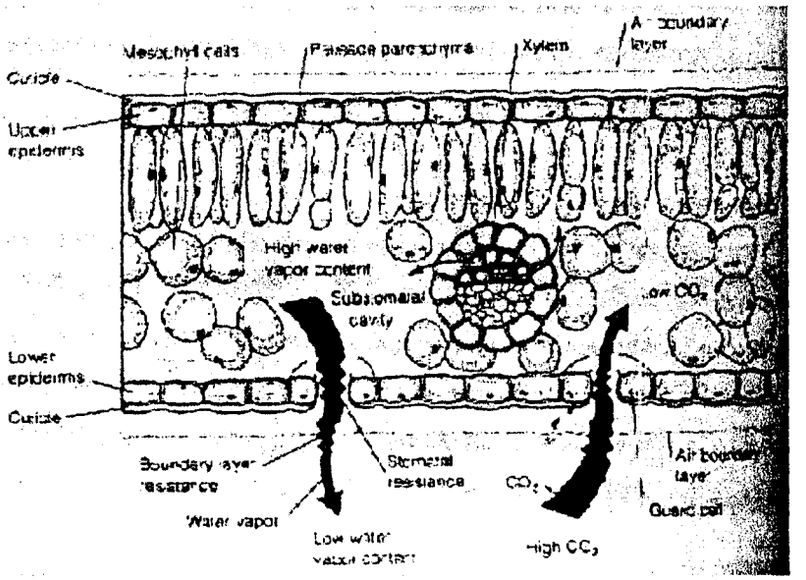
บทปฏิบัติการที่4

STUDY ON NUMBER OF STOMATA CHANGES AND MOPHOLOGICAL CHANGES OF STOMATA OF CROP UNDER STRESS

คำนำ

โครงสร้างของปากใบ

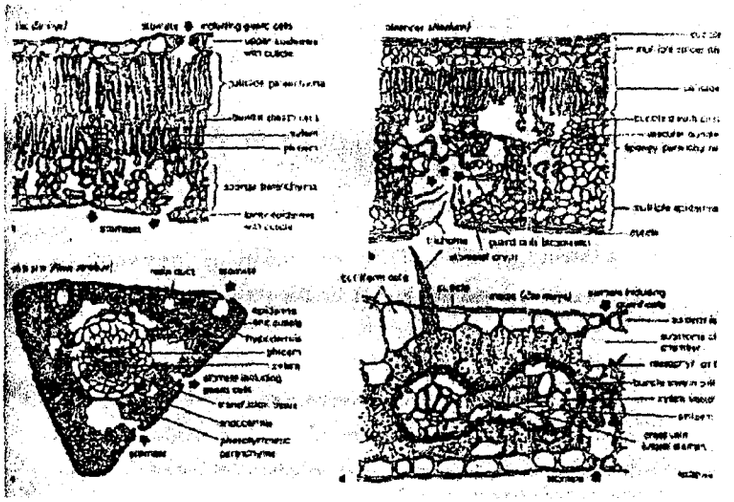
น้ำที่พืชคายออกทางปากใบนั้นถูกลำเลียงขึ้นมาตามลำดับจากท่อไซเลมของราก ลำต้น ก้านใบ เส้นกลางใบ จนกระทั่งถึงเส้นใบย่อยที่สุดซึ่งแตกแขนงครอบคลุมพื้นที่แทบทุกตารางมิลลิเมตรของใบ ดังนั้นเซลมีโซฟิลล์ทุก ๆ เซลล์จะอยู่ห่างจากเส้นใบย่อยที่สุดเป็นระยะทางไม่เกิน 0.5 มิลลิเมตร น้ำที่ออกจากไซเลมของเส้นใบย่อยจะเคลื่อนที่เข้าสู่ผนังเซลล์ของเซลล์มีโซฟิลล์ น้ำส่วนน้อยจะเคลื่อนที่เข้าสู่ไซโทพลาซึมของเซลล์มีโซฟิลล์ เพื่อให้เซลล์นำไปใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ และรักษาความเต่งของเซลล์ น้ำส่วนใหญ่ในผนังเซลล์ของเซลล์มีโซฟิลล์จะระเหยออกสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์ภายในใบและเคลื่อนที่ออกจากใบผ่านรูปากใบ (stomatal pore) ซึ่งล้อมรอบด้วยเซลล์เอพิเดอร์มิสที่เปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่ควบคุมการปิดเปิดของรูปากใบเรียกว่า เซลล์คุม (guard cell) ซึ่งอยู่เป็นคู่กัน (รูปที่ 1.1) จากรูปที่ 1.1 จะเห็นว่าพื้นผิวทั้งด้านบนและด้านล่างของใบพืชนั้นจะมีคิวทิเดิลปกคลุมไว้ทั้งหมดเพื่อป้องกันการเสียน้ำ ใบพืชสามารถรับ CO_2 เพื่อนำไปใช้สร้างอาหารได้เมื่อรูปากใบเปิดเท่านั้น การควบคุมการเปิดปิดของปากใบจึงเป็นกลไกที่สำคัญมากที่จะควบคุมให้พืชได้รับ CO_2 อย่างเพียงพอในขณะเดียวกับที่ไม่สูญเสียน้ำมากเกินไปจนเกิดการขาดน้ำ



รูปที่ 1.1 เส้นทางลำเลียงน้ำจากไซเลมของเส้นใบย่อยผ่านรูปากใบออกสู่บรรยากาศ

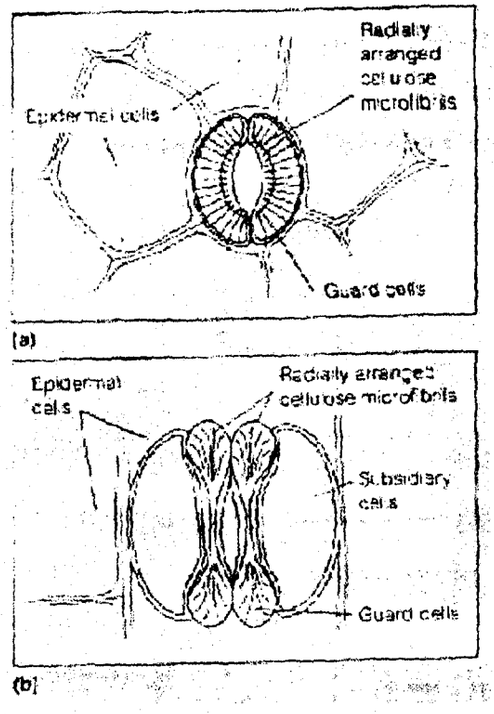
(Taiz and Zeiger, 1991)

บริเวณปากใบของพืชบางชนิดจะประกอบด้วยเซลล์คุมเพียงสองเซลล์เท่านั้น ล้อมรอบเซลล์คุมจะมีเซลล์เอพิเดอร์มิส แต่ปากใบของพืชบางชนิดนอกจากจะประกอบด้วยเซลล์คุมแล้วยังมีเซลล์ซับซิเครี (subsidiary cell) อยู่ล้อมรอบเซลล์คุมอีกชั้นหนึ่ง เซลล์ซับซิเครีเป็นเซลล์เอพิเดอร์มิสที่เปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่ร่วมกับเซลล์คุม พืชส่วนใหญ่มักจะมีปากใบอยู่บนผิวใบทั้งสองด้าน ซึ่งมักจะมีอยู่ทางผิวด้านล่าง (lower surface) มากกว่าผิวด้านบน (upper surface) แต่พืชบางชนิดอาจมีปากใบอยู่เฉพาะด้านล่างของใบเท่านั้น พืชที่มีใบปริ่มน้ำ เช่น ใบบัว จะมีปากใบอยู่เฉพาะผิวด้านบนของใบ ส่วนพืชที่จมน้ำ (submerged plants) จะไม่มีปากใบเลย พืชพวกหญ้ามักจะมีปากใบหนาแน่นพอ ๆ กันบนผิวใบทั้งสองด้าน พืชบางชนิดมีปากใบที่จมเว้าลงไปต่ำกว่าผิวใบส่วนอื่น ๆ (sunken stomata) เช่น ใบขี้โถ (oleander) ใบสน (*Pinus* spp.) ดังแสดงในรูปที่ 1.2 ซึ่งเป็นการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้ง



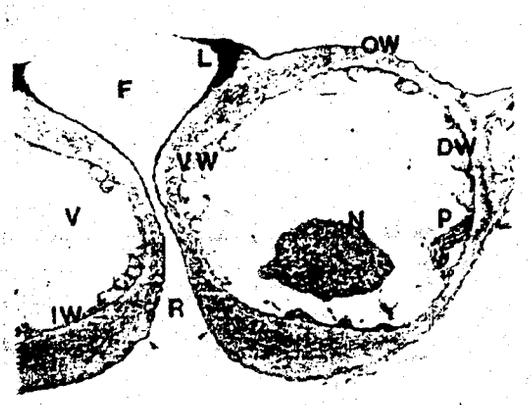
รูปที่ 1.2 ภาคตัดขวางแสดงโครงสร้างภายในของใบพืช 4 ชนิด (a) ใบ lilac แสดงปากใบที่อยู่ในระดับเสมอกับพื้นผิวใบ (b) ใบขี่โถซึ่งมีปากใบอยู่ในระดับต่ำกว่าผิวใบมาก (c) ใบสนมีปากใบอยู่ต่ำกว่าผิวใบเล็กน้อย (d) ใบข้าวโพดมีการกระจายของปากใบเท่า ๆ กัน บนผิวด้านหลังใบและท้องใบ (Salisbury and Ross, 1992)

เซลล์คุมในพืชชั้นสูงอาจแบ่งได้เป็น 2 ประเภท (รูปที่ 1.3) คือ เซลล์คุมที่มีรูปร่างคล้ายไตหรือเมล็ดถั่วแดง พบในพืชใบเลี้ยงคู่โดยทั่ว ๆ ไป รวมทั้งพืชชั้นต่ำ เช่น มอส เฟิร์น และจิมโนสเปิร์ม อีกประเภทหนึ่งคือ เซลล์คุมที่มีรูปร่างคล้ายดัมเบลล์ซึ่งพบในพืชจำพวกหญ้าและพืชใบเลี้ยงเดี่ยวบางชนิด เซลล์คุมพวกนี้มักจะมีเซลล์ซับซิเครีขนาบอยู่ข้างละ 1 เซลล์ ส่วนเซลล์คุมที่มีรูปร่างคล้ายไตอาจจะมีเซลล์ซับซิเครีหรือไม่มีก็ได้



รูปที่ 1.3 การเรียงตัวของเซลลูโลสไมโครไฟบริลในผนังเซลล์ของเซลล์คุม (a) เซลล์คุมที่มีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่ว (b) เซลล์คุมที่มีรูปร่างคล้ายดัมเบลล์ (Taiz and Zeiger, 1991)

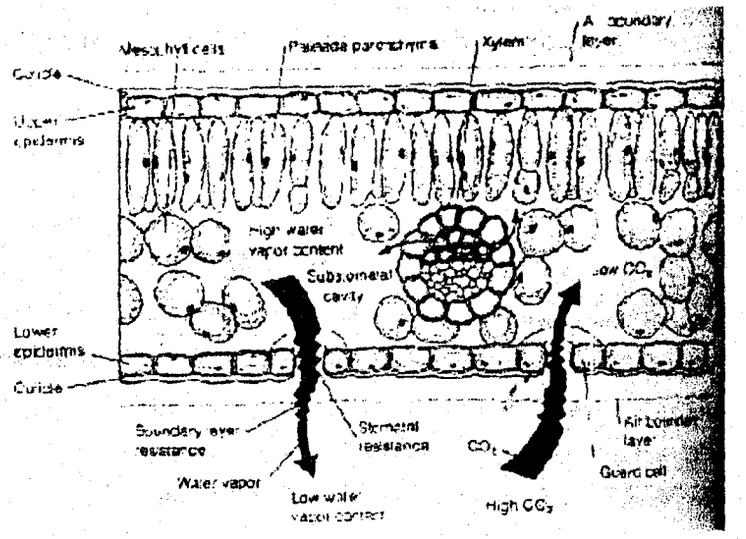
ลักษณะพิเศษของเซลล์คุมคือจะมีผนังเซลล์หนาเป็นบางช่วง ซึ่งอาจจะมีความหนาถึงไมโครเมตร (เซลล์เอพิเดอร์มิสปกติมีผนังเซลล์หนาประมาณ 1 ไมโครเมตร) เซลล์คุมที่มีรูปร่างคล้ายไตจะมีผนังด้านที่สัมผัสกับอากาศภายนอก (outer wall) ผนังด้านสัมผัสกับช่องว่างภายในใบ (linner wall) และผนังด้านข้างที่สัมผัสกับปากใบ (ventral wall) หนามากกว่าผนังด้านตรงข้ามรูปากใบที่สัมผัสกับเซลล์เอพิเดอร์มิสหรือเซลล์ซับซิเดรี (รูปที่ 1.4) การที่ผนังเซลล์ที่ล้อมรอบรูปากใบมีความหนามากดังกล่าวทำให้ยืดตัวได้น้อยกว่าผนังด้านตรงข้าม ซึ่งเป็นคุณสมบัติข้อหนึ่งที่ทำให้เซลล์คุมสามารถทำให้เกิดรูปากใบได้ นอกจากนี้การศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคอรแบบส่องกราดทำให้พบว่าการจัดเรียงตัวของเส้นใยเซลลูโลสไมโครไฟบริล บนผนังเซลล์ของเซลล์คุมนั้นแตกต่างไปจากเซลล์ธรรมดา โดยในเซลล์คุมนั้นเส้นใยเซลลูโลสไมโครไฟบริลจะเรียงตัวเป็นวงในแนวรัศมีพุ่งออกจากผนังด้านที่สัมผัสกับรูปากใบพาดไปโดยรอบเซลล์ (รูปที่ 1.3) เมื่อเซลล์คุมดูดน้ำผนังด้านตรงข้ามรูปากใบจะยืดตัวได้มากกว่าทำให้เส้นใยเซลลูโลสไมโครไฟบริลด้านนั้นแยกตัวห่างออกจากกัน ในขณะเดียวกับที่เส้นใยเซลลูโลสไมโครไฟบริลบนผนังด้านที่ใกล้รูปากใบบีบเข้าหากัน ทำให้เซลล์คุมขยายตัว และโค้งออกเกิดเป็นช่องระหว่างเซลล์คุมทั้งสองที่เรียกว่า รูปากใบ (stomatal pore)



รูปที่ 1.4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเซลล์คุมคู่หนึ่งของใบยาสูบซึ่งตัดตามขวาง แสดงผนังเซลล์ของเซลล์คุมซึ่งมีความหนาไม่เท่ากันในแต่ละด้าน (Taiz and Zeiger, 1991)

2 ผลของสิ่งแวดล้อมต่อการเปิดปิดปากใบ

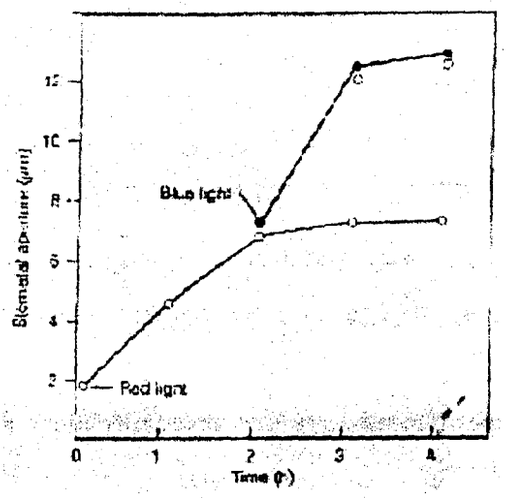
การเปิดปิดปากใบเป็นกระบวนการที่ถูกควบคุมโดยปัจจัยสิ่งแวดล้อมหลายอย่างร่วมกัน พืชโดยทั่ว ๆ ไปจะเริ่มเปิดปากใบในเวลาเช้าเมื่อดวงอาทิตย์ขึ้นและจะเปิดกว้างมากที่สุดในช่วงประมาณ 10.00 ถึง 11.00 น. จากนั้นความกว้างของรูปากใบจะค่อย ๆ ลดลงในช่วงบ่ายและจะปิดเมื่อดวงอาทิตย์ตก (รูปที่ 1.5) พืชบางชนิดรูปากใบจะแคบลงในช่วงเที่ยงวัน (midday closure) และเปิดกว้างอีกครั้งในช่วงบ่าย ในวันที่มืดครึ้มเนื่องจากมีเมฆมากปากใบจะเปิดน้อยกว่าวันที่มีแสงแดดจัด นอกจากแสงแล้วยังมีปัจจัยอื่น ๆ อีก คือ ปริมาณ CO_2 ภายในใบถ้ามีปริมาณสูงปากใบจะปิดถ้ามีปริมาณต่ำปากใบจะเปิด ภาวะกดดันที่ทำให้ปากใบปิดที่สำคัญคือการขาดน้ำ อุณหภูมิสูงและลมแรงจัด สำหรับพืชส่วนใหญ่ความเข้มข้นของ CO_2 ภายในใบเป็นปัจจัยสำคัญมากที่ทำให้ปากใบปิดหรือเปิด จากการทดลองผ่านอากาศที่ปราศจาก CO_2 ให้แก่ใบที่อยู่ในที่มืดพบว่าสามารถชักนำให้ปากใบเปิดกว้างได้ และในทางตรงกันข้ามปริมาณ CO_2 สูงภายในใบสามารถชักนำให้ปากใบปิดได้ ถึงแม้ว่าจะได้รับแสงเต็มที่ พืชอวบน้ำที่มีกลไกการตรึง CO_2 แบบ CAM จะมีแบบแผนของการเปิดปิดปากใบตรงกันข้ามกับพืชทั่วไปคือจะเปิดปากใบในเวลากลางคืนและปิดในเวลากลางวัน



รูปที่ 1.5 แบบแผนการเปิด-ปิดปากใบในสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ (Salisbury an:l Ross, 1992)

กลไกที่แสงควบคุมการเปิดปิดของปากใบนั้นยังเป็นเรื่องที่ถกเถียงกันอยู่ตลอดมาว่าการที่แสงทำให้ปากใบเปิดนั้นเป็นผลโดยตรงของแสงหรือเป็นผลทางอ้อมโดยที่แสงทำให้เกิดการสังเคราะห์ด้วยแสงทำให้ปริมาณ CO_2 ภายในใบต่ำปากใบจึงเปิด ในอดีตนักวิทยาศาสตร์จะเชื่อคำอธิบายในกรณีหลังกันมาก แต่ในระยะสิบกว่าปีที่ผ่านมาเริ่มมีผลการทดลองที่สนับสนุนว่าแสงมีผลโดยตรงต่อการเปิดปิดปากใบมากกว่าจะเป็นผลทางอ้อม เช่น การทดลองของ Sharkey และ Rascher (1981) ซึ่งศึกษาผลของแสงต่อการเปิดปิดปากใบในสภาพที่ควบคุมปริมาณ CO_2 ภายในใบให้คงที่ พบว่าความกว้างของปากใบแปรผันตามความเข้มของแสง และถ้าให้สารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง ปากใบยังคงตอบสนองต่อความเข้มแสงตามปกติ นอกจากนี้ยังมีการทดลองวัดความกว้างของรูปากใบโดยใช้ผิวใบ (epidermal peel) ที่ลอกออกมาจากใบของถั่วปากอ้า พบว่าเซลล์คุมในผิวใบที่ลอกออกมาสามารถตอบสนองต่อแสงโดยควบคุมความกว้างของรูปากใบได้โดยไม่ต้องอาศัยเซลล์มีโซฟิลล์ แสงที่มีผลต่อการเปิดปากใบมากที่สุดคือ แสงสีน้ำเงินความยาวคลื่นระหว่าง 430-460 นาโนเมตร และแสงสีแดงความยาวคลื่นระหว่าง 630-680 นาโนเมตร จากการศึกษา Schwartz and Zeiger (1984) ซึ่งวัดความกว้างของรูปากใบในพิเดอร์มิสที่ลอกมาจากใบ *Commelina communis* (รูปที่ 1.6) พบว่าเมื่อให้แสงสีแดง ความกว้างของรูปากใบจะเพิ่มมากขึ้นจากประมาณ 2 ไมโครเมตรไปเป็นประมาณ 7 ไมโครเมตร ภายในเวลา 2 ชั่วโมงและจะคงที่อยู่ที่ 7 ไมโครเมตรต่อไปอีก 2 ชั่วโมง ในอีกการทดลองหนึ่งซึ่งให้แสงสีแดงเป็นเวลา 2 ชั่วโมงจนกระทั่งรูปากใบเปิดกว้างเต็มที่แล้วจากนั้นจึงให้แสงสีน้ำเงิน ปรากฏว่ารูปากใบสามารถเปิดกว้างออกไปได้อีกจากประมาณ 7 ไมโครเมตรเป็น 12 ไมโครเมตร ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นชัดเจนว่า ในเซลล์คุมมีระบบปรับแสง 2 ระบบที่นำไปสู่การควบคุมการเปิดปากใบ ระบบหนึ่งดูดและตอบสนองต่อแสงสีแดง อีกระบบหนึ่งดูดและตอบสนองต่อแสงสีน้ำเงิน และนักวิทยาศาสตร์ค่อน

ข้างเชื่อว่ากลไกการรับและตอบสนองต่อแสงสีน้ำเงินในเซลล์คุมน่าจะเป็นกลไกที่คล้ายคลึงกับการตอบสนองต่อแสงสีน้ำเงินที่นำไปสู่กระบวนการทางสรีรวิทยาอื่น ๆ เช่น การโค้งเข้าหาแสง การหันก้านใบตามดวงอาทิตย์ และการเคลื่อนที่ของคลอโรพลาสต์ เป็นต้น ส่วนกลไกการรับสัญญาณแสงสีแดงนั้นน่าจะอยู่ในคลอโรพลาสต์และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ด้วยแสง



รูปที่ 1.6 ความกว้างของรูปากใบในเอพิเดอร์มิสของ *Commelina communis* เมื่อได้รับแสงสีแดงต่อเนื่องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (กราฟล่าง) และเมื่อได้รับแสงสีแดงเป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วเสริมด้วยแสงสีน้ำเงินอีก 2 ชั่วโมง (Schwartz and Zeiger, 1984 อ้างโดย Taiz and Zeiger, 1991)

ผลของความชื้นในอากาศต่อการเปิดปิดปากใบนั้นส่วนใหญ่พบว่าเป็นผลร่วมกันระหว่างความชื้น แสง อุณหภูมิ ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Tibbitts (1979) พบว่าในขณะที่มีแสงแดดจัดถ้าย้ายใบพืชไปไว้ในบรรยากาศที่มีความชื้นต่ำปากใบจะปิด แต่เมื่อทิ้งระยะเวลาห่างออกไปอีกเล็กน้อยปรากฏว่าปากใบจะเปิดใหม่อีกชั่วระยะเวลาหนึ่งแล้วจะปิดอีกเป็นวัฏจักรซึ่งแต่ละรอบใช้เวลาประมาณ 30 นาที ซึ่งเขาอธิบายว่าเมื่อย้ายใบจากบรรยากาศที่มีความชื้นปกติ ไปยังบรรยากาศที่มีความชื้นต่ำกว่าความชื้นภายในใบมากปากใบจะปิดทันทีเพื่อป้องกันอันตรายจากการเสียน้ำ แต่เมื่อทอดระยะเวลาออกไปใบจะทำการสังเคราะห์ด้วยแสง ทำให้ปริมาณ CO_2 ในใบลดต่ำลงทำให้ปากใบเปิดเพื่อดูด CO_2 เข้ามาใหม่ หลังจากเปิดไปชั่วระยะเวลาหนึ่งปากใบก็จะปิดอีกเพื่อหลีกเลี่ยงอันตรายจากการเสียน้ำ นอกจากความชื้นของอากาศภายนอกความชื้นของอากาศภายในใบหรือปริมาณน้ำภายในใบก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ ถ้าเกิดภาวะขาดน้ำทำให้ค่าวอเตอร์โพเทนเชียลของใบลดต่ำลงมากปากใบจะปิด เช่นที่พบในพืชบางชนิดที่มีการปิดปากใบชั่วคราวในเวลาเที่ยงวัน ปัจจัยสำคัญอีกอย่างหนึ่งคืออุณหภูมิ อุณหภูมิสูง (30-35 องศาเซลเซียส) มักจะทำให้ปากใบปิดซึ่งอาจจะเป็นผลทางอ้อมจากการที่อุณหภูมิสูง เร่งให้เกิดภาวะเครียดเนื่องจากการขาดน้ำหรืออุณหภูมิ

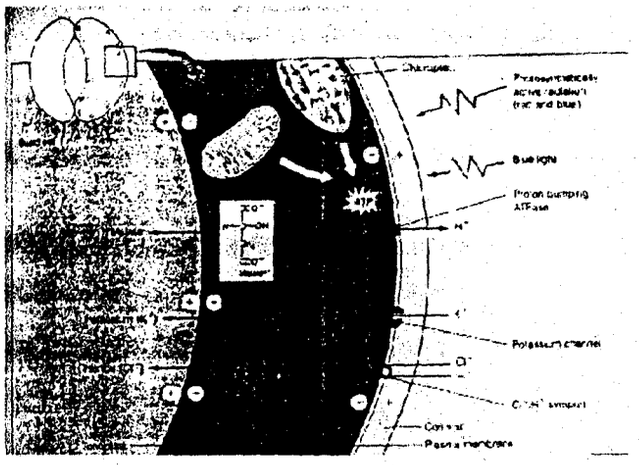
สูงเร่งอัตราการหายใจทำให้มีปริมาณ CO_2 สูงภายในใบ แต่สำหรับพืชบางชนิดอุณหภูมิสูงกลับทำให้ปากใบเปิดทำให้ใบคายน้ำมากขึ้นและช่วยลดความร้อนให้แก่ใบ

3 กลไกการเปิดปิดของปากใบ

เป็นที่ทราบมานานแล้วว่าปากใบเปิดเพราะเซลล์คุมเต่งเนื่องจากดูดน้ำจากเซลล์ข้างเคียง แต่สาเหตุหรือกลไกที่ทำให้เซลล์คุมดูดน้ำนั้นยังมีการถกเถียงกันอยู่มาก ทฤษฎีดั้งเดิมหนึ่งที่เคยได้รับการยอมรับในอดีตคือทฤษฎีการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลซึ่งอธิบายโดย F.E. Lloyd ตั้งแต่ ค.ศ. 1908 ซึ่งกล่าวว่า เมื่อแป้งในคลอโรพลาสต์ของเซลล์คุมเกิดไฮโดรลิซิสกลายเป็นน้ำตาลจะทำให้เซลล์คุมมีค่าวอเตอร์โพเทนเชียลต่ำลง น้ำจึงเคลื่อนที่จากเซลล์เอพิเดอร์มิสหรือเซลล์ซับซิเดรีซึ่งมีค่าชลศักย์สูงกว่าเข้ามาในเซลล์คุมทำให้เซลล์คุมเต่งปากใบจึงเปิดและเมื่อน้ำตาลเปลี่ยนกลับเป็นแป้งก็จะเกิดกระบวนการย้อนกลับทำให้เซลล์คุมสูญเสียความเต่งจากใบจึงปิด ทฤษฎีนี้เคยได้รับการยอมรับอยู่หลายปี จนกระทั่งในช่วงปี ค.ศ. 1960 เป็นต้นมาได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่มพบความสัมพันธ์ระหว่างการสะสมอิออนโดยเฉพาะ K^+ ในเซลล์คุมกับการเปิดของปากใบโดยพบว่าขณะที่ปากใบเปิดความเข้มข้นของ K^+ ในเซลล์คุมมีค่าเพิ่มขึ้นจากเดิมในขณะที่ปากใบปิดคือประมาณ 100 mM เป็นประมาณ 400-800 mM นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณ Cl^- ก็เพิ่มขึ้นด้วย และยังพบว่ามีการสลายแป้งเพื่อนำไปสังเคราะห์มาเลท (malate) การสะสม K^+ Cl^- และอิออนของมาเลทเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เซลล์คุมมีค่าชลศักย์ลดต่ำลงทำให้น้ำเคลื่อนที่จากเซลล์ข้างเคียงเข้าสู่เซลล์คุมในทางตรงกันข้ามพบว่าขณะที่ปากใบปิดจะมีการขนส่ง K^+ ออกจากเซลล์คุมและปริมาณมาเลทในเซลล์คุมก็ลดลง โดยเชื่อว่ามาเลทอาจจะเปลี่ยนกลับเป็นแป้ง หรือถูกนำไปใช้ในกระบวนการหายใจในไมโทคอนเดรียปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางว่า K^+ และมาเลท (ไม่ใช่น้ำตาล) เป็นตัวถูกทำละลายหลักที่ทำให้เซลล์คุมมีค่าชลศักย์ต่ำและนำไปสู่การเปิดปากใบ

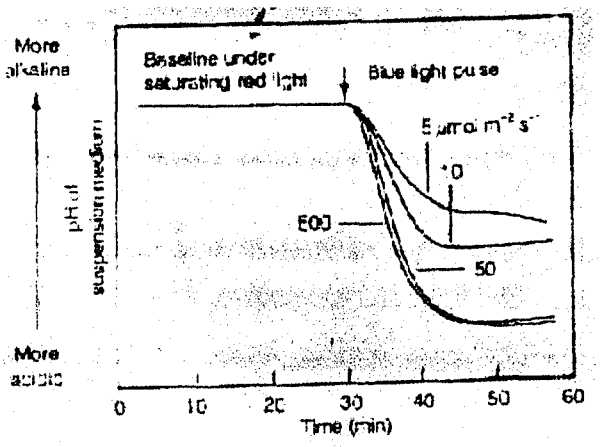
สำหรับกลไกการขนส่งและสะสม K^+ นั้นเชื่อว่าเกิดขึ้นโดยกลไกของแอกทีฟทรานสปอร์ตในพลาสมาเมมเบรนของเซลล์คุม โดย Zeiger (1983) พบว่าเซลล์คุมมีการขับ H^+ ออกจากเซลล์ในขณะที่ปากใบเปิด ทำให้เกิดแรงขับเคลื่อนโปรตอนซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่ใช้ผลักดันการดูดอิออนเข้าสู่เซลล์ นับจากนั้นได้มีการศึกษาอีกมากมายที่สนับสนุนว่ามีกลไกของโปรตอนพั้มพ์ (proton pump) ในพลาสมาเมมเบรนของเซลล์คุมซึ่งทำงานโดยใช้พลังงาน ATP จากคลอโรพลาสต์หรือไมโทคอนเดรีย

ในการขับ H^+ จากไซโทพลาซึมออกสู่ผนังเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์ (อะโพพลาสต์) การสะสม H^+ ในอะโพพลาสต์ก่อให้เกิด electrochemical proton gradient ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่ผลักดันให้เกิดการขนส่ง K^+ ผ่านช่องนำอิออน (ion chamnel) ซึ่งจำเพาะเจาะจงต่อ K^+ (รูปที่ 1.7) นอกจากนี้พลังงานส่วนหนึ่งยังนำไปใช้ในการขนส่ง Cl^- โดยใช้โปรตีนขนส่งควบคู่ระหว่าง Cl^- กับ H^+ (Cl^-/K^+ symporter)



รูปที่ 1.7 กลไกการขนส่ง K^+ เข้าสู่เซลล์คุมโดยการทำงานของ ATPase proton pump ในพลาสมา-เมมเบรนของเซลล์คุมซึ่งถูกกระตุ้นให้ทำงานโดยแสง (Taiz and Zeiger, 1991)

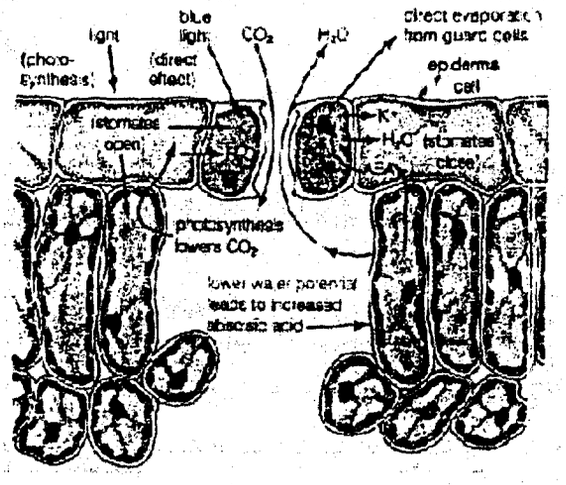
การศึกษาตั้งแต่ช่วงปี ค.ศ. 1986 เป็นต้นมาทำให้สามารถเริ่มเชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยภายนอกคือแสงกับการทำงานของโปรตอนพั้มพ์ เช่น การทดลองของ Shimazaki et al. (1986) ซึ่งทดลองโดยใช้โปรโตพลาสต์ของเซลล์คุมซึ่งเตรียมได้จากการลอกเยื่อผิวใบ (epidermal peel) ของถั่วปากอ้านำมาย่อยด้วยเอนไซม์ที่ย่อยมิดเดิลลาเมลทำให้เซลเอพิเดอร์มิสและเซลล์คุมแยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ แล้วทำการแยกเซลล์สองพวกนั้นออกจากกัน จากนั้นใช้เอนไซม์เซลลูเลสย่อยผนังเซลล์ของเซลล์คุมก็จะได้โปรโตพลาสต์ของเซลล์คุมจำนวนมากมาย เมื่อให้แสงสีน้ำเงินแก่โปรโตพลาสต์พบว่า pH ของสารละลายที่โปรโตพลาสต์แขวนลอยอยู่มีค่าต่ำลง แสดงว่ามีการขับ H^+ ออกจากโปรโตพลาสต์ และอัตการขับ H^+ ยังขึ้นอยู่กับการเข้มข้นของแสงสีน้ำเงินที่ให้ด้วย (รูปที่ 1.8) นอกจากนี้ยังมีการทดลองของ Assmann et al. (1985) ที่แสดงว่าแสงสีน้ำเงินกระตุ้นให้เกิดการขนส่งอิออนแบบกัมมันต์ โดยสามารถวัดการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าบนพลาสมาเมมเบรนของโปรโตพลาสต์ของเซลล์คุม ต่อมา Serrano et al (1988) พบว่าแสงสีแดงก็สามารถชักนำให้เกิดการทำงานของโปรตอนพั้มพ์เช่นเดียวกัน และการชักนำของแสงสีแดงนี้จะถูกยับยั้งโดยสารยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง แสดงว่ากลไกการรับสัญญาณแสงสีแดง ซึ่งนำไปสู่การขับโปรตอนนั้นน่าจะอยู่ภายในคลอโรพลาสต์ หลักฐานจนถึงปัจจุบันอาจพอสรุปได้ว่า มีกลไกการรับแสงอยู่ 2 ระบบ ระบบหนึ่งรับแสงสีแดง อีกระบบหนึ่ง รับแสงสีน้ำเงินซึ่งเมื่อรับแสงแล้วจะเกิดกลไกการนำสัญญาณ (signal transduction pathway) นำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ATPase ที่เชื่อมโยงกับการขับโปรตอน



รูปที่ 1.8 การทดลองแสดงการขับโปรตอนโดยโปรโตพลาสต์ของเซลล์คุม เมื่อได้รับแสงสีน้ำเงิน (Shimazaki et al. 1986 อ้างตาม Taiz and Zeiger, 1991)

ในช่วงปี ค.ศ. 1970 ได้มีการค้นพบที่สำคัญอีกชิ้นหนึ่งเกี่ยวกับการควบคุมการเปิดปิดปาก ใบนั่นคือการค้นพบว่าถ้าให้กรดแอบซิสิก (abscisic acid, ABA) แก่ใบในปริมาณต่ำจะชักนำให้ปากใบปิด และพบว่าใบที่อยู่ในสภาวะเครียดเนื่องจากขาดน้ำจะมีการสะสมกรดแอบซิสิกในเนื้อเยื่อมากและในสภาพที่ใบค่อย ๆ แห้งลงเพราะเสียน้ำอย่างช้า ๆ นั้น จะมีปริมาณกรดแอบซิสิกเพิ่มขึ้น และพบว่าปากใบจะปิดในเวลาต่อมา หลักฐานต่าง ๆ แสดงให้เห็นอย่างค่อนข้างชัดเจนว่าการปิดปากใบอันเนื่องมาจากการขาดน้ำนั้นเกี่ยวข้องกับการทำงานของกรดแอบซิสิกซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชชนิดหนึ่ง Jensen และ Salisbury (1984) (อ้างโดย Salisbury and Ross, 1992) ได้รวบรวมหลักฐานทั้งหมดเกี่ยวกับผลของปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ แสง CO_2 การขาดน้ำ ความชื้นในอากาศ และกรดแอบซิสิกต่อการเปิดปิดปากใบ และเสนอแบบจำลองที่ใช้อธิบายผลของปัจจัยหลายอย่างร่วมกันดังแสดงในรูปที่ 1.9 ทางด้านซ้ายของไดอะแกรมแสดงผลทางตรงและทางอ้อมของแสง กล่าวคือ ผลทางอ้อมเกิดจากแสง ทำให้ใบสังเคราะห์ด้วยแสงทำให้ปริมาณ CO_2 ภายในใบต่ำซึ่งชักนำให้ปากใบเปิด ผลทางตรงคือแสงโดยเฉพาะอย่างยิ่งแสงสีน้ำเงินกระตุ้นให้เกิดการขนส่ง K^+ แบบแอกทีฟเข้าสู่เซลล์คุมทำให้ปากใบเปิด ด้านขวาของไดอะแกรมแสดงผลของการขาดน้ำ เมื่อปากใบเปิดใบคายน้ำออกไปในอัตราที่สูงเกินกว่าอัตราการขนส่งน้ำจากรากเข้ามาชดเชย ทำให้ค่าวอเตอร์โพเทนเชียลของเซลล์มีโซฟิลล์ลดต่ำลงจะทำให้มีกรดแอบซิสิกเพิ่มขึ้นโดยเกิดสังเคราะห์กรดแอบซิสิกภายในเซลล์มีโซฟิลล์หรือเกิดการปลดปล่อยกรดแอบซิสิกที่สะสมไว้ในคลอโรพลาสต์หรือเกิดการขนส่ง กรดแอบซิสิกจากรากเข้าสู่ใบ กรดแอบซิสิกจะเคลื่อนที่จากเซลล์มีโซฟิลล์เข้าสู่เซลล์คุม ซึ่งจะชักนำให้เกิดการขนส่ง K^+ ออกจากเซลล์คุมส่งผลให้ค่าชลศักย์ของเซลล์คุมเพิ่มขึ้นน้ำจึงเคลื่อนที่ออกจากเซลล์คุม ปากใบจึงปิด ถ้าการขาดน้ำเกิดอย่างรวดเร็ว เช่น ใบได้รับอากาศแห้งอย่างกระทันหัน ปากใบอาจปิดโดยเกิดการระเหยของน้ำจากเซลล์คุมออกสู่อากาศโดยตรงไม่

ผ่านกลไกการควบคุมของกรดแอบซิสิก ดังนั้นจะเห็นว่าพืชมีกลไกอันละเอียดอ่อนและซับซ้อนแต่มีประสิทธิภาพสูง ในการควบคุมให้ปากใบเปิดเพื่อรับ CO_2 มาใช้สร้างอาหารและควบคุมให้ปากใบปิดก่อนที่พืชจะขาดน้ำจนเป็นอันตราย



รูปที่ 1.9 ผลของปัจจัยต่าง ๆ คือ แสง CO_2 การขาดน้ำ และกรดแอบซิสิก ต่อการเปิดปิดปากใบ (Salisbury and Ross, 1992)

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาลักษณะของ Stomata จากใบพืชที่ปลูกในสภาพปกติ และสภาพ ที่เกิดความเครียดเนื่องจากการขาดน้ำ (Water stress) และหาค่า Stomata index

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ใบ ว่านกาบหอย *Tradescantia spathacea* Swartz, COMMELINACEAE ที่ปลูกในสภาพปกติ และสภาพที่เกิดความเครียดเนื่องจากการขาดน้ำ Stress
2. กล้องจุลทรรศน์แบ stereo microscope(กำลังขยาย 10X)
3. สารซาฟารินเพื่อย้อมสี
4. แผ่น slide และ cover glass

นำใบว่านกาบหอยมาตัดให้ได้ขนาด 1x1 ตารางมิลลิเมตร แล้วย้อมด้วยสาร ซาฟาริน นำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวน Stomata และจำนวน epidermal เพื่อหา Stomatal index โดยใช้สูตรคำนวณ

$$Stomata\ index = \frac{stomatal\ \ frequency\ x\ 100}{stomata\ frequency + frequency\ of\ \ subsidiary\ and\ epidermal\ cells}$$

(Saliibury,1928) อ้างโดย (Weyers and Meidner,1990)

การรวบรวมข้อมูล

นับจำนวน stomata และจำนวน epidermal เพื่อหา Stomatal index โดยใช้สูตรคำนวณ

$$\text{Stomatal index} = \frac{\text{Stomatal frequency} \times 100}{\text{Stomatal frequency+ frequency of subsidiary and epidermal cellls}}$$

จากนั้นคำนวณและเปรียบเทียบค่า Stomata index ระหว่างด้านบนใบกับด้านใต้ใบ และระหว่างพืชปกติและพืช stress โดยกำหนดทั้งหมด 10 ตัวอย่าง แล้วหาค่าเฉลี่ย

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS v.13 for window และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการวัดค่า Stomata index ระหว่างพื้นที่บนใบกับพื้นที่ใต้ใบของใบชะบาที่อยู่ภายใต้สภาพปกติและสภาพ stress

เอกสารอ้างอิง

Slisbury, F.B. and Ross, C.W. 1992. Plant physiology. Belmont, Calif: Wadsworth Pub. USA.

Taiz, L. and Zeiger, E. 1991. Plant physiology. Benjamin/ Cummings Pub. Califonia. USA.