



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์)

ปริญญา

พฤกษศาสตร์

พฤกษศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ความสัมพันธ์ของการทนแล้งกับลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของหญ้าหนู

Relation between Drought Tolerance and Some Physiological Traits of
Urochloa ruziziensis (R. Germ. and C.M. Evrard) Crin.

นามผู้วิจัย นางสาวมัทนภรณ์ ใหม่คามิ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์มาลี ณ นคร, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ศรีสม สุวรรณวงศ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สรัญญา วัชรโรทัย, Dr.rer.nat.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความสัมพันธ์ของการทนแล้งกับลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของหญ้ารูจี

Relation between Drought Tolerance and Some Physiological Traits of
Urochloa ruziziensis (R. Germ. and C.M. Evrard) Crin.

โดย

นางสาวมัทนภรณ์ ไหมคำม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อขอความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พญกษศาสตร์)

พ.ศ. 2554

มัทนภรณ์ ใหม่คามิ, 2554: ความสัมพันธ์ของการทนแล้งกับลักษณะทางสรีรวิทยาบาง
ประการของหญ้ารัฐ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พฤกษศาสตร์) สาขาพฤกษศาสตร์
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ ฌ นคร,
Ph.D. 105 หน้า

เมื่อหญ้ารัฐอยู่ในสภาวะขาดน้ำ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่สำคัญ เช่น การรั่ว
ของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ลดลง และการปรับค่า osmotic potential
ภายในเซลล์ จากการทดลองพบว่าขั้นตอนที่เหมาะสมในการวัดค่าการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์
ออกจากเซลล์ของหญ้ารัฐ ได้แก่ การล้างเพื่อกำจัดเซลล์ตาย และสารต่างๆที่ผิวใบ ใช้ระยะเวลา 15
นาทิจากนั้นเป็นการชักนำให้ใบหญ้ารัฐอยู่ในสภาวะขาดน้ำด้วย PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์
เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และขั้นตอนสุดท้ายคือ การให้ใบหญ้ารัฐดูดน้ำกลับเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อศึกษา
การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหญ้ารัฐ 20 โคลนที่มีระดับการทนแล้งแตกต่างกัน
พบว่าโคลนที่ทนแล้งได้ดีจะมีการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์น้อยกว่าโคลนที่ทน
แล้งต่ำ ส่วนปริมาณน้ำสัมพัทธ์ของหญ้ารัฐทั้ง 20 โคลน ในแปลงทดลองเมื่ออยู่ในสภาวะขาดน้ำ
นานเป็นเวลา 7 วัน พบว่าโคลนที่ทนแล้งได้ดีมีปริมาณน้ำสัมพัทธ์น้อยกว่าโคลนที่ทนแล้งต่ำ
ต่อจากนั้นนำหญ้ารัฐที่ผ่านการประเมินระดับการทนแล้งจากลักษณะภายนอก 20 โคลนมาทดสอบ
ระดับการทนแล้งในสภาพปลอดเชื้อ โดยประเมินจากค่าความเข้มข้นของ PEG ที่ทำให้หญ้ารัฐตาย
เป็นร้อยละ 50 ของชุดควบคุม (LD_{50}) พบว่าหญ้ารัฐโคลนที่ทนแล้งได้ดีมีค่า LD_{50} สูงกว่าโคลนที่
ทนแล้งต่ำ นอกจากนั้นค่าออสโมแลลลิตีและปริมาณโปรตีนมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับ PEG ที่
มีความเข้มข้นสูงขึ้น โดยโคลนที่ทนแล้งได้ดีส่วนใหญ่มีค่าออสโมแลลลิตีเพิ่มขึ้นมากกว่าและมี
ปริมาณโปรตีนสูงกว่าโคลนที่ทนแล้งต่ำ ส่วนปริมาณ total soluble sugar ภายในเซลล์ใบของแต่ละ
โคลน เมื่อได้รับ PEG ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น พบว่าแต่ละโคลนมีการตอบสนองที่แตกต่างกัน มีทั้ง
ที่ปริมาณ total soluble sugar ลดลง เพิ่มขึ้น และค่อนข้างคงที่ นอกจากนี้พบว่า LD_{50} มีสหสัมพันธ์
กับการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา
2 ชั่วโมง และปริมาณโปรตีนของหญ้ารัฐที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน
อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็น -0.940 และ 0.827 ตามลำดับ จากผลการ
ทดลองนี้แสดงว่าการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์และปริมาณโปรตีนสามารถใช้เป็น
เกณฑ์ในการคัดเลือกหญ้ารัฐโคลนที่ทนแล้งได้

ลายมือชื่อนิติ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Mattanaporn Maikami 2011: Relation between Drought Tolerance and Some Physiological Traits of *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. and C.M. Evrard) Crin. Master of Science (Botany), Major Field: Botany, Department of Botany. Thesis Advisor: Associate Professor Malee Nanakorn, Ph.D. 105 pages.

Water deficit results in change of major physiological traits of ruzi grass such as electrolyte leakage, decreasing of relative water content and osmotic adjustment. From the study, the appropriate procedures to measure electrolyte leakage in ruzi leaf tissues comprised 15 min. for leaching cell death and substances on leaf surface consequently, water stress induction using 30%PEG for 2 hr. and finally, recovering from stress in deionized water for 2 hr. Twenty clones of ruzi grass vary in drought tolerant level were determined electrolyte leakage. The higher drought tolerant clone, the lower electrolyte leakage was found. In addition, water relation of 20 clones which induced drought stress for 7 days in field was lower in the higher drought sensitive clones. Subsequently, those 20 clones obtaining from morphological characteristics determination were *in vitro* estimated drought tolerance ability based on PEG concentration causing median lethal dose (LD_{50}). The result showed that the higher drought tolerant clones performed higher LD_{50} . Furthermore, both osmolality and proline content trend to increase along with increasing of PEG concentrations. Almost the higher drought tolerant clones exhibited higher osmolality increasing and proline content than the lower drought tolerant clones. Total soluble sugar content in cytoplasm, however, expressed various responses when PEG content increased; increased, decreased or stable. This suggested that total soluble sugar content may not play an important role in osmotic adjustment of ruzi grass. Moreover, LD_{50} had significant different correlations with electrolyte leakage of 30%PEG treatment for 2 hr. and also proline content of 20%PEG treatment for 1 week. The correlation coefficient was -0.940 and 0.827, respectively. This study indicated that electrolyte leakage and proline content can be an effective criterion for drought tolerant selection of ruzi grass.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

___ / ___ / ___

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.มาลี ณ นคร อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก และรองศาสตราจารย์ ดร.ศรีสม สุวรรณวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่
กรุณาช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย ตลอดจนกรุณาสละเวลาให้ความรู้ ให้คำปรึกษาแนะนำ
และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอกราบขอบพระคุณ รอง
ศาสตราจารย์ ดร. ลิลลี่ กาวีตะ ที่ให้คำปรึกษาเรื่อยมาตั้งแต่ปริญญาตรี จนถึงปริญญาโท และมีส่วน
สำคัญในการให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติที่ทำให้วิทยานิพนธ์สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้ความรู้และคำแนะนำในการศึกษา ทั้งในและ
นอกห้องเรียน อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งที่ข้าพเจ้านำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไปใน
อนาคต

ขอขอบคุณกองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดลอง สารเคมี
และอุปกรณ์ รวมทั้งสนับสนุนเงินทุนบางส่วนในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ ทุกคนในภาควิชาพฤกษศาสตร์ที่คอยให้ความช่วยเหลือให้
กำลังใจ ชี้แนะและสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงได้

ขอบคุณภรรยา ทรงความดี ที่ให้ความช่วยเหลือทั้งด้านการเรียน และการวิจัย และ
ขอขอบคุณพี่ฤทัยชนก กิตติวิโรดม ที่เป็นเรี่ยวแรงสำคัญในการแก้ไขสำนวน ภาษา และการจัดทำ
รูปเล่มวิทยานิพนธ์ ตลอดจนเป็นกำลังใจที่ดีมาตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัวของข้าพเจ้า ที่ช่วยส่งเสริม และเป็นแรงสนับสนุน
สำคัญ รวมทั้งกำลังใจที่มีให้แก่ข้าพเจ้าตลอดมาที่ทำให้ข้าพเจ้า

มัทนภรณ์ ไหม่คามิ

เมษายน 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	20
อุปกรณ์	20
วิธีการ	22
ผลการทดลอง	31
วิจารณ์ผลการทดลอง	53
สรุปผลการทดลอง	71
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	74
ภาคผนวก	89
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	105

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง LD_{50} ปริมาณน้ำสัมพัทธ์เมื่อรดน้ำ 7 วัน และการรื้อของสารอเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์เมื่อชักนำให้เกิดความเครียดจากการขาดน้ำด้วย PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ของหนัารูซี่ทั้ง 20 โคลน	43
2	ค่า EL เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ RWC เมื่อรดน้ำ 7 วัน และค่าออสโมแลลลิตี ปริมาณโปรตีน และปริมาณ total soluble sugar เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพหลอดทดลองของหนัารูซี่ 10 โคลนที่มีค่า LD_{50} ต่ำสุด 5 โคลน และที่มีค่า LD_{50} สูงสุด 5 โคลน โดยจัดแบ่งเป็นกลุ่มที่ทนแล้งได้ดี และกลุ่มที่ทนแล้งต่ำ และเรียงลำดับตามความเข้มข้นของ PEG ที่ทำให้หนัารูซี่ตาย เป็นร้อยละ 50 ของชุดควบคุม (LD_{50}) ในสภาพหลอดทดลอง	48
3	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง LD_{50} ออสโมแลลลิตี ปริมาณโปรตีน และ ปริมาณ total soluble sugar ของหนัารูซี่ 10 โคลน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน	50
4	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง LD_{50} การรื้อของสารอเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ (EL) ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (RWC) เมื่อรดน้ำ 7 วัน และ ออสโมแลลลิตี ปริมาณโปรตีน และปริมาณ total soluble sugar ของหนัารูซี่ทั้ง 10 โคลน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG ที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน	52

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
1	องค์ประกอบอาหารพื้นฐานสูตร MS	90
2	เกณฑ์ในการคัดเลือกหนูรัฐ 20 โคลน จากจำนวนหนูรัฐทั้งหมด 113 โคลนในสภาพแปลง ทำการคัดเลือกจากการประเมินด้วยสายตา หลังจากดให้น้ำ 7 วัน โดยอาศัยการพิจารณาจากลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไป	91
3	การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหนัรัฐที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปแช่น้ำไร้ออกซิเจนในที่มีดเป็นเวลา 1, 2, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง	93
4	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหนัรัฐที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปแช่น้ำไร้ออกซิเจนในที่มีดเป็นเวลา 1, 2, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง	93
5	ผลของระยะเวลาที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ต่อการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหนัรัฐเป็นเวลา 0.5, 1, 2, 4, 10, 16 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่น้ำไร้ออกซิเจนในที่มีดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	94
6	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของระยะเวลาที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ต่อการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหนัรัฐเป็นเวลา 0.5, 1, 2, 4, 10, 16 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่น้ำไร้ออกซิเจนในที่มีดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	94

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
7	การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของไบโพลิเมอร์ที่ใช้เวลาล้าง 30 นาที และได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปแช่ในน้ำไร้ไอออนในที่มีดเป็นเวลา 1, 2, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ไบคอลลีกลับ	96
8	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของไบโพลิเมอร์ที่ใช้เวลาล้าง 30 นาที และได้ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปแช่ในน้ำไร้ไอออนในที่มีดเป็นเวลา 1, 2, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ไบคอลลีกลับ	96
9	การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของไบโพลิเมอร์โคลน 16 และ 17 ที่ใช้เวลาล้าง 30 นาที และเมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วแช่ในน้ำไร้ไอออนในที่มีดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	99
10	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของไบโพลิเมอร์โคลน 16 และ 17 ที่ใช้เวลาล้าง 30 นาที และเมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วแช่ในน้ำไร้ไอออนในที่มีดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	100

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า	
11	ค่าการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ (EL) ของใบหญาฐีเมื่อชักนำให้เกิดความเครียดจากการขาดน้ำด้วย PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และใช้เวลา 2 ชั่วโมงเพื่อให้ใบคืนน้ำกลับ ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (RWC) ในใบของหญาฐี เมื่อคืนน้ำเป็นเวลา 7 วัน และความเข้มข้นของ PEG ที่ทำให้หญาฐีตายเป็นร้อยละ 50 ของชุดควบคุม (LD_{50}) ในสภาพหลอดทดลอง และการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหญาฐีทั้ง 20 โคลนซึ่งเรียงตามกลุ่มที่ประเมินระดับการทนแล้งในสภาพแปลง คือกลุ่มที่ทนแล้งได้ดี กลุ่มที่ทนแล้งปานกลาง และกลุ่มที่ทนแล้งต่ำ	102
12	ค่าออสโมแลลลิตี ปริมาณโปรตีนของหญาฐี และปริมาณ total soluble sugar ของหญาฐี 10 โคลน ที่มีค่า LD_{50} ต่ำสุด 5 โคลน และที่มีค่า LD_{50} สูงสุด 5 โคลน โดยจัดแบ่งเป็นกลุ่มที่ทนแล้งได้ดี และกลุ่มที่ทนแล้งต่ำ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG-6000 ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์	103
13	ค่าวิกฤตของสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson Product Moment correlation coefficient)	104

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การรื้อของสารอิเล็กโทรไลต์จากชิ้นส่วนไบโพลิเมอร์ 2 โคลนทุกๆ 15 นาที เป็นเวลา 90 นาที	33
2	การรื้อของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของไบโพลิเมอร์ โคลน 16 และ 17 ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในน้ำไร้ไอออนในที่มืดเป็นเวลา 1, 2, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ไบโพลิเมอร์กลับหลังจากได้รับ PEG	35
3	การรื้อของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของไบโพลิเมอร์ เปรียบเทียบระหว่างโคลน 16 และ 17 เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในน้ำไร้ไอออนในที่มืดเป็นเวลา 1, 2, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ไบโพลิเมอร์กลับหลังจากได้รับ PEG	36
4	การรื้อของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของไบโพลิเมอร์ โคลน 16 และ 17 ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 0 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 0.5, 1, 2, 4, 10, 16 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในน้ำไร้ไอออนในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	38
5	การรื้อของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์เปรียบเทียบของไบโพลิเมอร์ โคลน 16 และ 17 ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 0.5, 1, 2, 4, 10, 16 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในน้ำไร้ไอออนในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	39
6	การรื้อของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของไบโพลิเมอร์ 20 โคลน ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามระดับการทนแล้งในสภาพแปลงที่ประเมินจาก ลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไปคือ กลุ่มที่ทนแล้งดี กลุ่มที่ทนแล้ง ปานกลาง และกลุ่มที่ทนแล้งต่ำ เมื่อชักนำให้เกิดความเครียดจากการ ขาดน้ำด้วย PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และใช้เวลา 2 ชั่วโมงเพื่อให้ไบโพลิเมอร์กลับ	40

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
7	ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบของหนัารูชี้ทั้ง 20 โคลน ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามระดับการทนแล้งในสภาพแปลงที่ประเมินจากลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไปคือ กลุ่มที่ทนแล้งดี กลุ่มที่ทนแล้งปานกลาง และกลุ่มที่ทนแล้งต่ำ เมื่อให้น้ำเป็นเวลา 0 และ 7 วัน	41
8	ความเข้มข้นของ PEG ที่ทำให้หนัารูชี้ตายเป็นร้อยละ 50 ของชุดควบคุม (LD_{50}) ในสภาพหลอดทดลองของใบหนัารูชี้ทั้ง 20 โคลน ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามระดับการทนแล้งในสภาพแปลงที่ประเมินจากลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไปคือ กลุ่มที่ทนแล้งดี กลุ่มที่ทนแล้งปานกลาง และกลุ่มที่ทนแล้งต่ำ	42
9	ความสัมพันธ์ระหว่าง LD_{50} และการรื้อของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของหนัารูชี้ทั้ง 20 โคลน	43
10	ค่าออสโมแลลลิตีของหนัารูชี้ 10 โคลนที่มีค่า LD_{50} ต่ำสุด 5 โคลน และที่มีค่า LD_{50} สูงสุด 5 โคลน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์	45
11	ปริมาณโปรตีนของหนัารูชี้ 10 โคลนที่มีค่า LD_{50} ต่ำสุด 5 โคลน และที่มีค่า LD_{50} สูงสุด 5 โคลนเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์	45
12	ปริมาณ total soluble sugar ของหนัารูชี้ 10 โคลนที่มีค่า LD_{50} ต่ำสุด 5 โคลน และที่มีค่า LD_{50} สูงสุด 5 โคลน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG-6000 ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์	46
13	ความสัมพันธ์ระหว่าง LD_{50} และปริมาณโปรตีน ของหนัารูชี้ 10 โคลนที่มีค่า LD_{50} ต่ำสุด 5 โคลน และที่มีค่า LD_{50} สูงสุด 5 โคลน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG ที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
1	การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของไบโหญูร์ชีโคลน 16 และ 17 ที่ใช้ล้าง 30 นาที และได้รับ PEG ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วแช่น้ำไร้ไอออนในที่มีดเป็น เวลา 1, 2, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ไบคูดน้ำกลับ	95
2	การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของไบโหญูร์ชี เปรียบเทียบระหว่างโคลน 16 และ 17 ที่ใช้เวลาล้าง 30 นาที และได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ใน น้ำไร้ไอออนในที่มีดเป็นเวลา 1, 2, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ไบคูด น้ำกลับ	97
3	การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของไบโหญูร์ชีโคลน 16 และ 17 ที่ใช้เวลาล้าง 30 นาที และได้รับ PEG ความเข้มข้น 0 และ 30 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 0.5, 1, 2, 4, 10, 16 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ใน น้ำไร้ไอออนในที่มีดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	98
4	การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์เปรียบเทียบของไบโหญูร์ชีโคลน 16 และ 17 ที่ใช้เวลาล้าง 30 นาที และได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 0.5, 1, 2, 4, 10, 16 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ ในน้ำไร้ไอออนในที่มีดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง	100
5	กราฟมาตรฐานของโพรีลิน	101
6	กราฟมาตรฐานของกลูโคส	101

ความสัมพันธ์ของการทนแล้งกับลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของหญ้ารูซี่

Relation between Drought Tolerance and Some Physiological Traits of

Urochloa ruziziensis (R. Germ. and C.M. Evrard) Crin.

คำนำ

หญ้ารูซี่ของประเทศไทย แม้จะมีการเจริญได้ดี แต่มักมีข้อจำกัดในด้านศักยภาพการให้ผลผลิต จึงมีการนำเข้าหญ้ามานานจากต่างประเทศเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ หญ้าเหล่านี้ส่วนใหญ่มิมีความสามารถปรับตัวได้ดีในประเทศไทย เช่น หญ้ารูซี่ (*Urochloa ruziziensis* (R. Germ. and C.M. Evrard) Crins) (สายพันธุ์, 2547) เป็นหญ้าที่เจริญเติบโตเร็ว แตกกอดี นอกจากนั้นยังมีความสามารถทนแล้งได้ดี แต่มีระยะพักตัวในช่วงฤดูแล้ง แม้ว่าจะมีการให้น้ำและใส่ปุ๋ยอย่างเต็มที่ก็ไม่สามารถเพิ่มผลผลิตของหญ้าในช่วงฤดูแล้งได้ ทำให้ขาดแคลนอาหารหยาบคุณภาพดี (กรมปศุสัตว์, 2545) จึงต้องมีการปรับปรุงพันธุ์หญ้ารูซี่ให้ทนสภาพแล้งได้มากขึ้น

การคัดเลือกพืชสายพันธุ์ทนแล้งโดยการใช้สารออสโมติกัม (osmoticum) บางชนิด เช่น โพลีเอทรีลีน ไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) แมนนิทอล (mannitol) และซูโครส (sucrose) โดยสารเหล่านี้จะไปลด osmotic potential ของสารละลายที่อยู่ล้อมรอบเซลล์พืช ทำให้เซลล์อยู่ในสภาพที่ขาดน้ำ (Bressan *et al.*, 1981) เป็นวิธีการที่น่าสนใจ เนื่องจากการคัดเลือกพืชที่ทนต่อสภาพแห้งแล้งจากการขาดน้ำในธรรมชาติเป็นกระบวนการที่ใช้เวลานาน และขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ มีการนำ PEG มาใช้เพื่อทำให้เกิดภาวะขาดน้ำ มากกว่าสารละลายอื่นๆ เพราะเป็นสารเฉื่อย ไม่มีพิษต่อคนและสัตว์ และไม่ดูดซึมเข้าไปในเซลล์พืช (Satvir *et al.*, 1998) เมื่อพืชอยู่ในสภาวะขาดน้ำ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยา และกระบวนการทางชีวเคมีหลายประการ เช่น การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ (electrolyte leakage) ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (relative water content) และการสะสมตัวถูกละลาย (solute accumulation) เช่น โปรตีน และ น้ำตาลเป็นต้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงลักษณะดังกล่าว อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ระดับการทนแล้งของพืช ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการคัดกรองเพื่อให้ได้พืชทนแล้งจากประชากรจำนวนมากได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการทนแล้งของหญ้าธัญชี โคลนต่างๆ โดยใช้ polyethylene glycol (PEG 6000) เป็นสารที่ชักนำให้พืชอยู่ในภาวะขาดน้ำ
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาของการทนแล้งบางประการของหญ้าธัญชีในสภาพขาดน้ำ
3. เพื่อหาลักษณะทางสรีรวิทยาที่มีความสัมพันธ์กับระดับการทนแล้งของหญ้าธัญชี เพื่อใช้เป็นดัชนีชี้วัดระดับการทนแล้ง

การตรวจเอกสาร

พืชวงศ์หญ้ามีประมาณ 10,000 ชนิด มีหญ้าเขตร้อนถึง 172 ชนิด ที่มีความสำคัญในด้านการเป็นอาหารสัตว์ แต่มีเพียง 40 ชนิดเท่านั้นที่ใช้ปลูกเป็นหญ้าเลี้ยงสัตว์ (Skerman and Riveros, 1990) สำหรับประเทศไทยมีหญ้าพื้นเมืองมากกว่า 50 ชนิด ขึ้นกระจายอยู่ทั่วไป ตามธรรมชาติ หญ้าพื้นเมืองแม้ว่าสามารถเจริญเติบโตได้ดี แต่มีข้อจำกัดในด้านศักยภาพการให้ผลผลิตที่ค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับหญ้าที่นำมาจากต่างประเทศ ดังนั้นหญ้าที่นำมาปลูกเป็นแปลงหญ้าอาหารสัตว์ จึงได้จากการนำเข้ามาจากต่างประเทศแทบทั้งสิ้น และเป็นที่ยอมรับว่าหญ้าเหล่านี้สามารถปรับตัวได้ดีในประเทศไทย ซึ่งส่วนใหญ่มาจากเผ่า Paniceae รองลงมาได้แก่ Andropogoneae และ Chloridoideae เช่นหญ้านวล หญ้ารูซี่ หญ้าเนเปียร์ และหญ้างินนิ (สาขันธ์, 2547)

หญ้ารูซี่ ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C.M. Evrard) Crins ส่วนชื่อพ้องคือ *Brachiaria ruziziensis* R. Germ. & C.M. Evrard อยู่ในวงศ์ Gramineae วงศ์ย่อย Panicoideae เผ่า Paniceae (Norsaengsri, 2006) ชื่อสามัญอื่นๆ ได้แก่ หญ้า Kennedy ruzi (ออสเตรเลีย) หญ้า Congo signal (แอฟริกา) หญ้า prostrate signal (เคนยา) Itanto (Norsaengsri, 2006) หญ้ารูซี่ หรือ หญ้าคองโก (กอบแก้ว, 2535; Skerman and Riveros, 1990) ซึ่งหญ้าเผ่านี้พบมากในเขตร้อนชื้น และกึ่งเขตร้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่ที่มีอุณหภูมิสูงและฝนตกน้อย (สาขันธ์, 2547)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

หญ้ารูซี่เป็นพืชอายุหลายปี ลำต้นใต้ดินแบบเหง้า เจริญชานานพื้นดิน ลำต้นเหนือดินเป็นกระจุกสูง 150-300 เซนติเมตร ข้อเกลี้ยงสีม่วงเข้ม ปล้องมีขนยาว กาบใบบางคล้ายกระดาษมีขนยาว 9-16 เซนติเมตร ขาวช่อนเหลื่อมกับปล้องบน แผ่นใบรูปแถบกว้าง 1.0-1.7 เซนติเมตร ยาว 15-30 เซนติเมตร หลังใบและท้องใบมีขนปกคลุมมีลักษณะเป็นขนแข็ง โคนใบรูปหัวใจถึงกลม ปลายใบเรียวแหลม เส้นใบมีลักษณะเป็นขนแข็ง ช่อดอกแบบกระจุก (compound racemose) 5-7 ช่อเรียงสลับหายากที่มี 1 ช่อ แกนกลางช่อดอกเป็นรูปสามเหลี่ยมมีขนแข็งปกคลุม แกนกลางช่อดอกย่อยเกลี้ยง

รูปร่างแบนยาว 4.5-6.0 เซนติเมตร ดอกย่อยรูปรีถึงรูปไข่กลับกว้าง 2.0-2.3 มิลลิเมตร ยาว 5.5-5.8 มิลลิเมตร ก้านดอกย่อยเกลี้ยง กาบช่อย่อยด้านล่างรูปไข่บางคล้ายเยื่อขาว 2.5-2.7 มิลลิเมตร ปลายเรียวแหลม กาบช่อย่อยด้านบนรูปไข่ถึงรูปใบหอกยาว 4.3-4.4 มิลลิเมตร ส่วนล่างเกลี้ยงส่วนบนมีขน ปลายเรียวแหลม ดอกย่อยด้านล่างเป็นดอกเพศผู้หรือเป็นหมัน กาบล่างและกาบบนรูปใบหอกบางคล้ายเยื่อขอบบางใส ปลายเรียวแหลม ดอกย่อยด้านบนสมบูรณ์เพศ กาบล่างแข็งเปราะรูปรีถึงรูปใบหอกยาว 4.2-4.3 มิลลิเมตร มีขน ปลายเรียวแหลมหรือเป็นติ่งแหลม กาบบนแข็งเปราะ เกลี้ยง รูปรียาว 3.1-3.2 มิลลิเมตร ปลายเรียวแหลม กลีบเกล็ด 2 อัน รูปรีแกมรูปสามเหลี่ยม กว้าง 3 มิลลิเมตร ยาว 2.25-2.3 มิลลิเมตร ผลแบบแห้งเมล็ดติดรูปรียาว 2.8-3.0 มิลลิเมตร (บุญฤๅ, 2528; สายัณห์, 2547; Norsaengsri, 2006)

ลักษณะทั่วไป

หญ้ารูซี่ เป็นหญ้าที่มีอายุหลายปี เจริญเติบโตเร็ว แตกกอดี ใบอ่อนนุ่ม สัตว์ชอบกิน ลักษณะลำต้นกึ่งตั้งกึ่งเลื้อย (semi-prostrate) มีรากตามข้อ ขยายพันธุ์ได้ด้วยเมล็ดและลำต้น จัดเป็นพืชวันสั้น (กรมปศุสัตว์, 2545) ไม่มีโรคและแมลงรบกวน (จิริรัตน์ และคณะ, 2532) หญ้ารูซี่ยังมีความทนทานต่อการแทะเล็ม และการเหยียบย่ำของสัตว์ นอกจากนั้นมีความสามารถทนแล้งได้พอสมควร เมล็ดมีความงอกสูง ทำให้สะดวกต่อการขยายพันธุ์ แต่หญ้ารูซี่มีข้อเสียเล็กน้อยคือไม่สามารถปรับตัวอยู่ในสภาพแล้งที่ยาวนานได้ แม้ว่าจะมีการให้น้ำและใส่ปุ๋ยอย่างเต็มที่ก็ไม่สามารถเพิ่มผลผลิตของหญ้าในช่วงฤดูแล้ง (กอบแก้ว, 2535; กรมปศุสัตว์, 2545; สายัณห์, 2547; Skerman and Riveros, 1990)

การแพร่กระจายของหญ้ารูซี่

หญ้ารูซี่ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกา (Skerman and Riveros, 1990) เป็นหญ้าพื้นเมืองสำหรับใช้เป็นพืชอาหารสัตว์ที่สำคัญของประเทศคองโก (Congo) และประเทศเคนยา (Kenya) ได้มีการนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยที่ฟาร์มโคนมไทย-เดนมาร์ก อำเภอมวกเหล็ก (ปัจจุบันคือ องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย) และสถานีพืชอาหารสัตว์ปากช่อง ในปี 2511 (บุญฤๅ, 2528) ซึ่งต่อมาในปี 2523 ศูนย์ส่งเสริมการขยายพันธุ์สัตว์ของสำนักงานคณะกรรมการพิเศษเพื่อประสานงานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริกลาง นำเข้าอีกครั้งจากไอเวอร์โคส ซึ่งเป็น

พันธุ์ที่ปลูกแพร่หลายในปัจจุบัน (กอบแก้ว, 2535) การผลิตเมล็ดพันธุ์ในประเทศไทย ได้เริ่มขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2525 เนื่องจากพันธุ์ที่มีเมล็ดที่มีน้ำหนัก ดีเมล็ดดี เมล็ดมีขนาดใหญ่ และมีความงอกสูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ หน่วยงานของกองอาหารสัตว์จึงปลูกพันธุ์เพื่อผลิตเมล็ดหลายแห่ง และได้มีการแนะนำให้เกษตรกรนำไปปลูก เป็นผลให้พันธุ์นี้เป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกกันแพร่หลายที่สุดในประเทศไทย โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ลักษณะ, 2527; กรมปศุสัตว์, 2545; สายพันธ์, 2547)

การเกิดความเครียดน้ำในพืช (water stress)

การเกิดความเครียดน้ำอาจเกิดจากการที่พืชได้รับน้ำมากเกินไป (water excess) หรือขาดน้ำ (water deficit) ภาวะเครียดที่เกิดจากขาดน้ำ เรียกว่า drought stress ตัวอย่างการที่พืชได้รับน้ำมากเกินไป คือการเกิดน้ำท่วม น้ำขัง ทำให้ปริมาณออกซิเจนที่พืชได้รับลดลง ส่งผลให้การหายใจ การดูดธาตุอาหารพืช และกิจกรรมต่างๆ ของรากลดลง ส่วนการที่พืชขาดน้ำ มักจะเกิดจากความแห้งแล้ง แต่อาจเกิดขึ้นเนื่องจากพืชมีการคายน้ำมากกว่าปกติ พืชดูดน้ำไม่ได้เนื่องจากอากาศหนาวเย็น ดินมีสารละลายเกลือที่เข้มข้นสูง (salt stress) หรือระบบรากได้รับอันตราย ถึงแม้พืชจะอยู่ในดินที่มีความชื้นก็ตาม (นพพร, 2543; Hopkins, 2004)

การที่น้ำสามารถเคลื่อนที่จากดินสู่ต้นพืช โดยผ่านระบบราก และคายออกทางปากใบ โดยผ่านการแพร่ การออสโมซิส และ bulk flow เกิดจากมีความแตกต่างกันของ water potential ระหว่างสองบริเวณ น้ำจะเคลื่อนที่จากบริเวณที่มีค่า water potential สูงไปต่ำ จนทั้งสองบริเวณมีค่า water potential เท่ากันหรือสมดุลกัน ดินมีค่า water potential สูงกว่าของราก จึงทำให้น้ำสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่รากได้ ในขณะเดียวกัน water potential ของน้ำในรากก็สูงกว่าลำต้น กิ่งก้าน และใบ และ water potential ของใบก็สูงกว่าอากาศ จึงก่อให้เกิดการไหลของน้ำจากดินสู่ราก ลำต้น ใบ และอากาศตามลำดับ ดังนั้น เมื่อดินขาดน้ำ หรือรากดูดน้ำไม่ทันกับอัตราการคายน้ำ พืชจะขาดน้ำ ส่งผลให้เกิดความเครียดน้ำ (water stress) (เฉลิมพล, 2542; Taiz and Zeiger, 2002)

การคัดเลือกพืชทนแล้ง

การคัดเลือกพืชที่ทนทานต่อสภาพแล้งภายใต้สภาพธรรมชาติ เป็นกระบวนการที่ใช้เวลานาน และขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ เพราะฉะนั้นการพัฒนาระบวนการคัดเลือกพืชที่ทนแล้งภายใต้สภาวะที่สามารถควบคุมได้จึงเป็นวิธีการที่น่าสนใจ (Georgieva *et al.*, 2004) เช่นอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อ ซึ่งสามารถทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือกลุ่มเซลล์ บนอาหารที่เติมสารออสโมติกัม (osmoticum) บางชนิด เช่น โพลีเอทิลีน ไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) น้ำตาลแมนนิทอล (mannitol) ซูโครส (sucrose) และกลูโคส (glucose) เป็นต้น โดยสารเหล่านี้จะไปลด osmotic potential ของสารละลายที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ ทำให้เซลล์อยู่ในสภาพที่ขาดน้ำ (Bressan *et al.*, 1981)

Polyethylene glycol (PEG) มีชื่อทางการค้าว่า carbowaxes มีสูตรโครงสร้าง $\text{HOCH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ มวลโมเลกุลเมื่อเป็นของเหลวขึ้นเท่ากับ 200 ถึง 600 หรือเมื่อเป็นไขมีมวลโมเลกุล 1,000 ถึง 6,000 (Jackson, 1962) โดย PEG ถูกนำมาใช้เพื่อทำให้เกิดภาวะเครียดจากการขาดน้ำมากกว่าสารละลายอื่นๆ เพราะเป็นสารเฉื่อย เมื่อละลายน้ำไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่มีพิษต่อคนและสัตว์ และไม่ดูดซึมเข้าไปในเซลล์พืช (Satvir *et al.*, 1998) ในขณะที่ซอร์บิทอล และแมนนิทอลสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์พืช และยังช่วยทำให้ค่า osmotic potential ของเซลล์ลดลง เช่นการศึกษาความแตกต่างของสารที่ใช้ชักนำให้เกิดความเครียดจากการขาดน้ำระหว่าง PEG และซอร์บิทอล ที่ -1.5 MPa ในข้าว (*Oryza sativa* c.v. Taichung Native 1) พบว่า PEG สามารถชักนำให้ใบข้าวเกิดความเครียดจากการขาดน้ำได้มากกว่าซอร์บิทอล (Hsu and Kao, 2003) และการเปรียบเทียบผลของแมนนิทอล และ PEG ที่ -0.8 และ -1.8 MPa ต่อการเจริญเติบโตของ *Sesuvium portulacastrum* พบว่า PEG มีผลทำให้การเจริญเติบโตของ *S. portulacastrum* ลดลงมากกว่าแมนนิทอลอย่างมีนัยสำคัญ (Slama *et al.*, 2007)

การใช้ PEG ชักนำให้เกิดภาวะเครียดจากการขาดน้ำกับต้นพืช เพื่อทดสอบและคัดเลือกพืชทนแล้งในห้องปฏิบัติการ เช่น การคัดเลือกพันธุ์ข้าวทนแล้งจากแคลลัส ที่ชักนำจากเมล็ด ซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 9 μM และ PEG 6000 โดยพิจารณาการออกการชักนำให้เกิดแคลลัส และการเกิดต้นใหม่ พบว่า C 14-8 เป็นพันธุ์ที่สามารถทนแล้งได้ดีที่สุด

