

การประเมินถั่วลิสงทนแล้งด้วยตัวบ่งชี้ความเครียดออกซิเดชันของลิพิดและโปรตีนในปมราก

Evaluation of Drought Resistant Peanuts by Oxidative-stressed Indices of Lipids and Proteins in Root Nodules

รัมภ์รดา อุทิสานนท์ (Rumrada Utisanon)* ดร.สุพร นุชคำรงค์ (Dr.Suporn Nuchadomrong)**

ดร.สนั่น จอกลอย (Dr.Sanun Jogloy)***

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เปรียบเทียบตัวบ่งชี้ความเครียดออกซิเดชัน คือ มาลอนไดอัลดีไฮด์และโปรตีนคาร์บอนิลในปมราก ถั่วลิสงเพื่อเป็นแนวทางการศึกษาลักษณะพันธุกรรมทนแล้งที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของปมราก โดยใช้พันธุ์ทนแล้ง 3 พันธุ์และพันธุ์อ้างอิงไม่ทนแล้ง 2 พันธุ์ ในการปรับตัวหลังจากการให้น้ำกลับภายหลังช่วงการกระทบแล้ง ผลการศึกษาพบว่า พันธุ์ทนแล้ง ICGV 98305 สามารถฟื้นตัวจากการกระทบแล้งได้ดีกว่าพันธุ์อื่นๆ โดยมีค่าของตัวบ่งชี้ทั้งสองค่าลดลง และเมื่อแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบโปรตีนขนาด 16 กิโลดาลตันในพันธุ์ Tifton-8 มีปริมาณลดลงเมื่อกระทบแล้งน้อยมากเมื่อเทียบกับพันธุ์อื่นๆ และเมื่อให้น้ำกลับโปรตีนนี้มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น เมื่อวิเคราะห์ด้วย Western blot พบว่าปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลลดลงด้วย จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงบ่งชี้ได้ว่าพันธุ์ ICGV 98305 และ Tifton-8 น่าจะสามารถนำมาใช้เป็นพันธุ์ทนแล้งแนะนำให้เกษตรกรไทยปลูกได้ดีในเขตที่ร้อนชื้นสลับกับแห้งแล้งอย่างภาคอีสาน รวมทั้งใช้ในโปรแกรมการผสมพันธุ์ต่อไป

ABSTRACT

In this work, malondialdehyde and protein carbonyls were studied as oxidative-stressed indices in peanut root nodules of 3 drought resistant genotypes and 2 sensitive reference genotypes. It would be guidelines for the resistant genotype associated with nodule activity. The study was approached to the rewatering response after drought period. A resistant genotype, ICGV 98305, was superior for its ability in recovering from the stress as decrease in the content of both indices was remarkable. SDS-PAGE analysis revealed that a 16-kDa protein of Tifton-8 reduced the least content in the drought treatment when compared to other genotypes. After rewatered, the 16-kDa protein in this genotype turned back to a higher level with low protein carbonyls due to Western blot analysis. The present study demonstrated that ICGV 98305 and Tifton-8 should be two recommended drought resistant genotypes for cultivation in the alternating tropical moist and arid climate like in the northern Thailand, as well as for breeding program.

คำสำคัญ: ถั่วลิสง มาลอนไดอัลดีไฮด์ โปรตีนคาร์บอนิล

Keywords: Peanut, Malondialdehyde, Protein carbonyl

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*** ศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

ถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*) เป็นพืชต้องการน้ำน้อย เกษตรกรไทยปลูกถั่วลิสงเป็นพืชสร้างรายได้เสริมหมุนเวียนในพื้นที่ทำนาหลังฤดูเก็บเกี่ยวข้าวซึ่งเป็นเวลานานออกฤดูฝน เมล็ดถั่วลิสงมีน้ำมันไตรกลีเซอไรด์และโปรตีนในปริมาณสูง (44-56% และ 22-36% ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ) น้ำมันในเมล็ดประกอบด้วยกรดไขมันชนิดดีซึ่งร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ได้ คือ กรดโอเลอิก (oleic acid) และกรดลิโนเลอิก (linoleic acid) รวมทั้งสารไฟโตสเตอรอล (phytosterol) สารไตรเทอร์ปีน (triterpene) และสารพอลิฟีนอลิก (polyphenolic) ที่ช่วยลดความเสี่ยงของการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจและมะเร็ง (Gardner and Kraemer, 1995; Sebei et al., 2013) นอกจากนี้การปลูกถั่วลิสงยังช่วยคืนความสมบูรณ์ของดิน ภายในปมรากถั่วลิสงเกิดกิจกรรมตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียไรโซเบียม การปลูกถั่วลิสงได้ผลผลิตดีเมื่อปลูกในดินร่วนปนทรายเพื่อลดการติดเชืของฝักถั่วซึ่งเกิดอยู่ในดินและสะดวกในการเก็บฝัก จึงเสี่ยงต่อการกระทบแล้ง การกระทบแล้งในระยะเริ่มออกดอกจนถึงเวลาเก็บเกี่ยวทำให้ผลผลิตลดลง แต่ถั่วลิสงทนแล้งแล้วกลับมาได้น้ำตามปกติ (rewatering) ตั้งแต่ช่วงติดฝักจะทำให้ได้ฝักที่มีเมล็ดขนาดใหญ่ขึ้น (Reddy et al., 2003) ผลผลิตฝักของต้นที่กระทบแล้งเป็นลักษณะคัดเลือกพันธุ์ทนแล้งซึ่งจะสูงกว่าของพันธุ์ไม่ทนแล้ง (Dinh et al., 2013) แต่ไม่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ทนแล้ง Pimratch et al. (2008) พบว่ากิจกรรมการตรึงไนโตรเจนของเอนไซม์ไนโตรจีเนส (nitrogenase) ของไรโซเบียมในปมรากลดลงเมื่อต้นกระทบแล้งแต่ไม่สัมพันธ์กับสมบัติทนแล้งหรือไม่ทนแล้งของถั่วลิสง

การกระทบแล้งทำให้น้ำแพร่ออกนอกเซลล์และเป็นสัญญาณกระตุ้นให้ปากใบปิดเพื่อลดการคายน้ำ มีผลกระทบยับยั้งวัฏจักรคัลวิน (Calvin cycle) จากการที่แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์แพร่เข้าปากใบไม่ได้ ทำให้เกิดการสะสมโมเลกุลออกซิเจนว่องไว (reactive oxygen species; ROS) หลายชนิด เช่น อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (You and Chan, 2015) เรียกสภาวะที่เซลล์มีการสะสม ROS นี้ว่าสภาวะความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำให้เกิดปฏิกิริยาถูกไซ้ของกระบวนการลิพิดออกซิเดชัน (lipid oxidation) จะเกิดผลผลิตคือสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde) ซึ่งสารมาลอนไดอัลดีไฮด์สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ระดับการถูกทำลายเยื่อหุ้มเซลล์โดยอนุมูลอิสระ ส่วนปฏิกิริยาสำคัญที่ทำลายโปรตีนคือ ปฏิกิริยากับหมู่ไซ้ข้างของกรดอะมิโนเปลี่ยนเป็นหมู่คาร์บอนิล (carbonyl) ประเภทอัลดีไฮด์ (aldehyde) หรือคีโต (keto) ซึ่งรวมเรียกว่าเป็นหมู่โปรตีนคาร์บอนิล (Sharma et al., 2012) เป็นตัวบ่งชี้ Furlan et al. (2012) พบว่า การกระทบแล้งในช่วงออกดอกเกิดฝักชักนำไป ROS มาลอนไดอัลดีไฮด์ และโปรตีนคาร์บอนิลมีปริมาณเพิ่มขึ้นในปมรากถั่วลิสง ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ไนโตรจีเนสลดลง แต่ต้นที่กระทบแล้งแล้วได้น้ำอีกครั้งค่าต่างๆ ดังกล่าวจะใกล้เคียงกับต้นถั่วลิสงที่ได้รับน้ำตามปกติ อย่างไรก็ตามการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างถั่วลิสงพันธุ์ไม่ทนแล้งและทนแล้งยังมีน้อยมาก

วัตถุประสงค์การวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์และโปรตีนคาร์บอนิลในปมรากระหว่างถั่วลิสงพันธุ์ไม่ทนแล้งและพันธุ์ทนแล้ง สำหรับเป็นข้อมูลบ่งชี้พันธุกรรมในการกำหนดโปรแกรมผสมพันธุ์และพัฒนาพันธุ์ถั่วลิสงทนแล้งต่อไป

วิธีการวิจัย

การเตรียมตัวอย่าง

ถั่วลิสง 5 พันธุ์ คือ พันธุ์ทนแล้ง 3 พันธุ์ [Tifton-8 (จาก US Department of Agriculture ประเทศสหรัฐอเมริกา), ICGV 98305 (จาก ICRISAT ประเทศอินเดีย) และ KCU 60] และพันธุ์ไม่ทนแล้ง 2 พันธุ์ [KS 2 และ Tainan 9 (จากประเทศไต้หวัน)] ซึ่งพันธุ์ KCU 60 พันธุ์ KS 2 และพันธุ์ Tainan 9 เป็นพันธุ์แนะนำให้เกษตรกรไทยปลูก

(Dinh et al., 2013) ปลูกในสภาพไร่ที่แปลงทดลองคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น แบ่งกลุ่มการปลูก 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 กลุ่มกระทบแล้งช่วงออกดอกเกิดฝัก (D; drought) ปลูกตามปกติโดยได้รับน้ำจนอายุ 30 วันแล้วหยุดให้น้ำ ต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วัน กลุ่มที่ 2 กลับมาให้ น้ำทุกวันเป็นเวลา 15 วันหลังกระทบแล้ง (R; rewatering) และกลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มควบคุม C1 (เพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม D) โดยให้น้ำปกติเป็นเวลา 60 วันและ 75 วัน เป็นกลุ่มควบคุม C2 (เพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม R) ตามลำดับ เก็บปมรากแล้วแช่ทันทีในเอทานอลที่ 0-1°C แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ชับน้ำพองแห้ง ชั่ง และบันทึกเป็นน้ำหนักสดของปม (wet weight nodule) หลังจากนั้นทำให้ปมแห้งโดยวิธีสูญญากาศภายใต้สภาวะเยือกแข็ง (freeze-drying) ชั่งและบันทึกน้ำหนักปมแห้ง เก็บปมแห้งที่ -70°C สำหรับใช้ทดลองต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์

โดยทำการบดปมแห้ง 0.3 กรัมแล้วเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid; TCA) เพิ่มขึ้น 0.1% จากนั้นนำไปวัดค่าการเกิดลิพิดออกซิเดชัน โดยเปรียบเทียบจากปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นตามวิธีของ Sheokand et al. (2010) โดยอาศัยเทคนิคการใช้กรดไฮโอบาร์บิทริก อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร (A_{532}) ของสารเชิงซ้อนในหน่วยนาโนโมลต่อน้ำหนักสดของปม 1 กรัมและลบด้วยค่า A_{600} ของปฏิกริยารบกวน (Taulavuri et al., 2001) คำนวณปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Heath, Packer, 1968)

การวัดปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลโดยเทคนิค Western blot immunodetection

เตรียมอนุพันธ์โปรตีนคาร์บอนิลไดไนโตรฟีนิลไฮดราโซน (dinitrophenylhydrazone; DNP) โดยปรับใช้วิธีของ Juszczuk et al. (2008) ดังนี้ นำสารโปรตีนสกัดที่มีความเข้มข้น 3 มก./มล. จำนวน 20 ไมโครลิตรแล้วเติม 2,4-ไดไนโตรฟีนิลไฮดราซีน (2,4-dinitrophenylhydrazine) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (เตรียมในกรดไฮโอโรคลอริก 1 โมลาร์) จำนวน 10 ไมโครลิตร และเติม 10% SDS จำนวน 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติมทริสเบส (Tris base) 2 โมลาร์ จำนวน 20 ไมโครลิตร ผสมกัน หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ SDS-PAGE ซ้อมแถบโปรตีนและบันทึกภาพ หรือทำ Western blot ตามระบบของ Towbin et al. (1979) ถ่ายโอนโปรตีนจากเจลไปบนแผ่นพีวีดีเอฟ (PVDF membrane) แล้วติดตามแถบโปรตีนที่มีอนุพันธ์โปรตีนคาร์บอนิล-DNP บนแผ่นพีวีดีเอฟ ตามวิธีของ Sattayasai et al. (2003) โดยบ่มกับแอนติบอดีชนิดแรก คือ mouse monoclonal anti-DNP antiserum ที่ 4°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมงกับ anti-mouse IgG horseradish peroxidase-linked polyclonal antibody ซึ่งจำเพาะต่อแอนติบอดีชนิดแรก วิเคราะห์แถบโปรตีนที่มีโปรตีนคาร์บอนิลด้วยปฏิกริยาที่ทำให้เกิดการเรืองแสงของ ECL substrate บันทึกแถบเรืองแสงเป็นแถบสีดำบนแผ่นฟิล์มที่ไวต่อแสง วิเคราะห์ค่าความเข้มของแถบโปรตีนที่แยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE หรือในแผ่นฟิล์มด้วยโปรแกรมของเครื่อง Syngene G:Box

