บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

1. ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการงอกของเมล็ดและขนาดของต้นกล้าถั่วเหลือง

เมื่อเพาะเมล็ดถั่วเหลือง 4 พันธุ์ คือ พันธุ์ สจ.5 มข.35 สท.2 และ ชม.60 ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 5 วัน เนื่องจากที่ระยะเวลา 5 วัน เป็นช่วงเวลาที่สามารถนับจำนวนเมล็ดถั่วเหลืองที่งอกได้ในทุกชุดทดลอง และการใช้ 10% clorox ฟอกเมล็ดก่อนเพาะ เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจากการทดลองหลายครั้งพบว่าถั่วเหลืองที่เพาะในสารละลายเกลือนี้ จะมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย จากการทดลอง พบว่าถั่วเหลืองทั้ง 4 พันธุ์ ที่เพาะในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 40 มิลลิโมลาร์ มีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลง และลดลงมากยิ่งขึ้นในชุดที่เพาะในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นที่ระดับ 80 มิลลิโมลาร์ โดยที่เมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 มีแนวโน้มต้านทานต่อโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับ 40 มิลลิโมลาร์ ได้ดีที่สุด คือ มีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลงเพียง 2.25 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เดียวกันที่ไม่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ ถัดมาคือเมล็ดของถั่วเหลืองพันธุ์ มข.35 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลง 3.75 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์ สท.2 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลง 7.25 เปอร์เซ็นต์ และเมล็ดถั่วเหลืองที่มีแนวโน้มต้านทานต่อโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นนี้ได้น้อยที่สุดในการทดลองนี้คือ พันธุ์ ชม.60 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลงมากที่สุด คือ 9.25 เปอร์เซ็นต์ สำหรับชุดการทดลองที่เพาะในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 80 มิลลิโมลาร์ จะพบว่า เมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 ยังคงมีแนวโน้มต้านทานต่อความเค็มที่ระดับนี้ได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลงน้อยที่สุด คือ 12.75 เปอร์เซ็นต์ ถัดมาคือพันธุ์ ชม.60 และ สท.2 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลง 14 และ 14.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์ที่มีแนวโน้มต้านทานต่อภาวะเค็มที่ระดับ 80 มิลลิโมลาร์ ในระยะงอกได้น้อยที่สุดคือ พันธุ์ มข.35 โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลง 16 เปอร์เซ็นต์ มีการศึกษาการเพาะเมล็ดในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ของเมล็ด *Hordeum jubatum* โดย Ungar (1974) ซึ่งได้ผลการทดลองเช่นเดียวกันนี้ คือ เมล็ดที่เพาะในสารละลายโซเดียมคลอไรด์จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากค่าชลศักย์ของน้ำภายนอกเซลล์ต่ำกว่าภายในเซลล์เมล็ดถั่วเหลือง ทำให้เมล็ดดูดน้ำเข้าไปได้ช้าลง ทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกลดลงและงอกช้าลง จากการทดลองนี้วัดเปอร์เซ็นต์การงอกที่จุดเวลาเดียว คือ 5 วันหลังจากเพาะ ไม่ได้ทำการวัดในวันต่อๆ มา ซึ่งน่าจะมีการงอกเพิ่มขึ้น จากการทดลองของ อรุณศิริ กำลัง (2525) พบว่า โซเดียมคลอไรด์ทำให้เมล็ดงอกช้าลงเช่นเดียวกัน

เมื่อศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อความยาวต้นและรากของต้นกล้าถั่วเหลืองทั้ง 4 พันธุ์ ที่เพาะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ จะเห็นว่าโซเดียมคลอไรด์ทั้ง 2 ระดับ มีผลทำให้ความยาวต้นและรากของกล้าถั่วเหลืองน้อยกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ และมีแนวโน้มว่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น มีผลทำให้ความยาวต้นและรากน้อยลงมากขึ้นเช่นกัน

ผลของภาวะเค็มทำให้การงอกลดลงนี้ พบในการศึกษาวิจัยในพืชหลายชนิด และให้ผลการทดลองสอดคล้องกัน เช่น ในข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* (L.)) (Francois และคณะ, 1984) ในพืชกึ่งทนเค็ม (facultative halophyte) *Hordeum jubatum* L.(Ungar, 1974) และในถั่วเหลือง (อรุณศิริ กำลัง, 2525) ซึ่งได้มีการทดลองเพาะเมล็ดถั่วเหลืองในดินซึ่งเติมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้น 0 0.1 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักดินแห้ง พบว่าความเค็มของดินทำให้เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดลดลงและจะงอกล่าช้า และนอกจากนี้ ยังทำให้ต้นกล้าที่งอกมีความยาวต้นน้อยกว่าเมล็ดที่เพาะในภาวะปกติ ซึ่งเกิดจากอัตราการยืดตัวของลำต้นที่ลดลงที่เป็นผลจากความเป็นพิษจากไอออนของโซเดียมและคลอไรด์