ตามด้วย SR 26-8 และ Nona Bokra (Biswas *et al.*, 2002) นอกจากนั้น Georgieva *et al.* (2004) ยังใช้ PEG เป็นสารคัดเลือกพันธุ์เบอร์รี่ที่ทนแล้งในสภาพปลอดเชื้อ ซึ่งพันธุ์ Bulgarski rubin และ Elite 1 เป็นพันธุ์ที่ทนแล้ง ส่วนพันธุ์ Shopska alena, Samodiva, Lyulin และ Elite 3 มีการเจริญเติบโต และความแข็งแรงของเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง เมื่อเลี้ยงอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG 20 หรือ 25 เปอร์เซ็นต์

ผลของความเครียดน้ำที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิต

เมื่อพืชเกิดความเครียดจากการขาดน้ำ จะมีผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิต ซึ่งผลกระทบที่เกิดขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ระยะการเจริญเติบโต (อายุ) และระดับความรุนแรงที่เกิดจากความเครียดจากการขาดน้ำ ซึ่งพืชแต่ละชนิดมีกิจกรรม และกระบวนการต่างๆ ของพืชต่างกัน เช่น (เฉลิมพล, 2542; ศรีสม, 2549; Nilsen and Orcutt, 1996)

1. การเจริญเติบโตทางลำต้น ใบ และผลผลิต

เมื่อเซลล์อยู่ในสภาพขาดน้ำ แรงดันเต่งภายในเซลล์ลดลง ทำให้การแบ่งเซลล์ และการขยายตัวของเซลล์ลดลง ส่งผลให้เซลล์มีขนาดเล็กกว่าปกติ เมื่อเซลล์มีขนาดเล็กลงก็ส่งผลต่อรูปแบบการเจริญของพืชทั้งต้นโดยขึ้นอยู่กับระยะเจริญเติบโตของพืช เช่นถ้าพืชขาดน้ำช่วงที่มีการแบ่งเซลล์ และขยายตัวของเซลล์ จะทำให้พื้นที่ใบลดลง ส่งผลทำให้ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่จะเข้ามาน้อยลงเนื่องจากใบมีขนาดเล็ก ถ้าแรงดันเต่งภายในเซลล์ลดลงในขณะที่กำลังสร้างดอก ก็จะทำให้จำนวนดอกลดลง หรือถ้าเกิดขึ้นในขณะผสมเกสรจะมีผลทำให้ไม่มีการผสมเกสร ซึ่งส่งผลต่อกระบวนการสืบพันธุ์ และถ้าขาดน้ำช่วงที่ผลเจริญเต็มที่ การสะสมน้ำหนักรวมแล้วจะลดลง อาจจะทำให้ผลผลิตลดลงในที่สุด

2. การสังเคราะห์แสง

การที่ปากใบปิดหรือลดขนาดลง เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ ทำให้การดูดซึมเข้าของคาร์บอนไดออกไซด์ลดลง ส่งผลให้การสังเคราะห์แสงลดลง นอกจากนั้นถ้าปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ลดลง ออกซิเจนเพิ่มขึ้นยังกระตุ้นให้เกิด photorespiration โดยกระบวนการนี้ทำให้

ประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงลดลง เนื่องจากการนำ RuBP ซึ่งเป็น carbon receptor ในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ มาใช้ในการบวนการ photorespiration และกระบวนการนี้ไม่มีการสร้างพลังงาน (ATP)

3. การหายใจในสภาวะที่ไม่มีแสง และเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต

เมื่อพืชขาดน้ำ การสังเคราะห์แสงของพืชจะลดลงก่อนการหายใจ มีผลทำให้อัตราส่วนการสังเคราะห์แสงต่อการหายใจลดลง ในขณะที่ photorespiration และ dark respiration เพิ่มขึ้น กระบวนการทั้งสองนี้อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้พืชตายจากสภาวะขาดน้ำ เนื่องจากการขาดน้ำมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของพืชมากกว่าการขาดคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate deprivation) เพราะพืชบางชนิดสามารถสลายแป้งที่เก็บอยู่ในคลอโรพลาสต์ ทำให้ปริมาณ total free sugar เพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถนำไปใช้ในกระบวนการทางสรีรวิทยาได้ โดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลอาจเป็นสัญญาณควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึม และมีส่วนสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์สารต่างๆ ในสิ่งมีชีวิต นอกจากนั้นน้ำตาลยังทำหน้าที่เป็น osmoprotectant โดยปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นไม่เพียงแต่ไปทำหน้าที่ปรับค่า water potential ภายในเซลล์ ยังทำหน้าที่แทน OH^- ของน้ำ เพื่อช่วยรักษาโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ (Pandey *et al.*, 2004; Mahajan and Tuteja, 2005; Rosa *et al.*, 2009)

4. เมแทบอลิซึมของไนโตรเจน

ในช่วงที่พืชขาดน้ำ การสะสมไนเตรตและแอมโมเนียลดลง เนื่องจากการเคลื่อนย้ายไนโตรเจนจากรากไปยังยอดในช่วงที่ขาดน้ำนั้นจะช้า จึงทำให้มีความเข้มข้นของไนเตรตและแอมโมเนียในรากสูงกว่าในช่วงที่ได้รับน้ำปกติ ส่งผลยับยั้งการดูดไนโตรเจนจากดิน นอกจากนั้นเมื่อพืชขาดน้ำการสังเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์บางตัวลดลง เช่น เมื่อ *Leymus chinensis* (Trin.) Tzvel ขาดน้ำที่ระดับต่างๆ พบว่าเมื่อได้รับน้ำที่ระดับน้อยกว่า 50-50% ความจุความชื้นสนาม (field capacity, FC) ส่งผลให้ปริมาณไนโตรเจนของใบลดลงอย่างชัดเจน และถ้าได้รับน้ำที่ระดับ 35-40% FC และ 25-30% FC ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (soluble protein) และกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid) ลดลง (Xu and Zhou, 2006)

กลไกการต้านทานต่อความแห้งแล้ง

พืชสามารถตอบสนองต่อความเครียดได้หลายทาง เช่น พืชอาจจะหลีกเลี่ยงภาวะเครียดได้อย่างสมบูรณ์ (avoidance) หรือบางครั้งพืชสามารถทนต่อความเครียดที่เกิดขึ้นได้ (tolerance) หลังจากนั้นพืชจะสามารถฟื้นตัวกลับมาได้เมื่อความเครียดนั้นสิ้นสุดลง กลไกที่ทำให้พืชสามารถปรับตัวหรือหลีกเลี่ยงต่อภาวะขาดน้ำ โดยพืชมีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง (morphological change) หรือทางสรีรวิทยา (physiological change) แต่ถ้าความเครียดนั้นรุนแรง จนพืชบางชนิดไม่สามารถทนต่อความเครียดได้ จะตายในที่สุด ซึ่งพืชแต่ละชนิดมีกลไกการต้านทานต่อความแห้งแล้งที่แตกต่างกัน สามารถจำแนกออกได้เป็น 3 แบบดังนี้ (ชัยฤกษ์, 2523; จินดา และ กัลยา, 2539; Nilsen and Orcutt, 1996; Hopkins, 2004)

1. การหนีแล้ง (drought escape)

เป็นกลไกหลีกเลี่ยงการขาดน้ำที่เกี่ยวกับวงจรชีวิตหรือการพัฒนาของพืช ซึ่งกลไกนี้พืชสามารถเจริญเติบโต ออกดอกติดผลครบวงจรชีวิต โดยไม่ได้รับผลกระทบจากความแห้งแล้งเลย ซึ่งวงจรชีวิตของพืชในกลุ่มนี้จะสั้น มีการออก เจริญเติบโต ออกดอกและติดผลอย่างรวดเร็วในช่วงที่มีความชื้นมากพอ หลังจากนั้นเมล็ดจะพักตัว ก่อนที่ฤดูแล้งจะเริ่มต้นขึ้น

2. การเลี่ยงแล้ง (drought avoidance)

เป็นกลไกที่พืชสามารถอยู่รอดได้ โดยที่ภายในต้นพืชไม่ขาดน้ำเมื่อเกิดภาวะแห้งแล้ง เช่น alfalfa (*Medicago sativa*) มีระบบรากที่ลึกไปถึงชั้นดินที่มีน้ำอยู่ ในพืชกลุ่มกระบองเพชร มีใบที่ลดรูปเป็นหนาม ส่วนพืชอื่นๆ อาจจะมีใบอวบน้ำ ชั้นคิวติเคิลหนา และมีขนที่ผิวใบ เพื่อลดการคายน้ำ ซึ่งพืชที่มีลักษณะเหล่านี้จะสามารถรักษาแรงตึงของเซลล์ และสามารถรักษาระดับน้ำภายในเซลล์ไว้ได้

3. การทนแล้ง (drought tolerance)

เป็นกลไกที่พืชตอบสนองต่อการขาดน้ำโดยภายในต้นพืชขาดน้ำเข้าขั้นวิกฤติ พืชจะมีกลไกที่ทำให้ศักย์ของน้ำ (water potential) ในพืชลดลง โดยพืชจะสร้างสารหรือมีการสะสมสารตัว

ถูกละลาย (solute accumulation) เพื่อปรับระดับความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์ ซึ่งสารเหล่านี้จะไปลดค่า osmotic potential ภายในเซลล์ ส่งผลให้พืชสามารถดูดน้ำเข้าสู่เซลล์ได้ เซลล์จึงเต่ง ลดสภาวะที่จะเกิดระดับน้ำวิกฤติที่จะทำให้พืชตายได้

การตรวจวัดความเครียดน้ำในพืช

เมื่อพืชอยู่ในสภาวะขาดน้ำ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยา และกระบวนการทางชีวเคมีหลายประการ ซึ่งสามารถตรวจวัดความเครียดน้ำของพืชจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้ เช่น การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ (electrolyte leakage) การสะสมตัวถูกละลาย (solute accumulation) ซึ่งทำให้ค่า osmotic potential ของเซลล์ลดลง (osmotic adjustment) และการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (relative water content) เป็นต้น

1. การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ (electrolyte leakage)

เมื่อสิ่งแวดล้อมเกิดสภาวะไม่เหมาะสม เช่น ขาดน้ำ หรืออุณหภูมิสูง จะส่งผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์เป็นส่วนที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม โดยองค์ประกอบที่เป็นโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตจะเปลี่ยนแปลงไป ทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ความสามารถในการเลือกผ่าน และหน้าที่อื่นๆ เปลี่ยนไป (Jones *et al.*, 1981; Matos *et al.*, 2002) เนื่องจากเมื่อเกิดภาวะเครียดจากการขาดน้ำ โปรโตพลาสต์จะหดตัว สารต่างๆ เข้มข้นมากขึ้น ผลที่ตามมาคือ เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเมแทบอลิซึมของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยความเครียดจากการขาดน้ำ จะทำให้เกิดช่องบริเวณ polar phospholipid head ของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อเซลล์ได้รับน้ำอีกครั้ง บริเวณที่เป็นช่องจะยอมให้สารที่โมเลกุลขนาดใหญ่ผ่านเข้า-ออกเซลล์ (Hopkins, 2004) นอกจากนั้นความเครียดที่เกิดขึ้นกับเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ส่วนที่เป็นไขมันเคลื่อนที่เข้าแทนที่โปรตีน ซึ่งตำแหน่งและโครงสร้างของโปรตีนเป็นตัวกำหนดหน้าที่ของเอนไซม์ จึงทำให้ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์พื้นฐานของเยื่อหุ้มเซลล์ พร้อมกันนั้นยังทำให้เกิดการรั่วไหลของสาร (Jones *et al.*, 1981)

ระดับความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิดจากภาวะเครียดจากการขาดน้ำ อาจวัดจากการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ (electrolyte leakage) (Bajji *et al.*, 2002) เช่น ในใบข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* L.) (Kocheva *et al.*, 2005) และ tall fescue (*Festuca arundinacea* L.)

(Jiang and Huang 2002) เมื่ออยู่ในภาวะเครียดจากการขาดน้ำ การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์สูงขึ้น ซึ่งการวัดการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์เป็นวิธีที่ง่าย เครื่องมือราคาไม่สูง ไม่ต้องใช้พืชทั้งต้น นอกจากนี้ความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ยังเกิดจากปัจจัยทางกายภาพอื่นอีกหลายชนิด เช่น อุณหภูมิต่ำ อุณหภูมิสูง มลพิษ ความเป็นกรด โลหะหนัก และการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองของพืชทางสรีรวิทยา และชีวเคมีหลายประการ เช่น การทดลองของ Bandurska (2000) ที่ชักนำให้ข้าวบาร์เลย์อยู่ในสภาพขาดน้ำด้วยสารละลาย PEG ที่มีค่า osmotic potential เป็น -1.5 MPa พบว่า ความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane injury) ของข้าวบาร์เลย์ มีความสัมพันธ์กับการสะสมโปรตีนภายในเซลล์แบบผกผัน โดยพันธุ์ทนแล้งที่มีการสะสมโปรตีนสูง เกิดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์น้อย ในขณะที่พันธุ์ที่ไม่ทนแล้งมีการสะสมโปรตีนต่ำกว่า และเกิดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์มากกว่าพันธุ์ทนแล้ง และการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ยังมีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีน โดยโคลนที่ทนแล้งมีปริมาณโปรตีนสูง การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์น้อยกว่าโคลนที่ทนแล้งน้อย เนื่องจากโปรตีนเป็นสารออสโมไลต์ที่มีคุณสมบัติเป็น osmoprotectant (Sarker *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่า การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้นยังสอดคล้องกับการเหี่ยว และปริมาณ malondialdehyde (MDA) ของใบ Kentucky bluegrass ที่เพิ่มขึ้น (Liu *et al.*, 2004) และการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ในภาวะขาดน้ำมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของพืช เช่น ในข้าวสาลี (*Triticum vulgare* Vill.) (Bajji *et al.*, 2002) ดังนั้นอาจใช้ค่า electrolyte leakage เป็นเกณฑ์ในคัดเลือกพันธุ์ที่ทนแล้งของพืชไร่หลายๆ ชนิด

นอกจากนั้น electrolyte leakage สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดความทนแล้งของพืช เช่น ในข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* L.) (Bandurska and Floryszak-Wieczorek, 2002), *Oryza longistaminata* (Liu *et al.*, 2004) และข้าวโพด (*Zea mays* L.) (Kolarovic *et al.*, 2006) โดยพบว่าพันธุ์ที่ทนแล้ง มีค่า electrolyte leakage ต่ำกว่าพันธุ์ที่ไม่ทนแล้ง

2. ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (relative water content)

ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ของพืช มีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำทั้งหมดภายในต้นพืช สามารถใช้วัดระดับน้ำภายในต้นพืชที่ได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อม (Kocheva *et al.*, 2004) ซึ่ง Adejare

and Umebese (2007) ศึกษาในถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) พันธุ์ TGX 563-02 และ TGX 923-2E ที่มีอายุ 7 วัน ในระยะเจริญทางลำต้น ออกดอก ติดผล และพัฒนาเมล็ด พบว่าเมื่อถั่วเหลืองได้รับความเครียดจากการขาดน้ำ ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ลดลงในทุกระยะของการเจริญเติบโต นอกจากนั้น Mohammadkhani and Heidari (2007) ใช้ปริมาณน้ำสัมพัทธ์เป็นตัวบ่งชี้ระดับความเครียดของพืชเมื่อปริมาณน้ำสัมพัทธ์ลดลง แสดงถึงระดับความเครียดที่สูงขึ้น สอดคล้องกับ Tavakol and Pakniyat (2007) ที่ศึกษาความทนแล้งของข้าวสาลี (*Triticum vulgare* Vill.) ในระยะต้นกล้า โดยใช้ PEG-6000 เป็นสารชักนำให้เกิดภาวะเครียดจากน้ำ โดยมีค่า osmotic potential 0, -5 และ -8 bar พบว่าเมื่อระดับภาวะเครียดจากการขาดน้ำเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ของพืชลดลง และในการทดลองของ Slama *et al.* (2007) ที่นำ *Sesuvium portulacastrum* มาเลี้ยงในสารละลายแมนนิทอล และ PEG เป็นเวลา 12 วัน พบว่าในชุดควบคุมมีค่าปริมาณน้ำสัมพัทธ์ค่อนข้างคงที่ที่ 80 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนำมาชักนำให้เกิดความเครียดจากการขาดน้ำค่าปริมาณน้ำสัมพัทธ์มีแนวโน้มลดลง โดยเมื่อเลี้ยง *S. portulacastrum* ในสารละลายแมนนิทอล และ PEG มีค่าปริมาณน้ำสัมพัทธ์ลดลงเหลือ 53 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในต้นกล้าข้าว (*Oryza sativa* L.) ก็เช่นเดียวกัน ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของ PEG ที่ได้รับสูงขึ้น (Zhou *et al.*, 2007) นอกจากนั้น ใบของ *Vicia faba* L. (Khan *et al.*, 2007) และถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) (Lobato *et al.*, 2008) เมื่ออยู่ในภาวะเครียด ค่าปริมาณน้ำสัมพัทธ์จะลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ระดับของปริมาณน้ำสัมพัทธ์สามารถใช้เป็นค่าที่บอกความแตกต่างของการทนแล้งได้ เช่น ข้าวสาลี (*Triticum vulgare* Vill.) 2 พันธุ์ที่ใช้ PEG เป็นสารชักนำให้เกิดภาวะเครียดจากการขาดน้ำโดยให้มีค่า osmotic potential -0.5 MPa เป็นเวลา 0, 2, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า ค่าปริมาณน้ำสัมพัทธ์ของใบ จะค่อยๆ ลดลง ที่ 48 และ 72 ชั่วโมง โดยพันธุ์ Mainnong No.4 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไม่ทนแล้งมีค่าปริมาณน้ำสัมพัทธ์ลดลง 23.82 และ 45.13 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม ส่วนพันธุ์ Miannong No.5 เป็นพันธุ์ที่ทนแล้งปริมาณน้ำสัมพัทธ์ลดลงน้อยกว่า โดยมีค่าปริมาณน้ำสัมพัทธ์ลดลงเป็น 16.73 และ 38.09 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม (Lui *et al.*, 2006) ส่วน Turkan *et al.* (2005) ศึกษาใน *Phaseolus acutifolius* ซึ่งสามารถทนแล้งได้ดีกว่า *P. vulgaris* โดยใช้ PEG ชักนำให้เกิดภาวะเครียดจากการขาดน้ำ พบว่าปริมาณน้ำสัมพัทธ์ของ *P. acutifolius* ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ของ *P. vulgaris* ลดลง

3. การปรับค่า osmotic potential ภายในเซลล์ (osmotic adjustment)

Osmotic adjustment เป็นการตอบสนองของพืชเมื่ออยู่ในภาวะเครียดจากการขาดน้ำ เพื่อให้ยังคงสามารถรักษาความเต่งของเซลล์ไว้ได้ โดยการสะสมตัวถูกละลายเพื่อปรับค่า osmotic potential ภายในเซลล์ให้ต่ำลง ทำให้น้ำจากภายนอกสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ได้ ตัวถูกละลายนี้เรียกว่าสารออสโมไลต์ (osmolyte) ซึ่งเป็นตัวถูกละลายอินทรีย์ ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำ และเมื่อสะสมในปริมาณมาก ไม่เป็นพิษต่อส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ (compatible solute) ได้แก่ โพรลีน ซูโครส โพลีออล ทรีฮาโลส และสารประกอบควอเทอนารี แอมโมเนียม (quaternary ammonium compounds; QACs) เช่น ไกลซีน บีเทน, อะลานีน บีเทน, โพรลีน บีเทน, โคไลน์ และไฮดรอกซีโพรลีน บีเทน นอกจากนี้พืชยังสะสมน้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่น ซอร์บิทอล และแมนนิทอล (Rhodes and Hanson, 1993; Hare *et al.*, 1998; Serraj and Sinclair, 2002; Taiz and Zeiger, 2002; Brian and Pharm, 2003) หรือสะสมตัวถูกละลายอนินทรีย์ ได้แก่ ไอออนต่างๆ โดยเฉพาะ K^+ ที่มีการสะสมในแวคิวโอ เพื่อปรับค่า osmotic potential ในแวคิวโอ การสร้างสมดุล (osmotic equilibrium) ระหว่างแวคิวโอและไซโทซอล (Borowitzka, 1981; Taiz and Zeiger, 2002) โดยป้องกันการรั่วของไอออนจากแวคิวโอ รักษาความดันเต่ง (turgor pressure) ของเซลล์ ส่งผลให้ปากใบเปิด คาร์บอนไดออกไซด์จากภายนอกจึงสามารถแพร่เข้าสู่ภายในได้ กระบวนการสังเคราะห์แสงสามารถเกิดขึ้นได้เมื่ออยู่ในภาวะเครียด และทำให้งิจกรรมต่างๆ ทางสรีรวิทยาภายในเซลล์ดำเนินต่อไปได้ (Jones *et al.*, 1981; Hare *et al.*, 1998; Hopkins, 2004; Dacosta and Huang, 2006; Fábio and José, 2006)

นอกจากนี้สารออสโมไลต์ยังสามารถป้องกันการเสื่อมสภาพของโปรตีน รักษาความสามารถในการเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ รักษาโครงสร้างของเซลล์ที่อาจเกิดความเสียหายจากการขาดน้ำ และสามารถป้องกันการเกิด oxidative damage โดยไปกำจัดอนุมูลอิสระ (Hare *et al.*, 1998; Vendruscolo *et al.*, 2007) ซึ่งออสโมไลต์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวอาจเรียกว่า osmoprotectant

การวัดค่า osmotic potential ของสารละลายภายในเซลล์ อาจทำได้โดยการวัดค่าออสโมแลลลิตี (osmolality) ซึ่งเป็นการวัดค่าความเข้มข้นของสารอินทรีย์ และอนินทรีย์ทั้งหมดที่

ละลายอยู่ในแคววโอล (cell sap) มีหน่วยเป็น mmolkg^{-1} หรือ mOsmolkg^{-1} (Taiz and Zeiger, 2002; Brian and Pharm, 2003) เช่นการทดลองของ Pagter *et al.* (2005) ที่พบว่าค่าออสโมแลลลิตีของ *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex. Steud. มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับความเครียดจากการขาดน้ำ และมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อขาดน้ำจนถึงขั้นวิกฤต (ได้รับน้ำ 5 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม) ค่าออสโมแลลลิตีที่เพิ่มขึ้นทำให้ค่า osmotic potential ของใบ *P. australis* ต่ำลง

ความสามารถในการสะสมสารอินทรีย์และอนินทรีย์ เพื่อปรับค่า osmotic potential ภายในเซลล์ จึงปัจจัยที่สำคัญอีกหนึ่งปัจจัยที่ทำให้พืชสามารถทนแล้งได้ (Kaiser, 1982; Handa *et al.*, 1983) ดังนั้นความแตกต่างของระดับ หรือปริมาณของสารออสโมไลต์สามารถใช้เป็นสิ่งที่วัดความทนแล้งในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ (Hare *et al.*, 1998) สารออสโมไลต์ที่สำคัญได้แก่

3.1 โพรลีน

การสะสมโพรลีนเพิ่มขึ้นเป็นการบ่งบอกว่าพืชอยู่ภาวะในขาดน้ำ (Monreal *et al.*, 2007) ซึ่งสิ่งมีชีวิตหลายชนิดมีการปรับตัวให้อยู่ในสภาพแห้งแล้งโดยการสะสมโพรลีน รวมทั้งแบคทีเรีย แอลจี และพืชชั้นสูง จึงอาจสันนิษฐานว่า เป็นการตอบสนองที่พบตั้งแต่โบราณ (Aspinall and Paleg, 1981; Monreal *et al.*, 2007)

การสะสมโพรลีนในสภาพที่ขาดน้ำจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง และเมื่อพืชได้รับน้ำ พืชจะค่อยๆฟื้นตัวกลับมา ปริมาณโพรลีนที่เพิ่มขึ้นเมื่อพืชอยู่ในสภาพขาดน้ำจะปรับลดลงจนใกล้เคียงกับพืชที่อยู่ในสภาพปกติ (Cechin *et al.*, 2006) โดยบทบาทสำคัญของโพรลีนคือ การปรับค่า osmotic potential ของเซลล์ในภาวะขาดน้ำ เช่นใน *Sesamum indicum* L. ที่พบว่า เมื่อระดับความเครียดจากการขาดน้ำเพิ่มขึ้น ทำให้ค่า water potential, osmotic potential และ ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ของใบลดลง ในขณะที่ปริมาณของโพรลีนเพิ่มขึ้น (Fazeli *et al.*, 2006) นอกจากนี้โพรลีนยังทำหน้าที่เป็นสารต้านและกำจัดอนุมูลอิสระ ปกป้องกันสารโมเลกุลใหญ่ และโปรตีนไม่ให้เสียสภาพ เป็นแหล่งสำรองคาร์บอน และไนโตรเจนเพื่อช่วยให้พืชฟื้นตัวหลังจากที่ได้รับความเครียด (Vendruscolo *et al.*, 2007) เช่นการทดลองของ Parvanova *et al.* (2004) พบว่าต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนให้มีการแสดงออกของปริมาณโพรลีนมากขึ้น มีระดับของอนุมูลอิสระลดลง โดยวัดจากปริมาณ MDA (malondialdehyde) และยังพบว่ามียีนความเสถียรของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane

stability index) สูงกว่าต้นยาสูบปกติ บทบาทต่างๆ ดังกล่าวของโปรลีนทำให้การสะสมโปรลีนเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้พืชหลายชนิดทนแล้งเช่น ข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L. cv. W7) (Lei *et al.*, 2007) อ้อย (*Saccharum officinarum*) (Huang *et al.*, 2007), Moroccan wheat (El-kaoua, 2006) และข้าว (*Oryza sativa* L.) (Pandey *et al.*, 2004)

การสังเคราะห์โปรลีนในพืชมี L-glutamic acid เป็นสารตั้งต้นหลัก และมี pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) และ pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์โปรลีน (Delauney and Verma, 1993) ดังรายงานการศึกษาในยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนให้มีการแสดงออกของยีน P5CS มากกว่าปกติ มีปริมาณโปรลีนเพิ่มขึ้นมากกว่าต้นปกติ และสามารถทนแล้งและทนเค็มได้มากขึ้น (Kavi Kishor *et al.*, 1995) นอกจากนั้นในพิทูเนีย (*Petunia hybrid* cv. 'Mitchell') มีการสะสมโปรลีน และพบว่าในสภาวะปกติ พิตูเนียที่มีการถ่ายยีน Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase genes (*AtP5CS* จาก *Arabidopsis thaliana* L. หรือ *OsP5CS* จาก *Oryza sativa* L.) มีปริมาณโปรลีนเพิ่มขึ้นคิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ของกรดอะมิโนทั้งหมด หรือ 1.5-2.6 เท่าของต้นปกติ (Yamada *et al.*, 2005)

การสะสมโปรลีนเกิดขึ้นในทุกส่วนของพืชในช่วงที่มีการขาดน้ำ เช่นการทดลองของ Monreal *et al.* (2007) พบว่า เมื่อรากของ sugar beet (*Beta vulgaris* L.) อยู่ในภาวะขาดน้ำจะมีการสะสมโปรลีนมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับข้าวสาลี (*Triticum vulgare* Vill.) ที่มีการเคลื่อนย้ายและสะสมโปรลีนที่รากเพิ่มขึ้น เมื่ออยู่ในภาวะเครียดจากการขาดน้ำ (Nayyar and Walia, 2003) และ Cechin *et al.* (2006) ยังพบว่าปริมาณโปรลีนที่สะสมในใบของทานตะวัน (*Helianthus annuus* L. cv. Catissol-01) ขึ้นอยู่กับอายุด้วย ใบที่อายุน้อยกว่า มีปริมาณโปรลีนสูงกว่าใบที่มีอายุมากกว่า การสะสมโปรลีนของพืชหลายชนิดมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการทนแล้ง กล่าวคือพืชที่ทนแล้ง (stress-tolerance) มีปริมาณโปรลีนมากกว่าพืชที่ไม่ทนแล้ง (stress-sensitive) (Manivannan *et al.*, 2007) เช่นในข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) เมื่อชักนำให้อยู่ในภาวะขาดน้ำโดยใช้ PEG-6000 เป็นสารที่กำหนด osmotic potential ให้มีค่า -1.0 MPa ข้าวสาลีพันธุ์ C306 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ทนแล้ง มีการสะสมโปรลีนสูงกว่าพันธุ์ HD 2329 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไม่ทนแล้ง (Nayyar, 2004) ดังนั้นการสะสมโปรลีนจึงอาจใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกพืชสายพันธุ์ที่ทนแล้งได้ (Manivannan *et al.*, 2007)

3.2 Total soluble sugar

ระหว่างที่เกิดภาวะเครียดจากการขาดน้ำ อัตราการสังเคราะห์แสงลดลง เนื่องจากการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ลดลง ในขณะที่ photorespiration และ dark respiration เพิ่มขึ้น นอกจากนั้นในบางพืชมีการสลายแป้งที่ถูกเก็บอยู่ที่คลอโรพลาสต์ ทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เป็นอนุพันธ์ของแป้งเพิ่มสูงขึ้น (Nilsen and Orcutt, 1996) เช่นการศึกษาการตอบสนองต่อการขาดน้ำของ *Coleus blumei* พบว่าปริมาณแป้งลดลง และมีปริมาณน้ำตาลซูโครส และเฮกโซส เพิ่มขึ้นจากการสลายแป้ง (Pattangul and Madore, 1999) นอกจากนั้น ยอดและรากของข้าว (*Oryza sativa* L.) มีปริมาณ total free sugar เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณแป้งลดลง เมื่ออยู่ในภาวะเครียดจากการขาดน้ำ (Pandey *et al.*, 2004) และใบของ *Sesuvium portulacastrum* ที่ได้รับความเครียดจากการขาดน้ำ มี soluble sugar สูงกว่าชุดควบคุม 60 เปอร์เซ็นต์ (Slama *et al.*, 2007) นอกจากนั้นการสะสมน้ำตาลเป็นสิ่งที่ยืนยันการตอบสนองต่อสภาวะเครียดจากการขาดน้ำ โดยน้ำตาลเป็นสารที่มีส่วนในกระบวนการสังเคราะห์สารต่างๆ ในสิ่งมีชีวิต เป็นสารที่ให้พลังงาน และการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลยังอาจเป็นสัญญาณในการควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและเติบโตของพืช รวมทั้งปฏิกิริยาทางชีวเคมีและพันธุศาสตร์ต่างๆ (Mostajeran and Rahimi-Eichi, 2009; Rosa *et al.*, 2009) และน้ำตาลยังทำหน้าที่เป็น osmoprotectant โดยปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นไม่เพียงแต่ไปทำหน้าที่ปรับค่า water potential ภายในเซลล์ หมู่ hydroxyl group ของ sugar alcohol ยังทำหน้าที่แทน OH ของน้ำ เพื่อช่วยรักษาโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ (Mahajan and Tuteja, 2005)

ในพืชบางชนิดปริมาณน้ำตาลที่สะสมมีความสัมพันธ์กับระดับการทนแล้ง เช่น การทดลองของ Zhu *et al.* (2005) พบว่าในใบของ spring wheat (*Triticum aestivum* L.) พันธุ์ Dingxi 24 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่สามารถทนแล้งได้มากกว่าพันธุ์ Longchun 8139 มีการสะสม soluble sugar ในใบสูงกว่า Longchun 8139 ทุกช่วงการเติบโต และเมื่อนำ *Vicia faba* พันธุ์ Giza 40 และ Giza 667 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ทนแล้ง และไม่ทนแล้ง ตามลำดับ มาชักนำให้อยู่ในสภาวะขาดน้ำด้วยสารละลาย PEG พบว่าทั้ง 2 พันธุ์มีการสะสม soluble sugar สูงขึ้น โดยพันธุ์ Giza 40 มีการสะสม soluble sugar สูงกว่า Giza 667 (El-tayeb, 2006) นอกจากนั้นปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กับระดับของการสูญเสียน้ำ หรือความแห้งแล้ง เช่นในการทดลองของ Fazeli *et al.* (2006) ที่ศึกษาปริมาณน้ำตาลของใบ *Sesamum indicum* L. ในภาวะที่ความชื้นของดิน 100, 75, 50

และ 25 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการทดลองในพันธุ์ Yekta และ Darab 14 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ทนแล้ง และไม่ทนแล้ง ตามลำดับ พบว่าเมื่อความชื้นของดินลดลง ทั้ง 2 พันธุ์มีการสะสม soluble sugar เพิ่มขึ้น โดย Yekta มีความสามารถในการสะสม reducing sugar ได้ดีกว่า คือมีการสะสม reducing sugar เพิ่มขึ้นทุกระดับของภาวะแล้ง ในขณะที่ Darab 14 มีปริมาณ reducing sugar เพิ่มขึ้นเมื่อความชื้นของดินเป็น 25 และ 50 เปอร์เซ็นต์

3.3 โปแทสเซียมไอออน

โปแทสเซียมไอออนมีความสำคัญต่อการรักษาแรงดันเต่งของพืช ทำให้พืชสามารถดูดซึมน้ำเข้ามาภายในเซลล์ได้อย่างต่อเนื่อง เช่นการทดลองของ Patakas *et al.*, (2002) ที่ศึกษาการสะสมไอออนต่างๆใน *Vitis vinifera* L, cv. Savatiano พบว่าเมื่อ *V. vinifera* ได้รับความเครียดจากการขาดน้ำ ปริมาณโปแทสเซียมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และเพิ่มสูงกว่าไอออนอื่นๆ (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} และ NO_3^-) ซึ่งปริมาณโปแทสเซียมที่เพิ่มขึ้น มีส่วนในการปรับค่า osmotic potential ของเซลล์ลดต่ำลง นอกจากนั้นโปแทสเซียมไอออนยังเกี่ยวข้องโดยตรงกับการควบคุมการเปิด-ปิดของปากใบ เมื่อโปแทสเซียมไอออนเคลื่อนย้ายเข้าสู่แวคิวโอของเซลล์คุม ค่า osmotic potential ก็จะลดต่ำลง ทำให้น้ำจากเซลล์ข้างเคียงเข้าสู่เซลล์คุมโดยการออสโมซิสทำให้เซลล์เต่ง ส่งผลให้ปากใบเปิด (Gnanasiri *et al.*, 1995; Rascio *et al.*, 2001; Patakas *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2010;) เช่นการทดลองของ Premachandra *et al.* (1993) ที่ศึกษาค่าการนำไหลปากใบ, water stress และ osmotic potential ของข้าวโพด (*Zea mays* L.) ที่ได้รับปุ๋ยโปแทสเซียม 2 ระดับ ร่วมกับการงดน้ำเป็นเวลา 21 วันพบว่า ข้าวโพดที่งดน้ำมีค่า water potential และ osmotic potential ของเซลล์น้อยกว่าพืชที่ได้รับน้ำปกติ และข้าวโพดที่ได้รับโปแทสเซียมระดับสูงกว่ามีค่า water potential และ osmotic potential น้อยกว่าพืชที่ได้รับโปแทสเซียมระดับต่ำ ค่าแรงดันเต่งจะเพิ่มสูงขึ้นจากการที่พืชได้รับปุ๋ยที่มีโปแทสเซียมสูง เมื่อค่าแรงดันเต่งสูงขึ้นจะส่งผลให้ค่าการนำไหลปากใบของพืชที่ได้รับโปแทสเซียมสูงนั้นเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นระดับปุ๋ยโปแทสเซียมที่สูงกว่าอาจจะเป็นผลดีต่อข้าวโพด คือทำให้สามารถทนต่อความเครียดจากการขาดน้ำได้ดีกว่า

4. การยืดหยุ่นของผนังเซลล์ (cell wall elasticity)