เตรียมตัวอย่างโปรตีนสกัด

บดปมแห้งในไนโตรเจนเหลว แล้วเติมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิโมลาร์ ทีเอช 7.4 ที่มีฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (phenylmethylsulfonyl fluoride) 1 มิลลิโมลาร์ จำนวนบัฟเฟอร์ 1 มล.ต่อน้ำหนักเปียกปมราก 1 กรัม บดให้ผสมกันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (10,000g นาน 30 นาทีที่ 4°C) เก็บสารละลายส่วนใสเป็นตัวอย่างโปรตีนสกัด วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน (Lowry et al., 1951) แล้วเก็บไว้ที่ -70°C เพื่อใช้ไป

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลรวม

เตรียมตัวอย่างโปรตีนสกัดด้วยวิธีข้างต้นแต่ใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ทีเอช 7.4 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลรวม โดยทำปฏิกริยากับ 2,4-ไดไนโตรฟีนิลไฮดราซีนตามวิธีของ Furlan et al. (2012) หลังจากนั้นเติมอะซิโตนปริมาตร 4 เท่าเพื่อตกตะกอนโปรตีนที่ -20°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอน ล้างตะกอนด้วย

อะซิโตนแล้วละลายตะกอนด้วยปริมาตรที่เหมาะสมของกวานิดีนไฮโดรคลอไรด์ (guanidine hydrochloride) 6 โมลาร์ (เตรียมในโปแตสเซียมฟอสเฟต 0.5 โมลาร์พีเอช 2.5) เป็นเวลา 18 ชั่วโมงที่ 4°C นำไปวัดค่า A₃₇₀ และใช้ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง 22x10³ M⁻¹cm⁻¹ (Shacter, 2000) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลรวมในหน่วยนาโนโมลต่อน้ำหนักเปียกปม 1 กรัม

การแยกแถบของโปรตีนด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้ฟอลิอะคริลามิดเจล 15% ค่าความต่างศักย์คงที่ 150 โวลต์และระยะเวลาแยกโปรตีน 5 เซนติเมตร โดยอุปกรณ์ Mini-PROTEAN 3 Cell (BioRad) ย้อมแถบโปรตีนด้วยสีค้อมาสซีบลิลเลียนบลูอาร์-250 (Coomassie brilliant blue R-250) บันทึกภาพแถบโปรตีนเครื่อง Syngene G:Box

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ใช้โปรแกรมของวิธีทดสอบค่าสถิติแบบ Least Significant Difference (LSD) ของข้อมูลจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ผลการวิจัย

ปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ในปมราก

ตารางที่ 1 พบว่า ปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ที่วัดได้ในปมรากในต้นถั่วลิสงพันธุ์ Tifton-8 พันธุ์ ICGV 98305 พันธุ์ KCU 60 และพันธุ์ Tainan 9 มีปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์เพิ่มสูงขึ้นตามอายุ ส่วนพันธุ์ KS 2 นั้นไม่แตกต่างซึ่งเทียบจากค่าที่วัดได้ในกลุ่มที่ได้รับน้ำตามปกติ C2 (อายุ 75) เปรียบเทียบกับกลุ่ม C1 (อายุ 60 วัน) ในขณะที่ปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ในกลุ่มกระทบแล้ง (D) เพิ่มขึ้นในทุกพันธุ์ การได้รับน้ำกลับ (R) ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในปมรากที่วัดได้จะลดต่ำลงในพันธุ์ ICGV 98305 และ พันธุ์ KCU 60

ตารางที่ 1 ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ในปมรากต้นถั่วลิสงปลูกที่สภาวะกระทบแล้ง (D) และให้น้ำกลับ (R) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (C1 และ C2) ที่ได้รับน้ำตามปกติ 60 และ 75 วันตามลำดับ

