บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ผลของภาวะเค็มต่อการเจริญเติบโตของพืช

ภาวะเค็มมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชในทุกระยะนับตั้งแต่เมล็ดเริ่มงอก สำหรับผลของภาวะเค็มที่มีต่อการงอกของเมล็ด พบว่าภาวะเค็มโดยเฉพาะจากโซเดียมคลอไรด์จะทำให้ความงอกลดลงและทำให้การงอกเกิดล่าช้า เนื่องจากเมล็ดพืชดูดน้ำเข้าไปยากขึ้น อันเป็นผลจากความเข้มข้นของสารละลายภายนอกเมล็ดพืชที่มีมากทำให้ค่า ชลศักย์ (water potential)ลดลง นอกจากนี้ยังมีผลของความเป็นพิษจากไอออนของเกลือที่สะสมในเมล็ดมากเกินไปด้วย (Debez, Chaibi และ Bouzid, 2001) จากการศึกษาผลของภาวะเค็มต่อการงอกของเมล็ดในเมล็ดพืชหลายชนิด พบว่า *Hordeum jubatum* จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดลดลงเมื่อเพาะในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ และพบว่าค่าออสโมติกที่ลดลงมีผลทำให้การงอกเกิดช้าลงด้วย (Ungar, 1974) Francois, Donovan และ Maas (1984) พบว่าภาวะเค็มในระดับที่ทำให้ค่าการนำไฟฟ้าสูงกว่า 8.2 dS/m จะทำให้เมล็ดข้าวฟ่าง (*Sorghum vulgare*) งอกล่าช้าลง อรุณศิริ กำลัง (2525) พบว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปในดินที่ใช้เพาะเมล็ดถั่วเหลือง ทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของถั่วเหลืองมีค่าลดลงและทำให้งอกช้าลงด้วย และแม้แต่เมล็ดของต้น *Atriplex halimus* L. ซึ่งเป็นพืชกลุ่มทนเค็ม (halophyte) ก็มีการงอกลดลงเมื่อได้รับโซเดียมคลอไรด์เพิ่มมากขึ้น แต่การทำให้เมล็ดมีบาดแผลจะทำให้เมล็ดของต้น *A. halimus* ที่อยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์นี้งอกดีขึ้น (Debez และคณะ ,2001)

ภาวะเค็มนอกจากจะมีผลต่อการงอกของเมล็ดแล้ว ยังมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นพืชด้วย Francois, Donovan และ Maas (1984) ทำการทดลองในข้าวฟ่าง พบว่าข้าวฟ่างมีการเจริญเติบโตสัมพัทธ์ลดลงเมื่อได้รับความเค็มเทียบเป็นค่าการนำไฟฟ้าสูงกว่า 3 dS/m Ungar (1974) วัดการเจริญเติบโตของ *Hordeum jubatum* เมื่อได้รับภาวะเค็ม 0-2 เปอร์เซ็นต์ โดยวัดค่าน้ำหนักแห้งต้นและรากและค่าความยาวต้นและราก ปรากฏว่าค่าทั้งหมดลดลงเมื่อระดับความเค็มของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีจำนวนใบเฉลี่ยลดลงอีกด้วย ผลของภาวะเค็มจะยับยั้งการเจริญเติบโตในส่วนต้นมากกว่าในส่วนราก (Munns และ Termaat, 1986) เช่น ต้น *Hordeum vulgare* ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ 40 80 และ 120 mM จะมีน้ำหนักแห้งต้นลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ ตามความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น แต่ในส่วนรากจะเริ่มมีน้ำหนักแห้งต้นลดลงเฉพาะที่ระดับเกลือ 120 mM (Delane และคณะ, 1982) ซึ่ง

ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันในข้าวโพด (Shalhevet, Huck และ Schroeder, 1995) และถั่วเหลือง (ศิริพรรณ บรรหาร, 2543; อัญชลี ใจดี, 2543) ที่ได้รับภาวะเค็ม นอกจากนี้ ภาวะเค็มยังทำให้ใบพืชมีขนาดเล็กลงแต่กลับมีความหนามากขึ้น เช่น ในใบ trifoliate แรกของถั่ว *Phaseolus vulgaris* L. ที่ได้รับภาวะเค็ม 48 mM ซึ่ง Wignarajah, Jennings และ Handley (1975) พบว่าการที่มีขนาดใบเล็กลงนี้เกิดเนื่องจากการแบ่งเซลล์ถูกยับยั้ง ทำให้จำนวนเซลล์และปริมาณ DNA ลดลงและมีชั้นของ spongy parenchyma หนามากขึ้น ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาโดย Nieman (1965) (อ้างถึงใน Wignarajah และคณะ, 1975)

ในระยะการเจริญเติบโตต่างๆ ของพืชแต่ละชนิด มีความสามารถในการทนต่อภาวะเค็มได้แตกต่างกัน Francois และคณะ (1984) กล่าวว่า ข้าวฟ่าง (Sorghum) ในระยะงอกของเมล็ดจะสามารถทนต่อภาวะเค็มได้ดีกว่าระยะถัดๆ มาของการเจริญเติบโต การศึกษาในพืชปลูกส่วนใหญ่ ระยะกล้าอ่อนจะเป็นระยะที่ไวอย่างยิ่งต่อภาวะเครียดจากความเข้มข้นของสารละลาย (solute stress) (Shalhevet, 1992 อ้างถึงใน Shalhevet และคณะ, 1995) เช่น ข้าวในระยะต้นกล้าจะไวต่อภาวะเค็มมากที่สุด (Flowers และYeo, 1981 อ้างถึงใน Yeo, Caporn และ Flowers, 1985) และหลังจากนั้นระยะสร้างเมล็ดจะเป็นอีกระยะหนึ่งที่ไวต่อภาวะเค็มซึ่งจะมีผลต่อผลผลิต (Pearson, 1959 อ้างถึงใน Yeo และคณะ, 1985)