ผนังเซลล์เป็นสิ่งที่กำหนดขอบเขต โดยส่วนที่อยู่ภายนอกเยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรตเป็นจำนวนมาก มีส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญ คือ เซลลูโลส (Cellulose) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) เพคติน (Pectin) ลิกนิน (Lignins) และโปรตีน ผนังเซลล์จึงมีหน้าที่ค้ำจุนโครงสร้าง เพิ่มความแข็งแรงให้กับเซลล์ กำหนดปริมาณของเซลล์พืช และป้องกันอันตรายจากการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์และสารเคมี ตลอดจนสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆ เช่น ความเครียดจากการขาดน้ำ โดย Clifford *et al.* (1998) รายงานว่าเมื่อพืชอยู่ในสภาพขาดน้ำ ผนังเซลล์มีส่วนสำคัญต่อการปรับค่า osmotic potential ของเซลล์ (Luan, 2002; Taiz and Zeiger, 2002; Moore *et al.*, 2008) เนื่องจากผนังเซลล์ของเนื้อเยื่อพืชที่กำลังเจริญเติบโตส่วนใหญ่ประกอบด้วย เซลลูโลส และแมทริกซ์ โพลีแซคคาไรด์ (matrix polysaccharides) โดยส่วนประกอบเหล่านี้มีผลต่อโครงสร้างของผนังเซลล์ในการรักษาแรงดันเต่งของเซลล์ อาจจะได้ทั้งแบบยืดหยุ่น (elasticity) และไม่ยืดหยุ่น (plasticity) (Schultz and Matthews, 1993) เช่นการเจริญของต้นกล้าถั่วเหลืองในที่มืด ทำให้ไฮโปทอทิลยืดยาว ผนังเซลล์เปลี่ยนแปลงแบบไม่สามารถฟื้นกลับได้ (plasticity) เมื่อนำไปเลี้ยงในสภาพขาดน้ำการเติบโตลดลง นั้นแสดงให้เห็นว่าความเครียดจากการขาดน้ำส่งผลต่อการยืดยาวของเซลล์ (Nonami and Boyer, 1989) โดยอาจจะไปลดการเพิ่มปริมาณเซลลูโลส ซึ่งเกี่ยวข้องกับการยืดยาวของเซลล์ และความแข็งแรงผนังเซลล์ (Wakabayashi *et al.*, 1997)

เมื่อพืชอยู่ในภาวะเครียดจากการขาดน้ำ หรือสารละลายภายนอกมีค่า water potential ต่ำกว่าภายในเซลล์ พืชจะสูญเสียน้ำที่อยู่ภายในเซลล์ซึ่งเป็นน้ำส่วนใหญ่ของเซลล์ ทำให้พืชสูญเสียแรงดันเต่ง แต่การรักษาแรงดันเต่งของเซลล์เป็นสิ่งที่จำเป็นในการรักษากิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ และการเจริญให้ยังคงเป็นปกติภายใต้สภาวะแห้งแล้ง นอกจากการสะสมสารออสโมไลต์เพื่อปรับค่า osmotic potential ภายในเซลล์ให้ต่ำกว่าสารละลายภายนอก เพื่อให้ภายนอกสามารถเข้าสู่เซลล์ได้แล้วนั้น พืชอาจลดปริมาณของเซลล์ โดยการเปลี่ยนแปลงของ cell wall elasticity และการหดตัวของผนังเซลล์ เพื่อรักษาแรงดันเต่งของเซลล์ ทำให้สารละลายภายในเซลล์เข้มข้นขึ้น (Beck *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2007) เช่นเมื่อชักนำให้ black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) ขาดน้ำ ความยืดหยุ่นของเนื้อเยื่อ (tissue elasticity) เพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลต่อความสัมพันธ์ระหว่างแรงดันเต่งและปริมาณของเซลล์คือ แรงดันเต่งของเซลล์เพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณของเซลล์

ลดลง ซึ่งมีส่วนสนับสนุนให้พืชทนแล้ง (Blake *et al.*, 1991) โดย cell wall elasticity (CWE) เป็นหนึ่งในลักษณะทางสรีรวิทยาที่สำคัญของพืชในการปรับตัวต่อความเครียดจากการขาดน้ำ (Ackerson and Hebert, 1981; Radin, 1983; Martínez *et al.*, 2007) ซึ่งสามารถวัดการเปลี่ยนแปลงของ cell wall elasticity ได้จากค่า elastic modulus (E) โดยระหว่างที่เกิดความเครียดจากการขาดน้ำพบว่าค่า elastic modulus มีทั้งเพิ่มขึ้นและลดลง สำหรับพืชส่วนใหญ่เมื่อค่า elastic modulus สูงขึ้นหมายถึงผนังเซลล์มีความยืดหยุ่นลดลง (more rigid) ทำให้ใบเสียน้ำมากขึ้น (Clifford *et al.*, 1998) และแรงดันเต่งของเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการปรับตัวต่อภาวะขาดน้ำถ้ามีค่า elastic modulus สูงขึ้นจะเกิดควบคู่กับการปิดปากใบ เพื่อลดการคายน้ำและใช้น้ำอย่างมีประสิทธิภาพในภาวะที่มีน้ำอย่างจำกัด ในขณะที่พืชที่มีค่า elastic modulus ลดลง (less rigid) เมื่ออยู่ในสภาวะขาดน้ำสามารถรักษาแรงดันเต่งของเซลล์ไว้ได้ เนื่องจาก cell wall elasticity ของเซลล์เพิ่มขึ้น (Kozłowski *et al.*, 1990) เช่นการทดลองของ Martínez *et al.* (2007) ที่ศึกษาผลของความเครียดจากการขาดน้ำต่อ cell wall elasticity และปริมาตรของเซลล์ของ *Phaseolus vulgaris* L. โดยพบว่าพันธุ์ Orfeo มีค่า elastic modulus ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (35 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งทำให้ทราบว่าพันธุ์ cell wall elasticity สูง และมีปริมาตรของเซลล์ลดลงมากที่สุดถึง 44 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่งผลให้สามารถรักษาแรงดันเต่งของเซลล์ไว้ได้มากกว่าพันธุ์อื่นๆ (Arroz Tuscola, Barbucho, Coscorron, Pinto and T'ortola) นอกจากนั้น Orfeo ยังเป็นพันธุ์ที่มีความทนแล้งมากที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงค่า elastic modulus และปริมาตรของเซลล์มีความสัมพันธ์กับระดับการทนแล้ง

หลักเกณฑ์ที่ใช้ในการพิจารณาคัดเลือกพันธุ์ที่ทนแล้งอาจจะต้องอาศัยการตอบสนองหรือการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาหลายประการเช่น การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ ปริมาณน้ำสัมพันธ์ และการปรับค่า osmotic potential ซึ่งลักษณะทางสรีรวิทยาเหล่านี้ สามารถนำไปใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับระดับการทนแล้งของพันธุ์ในธรรมชาติได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พืชที่ใช้ทดลอง ได้แก่ หนุ่ยราชูซึ่งได้จากการผสมเปิดในโครงการความร่วมมือระหว่าง กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ และ JICA (Japan International Cooperative Agency) จำนวน 113 โคลน

2. อุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.1 อุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

- เครื่องชั่งไฟฟ้าที่อ่านค่าได้ถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytic balance)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ
- เครื่องแก้วชนิดต่างๆ เช่น บี กเกอร์ แท่งแก้ว ขวดปรับปริมาตร และขวดบรรจุอาหารพร้อมฝา ขนาด 8 ออนซ์ หลอดทดลอง 25×200 มิลลิเมตร เป็นต้น
- อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการย้ายเนื้อเยื่อ อพพืช ได้แก่ ตู้อบเชื้อ มีดผ่าตัดเบอร์ 10 ปากคีบ ตะเกียงแอลกอฮอล์ และจานแก้ว

2.2 สารเคมีที่ใช้เตรียมอาหาร

- สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962)
- สารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ N6-benzyladenine (BA) และกลุ่มออกซิน ได้แก่ indole-3-butyric acid (IBA)

- สารที่ใช้ปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหาร ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล
- สารเคมีที่ใช้ทำความสะอาดชิ้นส่วนพืช และการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ สารละลายคลอโรกซ์ (Clorox®) (โซเดียมไฮโปคลอไรต์ 5.25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) สารลดแรงตึงผิว (tween-20)

3. อุปกรณ์ และสารเคมีสำหรับการวัดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการ

3.1 อุปกรณ์สำหรับการวัดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการ

- เครื่องวัด electrolyte leakage conductivity รุ่น Con 510 (Bench meter)
- เครื่อง Vapor Pressure Osmometer รุ่น 5500 ของ Wescor
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ใช้วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน และ total soluble sugar โดยการวัดปริมาณโปรตีนอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ส่วนปริมาณ total soluble sugar อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- เครื่องเหวี่ยง (centrifuge)
- โกร่งบดตัวอย่างพืช
- หลอดฉีดขนาด 1 มิลลิลิตร

3.2 สารเคมีสำหรับการวัดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการ

3.2.1 สารเคมีสำหรับการวัดการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์

- deionized water
- polyethylene glycol (PEG – 6000) (Ajax Finechem®)

3.2.2 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโพรลีน ได้แก่ proline, sulfosalicylic acid, ninhydrin, glacial acetic acid, toluene, orthophosphoric acid และน้ำกลั่น

3.2.3 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณ total soluble sugar ได้แก่ anthrone reagent, สารละลายกลูโคสมาตรฐาน และน้ำกลั่น

4. อุปกรณ์บันทึกข้อมูล และกล้องถ่ายภาพ

วิธีการ

การคัดเลือกหน่อรัฐ 20 โคลน จากจำนวนหน่อรัฐทั้งหมด 113 โคลนในสภาพแปลง ทำการคัดเลือกจากการประเมินด้วยสายตา หลังจากงดให้น้ำ 7 วัน โดยอาศัยการพิจารณาจากลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไป เช่นการม้วนใบ มุมระหว่างแผ่นใบกับกาบใบ และการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของลำต้น โดยแบ่งเป็นพันธุ์ที่ทนแล้งได้มาก ปานกลาง และต่ำ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 1 วิธีการที่เหมาะสมสำหรับการวัดการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหน่อรัฐ

การหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการวัดการนำไฟฟ้า (electrical conductivity ; EC) ของสารละลายที่แช่ชิ้นส่วนใบเพื่อการประเมินการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบพืช (electrolyte leakage ; EL) แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนคือ washing, dehydration และ rehydration แต่เนื่องจากยังไม่มีรายงานหรือการศึกษาในหน่อรัฐมาก่อน จึงต้องทำการทดลอง 1.1 และ 1.2 กับโคลนที่ทนแล้งได้ดีและโคลนที่ทนแล้งต่ำ เพื่อหาระยะเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด ในการบอกความแตกต่างของการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหน่อรัฐที่มีระดับการทนแล้งแตกต่างกัน โดยนำใบบนสุดที่แผ่นใบแผ่เต็มที่ นำมาตัดให้มีขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร (Bajji *et al.*, 2002) โดยไม่มีเส้นกลางใบ ทำ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 10 ชิ้นส่วน

1.1. การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับกำจัดสารต่างๆ ที่ผิวใบและเซลล์ที่ตายขณะตัด

ตัดใบหญ้าวัชชีขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร โดยไม่มีเส้นกลางใบ จำนวน 10 ชิ้นชั่งน้ำหนักทันที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำไร้ไอออน (deionized water) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่า (100 rpm) ที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดค่า Electrical leakage (EL) อย่างต่อเนื่องในตัวอย่างเดิมทุกๆ 15 นาที เป็นเวลา 90 นาที (0, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที) เพื่อหาความแตกต่างของค่า EC ทุกๆ 15 นาที ดังสมการ

$$\text{Electrical leakage (EL)} = (EC_n - EC_{n-15}) / \text{น้ำหนักสด}$$

โดย EC_n และ EC_{n-15} คือค่า EC ที่ระยะเวลาที่ผ่านไปทุกๆ 15 นาที

1.2 การหาระยะเวลา และความเข้มข้นของ PEG ที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้ใบอยู่ในภาวะขาดน้ำ และระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อให้ใบดูดน้ำกลับ

1.2.1 การหาความเข้มข้นของ PEG ที่เหมาะสมในการชักนำให้ใบอยู่ในภาวะขาดน้ำ และระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อให้ใบดูดน้ำกลับ

นำชิ้นส่วนใบที่ตัดให้มีขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร โดยไม่มีเส้นกลางใบ จำนวน 10 ชิ้นล้างในน้ำไร้ไอออนปริมาตร 20 มิลลิลิตร 15 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ใน PEG ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในที่มืด หลังจากนั้นนำไปผ่านการแช่ PEG มาล้างด้วยน้ำไร้ไอออน 3 ครั้ง แล้วนำชิ้นส่วนใบแช่ในน้ำไร้ไอออนปริมาตร 6 มิลลิลิตร เป็นเวลา 0, 1, 2, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปต้มน้ำเดือดประมาณ 15 นาที เพื่อให้เชื้อหุ้มเซลล์เสื่อมสภาพแล้ววัด EC ที่อุณหภูมิห้อง คำนวณหาปริมาณการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ดังสมการ

$$\% \text{ Electrolyte leakage (EL)} = ((EC_i - EC_0) / (EC_i - EC_0)) \times 100$$

โดย EC_i คือค่า EC ที่เวลา 0 นาที EC_f คือค่า EC ที่ระยะเวลาผ่านไป f นาที และ EC_c คือค่า EC ของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เสื่อมสภาพแล้ว จำนวนเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า electrolyte leakage ด้วยวิธี least significant difference test (LSD-test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

1.2.2 การหาเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้พืชอยู่ในสภาพขาดน้ำด้วย PEG

นำชิ้นส่วนใบห่อหุ้มที่ตัดให้มีขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร โดยไม่มีเส้นกลางใบ จำนวน 10 ชิ้นลงในน้ำไร้ไอออนปริมาตร 20 มิลลิลิตร 15 นาที จากนั้นนำชิ้นส่วนใบมาแช่ใน PEG ที่ความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลอง 1.2.1 นาน 0.5, 1, 2, 4, 10, 16 และ 24 ชั่วโมง ในที่มืด ล้างด้วยน้ำไร้ไอออน 3 ครั้ง จากนั้นแช่ชิ้นส่วนในน้ำไร้ไอออนปริมาตร 6 มิลลิลิตร วัดค่า EC ทันที หลังจากนั้นวัด EC_f ที่เวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำชิ้นส่วนใบไปต้มในน้ำเดือดประมาณ 15 นาที เพื่อให้เยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมสภาพ วัด EC_c ที่อุณหภูมิห้อง และคำนวณหาปริมาณการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ดังสมการ

$$\% \text{ Electrolyte leakage (EL)} = ((EC_f - EC_i) / (EC_c - EC_i)) \times 100$$

โดย EC_i คือค่า EC ที่เวลา 0 นาที EC_f คือค่า EC ที่ระยะเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง และ EC_c คือค่า EC ของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เสื่อมสภาพแล้ว จำนวนเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า electrolyte leakage ด้วยวิธี least significant difference test (LSD-test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การทดลองที่ 2 การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบห่อหุ้ม

การวัดการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบห่อหุ้ม 20 โคลน ที่ให้น้ำปกติ โดยนำชิ้นส่วนใบห่อหุ้มที่ตัดให้มีขนาดขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร โดยไม่มีเส้นกลางใบ จำนวน 10 ชิ้น ล้างในน้ำไร้ไอออนปริมาตร 20 มิลลิลิตรเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนใบมาแช่ในสารละลาย PEG-6000 ที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำใบมาล้างด้วยน้ำไร้ไอออนอย่างรวดเร็ว 3 ครั้ง แล้วจึงไปแช่ในน้ำไร้ไอออน ปริมาตร 6 มิลลิลิตรในที่มืด จากนั้นนำใบมาวัดค่า electrical conductivity ทันที (EC_i) หลังจากนั้นวัด EC ที่

เวลา 2 ชั่วโมง (EC_p) และหลังจากทำให้เมมเบรนเสื่อมสภาพโดยการนำไปต้มในน้ำเดือดประมาณ 15 นาที เพื่อให้เยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมสภาพ แล้ววัด EC ที่อุณหภูมิห้อง (EC_r) โดยทำ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 10 ซีนส่วน คำนวณหาปริมาณการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์จากสมการ

$$\% \text{Electrolyte leakage (EL)} = ((EC_r - EC_p) / (EC_r - EC_p)) \times 100$$

การทดลองที่ 3 ผลของการขาดน้ำต่อปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบของหญ้ารูซี่

ทำการทดลองระหว่างเดือน ธันวาคม ถึง กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2551 โดยปลูกหญ้ารูซี่ 20 โคลน ในดินสำเร็จรูป (ดินสีดา) ในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 นิ้ว บริเวณเรือนเพาะชำ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน โดยปลูก 1 โคลนต่อ 1 กระถาง แต่ละกระถางมี 4 กอ กอละ 5 ต้น ให้น้ำทุกวันในปริมาณที่เท่ากันทุกกระถางเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นงดน้ำเวลา 0 และ 7 วัน ตัดใบหญ้ารูซี่ทั้ง 20 โคลน ให้แต่ละซีนส่วนมีความกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วชั่งน้ำหนักสดทันที จากนั้นนำซีนส่วนใบไปลอยในภาชนะที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 15 มิลลิลิตร ซึ่งมีฝาปิด แล้วเก็บในที่มืดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นชั่งน้ำหนักซีนส่วนใบที่อืดด้วยน้ำ นำซีนส่วนใบไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักแห้ง โดยแต่ละโคลนทำ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 10 ซีนคำนวณหาปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (relative water content; RWC) ของหญ้ารูซี่แต่ละโคลนจากสมการ (Turner, 1981)

$$\text{ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (\%)} = (\text{น้ำหนักสด} - \text{น้ำหนักแห้ง}) \times 100 / (\text{น้ำหนักอืด} - \text{น้ำหนักแห้ง})$$

การทดลองที่ 4 การหาค่าความเข้มข้นของ PEG-6000 ที่ทำให้หญ้ารูซี่ตายเป็นร้อยละ 50 ของชุดควบคุม (LD_{50}) ในสภาพหลอดทดลอง

เพิ่มปริมาณต้นหญ้ารูซี่ในสภาพปลอดเชื้อ โดยการนำหญ้ารูซี่จากแปลงปลูกจำนวน 20 โคลน มาลอกกาบใบออก และทำความสะอาดโดยใช้ฟู่กันทำความสะอาดบริเวณตาข้างเบาๆ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดฟอง นำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอโรกซ์ 20 เปอร์เซ็นต์ ผสมสารลดแรงตึงผิว 2 หยดต่อสารละลาย 150 มิลลิลิตร นาน 10 นาที ตามด้วยสารละลายคลอโรกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ ผสมสารลดแรงตึงผิว 2 หยดต่อสารละลาย 150 มิลลิลิตร นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ

กลั่นน้ำเชื้อ 2-3 ครั้ง หรือจนหมดฟอง ตัดแยกข้อ นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร ½ MS นาน 1 สัปดาห์ เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน หลังจากนั้นนำชิ้นส่วนข้อที่ปลอดเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ นาน 4 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มปริมาณยอด หลังจากนั้นนำยอดที่ได้ไปชักนำให้เกิดราก โดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ นาน 2 สัปดาห์

นำหน่อที่ชักนำให้เกิดราก มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG-6000 ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลอง 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 3 ค่าสังเกต บันทึกจำนวนต้นที่ตายเมื่อครบ 6 สัปดาห์ เพื่อหาค่าความเข้มข้นของ PEG-6000 ที่ทำให้ต้นตายเป็นจำนวนร้อยละ 50 (LD_{50}) ของชุดควบคุม

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson product-moment correlation coefficient) ระหว่างค่า LD_{50} การรื้อของสารอเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ และปริมาณน้ำสัมพัทธ์ ของหน่อที่ 20 โคลน คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน คำนวณจากสูตร

$$r_{xy} = \frac{N \sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[N \sum X^2 - (\sum X)^2][N \sum Y^2 - (\sum Y)^2]}}$$

r_{xy} = ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน

$\sum X$ = ผลรวมของข้อมูลที่วัดได้จากตัวแปรตัวที่ 1 (X)

$\sum Y$ = ผลรวมของข้อมูลที่วัดได้จากตัวแปรตัวที่ 2 (Y)

$\sum XY$ = ผลรวมของผลคูณระหว่างข้อมูลตัวแปรที่ 1 และ 2

$\sum X^2$ = ผลรวมของกำลังสองของข้อมูลที่วัดได้จากตัวแปรตัวที่ 1

$\sum Y^2$ = ผลรวมของกำลังสองของข้อมูลที่วัดได้จากตัวแปรตัวที่ 2

N = ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

การทดลองที่ 5 การปรับค่า osmotic potential ของเซลล์ด้วยสารอินทรีย์ (osmotic adjustment)

5.1 ออสโมแลลลิตี (osmolality)

นำหนักรูชี 10 โคลน (ที่มีค่า LD_{50} สูงสุด และต่ำสุด อย่างละ 5 โคลน) จากการทดลองที่ 4 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG-6000 ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, และ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ชับน้ำให้แห้ง จากนั้นนำต้นหนักรูชีไปเก็บในสภาพอุณหภูมิ -80 ± 2 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 3 ชั่วโมง นำมาใส่หลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร กดให้สารละลายภายในเซลล์ออกมา (Marcum and Murdoch, 1992) นำสารละลายมาวัดค่าออสโมแลลลิตีด้วยเครื่อง Vapor Pressure Osmometer รุ่น 5500 ของ Wescor ทำการทดลอง 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 3 ค่าสังเกต

5.2 ปริมาณโปรตีน

นำหนักรูชี 10 โคลน (ที่มีค่า LD_{50} สูงสุดและต่ำสุด อย่างละ 5 โคลน) จากการทดลองที่ 4 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG-6000 ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, และ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ชับน้ำให้แห้ง ตัดส่วนรากออก จากนั้นชั่งต้นหนักรูชีให้มีน้ำหนักประมาณ 1 กรัม บดให้ละเอียดในสารละลายกรดซัลโฟซาลิไซลิก (sulfosalicylic acid) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง whatman#1 นำส่วนที่กรองได้ 2 มิลลิลิตร บรรจุลงในหลอดทดสอบ เติมสารละลาย ninhydrin 4 มิลลิลิตร และกรดแอซิดิกเข้มข้น (glacial acetic acid) 2 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาในอ่างน้ำแข็ง สกัดสารละลายที่ทำปฏิกิริยากับโทลูอีน (toluene) 4 มิลลิลิตร เขย่า 15-20 วินาที สารละลายจะเกิดการแยกตัวออกจากกัน ดูดสารละลายส่วนบน (ชั้นของโทลูอีน) ออกจากหลอดทดสอบที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 3 ค่าสังเกต หลังจากนั้นนำไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ค่า absorbance 520 nm โดยมี toluene เป็น blank เปรียบเทียบความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาปริมาณโปรตีนเป็น ppm จากสมการ (Bates *et al.*, 1973)

$$\text{ปริมาณโพรีน (ppm)} = \frac{C \times V_t \times V_s}{W_t \times V_a}$$

C = ความเข้มข้นของโพรีนจากกราฟมาตรฐาน (ppm)

V_t = ปริมาตรของ toluene (มิลลิลิตร)

V_s = ปริมาตรของ 3 % sulfosalicylic (มิลลิลิตร)

W_t = น้ำหนักสดของตัวอย่างพืชที่นำมาวิเคราะห์ (กรัม)

V_a = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างพืชที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)

5.3 ปริมาณ total soluble sugar

นำหยูร์ซู 10 โคลน (ที่มีค่า LD_{50} สูงสุด และต่ำสุด อย่างละ 5 โคลน) จากการทดลองที่ 4 มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG-6000 ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, และ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ชับน้ำให้แห้ง ตัดส่วนรากออก จากนั้นชั่งต้นหยูร์ซูให้มีน้ำหนักประมาณ 1 กรัม แล้วนำไปบดในโกร่งที่เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร กรองสารที่สกัดได้ด้วยกระดาษกรอง whatman#1 นำสารละลายที่กรองได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บรรจุลงในหลอดทดสอบ แล้วเติมสารละลาย anthrone reagent ปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนใน water bath เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง แล้ววัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 620 nm โดยทำการทดลอง 5 ซ้ำ แต่ละซ้ำคือ 3 ค่าสังเกต นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (Bajracharya, 1999)

$$\text{ปริมาณ total soluble sugar (ppm)} = \frac{C \times V_t \times V_s}{W_t \times V_a}$$

C = ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ppm)

V_t = ปริมาตรของสารละลายที่กรองได้และสารละลาย anthrone reagent

V_s = ปริมาตรของ น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)

W_t = น้ำหนักสดของตัวอย่างพืชที่นำมาวิเคราะห์ (กรัม)

V_a = ปริมาตรสารละลายตัวอย่างพืชที่ใช้ในการวิเคราะห์ (มิลลิลิตร)

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson product-moment correlation coefficient) ระหว่างค่า LD₅₀ ค่าออสโมแลลลิตี ปริมาณโพรลีน และปริมาณ total soluble sugar ของหนักรูซี่ 10 โคลน (ที่มีค่า LD₅₀ สูงสุด และต่ำสุด อย่างละ 5 โคลน) ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สันระหว่าง LD₅₀ การรื้อของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณน้ำสัมพัทธ์หลังจากการรดน้ำ 7 วัน ค่าออสโมแลลลิตี ปริมาณโพรลีน และปริมาณ total soluble sugar ของหนักรูซี่ทั้ง 10 โคลน (ที่มีค่า LD₅₀ สูงสุด และต่ำสุด อย่างละ 5 โคลน) เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG ที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน คำนวณจากสูตร

$$r_{xy} = \frac{N \sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{\sqrt{[N \sum X^2 - (\sum X)^2][N \sum Y^2 - (\sum Y)^2]}}$$

r_{xy} = ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน

$\sum X$ = ผลรวมของข้อมูลที่วัดได้จากตัวแปรตัวที่ 1 (X)

$\sum Y$ = ผลรวมของข้อมูลที่วัดได้จากตัวแปรตัวที่ 2 (Y)

$\sum XY$ = ผลรวมของผลคูณระหว่างข้อมูลตัวแปรที่ 1 และ 2

$\sum X^2$ = ผลรวมของกำลังสองของข้อมูลที่วัดได้จากตัวแปรตัวที่ 1

$\sum Y^2$ = ผลรวมของกำลังสองของข้อมูลที่วัดได้จากตัวแปรตัวที่ 2

N = ขนาดของกลุ่มตัวอย่าง

สถานที่วิจัย

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเรือนเพาะชำ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร

เรือนเพาะชำ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต
บางเขน กรุงเทพมหานคร

ระยะเวลาวิจัย

เริ่มทำการทดลองตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2551 และสิ้นสุดการทดลองเดือนสิงหาคม
พ.ศ. 2553

ผลการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบระดับการทนแล้งของหนัารูซี่ในสภาพแปลง โดยพิจารณาจากลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไป หลังจากงคให้น้ำ 7 วัน เช่นการม้วนใบ มุมระหว่างแผ่นใบกับกาบใบ และการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของลำต้น และคัดเลือกหนัารูซี่ 20 โคลน จากทั้งหมด 113 โคลนในสภาพแปลง สามารถแบ่งหนัารูซี่เป็น 3 กลุ่ม (ตารางผนวกที่ 2) คือกลุ่มที่ทนแล้งได้มาก ได้แก่ 17, 23, 37, 80, 101 และ 107 กลุ่มที่ทนแล้งปานกลาง ได้แก่ 7, 52, 55, 73, 78, 83 และ 87 และกลุ่มที่ทนแล้งต่ำ ได้แก่ 12, 16, 22, 35, 90, 95 และ 112 โดยคัดเลือกโคลน 16 และ 17 ไปใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวัดการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหนัารูซี่ในการทดลองที่ 1 และนำหนัารูซี่ทั้ง 20 โคลน ไปศึกษาในการทดลองที่ 2, 3 และ 4 เพื่อประเมินลักษณะที่จะใช้ในการคัดกรองระดับการทนแล้งของหนัารูซี่ จากนั้นในการทดลองที่ 5 คัดเลือกหนัารูซี่ 10 โคลนที่มีค่า LD_{50} สูงสุด และต่ำสุดอย่างละ 5 โคลน ไปศึกษาการปรับค่า osmotic potential ของเซลล์ด้วยสารละลายอินทรีย์ เพื่อประเมินลักษณะที่จะใช้เป็นดัชนีในการชี้วัดระดับการทนแล้งของหนัารูซี่ได้ผลดังนี้

การทดลองที่ 1 วิธีการที่เหมาะสมสำหรับการวัดการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหนัารูซี่

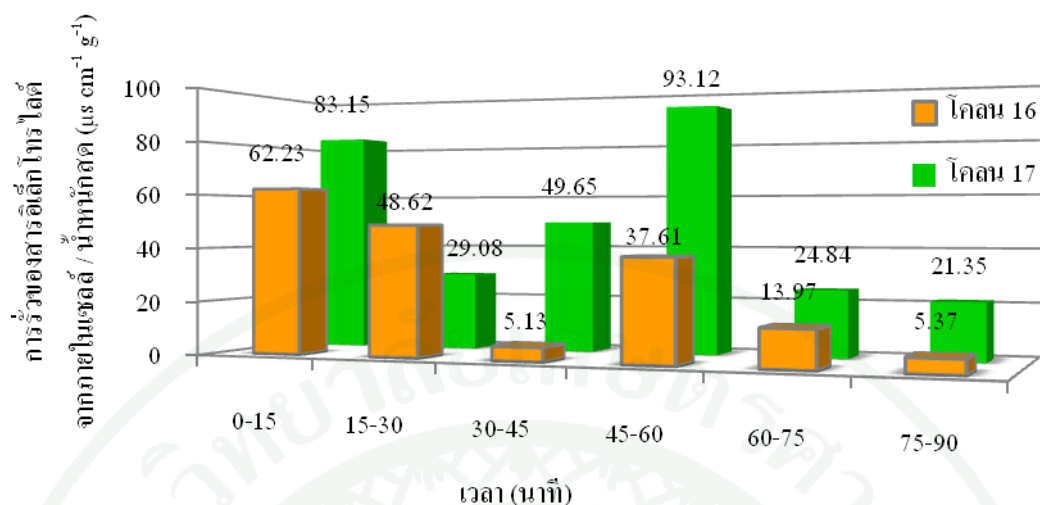
การตรวจสอบค่าการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ washing เป็นการล้างในเวลาที่เหมาะสมเพื่อกำจัดเซลล์ตาย และสารต่างๆ ที่ผิวใบ จากนั้นทำการ dehydration เพื่อชักนำให้ใบอยู่ในสภาพขาดน้ำในระยะเวลา และความเข้มข้นของสารออสโมติกัมที่เหมาะสม และขั้นตอนสุดท้ายเป็นการ rehydration เพื่อให้ใบดูดน้ำกลับในระยะเวลาที่เหมาะสม

1.1 การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับกำจัดสารต่างๆ ที่ผิวใบและเซลล์ที่ตายขณะตัด

จากการวัดค่า EL ทุกๆ 15 นาที เป็นเวลา 90 นาที พบว่าโคลน 16 และโคลน 17 มีค่า EL ที่ 15 นาทีแรกที่สูงเป็น 62.23 ไมโครซีเมนต์ต่อตารางเซนติเมตรต่อกรัม และ 83.14 ไมโครซีเมนต์ต่อตารางเซนติเมตรต่อกรัม ตามลำดับ จากนั้นที่ 30 นาทีมีค่าลดลง โดยโคลน 16 และโคลน 17 มีค่า EL 48.62 ไมโครซีเมนต์ต่อตารางเซนติเมตรต่อกรัม และ 29.08 ไมโครซีเมนต์ต่อตารางเซนติเมตรต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งโคลน 17 ค่า EL ลดลงอย่างชัดเจน ในขณะที่โคลน 16 ค่า EL ลดลงเล็กน้อย ในขณะที่ 60 นาทีโคลน 16 และโคลน 17 มีค่า EL เพิ่มขึ้นอีกครั้ง เป็น 37.06 ไมโครซีเมนต์ต่อตารางเซนติเมตรต่อกรัม และ 93.11 ไมโครซีเมนต์ต่อตารางเซนติเมตรต่อกรัม ตามลำดับ และที่ 75 และ 90 นาทีหุ้รฐฐฐฐ 2 โคลนมีค่า EL ลดลง (ภาพที่ 1)

จากผลการทดลองโคลน 16 อาจจะต้องใช้เวลาในการล้าง 30 นาที ส่วนโคลน 17 อาจใช้เวลา 15 นาที ดังนั้นจึงทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบผลของเวลาที่ใช้ในการล้าง 15 และ 30 นาทีต่อการศึกษาระยะเวลา และความเข้มข้นของ PEG ที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้ใบอยู่ในภาวะขาดน้ำ และระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อให้ใบดูดน้ำกลับ ซึ่งพบว่าการล้างใบหุ้รฐฐฐฐเป็นเวลา 15 และ 30 นาที ส่งผลให้ 2 ขั้นตอนดังกล่าวมีแนวโน้มไม่ต่างกัน (ตารางผนวกที่ 7, 8, 9, 10, ภาพผนวกที่ 1, 2, 3, 4)

ดังนั้นในการกำจัดเซลล์ตาย และสารต่างๆที่ผิวใบหุ้รฐฐฐฐจึงแช่ใบในน้ำไว้ไอออนเป็นเวลา 15 นาทีในการล้าง



ภาพที่ 1 การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากชั้นส่วนใบหน่อรูซี่ 2 โคลนทุกๆ 15 นาที เป็นเวลา 90 นาที

1.2 การหาระยะเวลาและความเข้มข้นของ PEG ที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้ใบอยู่ในภาวะขาดน้ำ และระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อให้ใบคืนน้ำกลับ

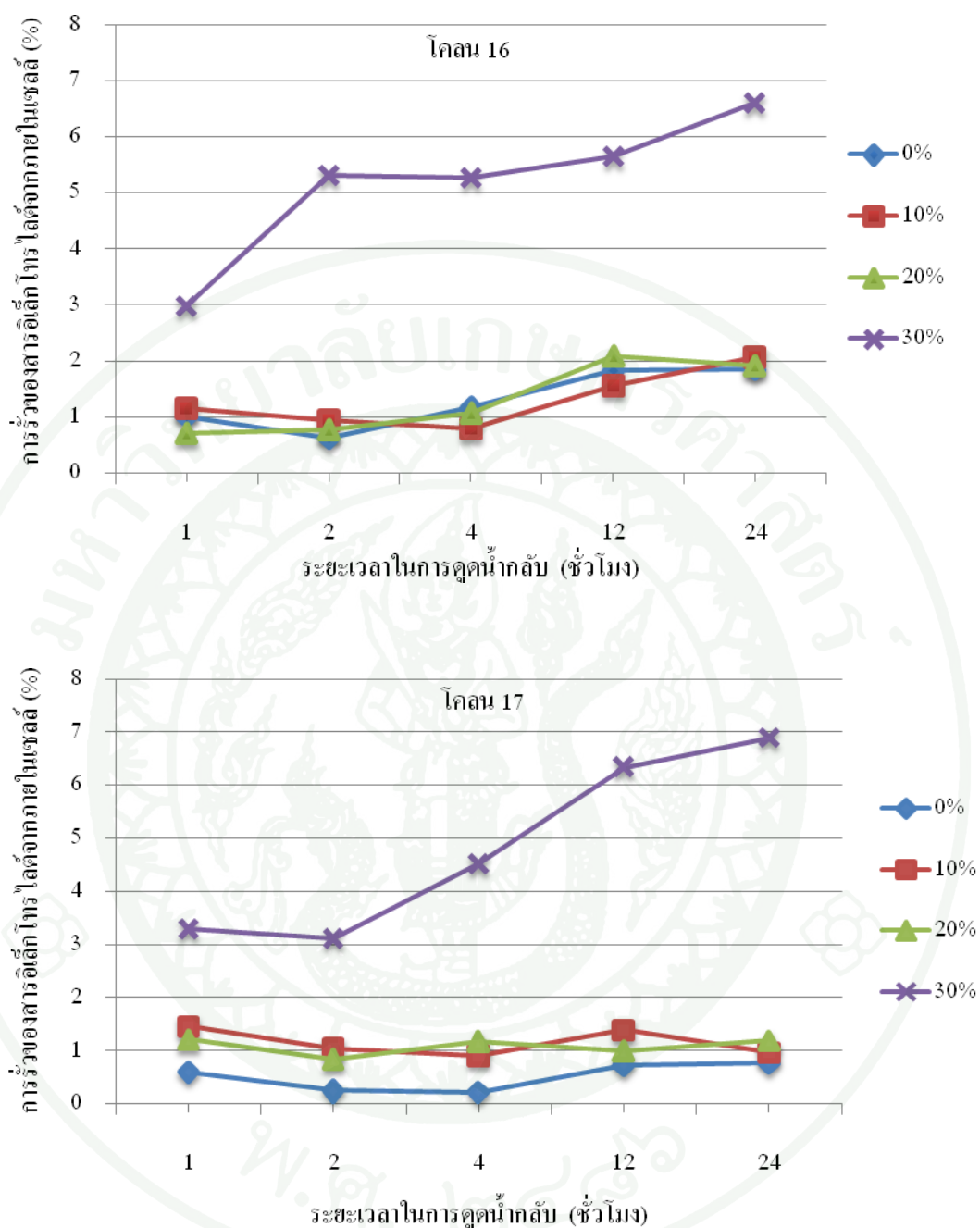
1.2.1 การหาความเข้มข้นของ PEG ที่เหมาะสมในการชักนำให้ใบอยู่ในภาวะขาดน้ำ และระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อให้ใบคืนน้ำกลับ