พันธุ์ถั่วลิสง	ปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์ (nmol/g nodule wet weight)			
	C1	D	C2	R
Tifton-8	29.97±5.03	64.40±5.50	40.91±2.16	38.07±1.93
ICGV 98305	30.65±5.62	46.84±4.28	40.77±3.72	28.76±1.29
KCU 60	10.80±4.33	43.88±4.85	44.46±3.04	31.11±1.09
KS 2	44.01±5.99	67.50±5.00	38.88±2.39	36.64±2.03
Tainan 9	24.03±5.47	50.08±4.41	28.22±1.85	36.99±1.68

ค่าปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลรวมในปมราก

จากตารางที่ 2 พบว่า กลุ่มที่ได้รับน้ำตามปกติ 60 (C1) และ 75 วัน (C2) ในทุกพันธุ์นั้น มีปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลรวมในปมรากเพิ่มสูงขึ้นและเพิ่มขึ้นในกลุ่มกระทบแล้ง (D) จากการทดลองให้น้ำกลับ (R) พบว่าพันธุ์ ICGV 98305 เป็นพันธุ์เดียวที่มีปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลลดลงอย่างมาก

ตารางที่ 2 ปริมาณ โปรตีนคาร์บอนิลรวมใน โปรตีนสกัดจากปมรากต้นถั่วลิสงปลูกที่สภาวะกระทบแล้ง (D) และให้น้ำกลับ (R) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (C1 และ C2) ข้อมูลที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$

พันธุ์ถั่วลิสง	ปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลรวม (nmol/g nodule wet weight)			
	C1	D	C2	R
Tifton-8	5.46±1.418 ^j	816.84±12.38 ^h	1500.11±8.40 ^c	1713.84±23.14 ^b
ICGV 98305	17.87±0.94 ^j	1182.82±25.15 ^c	2140.69±8.66 ^a	879.28±42.86 ^g
KKU 60	478.19±32.14 ⁱ	881.69±17.96 ^g	2150.12±20.71 ^a	2166.16±35.68 ^a
KS 2	335.33±21.60 ^d	837.42±27.19 ^{gh}	821.60±48.21 ^h	1744.53±48.21 ^b
Tainan 9	15.52±2.0 ^j	835.15±3.86 ^{gh}	1021.92±1.16 ^f	1218.04±33.21 ^c