จากงานวิจัยต่างๆ ข้างต้น จะเห็นได้ว่าภาวะเค็มมีผลกระทบต่อพืชตั้งแต่ระยะเมล็ดงอกจนกระทั่งพืชเจริญเติบโต ซึ่งในพืชแต่ละชนิดจะมีความไวต่อภาวะเค็มในระยะต่างๆ ของการเจริญเติบโตแตกต่างกัน นอกจากนี้ พืชชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ เช่น ถั่วเหลือง ก็อาจได้รับผลของภาวะเค็มต่อการเจริญเติบโตแตกต่างกันด้วย (ศิริพรรณ บรรหาร, 2543; อัญชลี ใจดี, 2543, พรศักดิ์ ภักดีวราภรณ์, 2543)

แอคคลิเมชัน (Acclimation)

Matthews และ Boyer (1984) ได้ให้คำอธิบายเกี่ยวกับคำว่า "acclimation" ไว้ดังนี้ คือ "acclimation จะเกิดขึ้นเมื่อพืชมีหนทางเลือกที่จะปรับกระบวนการภายในต้นพืชเพื่อตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ให้สามารถดำรงชีวิตได้ใกล้เคียงพืชที่อยู่ในภาวะปกติ ภายใต้สิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม" หรืออีกนัยหนึ่ง Umezawa และคณะ (2000) อธิบายว่าคือ การที่พืชสามารถปรับปรุงกลไกทางสรีรวิทยาภายในให้สามารถอยู่รอดได้ภายใต้การเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม มีการศึกษาวิจัยมากมายเกี่ยวกับ acclimation เช่น การปรับตัวให้ทนต่อภาวะแล้ง (drought acclimation) Matthews และ Boyer (1984) ได้ศึกษาถึงการให้ drought pretreatment กับทานตะวัน (*Helianthus annus* L. cv. IS894) พบว่าการลดปริมาณน้ำในเครื่องปลูกให้เหลือเพียง

25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วให้น้ำเต็มที่อีกครั้งเป็นเวลา 1 วันก่อนทำการงดให้น้ำ ทำให้ทานตะวันที่ได้รับ drought pretreatment มีการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลงน้อยกว่าต้นควบคุมที่ได้รับการงดให้น้ำโดยไม่ได้รับ drought pretreatment ซึ่งสัมพันธ์กับค่าชลศักย์ของน้ำ (water potential) ภายในใบพืชที่ลดลงเช่นกัน การศึกษาถึงวิธีการทำให้สามารถปรับตัวต่อภาวะเค็ม (salt acclimation บางครั้งเรียก salt adaptation หรือ salt hardening) มีการศึกษาในพืชหลายชนิด เช่น มะเขือเทศและฝ้าย (Kovalskaia, 1958 อ้างถึงใน Levitt, 1972) ทานตะวัน (Imre, 1968 อ้างถึงใน Levitt, 1972) ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* L.) (Amzallag และคณะ, 1990 และ Amzallag และคณะ, 1993) และถั่วเหลือง (Umezawa และคณะ, 2000)

จากการทดลองในมะเขือเทศและฝ้าย พบว่า พืชจะบาดเจ็บและได้รับความเสียหายถ้าหากได้รับความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ถ้าได้รับภาวะเค็มแบบค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นของเกลือและใช้ระยะเวลาที่นานมากขึ้น จะทำให้พืชมีความสามารถทนต่อภาวะเค็มได้ (Kovalskaia, 1958 อ้างถึงใน Levitt, 1972) นอกจากนี้ ยังพบว่า การรดสารละลายเกลือให้กับต้นถั่ว (pea) ข้าวโพดและทานตะวัน ในระยะงอก (germination period) จะสามารถเพิ่มความทนต่อภาวะเค็มได้ (Imre, 1968 อ้างถึงใน Levitt, 1972)

Amzallag และคณะ (1990) พบว่า ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* L.) ได้รับภาวะเค็มที่ระดับ 150 mM ซึ่งยังไม่เป็นอันตรายต่อพืช เป็นเวลา 20 วันก่อนได้รับภาวะเค็ม 300 mM จะทำให้ข้าวฟ่างสามารถรอดชีวิตและปรับตัวให้เจริญเติบโตและมีน้ำหนักแห้งต้นใกล้เคียงกับต้นปกติที่ไม่เคยได้รับภาวะเค็ม ต่อมาในปี 1993 Amzallag และคณะ ได้ทำการศึกษาต่อถึงรูปแบบของการให้ pretreatment และอายุของข้าวฟ่างที่ได้รับ pretreatment พบว่า ข้าวฟ่างอายุ 8 วัน ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นวันละ 25 mol m^{-3} จนถึง 150 mol m^{-3} และอยู่ที่ความเข้มข้นนี้ไม่เกิน 20 วัน (นับรวมตั้งแต่วันที่เริ่มได้รับโซเดียมคลอไรด์) แล้วจึงให้โซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นอีกวันละ 75 mol m^{-3} จนกระทั่งความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 300 mol m^{-3} จะทำให้ข้าวฟ่างมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการให้ pretreatment แบบอื่นๆ รวมถึงข้าวฟ่างที่ได้รับภาวะเค็มโดยไม่ได้รับ pretreatment และนอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการปรับตัวนี้จะยิ่งน้อยลงหากพืชเริ่มได้รับ pretreatment เมื่อมีอายุมากขึ้น