เมื่อชักนำให้ใบหน่อรูซี่ขาดน้ำ โดยแช่ชิ้นส่วนใบใน PEG ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าค่า EL ของใบหน่อรูซี่โคลน 16 และ 17 ที่แช่ใน PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกับที่แช่ชิ้นส่วนใบใน PEG ความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ อย่างชัดเจนทุกช่วงเวลา ในขณะที่ค่า EL ของใบหน่อรูซี่ทั้ง 2 โคลน ที่แช่ชิ้นส่วนใบใน PEG 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ มีค่าใกล้เคียงกับค่า EL เมื่อแช่ชิ้นส่วนใบใน PEG ความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2)

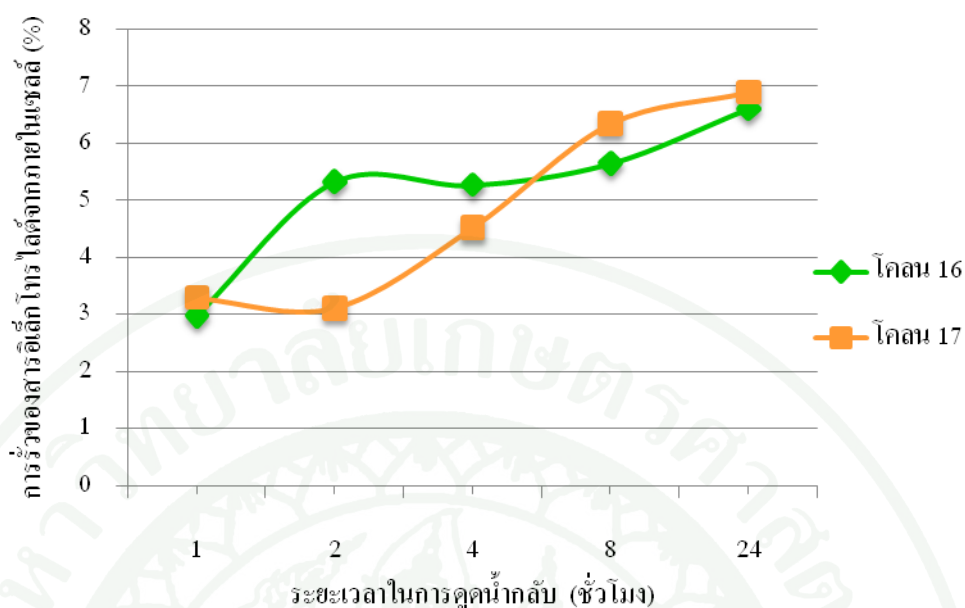
เมื่อชักนำให้ใบหน่อรูซี่ขาดน้ำด้วย PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำชิ้นส่วนใบแช่น้ำไว้ให้ออนเป็นระยะเวลา 1, 2, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ใบคืนน้ำกลับพบว่า โคลน 16 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งต่ำ มีค่า EL เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อแช่

ขึ้นส่วนใบในน้ำไว้ให้ออนเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง และค่า EL มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อแช่ขึ้นส่วนใบเป็นเวลา 4, 12 และ 24 ชั่วโมง ส่วนโคลน 17 ซึ่งเป็นโคลนที่มีความทนแล้งได้ดี ค่า EL ก่อนข้างคงที่ เมื่อแช่ขึ้นส่วนใบในน้ำไว้ให้ออนเป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง แต่เมื่อแช่ขึ้นส่วนใบเป็นเวลา 4 และ 12 ชั่วโมง ค่า EL มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมาก และเมื่อแช่ขึ้นส่วนใบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของค่า EL ลดลง เมื่อพิจารณาที่ระยะเวลาในการดูดน้ำกลับที่ 2 ชั่วโมง พบว่าเป็นระยะเวลาที่ความแตกต่างของค่า EL ระหว่างโคลน 16 และ 17 มากกว่าเวลาอื่น (ภาพที่ 3)

ดังนั้นการใช้ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์เพื่อชักนำให้ใบหญ้าฐีอยู่ในภาวะขาดน้ำ และใช้เวลา 2 ชั่วโมงเพื่อให้ใบดูดน้ำกลับ เป็นความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้ค่า EL ระหว่างโคลนทนแล้งได้ดี และทนแล้งต่ำแตกต่างกันมากที่สุด (ตารางผนวกที่ 3)



ภาพที่ 2 การร่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของไบฮูว์รูซี่โคลน 16 และ 17 ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในน้ำไว้ไออนในที่มีดเป็นเวลา 1, 2, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ไบดูดน้ำกลับหลังจากได้รับ PEG



ภาพที่ 3 การรั่วของสารอเล็กโตรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหูกวัวซึ่งเปรียบเทียบระหว่างโคลน 16 และ 17 เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่น้ำไร้ไอออนในที่มีดเป็นเวลา 1, 2, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ใบดูดน้ำกลับหลังจากได้รับ PEG

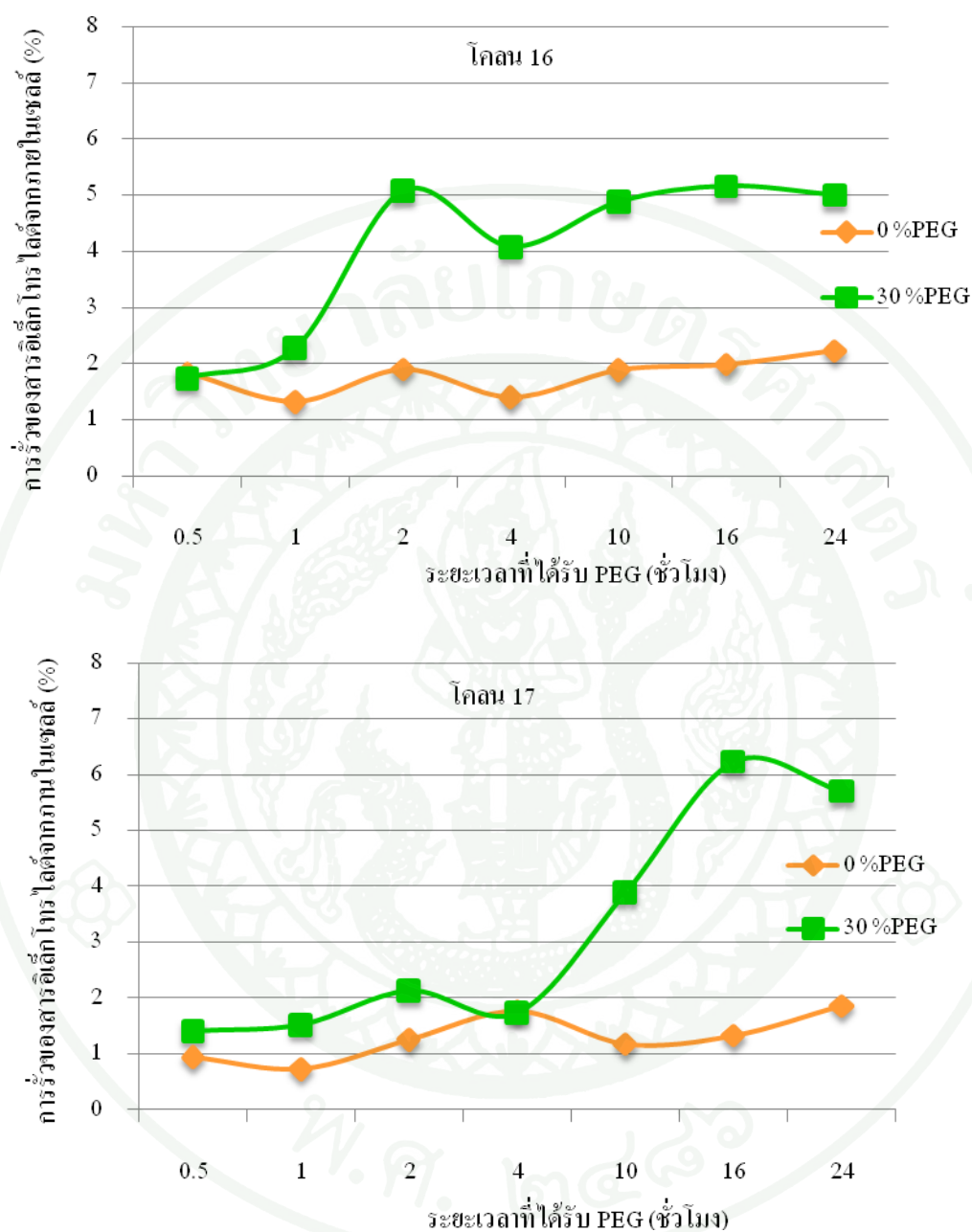
1.2.2 การหาเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้พืชอยู่ในสภาพขาดน้ำด้วย PEG

เมื่อชักนำให้ใบหูกวัวอยู่ในสภาพขาดน้ำด้วย PEG ความเข้มข้น 0 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 0.5, 1, 2, 4, 10, 16 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นให้ใบหูกวัวดูดน้ำกลับ 2 ชั่วโมง พบว่า ที่ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ค่า EL มากกว่าที่ความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4)

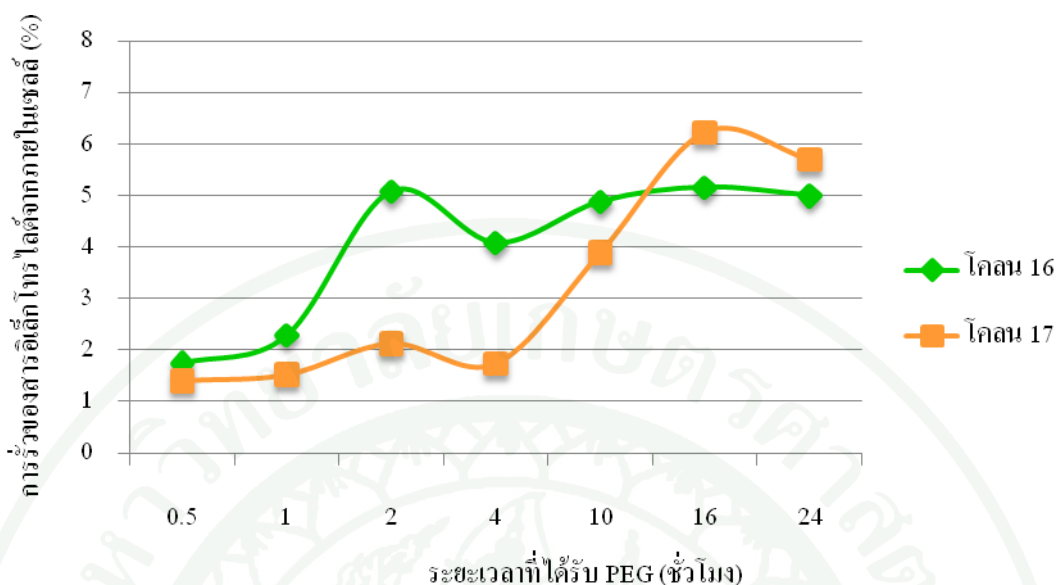
ชิ้นส่วนใบหูกวัวที่โคลน 16 ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 0.5, 1, และ 2 ชั่วโมง ค่า EL มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมาก และเมื่อชิ้นส่วนใบได้รับ PEG เป็นเวลา 4 ชั่วโมง มีค่า EL มีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย จากนั้นเมื่อชิ้นส่วนใบได้รับ PEG เป็นเวลา 10 ถึง 24 ชั่วโมง ค่า EL มีแนวโน้มค่อนข้างคงที่ (ภาพที่ 4)

ส่วนชิ้นส่วนใบหุ้มรัฐชี้ของโคลน 17 เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 0.5-4 ชั่วโมง ค่า EL มีแนวโน้มคงที่ แต่เมื่อแช่ใบหุ้มรัฐชี้เป็นเวลา 4-16 ชั่วโมง ค่า EL กลับมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมาก และเมื่อแช่ชิ้นส่วนใบเป็นเวลา 16-24 ชั่วโมงใน PEG ค่า EL ลดลง (ภาพที่ 4)

เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของ EL ของโคลน 16 และ 17 เมื่อแช่ใบใน PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ มีค่า 4.04 และ 3.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 5, 6) นอกจากนั้นค่า EL ของชิ้นส่วนใบหุ้มรัฐชี้โคลน 16 และ 17 เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 2 และ 4 ชั่วโมง มีค่าความแตกต่างเป็น 2.95 และ 2.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 5 และตารางผนวกที่ 5, 6) แต่เมื่อแช่ใบใน PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงทำให้ค่า EL ของทั้งสองโคลนแตกต่างกันมากที่สุด



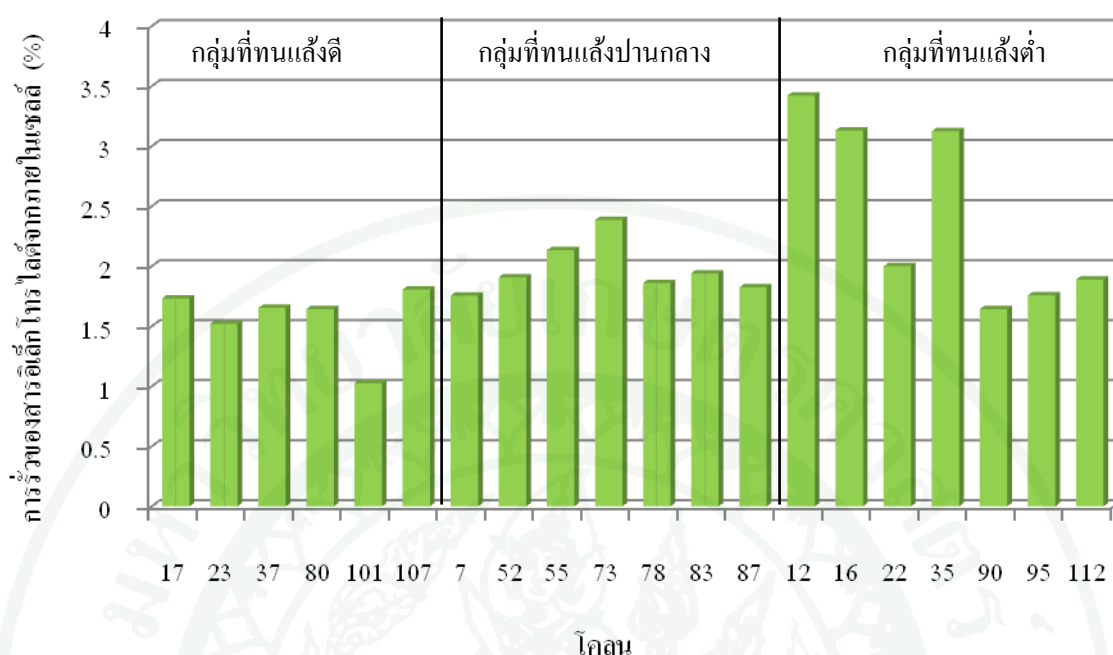
ภาพที่ 4 การร้าวของสารอเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์โคลน 16 และ 17 ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 0 และ 30 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 0.5, 1, 2, 4, 10, 16 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในน้ำไร้ไอออนในที่มีดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง



ภาพที่ 5 การรื้อของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์เปรียบเทียบของไบโหมั้วรื้อที่โคลน 16 และ 17 ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 0.5, 1, 2, 4, 10, 16 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในน้ำไร้ไอออนในที่มีดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

การทดลองที่ 2 การรื้อของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของไบโหมั้วรื้อ

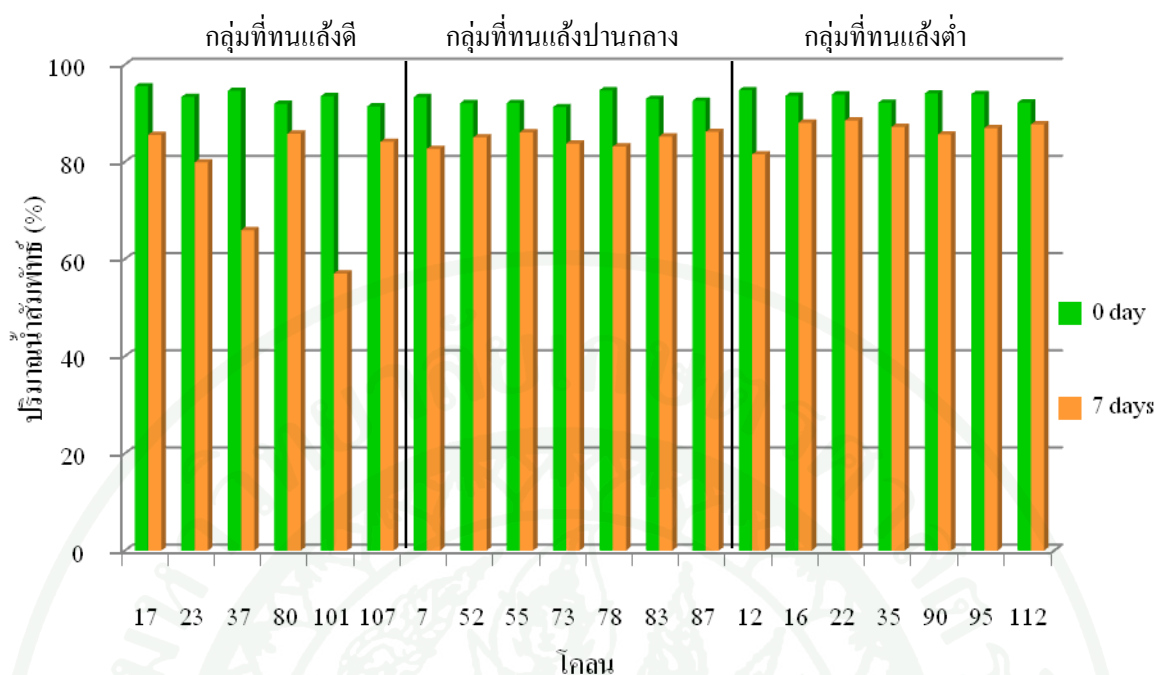
นำค่าที่เหมาะสมสำหรับวัดการรื้อของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของไบโหมั้วรื้อที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาใช้ในการหาค่าการรื้อของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของหมั้วรื้อทั้ง 20 โคลน พบว่าค่า EL ของชิ้นส่วนไบโหมั้วรื้อ 20 โคลนที่ชักนำให้เกิดความเครียดจากการขาดน้ำด้วย PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และใช้เวลา 2 ชั่วโมงเพื่อให้ไบคูดน้ำกลับ มีค่าอยู่ในช่วง 1.03-3.42 เปอร์เซ็นต์ โดยหมั้วรื้อโคลนที่ทนแล้งเช่น 23, 37, 80 และ 101 มีค่า EL เป็น 1.52, 1.66, 1.82 และ 1.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่า โคลนที่ทนแล้งต่ำเช่น 12, 16, 22, 35, และ 112 ที่มีค่า EL เป็น 3.42, 3.13, 2.00, 3.13 และ 1.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ 11, ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 การร่วงของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหญ้ารัฐ 20 โคลน ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามระดับการทนแล้งในสภาพแปลงที่ประเมินจากลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไปคือ กลุ่มที่ทนแล้งดี กลุ่มที่ทนแล้งปานกลาง และกลุ่มที่ทนแล้งต่ำ เมื่อชักนำให้เกิดความเครียดจากการขาดน้ำด้วย PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และใช้เวลา 2 ชั่วโมงเพื่อให้ใบดูดน้ำกลับ

การทดลองที่ 3 ผลของการขาดน้ำต่อปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบของหญ้ารัฐ

จากการทดสอบค่า RWC ของใบหญ้ารัฐทั้ง 20 โคลนที่ได้รับน้ำปกติมีค่าเฉลี่ย 93.18 เปอร์เซ็นต์ เมื่องดน้ำเป็นเวลา 7 วัน ค่าเฉลี่ยของ RWC ลดลงเหลือ 82.79 เปอร์เซ็นต์ ค่า RWC ของหญ้ารัฐแต่ละโคลนลดลงแตกต่างกัน มีค่าอยู่ในช่วง 57.02-88.48 เปอร์เซ็นต์ โคลนที่มีค่า RWC ต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ โคลน 23, 37 และ 101 ซึ่งมีค่า RWC เป็น 79.88, 65.94 และ 52.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โคลน 101 เป็นโคลนที่มีค่า RWC ต่ำที่สุด ส่วนโคลนอื่นๆ มีค่า RWC มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ โดยโคลน 22 มีค่า RWC สูงสุด 88.48 เปอร์เซ็นต์ (ตารางผนวกที่ 11, ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบของหญ้ารัฐซี่ทั้ง 20 โคลน ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามระดับการทนแสงในสภาพแปลงที่ประเมินจากลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไปคือ กลุ่มที่ทนแสงดี กลุ่มที่ทนแสงปานกลาง และกลุ่มที่ทนแสงต่ำ เมื่อคนน้ำเป็นเวลา 0 และ 7 วัน

การทดลองที่ 4 การหาความเข้มข้นของ PEG ที่ทำให้หญ้ารัฐซี่ตายเป็นร้อยละ 50 ของชุดควบคุม (LD_{50}) ในสภาพหลอดทดลอง

เมื่อนำหญ้ารัฐซี่มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ เพื่อหาค่า LD_{50} ของหญ้ารัฐซี่ 20 โคลน พบว่ากลุ่มที่สามารถทนแสงได้ดีในสภาพแปลง มีค่า LD_{50} มากกว่ากลุ่มที่สามารถทนแสงต่ำในสภาพแปลง ได้แก่ โคลน 23, 37, 80 และ 101 โดยโคลน 101 มีค่า LD_{50} สูงที่สุด 39.4 เปอร์เซ็นต์ PEG ส่วนโคลน 23, 37 และ 80 มีค่า LD_{50} เป็น 37.9, 35.1 และ 38.2 เปอร์เซ็นต์ PEG ตามลำดับ ยกเว้นโคลน 90 เป็นโคลนที่เมื่อประเมินจากสภาพแปลงแล้วมีความสามารถในการทนแสงต่ำ แต่มีค่า LD_{50} 37.1 เปอร์เซ็นต์ PEG ซึ่งอยู่ในกลุ่มที่ทนแสงได้ดีเมื่อประเมินจากค่า LD_{50} ในขณะที่โคลน 17 และ 107 ที่สามารถทนแสงได้ดีในสภาพแปลง กลับมีค่า LD_{50} 31.37 และ 33.89 เปอร์เซ็นต์ PEG ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในกลุ่มที่ทนแสงปานกลางจากการประเมินด้วยค่า LD_{50} โดยกลุ่มนี้มีค่า LD_{50} อยู่ระหว่าง 35-30

เปอร์เซ็นต์ PEG และหยาูรฐีโคลนที่สามารถทนแล้งได้ปานกลางในสภาพแปลงด้วยได้แก่ 7, 52, 55, 73, 78, 83, 87 และ 95 ซึ่งมีค่า LD_{50} เป็น 33.39, 30.89, 31.74, 32.36, 32.87, 32.38, 31.61 และ 34.18 เปอร์เซ็นต์ PEG ตามลำดับ และกลุ่มที่มีความสามารถในการทนแล้งต่ำจากการประเมินจากสภาพแปลง และค่า มีค่า LD_{50} น้อยกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ PEG ได้แก่โคลน 12, 16, 22, 35 และ 112 ซึ่งมีค่า LD_{50} เป็น 21.8, 18.1, 28.7, 18.9 และ 28.1 เปอร์เซ็นต์ PEG (ตารางผนวกที่ 11, ภาพที่ 8)



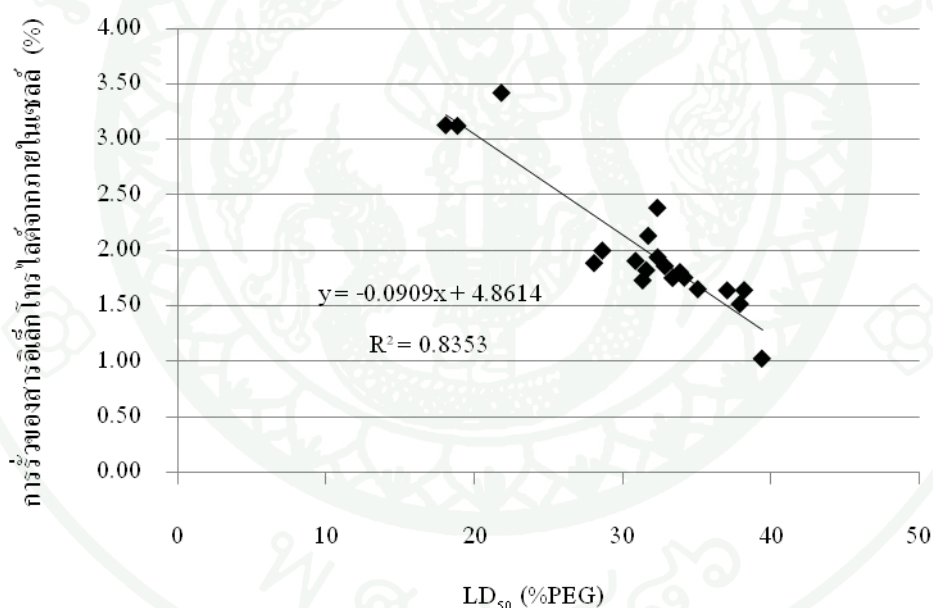
ภาพที่ 8 ความเข้มข้นของ PEG ที่ทำให้หยาูรฐีตายเป็นร้อยละ 50 ของชุดควบคุม (LD_{50}) ในสภาพหลอดทดลองของใบหยาูรฐีทั้ง 20 โคลน ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามระดับการทนแล้งในสภาพแปลงที่ประเมินจากลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไปคือ กลุ่มที่ทนแล้งดี กลุ่มที่ทนแล้งปานกลาง และกลุ่มที่ทนแล้งต่ำ

เมื่อนำค่า LD_{50} กับ EL และ RWC ของหยาูรฐี 20 โคลน มาหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์พบว่า ค่า LD_{50} มีสหสัมพันธ์กับ RWC ในเชิงลบอย่างไม่มีนัยสำคัญ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็น 0.257 ส่วน LD_{50} มีสหสัมพันธ์กับ EL มากกว่า RWC และมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ทางลบเป็น 0.917 (ตารางที่ 1) เมื่อนำค่า LD_{50} และ EL มาสร้างกราฟ (ภาพที่ 9) ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มหยาูรฐีเป็น 3 กลุ่มได้ชัดเจนคือ 1) กลุ่มที่ทนแล้งได้ดี ได้แก่โคลน 101 2) กลุ่มที่ทนแล้งปานกลางค่อนข้างดีได้แก่ 7, 17, 22, 23, 37, 52, 55, 73, 78, 80, 83, 87, 90, 95, 107 และ 112 3) กลุ่มที่ทนแล้งต่ำได้แก่โคลน 12, 16 และ 35

ตารางที่ 1 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง LD₅₀ ปริมาณน้ำสัมพัทธ์เมื่อดองน้ำ 7 วัน และการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์เมื่อชักนำให้เกิดความเครียดจากการขาดน้ำด้วย PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ของหนูกุ้งที่ทั้ง 20 โคลน

	LD ₅₀	ปริมาณน้ำสัมพัทธ์เมื่อ ดองน้ำ 7 วัน	การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์ จากภายในเซลล์
LD ₅₀	1.000		
ปริมาณน้ำสัมพัทธ์เมื่อดองน้ำ 7 วัน	-0.257	1.000	
การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จาก ภายในเซลล์	-0.917**	0.333	1.000

** แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %



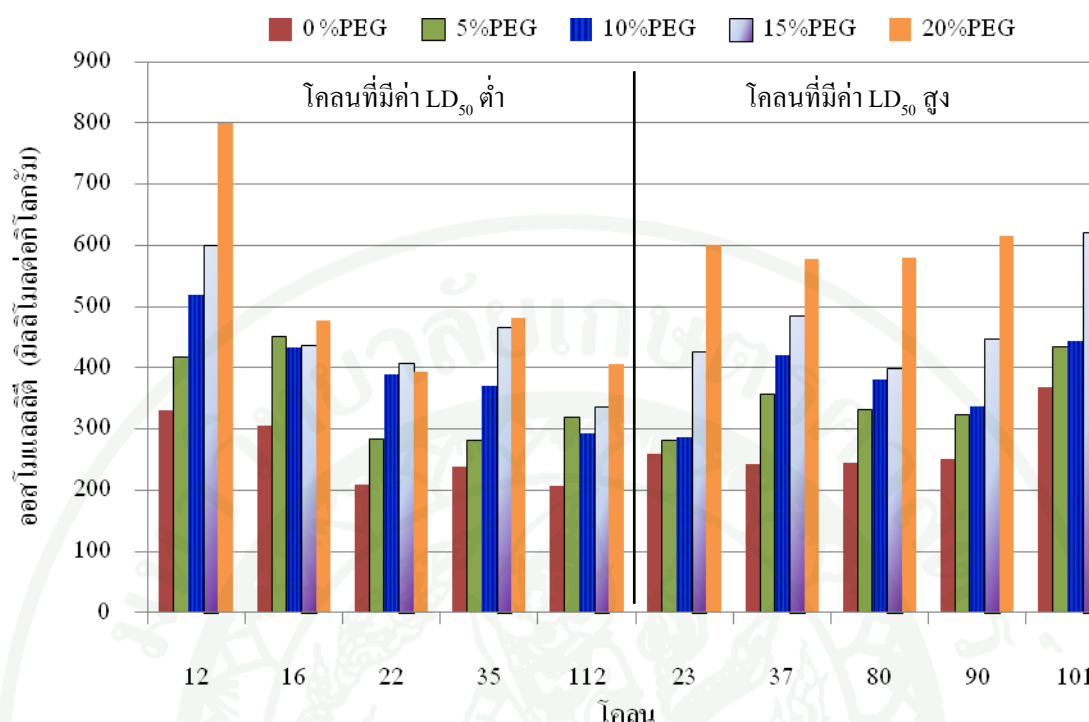
ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่าง LD₅₀ และการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของหนูกุ้งที่ทั้ง 20 โคลน

การทดลองที่ 5 การปรับค่า osmotic potential ของเซลล์ (osmotic adjustment)

เมื่อนำหนักรูชี 10 โคลนที่มีค่า LD_{50} สูงสุด 5 โคลนคือ 23, 37, 80, 90, และ 101 มีค่า LD_{50} เป็น 37.94, 35.09, 38.22, 37.08 และ 39.42 เปอร์เซ็นต์ PEG ตามลำดับ และหนักรูชีที่มีค่า LD_{50} ต่ำสุดอีก 5 โคลนคือ 12, 16, 22, 35 และ 112 ซึ่งมีค่า LD_{50} เป็น 21.83, 18.08, 28.65, 18.87 และ 28.09 เปอร์เซ็นต์ PEG ตามลำดับ มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 7 วันเพื่อศึกษาการปรับค่า osmotic potential ของเซลล์ได้ผลดังนี้

5.1 ออสโมแลลลิตี (osmolality)

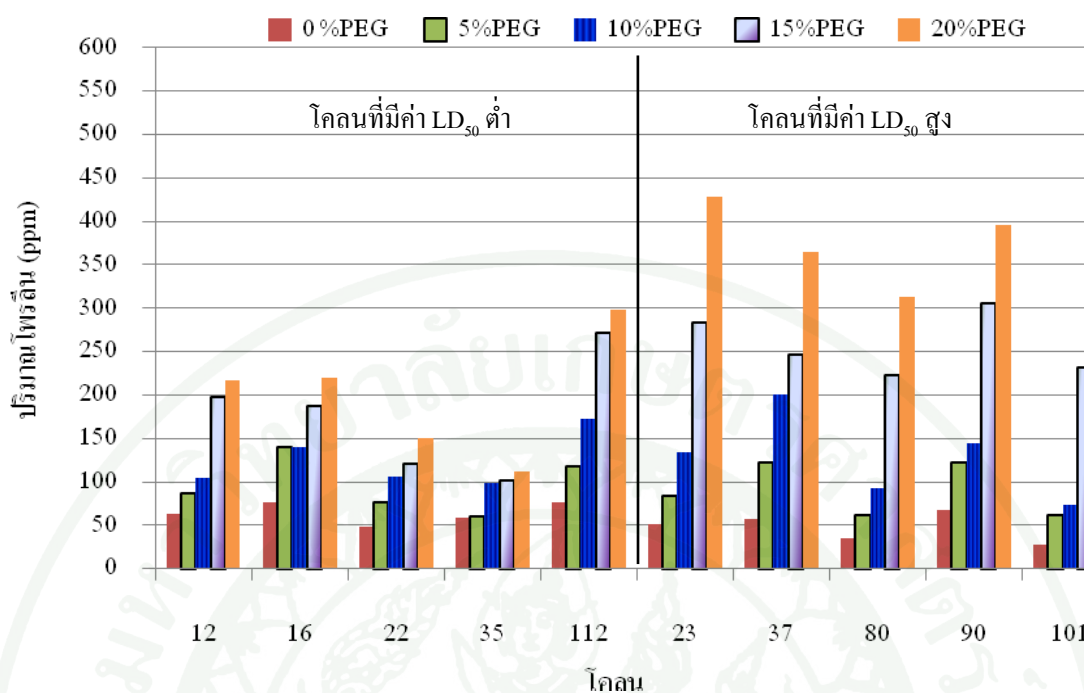
หนักรูชีทั้ง 10 โคลนมีค่าออสโมแลลลิตีสูงขึ้น เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม PEG ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นจาก 0 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าออสโมแลลลิตีของหนักรูชีทั้ง 10 โคลน เมื่อเลี้ยงใน PEG ที่มีความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วง 207.00-367.75 มิลลิโมลต่อกิโลกรัม และเมื่อพิจารณาที่ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่าโคลน 23, 37, 80, 90 และ 101 ซึ่งเป็นโคลนที่มีค่า LD_{50} สูง มีค่าออสโมแลลลิตีเพิ่มขึ้นเป็น 600.3, 577.0, 579.8, 615.3 และ 644.5 มิลลิโมลต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าโคลน 16, 22, 35, และ 112 ที่มีค่า LD_{50} ต่ำกว่า อย่างไรก็ตามโคลน 12 ซึ่งเป็นโคลนที่มีค่า LD_{50} ต่ำ เมื่อได้รับ PEG ที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ กลับมีค่าออสโมแลลลิตีเพิ่มขึ้นสูงที่สุดคือ 800.08 มิลลิโมลต่อกิโลกรัม (ตารางผนวกที่ 12, ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ค่าออกซิโมแอลลิติของเห็ดราซึ่ง 10 โคลนที่มีค่า LD_{50} ต่ำสุด 5 โคลน และที่มีค่า LD_{50} สูงสุด 5 โคลน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์

5.2 ปริมาณโปรตีน

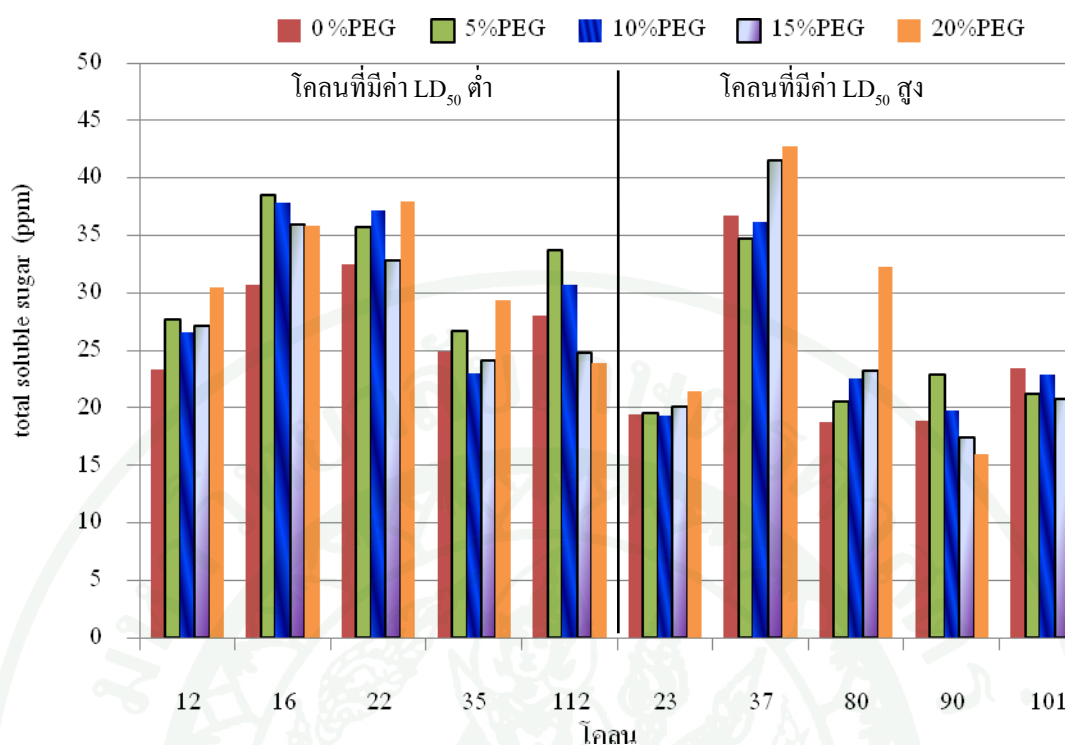
ปริมาณโปรตีนของเห็ดราซึ่งทั้ง 10 โคลนเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม PEG ความเข้มข้น 5-20 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (PEG ความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์) ที่มีปริมาณโปรตีน 27.92-76.09 ppm ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนที่ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ โคลน 23, 37, 80, 90 และ 101 ซึ่งเป็นโคลนที่มีค่า LD_{50} สูง มีปริมาณโปรตีนที่ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์เป็น 427.64, 364.54, 313.48, 395.46, และ 552.06 ppm ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าที่มีในโคลน 12, 16, 22, 35, และ 112 ซึ่งเป็นโคลนที่มีค่า LD_{50} ต่ำ โดยมีปริมาณโปรตีนที่ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์เป็น 217.45, 219.32, 150.42, 111.58 และ 298.60 ppm ตามลำดับ (ตารางผนวกที่ 12, ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ปริมาณโพลีฟีนอลของสายพันธุ์ 10 โคโลนที่มีค่า LD₅₀ ต่ำสุด 5 โคโลน และที่มีค่า LD₅₀ สูงสุด 5 โคโลนเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์

5.3 ปริมาณ total soluble sugar

สายพันธุ์ทั้ง 10 โคโลนเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารที่เติม PEG ความเข้มข้น 5 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ PEG เพิ่มขึ้น ปริมาณ total soluble sugar ของแต่ละโคโลนจะมีการเปลี่ยนแปลงแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (PEG ความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์) โดยปริมาณ total soluble sugar ของโคโลน 12, 22, 37 และ 80 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ส่วนโคโลน 16, 112 และ 90 เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณ total soluble sugar เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 10-20 เปอร์เซ็นต์ กลับพบว่า ปริมาณ total soluble sugar มีแนวโน้มลดลง สำหรับโคโลน 35, 23 และ 101 เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 5-15 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณ total soluble sugar ทั้งเพิ่มขึ้น และลดลง แต่เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ total soluble sugar ของทั้ง 3 โคโลน เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 ปริมาณ total soluble sugar ของหนัารูชี 10 โคลนที่มีค่า LD_{50} ต่ำสุด 5 โคลน และที่มีค่า LD_{50} สูงสุด 5 โคลน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG-6000 ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์

เมื่อเปรียบเทียบค่าต่างๆจากการตอบสนองต่อสภาพที่ขาดน้ำในหนัารูชีที่ทนแล้งได้ดี (มีค่า LD_{50} อยู่ในช่วง 35.09-39.42 เปอร์เซ็นต์ PEG) และที่ทนแล้งต่ำ (มีค่า LD_{50} อยู่ในช่วง 18.07-28.65 เปอร์เซ็นต์ PEG) ได้แก่ ค่า EL เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ RWC เมื่องดน้ำ 7 วัน และค่าออสโมแลลลิตี ปริมาณโปรตีน และปริมาณ total soluble sugar เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพหลอดทดลองของหนัารูชี 10 โคลนที่มีค่า LD_{50} ต่ำสุด 5 โคลน และที่มีค่า LD_{50} สูงสุด 5 โคลน (ตารางที่ 2) จะเห็นว่าหนัารูชีโคลนที่ทนแล้งได้ดี มีการตอบสนองที่แตกต่างจากโคลนที่ทนแล้งต่ำอย่างชัดเจน 3 ประการคือ 1) มีค่า EL ต่ำกว่าโคลนทนแล้งต่ำ 2) มีค่า RWC ต่ำกว่าโคลนที่ทนแล้งต่ำ 3) มีปริมาณโปรตีนสูงกว่าโคลนที่ทนแล้งต่ำ โดยโคลน 101 ซึ่งทนแล้งได้ดีที่สุด มีค่า EL และ RWC ต่ำสุด และมีปริมาณโปรตีนสูงสุด ดังนั้นในทางปฏิบัติในการคัดเลือกหนัารูชีทนแล้งจากประชากรจำนวนมาก จึงควรใช้ค่า EL และ RWC ในการคัดกรองให้ได้โคลนที่ทนแล้งได้มากจำนวนหนึ่งเสียก่อน เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย เครื่องมือราคาไม่สูง ไม่ต้องใช้

พืชทั้งต้น จากนั้นจึงคัดเลือกให้ได้โคลนที่ทนแล้งสูงสุดจากโคลนที่ผ่านการคัดกรอง โดยนำมาเพิ่มปริมาณในสภาพหลอดทดลอง และศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนในสภาพที่ขาดน้ำ และ/หรือ LD₅₀ ในสภาพหลอดทดลอง เนื่องจากการศึกษาในสภาพหลอดทดลองสามารถควบคุมค่า osmotic potential ของสารละลายที่อยู่ล้อมรอบเซลล์โดยอาศัย PEG จึงช่วยให้ทราบการตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำที่แน่นอน

ตารางที่ 2 ค่า EL เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ RWC เมื่อจมน้ำ 7 วัน และค่าออสโมแลลลิตี ปริมาณโปรตีน และปริมาณ total soluble sugar เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพหลอดทดลองของหญ้ารัฐ 10 โคลนที่มีค่า LD₅₀ ต่ำสุด 5 โคลน และที่มีค่า LD₅₀ สูงสุด 5 โคลน โดยจัดแบ่งเป็นกลุ่มที่ทนแล้งได้ดี และกลุ่มที่ทนแล้งต่ำ และเรียงลำดับตามความเข้มข้นของ PEG ที่ทำให้หญ้ารัฐตายเป็นร้อยละ 50 ของชุดควบคุม (LD₅₀) ในสภาพหลอดทดลอง

โคลน	LD ₅₀ (% PEG)	EL (%)	RWC (%)	โปรตีน (ppm)	ออสโมแลลลิตี (มิลลิโมลต่อกิโลกรัม)	total soluble sugar (ppm)
ทนแล้งได้ดี						
101	39.42	1.03	57.02	552.06	644.50	3085.86
80	38.22	1.64	85.79	313.48	579.75	3224.72
23	37.94	1.52	79.88	427.64	600.33	2140.68
90	37.08	1.64	85.62	395.46	615.33	1601.38
37	35.09	1.65	65.94	364.54	577.00	4274.18
ทนแล้งต่ำ						
22	28.65	2	88.48	150.42	394.00	3793.03
112	28.09	1.91	87.7	298.6	405.42	2386.77
12	21.83	3.42	81.53	217.42	800.08	3046.04
35	18.87	3.13	87.17	111.58	481.08	2932.07
16	18.08	3.13	88.03	219.32	477.50	3583.63

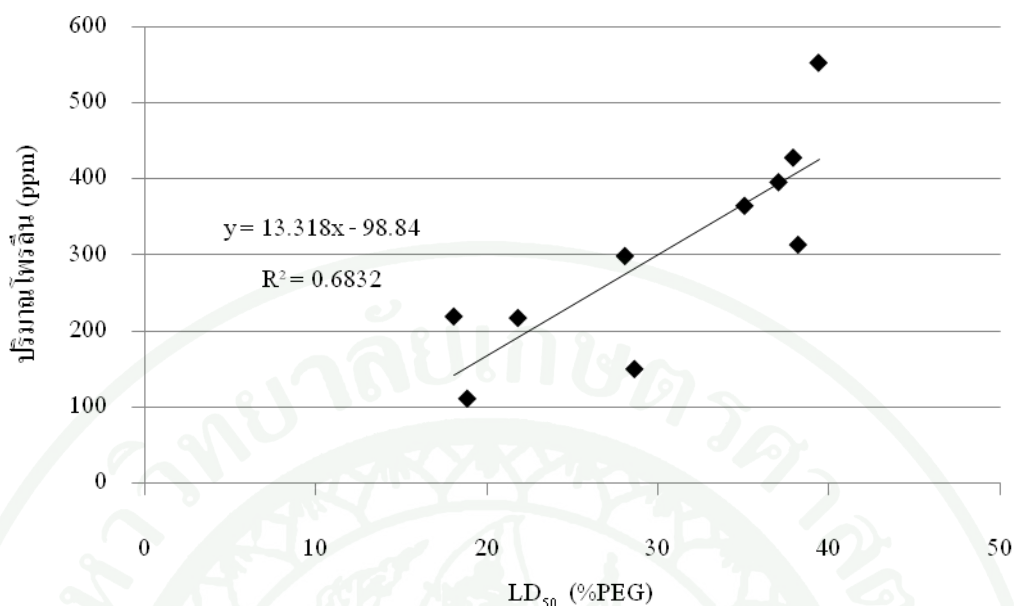
ค่าสหสัมพันธ์ระหว่าง LD_{50} ออสโมแลลลิตี ปริมาณโพรีน และ ปริมาณ total soluble sugar ของหนักรูซึ่งทั้ง 10 โคลน (ตารางที่ 3) เมื่อชักนำให้ขาดน้ำด้วย PEG ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่า LD_{50} และออสโมแลลลิตีมีสหสัมพันธ์กันทั้งทางบวกและลบ และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งเมื่อได้รับ PEG ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็น 0.009, -0.183, -0.327, 0.021 และ 0.237 ตามลำดับ ส่วน LD_{50} และปริมาณโพรีนมีสหสัมพันธ์กันทั้งทางบวกและลบเช่นกัน โดยเมื่อได้รับ PEG ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง LD_{50} และปริมาณโพรีนเป็น -0.615, -0.196, 0.017, 0.657 และ 0.827 ตามลำดับ โดยสหสัมพันธ์ระหว่าง LD_{50} กับปริมาณโพรีนของหนักรูซึ่งเมื่อได้รับ PEG ที่มีความเข้มข้น 0, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนสหสัมพันธ์ระหว่าง LD_{50} และปริมาณ total soluble sugar มีความสัมพันธ์ในทางลบ โดยเมื่อหนักรูซึ่งทั้ง 10 โคลนได้รับ PEG ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ มีสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็น -0.354, -0.608, -0.444, -0.374 และ -0.234 ตามลำดับ ซึ่งสหสัมพันธ์ระหว่าง LD_{50} กับปริมาณ total soluble sugar ของหนักรูซึ่งเมื่อได้รับ PEG ที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์มีความแตกต่างกันทางสถิติ จากผลการทดลองพบว่า สหสัมพันธ์ระหว่าง LD_{50} และปริมาณโพรีนของหนักรูซึ่งที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์มีความสัมพันธ์กันมากที่สุด โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ทางบวกเป็น 0.827 จึงนำมาสร้างกราฟ ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มหนักรูซึ่งเป็น 3 กลุ่มคือ 1) โคลน 12, 16, 22, และ 35 เป็นกลุ่มที่ LD_{50} ต่ำ และปริมาณ โพรีนเพิ่มขึ้นน้อย 2) โคลน 112 เป็นโคลนที่ LD_{50} ต่ำ และ โคลน 23, 37, 80, 90 เป็นโคลนที่ LD_{50} สูงกลุ่มนี้มีปริมาณโพรีนเพิ่มขึ้นปานกลาง 3) โคลน 101 เป็นโคลนที่ LD_{50} สูงที่สุด และมีปริมาณโพรีนเพิ่มขึ้นมากที่สุด (ภาพที่ 13)

ตารางที่ 3 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง LD₅₀ ออสโมแลลลิตี ปริมาณโพรลีน และ ปริมาณ total soluble sugar ของหนุ่ยารูชี 10 โคลน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน

LD ₅₀	PEG (%)	1	ออสโมแลลลิตี					โพรลีน					total soluble sugar				
			ความเข้มข้นของ PEG (%)					ความเข้มข้นของ PEG (%)					ความเข้มข้นของ PEG (%)				
			0	5	10	15	20	0	5	10	15	20	0	5	10	15	20
LD ₅₀	PEG (%)	1															
ออสโมแลลลิตี	0	0.009	1														
	5	-0.183	0.832**	1													
	10	-0.327	0.679*	0.746**	1												
	15	0.021	0.860**	0.616*	0.769**	1											
	20	0.237	0.694*	0.450	0.538	0.759**	1										
โพรลีน	0	-0.615*	-0.290	0.030	-0.156	-0.375	-0.249	1									
	5	-0.196	-0.131	0.282	-0.089	-0.296	-0.171	0.791**	1								
	10	0.017	-0.455	-0.115	-0.330	-0.435	-0.245	0.638*	0.815**	1							
	15	0.657*	0.066	0.070	-0.387	-0.098	0.324	0.102	0.425	0.469	1						
	20	0.827**	0.426	0.246	-0.147	0.305	0.403	-0.433	0.013	0.051	0.771**	1					
total soluble sugar	0	-0.354	-0.230	0.137	0.241	-0.097	-0.469	0.291	0.427	0.511	-0.348	-0.331	1				
	5	-0.608*	-0.276	0.187	0.203	-0.272	-0.544	0.594*	0.598*	0.500	-0.362	-0.546	0.891**	1			
	10	-0.444	-0.198	0.253	0.298	-0.199	-0.487	0.364	0.497	0.423	-0.360	-0.430	0.925**	0.955**	1		
	15	-0.374	-0.131	0.260	0.406	-0.048	-0.270	0.259	0.439	0.478	-0.346	-0.377	0.915**	0.832**	0.909**	1	
	20	-0.234	0.050	0.302	0.574*	0.167	-0.168	-0.203	-0.013	0.055	-0.544	-0.302	0.768**	0.584	0.750**	0.869**	1

* แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95

** แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99



ภาพที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่าง LD₅₀ และปริมาณโพลีฟีนอล ของหนักรูซี่ 10 โคลนที่มีค่า LD₅₀ ต่ำสุด 5 โคลน และที่มีค่า LD₅₀ สูงสุด 5 โคลน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG ที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์

เมื่อนำค่าเฉลี่ยของค่า LD₅₀ EL ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (RWC) เมื่อรดน้ำ 7 วันของหนักรูซี่ที่มีค่า LD₅₀ สูงสุด และต่ำสุดอย่างละ 5 โคลน และค่าเฉลี่ยของปริมาณออสโมแลลลิตี โพลีฟีนอล และ total soluble sugar เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ มาหาค่าสหสัมพันธ์พบว่า ค่าสหสัมพันธ์ระหว่าง LD₅₀ กับ EL และ โพลีฟีนอล มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็น -0.940 และ 0.827 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ส่วนสหสัมพันธ์ระหว่าง LD₅₀ กับ RWC ออสโมแลลลิตี และ total soluble sugar ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็น -0.517, 0.237 และ -0.234 ตามลำดับ ค่าสหสัมพันธ์ระหว่าง EL กับ โพลีฟีนอล มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็น -0.799 ส่วนค่าสหสัมพันธ์ระหว่าง EL กับ RWC ออสโมแลลลิตี และ total soluble sugar ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็น 0.521, 0.047 และ 0.171 ตามลำดับ ค่าสหสัมพันธ์ระหว่าง RWC กับ โพลีฟีนอล มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็น -0.732 ส่วนค่าสหสัมพันธ์ระหว่าง RWC กับ ออสโมแลลลิตี

และ total soluble sugar ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็น -0.441 และ -0.261 ตามลำดับ ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างออสโมแลลลิตี กับ โปรตีน และ total soluble sugar ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็น 0.403 และ -0.168 ตามลำดับ ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับ total soluble sugar ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็น -0.302

ตารางที่ 4 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง LD₅₀ การร่วของสารอเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ (EL) ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (RWC) เมื่อน้ำ 7 วัน และ ออสโมแลลลิตี ปริมาณ โปรตีน และปริมาณ total soluble sugar ของหนูกุ้งทั้ง 10 โคลน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG ที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน

	LD ₅₀	EL	RWC	ออสโมแลลลิตี	โปรตีน	total soluble sugar
LD ₅₀	1.000					
EL	-0.940 ^{**}	1.000				
RWC	-0.517	0.521	1.000			
ออสโมแลลลิตี	0.237	0.047	-0.441	1.000		
โปรตีน	0.827 ^{**}	-0.799 [*]	-0.732 [*]	0.403	1.000	
total soluble sugar	-0.234	0.171	-0.261	-0.168	-0.302	1.000

* แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

** แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

วิจารณ์ผลการทดลอง

สภาวะแห้งแล้งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยแต่ละพันธุ์มีการตอบสนองและปรับตัวต่อสภาวะแห้งแล้งแตกต่างกัน สำหรับการทดสอบและคัดเลือกพืชทนแล้งในสภาพแปลง (field screening) นับเป็นวิธีทดสอบที่ดีเนื่องจากเป็นวิธีที่คล้ายกับสภาพที่เกิดขึ้นจริงตามธรรมชาติ และสามารถศึกษาลักษณะการตอบสนองของพืชได้หลายลักษณะ เช่น ลักษณะการเจริญเติบโต และลักษณะการม้วนและแห้งของใบ ซึ่งลักษณะเหล่านี้อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการตรวจสอบพันธุ์พืชที่ทนแล้งได้ (ประภาพร, 2546) เช่นเดียวกับที่คัดกรองหญ้ารัฐที่ปลูกในสภาพแปลงด้วยการประเมินจากลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น การม้วนใบ มุมระหว่างแผ่นใบกับก้านใบ และลำต้นที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จำนวน 20 โคลน ซึ่งเป็นตัวแทนของหญ้ารัฐทั้งหมด 113 โคลน หลังจากนั้นนำหญ้ารัฐที่คัดกรองจากการประเมินด้วยลักษณะทนแล้งภายนอก ซึ่งเป็นการประเมินในเบื้องต้นให้ได้โคลนที่ทนแล้งได้ดีจากประชากรจำนวนมาก มาศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง ความสามารถในการทนแล้งที่แสดงออกจากลักษณะภายนอกเมื่อปลูกในสภาพแปลงกับการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาบางประการเมื่ออยู่ในสภาวะแห้งแล้งที่กำหนดขึ้นในสภาพทดลอง เพื่อที่จะหาการตอบสนองที่จะเป็นเกณฑ์ชี้วัดในการคัดเลือกหญ้ารัฐทนแล้งที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

วิธีการที่เหมาะสมสำหรับการวัดการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหญ้ารัฐ

เมื่อพืชอยู่ในสภาวะขาดน้ำ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาและกระบวนการทางชีวเคมีหลายประการ โดยเยื่อหุ้มเซลล์เป็นส่วนแรกที่จะเกิดความเสียหาย เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์เป็นส่วนที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม โดยทำให้ความสามารถในการเลือกผ่านลดลง จึงทำให้เกิดการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ (Jones *et al.*, 1981; Matos *et al.*, 2004) ซึ่งการตรวจสอบค่าการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ washing เป็นการล้างในเวลาที่เหมาะสมเพื่อกำจัดเซลล์ตาย และสารต่างๆ ที่ผิวใบ จากนั้นทำการ dehydration เพื่อชักนำให้ใบอยู่ในสภาวะขาดน้ำในระยะเวลา และความเข้มข้นของสารออสโมติกัมที่เหมาะสม และขั้นตอนสุดท้ายเป็นการ rehydration เพื่อให้ใบดูดน้ำกลับในระยะเวลาที่เหมาะสม

เมื่อประเมินจากลักษณะภายนอก พบว่าโคลน 17 อยู่ในกลุ่มที่ทนแล้งได้ดี เนื่องจากมีการม้วนใบ การปรับมุมระหว่างแผ่นใบกับกาบใบ ซึ่งเป็นกลไกในการเลี้ยงแล้ง เพื่อลดการรับแสง ทำให้มีการคายน้ำเพื่อลดอุณหภูมิของใบลดลง และลักษณะของลำต้นไม่มีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อสภาวะขาดน้ำ ในขณะที่โคลน 23 และ 37 ที่มีลักษณะภายนอกที่แสดงออกว่าเป็นโคลนที่ทนแล้ง เช่นเดียวกับโคลน 17 ยกเว้นลักษณะลำต้นที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่ออยู่ในสภาวะขาดน้ำ ส่วนโคลน 80 ถึงแม้ว่าจะมีลักษณะที่ทนแล้งเช่นเดียวกับโคลน 17 แต่เนื่องจากโคลน 80 นี้มีการแตกกอไม่ดี (ตารางผนวกที่ 2)

ส่วนโคลน 16 เมื่อประเมินจากลักษณะภายนอกพบว่ามีลักษณะที่แสดงออกถึงความไม่ทนแล้งอย่างชัดเจนคือ ไม่มีการม้วนใบ การปรับมุมระหว่างแผ่นใบกับกาบใบ ลำต้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่ออยู่ในสภาวะขาดน้ำ และมีการแตกกอได้ไม่ดี (ตารางผนวกที่ 2) จึงเลือกโคลน 16 และ 17 มาเป็นตัวแทนของกลุ่มที่ทนแล้งได้ไม่ดี และกลุ่มที่ทนแล้งได้ดี ตามลำดับ

1. การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับกำจัดสารต่างๆ ที่ผิวใบและเซลล์ที่ตายขณะตัด

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ในหยูารูชี 2 โคลนคือโคลน 16 และ 17 ซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มที่ทนแล้งต่ำ และทนแล้งได้ดี ตามลำดับ ในขั้นตอนการล้างเพื่อหาเวลาที่เหมาะสมเพื่อกำจัดเซลล์ตาย จากการวัดค่า EC ทุกๆ 15 นาที เป็นเวลา 90 นาที พบว่าการแช่ชิ้นส่วนใบหยูารูชีโคลน 17 ในน้ำไว้ 15 นาทีแรก สามารถวัดค่า EC ได้สูงมาก เพราะการรั่วของสารละลายในเซลล์มาจากช่องว่างระหว่างเซลล์ และเซลล์ที่ได้รับความเสียหายจากการตัด รวมทั้งสารต่างๆ ที่ผิวใบ (Bajji *et al.*, 2002) จึงคาดว่าสารต่างๆ ที่ใบ และเซลล์ที่ตายขณะตัดน่าจะล้างออกมาในช่วงแรกนี้จนเกือบหมด ทำให้ในช่วง 15-30 นาทีมีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว

ส่วนโคลนที่ 16 ในช่วง 15 นาทีแรก มีการรั่วของสารละลายต่างๆ ออกมาก่อนข้างมาก แต่ในช่วงที่ 2 คือช่วง 15-30 นาที ยังคงมีการรั่วของสารละลายต่างๆ ยังคงสูงอยู่ และรั่วจนเกือบหมดภายในช่วงที่ 3 ทำให้ช่วง 30-45 นาที มีค่า EC ลดลงอย่างชัดเจน จากนั้นในนาที่ที่ 45-60 ค่า EC ที่วัดได้จากทั้ง 2 โคลนเพิ่มขึ้นอีกครั้ง และลดต่ำลงในช่วง 60-90 นาที อาจเกิดจากการรั่วของสารละลายจากไซโตพลาสซึมหรือแวคิวโอลของเซลล์ที่ได้รับความเสียหายจาก hypotonic stress

(Ehwald *et al.*, 1984; Prášil and Zámečník, 1998) ทั้งนี้เนื่องจากการรั่วของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ หรือโพลีเมตต์เกิดขึ้นช้ากว่าการรั่วออกจากช่องว่างระหว่างเซลล์ หรือเซลล์ที่ตายขณะตัดดั่งที่กล่าวมาข้างต้น แต่จุดประสงค์ของขั้นตอนนี้คือ การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับกำจัดสารต่างๆ ที่ผิวใบและเซลล์ตายขณะตัด (Bajji *et al.*, 2002)

2 การหาระยะเวลาและความเข้มข้นของ PEG ที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้ใบอยู่ในภาวะขาดน้ำ และระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อให้ใบดูดน้ำกลับ

2.1 การหาความเข้มข้นของ PEG ที่เหมาะสมในการชักนำให้ใบอยู่ในภาวะขาดน้ำ และระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อให้ใบดูดน้ำกลับ

การชักนำให้ใบเหี่ยวซึ่งขาดน้ำในโคลน 16 และ 17 โดยแช่ใบใน PEG ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่น้ำไร้ไอออนเพื่อให้ใบดูดน้ำกลับเป็นเวลา 1, 2, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อแช่ใบใน PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกับที่แช่ใน PEG ความเข้มข้น 0-20 เปอร์เซ็นต์ อย่างชัดเจนทุกช่วงเวลา (ภาพที่ 2) ที่ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ หลักรูปร่างทั้ง 2 โคลน มีค่า EL ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 3, 4) โดยโคลน 16 มีค่า EL เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อใช้เวลาในการดูดน้ำกลับ 1 และ 2 ชั่วโมง และค่า EL มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นค่อนข้างคงที่ที่ 4-24 ชั่วโมง ส่วนโคลน 17 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งมากกว่า มีค่า EL คงที่ในระหว่าง 1 และ 2 ชั่วโมง แต่หลังจากแช่ใบในน้ำไร้ไอออนเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ค่า EL จึงเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามเมื่อแช่ชิ้นส่วนใบในน้ำไร้ไอออนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีความแตกต่างของค่า EL ระหว่าง 2 โคลนมากกว่าที่เวลาอื่น และค่า EL ของใบ หลักรูปร่างโคลน 17 มีค่าการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ต่ำกว่าโคลน 16 ซึ่งสอดคล้องกับระดับการทนแล้ง กล่าวคือพันธุ์ที่ทนแล้ง จะมีค่าการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์น้อยกว่าพันธุ์ที่ไม่ทนแล้ง (Kolarovic *et al.*, 2006) ดังนั้นเวลา 2 ชั่วโมงจึงเป็นเวลาเหมาะสมในขั้นตอนการดูดน้ำกลับ เมื่อใช้ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ในการชักนำให้เกิดสภาพขาดน้ำ เพื่อให้เห็นความแตกต่างระหว่างโคลนที่ทนแล้งได้ดี และทนแล้งต่ำ ซึ่งระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการดูดน้ำกลับของพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน และขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุล และความเข้มข้นของ PEG ที่ใช้ชักนำให้พืชเกิดความเครียด (Agarie *et al.*, 1995) ตัวอย่างเช่นในข้าว

สาลี (*Triticum durum* Desf.) ใช้เวลา 4 ชั่วโมงในการดูดน้ำกลับ หลังจากแช่ในสารละลาย PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซนต์ (Bajji *et al.*, 2002)

2.2 การหาเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้พืชอยู่ในสภาพขาดน้ำด้วย PEG

เมื่อชักนำให้ใบหญ้าธูซี่อยู่ในสภาพขาดน้ำด้วย PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซนต์ จากนั้นให้ใบหญ้าธูซี่ดูดน้ำกลับ 2 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาชิ้นส่วนใบของโคลน 16 ที่แช่ใน PEG เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าค่า EL เพิ่มขึ้นจากค่าเริ่มต้นอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าเยื่อหุ้มเซลล์ได้รับความเสียหายและเสียสภาพจากการแช่ในสารละลาย PEG อย่างรวดเร็ว และเมื่อเปรียบเทียบกับโคลน 17 พบว่า การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเป็นลำดับตามระยะเวลาที่ได้รับ PEG ที่เพิ่มขึ้น ค่า EL ที่วัดได้จึงค่อยๆ เพิ่มขึ้น และสูงสุดที่ 16 ชั่วโมง อาจเนื่องมาจากโคลน 17 มีความสามารถในการทนแล้งได้ดี เยื่อหุ้มเซลล์จึงอาจปรับตัวให้มีความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำจากสารละลายภายนอก ทำให้การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ต้องใช้เวลานานถึง 16 ชั่วโมง (Bajji *et al.*, 2002) ส่งผลให้ ค่า EL เฉลี่ยของโคลน 17 (3.00 เปอร์เซนต์) ที่วัดได้ต่ำกว่าโคลน 16 (4.04 เปอร์เซนต์) อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางผนวกที่ 5, 6)

สำหรับวิธีการปฏิบัติในการหาค่า EL ในขั้นตอนของการให้เซลล์ใบอยู่ในสภาพขาดน้ำ โดยการแช่ในสารละลาย PEG แล้วนำชิ้นส่วนใบไปล้างด้วยน้ำไร้ไอออน จากนั้นนำใบมาวัดค่า electrical conductivity ทันที (EC_t) หลังจากนั้นวัด EC ที่เวลา 2 ชั่วโมง (EC_p) และหลังจากทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมสภาพโดยการนำใบไปต้มในน้ำเดือดประมาณ 15 นาที เพื่อให้เยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมสภาพ แล้ววัด EC ที่อุณหภูมิห้อง (EC_r) ซึ่งแสดงถึงการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ หลังจากทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดความเสียหายหลังจากที่อยู่ในสภาพขาดน้ำ โดยไม่ได้วัดในขณะที่ได้รับ PEG ทั้งนี้ เนื่องจากสารละลาย PEG มีความเข้มข้นมากและมีความหนืด ซึ่ง PEG ทำให้ค่า osmotic potential ของสารละลายที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ลดต่ำกว่าสารละลายภายในเซลล์ จึงเกิดการออสโมซิสของน้ำออกจากเซลล์พืช ในขณะที่สารต่างๆ ภายในเซลล์แพร่ผ่านออกมาในสารละลาย PEG หรือมีการรั่วผ่านออกมาเพียงเล็กน้อย ทำให้ไม่สามารถวัดความแตกต่างได้ ดังผลการศึกษาเพิ่มเติมโดยการวัดค่าการนำไฟฟ้า (electrolyte conductivity; EC) ของสารละลาย PEG ที่ไม่ได้แช่ชิ้นส่วนใบ เปรียบเทียบกับที่แช่ชิ้นส่วนใบหญ้าธูซี่ในสารละลาย PEG ที่ความเข้มข้น 0,

10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ขณะที่แช่ชิ้นส่วนใบ การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของชิ้นส่วนใบหญ้าธัญพืชในสารละลาย PEG (ไม่ได้แสดงข้อมูล) พบว่าค่า EC ของสารละลาย PEG ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่ได้แช่ชิ้นส่วนใบมีค่าค่อนข้างคงที่ โดยมีค่าเฉลี่ย 547.32 ไมโครซีเมนต์ต่อตารางเซนติเมตร เมื่อแช่ชิ้นส่วนใบหญ้าธัญพืชในสารละลาย PEG ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าสารละลาย PEG แต่ละความเข้มข้นมีค่า EC เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย โดยมีค่าเฉลี่ยของ EC เป็น 551.47 ไมโครซีเมนต์ต่อตารางเซนติเมตร

การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหญ้าธัญพืช

การวัดปริมาณการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ สามารถบ่งชี้ถึงระดับความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิดจากภาวะเครียดจากการขาดน้ำ (Prášil and Zámecník, 1998; Bajji *et al.*, 2002) โดยค่า EL ของใบหญ้าธัญพืช 20 โคลนที่ชักนำให้อยู่ในสภาพขาดน้ำ ด้วย PEG ที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ โคลนที่ทนแล้งเช่น โคลน 23, 80 และ 101 มีค่า EL 1.52, 1.64 และ 1.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าโคลน 12, 16 และ 35 ซึ่งเป็นโคลนที่ไม่ทนแล้ง ซึ่งมีค่า EL 3.42, 3.13 และ 3.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในพืชชนิดอื่นๆ ที่ใช้ค่าการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์เป็นตัวชี้วัดความทนแล้ง เช่น ใน *Oryza longistaminata* (Liu *et al.*, 2004) และข้าวโพด (*Zea mays* L.) (Kolarovic *et al.*, 2006) โดยพบว่าพันธุ์ที่ทนแล้งมีการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์น้อยกว่าพันธุ์ที่ไม่ทนแล้ง ซึ่งการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ที่เกิดจากภาวะขาดน้ำทำให้โปรโตพลาสต์หลุดตัว สารต่างๆ เข้มข้นมากขึ้น ผลที่ตามมาคือเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเมแทบอลิซึมของเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจากส่วนที่เป็นไขมันเคลื่อนที่เข้าแทนที่โปรตีน ซึ่งตำแหน่งและโครงสร้างของโปรตีนเป็นตัวกำหนดหน้าที่ของเอนไซม์ จึงทำให้ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์พื้นฐานของเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนั้นทำให้เกิดช่องบริเวณ polar phospholipid head ของเยื่อหุ้มเซลล์ จึงทำให้เกิดการรั่วของสารต่างๆ ผ่านเข้า-ออกเซลล์ได้โดยง่าย (Jones *et al.*, 1981; Hopkins, 2004) และการที่หญ้าธัญพืชโคลนที่ทนแล้งได้ดีมีการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์น้อยกว่าโคลนที่ทนแล้งต่ำ อาจเกิดจากโคลนที่ทนแล้งได้ดีมีกลไกการสะสมสารออสโมไลต์ที่สามารถป้องกันการเสื่อมสภาพของโปรตีน รักษาความสามารถในการเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ รักษาโครงสร้างของเซลล์ที่อาจเกิดความเสียหายจากการขาดน้ำ

และสามารถป้องกันการเกิด oxidative damage โดยไปกำจัดอนุมูลอิสระ (Hare *et al.*, 1998; Vendruscolo *et al.*, 2007) นอกจากนั้น Bajji *et al.* (2002) กล่าวว่ากรร้าวของสารอเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ในภาวะขาดน้ำมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของข้าวสาลี (*Triticum durum* Desf) ในสภาพแปลงที่ขาดน้ำ ดังนั้นจึงอาจใช้ค่าการร้าวของสารอเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกพันธุ์ที่ทนแล้งได้

ผลของการขาดน้ำต่อปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบของหญ้ารูชี

ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (relative water content; RWC) เป็นค่าที่มีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำทั้งหมดภายในต้นพืช สามารถบ่งบอกถึงผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมที่มีต่อพืช (Kocheva *et al.*, 2004) สำหรับความเครียดจากการขาดน้ำที่มีผลต่อค่า RWC ของใบหญ้ารูชี เมื่อรดน้ำเป็นเวลา 7 วัน นั้น มีค่าน้อยกว่าเมื่อได้รับน้ำปกติ (0 วัน) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในข้าวสาลี (*Triticum vulgare*) (Tavakol and Pakniyat 2007) *Vicia faba* L. (Khan *et al.*, 2007) และถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) (Lobato *et al.*, 2008) เมื่ออยู่ในภาวะเครียดจากการขาดน้ำ ค่า RWC จะลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ค่า RWC ที่ลดลง อาจเกิดจากรากสามารถดูดน้ำได้น้อยลง เนื่องจากปริมาณน้ำในดินลดลง (Taiz and Zeiger, 1998) และพืชมีอัตราการคายน้ำสูงขึ้น ทำให้พืชสูญเสียน้ำสู่บรรยากาศมากขึ้น (Verslues *et al.*, 2006) เมื่อรดน้ำ 7 วัน ค่า RWC ของหญ้ารูชีบางโคลนที่ทนแล้งได้ดีมีค่ามากกว่าโคลนที่ทนแล้งต่ำ เช่น โคลน 80 และ 107 เมื่อได้รับน้ำปกติ มีค่า RWC 91.94 และ 91.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อรดน้ำ 7 วัน มีค่า RWC ลดลงเป็น 85.80 และ 84.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่โคลน 73 เป็นโคลนที่ทนแล้งต่ำกว่า เมื่อได้รับน้ำปกติ มีค่า RWC 91.24 เปอร์เซ็นต์ เมื่อรดน้ำ 7 วันมีค่า RWC ลดลงเป็น 83.73 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Turkan *et al.* (2005) ที่ศึกษาใน *Phaseolus acutifolius* (ทนแล้งได้ดีกว่า) และ *P. vulgaris* (ทนแล้งได้น้อยกว่า) โดยใช้ PEG ชักน้ำให้เกิดภาวะเครียดจากการขาดน้ำ พบว่าปริมาณน้ำสัมพัทธ์ของ *P. acutifolius* ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ของ *P. vulgaris* ลดลง แต่จากการทดลองพบว่าหญ้ารูชีส่วนใหญ่ มีค่า RWC ไม่สัมพันธ์กับระดับการทนแล้ง เช่นค่า RWC ในสภาพที่งดน้ำ 7 วันของโคลน 16 (88.03%) และ 22 (88.48%) ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งน้อยกลับมีค่า RWC สูงกว่าของโคลน 37 (65.94%) และ 101 (57.02%) ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งได้ดี เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาของ Carmo-silva *et al.* (2007) ที่พบว่า *Cynodon dactylon* ซึ่งทนแล้ง

ได้ดีกว่า มีค่า RWC ต่ำกว่า *Paspalum dilatatum* และ *Zoysia japonica* นอกจากนั้นยังพบว่า ปฏิกริยาการสังเคราะห์แสงของ *C. dactylon* ยังคงเกิดขึ้นได้แม้ว่าจะมีการขาดน้ำจนถึงขั้นวิกฤต และมีการใช้น้ำอย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า *P. dilatatum* และ *Z. japonica* การที่ *C. dactylon* มีความสามารถในการทนแล้ง กลับมีค่า RWC ต่ำอาจเนื่องจาก *C. dactylon* ใช้กลไกการทนแล้ง (drought tolerance) โดยค่า RWC ลดลงส่งผลให้สารละลายภายในเซลล์เข้มข้นขึ้น ค่า osmotic potential ภายในเซลล์จึงลดลงด้วย ในขณะที่ *P. dilatatum* และ *Z. japonica* ใช้กลไกในการเลี่ยงแล้ง (drought avoidance) เพื่อลดการสูญเสียน้ำทำให้มีค่า RWC สูงกว่า *C. dactylon* โดย *P. dilatatum* อาศัยการปิดปากใบ ส่วน *Z. japonica* อาศัยการปิดปากใบ การม้วนของใบ และมีขน (trichome) เพื่อช่วยลดการสูญเสียน้ำ นอกจากนั้นการค่า RWC ที่ลดลงนั้นเป็นกลไกหนึ่งในการรักษาแรงดันเต่งของเซลล์ และการปรับค่า osmotic potential ภายในเซลล์ เนื่องจากเมื่อค่า RWC ลดลงส่งผลให้ปริมาตรของเซลล์ลดลง และผนังเซลล์เกิดการหดตัว ทำให้สารละลายภายในเซลล์เข้มข้นขึ้น การที่ปริมาตรของเซลล์ลดลงนั้น อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ cell wall elasticity ซึ่ง cell wall elasticity (CWE) เป็นหนึ่งในลักษณะทางสรีรวิทยาที่สำคัญในการปรับตัวของพืชต่อความเครียดที่เกิดจากการขาดน้ำ (Ackerson and Hebert, 1981; Martínez *et al.*, 2005; Radin, 1983) เช่นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง RWC และค่า osmotic potential ของข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) 2 พันธุ์คือ Condor ซึ่งสามารถปรับตัวต่อความเครียดที่เกิดจากการขาดน้ำได้ดีกว่า Capelle Desprez' พบว่า เมื่อได้รับความเครียดที่เกิดจากการขาดน้ำ ค่า RWC ของ Condor ลดลงมากกว่า Capelle Desprez' สอดคล้องกับค่า osmotic potential ของ Condor ลดลงมากกว่า Capelle Desprez' (Gupta and Berkowitz, 1987)

การหาค่าความเข้มข้นของ PEG ที่ทำให้หญ้ารูซี่ตายเป็นร้อยละ 50 ของชุดควบคุม

ในการศึกษาระดับการทนแล้งโดยการนำหญ้ารูซี่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อการศึกษาระดับในการทนแล้งของหญ้ารูซี่ โดยการหาค่าความเข้มข้นของ PEG ที่ทำให้หญ้ารูซี่ตายเป็นร้อยละ 50 ของชุดควบคุม (LD_{50}) ของหญ้ารูซี่ 20 โคลนพบว่า โคลนที่ผ่านการประเมินจากสภาพแปลงว่าอยู่ในกลุ่มที่สามารถทนแล้งได้ดีส่วนใหญ่มีค่า LD_{50} สูงกว่ากลุ่มที่สามารถทนแล้งต่ำ (ภาพที่ 4) เช่นเดียวกับ Georgieva *et al.* (2004) ที่ใช้ PEG เป็นสารคัดเลือกพันธุ์ราสเบอร์รี่ที่ทนแล้ง 5 พันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อพบว่า

ราสเบอร์รี่พันธุ์ Bulgarski rubin และ Elite 1 เป็นพันธุ์ที่ทนแล้งมากกว่า เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การเจริญลดลง และการรั่วของไอออนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์น้อยกว่า Samodiva, Lyulin และ Elite 3 เมื่อความเข้มข้นของ PEG ที่ได้รับสูงขึ้นเป็น 20 หรือ 25 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องจากการเคลื่อนที่ของน้ำผ่านเข้าออกเซลล์ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของ water potential ของสารละลายภายใน และภายนอกเซลล์ ซึ่งปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อกระบวนการขยายขนาด และการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้นการเติม PEG ลงไปในอาหารทำให้น้ำเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง และถ้าใช้ PEG ในความเข้มข้นที่สูงมากพอ เซลล์จะสูญเสียน้ำ เนื่องจาก PEG ผลิต osmotic potential ของสารละลายที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ ทำให้เซลล์อยู่ในสภาพขาดน้ำ ส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลง (Bressan *et al.*, 1981)

เมื่อเปรียบเทียบการคัดเลือกพืชสายพันธุ์ทนแล้งโดยการใช้ PEG ในสภาพปลอดเชื้อ กับระดับในการทนแล้งของหลักรูซึ่งในสภาพแปลงที่การประเมินระดับการทนแล้งจากลักษณะภายนอกเช่น การม้วนใบ มุมระหว่างแผ่นใบกับก้านใบ และการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของลำต้น พบว่าการจัดกลุ่มโคลนที่ทนแล้งและไม่ทนแล้งที่ได้จากการประเมินในสภาพแปลงนั้นส่วนใหญ่สอดคล้องกับ LD₅₀ อาจเนื่องจากลักษณะภายนอกที่ใช้ประเมินระดับการทนแล้ง เช่น มุมระหว่างแผ่นใบกับก้านใบ หรือการเปลี่ยนแปลงทิศทาง หรือองศาใบเพื่อลดการรับแสง ทำให้ใบมีการคายน้ำเพื่อลดอุณหภูมิของใบลดลง ซึ่งเป็นกลไกการเลี่ยงแล้ง (drought avoidance) อย่างการหนึ่งของพืช (Zulkarnain *et al.*, 2009) นอกจากนั้น การม้วนหรือการเหี่ยวของใบเมื่อพืชขาดน้ำยังเป็นอีกลักษณะสำคัญของหญ้า เนื่องจากพืชกลุ่มนี้มี bulliform cell ที่ช่วยให้ใบม้วนงอได้ ซึ่งจะช่วยลดการคายน้ำ ทำให้พืชทนต่อความเครียดจากการขาดน้ำมากยิ่งขึ้น พืชที่ม้วนใบได้มากกว่าอาจจะทนต่อความแห้งได้มากกว่าด้วย การม้วนใบจึงอาจใช้เกณฑ์ในการคัดเลือกพันธุ์ที่ทนแล้ง (O'Toole and Cruz., 1980; Chandra and Dubey, 2009; Zulkarnain *et al.*, 2009) แต่มีบางโคลนที่ค่า LD₅₀ กับระดับการทนแล้งภายในแปลงไม่สอดคล้องกัน เช่น โคลน 90 เมื่อประเมินจากสภาพแปลงเป็นโคลนที่ทนแล้งน้อย แต่เมื่อประเมินจากค่า LD₅₀ กลับเป็นโคลนที่ทนแล้งได้ดี ส่วนโคลน 17 และ 107 เมื่อประเมินจากสภาพแปลงแล้วเป็นโคลนที่ทนแล้งได้ดี แต่เมื่อประเมินจาก LD₅₀ จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความทนแล้งปานกลาง ซึ่งการประเมินจากสภาพแปลงเป็นการประเมินจากลักษณะภายนอก ซึ่งอาจไม่สอดคล้องกับกลไกทางสรีรวิทยาในการทนแล้งที่แตกต่างกัน เช่น *Paspalum dilatatum* และ *Zoysia japonica* ที่ใช้กลไกในการเลี่ยงแล้ง (drought avoidance) เช่น การม้วนใบ

การปรับมุมระหว่างแผ่นใบกับกาบใบ การเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของลำต้น เพื่อปรับตัวต่อสภาวะเครียดจากการขาดน้ำ แต่มีระดับการทนแล้งต่ำกว่า *Cynodon dactylon* ที่ใช้กลไกการทนแล้ง (drought tolerance) ในการปรับตัวต่อสภาวะเครียดจากการขาดน้ำ ซึ่งทำให้ *C. dactylon* ยังคงมีอัตราการสังเคราะห์แสงคงที่แม้ว่าจะขาดน้ำอย่างรุนแรง และมีการใช้น้ำอย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า *P. dilatatum* และ *Z. japonica* (Carmo-silva *et al.*, 2007) ดังนั้นการประเมินระดับการทนแล้งในสภาพขาดน้ำที่ควบคุมด้วย PEG จึงช่วยให้ทราบระดับการทนแล้งที่แน่นอน และเป็นวิธีการที่น่าสนใจ เนื่องจากการคัดเลือกพืชที่ทนต่อสภาพแห้งแล้งจากการขาดน้ำภายใต้สภาพธรรมชาติเป็นกระบวนการที่ใช้เวลานาน และขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ (Georgieva *et al.*, 2004)

เมื่อนำค่าการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ และปริมาณน้ำสัมพัทธ์มาหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เพื่อหาลักษณะการตอบสนองในสภาพแปลงที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดกรองหญ้าวัชพืชทนแล้ง โดยการเปรียบเทียบกับค่า LD_{50} ที่ศึกษาในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง LD_{50} กับ RWC ของหญ้าวัชพืชค่อนข้างต่ำ อาจเนื่องจากกลไกที่หญ้าวัชพืชใช้ในการเอาชนะสภาพที่ขาดน้ำมีความแตกต่างกันบางโคลนใช้กลไกในการเลี่ยงแล้ง (drought avoidance) บางโคลนใช้กลไกในการทนแล้ง (drought tolerance) มีผลต่อค่า RWC ของพืชอย่างมากจึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นเกณฑ์เพื่อคัดกรองหญ้าวัชพืชที่ทนแล้ง ส่วนความสัมพันธ์ระหว่าง LD_{50} กับ EL พบว่ามีสหสัมพันธ์ในเชิงลบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เป็น 0.91 แสดงว่ามีความสัมพันธ์ค่อนข้างมาก (ตารางที่ 1) ดังนั้นค่า EL จึงสามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดกรองหญ้าวัชพืชโคลนที่ทนแล้งได้ เช่นเดียวกับการทดลองใน Kentucky bluegrass (*Poa pratensis* L.) 5 พันธุ์ เมื่อมีการขาดน้ำเป็นระยะเวลานานขึ้น ค่า EL ของแต่ละพันธุ์จะเพิ่มขึ้นแตกต่างกัน โดยพันธุ์ Award, Conni, Nuglade และ Impact ค่าเพิ่มขึ้นเมื่อขาดน้ำ 3 วัน ส่วน Bluechip ค่า EL จะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อขาดน้ำ 9 วัน และค่า EL ของพันธุ์ Award และ Conni สูงกว่า Nuglade, Impact และ Bluechip อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อขาดน้ำตั้งแต่ 6 ถึง 21 วัน นอกจากนั้นยังพบว่าค่า EL ที่เพิ่มขึ้นยังสอดคล้องกับการเหี่ยวของใบ และปริมาณ malondialdehyde (MDA) ที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นค่า EL จึงสามารถใช้เป็นลักษณะทางสรีรวิทยาในการคัดเลือก Kentucky bluegrass และพืชไร่หลายชนิด เพื่อให้ได้สายพันธุ์ทนแล้งได้อย่างดี และอย่างรวดเร็ว (Bajji *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004) โดยไม่ขึ้นกับกลไกการทนแล้ง

การปรับค่า osmotic potential ของเซลล์ (osmotic adjustment)

พืชที่ทนต่อความแห้งแล้งหลายชนิดอาศัยการปรับค่า osmotic potential ภายในเซลล์เพื่อเอาชนะความแห้งแล้งทั้งระยะสั้น และระยะยาว โดยทั่วไปเมื่อพืชได้รับความเครียดจากการขาดน้ำ จะสะสมสารออสโมไลต์ภายในเซลล์สูงขึ้น เนื่องจากการสะสมสารออสโมไลต์ภายในเซลล์นั้น ทำให้ค่า osmotic potential ภายในเซลล์ให้ต่ำกว่าสารละลายภายนอก ทำให้น้ำยังคงสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ (Merchant and Adams, 2005; Tavakol and Pakniyat, 2007) สำหรับในการศึกษาการปรับค่า osmotic potential ของหน่อกล้วย 10 โคลนที่มีค่า LD_{50} ต่ำสุด 5 โคลน และที่มีค่า LD_{50} สูงสุด 5 โคลน ในสภาพหลอดทดลอง ซึ่งในขั้นตอนนี้ศึกษาการตอบสนองการเปลี่ยนแปลงค่าออสโมแลลลิตี ปริมาณโปรตีน และปริมาณ total soluble sugar จึงทำการทดลองที่ PEG ความเข้มข้นเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการศึกษาก่อนทำการทดลอง (ไม่ได้แสดงข้อมูล) พบว่าหน่อกล้วยในสภาพปลอดเชื้อเมื่อได้รับ PEG ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์นั้น ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโต จนไม่สามารถนำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของหน่อกล้วยในสภาพขาดน้ำ

เมื่อพืชได้รับความเครียดจากการขาดน้ำค่าออสโมแลลลิตีของเซลล์สูงขึ้น เช่นเดียวกับการทดลองที่พบว่า ค่าออสโมแลลลิตีของหน่อกล้วยทั้ง 10 โคลนมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับ PEG ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น เมื่อพิจารณาค่าที่ PEG ความเข้มข้น 0 – 10 เปอร์เซ็นต์ ค่าออสโมแลลลิตีจากใบเพิ่มเพียงเล็กน้อย แต่ค่าออสโมแลลลิตีจะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อหน่อกล้วยได้รับ PEG ความเข้มข้น 15 หรือ 20 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าหน่อกล้วยสามารถปรับค่า osmotic potential เมื่อขาดน้ำจนถึงระดับวิกฤติ (Pagter *et al.*, 2005) นอกจากนั้นยังพบว่าโคลน 16, 22, 35, และ 112 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งต่ำ (ค่า LD_{50} ต่ำ) ค่าออสโมแลลลิตีเพิ่มขึ้นน้อยกว่าโคลน 23, 37, 80, 90 และ 101 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งได้ดี (ค่า LD_{50} สูงกว่า) เช่นเดียวกับการทดลองของ Sarker *et al.* (2004) ที่เปรียบเทียบการตอบสนองต่อความเครียดจากการขาดน้ำ ของ *Solanum melongena* L. และ *Lycopersicon esculentum* Mill. พบว่า *S. melongena* สามารถทนต่อความเครียดจากการขาดน้ำ และฟื้นตัวได้ดีกว่า *L. esculentum* เมื่อพิจารณาจากค่าออสโมแลลลิตีของสารละลายภายในเซลล์ พบว่า *S. melongena* มีค่าเพิ่มขึ้นมากกว่า *L. esculentum* และค่าออสโมแลลลิตีของพืชทั้งสองชนิดมีค่ามากกว่าชุดควบคุม การที่ *S. melongena* สามารถฟื้นตัวจากการขาดน้ำได้เร็วกว่า *L. esculentum*

อาจเนื่องจากเซลล์มีการสะสมสารออสโมไลต์ในช่วงที่ขาดน้ำ เพื่อช่วยรักษาแรงดันเต่ง และปรับค่า osmotic potential ภายในเซลล์ เมื่อเซลล์ได้รับน้ำจะสามารถฟื้นตัวได้เร็ว แต่เมื่อพิจารณาโคลน 12 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งต่ำ กลับมีค่าออสโมแลลิตีสูงสุด แสดงให้เห็นว่าการปรับค่าออสโมแลลิตีเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอที่จะทำให้พืชสามารถทนแล้งได้ อาจต้องอาศัยการลดปริมาณของเซลล์เพื่อช่วยในการรักษาแรงดันเต่ง โดยเมื่อพิจารณาจากค่า RWC ของโคลน 12 ยังมีค่ามากกว่าโคลนที่ทนแล้งได้ดีโคลนอื่นๆ เช่น 101, 37 และ 23 โดยการค่า RWC ที่ลดลงนั้นเป็นกลไกหนึ่งในการรักษาแรงดันเต่งของเซลล์ และการปรับค่า osmotic potential ภายในเซลล์ เนื่องจากเมื่อค่า RWC ลดลงส่งผลให้ปริมาณของเซลล์ลดลง และผนังเซลล์เกิดการหดตัว ทำให้สารละลายภายในเซลล์เข้มข้นขึ้น การที่ปริมาณของเซลล์ลดลงนั้น อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ cell wall elasticity ซึ่ง cell wall elasticity (CWE) เป็นหนึ่งในลักษณะทางสรีรวิทยาที่สำคัญในการปรับตัวของพืชต่อความเครียดที่เกิดจากการขาดน้ำ (Ackerson and Hebert, 1981; Martínez *et al.*, 2005; Radin, 1983)

โพรลีนเป็นสารสำคัญในการปรับค่า osmotic potential ของเซลล์พืชหลายชนิดให้ต่ำกว่าสารละลายภายนอกเมื่อพืชอยู่ในภาวะเครียดจากการขาดน้ำ ซึ่งจากการทดลองที่ชักนำให้หนูารู้ชี้ทั้ง 10 โคลนเกิดการขาดน้ำด้วย PEG พบว่าการสะสมโพรลีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ PEG สูงขึ้น โดยปริมาณโพรลีนที่สูงขึ้นทำให้ค่า osmotic potential ของเซลล์ต่ำลงทำให้พืชสามารถดูดน้ำจากภายนอกเข้ามาได้ (Kumar *et al.*, 2003) และระดับการสะสมโพรลีนของพืชหลายชนิดมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการทนแล้ง กล่าวคือพืชที่ทนแล้ง (stress tolerance) มีปริมาณโพรลีนสูงกว่าพืชที่ไม่ทนแล้ง (stress-sensitive) เช่น การชักนำให้เกิดการขาดน้ำในต้นกล้าข้าวโพด (*Zea mays* L.) 2 พันธุ์ด้วย PEG พบว่าพันธุ์ Giza 2 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ทนแล้งได้ดีมีปริมาณโพรลีนมากกว่าพันธุ์ Trihybrid 321 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไม่ทนแล้ง (Moussa and Abdel-Aziz, 2008) นอกจากนี้ปริมาณโพรลีนในใบข้าว (*Oryza sativa* L. cv. Taichung Native 1) มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับ PEG จาก 0-12 ชั่วโมง และเมื่อได้รับ PEG เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ปริมาณโพรลีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Hsu *et al.*, 2003) เช่นเดียวกับพืชน้ำในสภาวะปกติจะไม่มีการสะสมโพรลีน แต่เมื่อชักนำให้เกิดการขาดน้ำเป็นเวลา 14 วันกลับมีการสะสมโพรลีนอย่างมาก (Yamada *et al.*, 2005) ดังนั้นอาจใช้การสะสมโพรลีนเป็นเกณฑ์ใน

การคัดเลือกพืชสายพันธุ์ที่ทนแล้งได้ (Manivannan *et al.*, 2007) เช่นการตอบสนองของข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) เมื่ออยู่ในภาวะขาดน้ำ โดยใช้ PEG เป็นตัวกำหนดค่า osmotic potential ให้มีค่า -1.0 MPa จากการทดลองพบว่า ข้าวสาลีพันธุ์ C306 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ทนแล้ง มีการสะสมโปรตีนสูงกว่าพันธุ์ HD 2329 ซึ่งเป็นพันธุ์ไวต่อขาดน้ำ (Nayyar, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับหลัารู้ชี้โคลนที่ทนแล้งได้ดีมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าโคลนที่ทนแล้งต่ำ

ส่วนปริมาณ total soluble sugar ของหลัารู้ชี้ทั้ง 10 โคลน เมื่อความเข้มข้นของ PEG เพิ่มขึ้น พบว่าแต่ละ โคลนมีการตอบสนองที่แตกต่างกัน มีทั้งที่ปริมาณ total soluble sugar ลดลง เพิ่มขึ้น และค่อนข้างคงที่ ซึ่งสอดคล้อง Moradshahi *et al.* (2004) ที่นำ *Brassica napus* L 2 พันธุ์มาเลี้ยงในสารละลาย PEG ที่มีค่า water potential 0, -0.29, -0.48 และ -0.71 MPa ตามลำดับ พบว่าที่ -0.29 MPa พันธุ์ Aghaii ซึ่งเป็นพันธุ์ทนแล้งมีปริมาณ total soluble sugar สูงกว่า พันธุ์ PO4 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไม่ทนแล้ง ในขณะที่ -0.71 MPa พันธุ์ PO4 มีปริมาณ total soluble sugar สูงกว่า พันธุ์ Aghaii ซึ่งอาจเกิดจากพืชแต่ละพันธุ์มีกระบวนการ หรือการสะสมสารที่แตกต่างกัน เพื่อใช้เป็นกลไกในการป้องกันความเครียดที่เกิดความเค็ม และความแห้งแล้ง นอกจากนั้นปริมาณซูโครส กลูโคส และฟรุกโทสของ sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) ลดลงเมื่อได้รับความเครียดจากปริมาณเกลือที่เพิ่มขึ้น โดยที่สารละลาย NaCl ความเข้มข้น 2 dSm⁻¹ มีปริมาณซูโครส 17.4 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่สารละลาย NaCl ความเข้มข้น 12 dSm⁻¹ มีปริมาณซูโครส 12.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณกลูโคส และฟรุกโทสที่ NaCl ความเข้มข้น 2 dSm⁻¹ และ 4 dSm⁻¹ ไม่แตกต่างกัน แต่ที่ 8 dSm⁻¹ และ 12 dSm⁻¹ ปริมาณกลูโคส และฟรุกโทสกลับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ การที่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตของ sweet sorghum เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ NaCl ความเข้มข้นต่ำ แต่เมื่อ NaCl ที่ได้รับมีความเข้มข้นสูงขึ้น กลับมีปริมาณลดลง อาจเป็นเพราะ sweet sorghum ดูดน้ำกลับเข้าไป ทำให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตเจือจางลง (Almodares *et al.*, 2008) นอกจากนั้นโคลน 90 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งได้ดี มีปริมาณ total soluble sugar ลดต่ำลงเมื่อได้รับ PEG ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น อาจสอดคล้องกับการทดลองของ Newton *et al.* (1986) ที่ได้คัดเลือกพันธุ์ข้าวฟ่างที่ทนแล้งโดยใช้ PEG เป็นสารชักนำให้เกิดสภาพเครียดจากการขาดน้ำ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ PEG สูงขึ้น พันธุ์ที่ทนแล้งมากจะมีปริมาณตัวถูกละลาย เช่น ซูโครส กลูโคส ฟรุกโทส และมาเลต ต่ำ แต่น้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น ในขณะที่พันธุ์ที่ทนแล้งน้อยจะมีปริมาณตัวถูกละลายสูง และน้ำหนักแห้งที่ลดลง ซึ่งแสดง

ให้เห็นว่า เซลล์ของพันธุ์ที่ทนแล้งนำตัวถูกละลายนั้นไปใช้สร้างองค์ประกอบของเซลล์ ทำให้น้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้น ส่วนพันธุ์ที่ทนแล้งน้อยนั้น เซลล์นำตัวถูกละลายส่วนหนึ่งไปใช้ปรับค่า osmotic potential ภายในเซลล์ จึงทำให้ตัวถูกละลายที่ใช้สร้างองค์ประกอบของเซลล์ลดลง ซึ่งมีผลทำให้น้ำหนักแห้งลดลง และปริมาณ total soluble sugar ของโคลน 90 ที่ลดลงนั้น นอกจากนั้นยังมีการสะสมโปรตีน และออสโมแลลลิตีสูง ซึ่งค่าออสโมแลลลิตีเป็นการวัดค่าความเข้มข้นของสารอินทรีย์ และอนินทรีย์ทั้งหมดที่ละลายภายในแวกคิวโอล โดยไอออนมีส่วนในการปรับค่า osmotic potential ภายในแวกคิวโอล และการใช้ไอออนในการปรับค่า osmotic potential จะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์น้อย เนื่องจากการสูญเสียพลังงานน้อยกว่าที่ใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ เพียงแต่ใช้ในการลำเลียงไอออนเข้าไปในแวกคิวโอลเท่านั้น (Handa *et al.*, 1983) และการที่สะสมตัวถูกละลายอนินทรีย์ ได้แก่ ไอออนต่างๆ โดยเฉพาะ K^+ ที่มีการสะสมในแวกคิวโอล เพื่อปรับค่า osmotic potential แวกคิวโอล การสร้างสมดุล (osmotic equilibrium) ระหว่างแวกคิวโอล และไซโทซอล (Borowitzka, 1981; Taiz and Zeiger, 2002) เพื่อทดแทนปริมาณ total soluble sugar ที่มีปริมาณน้อย เช่นเดียวกับโคลน 101 ซึ่งเป็นโคลนที่มีระดับการทนแล้งสูงสุด แต่กลับมีการสะสมปริมาณ total soluble sugar น้อย แต่มีการสะสมโปรตีนสูงสุด และมีค่าออสโมแลลลิตีสูงเช่นเดียวกัน

ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง LD_{50} การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ (EL) ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (RWC) เมื่อน้ำ 7 วัน และ ออสโมแลลลิตี ปริมาณโปรตีน และปริมาณ total soluble sugar เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG ที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน ของหนักรูชีทั้ง 10 โคลน

เมื่อนำค่าเฉลี่ยของ LD_{50} และค่าออสโมแลลลิตีของหนักรูชีที่มีค่า LD_{50} สูงสุด และต่ำสุด อย่างละ 5 โคลนมาหาความสัมพันธ์ พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง LD_{50} กับ ออสโมแลลลิตีของหนักรูชีค่อนข้างต่ำ (ตารางที่ 4) อาจเนื่องจากหนักรูชีอาจอาศัยการรักษาแรงดันเต่งของเซลล์ เพื่อรักษากิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ โดยการสูญเสียจากแวกคิวโอล ซึ่งปริมาตรของแวกคิวโอลมีประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเซลล์ ส่งผลให้ค่า RWC ลดลง สารละลายภายในเซลล์จะเข้มข้นขึ้น และทำให้เซลล์เกิดการหดตัว ปริมาตรของเซลล์จึงลดลง (Martínez *et al.*, 2007; Merchant and Adams, 2005; Beck *et al.*, 2007) ซึ่งสอดคล้องกับค่าสหสัมพันธ์ระหว่าง LD_{50} กับ

ออสโมแลลลิตี ที่มีค่าต่ำกว่าค่าสหสัมพันธ์ระหว่าง LD_{50} กับ RWC ที่เป็นในเชิงลบ เมื่อพิจารณาค่า RWC ของหญ้าที่ทิ้งน้ำ 7 วันในสภาพแปลงพบว่าโคลน 23, 37, 80, 90 และ 101 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งได้ดี มีค่า LD_{50} สูง กลับมีค่า RWC ต่ำกว่าโคลน 16, 22, 35 และ 112 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งต่ำ แสดงให้เห็นว่าโคลนทนแล้งอาจใช้การลดปริมาณของเซลล์ลง ทำให้สารละลายภายในเซลล์เข้มข้นขึ้นเป็นกลไกหนึ่งในการปรับค่า osmotic potential ภายในเซลล์ให้กว่าสารละลายภายนอก จึงสามารถรักษาแรงดันเต่งเอาไว้ได้ และกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ยังคงทำงานเป็นปกติ ในขณะที่โคลนทนแล้งต่ำยังคงมีค่า RWC สูง อาจเนื่องมาจากพืชใช้กลไกในการเลี่ยงแล้ง (drought avoidance) ในการควบคุมการสูญเสียน้ำเช่น การเหี่ยว การม้วนของใบ รวมทั้งการปิดปากใบ เพื่อรักษาระดับปริมาณน้ำในเซลล์ (Carmo-silva *et al.*, 2007) นอกจากนั้น พืชอาจอาศัยการปรับค่า osmotic potential ในสารละลายแวคิวโอลเป็นกลไกกรอง โดยพืชจะปรับเมื่อพืชขาดน้ำจนถึงขั้นวิกฤต ซึ่งสอดคล้องกับค่าออสโมแลลลิตีของ *Phragmites australis* จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีการขาดน้ำอย่างรุนแรง (ได้รับน้ำ 5 เปอร์เซ็นต์ของชุดควบคุม) (Pagter *et al.*, 2005)

ส่วนความสัมพันธ์ระหว่าง LD_{50} และ โพรลีน มีค่าสหสัมพันธ์ในเชิงบวก โดยที่ความเข้มข้นของ PEG เป็น 20 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์มากที่สุดคือ 0.827 แสดงให้เห็นว่า การสะสมโพรลีนของพืชมีความสัมพันธ์กับการทนต่อสภาพขาดน้ำ เช่นเดียวกับพืชหลายชนิดที่มีโพรลีนเป็นสารสำคัญในการปรับค่า osmotic potential ของเซลล์ให้ต่ำการสารละลายภายนอกในสภาวะเครียดจากการขาดน้ำ เช่นการทดลองในข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ Kranti พบว่ามีปริมาณโพรลีนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม หลังจากนำมาชักนำให้เกิดความเครียดจากการขาดน้ำโดย PEG-6000 และแมนนิทอล นอกจากนั้นยังมีข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L. cv. W7) (Lei *et al.*, 2007) อ้อย (*Saccharum officinarum*) (Huang *et al.*, 2007), Moroccan wheat (El-kaoua, 2006) ที่มีการสะสมโพรลีนเป็นกลไกที่ทำให้ทนแล้ง และโดยทั่วไปพันธุ์ที่มีการสะสมโพรลีนมากกว่าจะมีความทนต่อสภาพเครียดมากกว่า (Ashraf and Foolad, 2007) เช่นการทดลองของ Moussa and Abdel-Aziz (2008) ที่นำข้าวโพด 2 พันธุ์คือ Giza 2 และ Trihybrid 321 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ทนแล้ง และไม่ทนแล้ง ตามลำดับ มาเลี้ยงในสารละลาย PEG ที่มีค่า water potential เป็น 0, -5, -10 และ -20 bar พบว่า Giza 2 มีปริมาณโพรลีนมากกว่า Trihybrid 321 เนื่องจากปริมาณโพรลีนที่สูงขึ้นส่งผลให้ค่า osmotic potential ภายในเซลล์ต่ำลง ทำให้น้ำจากภายนอกสามารถเข้ามาภายในเซลล์ได้

นอกจากนั้นการที่หยูร์ซึ่งสะสมโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในสภาพขาดน้ำ อาจเป็นการสร้างสมดุลของค่า water potential ระหว่างภายในแวคคิวโอล และไซโตซอล (Handa *et al.*, 1983) เนื่องจากค่า RWC ที่ลดลงของหยูร์ซึ่งอาจเกิดจากการสูญเสียน้ำจากแวคคิวโอล สารละลายภายในแวคคิวโอลเข้มข้นขึ้น ทำให้ค่า osmotic potential ลดต่ำลง ดังนั้นหยูร์ซึ่งจึงต้องมีการสะสมสารออสโมไลต์เพื่อปรับค่า osmotic potential ของไซโตซอลให้ต่ำลง ซึ่งสอดคล้องกับความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน กับ RWC ที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ถึง 0.732 และมีค่าสหสัมพันธ์ในเชิงลบ กล่าวคือมีปริมาณโปรตีนสูงเมื่อมีค่าปริมาณน้ำสัมพัทธ์ต่ำ โดยโปรตีนอาจเป็นสารออสโมไลต์ที่สำคัญของหยูร์ซึ่งที่สะสมเพื่อเป็นการรักษาสมดุลของค่า water potential ระหว่างภายในแวคคิวโอล และไซโตซอล นอกจากนี้ปริมาณโปรตีนยังมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับค่าออสโมแลลลิตีอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับการทดลองของ Sarker *et al.* (2004) ที่งุ่นน้ำ *Solanum meongena* L. และ *Lycopersicum esculentum* Mill. เป็นเวลา 15 วัน พบว่าปริมาณโปรตีนมีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่าออสโมแลลลิตี กล่าวคือโคลนที่ทนแล้งมีปริมาณโปรตีนสูง และค่าออสโมแลลลิตีสูง

นอกจากนั้น Lannucci *et al.* (2000) ยังกล่าวว่าค่า osmotic potential ออสโมแลลลิตี และปริมาณโปรตีนของ *Trifolium alexandrinum* L. มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ โดยค่าออสโมแลลลิตีและปริมาณโปรตีนสูงขึ้นเป็นกลไกในการปรับตัวในสภาพขาดน้ำ ซึ่งทำให้ค่า osmotic potential ของเซลล์ลดลง ทำให้น้ำจากภายนอกสามารถเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ได้ และปริมาณโปรตีนของหยูร์ซึ่งยังมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญในเชิงลบกับค่าการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ โดยโคลนที่ทนแล้งมีปริมาณโปรตีนสูง การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์น้อยกว่าโคลนที่ทนแล้งน้อย เนื่องจากโปรตีนเป็นสารออสโมไลต์ที่มีคุณสมบัติเป็น osmoprotectant (Sarker *et al.*, 2004) และ Vendruscolo *et al.* (2007) กล่าวว่าโปรตีนมีความสำคัญในการป้องกันการเกิดออกซิเดชัน และลดการเกิด oxidative damage ในข้าวสาลีที่ถูกตัดต่อพันธุกรรม (*Triticum aestivum* L. cv. CD200126) ให้มีการแสดงออกของยีน P5CS มากกว่าปกติ ซึ่ง P5CS เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสังเคราะห์โปรตีน เมื่องุ่นน้ำเป็นเวลา 15 วัน ต้นที่ถ่ายยีนมีปริมาณโปรตีนมากกว่าต้นปกติ 2 เท่า โดยที่ไม่ได้รับถ่ายยีนมีปริมาณ MDA (malondialdehyde) ซึ่งเป็นสารหนึ่งที่บ่งบอกการเกิด lipid peroxidation และความเสียหายของเซลล์ สูงกว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีน 65 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า MSI (membrane stability index) ซึ่งเป็นดัชนีแสดงความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยประเมินจากการนำไฟฟ้า และค่า MSI มีความสัมพันธ์แบบผกผันกับปริมาณ MDA โดยในต้นที่

ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีค่า MSI ลดลง 73 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีค่า MSI ลดลงเพียง 36 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการทดลองของ Parvanova *et al.* (2004) ที่พบว่าต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนให้มีปริมาณโพรลีนมากขึ้น มีปริมาณ MDA น้อยกว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และยังพบว่าค่า MSI สูงกว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงปริมาณโพรลีนจึงอาจใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกหนักรูฐที่ทนแล้งได้

สำหรับค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง LD₅₀ กับ total soluble sugar ของหนักรูฐที่ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากปริมาณ total soluble sugar ของหนักรูฐแต่ละ โคลนเมื่อได้รับ PEG ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น มีการตอบสนองที่แตกต่างกัน มีทั้งที่ปริมาณลดลง เพิ่มขึ้น และค่อนข้างคงที่ อาจเป็นเพราะน้ำตาลไม่ใช่สารหลักในการปรับค่า osmotic potential ภายในเซลล์ของหนักรูฐ เช่นเดียวกับองุ่น (*Vitis vinifera* L, cv. Savatiano) เมื่อได้รับความเครียดจากการขาดน้ำพบว่าปริมาณน้ำตาลมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ โดยความเข้มข้นของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเช่น กลูโคส และฟรุกโทสไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่ปริมาณซูโครสลดลงเล็กน้อย ในขณะที่ปริมาณไอออนอนินทรีย์ (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺) กลับมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แสดงให้เห็นว่าไอออนอนินทรีย์อาจเป็นสารประกอบหลักที่ทำหน้าที่ปรับค่า osmotic potential ภายในเซลล์องุ่น (Patakas *et al.*, 2002) ซึ่งสอดคล้องกับ Slama *et al.* (2007) ที่กล่าวว่าในพืชบางชนิดการตอบสนองของน้ำตาลค่อนข้างดี เมื่อได้รับความเครียดจากการขาดน้ำ และอาจเป็นสารออสโมไลต์ที่สำคัญในการปรับค่า osmotic potential ภายในเซลล์ ในขณะที่ *Sesuvium portulacastrum* เมื่อได้รับความเครียดจากการขาดน้ำจะพบปริมาณน้ำตาลที่ใบเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (10-12 มิลลิโมลาร์) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งเป็นไปได้ว่าการสะสมสารออสโมไลต์อาจมีปริมาณไม่มากพอที่จะทำหน้าที่ปรับค่า osmotic potential แต่จะทำหน้าที่เป็นสารในการป้องกันพืชเมื่อเกิดสภาวะเครียดขึ้น เช่นทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ และป้องกันการเกิดการยังยั้งการสังเคราะห์แสง เช่น การทดลองของ Abebe *et al.* (2003) ที่นำข้าวสาลีที่ผ่านการถ่ายยีน mannitol-1-phosphatase dehydrogenase gene (*mtID*) โดยยีนนี้ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ mannitol-1-phosphate dehydrogenase ในการเปลี่ยน Fructose-6-phosphate ให้เป็น mannitol-1-phosphate โดยแมนนิทอลเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่สะสมมากขึ้นเมื่อพืชอยู่ในภาวะที่ไม่เหมาะสมเช่น ขาดน้ำ และความเข้มข้นของเกลือสูง จากการทดลองพบว่าข้าวสาลีที่ได้รับการถ่ายยีนมีการทนแล้ง และทนเค็มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามปริมาณ

แมนนิทอลที่สะสมเพิ่มขึ้นน้อยเกินกว่าที่จะทำหน้าที่เป็นสารออสโมไลต์ ดังนั้นจึงคาดว่าแมนนิทอลน่าจะทำหน้าที่กำจัด reactive oxygen species (ROS) นอกจากนั้นยังพบว่า การสะสมปริมาณโพรลีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ PEG สูงขึ้น และปริมาณ total soluble sugar ของหนักรูซึ่งทั้ง 10 โคลนมีแนวโน้มคงที่ ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถในการเพิ่มปริมาณโพรลีน และการรักษาปริมาณน้ำตาลที่คงที่ในสภาพขาดน้ำสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดความทนแล้งของพันธุ์ถั่วลิสงได้ (Riduan *et al.*, 2005)

จากการประเมินการทนแล้งของหนักรูซึ่ง ด้วยลักษณะภายนอกซึ่งแสดงออกถึงการปรับตัวต่อสภาวะแห้งแล้ง เช่น การม้วนหรือการเหี่ยวของใบเมื่อขาดน้ำ ซึ่งจะช่วยลดการคายน้ำ และการปรับมุมระหว่างแผ่นใบกับกาบใบ หรือการเปลี่ยนทิศทางเพื่อลดการรับแสง ซึ่งจะช่วยให้อุณหภูมิของใบไม่สูงเกินไป กลไกดังกล่าวเป็นกลไกการเลี่ยงแล้ง (drought avoidance) (O'Toole and Cruz., 1980; Chandra and Dubey, 2009; Zulkarnain *et al.*, 2009) ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงปริมาณโพรลีน เพื่อปรับระดับความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์ ที่จะทำให้ศักย์ของน้ำ (water potential) ในพืชลดลง (Martínez *et al.*, 2007; Beck *et al.*, 2007) เป็นกลไกทางสรีรวิทยาในการทนแล้ง (drought tolerance) การคัดกรองโดยประเมินด้วยสายตาจึงมีโอกาสผิดพลาดได้ ดังเช่น โคลน 90 เมื่อประเมินจากสภาพแปลงเป็นโคลนที่ทนแล้งน้อย แต่เมื่อประเมินจากค่า LD₅₀ กลับเป็นโคลนที่ทนแล้งได้ดี ส่วนโคลน 17 และ 107 เมื่อประเมินจากสภาพแปลงแล้วเป็นโคลนที่ทนแล้งได้ดี แต่เมื่อประเมินจาก LD₅₀ จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความทนแล้งปานกลาง ดังนั้น ในทางปฏิบัติในการคัดเลือกหนักรูซึ่งทนแล้งจากประชากรจำนวนมาก เพื่อให้การคัดเลือกมีประสิทธิภาพ จึงควรใช้ค่า EL และ RWC ในการคัดกรองให้ได้โคลนที่ทนแล้งได้ดีจำนวนหนึ่งเสียก่อน เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย เครื่องมือราคาไม่สูง ไม่ต้องใช้พืชทั้งต้น จากนั้นจึงคัดเลือกให้ได้โคลนที่ทนแล้งสูงสุดจากโคลนที่ผ่านการคัดกรอง โดยนำมาเพิ่มปริมาณในสภาพหลอดทดลอง และศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณโพรลีนในสภาพที่ขาดน้ำ และ/หรือ LD₅₀ ในสภาพหลอดทดลอง เนื่องจากการศึกษาในสภาพหลอดทดลองสามารถควบคุมค่า osmotic potential ของสารละลายที่อยู่ล้อมรอบเซลล์โดยอาศัย PEG จึงช่วยให้ทราบการตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำที่แน่นอน ดังเห็นได้จากตารางที่ 2 ซึ่งเปรียบเทียบค่า LD₅₀, EL เมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ค่า RWC เมื่องดน้ำ 7 วัน และค่าออสโมแลลลิตี ปริมาณโพรลีน และปริมาณ total soluble sugar เมื่อได้รับ

PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ จากการตอบสนองต่อสภาพที่ขาดน้ำในหญ้ารัฐโคลนที่ทนแล้งได้ดี (มีค่า LD_{50} อยู่ในช่วง 35.09-39.42 เปอร์เซ็นต์ PEG) และที่ทนแล้งต่ำ (มีค่า LD_{50} อยู่ในช่วง 18.07-28.65 เปอร์เซ็นต์ PEG) จะเห็นได้ชัดเจนว่า หญ้ารัฐโคลนที่ทนแล้งได้ดีมีการตอบสนองที่แตกต่างจากโคลนที่ทนแล้งต่ำอย่างชัดเจน 3 ประการคือ 1) มีค่า EL ต่ำกว่าโคลนทนแล้งต่ำ 2) มีค่า RWC ต่ำกว่าโคลนที่ทนแล้งต่ำ 3) มีปริมาณโปรตีนสูงกว่าโคลนที่ทนแล้งต่ำ



สรุปผลการทดลอง

1. การคัดกรองหญ้าที่ปลูกในสภาพแปลงด้วยการประเมินจากลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น การม้วนใบ มุมระหว่างแผ่นใบกับกาบใบ และลำต้นที่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จำนวน 20 โคลน ซึ่งเป็นตัวแทนของหญ้าที่ทั้งหมด 113 โคลน เมื่อทดสอบระดับการทนแล้งในสภาพปลอดเชื้อ โดยพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของ PEG-6000 ที่ทำให้หญ้าที่ตายเป็นร้อยละ 50 ของชุดควบคุม (LD_{50}) พบว่ากลุ่มที่สามารถทนแล้งได้ดีในสภาพแปลงส่วนใหญ่ มีค่า LD_{50} มากกว่ากลุ่มที่สามารถทนแล้งต่ำในสภาพแปลง โดยโคลน 101 มีค่า LD_{50} สูงที่สุดคือ 39.4 เปอร์เซ็นต์ PEG และโคลน 16 มีค่า LD_{50} ต่ำที่สุดคือ 18.08 เปอร์เซ็นต์ PEG ยกเว้น โคลน 90 เป็นโคลนที่เมื่อประเมินจากสภาพแปลงแล้วมีความสามารถในการทนแล้งต่ำ แต่มีค่า LD_{50} 37.1 เปอร์เซ็นต์ PEG ซึ่งอยู่ในกลุ่มที่ทนแล้งได้ดีเมื่อประเมินจากค่า LD_{50} ในขณะที่โคลน 17 และ 107 ที่สามารถทนแล้งได้ดีในสภาพแปลง กลับมีค่า LD_{50} 31.37 และ 33.89 เปอร์เซ็นต์ PEG ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในกลุ่มที่ทนแล้งปานกลางจากการประเมินด้วยค่า LD_{50}

2. การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการของหญ้าที่อยู่ในสภาพขาดน้ำ พบว่า

2.1 การตรวจสอบการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของหญ้าที่ทั้ง 3 ขั้นตอนคือ การล้าง (washing) การชักนำให้เกิดการขาดน้ำ (dehydration) และการให้ใบดูดน้ำกลับ (rehydration) ระยะเวลาที่เหมาะสมในการล้างเพื่อกำจัดเซลล์ตาย และสารต่างๆ ที่ผิวใบคือ 15 นาที จากนั้นการที่ใบหญ้าที่ได้รับ PEG-6000 ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อชักนำให้ใบหญ้าที่อยู่ในสภาพขาดน้ำ และการให้ใบหญ้าที่ดูดน้ำกลับเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างโคลนที่ทนแล้งได้ดี และทนแล้งต่ำได้ชัดเจนที่สุด

2.2 การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหญ้า 20 โคลน ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ โคลนที่ทนแล้งได้ดีมีการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ต่ำกว่าโคลนทนแล้งต่ำ โดยโคลน 101 เป็นโคลนที่มีค่าการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ต่ำสุดคือ 1.03 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโคลน 12 มีค่าสูงสุดคือ 3.42 เปอร์เซ็นต์

2.3 ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ของใบหญาฐิที่แช่น้ำในสภาพแปลงเป็นเวลา 7 วัน ในโคลนที่ทนแล้งได้ดีมีค่าต่ำกว่าโคลนที่ทนแล้งต่ำ โดยโคลน 101 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งได้ดี มีปริมาณน้ำสัมพัทธ์ต่ำสุดคือ 57.02 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่โคลน 22 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งต่ำ มีปริมาณน้ำสัมพัทธ์ สูงสุดคือ 88.48 เปอร์เซ็นต์

2.4 หญาฐิที่ผ่านการประเมินระดับการทนแล้งจากลักษณะภายนอก 20 โคลน เมื่อทดสอบระดับการทนแล้งในสภาพปลอดเชื้อ โดยพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของ PEG-6000 ที่ทำให้หญาฐิตายเป็นร้อยละ 50 ของชุดควบคุม (LD_{50}) พบว่าหญาฐิโคลนที่ทนแล้งได้ดีมีค่า LD_{50} อยู่ในช่วง 35.09-39.42 เปอร์เซ็นต์ PEG ซึ่งสูงกว่าโคลนที่ทนแล้งต่ำที่มีค่า LD_{50} อยู่ในช่วง 18.07-28.65 เปอร์เซ็นต์ PEG โดยโคลน 101 เป็นโคลนที่มีค่า LD_{50} สูงสุดคือ 39.42 เปอร์เซ็นต์ PEG โคลน 16 เป็นโคลนที่มีค่า LD_{50} ต่ำสุดคือ 18.08 เปอร์เซ็นต์ PEG

2.5 ค่าออสโมแลลลิตีของหญาฐิมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับ PEG ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น โดยโคลนที่ทนแล้งได้ดีมีค่าออสโมแลลลิตีเพิ่มขึ้นมากกว่าโคลนทนแล้งต่ำ โดยโคลน 101 เป็นโคลนที่ทนแล้งได้ดีมีค่าออสโมแลลลิตี 644.5 มิลลิโมลต่อกิโลกรัม และโคลน 22 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งต่ำมีค่าออสโมแลลลิตี 394.00 มิลลิโมลต่อกิโลกรัม ยกเว้นโคลน 12 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งต่ำ กลับมีค่าออสโมแลลลิตีสูงสุดคือ 800.083 มิลลิโมลต่อกิโลกรัม

2.6 เมื่อหญาฐิได้รับ PEG-6000 ความเข้มข้น 0-20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณโปรตีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อ PEG มีความเข้มข้นสูงขึ้น หญาฐิโคลนที่ทนแล้งได้ดีมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าโคลนที่ทนแล้งต่ำ ที่ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ โคลน 101 ซึ่งทนแล้งได้ดีที่สุด มีปริมาณโปรตีนสูงสุด 552.06 ppm ส่วนโคลน 35 ซึ่งทนแล้งต่ำ มีปริมาณโปรตีนต่ำสุด 111.58 ppm

2.7 ปริมาณ total soluble sugar ภายในเซลล์ใบแต่ละโคลนของหญาฐิ เมื่อได้รับ PEG ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น แต่ละโคลนมีการตอบสนองที่แตกต่างกัน มีทั้งที่ปริมาณ total soluble sugar ลดลง เพิ่มขึ้น และค่อนข้างคงที่ จึงอาจไม่ได้มีส่วนสำคัญในการปรับค่า osmotic potential ภายในไซโทพลาสซึมของหญาฐิ

3. ระดับการทนแล้งของหญ้าที่มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณโพรลินของหญ้าที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วันเนื่องจากพบว่า LD_{50} มีสหสัมพันธ์กับทั้งสองค่าอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าความสัมพันธ์สหสัมพันธ์ -0.940 และ 0.827 ตามลำดับ



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2545. **หยูร์ชี**. โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.

กอบแก้ว ตรงคงสิน. 2535. **พืชอาหารสัตว์เขตร้อน**. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

จินดา สนิทวงศ์ ณ อยุธยา และกัลยา บุญญานุวัตร. 2539. การทดสอบและสาธิตการใช้หยูร์ชีหมักสำหรับโครีดนมในช่วงฤดูแล้ง, น. 52-60. ใน **รายงานประจำปีของกองอาหารสัตว์**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

จิรรัตน์ สัจจิตานนท์, กานดา นาคมนิ, สิงห์ ไชยวงศ์ และชาญชัย มณีคุณ. 2532. อัตราปุ๋ยไนโตรเจนและวิธีการใส่ปุ๋ยที่มีต่อผลผลิตเมล็ดหยูร์ชี, น. 63-69. ใน **รายงานผลงานวิจัยพืชอาหารสัตว์ พ.ศ.2520-2530**. กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

เฉลิมพล เข้มเพชร. 2542. **สรีรวิทยาการผลิตพืชไร่**. นพบุรีการพิมพ์, เชียงใหม่.

ชัยฤกษ์ มณีพงษ์. 2523. ธัญพืชทนแล้ง. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร** 13: 247-251.

นพพร สายัมพล. 2543. **เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประภาพร พงษ์ไทย. 2546. การคัดเลือกข้าว (*Oryza sativa* L.) ทนแล้งในสภาพแปลงทดลองและหลอดทดลอง. **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท**, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ลักขณา วุฒิปราชญ์อำไพ, ชูเวียน สัจจะเวทะ, ปิยนาด เกตุวงศ์, มงคล หาญกล้า และชาญชัย มณีคุณ. 2527. การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อความงอกของเมล็ดหยูร์ชี, น. 81-85. ใน **รายงานประจำปีของกองอาหารสัตว์**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ศรีสม สุวรรณวงศ์. 2549. การรับอนเมแทบอลิซึม, น. 97-151. ใน ลิลลี่ กาวิทัះ มาลี ณ นคร ศรีสม สุวรรณวงศ์และ สุริยา ตันติวิวัฒน์. **สรีรวิทยาของพืช**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สาขันธ์ ทัดศรี. 2547. **พืชอาหารสัตว์เขตร้อน**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Abebe, T., A. C. Guenzi, B. Martin and J. C. Cushman. 2003. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. **Plant physiol.** 131: 1748-1755.

Ackerson, R. C. and R. R. Herbert. 1981. Osmoregulation in cotton in response to water stress. I. Alternations in photosynthesis, leaf conductance, translocation and ultrastructure. **Plant physiol.** 67: 484-88.

Adejare, F.B. and C.E. Umebese. 2007. Stomatal resistance to low leaf water potential at different growth stages affects plant biomass in *Glycine max L.* **Am. J. Agri. & Biol. Sci.** 2(3): 136-141.

Agarie, S., N. Hanaoka, F. Kubota, W. Agata and B. Kaufman. 1995. Measurement of cell membrane stability evaluated by electrolyte leakage as a drought and heat tolerance test in rice (*Oryza sativa L.*). **J. Fac. Agr. Kyushu Univ.** 40: 233-240.

Almodares, A., M. R. Hadi and H. Ahmapour. 2008. Sorghum stem yield and soluble carbohydrates under different salinity levels. **Afr. J. Biotechnol.** 7(22): 4051-4055.

Ashraf, M. and M. R. Foolad. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environ. Experi. Bot.** 59: 206-216.

- Aspinall, D. and L.G. Paleg. 1981. Proline accumulation: Physiological aspects, pp. 206-242. *In* L.G. Paleg and D. Aspinall, eds. **The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants**. Academic Press, Australia.
- Bajji, M., J.M. Kinet and S. Lutts. 2002. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. **Plant Growth Regul.** 36(1): 61-70.
- Bajracharya, D. 1999. **Experiments in Plant Physiology**. Narosa Publishing House, India.
- Bandurska, H. 2000. Does proline accumulated in leaves of water deficit stressed barley plants confine cell membrane injury free proline accumulation and membrane injury index in drought and osmotically stressed plants. **Acta Physiol. Plant.** 22(4): 409-415.
- _____ and J. Floryszak-Wieczorek. 2002. Water deficit-induced membrane injury and oxidative stress in two barley genotypes. **Acta Soc. Bot. Pol.** 71: 17-21.
- Bates, L.S., S.P. Waldren and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil** 39: 205-207.
- Beck, H. E., S. Fettig, C. Knake, K. Hartig and T. Bhattarai. 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. **J. Bio. Sci.** 32(3): 501-510.
- Biswas, J., B. Chowdhury, A. Bhattacharya and A.B. Mandal. 2002. *In vitro* screening for increased drought tolerance in rice. **In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant** 38: 525-530.
- Blake, T. J., E. Bevilacqua and J. J. Zwiazek. 1991. Effects of repeated stress on turgor pressure and cell elasticity changes in black spruce seedlings. **Can. J. For. Res.** 21: 1329-33.

- Borowitzka, L.J. 1981. Solute accumulation and regulation of cell water activity, pp. 97-130. *In* L.G. Paleg and D. Aspinall, eds. **The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants**. Academic Press, Australia.
- Brian, L.E. and D. Pharm. 2003. Osmolality and osmolarity: narrowing the terminology gap. **Pharmacotherapy** 23(9): 1085–1086
- Bressan, R. A., P. M. Hasegawa and A. K. Handa. 1981. Resistance of cultured higher plant cells to polyethylene glycol-induced water stress. **Plan. Sci. Letters** 21: 23-30.
- Carmo-Silva, A.E., A.S. Soares, J.M. da Silva, A. Bernardes da Silva, A.J. Keys and M.C. Arrabaca. 2007. Photosynthetic responses of three C4 grasses of different metabolic subtypes to water deficit. **Funct. Plant Biol.** 34: 204-213.
- Cechin, I., S.C. Rossi, V.C. Oliveira and T.F. Fumis. 2006. Photosynthetic responses and proline content of mature and young leaves of sunflower plants under water deficit. **Photosynthetica** 44: 143-146.
- Chandra, A. and A. Dubey. 2009. Assessment of ploidy level on stress tolerance of *Cenchrus* species based on leaf photosynthetic characteristics. **Acta Physiol. Plant.** 31: 1003-1013.
- Clifford, S. C., S. K. Arndt, J. E. Corlett, S. Joshi, N. Sankhla, M. Popp and H. Jones 1998. The role of solute accumulation, osmotic adjustment and changes in cell wall elasticity in drought tolerance in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). **J. Exp. Bot.** 49 (323): 967–977.
- Dacosta, M. and B. Huang. 2006. Osmotic adjustment associated with variation in bentgrass tolerance to drought stress. **J. Am. Soc. Hort. Sci.** 131: 338-344.

- Delauney, A.J. and D.P.S. Verma. 1993. Proline biosynthesis and degradation in plants. **Plant J.** 4: 215-223.
- El-kaoua, M. R. Serraj, M. Benichou and D. Hsissou. 2006. Comparative sensitivity of two Moroccan wheat varieties to water stress: The relationship between fatty acids and proline accumulation. **Botanical Studies** 47: 51-60.
- El-tayeb, M.A. 2006. Differential response of two *Vicia faba* cultivars to drought: growth, pigments, lipid peroxidation, organic solutes, catalase and peroxidase activity. **Acta Agro. Hung.** 54(1): 25-37
- Ehwald, R., E. Richter and M. Schlangstedt. 1984. Solute leakage from the isolated parenchyma of *Allium cepa* and *Kalanchoe daigremontiana*. **J Exp Bot** 35, 1095-1103.
- Fábio M. D. and D. C. R. José. 2006. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Braz. J. Plant Physiol.** 18(1): 55-81.
- Fazeli, F., M. Ghorbanli and V. Niknam. 2006. Effect of drought on water relation, growth and solute accumulation in two sesame cultivars. **Pak. J. Biol. Sci.** 9: 1829-1835.
- Georgieva, M., D. Djilianov, T. Konstantinova and D. Parvanova. 2004. Screening of bulgarian raspberry cultivars and elites for osmotic tolerance *in vitro*. **Biotechnol. & Biotechnol. Eq.** 18(2): 95-98.
- Gnanasiri, S. P., D. T. Hahn, D. Rhodes and R. J. Joly. 1995. Leaf water relations and solute accumulation in two grain sorghum lines exhibiting contrasting drought tolerance. **J. Exp. Bot.** 46: 1833-1841.

- Gupta, A. S. and G. A. Berkowitz. 1987. Osmotic adjustment, symplast volume and nonstomatally mediated water stress inhibition of photosynthesis in wheat. **Plant Physiol.** 85: 1040-1047.
- Handa, S., R. A. Bressan, A. K. Handa and N. C. Carpita. 1983. Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant cells adapted to water stress. **Plant Physiol.** 73: 834-843.
- Hare, P. D., W. A. Cress and J. V. Staden. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant, Cell and Environ.** 21: 535-553.
- Hopkins, W.G. 2004. **Introduction to Plant Physiology.** John Wiley, Hoboken, NJ.
- Hsu, S.Y. and C. H. Kao. 2003. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regul.** 39: 83-90.
- _____, Y. T. Hsu and C. H. Kao. 2003. The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in leaves. **Biol. Plant.** 46(1): 73-78.
- Huang, C.M., L.-M. Bi, L.-T. Yang and Y.R. Li. 2007. Effects of polyethylene glycol stress on proline accumulation and the activities of the key enzymes in leaves of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) at the elongation stage. **Plant Physiology Communications** 43: 77-80.
- Jackson, W. T. 1962. Use of carbowaxes (polyethylene glycols) as osmotic agents. **Plant Physiol.** 37: 513-519.
- Jiang, Y. and B. Huang. 2002. Protein alterations in tall fescue in response to drought stress and abscisic acid. **Crop Sci.** 42:202-207

- Jones, M.M., N.C. Turner and C.B. Osmond. 1981. Mechanisms of drought resistance, pp. 15-38. In L.G. Paleg and D. Aspinall, eds. **The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants**. Academic Press, Australia.
- Kaiser, W. M. 1982. Correlation between changes in photosynthetic activity and changes in total protoplast volume in leaf tissue from hygro-, meso- and xerophytes under osmotic stress. **Planta** 154: 538-545.
- Kavi Kishor P.B., Z. Hong, G.H. Miao, C.A.A. Hu and D.P.S. Verma. 1995. Overexpression of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiol.** 108: 1387–1394.
- Khan, H. U. R., W. Link, T. J. Hocking and F. L. Stoddard. 2007. Evaluation of physiological traits for improving drought tolerance in faba bean (*Vicia faba* L.). **Plant Soil** 292: 205-217.
- Kocheva, K., P. Lambrev, G. Georgiev, V. Goltsev and M. Karabaliev. 2004. Evaluation of chlorophyll fluorescence and membrane injury in the leaves of barley cultivars under osmotic stress. **Bioelectrochemistry** 63: 121-124.
- Kocheva, K. V., G. I. Georgieva and V. K. Kochev. 2005. A diffusion approach to the electrolyte leakage from plant tissues. **Physiol. Plant.** 125: 1-9.
- Kolarovic, L., M. Luxová and P. Valentovic. 2006. Effect of osmotic stress in early stages of ontogenesis on root respiration, growth, sugar content, and cell injury in maize seedlings differing in drought sensitivity. **J. Integr. Plant Biol.** 48(7): 814-822.
- Kozlowski, T. T., P. J. Kramer and S. G. Pallardy. 1990. **The Physiological Ecology of Woody Plants**. Academic Press. New York. USA.

- Kumar, S.G., R. A Matta and C. Sudhakar. 2003. NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. **Plant Sci.** 165:1245–1251.
- Lannucci, K. O., A. Rasci, M. Russo, N. Di-Fonzo and P. Martiniello. 2000. Physiological responses to water stress following a conditioning period in berseem clover. **Plant Soil.** 223: 217-227.
- Lei, Y., C. Yin, J. Ren and C. Li. 2007. Effect of osmotic stress and sodium nitroprusside pretreatment on proline metabolism of wheat seedlings. **Biol. Plant.** 51(2): 386-390.
- Lobato, A. K. S., R. C. L. Costa, C.F.O. Neto, B.G.S. Filho, F.J.R. Cruz, J.M.N. Freitas and F.C. Cordeiro. 2008. Morphological change in soybean under progressive water stress. **Int. J. Bot.** 4(2): 231-235.
- Liu, L., R. Lafitte and D. Guan. 2004. Wild *Oryza* species as potential sources of drought-adaptive traits. **Euphytica** 138: 149–161.
- Luan, S. 2002. Signaling drought in guard cells. **Plant Cell Environ.** 25: 229–237
- Lui, W. J., S. Yuan, N. H. Zhang, T. Lei, H.G. Duan, H.G. Liang and H.H. Lin. 2006. Effect of water stress on photosystem 2 in two wheat cultivars. **Biol. Plant.** 50(4): 597-602.
- Mahajan, S. and N. Tuteja. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Plant Molecular Biology, Arch. Biochem. Biophys* 444: 139-158
- Manivannan, P., C. Abdul Jaleel, B. Sankar, A. Kishorekumar, R. Somasundaram, G.M.A. Lakshmanan and R. Panneerselvam. 2007. Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 59: 141–149.

- Matos, M. C., P. S. Campos, J. C. Ramalho, M. C. Medeira, M. I. Maia, J. M. Semedo, N. M. Marques and A. Matos. 2002. Photosynthetic activity and cellular integrity of the Andean Legume *Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi under Heat and Water Stress. **Photosynthetica** 40: 493-501.
- Marcum, B. K. and C. L. Murdoch. 1992. Salt tolerance of the coastal salt marsh grass, *Sporobolus virginicus* (L.) Kunth. **New Phytol.** 120: 281-288.
- Martínez, J. P., H. Silva, J. F. Ledent and M. Pinto. 2007. Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Europ. J. Agronomy.** 26: 30-38.
- Merchant, A. and M. Adams. 2005. Stable osmotic in *Eucalyptus spathulata*-responses to salt and water deficit stress. **Funct. Plant Biol.** 32: 797-805.
- Mohammadkhani, N. and R. Heidari. 2007. Effect of water stress on respiration, photosynthetic pigments and water content in two maize cultivars. **Pak. J. Biol. Sci.** 10(22): 4022-4028.
- Monreal, J.A., E.T. Jimenez, E. Remesal, R. Morillo-Velarde, S. Garcia-Maurino and C. Echevarria. 2007. Proline content of sugar beet storage roots: Response to water deficit and nitrogen fertilization at field conditions. **Environ. Experi. Bot.** 60: 257-267.
- Moore, J. P., M. Vitré-Gibouin, J. M. Farrant and A. Driouich. 2008. Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. **Physiol. Plant.** 134: 237-245.
- Moradshahi, A., B. S. Eskandari and B. Kholdebarin. 2004. Some physiological responses of canola (*Brassica napus* L.) to water deficit stress under laboratory conditions. **Iran. J. of Sci. & Tech.** 28 (1): 43-50.

- Mostajeran, A. and V. Rahimi-Eichi. 2009. Effects of drought stress on growth and yield of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars and accumulation of proline and soluble sugars in sheath and blades of their different ages leaves. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.** 5 (2): 264-272.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiol. Plant.** 15: 473-497.
- Moussa, H. R. and S. M. Abdel-Aziz. 2008. Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. **Aust. J. of Crop Sci.** 1(1): 31-36
- Nayyar, H. 2004. Variation in osmoregulation in differentially drought-sensitive wheat genotypes involves calcium. **Biol. Plant.** 47(4): 541-547.
- _____ and D.P.Walia. 2003. Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. **Biol. Plant.** 46(2): 275-279.
- Newton, R.J., S. Bhaskaran, J.D. Puryear and R.H. Smith 1986. Physiological changes in cultured sorghum cells in response to induced water stress I. Soluble carbohydrates and organic acids. **Plant Physiol.** 81: 626-629.
- Nilsen, E.T. and D.M. Orcutt. 1996. **Physiology of Plants Under Stress: Abiotic Factors.** John Willey & Sons Inc., USA.
- Nonami, H. and J. S. Boyer. 1989. Turgor and growth at low water potentials. **Plant Physiol** 89: 798-804.
- Norsaengsri, M. 2006. **Systematics of Poaceae subtribe setariinae in Thailand.** Ph.D. Thesis, Khon Kaen University.

- O'Toole, J. C. and R. T. Cruz. 1980. Response of leaf water potential, stomata resistance and leaf rolling to water stress. **Plant Physiol.** 65: 428-432.
- Pagter, M., C. Bragato and H. Brix. 2005. Tolerance and physiological responses of *Phragmites australis* to water deficit. **Aquat. Bot.** 81: 285-299.
- Pandey, R., R.M. Agarwal, K. Jeevaratnam and G.L. Sharma. 2004. Osmotic stress-induced alterations in rice (*Oryza sativa* L.) and recovery on stress release. **Plant Growth Regul.** 42: 79-87.
- Parvanova, D., S. Ivanov, T. Konstantinova, E. Karanov, A. Atanassov and T. Tsvetkov. 2004. Transgenic tobacco plants accumulating osmolytes show reduced oxidative damage under freezing stress. **Plant Physiol. and Biochem.** 42: 57-63.
- Patakas, A., N. Nikolaou, E. Zioziou, K. Radoglou and B. Noitsakis. 2002. The role of organic solute and ion accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. **Plant Sci.** 163: 361-367.
- Pattangual, W. and M. Madore. 1999. Water deficit effects on raffinose family oligosaccharide metabolism in *Coleus*. **Plant Physiol.** 121: 998-993.
- Prášil, I. and J. Zámecník. 1998. The use of a conductivity measurement method for assessing freezing injury I. Influence of leakage time, segment number, size and shape in a sample on evaluation of the degree of injury. **Environ. Experi. Bot.** 40: 1-10.
- Premachandra, G. S, H. Saneoka, K. Fujita and S. Ogata. 1993. Water stress and potassium fertilization in field grown maize (*Zea mays* L.): Effects on leaf water relations and leaf rolling. **J. Agron Crop. Sci.** 171(3): 195-201.

- Radin, J. W. 1983. Physiological consequences of cellular water deficits: osmotic adjustment. In: Taylor, J.M., D.W. Rains and T.R. Sinclair. eds. Limitations to efficient water use in crop production. **American Society for Agronomy (Publ.)**. 267–76.
- Rascio, A., M. Russo, L. Mazzucco, C. Platani, G. Nicastro and N. D. Fonzo. 2001. Enhanced osmotolerance of a wheat mutant selected for potassium accumulation. **Plant Sci.** 160: 441–448.
- Riduan, A., H. Aswidinnoor, J. Koswara and Sudarsono. 2005. Tolerance of several peanut cultivars against drought stress. **Hayati J. Biosci.** 12(1): 28-34.
- Rosa, M., M. Hilal, J. A. González and F.E. Prado. 2009. Low-temperature effect on enzyme activities involved in sucrose-starch partitioning in salt-stressed and salt-acclimated cotyledons of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seedlings. **Plant Physiol. Biochem.** 47: 300-307.
- Rhodes, D. and A. D. Hanson. 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 44: 357–384.
- Sarker, B. C., M. Here and M. Uemura. 2004. Comparison of response of two C3 species to leaf water relation, proline synthesis, gas exchange and water use under periodic water stress. **J. Plant Biol.** 47(1): 33-41.
- Satvir, K., A.K. Gupta and N. Kaur. 1998. Gibberellic acid and kinetin partially reverse the effect of water stress on germination and seedling growth in chickpea. **Plant Growth Regul.** 25: 29–33.
- Schultz, H. R. and M.A. Matthews. 1993. Growth, Osmotic Adjustment, and Cell-Wall Mechanics of Expanding Grape Leaves during Water Deficits. **Crop Sci.** 33(2): 287–294.

- Serraj, R. and T.R. Sinclair. 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions?. **Plant Cell and Environ.** 25: 333–341.
- Serraj, R. and T.R. Sinclair. 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions?. **Plant Cell and Environ.** 25: 333–341.
- Silva, E. N., S. Ferreira-Silva, R. A. Viégas and J. A. G. Silveira. 2010. The role of organic and inorganic solutes in the osmotic adjustment of drought-stressed *Jatropha curcas* plants. **Environ. Exp. Bot.** 69(3): 279-285
- Skerman, P.J. and F. Riveros. 1990. **Tropical Grasses.** Food and Agriculture Organization of The United Nation, Rome.
- Slama, I., T. Ghnaya, K. Hessini, D. Messedi, A. Savoure and C. Abdelly. 2007. Comparative study of the effects of mannitol and PEG osmotic stress on growth and solute accumulation in *Sesuvium portulacastrum*. **Environ. Experi. Bot.** 61: 10-17.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2002. **Plant physiology.** 3rd ed. Sinauer Associates, Inc. publishers, Sunderland.
- Tavakol, E. and H. Pakniyat. 2007. Evaluation of some drought resistance criteria at seedling stage in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Pak. J. Biol. Sci.** 10: 1113-1117.
- Turkan, I., M. Bor, F. Ozdemir and H. Koca. 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. **Plant Sci.** 168: 223-231.
- Turner, N.C. 1981. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. **Plant Soil** 58: 339–366.

Vendruscolo, E. C. G., I. Schusterb, M. Pileggic, C. A. Scapimd, H. B. C. Molinarie, C. J.

Marure and L. G. E. Vieirae. 2007. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. **J. Plant Physiol.** 164: 1367—1376.

Verslues P.E., M. Agarwal, S. Katiyar-Agarwal, J. Zhu and J. K. Zhu. 2006. Methods and

concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **Plant J.** 45(4):523-39.

Wakabayashi, K., T. Hoson and S. Kamisaka 1997. Osmotic stress suppresses cell wall

stiffening and the increase in cell wall-bound ferulic and diferulic acids in wheat coleoptiles. **Plant Physiol.** 133: 967-973.

Xu, Z. Z. and G. S. Zhou. 2006. Combined effects of water stress and high temperature on

photosynthesis, nitrogen metabolism and lipid peroxidation of a perennial grass *Leymus chinensis*. **Planta** 244: 1080-1090.

Yamada M., H. Morishita, K. Urano, N. Shiozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki and Y.

Yoshiba. 2005. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. **J. Experi. Bot.** 417 (56): 1975–1981.

Yancey, P. H. 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting

cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. **J. Experi. Biol.** 208: 2819-2830.

Zhou, Y., H. M. Lam and J. Zhang. 2007. Inhibition of photosynthesis and energy dissipation

induced by water and high light stresses in rice. **J. Experi. Bot.** 58(5): 1207-1217.

Zhu, X., H. Gong, G. Chen, S. Wang and C. Zhang. 2005. Different solute levels in two spring

wheat cultivars induced by progressive field water stress at different developmental stages. **J. Arid Environ.** 62: 1-14.

Zulkarnain, W.M., M.R. Ismail, M. Ashrafuzzaman, H. M. Saud and I.C. Haroun. 2009. Growth, physiological and biochem responses of Malaysia rice cultivars to water stress. **Pak. J. Biol. Sci.** 32(2): 323-333





ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบอาหารสูตร MS

สารเคมี	มิลลิกรัมต่อลิตร
Macrolements	
NH_4NO_3	1,650.00
KNO_3	1,900.00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.00
KH_2PO_4	170.00
Microelements	
H_3BO_3	6.20
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.90
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6.14
KI	0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.03
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.03
Na_2EDTA	37.25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85
Organic compounds	
Glycine	2.00
Myo-inositol	100.00
Nicotinic acid	0.50
Pyridoxine.HCl	0.50
Thiamine.HCl	0.10
Sucrose	30,000.00
Agar	8,00.00
pH 5.7-5.8	

ตารางผนวกที่ 2 เกณฑ์ในการคัดเลือกหมู่บ้าน 20 โคลน จากจำนวนหมู่บ้านทั้งหมด 113 โคลนในสภาพแปลง ทำการคัดเลือกจากการประเมินด้วยสายตา
หลังจากดูให้น้ำ 7 วัน โดยอาศัยการพิจารณาจากลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไป

ลักษณะ	โคลน																																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	
การมีวนใบ	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	X	0	0	0	X	√	√	0	0	0	X	√	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	√	0	
มุมใบตั้ง	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	X	0	0	0	X	√	√	0	0	0	X	√	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	√	0	
ลำต้น เปลี่ยน เป็นสี น้ำตาล	0	0	0	0	0	0	0	√	0	0	0	√	0	0	0	√	X	X	0	0	0	√	√	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	√	0	√	0	
การแตกกอ	0	0	0	0	0	0	0	√	0	0	0	√	0	0	0	√	√	X	0	0	0	√	√	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	√	0	√	0
ลำต้นอวบ	0	0	0	0	0	0	0	x	0	0	0	X	0	0	0	X	√	√	0	0	0	X	√	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	√	0	
รวม	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	4	5	5	5	4	8	6	5	5	5	4	10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	0	6	5	

ลักษณะ	โคลน																																						
	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	
การมีวนใบ	0	0	0	0	0	0	0	√	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	√	0	0	0	0	√	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
มุมใบตั้ง	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	√	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ลำต้น เปลี่ยน เป็นสี น้ำตาล	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	√	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	X	0	0	0	√	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
การแตกกอ	0	0	0	0	0	0	0	√	0	0	√	0	0	0	0	0	0	0	0	√	0	0	0	0	√	0	0	0	√	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ลำต้นอวบ	0	0	0	0	0	0	0	√	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	√	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
รวม	5	5	5	5	5	5	5	6	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	8	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ลักษณะ	โคลน																																					
	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112		
การม้วนใบ	0	0	0	√	0	0	0	0	0	0	0	0	0	√	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	√	0	√	0	0	0	√	0	0	0	0	X		
มุมใบตั้ง	0	0	0	√	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	√	0	√	0	0	0	√	0	0	0	0	X		
ลำต้น เปลี่ยน เป็นสี น้ำตาล	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	√	0	0	0	0	√	0	0	0	0	0	X	0	X	0	0	0	X	0	0	0	0	√		
การแตกกอ	0	0	0	X	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	√	0	0	0	0	0	X	0	X	0	0	0	X	0	0	0	0	√		
ลำต้นอวบ	0	0	0	√	0	0	0	0	0	0	0	0	0	X	0	0	0	0	X	0	0	0	0	0	√	0	√	0	0	0	√	0	0	0	0	X		
รวม	5	5	5	6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	6	5	6	5	5	5	6	5	5	5	5	4		

หมายเหตุ

X = น้อย มีค่า 0 คะแนน

O = ปานกลาง มีค่า 1 คะแนน

√ = มาก มีค่า 2 คะแนน

ตารางผนวกที่ 3 การร่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหญ้าที่ได้รับความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปแช่น้ำไว้ไออนในที่มีดเป็นเวลา 1, 2, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง

ช่วงเวลาคืนน้ำกลับ (ชั่วโมง)	การร่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ (%)		ค่าเฉลี่ย ^{1/}	ความแตกต่างของ ค่า EL
	โคลน 16	โคลน 17		
1	2.98	3.29	3.13 a	0.31
2	5.32	3.11	4.22 ab	2.21
4	5.26	4.51	4.89 bc	0.75
8	5.64	6.34	5.99 cd	0.70
24	6.60	6.90	6.75 d	0.30
ค่าเฉลี่ย ^{ns}	6.97	6.86		
CV (%)	22.3			

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการร่วของสารอิเล็กโทรไลต์ จากภายในเซลล์ของใบหญ้าที่ได้รับความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปแช่น้ำไว้ไออนในที่มีดเป็นเวลา 1, 2, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง

SV	DF	SS	MS	F
clone	1	0.821	0.821	0.660 ^{ns}
hour	4	48.827	12.207	9.814 [*]
clone*hour	4	8.344	2.086	1.677 ^{ns}
Error	20	24.877	1.244	
Total	29	82.869		

CV (%) 22.3

LSD_{0.05} ของช่วงเวลาคืนน้ำกลับ = 0.548

^{*} แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

^{ns} = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 5 ผลของระยะเวลาที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ต่อการรื้อของสาร
อิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหญ้าซึ่งเป็นเวลา 0.5, 1, 2, 4, 10, 16 และ 24
ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในน้ำไร้ออกซิเจนในที่มีดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ช่วงเวลาที่ได้รับ PEG (ชั่วโมง)	การรื้อของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ (%)		ค่าเฉลี่ย ^{1/}	ค่า EL ที่แตกต่าง ของหญ้าซึ่ง
	โคลน 16	โคลน 17		
0.5	1.75	1.41	1.57 a	0.34
1	2.28	1.52	1.90 a	0.76
2	5.08	2.13	3.61 ab	2.95
4	4.09	1.74	2.91 a	2.35
10	4.89	3.89	4.39 b	1.00
16	5.17	6.23	4.78 b	1.06
24	5.00	5.70	5.45 c	0.70
ค่าเฉลี่ย ^{2/}	4.04 y	3.00 x		
CV (%)	34.6			

^{1/, 2/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลของระยะเวลาที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ต่อการรื้อของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหญ้าซึ่งเป็นเวลา 0.5, 1, 2, 4, 10, 16 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในน้ำไร้ออกซิเจนในที่มีดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

SV	DF	SS	MS	F
Clone	1	11.337	11.337	7.648*
Hour	6	77.170	12.862	8.676*
clone*hour	6	14.677	2.446	1.650 ^{ns}
Error	28	41.508	1.482	
Total	41	144.691		

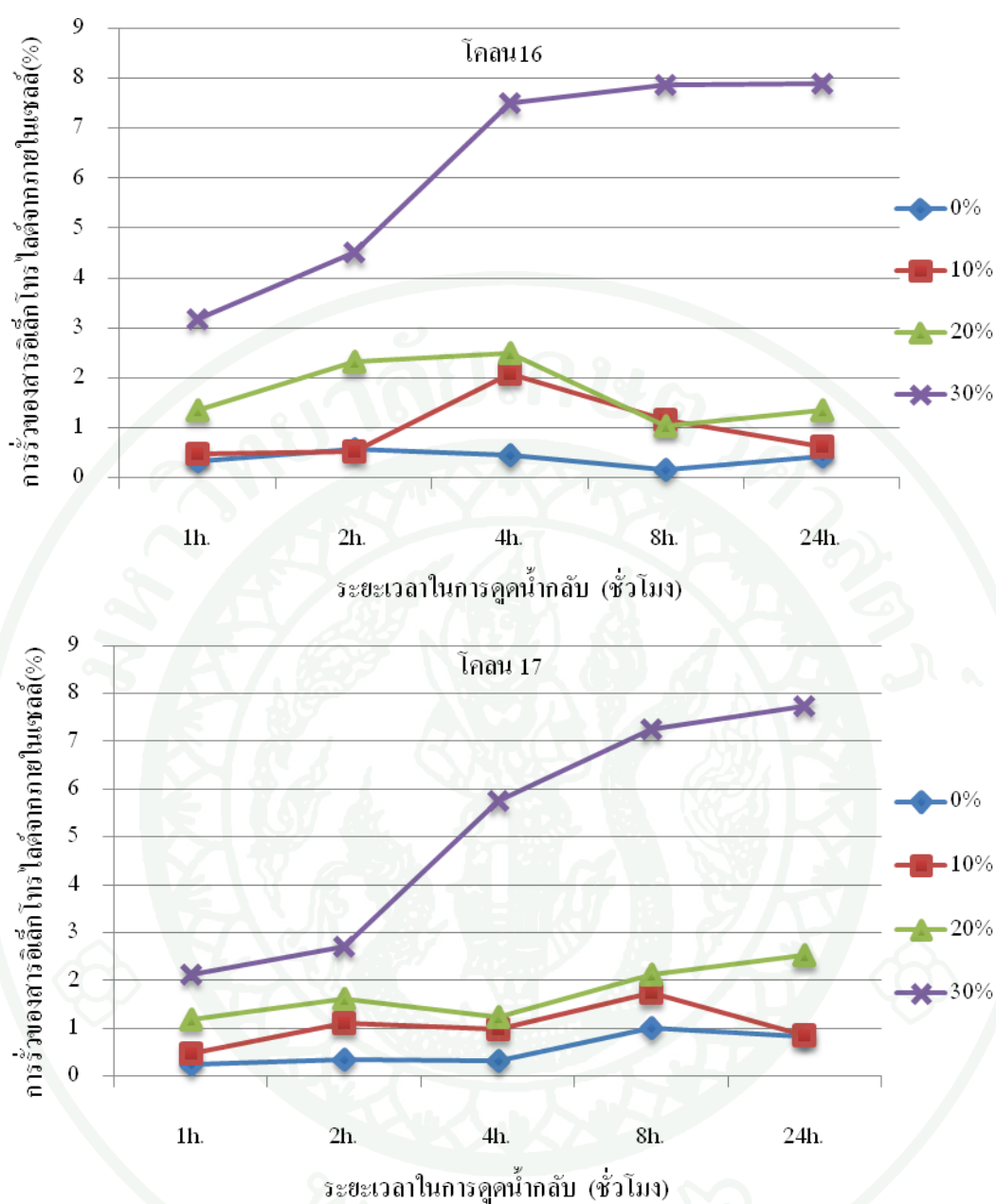
CV (%) 34.6

LSD_{0.05} ของโคลนหญ้าซึ่ง = 0.770

LSD_{0.05} ของช่วงเวลาที่ได้รับ PEG (ชั่วโมง) = 1.440

* แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

^{ns} = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



ภาพผนวกที่ 1 การรั่วของสารอีเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหญ้าธัญโคสน 16 และ 17 ที่ใช้
 ล้าง 30 นาที และได้รับ PEG ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 16
 ชั่วโมง แล้วแช่ในน้ำไร้ไอออนในที่มีดเป็นเวลา 1, 2, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อให้
 ใบดูน้ำกลับ

ตารางผนวกที่ 7 การร่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหญ้าที่ใช้เวลาล้าง 30 นาที และได้ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปแช่น้ำไร้ไอออนในที่มืดเป็นเวลา 1, 2, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ใบดูดน้ำกลับ

ช่วงเวลาดูดน้ำกลับ (ชั่วโมง)	การร่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ (%)		ค่าเฉลี่ย ^{1/}	ความแตกต่าง ของค่า EL
	โคลน 16	โคลน 17		
1	3.18	2.17	2.66 a	1.01
2	4.66	2.71	3.61 b	1.95
4	7.51	5.75	6.63 c	1.76
8	7.87	7.25	7.68 d	0.62
24	7.90	7.74	7.82 d	0.16
ค่าเฉลี่ย ^{2/}	6.19 y	5.16 x		
CV (%)	31.60			

^{1/}, ^{2/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการร่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหญ้าที่ใช้เวลาล้าง 30 นาที และได้ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปแช่น้ำไร้ไอออนในที่มืดเป็นเวลา 1, 2, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ใบดูดน้ำกลับ

SV	DF	SS	MS	F
clone	4	137.49	34.37	60.59*
hour	1	7.95	7.95	14.01*
clone*hour	4	3.45	0.86	1.52 ^{ns}
Error	20	11.35	0.57	
Total	29	160.24		

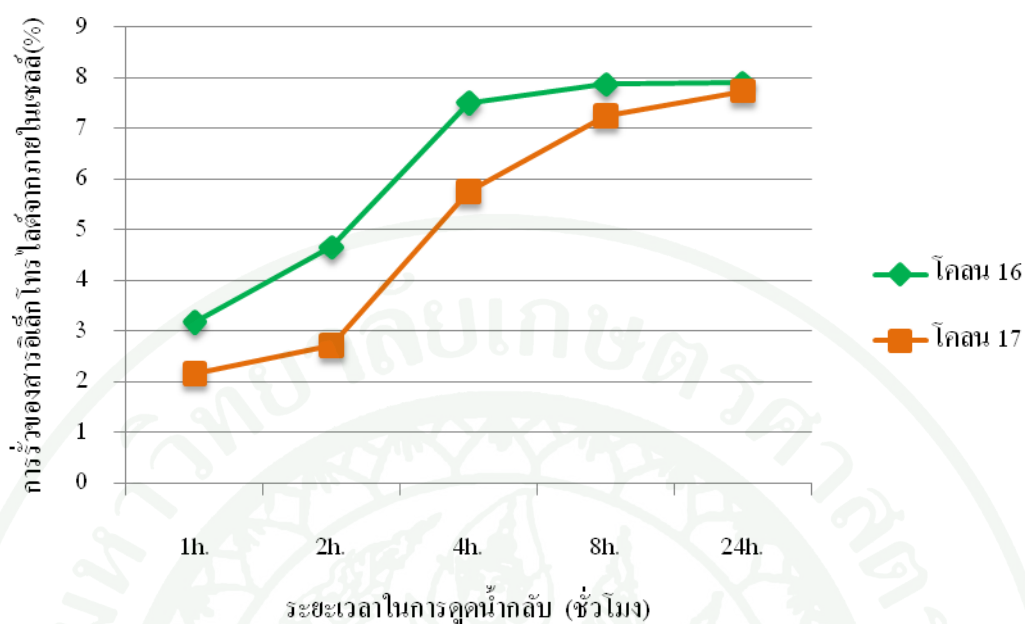
CV (%) 31.60

LSD_{0.05} ของโคลนหญ้า = 0.148125

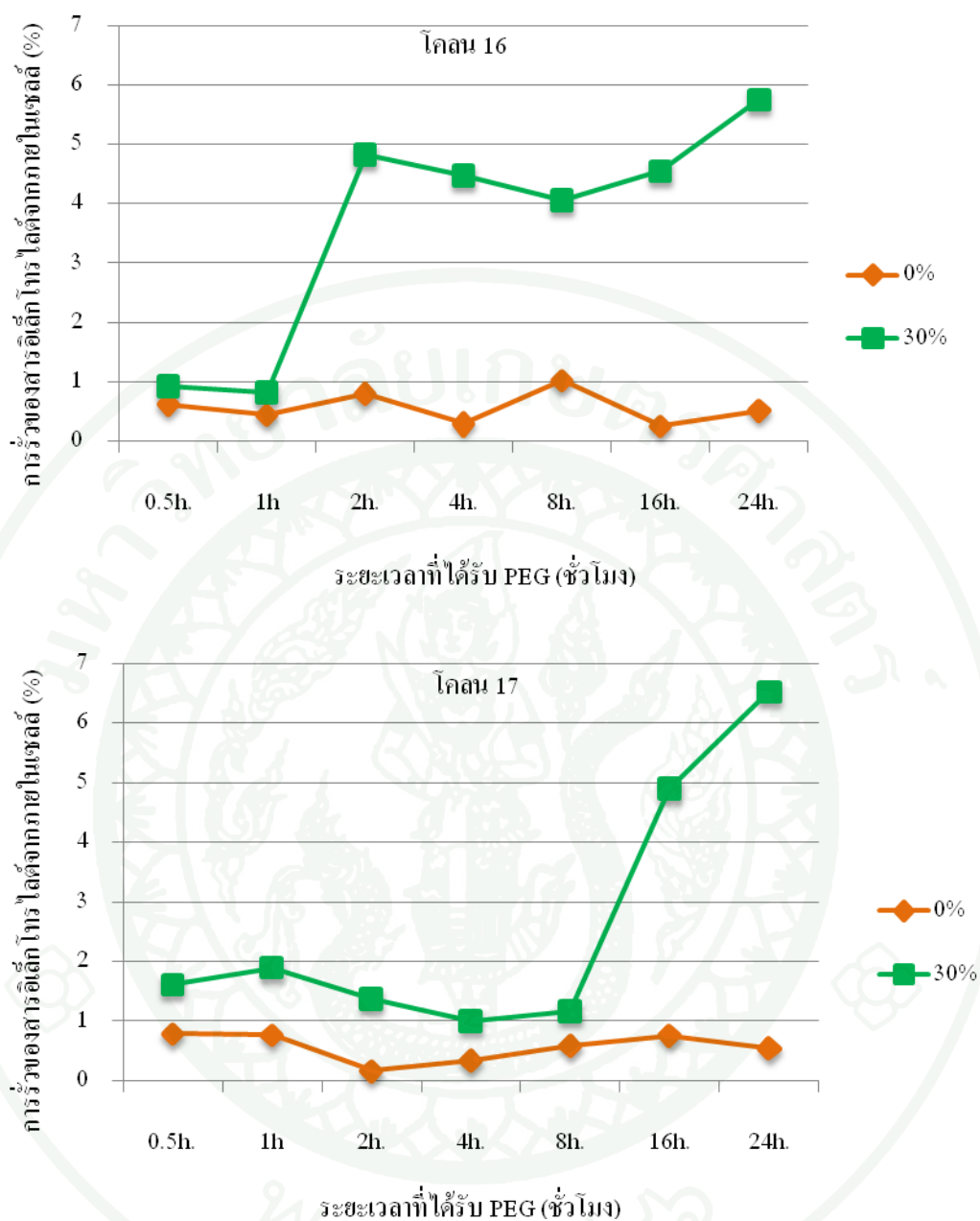
LSD_{0.05} ของช่วงเวลาดูดน้ำกลับ = 0.370311

* แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

^{ns} = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



ภาพผนวกที่ 2 การรื้อของสารอีเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหญ้าที่เปรียบเทียบระหว่างโคสน 16 และ 17 ที่ใช้เวลาดำง 30 นาที และได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่น้ำไร้ไอออนในที่มืดเป็นเวลา 1, 2, 4, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อให้ใบดูดน้ำกลับ



ภาพผนวกที่ 3 การรื้อของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของไบโพลีเมอร์โคลน 16 และ 17 ที่ใช้เวลาล้าง 30 นาที และได้รับ PEG ความเข้มข้น 0 และ 30 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 0.5, 1, 2, 4, 10, 16 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในน้ำไร้ไอออนในที่มีดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ตารางผนวกที่ 9 การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหญ้ารัฐโคลน 16 และ 17 ที่ใช้เวลาล้าง 30 นาที และเมื่อได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วแช่ในน้ำไร้ออกซิเจนที่มีดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ช่วงเวลาที่ได้รับ PEG (ชั่วโมง)	การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ (% ^{3/})		ค่าเฉลี่ย ^{1/}	ค่า EL ที่แตกต่างของ หญ้ารัฐ
	โคลน 16	โคลน 17		
0.5	0.92 A	1.61 C	1.14 a	-0.69
1	0.82 A	1.89 E	1.36 b	-1.07
2	4.83 H	1.37 C	3.10 e	3.45
4	4.47 G	1.00 AB	2.74 d	3.47
10	4.06 F	1.16 B	2.61 c	2.89
16	4.55 G	4.89 HI	4.72 f	-0.35
24	5.75 J	6.52 K	6.14 g	-0.77
ค่าเฉลี่ย ^{2/}	3.62 y	2.61 x		
CV (%)	47.69			

^{1/}, ^{2/}, ^{3/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางผนวกที่ 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการร่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์
ของใบหญ้าธัญพืชโคลน 16 และ 17 ที่ใช้เวลาล้าง 30 นาที และเมื่อได้รับ PEG
ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วแช่น้ำไร้ไอออนในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

SV	DF	SS	MS	F
Clone	6	114.73	19.12	27.00*
Hour	1	10.79	10.79	15.23*
clone*hour	6	40.94	6.82	9.64*
Error	28	19.83	0.71	
Total	41	186.29		

CV (%) 47.69

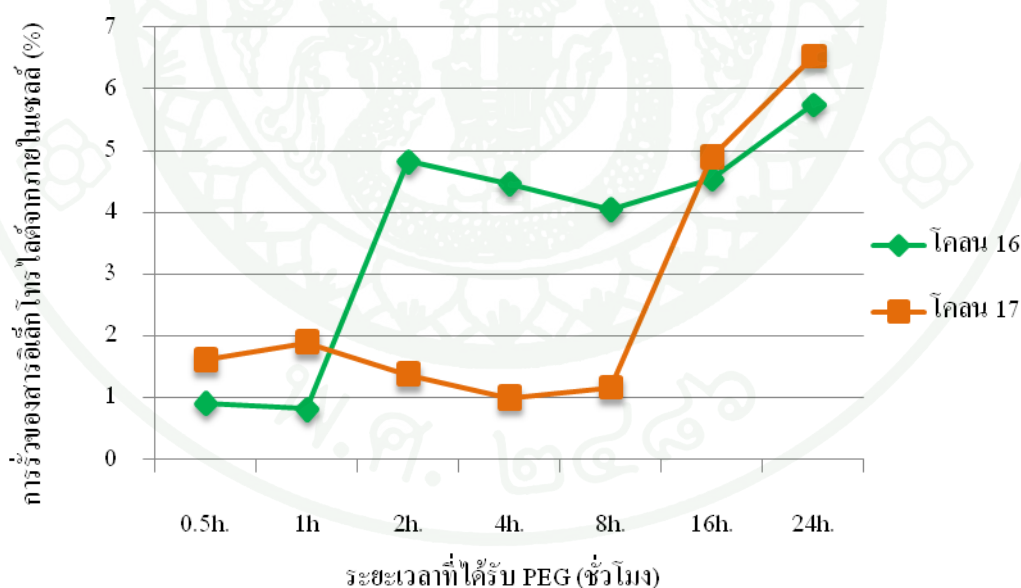
LSD_{0.05} ของโคลนหญ้าธัญพืช = 0.406

LSD_{0.05} ของช่วงเวลาที่ได้รับ PEG (ชั่วโมง) = 0.116

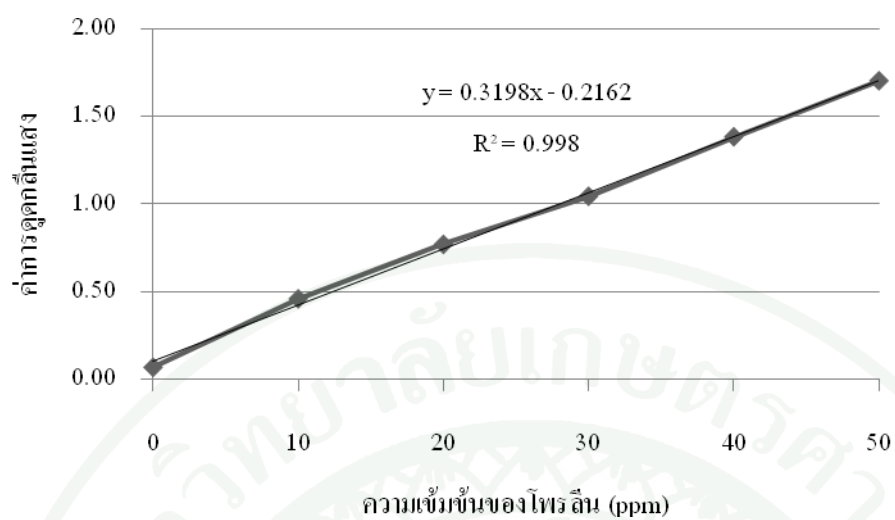
LSD_{0.05} ของโคลนหญ้าธัญพืช * ช่วงเวลาที่ได้รับ PEG (ชั่วโมง) = 0.174

* แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

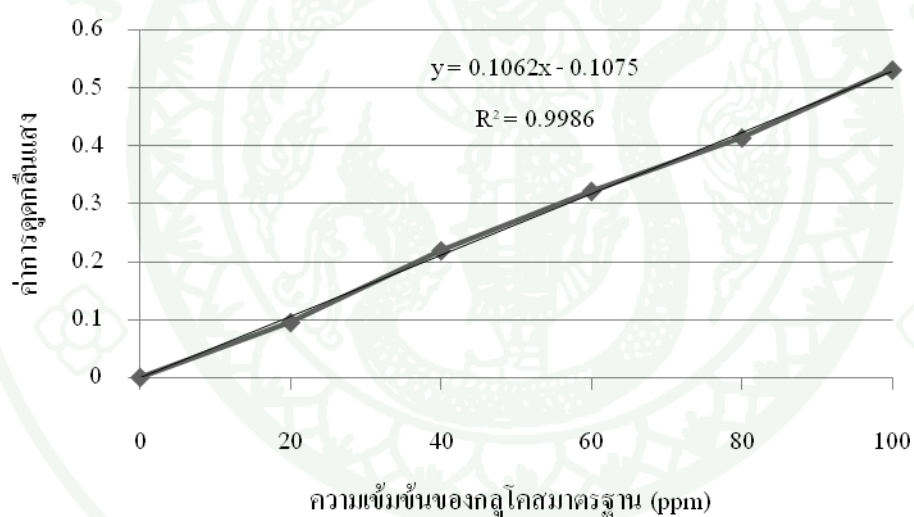
ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



ภาพผนวกที่ 4 การร่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์เปรียบเทียบของใบหญ้าธัญพืชโคลน 16 และ 17 ที่ใช้เวลาล้าง 30 นาที และได้รับ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 0.5, 1, 2, 4, 10, 16 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่น้ำไร้ไอออนในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง



ภาพผนวกที่ 5 กราฟมาตรฐานของโพแทสเซียม



ภาพผนวกที่ 6 กราฟมาตรฐานของแคลเซียม

ตารางผนวกที่ 11 ค่าการรั่วของสารอิเล็กทรอนิกส์จากภายในเซลล์ (EL) ของไบโพลาร์เมื่อชักนำให้เกิดความเครียดจากการขาดน้ำด้วย PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และใช้เวลา 2 ชั่วโมงเพื่อให้ไบโพลาร์กลับ ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ (RWC) ในใบของหญ้ารัฐ เมืองคานาเป็นเวลา 7 วัน และความเข้มข้นของ PEG ที่ทำให้หญ้ารัฐตายเป็นร้อยละ 50 ของชุดควบคุม (LD_{50}) ในสภาพหลอดทดลอง และการรั่วของสารอิเล็กทรอนิกส์จากภายในเซลล์ของไบโพลาร์ซึ่ง 20 โคลนซึ่งเรียงตามกลุ่มที่ประเมินระดับการทนแล้งในสภาพแปลง คือกลุ่มที่ทนแล้งได้ดี กลุ่มที่ทนแล้งปานกลาง และกลุ่มที่ทนแล้งต่ำ

โคลน	EL (%)	RWC (%)	LD_{50} (%PEG)
กลุ่มที่ทนแล้งได้ดี			
17	1.732	85.537	31.366
23	1.519	79.882	37.936
37	1.652	65.940	35.090
80	1.644	85.794	38.223
101	1.026	57.019	39.422
107	1.806	84.106	33.890
ทนแล้งปานกลาง			
7	1.754	82.659	33.390
52	1.907	85.032	30.890
55	2.133	86.060	31.744
73	2.385	83.728	32.360
78	1.860	83.145	32.870
83	1.940	85.211	32.380
87	1.823	86.152	31.610
ทนแล้งต่ำ			
12	3.422	81.526	21.831
16	3.131	88.029	18.078
22	2.000	88.479	28.650
35	3.125	87.173	18.866
90	1.642	85.616	37.078
95	1.757	86.929	34.180
112	1.888	87.696	28.090

ตารางผนวกที่ 12 ค่าออสโมแลลลิตี ปริมาณโปรตีนของหย้ารูซี่ และปริมาณ total soluble sugar ของหย้ารูซี่ 10 โคลน ที่มีค่า LD₅₀ ต่ำสุด 5 โคลน และที่มีค่า LD₅₀ สูงสุด 5 โคลน โดยจัดแบ่งเป็นกลุ่มที่ทนแล้งได้ดี และกลุ่มที่ทนแล้งต่ำ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PEG-6000 ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 สัปดาห์

โคลน	ออสโมแลลลิตี					โปรตีน					total soluble sugar				
	ความเข้มข้นของ PEG (%)					ความเข้มข้นของ PEG (%)					ความเข้มข้นของ PEG (%)				
	0	5	10	15	20	0	5	10	15	20	0	5	10	15	20
ทนแล้งต่ำ															
12	331.42	418.50	520.00	601.67	800.08	63.06	86.05	104.66	198.13	217.42	23.30	27.70	26.62	27.08	30.46
16	304.67	451.17	432.83	436.50	477.50	75.99	139.86	140.23	187.03	219.32	30.72	38.49	37.87	35.98	35.84
22	209.00	283.75	388.75	409.00	394.00	48.73	76.39	106.15	121.43	150.42	32.50	35.72	37.23	32.80	37.93
35	238.25	281.00	370.33	467.42	481.08	58.44	60.51	98.77	101.10	111.58	24.86	26.67	22.96	24.15	29.32
112	207.00	318.08	292.67	337.67	405.42	76.09	117.82	172.79	272.08	298.60	28.03	33.72	30.76	24.79	23.87
ทนแล้งได้ดี															
23	260.42	282.17	286.67	426.00	600.33	51.18	83.46	134.34	284.06	427.64	19.42	19.51	19.30	20.07	21.41
37	243.58	356.92	419.67	485.50	577.00	57.40	122.98	200.77	247.09	364.54	36.71	34.73	36.17	41.57	42.74
80	245.50	331.08	381.00	399.75	579.75	34.82	61.43	93.42	222.27	313.48	18.81	20.57	22.56	23.25	32.25
90	251.67	324.17	337.33	447.58	615.33	67.26	121.81	144.22	306.25	395.46	18.88	22.87	19.79	17.46	16.01
101	367.75	433.50	444.25	622.50	644.50	27.92	61.52	73.04	231.77	552.06	23.40	21.23	22.89	20.80	30.86

ตารางผนวกที่ 13 ค่าวิกฤตของสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson Product Moment correlation coefficient)

df=N-2	0.05	0.025	0.01	0.005	One-tail
N=จำนวนคู่	0.10	0.05	0.02	0.01	Two-tail
1	0.988	0.997	1.000	1.000	
2	0.900	0.950	0.980	0.990	
3	0.805	0.878	0.934	0.959	
4	0.729	0.811	0.882	0.917	
5	0.669	0.754	0.833	0.874	
6	0.622	0.707	0.789	0.834	
7	0.582	0.666	0.750	0.798	
8	0.549	0.632	0.716	0.765	
9	0.521	0.602	0.685	0.735	
10	0.497	0.576	0.658	0.708	
11	0.476	0.553	0.634	0.684	
12	0.458	0.532	0.612	0.661	
13	0.441	0.514	0.592	0.641	
14	0.426	0.497	0.574	0.623	
15	0.412	0.482	0.558	0.606	
16	0.400	0.468	0.542	0.590	
17	0.389	0.456	0.528	0.575	
18	0.378	0.444	0.516	0.561	
19	0.369	0.433	0.503	0.549	
20	0.360	0.423	0.492	0.537	
21	0.352	0.413	0.482	0.526	
22	0.344	0.404	0.472	0.515	
23	0.337	0.396	0.462	0.505	
24	0.330	0.388	0.453	0.496	
25	0.323	0.381	0.445	0.487	

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	มัทนภรณ์ ไหมคำมี
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 18 มิถุนายน 2527
สถานที่เกิด	ร้อยเอ็ด
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	โครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดี วิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย)