ผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณโพรลีนในแคลลัสสละ

เจนนี่ เจา[1] สายสุณีย์ ลิ้มชูวงศ์[1,2] สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ[1,2] และสุรศักดิ์ ละลอกน้ำ[2,3*]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร 10110
[2]หน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร 10110
[3]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร 10110
*E-mail: surasakl@swu.ac.th

รับบทความ: 12 กันยายน 2553 ยอมรับตีพิมพ์: 16 พฤศจิกายน 2553

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาปริมาณโพรลีนของแคลลัสสละภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 – 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณโพรลีนในแคลลัสสละ เพิ่มขึ้นภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจาก NaCl เพิ่มขึ้น และที่ความเข้มข้นของ NaCl ร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ปริมาณโพรลีนสูงสุด ดังนั้นแคลลัสสละมีการสะสมโพรลีนภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl

คำสำคัญ: แคลลัสสละ โพรลีน ความเครียดจากเกลือ

Effect of Salt Stress on Proline Content in Snake Palm Callus

Jenny Chao[1] Saisunee Limchoowong[1,2] Somkiat Phornphisutthimas[1,2] and Surasak Laloknam[2,3*]

[1] Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand
[2] Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning, Faculty of science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand
[3] Department of General Science, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand
E-mail: surasakl@swu.ac.th

Abstract

This research was to study the effect of salt stress on proline content in snake palm (*Salacca zalacca*) by observing callus growth under sodium chloride (NaCl) concentrations 0 – 1% (w/v) for 4 weeks. The results revealed that the calli were increasing accumulated of proline content when the concentration of NaCl increased. 0.8% (w/v) of NaCl showed highest proline content in calli. Snake palm calli were enhanced proline content under salt stress conditions.

Keywords: Snake palm calli, Proline, Salt stress

บทนำ:

ต้นสละ (snake palm) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Salacca zalacca* เป็นพืชที่สามารถผลิตน้ำมันได้ ทำให้มีโอกาสที่จะนำมาปลูกเป็นพืชผลิตน้ำมันนอกจากปาล์มและมะพร้าว (อัจฉริยา รังษิรุจิ และคณะ, 2549) ทำให้สละเป็นพืชเศรษฐกิจที่ทำรายได้ให้แก่เกษตรกรในประเทศนอกจากนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป

บางพื้นที่ของประเทศไทยประสบกับปัญหาดินเค็มไม่สามารถทำการเกษตรได้ โดยเฉพาะบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ความเค็มทำให้เกิดความเครียดจากแรงดันออสโมติก (osmotic stress) และความเป็นพิษของไอออนโซเดียมในพืช ส่งผลต่อการเจริญของพืชบางชนิด เช่น หอมใหญ่ ถั่วเขียว และสละ (Limchoowong et al., 2009; Laloknam et al., 2008a; 2008b) ดังนั้นจึงมีความพยายามคัดเลือกพืชที่สามารถเจริญได้ภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ แต่เมื่อนำไปปลูกในสภาพพื้นที่จริงไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (พจมาลย์ สุรนิลพงษ์ และคณะ, 2543)

โพรลีน (proline) เป็นสารออสโมโพรเทคแทนต์ (osmoprotectants) ชนิดหนึ่งอยู่ในกลุ่มกรดอะมิโนทำหน้าที่ในการรักษาสมดุลของน้ำและแรงดันออสโมติกภายในเซลล์กับสิ่งแวดล้อม เซลล์สามารถสะสมโพรลีนได้ 2 กลไก คือ การสะสมสารด้วยการสังเคราะห์ และการนำสารจากสิ่งแวดล้อมเข้าสู่เซลล์ โพรลีนช่วยลดแรงดันออสโมติกและส่งเสริมให้พืชเจริญได้ภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ (Limchoowong et al., 2009; Laloknam et al., 2008a; 2008b) การศึกษาครั้งนี้ต้องการศึกษาผลของความเครียดจากเกลือต่อปริมาณโพรลีนในแคลลัสสละ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในพื้นที่ที่มีความเค็มเพื่อเพิ่มผลผลิตของสละต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมแคลลัสสละ

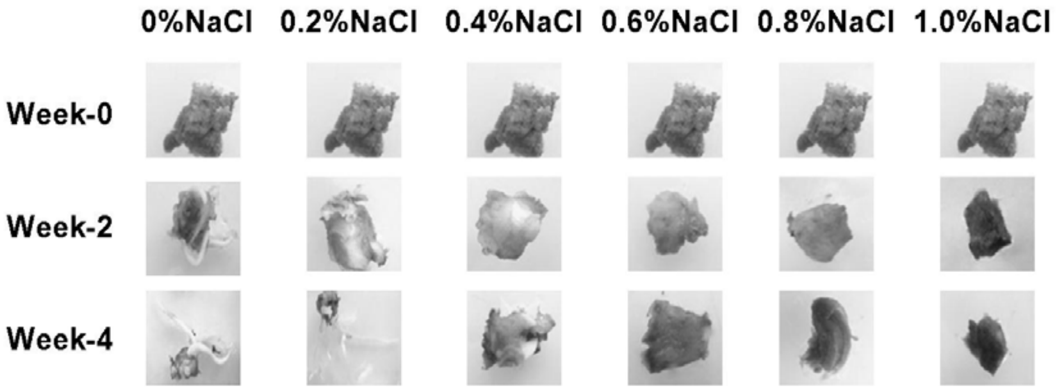
นำสละมาแยกส่วนเมล็ดออกเพื่อใช้ในการทดลอง นำเมล็ดมาทำความสะอาดและฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวเมล็ดด้วยสารละลายคลอรอกซ์ (Clorox) จากนั้นนำเมล็ดใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการแยกเอมบริโอสละมาเพาะเลี้ยงให้เกิดแคลลัส ย้ายแคลลัสสละให้เจริญในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงสีขาว แล้วสังเกตการเจริญของแคลลัสสละทุก 7 วัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ แล้วหาปริมาณโพรลีนในแคลลัสสละ

วิธีการหาปริมาณโพรลีน

ทำการหาปริมาณโพรลีนโดยดัดแปลงจากวิธีของ Bate et al. (1973) ดังนี้ นำแคลลัสที่ใช้ในการศึกษาหนัก 0.5 กรัม บดกับกรดซัลโฟซาลิไซลิคเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 2 แล้วนำสารละลายที่กรองได้เติมกรดนินไฮดรินปริมาตร 2 มิลลิลิตร และกรดอะซิติก ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมโทลูอีนปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปล่อยให้แบ่งชั้นประมาณ 1 – 2 นาที แล้วดูดชั้นโทลูอีนที่มีสีชมพูอยู่ด้านบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานโพรลีน

ผลการวิจัย และอภิปรายผล

จากการศึกษาผลของความเค็มต่อการเจริญของแคลลัสสละโดยนำแคลลัสสละไปเจริญในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงสีขาว เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ความเข้มข้นของ NaCl ที่เพิ่มขึ้นทำให้การเจริญของแคลลัสสละลดลงและแคลลัสไม่สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้น NaCl ร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาพที่ 1) สอดคล้องกับการศึกษาของ Limchoowong et al. (2009)



ภาพที่ 1 ผลของความเข้มข้นของ NaCl ต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสสละในสัปดาห์ที่ 0, 2 และ 4

ทำการศึกษาปริมาณของโพรลีนในแคลลัสสละที่เจริญในอาหารแข็งสูตร MS ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงสีขาว ทุกๆ 1 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ แสดงผลดังภาพที่ 2