Rodri'guez และคณะ (1997) ทำการทดลองให้โซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันแบบค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ให้กับรากข้าวโพด โดยค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์วันละ 25 mM จนกระทั่งได้ความเข้มข้นสุดท้าย คือ 50 และ 100 mM เปรียบเทียบกับต้นที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายทันที พบว่า รากข้าวโพดที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์

แอคคลิเมชันมีการยืดยาวของรากไม่แตกต่างจากต้นปกติที่ไม่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ ในขณะที่รากข้าวโพดที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 50 และ 100 mM ทันทีจะชะงักการเจริญเติบโต และจะค่อยๆ ปรับตัวให้มีความยาวรากได้เท่ากับต้นควบคุมภายหลังภายในเวลา 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม รากข้าวโพดที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ 50 และ 100 mM ทันทีจะมีปริมาณน้ำในรากและค่า solute potential ลดลงรวดเร็วกว่าข้าวโพดที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชัน

Tsonev และคณะ (1998) ทำการทดลองให้โซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นวันละ 25 mM จนถึงความเข้มข้นสุดท้ายคือ 100 mM กับต้นกล้าข้าวบาร์เลย์อายุ 2 วัน เปรียบเทียบกับต้นที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ 100 mM ทันที พบว่าต้นที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นที่ละ 25 mM จะมีอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงสุทธิ (net photosynthesis rate) สูงกว่าต้นที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ 100 mM ทันที แต่มีปริมาณคลอโรฟิลล์ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้การทดลองนี้ยังทดลองเกี่ยวกับการให้ jasmonic acid เพื่อช่วยเพิ่มความสามารถในการปรับตัวต่อภาวะเค็ม พบว่าสามารถทำให้ข้าวบาร์เลย์มีอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงสุทธิมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ให้ jasmonic acid

Umezawa และคณะ (2000) ทำการทดลองเพิ่มความสามารถในการทนเค็มให้กับถั่วเหลือง โดยให้ pretreatment กับต้นกล้าอายุ 2-3 วัน โดยให้ได้รับ pretreatment จากการปลูกในสารละลายที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 34 และ 68 mM เป็นเวลา 23 วัน (จากการทดลองนำร่อง พวกเขาพบว่าการให้ pretreatment เป็นเวลาน้อยกว่า 10 วัน จะไม่ช่วยเพิ่มความสามารถในการทนเค็มของถั่วเหลือง) หลังจากนั้น ต้นกล้าที่ได้รับ pretreatment ทุกความเข้มข้นจะได้รับ salt treatment 3 ความเข้มข้น คือ 0 68 และ 137 mM พบว่า การให้ pretreatment ไม่ทำให้ต้นถั่วเหลืองที่ได้รับภาวะเค็ม 68 และ 137 mM มีน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นจากต้นที่ไม่ได้รับ pretreatment แต่พบว่า การให้ pretreatment ที่ระดับ 34 mM ก่อนได้รับภาวะเค็ม 137 mM ทำให้ถั่วเหลืองสะสมโซเดียมและคลอไรด์น้อยลง ในส่วนใบ ต้นและราก โดยเฉพาะปริมาณคลอไรด์ในส่วนใบและรากที่สะสมน้อยกว่าต้นที่ไม่ได้รับ pretreatment

พืชแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อภาวะเค็มแตกต่างออกไป และแตกต่างกันแต่ละช่วงของการเจริญเติบโต Choudhuri (1968) (อ้างถึงใน Levitt,1972) พบว่า พืชหลายชนิดมีความสามารถในการต้านทานต่อภาวะเค็มในระยะงอกน้อยกว่าในระยะต้นกล้า ดังนั้นการทำให้พืชมีความสามารถปรับตัวต่อภาวะเค็มก็ต้องคำนึงถึงชนิดและระยะของต้นพืชด้วย นอกจากนี้รูปแบบและระยะเวลาของการให้ salt pretreatment ก็มีความสำคัญที่อาจจะเพิ่มความสามารถในการทนเค็มให้กับพืช หรืออาจทำให้พืชยิ่งได้รับความเสียหายจากภาวะเค็ม

