บทบาทของสารไกลซีนเบตาอีน แคลเซียมและโพแทสเซียม ในกระบวนการชักนำให้ต้นกล้ามะเขือเทศเกิดความทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูง

Role of Glycinebetaine, Calcium and Potassium on Induction of Heat Tolerance in Tomato Seedlings

นิลวรรณ นิ่มน้อย และ สิริวัฒน์ สาครวาสี*

NinlawanNimnoy and SiriwatSakhonwasee*

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชสวน) คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

Master of Science Program in Horticulture, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai 50290

* Corresponding author: siriwat@mju.ac.th

Abstract

Supra-optimal temperature induces heat stress in plants which in turn affect quality and quantity of agricultural products negatively. Induction of heat tolerance by exogenous application of Glycinebetaine (GB) is an alternative approach which can alleviate the effect of heat stress during plant cultivation. However, the mechanism of GB on induction of heat tolerance is not well understood. This study investigated the involvement of calcium on the mechanism of GB using calcium channel blocker, Verapamil (VP), and potassium channel blocker, Tetraethylammonium Chloride (TEA) and tomato seedlings as a plant model. Results showed that tomato seedlings received foliar application of GB had higher photosynthetic rate, stomatal conductance, maximum quantum efficiency of PSII, quantum efficiency of PSII fresh weight and dry weight than the control received only water. Moreover, application of GB resulted in lower amount of Malondialdehyde and percentage of ion leakage of leaf tissue when compared to the control under heat stress condition. Application of either calcium or potassium channel blockers negated all the positive effects of GB. Results implied that the mechanism of GB-induced heat

tolerance could be associated with the change of cellular concentration of calcium and potassium.

Keywords: Glycinebetaine, Heat stress, Calcium

บทคัดย่อ

สภาพอุณหภูมิสูงเกินความเหมาะสมก่อให้เกิดสภาวะเครียดในพืชซึ่งจะส่งผลเสียต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิตในภาคการเกษตร การชักนำให้พืชทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูงโดยให้สารละลายไกลซีนเบตาอีน (Glycinebetaine หรือ GB) จากภายนอกเป็นหนทางหนึ่งที่ช่วยบรรเทาผลกระทบในเชิงลบของสภาพอุณหภูมิสูงต่อการปลูกพืชได้ แต่กลไกการทำงานของ GB ในสภาพอุณหภูมิสูงยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด งานวิจัยนี้จึงศึกษาความเกี่ยวข้องของแคลเซียมในกลไกการทำงานของ GB โดยให้สารยับยั้งการทำงานของช่องโปรตีนแคลเซียมเวอร์ราปามิล (Verapamil) และสารยับยั้งการทำงานของช่องโปรตีนโพแทสเซียม (Tetraethylammonium Chloride) ร่วมกับ GB โดยใช้ต้นกล้ามะเขือเทศเป็นพืชทดสอบจากการทดลองพบว่า การให้ GB ทางใบที่ความเข้มข้น 1 mM แก่ต้นกล้ามะเขือเทศที่ปลูกในสภาพอุณหภูมิสูงส่งผลให้ต้นมะเขือเทศมีค่าอัตราการสังเคราะห์แสง ค่าอัตราการนำไหลของปากใบ ค่าประสิทธิภาพการทำงานสูงสุดและประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสงหมายเลขสอง น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากกว่าของต้นควบคุมที่ได้รับน้ำเปล่าในสภาพเดียวกัน อีกทั้งการให้ GB ยังส่งผลให้ปริมาณมาลอนดิอัลดีไฮด์และเปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของไอออนในใบต่ำกว่าต้นที่ได้รับน้ำเปล่า ด้วยการให้สารยับยั้งการทำงานของช่องโปรตีนแคลเซียมและโพแทสเซียมลดทอนอิทธิพลในเชิงบวกของ GB ทั้งหมด ผลการทดลองในครั้งนี้แสดงนัยว่ากลไกการชักนำให้พืชทนร้อนด้วย GB น่าจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแคลเซียมและโพแทสเซียมภายในเซลล์

คำสำคัญ: ไกลซีนเบตาอีนแคลเซียม ความเครียดจากสภาพอุณหภูมิสูง มะเขือเทศ

คำนำ

สภาพอุณหภูมิสูงเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้ผลผลิตในภาคการเกษตรลดลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่เขตร้อน โดยสภาพอุณหภูมิที่สูงขึ้นเพียง 1 องศาเซลเซียส อาจทำให้ผลผลิตข้าวลดลงได้ถึง 10 % (Peng *et al.*, 2004) นอกจากนี้อุณหภูมิที่สูงเกินความเหมาะสมทำให้ประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของพืชลดลงได้ เช่น ในผักโขมที่ปลูกในสภาพอุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส พบว่ามีประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงลดลงถึงประมาณ 80 % (Yamane *et al.*, 1998) ในมะเขือเทศพบว่าสภาพอุณหภูมิสูงที่ 45 องศาเซลเซียส ทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งไม่ได้เป็นผลมาจากการปิดของปากใบแต่กลับมีสาเหตุมาจากการยับยั้งการทำงานของปฏิกิริยาคาร์บอนและปฏิกิริยาแสงเป็นหลัก (Camejo *et al.*, 2005) ผลกระทบในเชิงลบที่เกิดขึ้นกับการสังเคราะห์แสงนี้ถือเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ทำให้