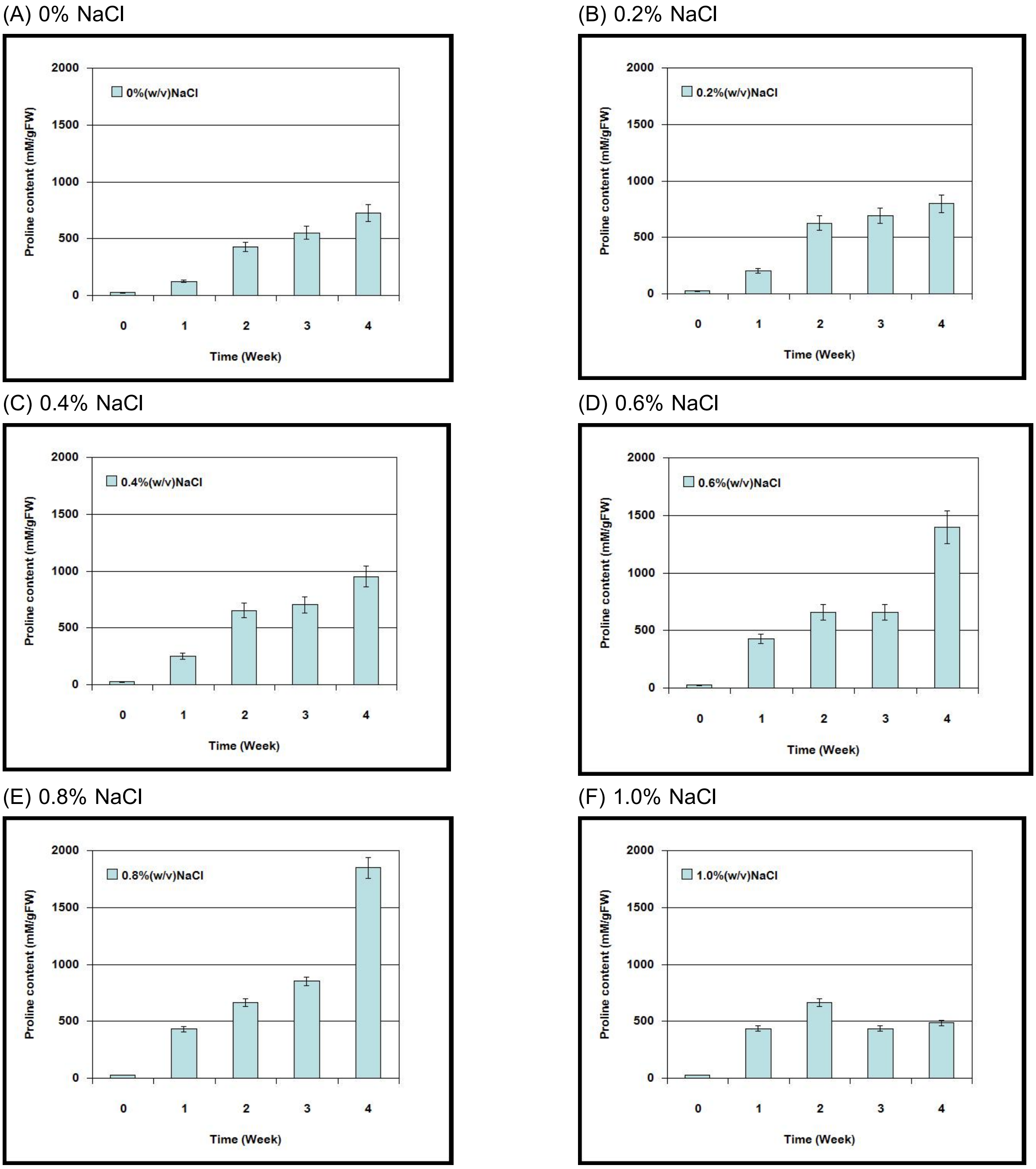
ที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl ในสัปดาห์ที่ 0 – 2 ให้ปริมาณโพรลีนในแคลลัสสละไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 3 ปริมาณโพรลีนในแคลลัสสละสูงขึ้นที่ความเข้มข้นของ NaCl ร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาพที่ 2C) และที่ความเข้มข้นของ NaCl สูงกว่าร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณโพรลีนลดลง (ภาพที่ 2F) ระดับโพรลีนเพิ่มขึ้นประมาณ 2 – 3 เท่า ที่ระดับความเข้มข้นของ NaCl 0.4 – 0.8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาพที่ 2C – 2D)