การสะสมสารบางชนิดในพืชเมื่อได้รับภาวะเค็ม

เมื่อพืชประสบกับภาวะเค็ม อันดับแรกที่พืชจะต้องเผชิญคือ ภาวะขาดน้ำจากการที่ความเข้มข้นของสารละลายภายนอกรากพืชมีมากกว่าภายในรากพืช อันเนื่องมาจากปริมาณไอออนของเกลือในดิน โดยเฉพาะเกลือต่างๆ สูงขึ้น ทำให้ค่าซลศักย์ของน้ำในดินลดลงจนอาจใกล้เคียงหรือต่ำกว่าภายในเซลล์รากพืช พืชจะดูดน้ำได้น้อยลง ดังนั้นเมื่อได้รับภาวะเค็ม พืชจะมีการตอบสนองบางประการเพื่อลดค่าซลศักย์ของน้ำภายในเซลล์ให้ต่ำกว่าภายนอก โดยการสะสมสารหรือไอออนต่างๆ เช่น น้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส (Liu และ Staden 2001) น้ำตาลแอลกอฮอล์ (Fougere และคณะ, 1991) glycine betaine (Robinson และ Jones, 1986; Ge'nard และคณะ, 1991 อ้างถึงใน McNeil, Nuccio และ Hanson, 1999) polyamines (Friedman และคณะ, 1989) โซเดียมไอออน และคลอไรด์ไอออน (Delane และคณะ, 1982; อรุณศิริ กำลัง 2525; อัญชลี ใจดี, 2534 และ พรศักดิ์ ภักดีวราภรณ์, 2543) และโพรลีน (Treichel 1986; Fougere และคณะ, 1991: Rodriguez และคณะ, 1997: Mattioni และคณะ, 1997และLutts และคณะ, 1999) เป็นต้น การปรับค่าออสโมติกของสารละลายภายในเซลล์พืชให้มีค่าต่ำลงเพียงพอนี้จะทำให้รากพืชสามารถดูดน้ำเข้าภายในเซลล์ได้ดีขึ้น (Taiz และ Zeiger, 1991)

อย่างไรก็ตาม รูปแบบการสะสมสารต่างๆ จะแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด รวมทั้งความสามารถในการทนเค็ม เช่น Liu และ Staden (2001) พบว่า เมื่อได้รับภาวะเค็ม cell line ของถั่วเหลืองพันธุ์ทนเค็มจะสะสมน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่พันธุ์ไม่ทนเค็มจะสะสมน้อยลง และการสะสมนี้จะเกิดสลับกันเมื่อสิ้นสุดภาวะเค็ม

การสะสมโพรลีนในพืช

โพรลีนเป็นกรดอมิโนชนิดหนึ่ง ที่มักถูกสะสมเพิ่มมากขึ้นในพืชหลายชนิดเมื่อได้รับภาวะเครียดออสโมติก ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้จากภาวะแล้งและเค็ม และจะลดลงสู่ระดับปกติเมื่อสิ้นสุดภาวะเครียดนั้น (Verma และคณะ, 1996) โพรลีนที่สะสมอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์จะช่วยลดค่า solute potential ภายในเซลล์พืชได้ นอกจากนี้ยังมีความสำคัญหลายประการต่อเซลล์พืช เช่น ช่วยถ่วงสมดุลของ solute potential ที่เกิดจาก Na^+ และ Cl^- (Stewart และ Lee, 1974) ช่วยกำจัดอนุมูลอิสระ (radical detoxification) (Smirnoff และ Cumbes, 1989 อ้างถึงใน Verslues และ Sharp, 1999) เมตาบอลิซึมของโพรลีนช่วยควบคุมสถานภาพของปฏิกิริยารีดอกซ์ภายในเซลล์ (Hare และ Cress, 1997 อ้างถึงใน Verslues และ Sharp, 1999) นอกจากนี้โพรลีนทำหน้าที่เกี่ยวพันกับระบบเยื่อหุ้มต่างๆ (Rudolph และคณะ, 1986 อ้างถึงใน Peng, Lu และ Verma, 1996)

ถ่วงสมดุลของอัตราส่วนระหว่าง NADH กับ NAD^+ ภายในเซลล์ (Alia และ Paradha Saradhi, 1993 อ้างถึงใน Peng, Lu และ Verma, 1996) และยังทำหน้าที่ป้องกันการเสื่อมสภาพ (denaturation) ของเอนไซม์ต่างๆ (Rajendrakumar และคณะ, 1994 อ้างถึงใน Peng, Lu และ Verma, 1996)

พืชชั้นสูงหลายชนิดสะสมโพรลีนเพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับภาวะเค็ม เช่น อัลฟัลฟา (Fouere และ คณะ, 1991) ข้าวโพด (Rodriguez, 1992) ข้าวฟ่าง (Mattioni และคณะ, 1992) ข้าว (Lutts และ คณะ, 1999) ในเซลล์แขวนลอยของ common ice plant (*Mesembryanthemum nodiflorum*) (Treichel, 1986) และยาสูบ (Kuznetsov และคณะ, 1997) นอกจากนี้พืชที่อยู่ในภาวะปกติก็สามารถพบการสะสมโพรลีนในอวัยวะบางส่วนที่มักมีการสูญเสียน้ำแม้ไม่ได้รับภาวะเครียดใดๆ เช่น ละอองเรณู เมล็ด (Chiang และ Dandekar, 1995; Hua และคณะ, 1997) ดอก และผล (Savour' และคณะ, 1995; Fujita และคณะ, 1998; Stines และคณะ, 1999 อ้างถึงใน Igarashi และคณะ, 2000)

ในพืชทนเค็ม (halophyte) หลายชนิดจะพบโพรลีนมากกว่ากรดอมิโนชนิดอื่นๆ ซึ่งพบว่ามีการสะสมโพรลีนมากขึ้นเมื่อปลูกในภาวะเค็ม และมีปริมาณโพรลีนลดลงสู่ระดับปกติเมื่อสิ้นสุดภาวะเค็ม การสะสมโพรลีนมากขึ้นในส่วนยอดคาดว่าเป็นการช่วยปรับค่าออสโมติกในต้นพืช (Stewart และ Lee, 1974) จึงอาจทำให้หลายคนคิดว่า ความสามารถในการทนเค็มจะเกิดควบคู่ไปกับการสะสมโพรลีน ซึ่งอาจจะเป็นจริงในพืชบางชนิด เช่น *Mesembryanthemum nodiflorum* (Treichel, 1986)