ผลผลิตของพืชที่ปลูกในสภาพอุณหภูมิสูงมีปริมาณและคุณภาพลดลง

ไกลซีนเบตาอีน (Glycinebetaine หรือ GB) เป็นอนุพันธ์ของอามีน ที่มีคุณสมบัติเป็นสารคอมแพททิเบิลโซลูท (Compatible solute) ที่เซลล์ของพืชสามารถสะสมไว้ได้ในปริมาณสูงโดยไม่เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ พืชหลายชนิดสามารถสังเคราะห์ GB ได้ภายในเซลล์โดยจะมีการสะสมในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อพืชเผชิญสภาวะเครียดรูปแบบต่างๆ (Chen and Murata, 2011) ด้วยเหตุนี้จึงมีงานวิจัยการถ่ายยีนสังเคราะห์ GB ให้กับพืชเพื่อจุดประสงค์ในการเพิ่มความทนทานต่อความเครียด เช่น การถ่ายยีน *codA* ซึ่งทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ไกลซีนเบตาอีนจากสารโคลีนให้แก่มะเขือเทศ และพบว่ากล้ามะเขือเทศมีการแสดงออกของยีน HSP70 (Heat-shock protein 70) เพิ่มขึ้นพร้อมกับมีความทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูงมากขึ้นด้วย (Li *et al.*, 2011) นอกจากนี้การให้ GB แก่พืชโดยตรงยังสามารถชักนำให้พืชมีความทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูงเพิ่มขึ้นด้วย เช่น ในต้นดาวเรืองการพ่นสารละลาย GB ที่ความเข้มข้น 1 mM ให้ทางใบ พบว่ามีผลทำให้อัตราการสังเคราะห์แสงสูงขึ้นกว่าต้นที่ได้รับน้ำเปล่าเพียงอย่างเดียว (Sorwong and Sakhonwasee, 2015) อย่างไรก็ตามกลไกการชักนำให้พืชทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูงโดยไกลซีนเบตาอีนไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

งานวิจัยของ Li *et al.* (2011) แสดงให้เห็นว่าการมี GB สะสมภายในเซลล์พืชทำให้เซลล์สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน HSP70 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการบรรเทาความเครียดจากสภาพอุณหภูมิสูงได้ ในขณะเดียวกันงานวิจัยของ Saidi *et al.* (2009) ก็บ่งชี้ว่าการตอบสนองของเซลล์พืชรวมไปถึงการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน HSP ในสภาพอุณหภูมิสูงต้องอาศัยแคลเซียมไอออนเป็นตัวส่งสัญญาณ ทั้งนี้การไหลเข้าและออกของแคลเซียมผ่านทางช่องโปรตีน (channel) ในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของแคลเซียมภายในเซลล์ซึ่งเปรียบเสมือนสัญญาณที่ชักนำให้เซลล์มีการตอบสนองต่อสภาพอุณหภูมิสูง จึงเป็นที่มาของสมมุติฐานว่ากลไกการชักนำให้พืชทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูงโดย GB อาจเกี่ยวข้องกับการไหลเข้าและออกของแคลเซียมภายในเซลล์โดยข้อเท็จจริงมีรายงานก่อนหน้านี้แล้วว่า GB ชักนำให้เกิดการไหลเข้าของแคลเซียมภายในเซลล์ในสภาวะเค็มจัด โดยปริมาณแคลเซียมในเนื้อเยื่อที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในต้นพืชที่ได้รับสารไกลซีนเบตาอีนและโดยกระบวนการไหลเข้าของแคลเซียมนี้เองที่ชักนำให้เพิ่มการแสดงออกของยีน HSP (Li *et al.*, 2013) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องการทดสอบสมมุติฐานดังกล่าวโดยทดลองให้ GB แก่พืช พร้อมรบกวนกระบวนการไหลเข้าออกของแคลเซียมโดยใช้สารยับยั้งการทำงานของช่องโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งแคลเซียม (Calcium channel blocker drug) ผลการทดลองที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการทำความเข้าใจกระบวนการทำงานของ GB ในพืชที่อยู่ในสภาพอุณหภูมิสูงต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

สภาพการปลูกและตำรับการทดลอง

ดำเนินการทดลองที่ห้องควบคุมสภาพแวดล้อม สาขาพืชผัก มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ การทดลองทั้งหมดใช้เมล็ดมะเขือเทศสายพันธุ์สีดา (บริษัท เจียไต๋ จำกัด ประเทศไทย) โดยเพาะเมล็ดลงในวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของพีทมอส (Klasmann