Ogasa (1939) และ Rudolfs (1921) (อ้างถึงใน อรุณศิริ กำลัง, 2525) รายงานว่าเมล็ดถั่วเหลืองที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ 0.05-0.10 เปอร์เซ็นต์ จะยังคงงอกได้อย่างสมบูรณ์ แต่ถ้าเพิ่มปริมาณโซเดียมคลอไรด์มากกว่า 0.10 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้การงอกของเมล็ดถั่วเหลืองลดลงอย่างเด่นชัด เนื่องจากผลของ osmotic potential และความเป็นพิษของโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการทดลองนี้ โดยที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ใช้ (40 และ 80 มิลลิโมลาร์) เทียบได้เท่ากับ 0.234 และ 0.468 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากพอที่จะทำให้การงอกของเมล็ดถั่วเหลืองลดลงอย่างชัดเจน

2. ผลของภาวะเค็มในระยะเพาะเมล็ดถึงระยะต้นกล้าในถั่วเหลืองที่มีต่อการเจริญเติบโตและปริมาณน้ำภายในต้นพืชของถั่วเหลือง

จากการทดลองเพาะเมล็ดถั่วเหลือง 4 พันธุ์ คือ พันธุ์ สจ.5 มข.35 สท.2 และ ชม.60 ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ เมื่อกล้างอกและย้ายปลูกลงในสารละลายอาหารที่มีความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ระดับเดียวกันกับตอนที่เพาะ หลังจากนั้น 14 วัน ย้ายปลูกกลับมาในสารละลายอาหารปกติ(ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ พบว่า เมื่อเริ่มทดลอง (0วัน) ถั่วเหลืองทั้ง 4 พันธุ์ ที่ได้รับภาวะเค็มจากโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ระยะเพาะเมล็ดจนถึงระยะต้นกล้ามีน้ำหนักแห้งต้นน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และยังคงส่งผลต่อการสะสมน้ำหนักแห้งต้นและรากของต้นถั่วเหลืองในระยะเวลาต่อมา ซึ่งเมื่อสิ้นสุดการ

ทดลอง โดยพบว่าถั่วเหลืองทุกพันธุ์มีการเพิ่มน้ำหนักแห้งต้นและรากต่ำกว่าชุดควบคุม ยกเว้นพันธุ์ สจ.5 ซึ่งชุดที่ได้รับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 40 mM มีการเพิ่มของน้ำหนักแห้งต้นมากขึ้นกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย และเมื่อย้ายปลูกกลับมาในภาวะที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์เป็นระยะเวลา 12 วัน โซเดียมคลอไรด์ที่ส่งผลชลอการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง เพราะว่าในระยะเมล็ดและต้นกล้าเป็นระยะที่ต้นพืชยังอ่อนแอ และไวต่อภาวะที่ไม่เหมาะสม อีกทั้งยังมีผลของไอออนโซเดียมและคลอไรด์ซึ่งสามารถเข้าไปสะสมที่ใบของพืช ในการทดลองนี้พบความผิดปกติที่บริเวณใบ โดยเกิดอาการใบขาวซีดระหว่างเส้นใบ (bleaching) คาดว่าเป็นผลจากภาวะเค็มของโซเดียมคลอไรด์ ทำให้คลอโรฟิลล์และรงควัตถุอื่นๆ สลายตัว มีผลต่อระบบการสังเคราะห์ด้วยแสง ซึ่งเป็นผลของความเป็นพิษจากไอออนของเกลือที่สะสมที่ใบมากเกินไป จากผลการทดลองให้ภาวะเค็มกับถั่วเหลืองโดย พรศักดิ์ ภักดีวราภรณ์ (2543) พบว่าถั่วเหลืองจะสะสมไอออนของโซเดียมและคลอไรด์เพิ่มมากขึ้นในใบเมื่อได้รับภาวะเค็ม ซึ่งเป็นสาเหตุให้การสังเคราะห์ด้วยแสงลดลง ดังเช่นการทดลองในข้าว (Flower และคณะ,1985; Yeo, Caporn และ Flowers, 1985) ซึ่งจะทำให้พืชจะชะงักการเจริญเติบโต เช่นเดียวกันกับในการทดลองนี้ คือ ถั่วเหลืองที่เพาะด้วยโซเดียมคลอไรด์ทั้ง 2 ระดับ จะมีการเจริญเติบโตลดลงและในเวลาต่อมาจะทิ้งใบที่เกิดและเจริญเติบโตตลอดช่วงเวลาที่ได้รับภาวะเค็ม โดยเฉพาะใบล่างที่เคยมีรายงานพบการสะสมไอออนของโซเดียมมากกว่าใบบน (พรศักดิ์ ภักดีวราภรณ์, 2543)

เมื่อเปรียบเทียบถั่วเหลืองทั้ง 4 พันธุ์ ในการทดลองนี้ จะเห็นว่า ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 มีแนวโน้มของการฟื้นตัวจากภาวะเค็มในระยะเมล็ดงอกและระยะต้นกล้า ที่ระดับ 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ ได้ดีที่สุด โดยจะเห็นได้จากการเพิ่มน้ำหนักแห้งต้นและรากของถั่วเหลืองเมื่อสิ้นสุดการทดลอง คือ มีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักแห้งต้นและรากมากกว่าถั่วเหลืองอีก 3 พันธุ์