แต่ในพืชอีกหลายชนิดที่เป็นพืช glycophyte มีการศึกษาทดลองพบว่า พันธุ์พืชที่ไม่ทนเค็มจะสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้นมากกว่าพันธุ์ไม่เค็ม เช่น ในต้น mutant ของ *Arabidopsis* ที่มีความไวต่อภาวะเค็มสูง จะมีการสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้นมากกว่าต้นพันธุ์ป่า (wild type) ประมาณ 2 เท่า (Liu และ Zhu, 1997) นอกจากนี้ Aziz และคณะ (1998) ทำการทดลองในชิ้นใบของมะเขือเทศพันธุ์ทนเค็มและพันธุ์ไม่ทนเค็ม พบว่า พันธุ์ไม่ทนเค็มจะสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้นมากกว่าพันธุ์ทนเค็ม

Hanson และ Nelsen (อ้างถึงใน Moftah และ Michel, 1987) ให้ข้อสังเกตว่า การสะสมโพรลีนน่าจะเป็นอาการของความเสียหาย ซึ่งจากการศึกษาวิจัยถึงผลของภาวะเค็มในถั่วเหลืองของ พรศักดิ์ ภักดีวราภรณ์ (2543) ซึ่งพบว่า การสะสมโพรลีนจะมีความสัมพันธ์ในทางลบกับการเจริญเติบโต

จากการศึกษาการสะสมโพรลีนกับภาวะเค็มในถั่วเหลือง มีการทดลองในถั่วเหลืองพันธุ์ Bragg ซึ่งไม่ทนเค็ม จะมีการสะสมโพรลีนทั้งในใบบนและใบล่างเพิ่มขึ้นมากกว่าพันธุ์ Ransom ซึ่งทนเค็มมากกว่า (Moftah แ ละ Michel, 1987) และจากการศึกษาการสะสมโพรลีนในถั่วเหลืองทั้งในระดับห้องทดลองและแปลงทดลอง พบว่า ใบถั่วเหลืองที่ได้รับภาวะแล้งจะไม่สะสมโพรลีนจนกว่าใบจะแสดงอาการเหี่ยว (Waldren และ Teare, 1974; Waldren, Teare และ Ehler, 1974 อ้างถึงใน Moftah และ Michel, 1987) นอกจากนี้ในเซลล์แขวนลอยของยาสูบ (*Nicotiana sylvestris* L.)ที่ได้รับภาวะเค็ม ที่ระดับ 170-340 mM จะสะสมโพรลีนเพิ่มมากขึ้น (Kuznetsov และคณะ, 1997) Aziz และคณะ (1998) ได้ทดลองให้ภาวะเค็มกับชิ้นใบ (leaf disc) ของมะเขือเทศ พบว่า ทั้งพันธุ์ทนเค็มและพันธุ์ไม่ทนเค็มจะมีการสะสมโพรลีนเพิ่มมากขึ้น โดยจะสะสมสูงที่สุดเมื่อได้รับภาวะเค็มที่ระดับ 250-300 mM และพันธุ์ทนเค็มจะสะสมในปริมาณที่น้อยกว่าพันธุ์ไม่ทนเค็ม เช่นเดียวกันกับต้น Alfalfa ที่ได้รับภาวะเค็มสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้นในส่วนรากถึง 11.3 เท่า (Fougere และคณะ, 1991) และในข้าว Lutts, Majerus และ Kinet (1999) กล่าวว่า การสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้นเมื่อข้าวได้รับภาวะเค็มเป็นอาการของความเสียหายจากเกลือ

การสะสมโพรลีนเพิ่มมากขึ้นในพืชเมื่อได้รับภาวะเครียดจากความเค็มจะแตกต่างกันไปตามชนิดพืชและความสามารถในการทนเค็ม แต่อย่างไรก็ตามการสะสมโพรลีนยังคงสามารถเป็นตัวบ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมหรือภาวะที่พืชขึ้นอยู่ได้ เช่น ภาวะดินเค็มและภาวะแล้ง เป็นต้น

เมตาบิลิซึมของโพรลีน

Dierks-Ventling และ Tonelli (1982) ได้ทำการทดลองกับปลายรากข้าวโพด โดยให้กรดอะมิโนหลายชนิดที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีจากภายนอก พบว่าข้าวโพดสามารถนำกรดอะมิโนที่ให้ในอาหารวุ้นไปใช้ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการสังเคราะห์โพรลีนในข้าวโพดสามารถสังเคราะห์ได้จากทั้ง Glutamate และ Ornithine (Bryan,1990; Delauney และ Verma,1993 อ้างถึงใน Kishor และคณะ, 1995; Hu และคณะ,1992) เมื่อพืชได้รับภาวะเครียดออสโมติก (osmotic stress) พืชจะสังเคราะห์โพรลีนโดยใช้ Glutamate เป็นสารตั้งต้นมากกว่า ornithine (Delauney และคณะ, 1993; Boggass และ Stewart, 1976; Rhodes และคณะ, 1986 อ้างถึงใน Kishor และคณะ, 1995)