โพรลีนเป็นกรดอะมิโนแสดงสมบัติเป็นสารออสโมโพรเทคแทนท์ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่ส่งเสริมให้สิ่งมีชีวิตนั้นเจริญได้ภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณโพรลีนเพิ่มขึ้นสามารถเป็นสารออสโมโพรเทคแทนท์ได้เพราะแคลลัสสละสามารถเจริญได้ภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ เช่นเดียวกับโพรลีนส่งเสริมการงอกของรากในหัวหอมใหญ่ และถั่วเขียว (Laloknam et al., 2008a, 2008b) และพืชในป่าโกงกาง เช่น ต้นแสม (*Avecennai marina*) สะสมโพรลีนและบีเทนภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือโดยอาศัยตัวขนส่งโพรลีน/บีเทน ทรานสพอร์เตอร์ (proline/betaine transporter) โดยทำการแสดงออกของยีนใน *E. coli* (Waditee et al., 2002) ดังนั้นการศึกษาขั้นต่อไป อาจศึกษาถึงผลของความเข้มข้นของโพรลีนต่อการเจริญของสละ

ทั้งนี้ปริมาณโพรลีนที่ความเข้มข้น NaCl ไม่เกินร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นปริมาณโพรลีนที่ไม่เป็นพิษต่อแคลลัสสละทำให้สามารถเจริญเติบโตได้ ในขณะที่ความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อาจจะให้ปริมาณโพรลีนที่มากจนเกิดความเป็นพิษต่อแคลลัสสละได้

จากการศึกษาทำให้เห็นว่าแคลลัสสละเจริญได้ภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือมาจาก 2 กลไก คือ การสะสมสารออสโมโพรเทคแทนท์จากการสร้างขึ้นภายในเซลล์และการนำเข้าด้วยโปรตีนขนส่งที่เยื่อหุ้มเซลล์ เรียกว่า ทรานส-พอร์เตอร์ เช่นเดียวกับไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica* สะสมสารออสโมโพรเทคแทนท์บีเทนภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือโดยการนำเข้าจากภายนอกเซลล์ด้วย บีเทนทรานสพอร์เตอร์ (betaine transporter) และสร้างขึ้นภายในเซลล์ด้วยเอนไซม์ glycine sarcosine methyl transferase และ dimethyl glycine transferase (Laloknam et al., 2006; Waditee et al., 2003)

โพรลีนเป็นสารออสโมโพรเทคแทนท์ในพืชช่วยทำให้พืชเจริญเติบโตได้ภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl เช่น ในข้าวบาร์เลย์ ข้าวป่า หอมใหญ่ ถั่วเขียว และสตรอเบอรี่ (Laloknam et al., 2008a; 2008b; สุกัญญา ใจโพธิ์ และ สุรินทร์ นิลสำราญจิต, 2545; ปานแก้ว อักษรขำ, 2546; วาสินี พงษ์ประยูร, 2550; นวรัตน์ อุดมประเสริฐ และ อมรรัตน์ พรหมบุญ, 2537)



ภาพที่ 2 ปริมาณโพรลีนในแคลลัสสละภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สละสามารถเจริญได้ภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ แต่เมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นการเจริญของสละจะลดลง โพรลีนแสดงสมบัติเป็นสารออสโมโพรเทคแทนต์ในสละทำให้สละสามารถเจริญได้ภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ (Limchoowong et al, 2009) และแคลลัสสละมีการสะสมโพรลีนภายใต้ภาวะเครียดจากเกลือ NaCl ทำให้สรุปได้ว่าแคลลัสมีกลไกในการทนเค็มอย่างน้อย 2 กลไก ได้แก่ การนำโพรลีนเข้าสู่เซลล์ และการสะสมโพรลีนจากการสังเคราะห์ภายในเซลล์ ซึ่งอาจจะต้องทำการศึกษาต่อไปถึงระดับความเป็นพิษของโพรลีน และการศึกษาระดับโมเลกุลต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป ภาควิชาชีววิทยา หน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อม

