

การวิเคราะห์ทางสรีรวิทยาและการแสดงออกของยีนในมะเขือเทศ
ที่ได้รับสารแคลเซียมซิลิเกตภายใต้สภาวะเครียดจากเกลือ
Physiological and Gene Expression Analysis of Calcium Silicate
Supplemented-tomato under Salt Stress

สุภาลัย อารีรักษ์^{1*} และสิริวัฒน์ สาครวาสี²

Subhalai Areerak^{1*} and Siriwat Sakhonwasee²

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรุงเทพฯ 10240

²สาขาวิชาพืชผัก คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

¹Department of Biology, Faculty of Sciences, Ramkhamhaeng University, Bangkok, Thailand 10240

²Department of Horticulture, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

*Corresponding author: subhalai@ru.ac.th

Received: August 29, 2019

Revised: January 23, 2020

Accepted: February 27, 2020

Abstract

Presently, many countries have problems about plant salt stress due to drought and deposition of sea salt in agricultural land. Salt stress negatively affects plant growth and production. In this research, CaSiO_3 was applied to tomato plants growing under salt stress at 50 mM NaCl. The results showed that adding 1.25 mM CaSiO_3 can provide the higher chlorophyll contents, relative water contents and weight compared with those grown without 1.25 mM CaSiO_3 . Gene expression of *HAK5*, *APPR2-like gene* and *SOS2* were analyzed from tomato leaves under salt stress at 50 mM NaCl with and without 1.25 mM CaSiO_3 . It was found that 1.25 mM CaSiO_3 -treated plants under salt stress had the level of *HAK5* expression were significantly higher than those plants without 1.25 mM CaSiO_3 in the fourth week. Moreover, the 1.25 mM CaSiO_3 -treated plants also had the level of *APPR2-like gene* expression were significantly higher than those plants without 1.25 mM CaSiO_3 in the the second week. On the other hand, the expression levels of *SOS2* cannot be detected in salt stress plants supplemented with and without 1.25 mM CaSiO_3 in the whole period. According to the experimental results, 1.25 mM CaSiO_3 -supplemented salinity plant had physiological and salt-responed gene expression more potential than those without 1.25 mM CaSiO_3 . Also, the 1.25 mM CaSiO_3 -supplemented salinity plant tends to have physiological indices and gene expression most similar to the control plants until the fourth week.

Keywords: calcium silicate, gene, salt tolerance, tomato

บทคัดย่อ

ปัจจุบันหลายประเทศกำลังประสบปัญหาเรื่องดินเค็ม เนื่องจากความแห้งแล้งและการสะสมของเกลือทะเลในพื้นที่ทางการเกษตร ส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตผิดปกติ และผลผลิตทางการเกษตรลดลง ในงานวิจัยนี้ประยุกต์ใช้ CaSiO_3 กับต้นมะเขือเทศที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือที่ความเข้มข้น 50 mM พบว่าการเพิ่ม CaSiO_3 1.25 mM มีแนวโน้มช่วยให้ต้นมะเขือเทศมีปริมาณคลอโรฟิลล์ ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ และน้ำหนักมากกว่าต้นที่ไม่ได้รับ CaSiO_3 1.25 mM เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *HAK5 APPR2-like gene* และ *SOS2* จากใบของมะเขือเทศที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือที่ความเข้มข้น 50 mM พบว่าต้นมะเขือเทศที่ได้รับ CaSiO_3 1.25 mM มีการแสดงออกของยีน *HAK5* มากกว่าต้นที่ไม่ได้รับ CaSiO_3 1.25 mM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสัปดาห์ที่ 4 และมีการแสดงออกของยีน *APPR2-like gene* มากกว่าต้นที่ไม่ได้รับ CaSiO_3 1.25 mM อย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 2 ในขณะที่ยีน *SOS2* ไม่มีการแสดงออกตลอดการทดลองในต้นมะเขือเทศที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือทั้งต้นที่ได้รับและไม่ได้รับ CaSiO_3 1.25 mM จากการวิเคราะห์พบว่า การให้ CaSiO_3 1.25 mM กับต้นมะเขือเทศที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือที่ความเข้มข้น 50 mM สามารถช่วยให้ต้นมะเขือเทศมีผลทางสรีรวิทยา และการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อความเค็มได้ดีกว่าต้นที่ไม่ได้รับ CaSiO_3 1.25 mM นอกจากนี้ยังช่วยให้ต้นมะเขือเทศที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือมีค่าดัชนีทางสรีรวิทยาและการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อความเค็มใกล้เคียงกับต้นควบคุมมากที่สุดจนถึงสัปดาห์ที่ 4

คำสำคัญ: แคลเซียมซิลิเกต ยีน ทนเค็ม มะเขือเทศ

คำนำ

ปัจจุบันในหลายประเทศกำลังประสบปัญหาเรื่องดินเค็ม เนื่องจากมีการรุกรานของน้ำทะเลเข้ามาในพื้นที่ทางการเกษตรมากขึ้น หรือเกิดจากความแห้งแล้งในพื้นที่ ซึ่งทำให้พื้นที่ดังกล่าวมีความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น ส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตผิดปกติ เนื้อเยื่อพืชถูกทำลาย และผลผลิตทางการเกษตรลดลง เป็นต้น การบรรเทาปัญหาดังกล่าวสามารถทำได้ในหลายแนวทาง เช่น เติมน้ำ ป้องกันแรงดันออสโมติก ฮอร์โมนพืช สารต้านอนุมูลอิสระ และแร่ธาตุต่างๆ ในดินเพื่อให้พืชสามารถเจริญเติบโตภายใต้สภาวะเครียดเกลือได้ดีขึ้น (Hasanuzzaman *et al.*, 2013)