จากภาพที่ 1 glutamate จะถูกเปลี่ยนเป็น L-glutamyl-γ-semialdehyde (GSA) ซึ่งปฏิกิริยานี้ถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ Δ^1-pyyroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) ซึ่งควบคุมโดยยีน *P5CS* (เอนไซม์ P5CS ประกอบด้วยกิจกรรมของเอนไซม์ glutamyl kinase (γ-GK) และ

GSA dehydrogenase ซึ่ง γ-GK จะกระตุ้นปฏิกิริยาการเปลี่ยน glutamate เป็น L-γ-glutamyl phosphate และจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น GSA โดยการทำงานของเอนไซม์ GSA dehydrogenase) ทันที จากนั้น GSA จะถูกเปลี่ยนเป็น Δ^1-pyyroline-5-carboxylic acid (P5C) โดยไม่ต้องอาศัยตัวเร่งปฏิกิริยา และ P5C จะถูกเปลี่ยนเป็น proline โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Δ^1-pyyroline-5-carboxylate reductase (P5CR) ในการกระตุ้นปฏิกิริยา แต่ในกรณีที่สารตั้งต้นคือ ornithine โดยที่ ornithine จะถูกเปลี่ยนเป็น GSA ด้วยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ornithine-δ-aminotransferase (OAT) และจะผ่านกระบวนการเปลี่ยนจาก GSA ไปเป็น proline ด้วยกระบวนการเดียวกันกับการใช้ glutamate เป็นสารตั้งต้น

การสะสมโพรลีนที่เพิ่มมากขึ้น นอกจากจะเกิดจากกระบวนการสังเคราะห์โพรลีนที่เพิ่มขึ้นแล้ว ยังอาจเกิดจากการลดลงของกระบวนการสลายโพรลีนได้เช่นกัน (Stewart และคณะ, 1997; Stewart และ Boggess, 1978 อ้างถึงใน Verslues และ Sharp, 1999; Yoshiba และคณะ, 1997)ปฏิกิริยาการสลายโพรลีนจะเริ่มจาก Proline ถูกเปลี่ยนกลับไปเป็น P5C โดยการทำงานของเอนไซม์ Proline oxidase ต่อจากนั้น P5C จะถูกเปลี่ยนเป็น glutamate โดยเอนไซม์ P5C dehydrogenase (Brandriss และ Magasanik, 1979 อ้างถึงใน Peng, Lu และ Verma, 1996) ซึ่งปฏิกิริยาการสลายโพรลีนนี้เกิดขึ้นในไมโตคอนเดรีย (Yoshiba และคณะ, 1997)

งานวิจัยที่ศึกษาถึงการควบคุมการสังเคราะห์โพรลีน หลายงานวิจัยมุ่งเน้นที่การศึกษาถึงการแสดงออกของยีน *P5CR* Treichel (1986) (อ้างถึงใน Larosa และคณะ, 1991) คาดว่า *P5CR* เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสังเคราะห์โพรลีนในเซลล์แขวนลอยของ *Mesembryanthemum nodiflorum* เนื่องจากพบว่า เซลล์ได้รับภาวะเค็มจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ P5CR เพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาใน *Chlorella autotrophica* ซึ่งพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ P5CR เพิ่มขึ้นถึง 4 เท่าเมื่อได้รับภาวะเค็ม (Laliberte และ Hellebust, 1989 อ้างถึงใน Larosa และคณะ, 1991)

เอนไซม์ P5CR ในถั่วเหลืองถูกพบครั้งแรกใน cytoplasm ของปมราก (Kohl และคณะ, 1988; Chilson, Kelly-Chilson และ Siegel, 1991 อ้างถึงใน Szoke และคณะ, 1992) และเซลล์ใบถั่วเหลือง ข้าวบาร์เลย์ ยาสูบและถั่ว pea (Miao และคณะ, 1991; Nogushi, Koiwai และ Tamaki, 1966; Rayapati, Stewart และ Hack, 1989 อ้างถึงใน Szoke และคณะ, 1992)

Delauney และ Verma (1990) ได้โคลนยีน *P5CR* จากปมรากถั่วเหลือง และทำการศึกษาปริมาณ *P5CR* mRNA ในรากของต้นกล้าถั่วเหลืองที่ได้รับภาวะเค็มที่ระดับ 0.2 M พบว่า มี

ปริมาณ *P5CR* mRNA เพิ่มมากขึ้นถึง 6 เท่า จากการทดลองในลักษณะเดียวกันกับถั่ว pea (*Pisum sativum* L.) พบว่า รากของกล้าถั่ว pea ที่ได้รับภาวะเค็มจากสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.4 M NaCl จะมีปริมาณ *P5CR* mRNA ที่อยู่ในระยะ steady state เพิ่มมากขึ้นถึง 5 เท่าภายในเวลา 6 ชั่วโมง (Williamson และ Slocum, 1992) นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังได้โคลนยีน *P5CR* จากใบของถั่ว pea ด้วย

จากการศึกษายีน *At-P5C1* ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ P5CR ใน *Arabidopsis thaliana* และทำการวัดปริมาณ mRNA ด้วย พบว่า มี *P5CR* mRNA ปริมาณสูงในส่วนรากและในเมล็ดที่กำลังแก่ มากกว่าบริเวณส่วนอื่นๆ ที่มีสีเขียว และนอกจากนี้ใน *Arabidopsis* ที่ได้รับภาวะเค็มจะทำให้ *At-P5C1* เกิด transcription เพิ่มมากขึ้นถึง 5 เท่า ซึ่งส่งผลให้เกิดการสะสมโพรลีนเพิ่มมากขึ้นด้วย (Verbruggen, Villarroel และ Montagu, 1993)

Mattioni และคณะ (1997) ได้ทำการศึกษาผลของภาวะเค็มต่อเมตาบอลิซึมของโพรลีน พบว่า ต้นกล้าของ durum wheat (*Triticum durum*) ที่ได้รับภาวะเค็ม 200 mM จะสะสมโพรลีนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจากการศึกษาพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ P5CR เพิ่มมากขึ้น แต่กลับพบว่าระดับของการแสดงออกของยีน *P5CR* ไม่แตกต่างจากพืชชุดควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ proline dehydrogenase ถูกยับยั้ง

จากหลักฐานการเพิ่มขึ้นของ *P5CR* mRNA และกิจกรรมของเอนไซม์ P5CR ในพืชหลายชนิดที่สะสมโพรลีนเพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับภาวะเค็ม Szoke และคณะ (1992) ได้ทำการทดลองถ่ายยีน *P5CR* cDNA ของถั่วเหลืองเข้าสู่ยาสูบ ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *CaMV-35S* ซึ่งจะทำให้ยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนนี้มีกิจกรรมของเอนไซม์ P5CR ใน cytoplasm เพิ่มมากขึ้นถึง 50 เท่า แต่กลับไม่พบว่ามี P5C (pyrroline-5-carboxylic acid) และโพรลีนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งคณะผู้วิจัยสรุปว่า เอนไซม์ P5CR อาจไม่ใช่เอนไซม์ที่ควบคุมการสังเคราะห์โพรลีน นอกจากนี้ยังมีการทดลองในเซลล์แขวนลอยของยาสูบที่ได้รับภาวะเค็มระดับ 428 mM (Larosa และคณะ, 1991) พบว่า มีการสะสมโพรลีนเพิ่มมากขึ้น แต่ไม่พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ P5CR เพิ่มมากขึ้น จึงไม่น่าจะเป็นปฏิกิริยาขั้นควบคุมการสังเคราะห์โพรลีน และการทดลองนี้ยังสามารถพิสูจน์ให้เห็นว่าโพรลีนที่สะสมเพิ่มมากขึ้นนี้ สังเคราะห์มาจาก glutamate

ในขณะที่มีการสนใจศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ P5CR และการแสดงออกของยีนดังกล่าว มีนักวิจัยหลายคณะเริ่มให้ความสนใจกับเอนไซม์และยีน *P5CS* เพิ่มมากขึ้น และต่างก็พบว่าปฏิกิริยา 2 ขั้นตอนแรกที่ถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ P5CS น่าจะเป็นขั้นควบคุมปฏิกิริยาในการสังเคราะห์โพรลีนมากกว่าขั้นตอนที่กระตุ้นการสังเคราะห์โพรลีนด้วยเอนไซม์ P5CR

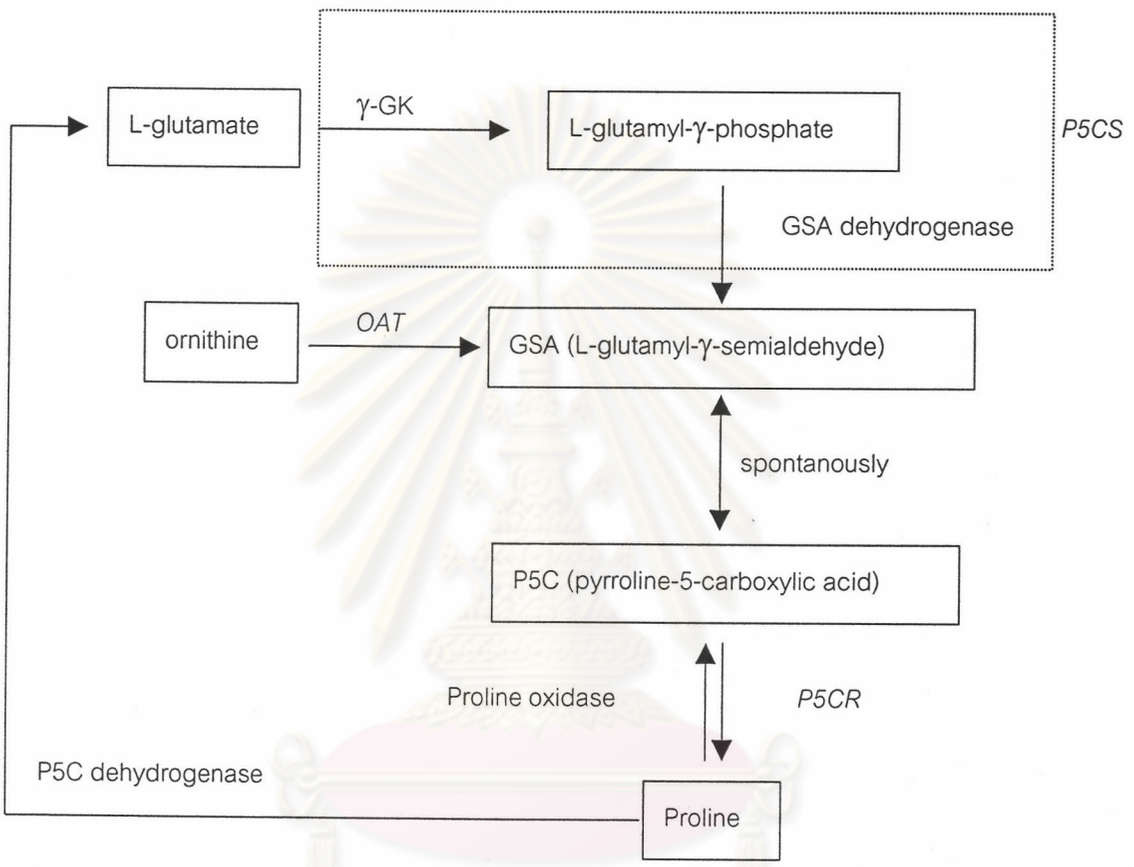
Hu และคณะ (1992) ได้ทำการแยก cDNA ของยีน *P5CS* จากถั่ว *mothbean (Vigna aconitifolia)* พร้อมทั้งศึกษาการแสดงออกของยีนนี้ พบว่า ยีน *P5CS* มี transcription เพิ่มมากขึ้นในใบของ mothbean มากกว่าในรากและปมราก ในรากยีนนี้จะมี transcription เพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับภาวะเค็ม จากโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 mM ผู้วิจัยสรุปว่าระดับของเอนไซม์ P5CS อาจเป็นสิ่งที่ควบคุมกระบวนการเปลี่ยนจาก glutamate มาเป็น P5C และการควบคุมการสังเคราะห์โพรลีนไม่เพียงแต่มีการควบคุมแบบย้อนกลับเท่านั้น แต่ยังสามารถควบคุมได้ในขั้นตอนของ transcription อีกด้วย ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณไนโตรเจนภายในเซลล์ นอกจากนี้ Zhang Lu และ Verma (1995) ยังพบว่าเอนไซม์ γ-GK ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของเอนไซม์ P5CS ใน *Vigna aconitifolia* ถูกควบคุมแบบย้อนกลับได้ด้วยปริมาณโพรลีน และ ADP