ประเทศลิธัวเนีย): ขุยมะพร้าว: ทรายหยาบ ในอัตราส่วน 1:1:1 เมื่อเมล็ดงอกเป็นต้นกล้าและมีอายุได้ 10 วันให้สารละลายปุ๋ยสูตร Modified Hoagland Solution (Epstein and Bloom, 2005) ความเข้มข้น 0.5 เท่า ต้นกล้าปลูกอยู่ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตลอดทั้งวัน (25/25 °C) ให้แสงเทียมจากหลอดไฟแอลอีดีสีขาวอุณหภูมิสี 3000K: 6500K ในอัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้ม 150 PPFD เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่สภาพการทดลองอุณหภูมิสูงใช้อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียสช่วงที่ไฟเปิด 16 ชั่วโมงและ 29 องศาเซลเซียส ในช่วงที่ไฟปิด 8 ชั่วโมง (39/29 °C) เมื่อต้นกล้ามะเขือเทศมีอายุครบ 21 วันจะย้ายเข้าสู่การทดลองในห้องควบคุมอุณหภูมิ

การทดลองนี้มี 4 ตำรับ โดยเป็นการพ่นสารละลายที่แตกต่างกันตามรายละเอียดดังนี้ ตำรับที่ 1 ตำรับควบคุม พ่นน้ำเปล่าตำรับที่ 2 พ่นสารละลายไกลซีนเบตาอีน ความเข้มข้น 1 mM 24 ชั่วโมงก่อนเข้าสู่การทดลอง ตำรับที่ 3 พ่นสารละลายไกลซีนเบตาอีนและสารยับยั้งการทำงานของช่องโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งแคลเซียม เวอราปามิล (Verapamil หรือ VP) (บริษัท ฟาร์มาสันต์ แล็บบอราตอรี่ส์ จำกัด นนทบุรี ประเทศไทย) ความเข้มข้น 1 mM 24 ชั่วโมงก่อนเข้าสู่การทดลอง และตำรับที่ 4 พ่นสารละลายไกลซีนเบตาอีนและสารยับยั้งการทำงานของช่องโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งโพแทสเซียมเตตระเอทิลแอมโมเนียมคลอไรด์ (Tetraethylammonium Chloride หรือ TEA) ความเข้มข้น 1 mM 24 ชั่วโมงก่อนเข้าสู่การทดลอง การพ่นสารละลายและน้ำในทุกตำรับจะทำการพ่นจนใบเปียกและมีน้ำไหลหยดลงจากใบ เก็บข้อมูลการเจริญเติบโตและดัชนีทางสรีรวิทยาเมื่อทำการทดลองครบ 14 วัน

ค่าดัชนีที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนก๊าซ

วัดค่าดัชนีที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนก๊าซ ได้แก่ ค่าอัตราการนำไหลของปากใบ และค่าอัตราการดูดซึมคาร์บอนไดออกไซด์ของใบพืชดำเนินการโดยใช้เครื่อง LCi-SD (BioScientific Ltd. ประเทศอังกฤษ) เลือกวัดใบที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและมีอายุน้อยที่สุด

ค่าดัชนีที่เกี่ยวข้องกับการเรืองแสงของคลอโรฟิลล์

วัดค่าดัชนีที่เกี่ยวข้องกับการเรืองแสงของคลอโรฟิลล์ ได้แก่ ค่าประสิทธิภาพการทำงานสูงสุดของระบบแสงที่สอง (Maximum quantum efficiency of PSII หรือ F_v/F_m) และค่าประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสงที่สอง (Quantum efficiency of PSII หรือ $Ø_{PSII}$) ใช้เครื่อง Fluorescence Monitoring System รุ่น FMS2 เลือกวัดใบที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและมีอายุน้อยที่สุด

ปริมาณมาลอนดิอัลดีไฮด์

วัดปริมาณมาลอนดิอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde หรือ MDA) โดยวิธีการตาม Velikova and Loreto (2005) ดังนี้ ใช้ตัวอย่างใบจากมะเขือเทศ ประมาณ 0.1 กรัม บดให้ละเอียดใน 1 ml ของสารละลาย Trichloroacetic acid 0.1 % (W/V) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำสารละลายส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 0.5 ml มาผสมกับ thiobarbituric acid (0.5 % ผสมใน 20 % (W/V) Trichloroacetic acid) ปริมาตร 1 ml แล้วนำสารผสมที่ได้ไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที และนำไปแช่น้ำแข็งและปั่นเหวี่ยงที่ 7500×g เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น

532 nm จากนั้นวัดค่า A ที่ 600 nm เพื่อนำค่ามาใช้หักลบการดูดกลืนแสงที่ไม่จำเพาะอันเกิดจากความขุ่นของสารละลาย ปริมาณของ MDA จะถูกคำนวณโดยใช้สูตร:

MDA(μmol/g FW) = [(A532-A600)/155] × 103 × dilution factor

เปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของไอออน

เปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของไอออนดำเนินการทั้งหมด 4 ซ้ำ โดยการตัดใบเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรใส่ลงในหลอดแก้วจำนวน 10 วงต่อหนึ่งหลอด จากนั้นนำไปแช่ในน้ำกลั่นชนิด deionized เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 ครั้ง ใส่น้ำ deionized 10 ml ลงในหลอดทดลอง ปิดปากหลอดให้สนิทด้วยกระดาษฟอยล์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย (Electrical Conductivity หรือ EC) จากนั้นนำหลอดแก้วที่มีตัวอย่างทั้งหมดไปนึ่งในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำหลอดแก้วมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีก่อนดำเนินการวัดค่า EC อีกครั้ง นำค่า EC ที่ได้ทั้งหมดมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของไอออนตามสูตร

การรั่วไหลของไอออน (%) = (ค่าการรั่วไหลของไอออนก่อน autoclave/ ค่าการรั่วไหลของไอออนหลัง autoclave) × 100

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยใช้วิธีการ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ใช้โปรแกรม SPSS V.22 (2013) การรายงานความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

จากการทดลองพบว่า มะเขือเทศสีดาที่ได้รับสารละลาย GB มีอัตราการสังเคราะห์แสง และค่าการนำไหลของปากใบสูงกว่าต้นควบคุมที่ได้รับน้ำเปล่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในสภาพอุณหภูมิควบคุม (25/25 °C) และสภาพอุณหภูมิสูง (39/29 °C) แสดงให้เห็นว่า GB มีผลในเชิงบวกต่อการสังเคราะห์แสงแม้ในสภาพปกติ (Figure 1A) มีความเป็นไปได้ว่าการเพิ่มขึ้นของอัตราการสังเคราะห์แสงนี้เป็นผลมาจากอิทธิพลของ GB ในการส่งเสริมการนำไหลของปากใบ (Figure 1B) สมมุติฐานนี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่รายงานว่าการให้ GB แก่ต้นข้าวโพดทำให้อัตราการนำไหลของปากใบเพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลให้อัตราการสังเคราะห์แสงที่เพิ่มขึ้นตามไปด้วย (Yang and Lu, 2006) นอกจากนี้พบว่าการให้สารยับยั้งการทำงานของช่องโปรตีนแคลเซียมและโพแทสเซียมร่วมกับ GB มีผลทำให้อิทธิพลในเชิงบวกของ GB ต่ออัตราการสังเคราะห์แสงและอัตราการนำไหลของปากใบลดลง โดยที่ค่าดัชนีทั้งสองมีค่าไม่แตกต่างกับตำรับควบคุม ซึ่งบ่งชี้ว่าสารยับยั้งการทำงานทั้งของช่องโปรตีนทั้งสองชนิดยับยั้งอิทธิพลของ GB โดยไม่ก่อให้เกิดผลในเชิงลบต่อค่าดัชนีที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนก๊าซ

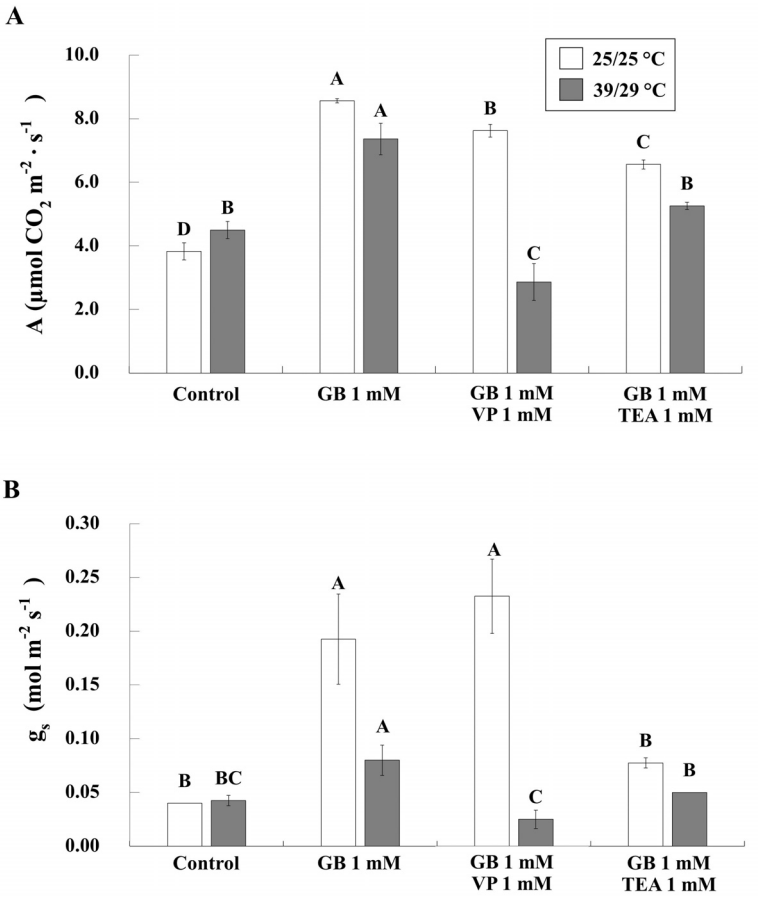

Figure 1 Gas exchange parameters of tomato leaves after 14 days of the experiment (A) Net CO_2 Assimilation or A (B) Stomatal Conductance or g_s. Different letters indicate significance difference between treatments in the same environmental condition analyzed by DMRT ($P < 0.05$). Error bars indicate standard error (n = 6).

ในส่วนการทำงานของปฏิกิริยาแสง (Light reaction) ซึ่งถูกประเมินโดยใช้ค่าดัชนีที่เกี่ยวข้องกับการเรืองแสงของคลอโรฟิลล์พบว่า ในต้นมะเขือเทศทุกตำรับที่ปลูกในสภาพควบคุมมีค่า F_v/F_m ไม่แตกต่างกัน ในส่วนของค่า $Ø_{PSII}$ พบว่าต้นที่ได้รับ GB มีค่าสูงกว่าต้นควบคุมที่ได้รับน้ำเปล่าอย่างมีนัยสำคัญ (Figure 2A และ Figure B) ผลการทดลองนี้แสดงว่าสารยับยั้งการทำงานของช่องโปรตีนแคลเซียมและโพแทสเซียม ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อการทำงานของปฏิกิริยาแสงในสภาพการปลูกปกติ และในสภาพอุณหภูมิสูงพบว่า ผลการทดลองมีความคล้ายคลึงกัน โดยค่าความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนก๊าซพบว่า ต้นที่ได้รับ GB มีค่า F_v/F_m และค่า $Ø_{PSII}$ สูงกว่าต้นควบคุมที่ได้รับน้ำเปล่า และเมื่อมีการให้สารยับยั้งการทำงานของช่องโปรตีนแคลเซียมและโพแทสเซียม ร่วมกับ GB พบว่าอิทธิพลในเชิงบวกของ GB ที่เคยปรากฏถูกลดทอนลงอย่างมีนัยสำคัญ

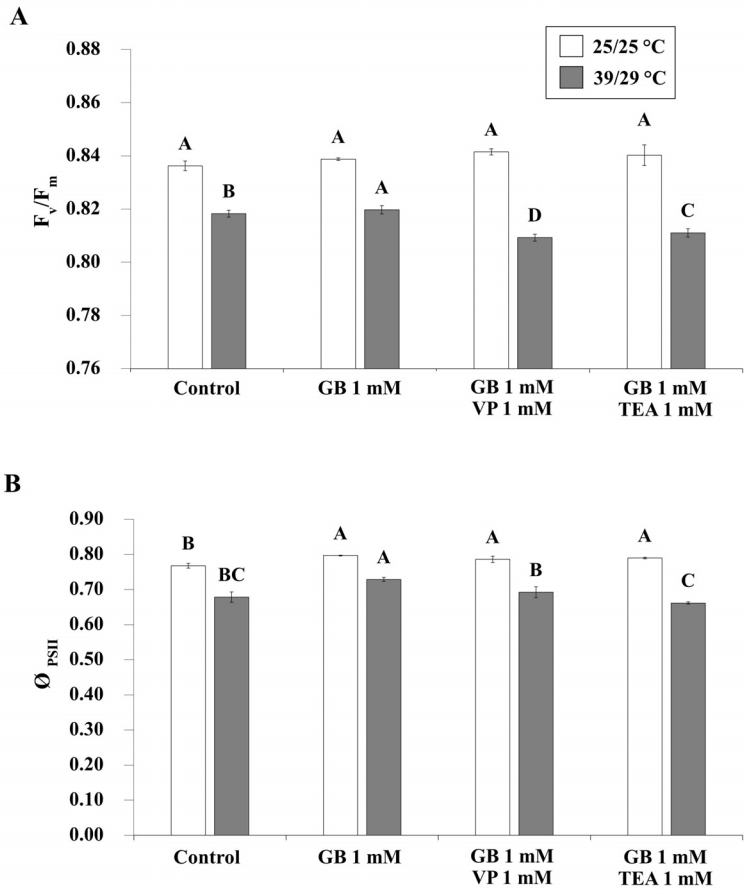

Figure 2 Chlorophyll fluorescence parameters of tomato leaves after 14 days of the experiment (A) Maximum Quantum Efficiency of PSII or F_v/F_m (B) Quantum Efficiency of PSII or $Ø_{PSII}$. Different letters indicate significance difference between treatments in the same environmental condition analyzed by DMRT ($P < 0.05$). Error bars indicate standard error (n = 6).

จากนั้นได้ดำเนินการประเมินระดับการเกิดออกซิเดชั่นของไขมัน (Lipid peroxidation) ในเนื้อเยื่อโดยพิจารณาปริมาณมาลอนดิอัลดีไฮด์ (Malondialdehydeหรือ MDA) ในเนื้อเยื่อใบเป็นตัวชี้วัด จากการทดลองพบว่าต้นกล้ามะเขือเทศที่ปลูกในสภาพอุณหภูมิสูงมีค่าปริมาณ MDA สูงกว่าต้นที่ปลูกในสภาพปกติอย่างมีนัยสำคัญในทุกตำรับการทดลอง (Figure 3A) ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นเป็นนัยว่าสภาพอุณหภูมิสูงที่ใช้ในการทดลองนี้มีผลทำให้ออกซิเดชั่นไขมันเพิ่มมากขึ้นและน่าจะก่อให้เกิดความเครียดกับพืช (Larkindale and Knight, 2002) ทั้งนี้พบว่าต้นที่ได้รับ GB ปริมาณ MDA น้อยกว่าต้นควบคุมที่ได้รับน้ำเปล่า และเมื่อมีการให้สารยับยั้งการทำงานของช่องโปรตีนแคลเซียมและโพแทสเซียม พร้อมกับ GB พบว่าอิทธิพลของ GB ในการลดปริมาณ MDA ในสภาพ