แบบแผนของโปรตีนและโปรตีนที่มีโปรตีนคาร์บอนิลจากปมราก

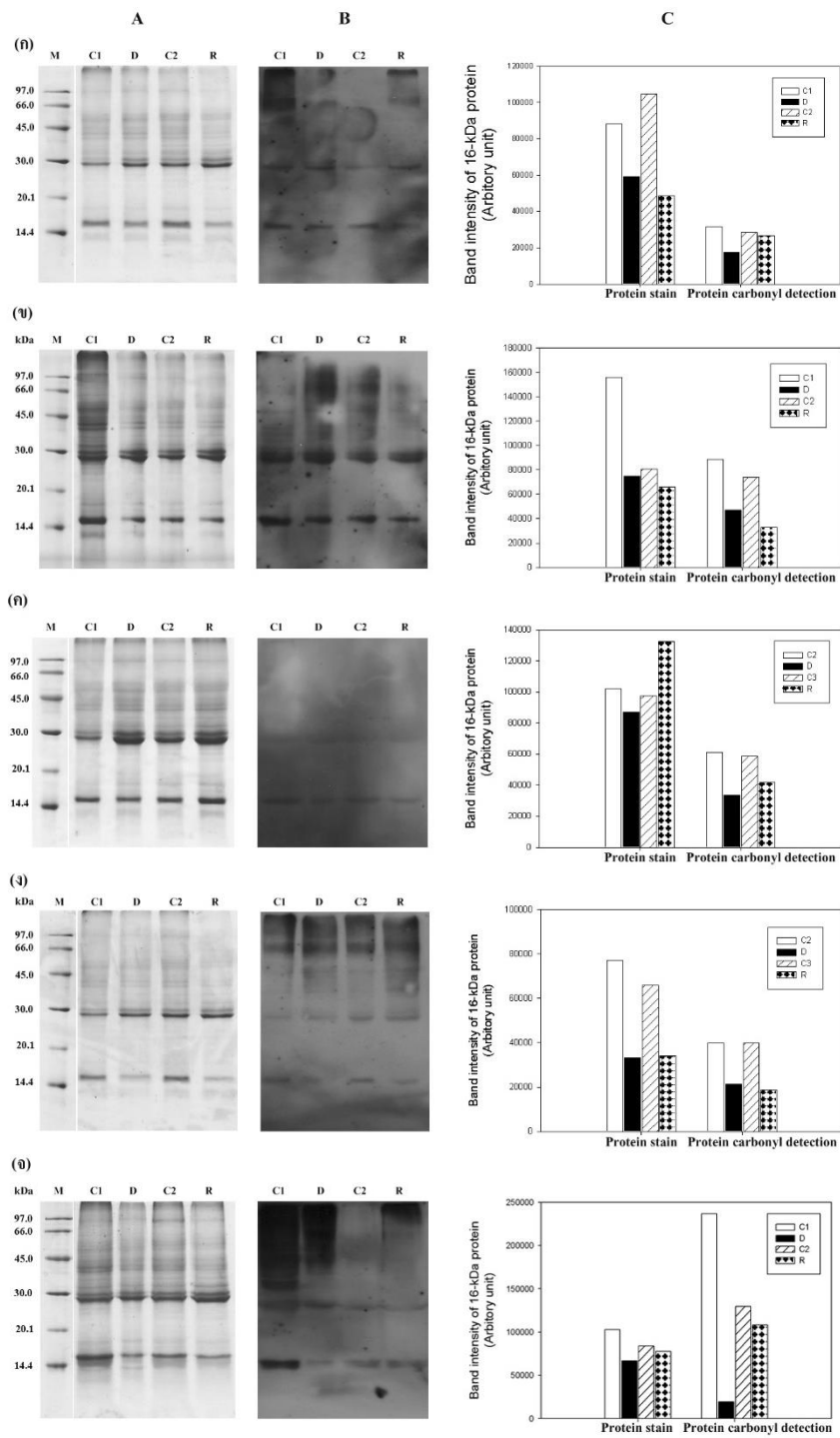
ผลการศึกษาแบบแผนของโปรตีนด้วยเทคนิคของ SDS-PAGE พบแถบโปรตีนที่ขนาด 16 และ 28 กิโลดาลตัน (kDa) ติดสีเข้มมากในถั่วลิสงทุกสายพันธุ์ แสดงว่าโปรตีนทั้ง 2 ขนาดมีปริมาณมากในปม เมื่อกระทบแล้งและการให้น้ำกลับ โปรตีน 16 kDa มีปริมาณลดลงในพันธุ์ Tainan 9 (ก) พันธุ์ ICGV 98305 (ง) และพันธุ์ KKU 60 (จ) ยกเว้นพันธุ์ KS 2 (ข) และพันธุ์ Tifton-8 (ค) เมื่อวิเคราะห์แบบแผนโปรตีนซึ่งมีหมู่โปรตีนคาร์บอนิล โดยวัดค่าความเข้มของแถบโปรตีน 16 kDa พบว่าโปรตีนนี้มีปริมาณลดลงในทุกพันธุ์เมื่อต้นกระทบแล้ง วิเคราะห์ปริมาณหมู่โปรตีนคาร์บอนิลได้ลดลงด้วย พันธุ์ที่น่าสนใจคือ Tifton-8 (รูปที่ 1 ค) โปรตีนขนาด 16 kDa มีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อยจากผลของการกระทบแล้ง แล้วเพิ่มขึ้นสูงมากหลังจากที่กลับมาได้รับน้ำอีกครั้งและมีโปรตีนคาร์บอนิลในระดับต่ำ แตกต่างจากพันธุ์อื่นเช่นพันธุ์ KKU 60 ซึ่งการให้น้ำกลับทำให้ปริมาณ โปรตีน 16 kDa เพิ่มขึ้นแต่ปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลยังสูงด้วย (รูปที่ 1 จ)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ต้นถั่วลิสงต้องการน้ำมากเป็นพิเศษในช่วงกลางฤดูปลูก คือ ประมาณ 25-30 วันหลังปลูก ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่การทดลองกำหนดให้เกิดสภาวะกระทบแล้ง ที่ระยะนี้ต้นถั่วเริ่มออกดอกทยอยเกิดเข็ม (peg) แทงลงดินและเริ่มพัฒนาฝักภายใน 30-45 วัน ตามการรายงานของ Boote (1982)

จากการเปรียบเทียบปริมาณสารมาลอนไดอิลดีไฮด์ที่วัดได้บ่งชี้ได้ว่า ปริมาณสารมาลอนไดอิลดีไฮด์ที่สูงขึ้นเมื่อกระทบแล้ง และลดต่ำลงเมื่อได้รับน้ำกลับนั้น ขึ้นกับพันธุ์โดยไม่สัมพันธ์กับลักษณะการทนแล้ง และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลระหว่างพันธุ์ทนแล้งและพันธุ์ไม่ทนแล้ง แตกต่างกันไปในแต่ละพันธุ์ ตลอดจนไม่แปรผันตามปริมาณสารมาลอนไดอิลดีไฮด์ ผลการศึกษายังชี้ได้ว่า ถั่วลิสงพันธุ์ ICGV 98305 สามารถปรับตัวได้ดีที่สุดเมื่อกระทบแล้งและให้น้ำกลับ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Furlan et al. (2012) ในถั่วลิสงพันธุ์อื่น

ผลจากการศึกษาแบบแผนของโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE พบโปรตีนขนาด 16 kDa ที่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งปริมาณและสมบัติของหมู่โปรตีนคาร์บอนิล จากขนาดของโปรตีนและการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว เป็นไปได้ว่าโปรตีนนี้เป็นเลฮีโมโกลบิน (leghemoglobin) ซึ่งเป็นโปรตีนมีฮีม (heme) เป็นหมู่ที่ทำหน้าที่จับออกซิเจนและขนส่งไปให้ไรโซเบียมใช้ขนาดของเลฮีโมโกลบินประมาณ 14-16 kDa (Becana et al., 1995; Ott et al., 2005) แต่ Basak และ Bhattacharyya (2013) ได้



รูปที่ 1 แบบแผนของโปรตีน (รูป A) จากปมรากถั่วลิสง 5 พันธุ์คือ Tainan 9 (ก) KS 2 (ข) Tifton-8 (ค) ICGV 98305 (ง) และ KKU 60 (จ) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลด้วยเทคนิค Western blot (รูป B) และความเข้มของแถบโปรตีน 16 kDa ในโปรตีนจากรูป A และ B (รูป C) โดย M เป็นแถบโปรตีนมาตรฐาน C1 และ C2 หมายถึงกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ 60 และ 75 วันตามปกติ D เป็นกลุ่มกระทบแล้งและ R เป็นกลุ่มให้น้ำกลับ

รายงานที่สามารถแยกบริสุทธิ์เลกฮีโมโกลบินจากถั่วลิสงที่มีขนาด 14.5 kDa ก่อนหน้านี้ Furlan et al. (2012) พบว่า ผลกระทบแล้งทำให้ปริมาณเลกฮีโมโกลบินลดลง และการให้น้ำกลับจะทำให้ปริมาณเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ Naya et al. (2007) รายงานว่าการกระทบแล้งในพืชอัลฟาฟาไม่ยับยั้งยีนสังเคราะห์เลกฮีโมโกลบิน การลดลงของเลกฮีโมโกลบินจึงน่าจะเป็นผลจากการที่ถูกละลายเมื่อการกระทบจากสภาวะแล้งทำให้เกิดหมู่โปรตีนคาร์บอนิลมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยที่ว่าผลกระทบแล้งทำให้ปริมาณโปรตีน 16 kDa มีปริมาณลดลง

สภาวะแล้งทำให้โปรตีน 16 kDa ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนเลกฮีโมโกลบินสำคัญออกซิเจนนี้เกิดหมู่โปรตีนคาร์บอนิลเพิ่มขึ้น แต่ทำให้ปริมาณโปรตีน 16 kDa ลดลง ผลการทดลองที่พบในพันธุ์ Tifton-8 และ KKV 60 เท่านั้นที่สอดคล้องกับผลของ Furlan et al. (2012) ที่ว่าการให้น้ำหลังแล้งทำให้ปริมาณโปรตีน 16 kDa เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามพันธุ์ทนแล้ง Tifton-8 ได้เปรียบกว่า

จากการศึกษาในครั้งนี้ข้อสรุปว่า ปริมาณสารมาลอนไดอัลดีไฮด์และปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลในปมรากถั่วลิสงสามารถใช้เป็นข้อมูลบ่งชี้พันธุกรรมที่ได้เปรียบของพันธุ์ถั่วลิสงที่มีระดับการทนแล้งที่แตกต่างกันได้ โดยพันธุ์ที่มีลักษณะการปรับตัวที่ดี คือ ICGV 98305 ส่วนพันธุ์ Tifton-8 น่าจะมีลักษณะดีของกิจกรรมตรึงไนโตรเจนถ้าพิสูจน์ได้ต่อไปว่าโปรตีน 16 kDa นี้เป็นเลกฮีโมโกลบิน

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเงินทุนสนับสนุนจากโครงการวิจัย The Thailand Research Fund for providing financial support through the Senior Research Scholar Project of Prof. Dr. Sanun Jogloy (Project no. RTA 5880003)

เอกสารอ้างอิง

- Basak P, Bhattacharyya M. Intrinsic tryptophan fluorescence and related energy transfer in leghemoglobin isolated from *Arachis hypogaea*. Turkish Journal of Biochemistry 2013; 38:49–56.
- Becana M, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Gogorcena Y, Escuredo PR. Structure and function of leghemoglobins. Anales de la Estación Experimental de Aula Dei (Zaragoza) 1995; 21:203-208.
- Boote KJ. Growth stages of peanuts (*Arachis hypogaea* L.). Peanut Science 1982; 9: 34-40.
- Dinh HT, Kaewpradit W, Jogloy S, Vorasoot N, Patanothai A. Biological nitrogen fixation of peanut genotypes with different levels of drought tolerance under mid-season drought. SABRAO Journal of Breeding and Genetics 2013; 45: 491-503.
- Furlan A, Llanes A, Luna V, Castro S. Physiological and biochemical responses to drought stress and subsequent rehydration in the symbiotic association peanut-*Bradyrhizobium* sp. ISRN Agronomy 2012; 2012: 1-8.
- Gardner CD, Kraemer HC. Monounsaturated versus polyunsaturated dietary fat and serum lipids: A meta-analysis. Arterioscler Thrombosis and Vascular Biology 1995; 15: 1917-1927.
- Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives in Biochemistry and Biophysics 1986; 125: 189–198
- Juszczuk IM, Tybura A, Rychter AM. Protein oxidation in the leaves and roots of cucumber plants (*Cucumis satives* L.), mutant MSC16 and wild type. Journal of Plant Physiology 2008; 165: 355-365.

- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 1951; 193: 265-275.
- Naya L, Ladrera R, Ramos J, González EM, Arrese-Igor C, Minchin FR, Becana M. The response of carbon metabolism and antioxidant defenses of alfalfa nodules to drought stress and to subsequent recovery of plants. *Plant Physiology* 2007; 144: 1104-1114.
- Ott T, van Dongen JT, Günther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, et al., (2005). Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology* 2005; 15: 531-535.
- Pimratch S, Jogloy S, Vorasoot N, Toomsan B, Patanothai A, Holbrook CC. Relationship between biomass production and nitrogen fixation under drought-stress conditions in peanut genotypes with different levels of drought resistance. *Journal of Agronomy and Crop Science* 2008; 194: 15-25.
- Reddy TY, Reddy VR, Anbumozhi V. Physiological responses of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) to drought stress and its amelioration: a critical review. *Plant Growth Regulation* 2003; 41: 75-88.
- Sattayasai N, Sattayasai J, Daduang S, Chahomchuen T, Ketkaew S, Puchongkavarin H. A non-mitochondrial carboxylase, related to glutamate action is synthesized in the retina of the chick embryo. *Journal of Neuroimmunology* 2003; 141: 104-111.
- Sebei K, Gnonma A, Herchi W, Sakouhi F, Boukhchina S. Lipids, proteins, phenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of seeds of peanuts (*Arachis hypogaea* L.) cultivated in Tunisia. *Biological Research* 2013; 46: 257-263.
- Shacter, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews* 2000; 32: 307-326.
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012; 2012: 1-26.
- Sheokand S, Bhankar V, Sawhney V. Ameliorative effect of exogenous nitric oxide on oxidative metabolism in NaCl treated chickpea plants. *Brazilian Society of Plant Physiology* 2010; 22: 81-90.
- Taulavuori E, Hellstrom EK, Taulavuori K, Laine K. Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. *Journal of Experimental Botany* 2001; 52: 2375-2380.
- Towbin H, Stachelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 1979; 76: 4350-4354.
- You J, Chan Z. ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Frontiers in Plant Science* 2015; 6: 1092. doi: 10.3389/fpls.2015.01092, 15 pages.