Kishor และคณะ (1995) ทำการทดลองโดยทำให้ยีน *P5CS* มีการแสดงออกมากกว่าปกติ (over expression) โดยการถ่ายยีน *P5CS* ของ mothbean เข้าสู่ต้นยาสูบ พบว่ายาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนจะมีปริมาณเอนไซม์ P5CS เพิ่มมากขึ้น และสามารถสังเคราะห์โพรลีนเพิ่มมากขึ้นถึง 2 เท่าเมื่อได้รับภาวะแล้ง และเมื่อได้รับภาวะเค็มระดับ 0.4 M ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และยังทำให้มีจำนวนดอกและอัตราการติดฝักเพิ่มมากขึ้นด้วย แต่จากการทดลองศึกษาต้น *Arabidopsis* ที่กลายพันธุ์ไป 1 ตำแหน่งยีน (*sos1* mutant) จะมีการตอบสนองต่อภาวะเค็มจากโซเดียมคลอไรด์มากกว่าปกติ เมื่อได้รับภาวะเค็ม ต้น sos1 mutant นี้จะสะสมโพรลีนมากกว่าต้น wild type ซึ่งพบว่ายีน *P5CS* มีการแสดงออกมากกว่าปกติ (over expression) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้นไม่ได้ทำให้พืชทนเค็มได้มากขึ้น (Liu และ Zhu, 1997)

Fujita และคณะ (1998) ได้ทำการแยกยีน *tomPRO1* และ *tomPRO2* โดยที่ยีน *tomPRO2* จะ encode ให้เอนไซม์ P5CS ที่สมบูรณ์จากมะเขือเทศ เมื่อได้รับภาวะเค็มจากโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 mM ยีน *tomPRO2* จะมี transcription เพิ่มมากขึ้นไม่ถึง 3 เท่า ในขณะที่มีโพรลีนสะสมทั้งในส่วนใบและรากเพิ่มมากขึ้นถึง 60 เท่า คณะผู้วิจัยให้ความเห็นว่าการสังเคราะห์โพรลีนในมะเขือเทศเมื่อได้รับภาวะเครียดออสโมติกเช่นภาวะเค็มนี้ ยีน *P5CS* อาจถูกควบคุมในขั้นตอนอื่นที่ไม่ใช่ขั้นตอน transcription

นอกจากนี้ในปี 1999 Lutts, Majerus และ Kinet ให้ข้อสรุปของงานทดลองในข้าวว่า การสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเพราะกิจกรรมของเอนไซม์ OAT (ornithine-δ-aminotransferase) เพิ่มขึ้นร่วมกับปริมาณของ glutamate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นเพิ่มมากขึ้น แต่การทดลองนี้ไม่ได้ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ P5CS

จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่า เอนไซม์ที่สำคัญในการควบคุมการสังเคราะห์โพรลีนในพืช คือ เอนไซม์ P5CS ซึ่งการแสดงออกของยีน P5CS จะถูกควบคุมได้ทั้งแบบย้อนกลับโดยปริมาณโพรลีน และถูกควบคุมได้ในระดับ transcription หรือขั้นตอนอื่นๆ ซึ่งแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด



รูปที่ 1 กลไกการสังเคราะห์โพรลีนในพืชโดยใช้ glutamate และ ornithine เป็นสารตั้งต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

γ-GK = glutamate kinase

OAT = ornithine-δ-aminotransferase

P5CS = Δ^1-pyrroline-5-carboxylate synthetase

P5CR = Δ^1-pyrroline-5-carboxylate reductase