เพื่อการเรียนรู้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่เอื้อเฟื้อวัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และสถานที่ ในการทำวิจัย รวมถึงการสนับสนุนให้นำเสนอผลการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

นวรัตน์ อุดมประเสริฐ และอมรรัตน์ พรหมบุญ. 2537. การใช้ลักษณะการสะสมปริมาณโพรลีนเนื่องจากสภาวะขาดน้ำบ่งบอกถึงความทนแล้งในข้าวบาร์เลย์. ใน **รายงานผลการวิจัยในการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 32** วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2537 (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก http://kucon.lib.ku.ac.th/Fulltext/KC3201007.pdf

ปานแก้ว อักษรขำ. 2546. **การศึกษาความทนเค็มของข้าวป่าบางชนิด.** วิทยานิพนธ์การศึกษามหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

พจมาลย์ สุรนิลพงศ์ สุภาวรัตน์ ชาญยุทธ และอารีย์ วรัญญูวัฒน์. 2543. การปรับปรุงพันธุ์อ้อยทนเค็ม. **วารสารเทคโนโลยีสุรนารี** 7: 217-223.

วาสินี พงษ์ประยูร. 2550. **การตอบสนองต่อความเค็มโดยการสะสมโพรลีนในข้าวสารพันธุ์ไทย.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก http://stang.sc.mahidol.ac.th/text/pdf/thesis/2007/PLANS_2007_W319r.pdf.

สุกัญญา ใจโพธิ์ และ สุรินทร์ นิลสำราญจิต. 2545. ผลของสภาวะเครียดจากน้ำต่อปริมาณโพรลีนและการเติบโตของสตอเบอรี่. **วารสารเกษตร** 18(3): 201-209.

อัจฉริยา รังษิรุจิ ฐปวิตรา ผ่องแผ้ว และธวัช ดอนสกุล. 2549. คาริโอไทป์ของพืชสกุลระกำ *(Salacca)* บางชนิดในประเทศไทยและประเทศอินโดนีเซีย. **วารสารวิทยาศาสตร์ มศว** 22(2): 49-61.

Laloknam, S., Sirisopana, S., Limchoowong, S., Phornphisutthimas, S., Kosiarpa, T., Areeyadej, W., Puangkwan, P., and Nilapai, Y. 2008a. Betaine, Glycerol, and Proline enhance seed germination and plant growth of Mung bean (*Vigna radiata* L.) under high salinity. T**he 34th Congress on Science and Technology of Thailand**. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand: (CD-ROM).

Laloknam, S., Suksanchananun, C., Phornphisutthimas, S., Sirisopana, S., Limchoowong, S., and Rai, V. 2008b. **Reduction of salt stress in onion root by glycerol, betaine and proline.** The 4th Naresuan Research Conference. Naresuan University, Pisanulok, Thailand: (CD-ROM).

Limchoowong, S., Suwanpibul, S., Phornphisutthimas, S., and Laloknam, S. 2009. Proline promotes growth of snake palm under salt stress condition. **Naresuan Agri. J**. 12(Suppl.): 404-409.

Waditee, R., Hibino, T., Tanaka, Y., nakamura, T., Incharoensakdi, A., Hayakawa, S., Suzuki, S., Futsuhara, Y., kawamitsu, Y., Takabe, T., and Takabe, T. 2002. Functional Characterization of Betaine/Proline Transporters in Betaine-accumulating Mangrove. **J. Biol. Chem.** 277(21): 18373-18382.

Waditee, R., Tanaka, Y., Aoki, K., Hibino, T., Jikuya, H., Takano, J., Takabe, T., Takabe, T. 2003. Isolation and Functional Characterization of N-Methyltransferases that Catalyze Betaine Synthesis from Glycine in a Halotolerant Photosynthetic Organism *Aphanothece halophytica*. **J. Biol. Chem.** 278: 4932-4942.