เนื่องจากซิลิคอน (Silicon) เป็นแร่ธาตุที่พบมากในพื้นดิน และถูกดูดซึมเข้าสู่อร์แกนเซลล์พืชได้ง่ายจึงมีการประยุกต์ใช้ซิลิคอนกับพืชหลายชนิด และซิลิคอนมีประโยชน์ต่อพืชในด้านต่างๆ เช่น ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต เพิ่มผลผลิต บรรเทาความเครียดของพืชเมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง และช่วยเพิ่มความต้านทานต่อโรคเหี่ยวจากเชื้อรา (*Fusarium wilt*) (Soundararajan *et al.*, 2013, Muneer *et al.*, 2014 and Zhou *et al.*, 2018) นอกจากนี้ซิลิคอนที่อยู่ในรูปแบบสารประกอบ K_2SiO_3 และ Na_2SiO_3 สามารถบรรเทาความเครียดของพืชจากสภาวะดินเค็มได้ ทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดีขึ้น มีปริมาณคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นควบคุมที่ไม่ได้รับ K_2SiO_3 หรือ Na_2SiO_3 (Soundararajan *et al.*, 2013; Muneer *et al.*, 2014) นอกจากนี้ K และ Na ที่อยู่ในรูปแบบสารประกอบกับซิลิคอนแล้ว ยังมี Ca ที่อยู่ในรูปแบบสารประกอบกับซิลิคอนที่น่าสนใจ คือ CaSiO_3 เนื่องจาก Ca ในพืชทำหน้าที่เป็นสารส่งสัญญาณ (Second messenger) ที่เกี่ยวข้องกับการเมตาบอลิซึม

และเป็นตัวกระตุ้นให้พืชปรับตัวและตอบสนองต่อสภาวะเครียดเกลือได้ดียิ่งขึ้น (Hadi and Karimi, 2012) และซิลิคอนช่วยให้พืชมีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น และให้ผลผลิตมากขึ้น รวมถึงบรรเทาความเครียดของพืชเมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง (Soundararajan *et al.*, 2013; Muneer *et al.*, 2014) นอกจากนี้องค์การอาหารและยาของสหภาพยุโรป (EU) และสหรัฐอเมริกา (FDA) อนุญาตให้ใช้ CaSiO_3 เป็นวัตถุเจือปนในอาหารได้ (Food additive) (Aguilar *et al.*, 2009) ดังนั้นการใช้ CaSiO_3 กับพืชผลการเกษตรจึงมีความปลอดภัย และช่วยบรรเทาความเครียดของพืชจากสภาวะดินเค็ม และเพื่อให้เกิดความเข้าใจอย่างลึกซึ้งถึงกลไกการทำงานของ CaSiO_3 จึงได้ทำการศึกษากการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดเกลือในพืชด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลอง มะเขือเทศสีดา (*Solanum lycopersicum*) บริษัทเจียไต๋

การวิเคราะห์ลักษณะทางสรีรวิทยาของมะเขือเทศที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดเกลือในโรงเรือน

เพาะเมล็ดมะเขือเทศในดินชนิดเดียวกันจนได้ต้นกล้าที่มีอายุ 21 วัน จากนั้นย้ายปลูกในถุงสีดำความจุ 5 ลิตร ใช้ขุยมะพร้าว ทราย และพีทมอส (Klasmann) ในอัตราส่วน 3:1:1 เป็นวัสดุปลูก ซึ่งการทดลองแบ่งออกเป็น 4 กรรมวิธี ได้แก่ ต้นควบคุม ต้นที่ได้รับ NaCl 50 mM ต้นที่ได้รับ CaSiO_3 1.25 mM และต้นที่ได้รับ NaCl 50 mM + CaSiO_3 1.25 mM ต้นพืชแต่ละกรรมวิธีได้รับสารละลายปุ๋ยสูตร Hoagland 1 ลิตร ทุกวัน และฉีดพ่นสารละลายแต่ละกรรมวิธีปริมาณ 1.5 ลิตรทุกสัปดาห์ น้ำที่ใช้ในการทดลองเป็นน้ำประปา สำหรับต้นพืชเพาะปลูกในโรงเรือนพลาสติก ณ สาขาพืชผัก มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

เก็บตัวอย่างใบมะเขือเทศที่ระยะเวลา 2, 4 และ 6 สัปดาห์ โดยพืชแต่ละกรรมวิธีแบ่งออกเป็น 3 ซ้ำๆ ละ 5 ต้น รวมเป็น 15 ต้น/กรรมวิธี/ระยะเวลา ในการทดลองนี้เลือกใช้ CaSiO_3 1.25 mM เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่ผ่านการวิจัยเบื้องต้นจากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งพบว่า CaSiO_3 1.25 mM ช่วยให้สรีรวิทยาของมะเขือเทศที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเจริญเติบโตได้ใกล้เคียงกับต้นควบคุมมากกว่าต้นที่ได้รับ CaSiO_3 ที่ความเข้มข้น 2.5 และ 3.75 mM และความเข้มข้นของ NaCl ที่มากกว่า 50 mM ส่งผลให้ต้นมะเขือเทศในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีลักษณะใบซีด และลำต้นเตี้ย แม้ว่าจะได้รับ CaSiO_3 ที่ความเข้มข้น 1.25, 2.5 และ 3.75 mM ก็ไม่สามารถช่วยให้ต้นมะเขือเทศเจริญเติบโตได้มากกว่า 6 สัปดาห์

วิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุคลอโรฟิลล์ที่บริเวณใบ

เก็บใบมะเขือเทศของแต่ละตัวอย่างปริมาณ 1 กรัม บดในไนโตรเจนเหลวแล้วเติมสาร Hexane:Acetone (60:40) ปริมาณ 2-3 มิลลิลิตร และบดให้เข้ากัน จากนั้นนำตัวอย่างใส่หลอดเซนตริฟิวส์พร้อมเติมสาร Hexane:Acetone (60:40) จนถึงปริมาณ 10 มิลลิลิตร แล้วห่อหลอดเซนตริฟิวส์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminium foil) เก็บไว้ในตู้ดูดควันเป็นระยะเวลา 2 วัน หรือจนกระทั่งรงควัตถุสารสีทั้งหมดถูกสกัดออกจากตัวอย่าง และคำนวณปริมาณตามวิธี Pan *et al.* (2013)

ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในเนื้อเยื่อใบ (Relative Water Content, RWC)

เก็บใบมะเขือเทศของแต่ละตัวอย่างปริมาณ 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง นำไปแช่น้ำทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักบริเวณใบให้แห้ง จากนั้นชั่งน้ำหนักเพื่อเป็นค่าน้ำหนักแห้ง แล้วอบที่อุณหภูมิ 60°C. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักเป็นค่าน้ำหนักแห้ง และนำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในเนื้อเยื่อใบตามวิธีของ Roberts (1987)

ค่าประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสงที่สอง (F_v/F_m) และประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสงที่สอง (ϕ_{PSII})

ใช้เครื่อง Fluorescence Monitoring System (FMS-1) (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK) วัดใบอ่อนที่เจริญเติบโตเต็มที่ การวัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสงที่สอง (ϕ_{PSII}) ทำโดยให้แสงปกติสำหรับการวัดค่าประสิทธิภาพการทำงานของระบบแสงที่สอง ($F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$: maximum efficiency of PSII Photochemistry) ทำโดยเก็บต้นมะเขือเทศให้อยู่ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาทีก่อนการวัด ตามวิธีของ Willits and Peet (2001)

ปริมาณน้ำหนัสดและน้ำหนักแห้งของต้นและรากพืช

ชั่งน้ำหนักสดของต้นมะเขือเทศ จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 80°C. เป็นเวลา 3 วัน เพื่อชั่งน้ำหนักแห้งของต้นมะเขือเทศ

วิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อความเค็ม

สกัด RNA จากใบมะเขือเทศตามวิธีของ Carey *et al.* (1995) แล้วสังเคราะห์ cDNA ด้วยเอนไซม์ Superscript III RT (Vivantis, Malaysia) และวิธีตามคู่มือของเอนไซม์ จากนั้นวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR analysis) ซึ่งยีนที่สนใจ ได้แก่ *HAK5* (Huertas *et al.*, 2013) *SOS2* (Huertas *et al.*, 2012) และ *APRR2-like gene* (Pan *et al.*, 2013) นอกจากนี้ใช้ยีน *Elongation Factor 1-Alpha (ELF)* ของมะเขือเทศ (GenBank accession no. X14449) เป็นยีนควบคุม (Internal control) (Table 1) เพื่อวิเคราะห์ค่า Relative gene expression และสถานะในการทำปฏิกิริยา (Table 2) คำนวณปริมาณการแสดงออกของยีนบน Agarose gel ด้วยโปรแกรม Image J เวอร์ชัน 1.52n

Table 1 List of primers used in this experiment

Primer name	Primer Sequences (5' to 3')
<i>ELF_F</i>	ACC TTT GCT GAA TAC CCT CCA TTG
<i>ELF_R</i>	CAC ACT TCA CTT CCC CTT CTT CTG
<i>HAK5_F</i>	GTA TGA TGT GAC CGT GTT ACG
<i>HAK5_R</i>	TCA GAT CCT GTG ATG CAA AGG
<i>SOS2_F</i>	CTG CTT AGG ACA AGG ACT CG
<i>SOS2_R</i>	GGT ATA GTG TGT GTA ACT GC
<i>APRR2-like gene_F</i>	GGC GGA TGA GGT GAT TGA TA
<i>APRR2-like gene_R</i>	ACG GGA GTC GTT GAT TTG TG

Table 2 RT-PCR condition

Step	Temperature (°C)				Time	Cycles	
	ELF	APRR2 like gene	SOS2	HAK5		ELF	APRR2 like gene, SOS2, HAK5
Initial denaturation	95	95	95	95	3 min	1	1
Denaturation	95	95	95	95	30s	40	35
Annealing	52	58.3	50	52	30s	40	35
Elongation	72	72	72	72	1 min	40	35
Extension	72	72	72	72	5 min	1	1

วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) และวิเคราะห์หาความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (Standard error of mean, SEM) และวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย Analysis of variance (ANOVA) และวิธีของดันแคน (Duncan's Multiple Range Test) ด้วยโปรแกรม SPSS

ผลการวิจัยและวิจารณ์

วิเคราะห์ปริมาณรังกัวตูลคลอโรฟิลล์ที่บริเวณใบ

ต้นมะเขือเทศที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือที่ได้รับ CaSiO_3 1.25 mM มีปริมาณคลอโรฟิลล์มากกว่าต้นที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือที่ไม่ได้รับ CaSiO_3 1.25 mM ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 ถึงสัปดาห์ที่ 6 นอกจากนี้เป็นที่น่าสนใจว่าการเติม CaSiO_3 1.25 mM ให้กับต้นมะเขือเทศที่อยู่ในสภาวะปกติ สามารถชักนำให้พืชผลิตปริมาณคลอโรฟิลล์มากกว่าต้นควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะในสัปดาห์ที่ 4 (Figure 1A) สำหรับต้นที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือที่ไม่ได้รับ CaSiO_3 1.25 mM มีปริมาณคลอโรฟิลล์น้อยที่สุดตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 เป็นต้นไป จากการทดลองนี้พบว่าการให้ CaSiO_3 1.25 mM สามารถช่วยให้ต้นมะเขือเทศที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือกลับมามีการสังเคราะห์ปริมาณคลอโรฟิลล์ได้ใกล้เคียงกับต้นควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับ

งานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่า การให้ NaCl 50 mM + K_2SiO_3 50 mg/L กับต้นซัลเวีย ส่งผลให้มีปริมาณคลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับต้นควบคุม ในขณะที่ต้นซัลเวียที่ได้รับ NaCl 50 mM อย่างเดียวมีปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับต้นควบคุม (Soundararajan *et al.*, 2013) จากผลการทดลองบ่งชี้ว่า CaSiO_3 1.25 mM ช่วยกระตุ้นให้พืชที่อยู่ในสภาวะปกติมีการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น และสามารถช่วยบรรเทาความเสียหายของคลอโรฟิลล์ในพืชเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดเกลือ ซึ่งคล้ายกับการเพิ่ม CaSiO_3 ที่ความเข้มข้น 1.0 g/L ให้กับต้นกล้วย 'Maca' ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาวะปกติ ส่งผลให้ใบกล้วยมีปริมาณคลอโรฟิลล์มากกว่าต้นที่ไม่ได้รับ CaSiO_3 (Asmar *et al.*, 2013)

ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในเนื้อเยื่อใบ

ต้นมะเขือเทศที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือทั้งที่ได้รับและไม่ได้รับ CaSiO_3 1.25 mM มีปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในเนื้อเยื่อใบใกล้เคียงกันตลอดการทดลอง แต่กลับมีปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในเนื้อเยื่อใบน้อยกว่าต้นที่อยู่ในสภาวะปกติ (Figure 1B) ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากค่าศักย์ของน้ำในดินมีน้อยเนื่องจากดินมีความเค็ม จึงทำให้เกิดการดูดน้ำทางรากด้วยกระบวนการออสโมติกเกิดขึ้นยาก (Hasanuzzaman *et al.*, 2013) เป็นที่น่าสนใจว่าต้นที่ได้รับ

CaSiO₃ 1.25mM ในสภาวะปกติมีปริมาณน้ำสัมผัสพืชนั้นในเนื้อเยื่อใบมากที่สุดตลอดการทดลอง 6 สัปดาห์

ค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงสูงสุดของระบบแสงที่สอง (F_v/F_m)

F_v/F_m ของพืช คือ ค่าที่ใช้วิเคราะห์ความเครียดของพืชโดยวัดจากค่าการเรืองแสงของคลอโรฟิลล์ในระบบ Photosystem II ซึ่งพืชส่วนใหญ่เมื่ออยู่ในสภาวะปกติจะมีค่า F_v/F_m อยู่ที่ 0.83 หรืออยู่ในช่วง 0.79-0.85 หาก F_v/F_m มีค่าต่ำกว่า 0.79 แสดงว่าพืชอยู่ในสภาวะเครียด เนื่องจากมีกระบวนการยับยั้งการสังเคราะห์แสง (Photoinhibition) เกิดขึ้น (Maxwell and Johnson, 2000) จากผลการทดลองพบว่าต้นที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือที่ไม่ได้รับ CaSiO₃ 1.25 mM มีค่าเฉลี่ยของ F_v/F_m มากที่สุดตลอดการทดลอง แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับต้นมะเขือเทศที่อยู่ในกรรมวิธีอื่นๆ ยกเว้นต้นควบคุมในสัปดาห์ที่ 2 สำหรับสัปดาห์ที่ 4 ถึงสัปดาห์ที่ 6 พบว่าค่า F_v/F_m ของแต่ละกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีค่าอยู่ในช่วง 0.79-0.85 ซึ่งถือว่ากระบวนการสังเคราะห์แสงในส่วนของการปฏิกิริยาแสงมีการทำงานเป็นปกติ และเป็นที่น่าสังเกตว่าต้นมะเขือเทศที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือที่ได้รับ CaSiO₃ 1.25 mM มีค่า F_v/F_m ใกล้ค่า 0.83 ซึ่งเป็นค่าปกติของการสังเคราะห์แสงมากที่สุด (Figure 1C)

ค่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงของระบบที่สอง (ϕ_{PSII})

ϕ_{PSII} เป็นค่าที่ใช้วิเคราะห์การสังเคราะห์แสงในระบบ Photosystem II ในการขนถ่ายอิเล็กตรอน หากค่านี้มีมากแสดงว่าพืชมีความสามารถในการรับแสงและเปลี่ยนแปลงเป็นพลังงานเคมี เพื่อขนถ่ายอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์แสงได้ดี แต่อย่างไรก็ตามค่าความเข้มข้นของ NaCl ส่งผลต่อการสังเคราะห์แสงในพืช

แต่ละชนิดแตกต่างกันด้วย (Demetriou *et al.*, 2007) จากการทดลองพบว่าค่า ϕ_{PSII} ของสัปดาห์ที่ 2 มีค่าใกล้เคียงกันมากในทุกกรรมวิธี แต่จะเริ่มมีความแตกต่างกันเมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 4 ต้นที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือที่ได้รับ CaSiO₃ 1.25 mM มีค่าเฉลี่ย ϕ_{PSII} มากกว่าต้นที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือที่ไม่ได้รับ CaSiO₃ 1.25 mM สำหรับต้นที่ได้รับ CaSiO₃ 1.25 mM ในสภาวะปกติมีค่าเฉลี่ย ϕ_{PSII} น้อยที่สุด (Figure 1D) ทำให้ทราบว่าทำให้ CaSiO₃ 1.25 mM แก่ต้นมะเขือเทศที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือสามารถช่วยให้ต้นมะเขือเทศมีประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงในส่วนของการระบบแสงที่สองดีขึ้น

ปริมาณน้ำหนักรากและน้ำหนักแห้งของต้นและรากพืช

ต้นมะเขือเทศที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือที่ได้รับ CaSiO₃ 1.25 mM มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นและรากพืช มากกว่าต้นที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือแต่ไม่ได้รับ CaSiO₃ 1.25mM ซึ่งน่าจะเกิดจากซิลิคอนมีคุณสมบัติทำให้รากพืชมีค่าสัมประสิทธิ์การยอมให้น้ำซึมผ่านเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นรากพืชจึงสามารถดูดน้ำเข้าสู่ลำต้นได้มากกว่าปกติ น้ำหนักสดของต้นพืชจึงเพิ่มขึ้น (Wang *et al.*, 2015) และน่าจะเป็นการช่วยลดความเข้มข้นของปริมาณ Na⁺ ในต้นพืชลงด้วย สำหรับต้นที่ได้รับ CaSiO₃ 1.25 mM อย่างเดียว มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักมากกว่าพืชที่อยู่ในตำรับอื่นๆ (Figure 2) สอดคล้องกับการให้ CaSiO₃ ที่มีความเข้มข้น 0.5 และ 2.0 mg/L กับกล้วยไม้ (*Brassavola perrinii*) ทำให้กล้วยไม้เจริญเติบโตได้ดีกว่าต้นที่ไม่ได้รับ CaSiO₃ (Soares *et al.*, 2012) และคล้ายกับการเพิ่มซิลิคอนในรูป Na₂SiO₃ มีความเข้มข้น 2.0 mM ให้กับต้นแตงกวา ในสภาวะปกติส่งผลให้ต้นแตงกวาที่ได้รับ Na₂SiO₃ 2.0 mM ตั้งแต่ 20-30 วัน มีน้ำหนักแห้งมากกว่าต้นที่ไม่ได้รับ Na₂SiO₃ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Zhou, *et al.*, 2018)