ภาวะเค็มที่ได้รับยังส่งผลต่อการสะสมน้ำภายในต้นถั่วเหลือง (เปอร์เซ็นต์เทียบกับน้ำหนักสด) โดยจะพบว่า ถั่วเหลืองชุดที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์ 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ มีปริมาณน้ำในส่วนต้นมากกว่าถั่วเหลืองชุดควบคุมที่ไม่เคยได้รับภาวะเค็มอย่างมีนัยสำคัญ และยิ่งได้รับโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงขึ้น (80 มิลลิโมลาร์) จะมีปริมาณน้ำในส่วนต้นสูงขึ้น อาจเป็นไปได้ว่า ในระหว่างการได้รับภาวะเค็มทั้ง 2 ระดับ ถั่วเหลืองมีการปรับตัวให้สะสมไอออนและสารบางชนิดเพื่อช่วยลดค่าชลศักย์ของน้ำภายในต้นพืช และเมื่อได้รับภาวะปกติอีกครั้ง ถั่วเหลืองที่เคยได้รับภาวะเค็มมาก่อนจะมีผลต่างของค่าชลศักย์ของน้ำภายในต้นพืชกับภายนอกสูงกว่าถั่วเหลืองชุดควบคุม จึงส่งผลให้น้ำแพร่เข้าสู่ต้นพืชได้มากและรวดเร็วกว่า ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Wignarajah, Jennings and Handley (1975) ซึ่งพบ

ว่าใบประกอบคู่แรกของต้นถั่ว *Phaseolus vulgaris* ที่ได้รับภาวะเค็ม จะมีปริมาณน้ำมากกว่าถั่วที่ไม่ได้รับภาวะเค็ม นอกจากนี้ยังมีพื้นที่ใบลดลงแต่จะมีความหนามากขึ้น ซึ่งเนื่องมาจากชั้นเนื้อเยื่อของ spongy parenchyma มีความหนามากขึ้น เป็นไปได้ว่าถั่วเหลืองอาจตอบสนองเช่นเดียวกันโดยมีพื้นที่ใบลดลงเช่นกัน (พรศักดิ์ ภักดีวราภรณ์, 2543) แต่ขัดแย้งกับงานทดลองของ Delane และคณะ (1982) ซึ่งพบว่า ปริมาณน้ำในต้น *Hordeum vulgare* ที่ได้รับภาวะเค็ม 180 mM ไม่มีการเปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ตาม ภาวะเค็มจากโซเดียมคลอไรด์ทั้ง 2 ระดับนี้ ไม่มีผลทำให้ปริมาณน้ำในส่วนรากของถั่วเหลืองแตกต่างจากชุดควบคุม อาจมีสาเหตุจากการที่รากเป็นส่วนที่สัมผัสอยู่กับน้ำและอาหารตลอดเวลาทำให้ปริมาณน้ำในส่วนรากเปลี่ยนแปลงน้อยมาก และจากการทดลองของพรศักดิ์ ภักดีวราภรณ์ (2543) พบว่าถั่วเหลืองที่ได้รับภาวะเค็มจะสะสมโซเดียมและคลอไรด์ไอออนในบริเวณรากมาก ซึ่งน่าจะมีส่วนช่วยปรับค่าออสโมติกภายในเซลล์พืชได้ ทำให้ไม่พบความแตกต่างของปริมาณน้ำภายในรากถั่วเหลืองที่ได้รับภาวะเค็มดังกล่าว

จากการทดลองทดสอบผลของโซเดียมคลอไรด์ในระยะเพาะเมล็ดจนถึงต้นกล้าในถั่วเหลืองทั้ง 4 พันธุ์ จะเห็นว่า การที่ถั่วเหลืองได้รับภาวะเค็มตั้งแต่ระยะเมล็ดจนกระทั่งงอกเป็นต้นกล้านั้น มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตทั้งส่วนต้นและส่วนราก อาจเนื่องมาจากถั่วเหลืองเป็นพืชที่มีความต้านทานต่อความเค็มได้ในระดับต่ำ และระยะต้นอ่อนที่เพิ่งงอกจากเมล็ดเป็นระยะที่ยังไม่มีความแข็งแรงเพียงพอที่จะต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เมล็ดยังคงสร้างอาหารเองไม่ได้ ต้องใช้อาหารสะสมที่มีอยู่ภายในเมล็ดเพื่อสร้างส่วนต่างๆ ที่จำเป็น เช่น ใบ ซึ่งใช้ในการสร้างอาหารและ รากซึ่งใช้ในการดูดน้ำและเกลือแร่ ดังนั้นพืชในระยะนี้จึงได้รับผลกระทบจากภาวะเค็มได้ง่าย และแม้ว่าหลังจากนั้นภาวะเค็มจะหมดไป พืชยังคงไม่สามารถเจริญเติบโตได้เทียบเท่ากับต้นที่ไม่เคยได้รับภาวะเค็ม

3. ผลของโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันในระยะเพาะเมล็ดจนถึงระยะต้นกล้าที่มีต่อการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง

จากการให้โซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันในระยะเพาะเมล็ดจนกระทั่งเป็นต้นกล้าในถั่วเหลืองทั้ง 4 พันธุ์ เพื่อศึกษาถึงผลที่มีต่อการเจริญเติบโต ผลปรากฏว่า การให้โซเดียมแอคคลิ-เมชันทั้งที่ระดับ 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ ในระยะนี้กับถั่วเหลืองก่อนได้รับภาวะเค็มจะทำให้ต้นถั่วเหลืองทุกพันธุ์มีน้ำหนักแห้งต้นและรากน้อยกว่าชุดควบคุมและชุดที่ได้รับภาวะเค็มโดยไม่ได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันตลอดการทดลอง ที่เป็นเช่นนี้เพราะการให้โซเดียมคลอไรด์กับพืชตั้งแต่เป็นต้นอ่อนนั้น มีผลกระทบกระเทือนอย่างมากต่อการเจริญเติบโตในถั่วเหลือง ดัง

เช่นอธิบายไว้ใน การอภิปรายผลการทดลองข้อ 2 ซึ่งสามารถสังเกตได้จากวันที่เริ่มการทดลอง (วันที่ 0) ถั่วเหลืองทุกพันธุ์ที่ได้รับแอคคลิเมชันจะมีน้ำหนักแห้งต้นและรากน้อยกว่าชุดที่ไม่ได้รับแอคคลิเมชัน และเมื่อได้รับภาวะเค็มอีกครั้ง ยิ่งทำให้ถั่วเหลืองชะงักการเจริญเติบโตและแสดงอาการใบขาวซีดระหว่างเส้นใบ (bleaching) เช่นเดียวกับถั่วเหลืองในการทดลองที่ 2 นอกจากนี้ยังพบว่าการที่ถั่วเหลืองที่ได้รับภาวะเค็มในระยะเพาะเมล็ดและระยะต้นกล้ามีน้ำหนักแห้งต้นลดลง มีสาเหตุมาจากการทิ้งใบของถั่วเหลือง ดังนั้นการให้โซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันในระยะเพาะเมล็ดจนถึงระยะกล้าไม่ทำให้ถั่วเหลืองมีความสามารถในการต้านทานต่อภาวะเค็มได้ดีขึ้น

และจากการทดลองนี้จะเห็นว่า ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 มีความสามารถทนต่อภาวะเค็มได้ดีที่สุด เนื่องจากมีชีวิตรอดได้ทุกชุดการทดลองและเมื่อได้รับภาวะเค็มยังคงมีการเจริญเติบโตได้ ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อได้รับภาวะเค็มชุดที่ได้รับแอคคลิเมชันจะมีการเจริญเติบโตดีกว่าต้นที่ไม่ได้รับแอคคลิเมชัน

4. **ผลของโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันในระยะเพาะเมล็ดที่มีต่อการเจริญเติบโตของถั่วเหลือง (การทดลองนี้ใช้ถั่วเหลืองเพียง 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ สจ.5 และ มข.35)**

การทดลองนี้ศึกษาการให้โซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันในระยะเมล็ดงอก โดยการเพาะเมล็ดในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ หลังจากเมล็ดงอก ย้ายปลูกต้นกล้าลงในสารละลายอาหารที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลา 14 วัน แล้วจึงให้ภาวะเค็มด้วยสารละลายอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 80 มิลลิโมลาร์ จะเห็นว่า เมื่อเริ่มการทดลอง (0 วัน) ถั่วเหลืองทุกชุดทดลองมีน้ำหนักแห้งต้นไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่า การย้ายปลูกกล้าลงในอาหารที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ เป็นระยะเวลา 14 วัน ก่อนได้รับภาวะเค็ม 80 มิลลิโมลาร์ นั้น ช่วยทำให้ถั่วเหลืองสามารถปรับตัว มีการเจริญเติบโตและสร้างน้ำหนักแห้งต้นและรากได้กลับมาเทียบเท่ากับชุดควบคุม (เปรียบเทียบกับการทดลองข้อที่ 3 ซึ่งได้รับภาวะเค็มตั้งแต่ระยะเพาะเมล็ดจนถึงระยะต้นกล้า ซึ่งพบว่าต้นกล้าที่เพาะในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ มีน้ำหนักแห้งต้นและรากเริ่มต้นก่อนการทดลองน้อยกว่าชุดควบคุม) แต่เมื่อได้รับภาวะเค็ม 80 มิลลิโมลาร์ อีกครั้งจะเห็นได้ว่า เมื่อได้รับภาวะเค็ม 4 วันจนถึง 12 วัน ถั่วเหลืองที่ได้รับภาวะเค็ม (ทั้งชุดที่ได้รับและไม่ได้รับโซเดียมคลอไรด์แอค-คลิเมชัน) มีน้ำหนักแห้งต้นน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ถั่วเหลืองชุดที่เคยได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันในระยะเพาะเมล็ดทั้ง 2 ระดับนั้นมีน้ำหนักแห้งต้นและรากไม่แตกต่างกับชุดที่ไม่เคยได้รับแอคคลิเมชันก่อนได้รับภาวะเค็ม และภาวะเค็มยังมีผลต่อน้ำหนักแห้งรากเช่นเดียวกันกับน้ำหนักแห้งต้น แต่ล่าช้ากว่า (เริ่มเห็นในวันที่ 8) แสดงว่าภาวะเค็มมีผลต่อ

การเจริญเติบโตของส่วนต้นเร็วกว่าส่วนราก และการให้โซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันที่ระดับความเข้มข้น 40 และ 80 มิลลิโมลาร์ ในระยะเพาะเมล็ดนี้ ไม่กระตุ้นให้เกิดการปรับตัวเพื่อต้านทานต่อภาวะเค็มในถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ (สจ.5 และ มข.35) นอกจากนี้ถั่วเหลืองที่ได้รับภาวะเค็มตั้งแต่ระยะเมล็ด (ซึ่งเป็นการแอคคลิเมชัน) จะพบอาการใบขาวซีดระหว่างเส้นใบ (bleaching) ในลักษณะเดียวกันกับการทดลองที่ 2 และ 3

5. ผลของโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันในระยะต้นกล้าที่มีต่อการเจริญเติบโตและการสะสมโพรลีนของถั่วเหลือง

5.1 ผลต่อการเจริญเติบโต

จากการทดลองให้โซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันกับถั่วเหลือง 2 แบบ คือ แบบที่ 1 (ได้รับภาวะเค็มเพิ่มขึ้นทีละน้อยก่อนได้รับภาวะเค็ม 80 มิลลิโมลาร์) และแบบที่ 2 (ได้รับภาวะเค็มเพิ่มขึ้นทีละน้อยเช่นเดียวกันกับชุดที่ได้รับแอคคลิเมชันแบบที่ 1 แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ถึงระดับความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ แล้วย้ายปลูกกลับมาในสารละลายอาหารที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ระยะเวลาหนึ่ง ก่อนให้ภาวะเค็ม) จะเห็นได้ว่าตลอดการทดลอง ถั่วเหลืองทั้ง 4 พันธุ์ (สจ.5 มข.35 สท.2 และ ชม.60) ที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันทั้ง 2 แบบ มีน้ำหนักแห้งต้นไม่แตกต่างจากชุดที่ไม่ได้รับแอคคลิเมชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และถั่วเหลืองชุดควบคุมยังคงมีน้ำหนักแห้งต้นมากที่สุด ซึ่งมากกว่าถั่วเหลืองที่ได้รับภาวะเค็ม (ทั้งชุดที่ได้รับและไม่ได้รับแอคคลิเมชัน) แสดงให้เห็นว่า การให้โซเดียมแอคคลิเมชันทั้งแบบที่ 1 และ 2 นี้ ไม่สามารถทำให้ถั่วเหลืองทั้ง 4 พันธุ์ มีการเจริญเติบโตทางต้นได้ดีขึ้นเมื่อได้รับภาวะเค็ม ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานของ Umezawa และคณะ (2000) ซึ่งทำการทดลองให้ pretreatment กับถั่วเหลือง โดยปลูกในสารอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 37 และ 68 มิลลิโม-ลาร์ เป็นเวลา 23 วัน ก่อนย้ายลงปลูกในภาวะเค็มที่ระดับ 0 68 และ 137 มิลลิโมลาร์ และพบว่า ภาวะเค็มที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้น้ำหนักแห้งรวมของถั่วเหลืองลดลง แต่การให้ pretreatment ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักแห้งถั่วเหลืองที่ได้รับภาวะเค็ม เมื่อย้ายปลูกกลับมาที่ภาวะปกติเป็นเวลา 12 วัน เพื่อศึกษาความสามารถในการฟื้นตัวของถั่วเหลือง จะเห็นว่าถั่วเหลืองทุกชุดทดลองที่ได้รับภาวะเค็มยังคงมีน้ำหนักแห้งต้นน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าภาวะเค็มที่เคยได้รับ ยังคงส่งผลต่อการเจริญเติบโตในส่วนต้นของถั่วเหลือง