อุณหภูมิสูงกลับถูกยับยั้ง ในขณะที่ค่าเปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของไอออนซึ่งบ่งชี้เสถียรภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ พบว่าผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ การให้ GB มีผลทำให้การรั่วไหลของไอออนในสภาพอุณหภูมิสูงลดลงและเมื่อมีการให้สารยับยั้งการทำงานของช่องโปรตีนแคลเซียมและโพแทสเซียมร่วมด้วย พบว่าอิทธิพลในเชิงบวกของ GB หายไป (Figure 3B)

การเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเขือเทศในสภาพอุณหภูมิสูงนั้นต่ำกว่าการเจริญเติบโตในสภาพอุณหภูมิปกติอย่างเห็นได้ชัด พิจารณาจากได้จากค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นกล้ามะเขือเทศที่ปลูกในสภาพอุณหภูมิสูง ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่าของต้นที่ปลูกในสภาพควบคุม (Figure 4A และ Figure B) ในสภาพอุณหภูมิสูงการให้ GB มีผลทำให้ทั้งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นกล้ามะเขือเทศสูงกว่าต้นควบคุมที่ได้รับน้ำเปล่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการให้สารยับยั้งการทำงานของช่องโปรตีนแคลเซียมและโพแทสเซียมมีผลทำให้ประสิทธิภาพของ GB ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเขือเทศถูกลดทอนลง

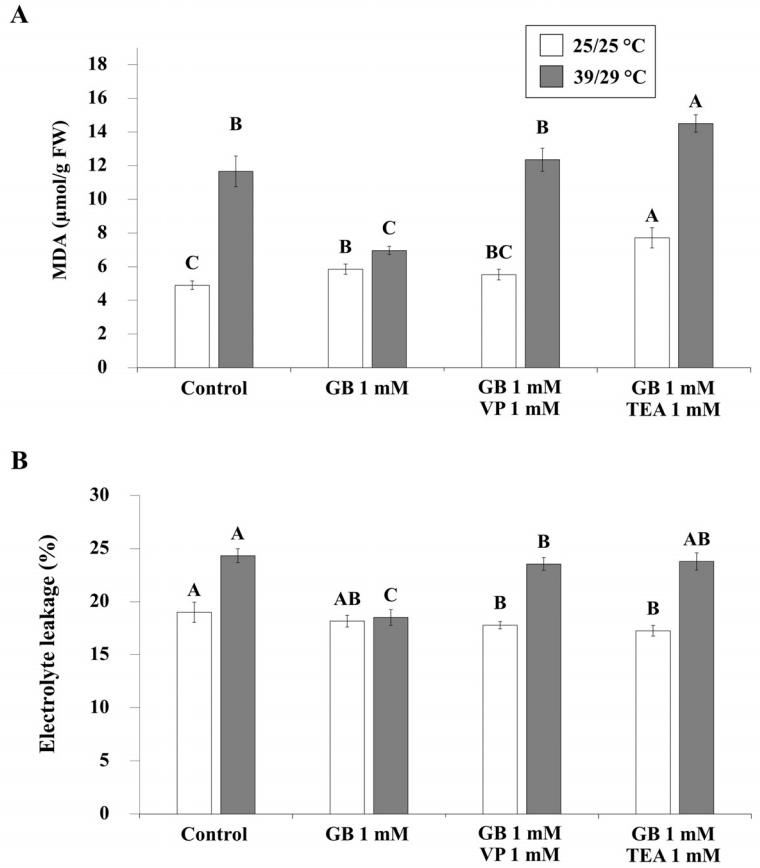

Figure 3 (A) Malondialdehyde or MDA (B) Percentages of ion leakage of tomato leaves after 14 days of the experiment. Different letters indicate significance difference between treatments in the same environmental condition analyzed by DMRT ($P < 0.05$). Error bars indicate standard error (n = 6).

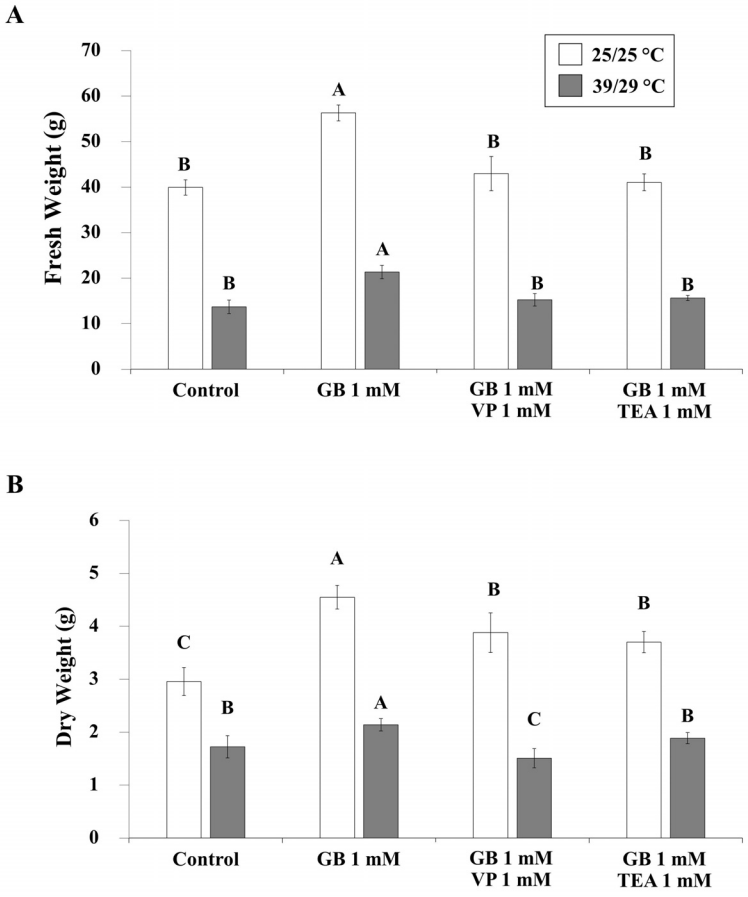

Figure 4 Growth of tomato plants after 14 days of the experiment (A) Fresh weight and (B) Dry weight. Different letters indicate significance difference between treatments in the same environmental condition analyzed by DMRT ($P < 0.05$). Error bars indicate standard error (n = 6).

ผลการทดลองทั้งหมดบ่งชี้ไปในทิศทางเดียวกันว่าการให้ GB จากภายนอกที่ระดับความเข้มข้น 1 mM สามารถบรรเทาความเครียดให้กับกล้ามะเขือเทศได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับผลการทดลองในต้นดาวเรือง (Sorwong and Sakhonwasee, 2015) และอ้อย (Rasheed *et al.*, 2011) ผลการทดลองในครั้งนี้บ่งชี้ว่ากลไกการทำงานของ GB ในเซลล์พืชนั้นเกี่ยวข้องกับการไหลเข้าและออกของแคลเซียม เนื่องจากการให้ VP ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของช่องโปรตีนแคลเซียม (Awasthi and Yadav, 2007) มีผลทำให้อิทธิพลของ GB ในกระบวนการทางสรีรวิทยาและการเจริญเติบโตถูกหักล้างไป โมเลกุลของแคลเซียมมีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวส่งสัญญาณขั้นทุติยภูมิเพื่อตอบสนองต่อสิ่งเร้า เช่น แสง ความเครียดและฮอร์โมน การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแคลเซียมภายในเซลล์ชักนำให้เซลล์ตอบสนอง เช่น การเปลี่ยนแปลงระดับการ

แสดงออกของยีน (Taiz and Zeiger, 2006) ซึ่งช่วยให้เซลล์สามารถปรับตัวและมีชีวิตรอดได้ในสภาพแวดล้อมที่ผันแปรอยู่ตลอดเวลา ในกรณีของสภาพอุณหภูมิสูงมีรายงานว่า การเพิ่มระดับการแสดงออกของ Heat Shock Protein ซึ่งมีส่วนสำคัญในการปกป้องเซลล์ถูกชักนำให้เกิดขึ้นผ่านการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของแคลเซียมภายในเซลล์ (Saidi *et al.*, 2009) และการให้ GB ก็มีผลทำให้ระดับการแสดงออกของยีน HSP เพิ่มขึ้นในสภาพอุณหภูมิสูงด้วย (Li *et al.*, 2011) นอกจากนี้มีรายงานว่าการให้ GB นั้นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแคลเซียมภายในเซลล์ในสภาพเค็มจัด (Li *et al.*, 2014) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลองที่เคยรายงานมาก่อนหน้านี้ร่วมกลับกับผลการทดลองในครั้งนี้ อาจสรุปได้ว่ากลไกการชักนำให้เกิดการทนต่อความร้อนในกล้ามะเขือเทศโดย GB นั้นเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณขั้นทุติยภูมิโดยแคลเซียมในระดับเซลล์

เป็นที่น่าสนใจว่าการให้สารยับยั้งการทำงานของช่องโปรตีนโพแทสเซียม TEA (Bialczyk and Lechowski, 1990) มีผลในการลดทอนประสิทธิภาพของ GB เช่นเดียวกันกับ VP อาจเป็นไปได้ว่ากลไกการทำงาน GB เกี่ยวข้องกับการผ่านเข้าออกของโพแทสเซียมในเซลล์ด้วย คำอธิบายหนึ่งที่เป็นไปได้คือ GB นั้นชักนำให้ค่าอัตราการนำไหลของปากใบเพิ่มขึ้น (Figure 1B) โดยค่านี้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเปิดปิดของปากใบซึ่งถูกควบคุมด้วยการไหลเข้าออกของโพแทสเซียมไอออนในการ์ดเซลล์ (Taiz and Zeiger, 2006) การเปิดปากใบนั้นเป็นผลดีในสภาพอุณหภูมิสูงเนื่องจากช่วยให้พืชสามารถระบายความร้อนออกจากปากใบผ่านทางการคายน้ำ เมื่อกระบวนการนี้ถูกยับยั้งด้วย TEA อิทธิพลในเชิงบวกของ GB จึงถูกลดทอนลง

การลดทอนประสิทธิภาพของ GB โดยการให้สารยับยั้งการทำงานของช่องโปรตีนแคลเซียมและโพแทสเซียมในการทดลองนี้ ไม่น่าจะเกิดขึ้นเพราะความเป็นพิษของสารทั้งสองชนิด เนื่องจากในสภาพปกติการให้สารทั้งสองชนิดไม่ได้ทำให้ประสิทธิภาพของกระบวนการสังเคราะห์แสง (Figure 1 และ Figure 2) และการเจริญเติบโต (Figure 4) ของต้นกล้ามะเขือเทศต่ำกว่าต้นควบคุม

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองนี้ช่วยเพิ่มความรู้พื้นฐานสำหรับการใช้ประโยชน์จากสาร GB ร่วมกับการปลูกพืช สาร GB เป็นสารที่ปลอดภัยต่อมนุษย์และสามารถพบได้พืชอาหารหลายชนิด อีกทั้งยังมีราคาไม่แพง การให้ GB แก่พืชเพื่อชักนำให้ต้นพืชทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูงจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ อย่างไรก็ดี หากต้องการใช้ประโยชน์จาก GB ในระบบการปลูกพืชให้ได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ ควรต้องพิจารณาและให้ความสำคัญกับบทบาทของแคลเซียมและโพแทสเซียม ให้รอบคอบ

เอกสารอ้างอิง

Awasthi A. and A. Yadav. 2007. Phenylalkylamines as calcium channel blockers. J Chem Sci. 11: 565-570.

Bialczyk, J. and Z. Lechowski. 1990. Influence of a potassium-channel blocker and metabolic and ATPase inhibitors on potassium and malate content of Phaseoluscoccineus L. Pulvini. New Phytol. 115: 595-601.

Camejo, D., P. Rodríguez, M.A. Morales, M. Dell'AmicoJ, A. Torrecillas and J.J. Alarcón. 2005. High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. J Plant Physiol. 162(3): 281-9.

Chen, T.H. and N. Murata. 2011. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. Plant Cell Environ. 34(1): 1-20.

Epstein, E., and A.J. Bloom. 2005. Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. Second Edition. Sinauer Associates.

Larkindale, J. and M. R. Knight. 2002. Protection against heat stress-induced oxidative damage in Arabidopsis involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. J Plant Physiol. 128: 682-695.

Li, M., S. Guo, Y. Xu, Q. Meng, G. Li and X. Yang. 2014. Glycine betaine-mediated potentiation of HSP gene expression involves calcium signaling pathways in tobacco exposed to NaCl stress. Physiol Plant. 150(1): 63-75.

Li, S., F. Li, J. Wang, W. Zhang, Q. Meng, T.H. Chen, N. Murata and X. Yang. 2011. Glycinebetaine enhances the tolerance of tomato plants to high temperature during germination of seeds and growth of seedlings. Plant Cell Environ. 34(11): 1931-43.

Peng, S., J. Huang, S. J.E. Heehy, R.C. Laza, R.M. Visperas, X. Zhong, G.S. Centeno, G.S. Khush, and K.G. Cassman. 2004. Rice yields decline with higher night temperature from global warming. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 101(27): 9971-9975.

Rasheed, R., A. Wahid, M. Farooq, I. Hussain, and M. A. Basra Shahzad. 2011. Role of proline and glycinebetaine pretreatments in improving heat tolerance of sprouting sugarcane (Saccharum sp.) buds. Plant Growth Regula. 65(1): 35-45.

Saidi, Y., A. Finka, M. Muriset, Z. Bromberg, Y.G. Weiss, F.J. Maathuis and P. Goloubinoff. 2009. The heat shock response in moss plants is regulated by specific calcium-permeable channels in the plasma membrane. Plant Cell. 21(9): 2829-43.

Sorwong, A. and S. Sakhonwasee. 2015. Foliar Application of Glycine Betaine Mitigates the Effect of Heat Stress in Three Marigold (Tageteserecta) Cultivars. Hort. J. 84(2): 161-171.

Taiz, L. and E. Zeiger. 2006. Plant Physiology. (4th Ed.). Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, U.S.A.

Yamane Y., Y. Kashino, H. Koike and K. Satoh. 1998.Effects of high temperatures on

the photosynthetic systems in spinach: oxygen-evolving activities, fluorescence characteristics and the denaturation process. Photosynth Res. 57: 51-59.

Yang, S. and C. Lu. 2006. Effect of exogenous glycinebetaine on growth, CO_2 assimilation, and photosystem ll photochemistry of maize Plant. Physiologia Plantarum. 127: 593-602.