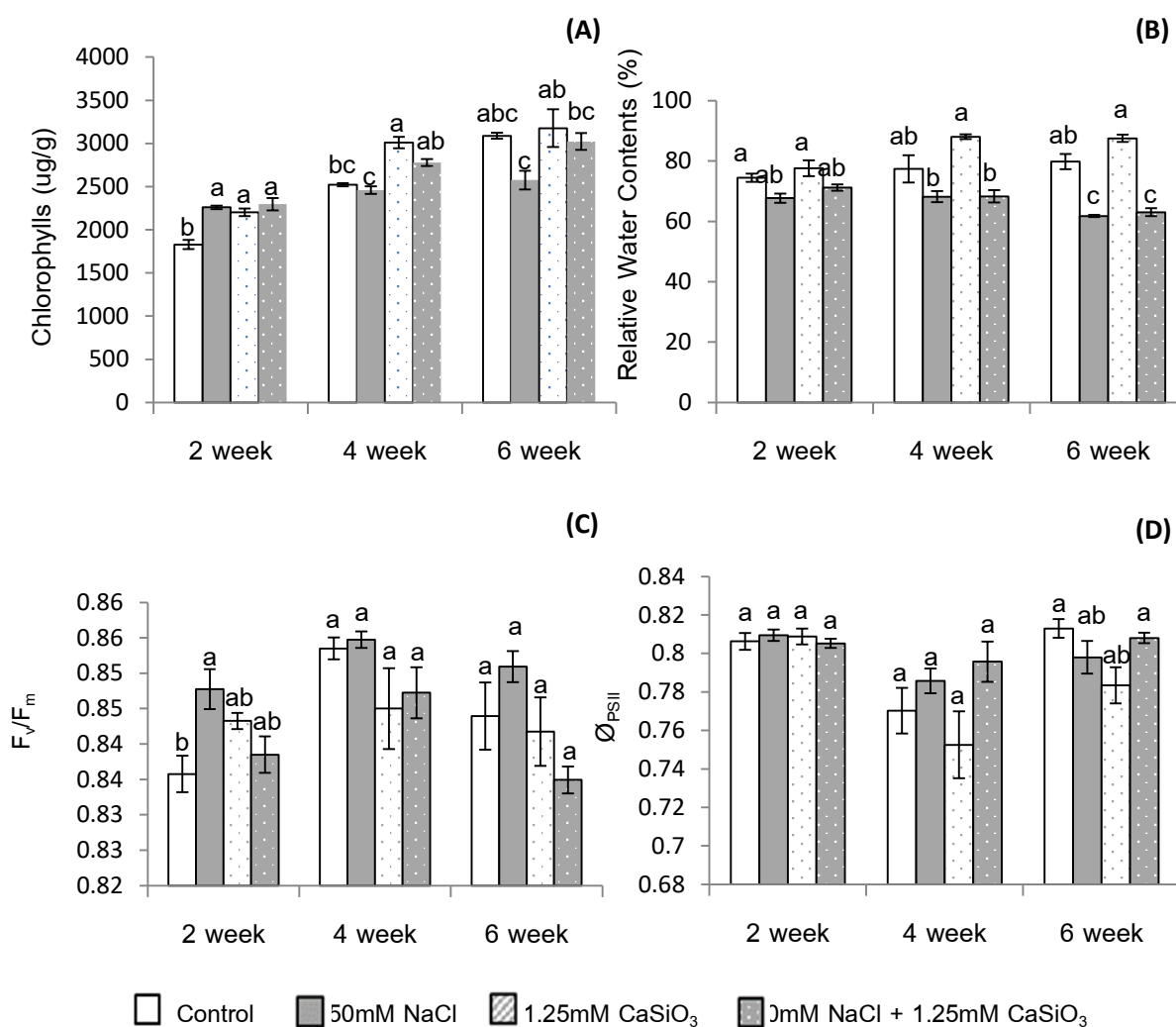


Figure 1 Physiological effects of salt stress on tomato leaves in the greenhouse within 6 weeks; chlorophylls (A), relative water contents (B), F_v/F_m (C) and Φ_{PSII} (D). Each value is the mean of 15 samples. Error bars are standard error of mean (SEM). Value with different letters a, b and c, are significantly different ($P < 0.05$) within the treatments.

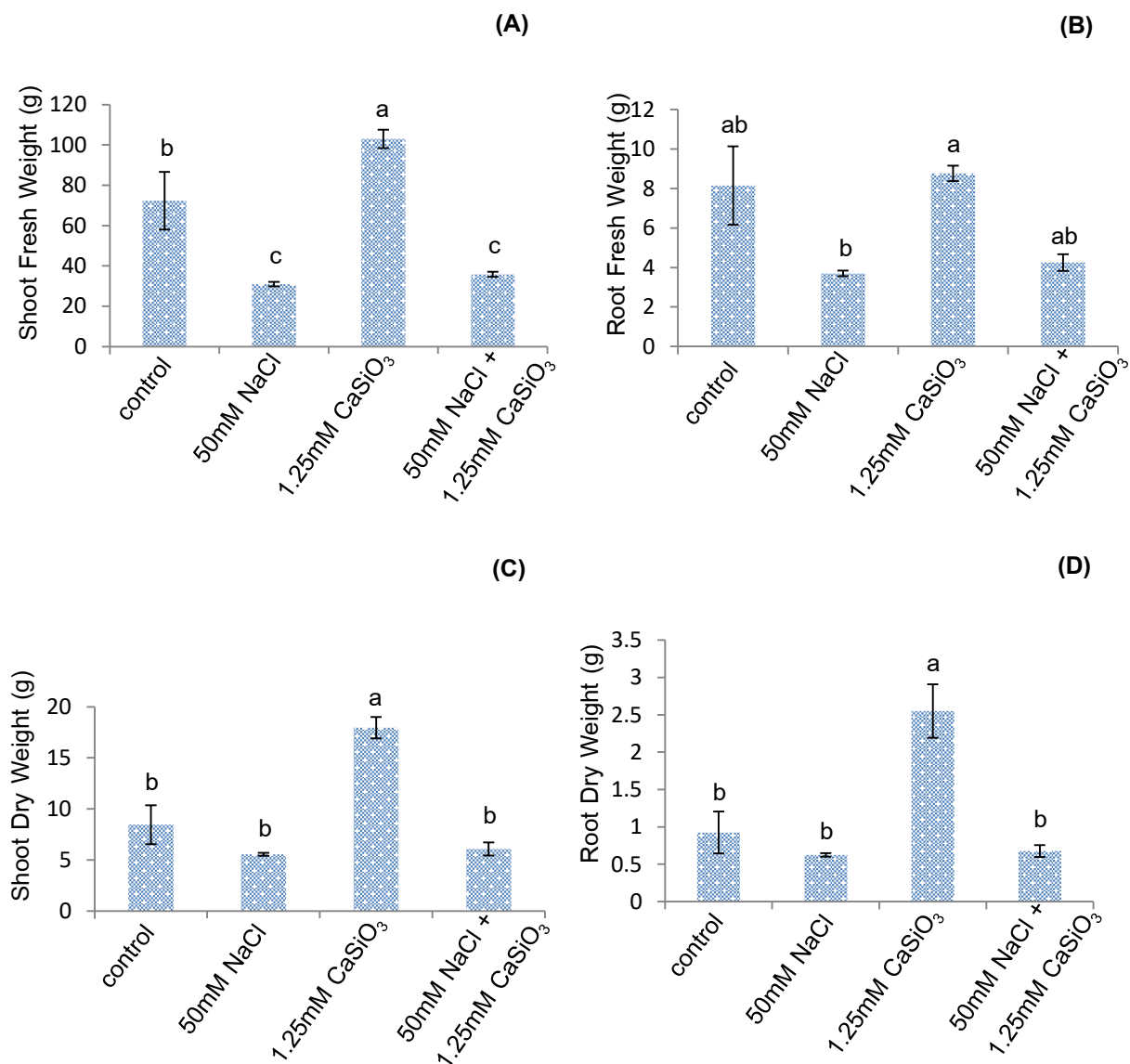


Figure 2 The effects of salt stress on fresh and dry weight of tomato leaves and roots in the greenhouse within 6 weeks; shoot fresh weight (A), root fresh weight (B), shoot dry weight (C) and root dry weight (D)

Each value is the mean of 15 samples. Error bars are standard error of mean (SEM).

Value with different letters a, b and c, are significantly different ($P < 0.05$) within the treatments.

วิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อความเค็ม

ยีน *HAK5* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมโพแทสเซียม และหากยีนนี้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นแสดงว่าพืชกำลังอยู่ในสภาวะที่ขาดโพแทสเซียม ซึ่งการขาดโพแทสเซียมนั้นส่งผลต่อการรักษาแรงดันเต่ง การตอบสนองของปากใบ และการเจริญเติบโตของเซลล์พืช (Nieves-Cordones *et al.*, 2008) ในงานวิจัยนี้พบว่าในสัปดาห์ที่ 2 ยีน *HAK5* มีการแสดงออกมากที่สุดในส่วนที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือ แต่ต้นที่ได้รับ CaSiO_3 1.25 mM ในสภาวะเครียดเกลือมีการแสดงออกของยีนน้อยกว่าเมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 4 การแสดงออกของยีน *HAK5* กลับมีผลตรงข้ามกับสัปดาห์ที่ 2 แต่เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 6 การแสดงออกของยีน *HAK5* ในต้นที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือทั้งที่ได้รับและไม่ได้รับ CaSiO_3 1.25 mM มีการแสดงออกที่ใกล้เคียงกัน (Figure 3A) แสดงว่าการเพิ่ม CaSiO_3 1.25 mM ให้กับต้นมะเขือเทศที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือสามารถช่วยลดสภาวะขาดโพแทสเซียมในพืชเมื่อพืชเริ่มอยู่ในสภาวะเครียดเกลือ แต่ประสิทธิภาพการเพิ่ม 1.25 mM CaSiO_3 ไม่ได้มีมากนักหากต้นพืชต้องอยู่ในสภาวะเครียดเกลือเป็นเวลานาน ในขณะที่ต้นควบคุมมีการแสดงออกยีน *HAK5* ใกล้เคียงกันตลอดการทดลอง ส่วนต้นที่อยู่ในสภาวะปกติและได้รับ CaSiO_3 1.25 mM มีการแสดงออกของยีน *HAK5* น้อยที่สุดตลอดการทดลอง

ยีน *APRR2-like gene* ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมทางบวกในการสังเคราะห์สารคลอโรฟิลล์และแคโรทีนอยด์ในมะเขือเทศ (Pan *et al.*, 2013) ในงานวิจัยนี้พบว่าต้นมะเขือเทศที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือที่ได้รับ CaSiO_3 1.25 mM มีการแสดงออกของยีน *APRR2-like gene* มากกว่าต้นที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลืออย่างเดียวในสัปดาห์ที่ 2 แต่หลังจากนั้นปริมาณการแสดงออกของยีน *APRR2-like gene* ลดลงจนมีปริมาณน้อยกว่าต้นที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลืออย่างเดียว ในขณะที่ต้นควบคุมมีปริมาณการแสดงออกของยีนนี้ใกล้เคียงกันตลอดการทดลอง และต้นที่ได้รับ CaSiO_3

1.25 mM ในสภาวะปกติก็มีปริมาณการแสดงออกของยีนนี้ลดลงจากสัปดาห์ 2-6 (Figure 3B) อาจเป็นไปได้ว่าต้นพืชที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือเป็นระยะเวลานานปริมาณ Na^+ ในต้นพืช มีปริมาณมากจนไปยับยั้ง Pathway ของกระบวนการสังเคราะห์สารสี และกระบวนการสังเคราะห์แสง จึงทำให้ใบมะเขือเทศมีสีเขียวมากกว่าปกติ (Hasanuzzaman *et al.*, 2013) เป็นที่น่าสังเกตว่าแสดงออกของยีน *APRR2-like gene* ในสัปดาห์ที่ 6 มีปริมาณใกล้เคียงกันทุกกรรมวิธี

ยีน *SOS2* แพลรหัสเป็นโปรตีน Calcineurin-interacting protein kinase ซึ่งมีส่วนช่วยในการรักษาสสมดุลของปริมาณ K^+/Na^+ ที่อยู่ในไซโตพลาสซึมเพื่อส่งผ่านไปยังไซเล็ม เมื่อยีน *SOS2* มีการแสดงออกมากขึ้นจะส่งผลให้ต้นพืชสามารถทนต่อสภาวะเครียดเกลือได้มากขึ้น (Belver *et al.*, 2012) และมีการพบว่าการถ่ายยีน *SOS2* (*SOS2* overexpression) เพิ่มให้กับต้นมะเขือเทศส่งผลให้ต้นมะเขือเทศเจริญเติบโตในสภาวะเครียดเกลือที่ NaCl 120 mM เป็นระยะเวลา 10 วัน ได้ดีกว่าต้นปกติ (Huertas *et al.*, 2012) ในงานวิจัยนี้พบว่าการแสดงออกของยีน *SOS2* เกิดขึ้นเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 2 ของต้นที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือ และต้นที่ได้รับ CaSiO_3 1.25 mM ในสภาวะปกติ ขณะที่ต้นที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือที่ได้รับ CaSiO_3 1.25 mM และต้นควบคุมไม่พบการแสดงออกของยีน *SOS2* สำหรับสัปดาห์ที่ 4-6 ไม่พบการแสดงออกของยีน *SOS2* ในใบมะเขือเทศทุกกรรมวิธี (Figure 3C) ซึ่งอาจแสดงว่าการเพิ่มปริมาณ CaSiO_3 ให้กับต้นมะเขือเทศที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือเป็นเวลานานไม่ได้ช่วยให้ต้นมะเขือเทศเจริญเติบโตได้ดีขึ้น แต่ที่น่าสนใจคือ ต้นที่ได้รับ CaSiO_3 1.25 mM ในสภาวะปกติมีการเจริญเติบโตมากกว่าต้นที่อยู่ในกรรมวิธีอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่ใช้ CaSiO_3 ในกล้วยไม้ และส่งผลให้กล้วยไม้เจริญเติบโตได้ดีกว่าต้นควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Soares *et al.*, 2012)

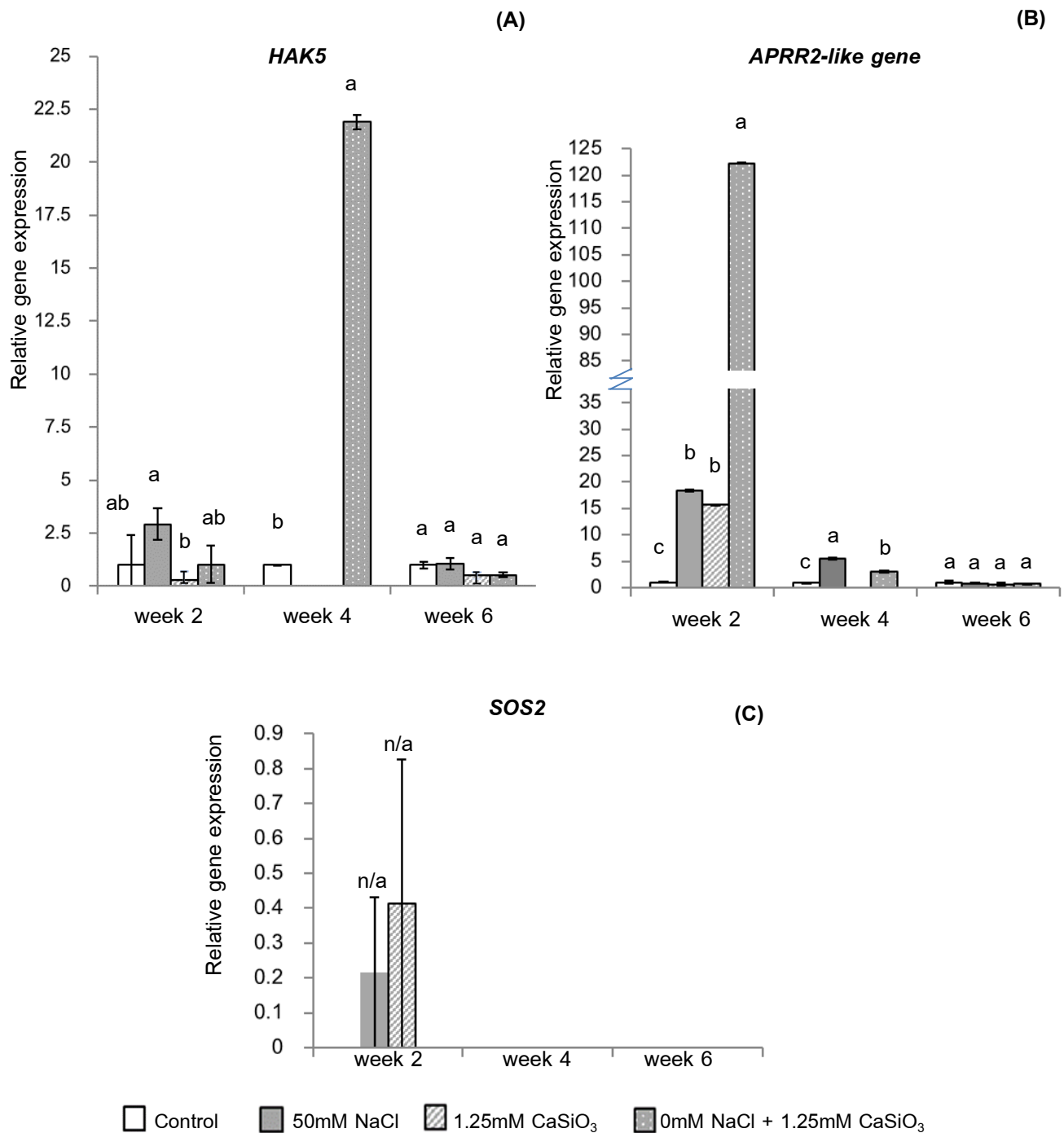


Figure 3 Relative gene expression of *HAK5* (A), *APRR2-like gene* (B) and *SOS2* (C) within 2, 4 and 6 week. Each value is the mean of 5 samples in biological replicate. Error bars are standard error of mean (SEM). Value with different letters a, b and c, are significantly different ($P < 0.05$) within the treatments. Data not available (n/a) : some replicate of gene expression is not detected.

สรุปผลการวิจัย

ต้นมะเขือเทศที่อยู่ในสภาวะเครียดเกลือที่ได้รับ CaSiO_3 1.25 mM มีแนวโน้มปริมาณคลอโรฟิลล์ ปริมาณ น้ำสัมพันธ์ และน้ำหนักมากกว่าต้นที่อยู่ในสภาวะเครียด เกลืออย่างเดียว แสดงว่า CaSiO_3 1.25 mM มีส่วนช่วยให้ ต้นมะเขือเทศสามารถเจริญเติบโตได้ แต่การให้ CaSiO_3 1.25 mM กับต้นมะเขือเทศที่อยู่ในสภาวะเครียด เกลือเป็นระยะเวลานานไม่สามารถช่วยให้ต้นมะเขือเทศ เจริญเติบโตได้เท่ากับต้นควบคุม และเมื่อวิเคราะห์การ แสดงออกของยีน *HAK5*, *APRR2-like gene* และ *SOS2* พบว่าการให้ CaSiO_3 1.25 mM กับต้นมะเขือเทศที่ อยู่ในสภาวะเครียดเกลือไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับรักษาสสมดุล ของ K^+/Na^+ ที่อยู่ในไซโทพลาสซึมเพื่อส่งผ่านไปยัง ไซเล็ม แต่ในขณะเดียวกันอาจช่วยลดสภาวะการขาด โพแทสเซียมในพืชเมื่อพืชเริ่มอยู่ในสภาวะเครียดเกลือ และช่วยให้ต้นพืชมีการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์เพิ่มขึ้น สิ่งที่น่าสนใจจากการทดลองนี้คือการให้ CaSiO_3 1.25 mM กับต้นมะเขือเทศที่อยู่ในสภาวะปกติส่งผลให้ต้นมะเขือเทศ มีแนวโน้มทางสรีรวิทยาที่ดีที่สุดตลอดการทดลอง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยครั้งนี้ให้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ภาควิชาพืชสวน สาขาพืชผัก คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ และห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ทดสอบและพัฒนา นวัตกรรมด้วยเซลล์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้การ สนับสนุนสถานที่ และอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ในการ ทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Aguilar, F., U.R. Charrondiere, B. Dusemund, P. Galtier, J. Gilbert, D.M. Gott, S. Grilli, R. Guertler, G.E.N. Kass, J. Koenig, C. Lambré, J.C. Larsen, J.C. Leblanc, A. Mortensen, D. Parent-Massin, I. Pratt, I.M. Rietjens, I. Stankovic, P. Tobback, T. Verguieva and R. Woutersen. 2009. Calcium silicate and silicon dioxide/silicic acid gel added for nutritional purposes to food supplements. **The EFSA Journal** 1132: 1-24.
- Asmar, S.A., E.M. Castro, M. Pasqual, F.J. Pereira and J.D.R. Soares. 2013. Changes in leaf anatomy and photosynthesis of micropropagated banana plantlets under different silicon sources. **Sci. Hortic.** 161: 328-332
- Belver, A., R. Olías, R. Huertas and M.P. Rodríguez-Rosales. 2012. Involvement of *SlSOS2* in tomato salt tolerance. **Bioengineered** 3: 298-302.
- Carey, A.T., K. Holt, S. Picard, R. Wilde, G.A. Tucker, C.R. Bird, W. Schuch and G.B. Seymour. 1995. Tomato exo-(1→4)- β -D-galactanase. Isolation, changes during ripening in normal and mutant tomato fruit, and characterization of a related cDNA clone. **Plant Physiol.** 108: 1099-1107.

- Demetriou, G., C. Neonaki, E. Navakoudis and K. Kotzabasis. 2007. Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus-the protective role of polyamines. **Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.** 1767(4): 272-280.
- Hadi, M.R. and N. Karimi. 2012. The role of calcium in plants salt tolerance. **J. Plant Nutr.** 3: 2037-2054.
- Hasanuzzaman, M., K. Nahar and M. Fujita. 2013. Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. pp. 25-87. *In* Ahmad, P., M.M. Azooz and M.N.V. Prasad (eds.) **Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress**. New York: Springer.
- Huertas, R., R. Olías, Z. Eljakaoui, F.J. Gálvez, J. Li, P.A. De Morales, A. Belver and M.P. Rodríguez-Rosales. 2012. Overexpression of *SISOS2 (SLCIPK24)* confers salt tolerance to transgenic tomato. **Plant Cell Environ.** 35: 1467-1482.
- Huertas, R., L. Rubio, O. Cagnac, M.J. Garcia-Schanchez, J. De Dios Alche, K. Venema, J.A. Fernandez, M.P. Rodríguez-Rosales. 2013. The K⁺/H⁺ antiporter *LeNHX2* increases salt tolerance by improving K⁺ homeostasis in transgenic tomato. **Plant Cell Environ.** 36: 2135-2149.
- Maxwell, K. and G.N. Johnson. 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. **J. Exp. Bot.** 51: 659-668.
- Muneer, S., Y.G. Park, A. Manivannan, P. Soundararajan and B.R. Jeong. 2014. Physiological and proteomic analysis in chloroplasts of *Solanum lycopersicum* L. under silicon efficiency and salinity stress. **Int. J. Mol. Sci.** 15: 21803-21824.
- Nieves-Cordones, M., A.J. Miller, F. Alemañ, V. Martí'nez and F. Rubio. 2008. A putative role for the plasma membrane potential in the control of the expression of the gene encoding the tomato high-affinity potassium transporter *HAK5*. **Plant Mol. Biol.** 68: 521-532.
- Pan, Y., G. Bradley, K. Pyke, G. Ball, C. Lu, R. Fray, A. Marshall, S. Jayasuta, C. Baxter, R. Wijk, L. Boyden, R. Cade, N. Chapman, P. Fraser, C. Hodgman and G. Seymour. 2013. Network inference analysis Identifies an *APRR2-like* gene linked to pigment accumulation in tomato and pepper fruits. **Plant Physiol.** 161: 1476-1485.
- Roberts, B.R. 1987. Methods for measuring water status and reducing transpirational water loss in trees. **J. Arboriculture** 13(2): 52-61.

- Soares, J.D.R., M. Pasqual, A.G. De Araujo, E.M. De Castro, F.J. Pereira and F.T. Braga. 2012. Leaf anatomy of orchids micropropagated with different silicon concentrations. **Acta Sci. Agron.** 34: 413-421.
- Soundararajan, P., I. Sivanesan, E.H. Jo and B.R. Jeong. 2013. Silicon promotes shoot proliferation and shoot growth of *Salvia splendens* under salt stress in vitro. **Hort. Environ. Biotechnol.** 54: 311-318.
- Wang, S., P. Liu, D. Chen, L. Yin, H. Li and X. Den. 2015. Silicon enhanced salt tolerance by improving the root water uptake and decreasing the ion toxicity in cucumber. **Front Plant Sci.** 6(759): 1-10.
- Willits, D.H. and M.M. Peet. 2001. Using chlorophyll fluorescence to model leaf photosynthesis in greenhouse pepper and tomato. **Acta Hortic.** 507: 311-315.
- Zhou, X., Y. Shen, X. Fu and F. Wu. 2018. Application of sodium silicate enhances cucumber resistance to fusarium wilt and alters soil microbial communities. **Front Plant Sci.** 9(624): 1-12.