สำหรับผลต่อน้ำหนักแห้งรากนั้น โดยภาพรวมจะเห็นว่า ถั่วเหลืองที่ได้รับภาวะเค็ม 80 มิลลิโมลาร์ มีแนวโน้มของน้ำหนักแห้งรากไม่แตกต่างจากถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับภาวะเค็ม โดยจะเห็นได้ชัดเจนตลอดการทดลองในถั่วเหลืองพันธุ์ สท.2 และ ชม.60 แต่สำหรับพันธุ์ สจ.5 และ มข.35 อาจแตกต่างไปเล็กน้อย คือ ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 เมื่อย้ายปลูกกลับมาในภาวะปกติเป็นเวลา 12 วัน พบว่า ถั่วเหลืองที่เคยได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันแบบที่ 1 มีน้ำหนักแห้งรากน้อยกว่าถั่วเหลืองชุดอื่นๆ ในขณะที่ถั่วเหลืองที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันแบบที่ 2 มีน้ำหนักแห้งรากใกล้เคียงและไม่แตกต่างจากชุดที่ไม่ได้รับแอคคลิเมชัน แสดงให้เห็นว่า โซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันแบบที่ 1 คือ ต้นถั่วเหลืองจะได้รับผลจากภาวะเค็มมาโดยตลอดการทดลอง (ตั้งแต่เริ่มได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันจนกระทั่งสิ้นสุดภาวะเค็มที่เวลา 12 วันหลังจากได้รับโซเดียมคลอไรด์ 80 มิลลิโมลาร์) นอกจากจะไม่สามารถทำให้ถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 เจริญเติบโตทางรากได้ดีขึ้นเมื่อได้รับภาวะเค็มแล้ว ยังทำให้มีน้ำหนักแห้งรากน้อยกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับแอคคลิเมชันอีกด้วย

สำหรับถั่วเหลืองพันธุ์ มข.35 เมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 12 วัน พบว่า ถั่วเหลืองที่ได้รับแอคคลิเมชันมีน้ำหนักแห้งรากน้อยกว่าชุดควบคุมและชุดที่ไม่เคยได้รับแอคคลิเมชันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า การให้โซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันทั้ง 2 แบบ ทำให้น้ำหนักแห้งรากน้อยลงด้วย และเมื่อย้ายกลับมาได้รับภาวะปกติเป็นเวลา 12 วัน จะเริ่มเห็นผลกระทบของภาวะเค็มที่เคยได้รับ คือ ถั่วเหลืองทุกชุดที่เคยได้รับภาวะเค็ม 80 มิลลิโมลาร์ มีน้ำหนักแห้งรากไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ยังคงน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่จะเห็นว่า ถั่วเหลืองที่เคยได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันมีแนวโน้มของน้ำหนักแห้งรากน้อยกว่าชุดที่ไม่เคยได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชัน (ไม่แตกต่างทางสถิติ) กล่าวคือ การให้โซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันทั้ง 2 แบบ กับถั่วเหลืองพันธุ์ มข.35 มีแนวโน้มทำให้ต้นถั่วเหลืองได้รับผลกระทบของภาวะเค็มต่อน้ำหนักแห้งรากรุนแรงกว่าชุดที่ไม่ได้รับแอคคลิเมชัน

จากเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งต้นและรากของถั่วเหลืองทั้ง 4 พันธุ์เมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 12 วัน จะสังเกตได้ว่า เมื่อได้รับภาวะเค็มการให้แอคคลิเมชันจะทำให้ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 มีการเจริญเติบโตทางต้นและรากดีขึ้น ในขณะที่แอคคลิเมชันแบบค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นทีละน้อยโดยตลอด (แบบที่ 1) จะทำให้พันธุ์ สจ.5 มีการเจริญเติบโตทางต้นและรากดีขึ้น แต่การให้แอคคลิเมชันแบบที่ค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ และย้ายกลับมาภาวะปกติระยะหนึ่ง(แบบที่ 2) จะทำให้มีการเจริญเติบโตทางต้นดีขึ้น แต่จะยับยั้งการเจริญเติบโตทางราก สำหรับพันธุ์ สท.2 การให้แอค-

คลิเมชันทั้ง 2 แบบจะทำให้มีการเจริญเติบโตลดลงเพียงเล็กน้อย แต่สำหรับพันธุ์ มข.35 การให้แอคคลิเมชันจะทำให้มีการเจริญเติบโตทั้งทางต้นและรากแย่ลงอย่างชัดเจน

จากข้อสรุปข้างต้นเกี่ยวกับผลของภาวะเค็มต่อน้ำหนักแห้งต้นและรากในถั่วเหลืองทั้ง 4 พันธุ์ข้างต้น จะเห็นได้ว่าภาวะเค็มที่ระดับ 80 มิลลิโมลาร์ นี้ มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตในส่วนต้นชัดเจนกว่าในส่วนราก เช่นเดียวกันกับที่ศึกษาพบในข้าวบาร์เล่ย์ (Delane และคณะ 1982 อ้างถึงใน Munns และ Termaat, 1986) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ ศิริพรรณ บรรหาร (2543) และอัญชลี ใจดี (2543) ที่ทำการทดลองและได้ผลเช่นเดียวกันในถั่วเหลือง ทั้งนี้เป็นเพราะภาวะเค็มมีผลกระทบต่อกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง และการดูดน้ำเข้าภายในต้นพืช ทำให้พืชเจริญเติบโตลดลง

5.2 ผลต่อการสะสมโพรลีนในใบ

จากการทดลองจะเห็นว่า พบแนวโน้มการสะสมโพรลีนในถั่วเหลืองที่ทำการทดลองแตกต่างไปในแต่ละพันธุ์ โดยจะพบการสะสมโพรลีนเพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 12 วัน ในถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.5 จะพบว่ามีการสะสมโพรลีนเพิ่มสูงขึ้นในถั่วเหลืองที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันแบบที่ 1 ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าถั่วเหลืองที่ทำการทดลองชุดอื่นๆ (แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ) สำหรับถั่วเหลืองพันธุ์มข.35 พบเช่นเดียวกันกับพันธุ์ สจ.5 แต่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างชัดเจน ในขณะที่ถั่วเหลืองพันธุ์ สท.2 พบการเพิ่มขึ้นของโพรลีนในถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชัน ซึ่งมากกว่าถั่วเหลืองชุดควบคุมและชุดทดลองที่ได้รับแอคคลิเมชันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของโพรลีนในถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ ดังกล่าวจะพบสอดคล้องกับอาการที่พบในใบล่าง คือ ใบไหม้เป็นจุดและขอบใบม้วนลง (รูปที่ 8ข ในภาคผนวก ข) ซึ่งจะร่วงไปในเวลาต่อมาแม้ว่าจะถูกย้ายกลับสู่อาหารที่ปราศจากโซเดียมคลอไรด์ จากการทดลองในถั่วเหลืองที่ได้รับภาวะแล้งทั้งในระดับ Chamber (Waldren และ Teare, 1974) และระดับแปลงทดลอง (Waldren และคณะ, 1974) จะมีการสะสมโพรลีนเพิ่มมากขึ้นเมื่อพืชแสดงอาการเหี่ยวดังนั้นการที่ถั่วเหลืองสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับภาวะเครียด น่าจะหมายถึงความเสียหายของพืชมากกว่าความต้านทานต่อภาวะนั้นๆ รวมถึงภาวะเครียดจากความเค็ม (Hanson and Nelson, 1978) ซึ่งเหตุการณ์นี้สอดคล้องกับการทดลองของ พรศักดิ์ ภักดีวราภรณ์ (2543) และ Moftah และ Michel (1987) ซึ่งศึกษาในถั่วเหลืองที่ได้รับภาวะเค็มเช่นเดียวกัน

สำหรับถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 ไม่พบการ สะสมโพรลีนเพิ่มมากขึ้นตลอดการทดลอง และพบว่ามีการสะสมโพรลีนน้อยลงและการให้โซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชชันจะยิ่งทำให้สะสมโพรลีนลดลงมากขึ้นอีกด้วย ประกอบกับไม่พบอาการเหี่ยวตามขอบใบดังเช่นที่พบในถั่วเหลืองอีก 3 พันธุ์ อาจเนื่องมาจากถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 นี้ไม่ตอบสนองต่อภาวะเค็มที่ระดับ 80 มิลลิโมลาร์ โดยการสะสม โพรลีน หรืออาจเป็นไปได้ว่าภาวะเค็มที่ระดับนี้ยังไม่รุนแรงเพียงพอที่จะสามารถกระตุ้นให้เกิดการสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้นในถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 นี้

หากอาการเหี่ยวตามขอบใบที่เกิดควบคู่ไปกับการสะสมโพรลีนเพิ่มมากขึ้นนี้แสดงถึงความเสียหายจากภาวะเค็มแล้ว การสะสมโพรลีนที่เพิ่มมากขึ้นนี้อาจเป็นผลจากการสลายโปรตีนที่มีอิทธิพลจากภาวะเค็ม หรืออาจเป็นเพราะว่าภาวะเค็มมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PDH (proline dehydrogenase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการสลายโพรลีนกลับไปเป็น glutamate ซึ่งการทำงานของเอนไซม์นี้ถูกควบคุมแบบย้อนกลับโดยปริมาณของโพรลีนภายในเซลล์ ดังเช่นที่พบใน *Arabidopsis* (Peng และคณะ, 1996)

6. การศึกษาจำนวนยีนในยีนแฟมิลีของ *P5CS* และการแสดงออกของยีน *P5CS* ในถั่วเหลือง

6.1 การศึกษาจำนวนยีนและจำนวนชุดของยีน *P5CS* โดยใช้วิธี Southern Blot Analysis

จากผลการศึกษายีน *P5CS* ใน genomic DNA ของถั่วเหลืองโดยวิธี Southern Blot Hybridization โดยใช้ *P5CS* cDNA ของ mothbean เป็น probe พบแถบ DNA จำนวน 1 ซึ่งอาจเป็นการบ่งชี้ว่า ยีน *P5CS* ในถั่วเหลืองเป็นยีนเดี่ยว (single gene) แต่ยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจน ต้องทำการศึกษาเพื่อหาหลักฐานในการยืนยันให้มากกว่านี้ และ จากรายงานการศึกษายีน *P5CS* ในพืชชนิดอื่นๆ พบว่า ในพืชบางชนิดมีรายงานพบมากกว่า 1 ยีน เช่น ยีน *p5csA* (gi : 870865) *p5csB* (gi : 870876) และ *ATP5CS2* (gi : 1669657) ใน *Arabidopsis thaliana* (Strizhov และคณะ, 1997) ยีน *MSP5CS1* (gi : 1419035) และ *MSP5CS2* (gi : 1781039) ใน alfalfa (*Medicago sativa*) (Ginzberg และคณะ, 1998) และยีน *tomPRO1* และ *tomPRO2* (gi : 1480669) ในมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) (Maggio และคณะ, 1996) แต่ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในพืชหลายชนิดปัจจุบันพบเพียงยีนเดียว แต่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นยีนเดี่ยวหรือเป็นแฟมิลี่ยีน เช่น ยีน *OsP5CS* ในข้าว (*Oryza sativa* L.) (Igarashi และ

คณะ, 1997) และ ใน common ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum*) ซึ่งเป็นพืช halophyte (Michaloski, Qulgley-Landreau และ Bohnet, unpublished ข้อมูลจาก NCBI Genebank, gi : 3176964) ปัจจุบันมีผู้สามารถโคลน *P5CS* cDNA ของถั่วเหลืองได้บางส่วน แต่ยังไม่สมบูรณ์ (Shoemaker และคณะ, Public Soybean EST Project, unpublished, Genebank, gi : 7685816, 6227545 และ 8283691)

6.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* ในใบถั่วเหลือง

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *P5CS* ในถั่วเหลืองด้วยวิธี Northern Blot Hybridization พบแถบของ *P5CS* mRNA ที่เป็นของถั่วเหลืองพันธุ์ มข.35 ที่ได้รับภาวะเค็ม 80 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 12 วัน ซึ่งจะพบปรากฏ ทั้งหมด 2 ตัวอย่าง คือถั่วเหลืองพันธุ์ มข.35 ที่ไม่ได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันและชุดที่ได้รับโซเดียมคลอไรด์แอคคลิเมชันแบบที่ 2 สำหรับในกรณีแรก การพบแถบของ *P5CS* mRNA นี้ สอดคล้องกับการสะสมโพรลีนที่พบ ซึ่งกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ P5CS ยังคงอยู่ที่ขั้นของการเกิด transcription จึงพบ mRNA ในปริมาณมาก ในขณะที่โพรลีนยังไม่มีการสะสมเพิ่มอย่างชัดเจน และสำหรับในกรณีหลังจะเห็นว่าปริมาณ mRNA ที่พบน้อยกว่าที่พบในถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับแอคคลิเมชันนั้น แสดงว่าการสังเคราะห์เอนไซม์น่าจะผ่านขั้นตอน Transcription ไปและกำลังเกิด translation เพื่อให้ได้โปรตีนซึ่งคือเอนไซม์ P5CS ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโพรลีนที่พบเพิ่มมากขึ้นกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ได้รับแอคคลิเมชัน ซึ่งสามารถอธิบายผลที่เกิดขึ้นในถั่วเหลืองที่ได้รับแอคคลิเมชันแบบที่ 1 ด้วยเหตุผลลักษณะเดียวกัน สำหรับในถั่วเหลืองพันธุ์อื่นๆ เช่น พันธุ์ สท.2 ที่พบการสะสมโพรลีนเพิ่มมากขึ้นในชุดทดลองที่ไม่ได้รับแอคคลิเมชัน และพันธุ์ สจ.5 ที่พบการสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้นมากในชุดที่ได้รับแอคคลิเมชันแบบที่ 1 แต่ทั้ง 2 ตัวอย่างไม่พบสัญญาณของ *P5CS* mRNA อาจเป็นเพราะระดับของ mRNA ลดลงเนื่องจากผ่านกระบวนการ translation ไปแล้วจนไม่สามารถตรวจวัดได้ หรือในถั่วเหลืองชุดควบคุมที่พบการสะสมโพรลีนเล็กน้อยแต่ไม่พบสัญญาณของ *P5CS* mRNA อาจเนื่องจากมีการแสดงออกน้อยมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้ แต่สำหรับพันธุ์ ชม.60 ไม่พบสัญญาณของ *P5CS* mRNA ที่ตัวอย่างใดเลย ซึ่งสอดคล้องกับผลการสะสมโพรลีน ซึ่งไม่พบการสะสมเพิ่มขึ้นในทุกชุดทดลอง

จากขนาดของ mRNA ที่พบใหญ่ที่สุดคือประมาณ 3 กิโลเบส จึงเป็นไปได้ว่ายีน *P5CS* ในถั่วเหลืองน่าจะมีขนาดใหญ่กว่า 3 กิโลเบส และ mRNA ขนาดเล็กลงมาที่พบอาจอยู่ในขั้นตอนของกระบวนการ translation และ post-translation จึงมีขนาดเล็กลง

กว่า 3 กิโลเบส ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าขนาดของ *P5CS* cDNA ที่มีผู้โคลนได้จากถั่วเหลือง ซึ่งมีขนาด 208 546 และ 1759 คู่เบส (Shoemaker และคณะ, Public Soybean EST Project, unpublished)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย