

เครื่องหมาย AFLP ที่เชื่อมโยงกับลักษณะความสามารถในการรักษา ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำและค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำในอ้อย

AFLP Markers Linked to the Ability to Maintain Total Leaf Water Potential and Osmotic Potential in Sugarcane

คำนำ

อ้อยจัดเป็นพืชอุตสาหกรรมที่สำคัญที่สุดชนิดหนึ่งของประเทศไทย ผลผลิตอ้อยถูกนำเข้าสู่โรงงานน้ำตาลเพื่อผลิตเป็นน้ำตาลในรูปแบบต่าง ๆ ซึ่งนอกจากจะใช้บริโภคภายในประเทศแล้วผลผลิตที่ได้ยังสามารถส่งออกและนำรายได้เข้าสู่ประเทศมีมูลค่านับหมื่นล้านบาท นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลและผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล คือกากน้ำตาลและกากอ้อยยังก่อให้เกิดอุตสาหกรรมต่อเนื่องต่าง ๆ อีกมากมาย อาทิ อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมยา แอลกอฮอล์ ทำเชื้อเพลิงจากกากอ้อย อาหารสัตว์และปุ๋ย ทำกระดาษและเฟอร์นิเจอร์ต่าง ๆ เป็นต้น

ผลผลิตอ้อยของประเทศไทยในช่วง 20 ปีที่ผ่านมาเพิ่มขึ้น เนื่องจากการขยายพื้นที่ปลูกเป็นส่วนใหญ่ จากพื้นที่ปลูก 4.08 ล้านไร่ ผลิตอ้อยได้ 23.92 ล้านตัน ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ 5.86 ตัน ในปีการเพาะปลูก 2526 เพิ่มเป็น 6.83 ล้านไร่ ผลิตอ้อยได้ 64.97 ล้านตัน ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ 9.27 ตัน ในปีการเพาะปลูก 2547 แต่เมื่อเทียบกับประเทศผู้ผลิตอ้อยที่สำคัญอื่น ๆ ของโลก เช่น ออสเตรเลีย (14.22 ตัน/ไร่) หรือบราซิล (12.05 ตัน/ไร่) ผลผลิตของประเทศไทยยังถือว่าต่ำมาก (สถิติการเกษตรของประเทศไทย, 2547)

หนึ่งในหลายสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผลผลิตอ้อยต่อหน่วยพื้นที่ต่ำคือ การปลูกอ้อยในสภาพพื้นที่ที่ไม่เหมาะสม ทั้งนี้พื้นที่ปลูกอ้อยของประเทศไทยกว่า 80% อยู่ในเขตที่ต้องอาศัยน้ำฝนเป็นหลัก ทำให้ผลผลิตอ้อยในแต่ละปีมีความแปรปรวนมากและส่งผลกระทบต่อปริมาณผลผลิตอ้อยโดยรวมของประเทศ โดยเฉพาะอ้อยพันธุ์ที่ไม่ทนแล้งจะได้รับผลกระทบอย่างรุนแรงจากการขาดน้ำ ผลจากวิกฤติการณ์ภัยแล้งที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดปี พ.ศ. 2547 ส่งผลกระทบทำให้ปริมาณผลผลิตเฉลี่ยต่อพื้นที่ในปี 2548 ลดลงเหลือ 7.8 ตัน/ไร่ และพื้นที่ปลูกอ้อยรวมทั้งประเทศลดลงจากปี

2547 ประมาณ 7.14 เปอร์เซ็นต์ (FAO, 2005; สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2548)

การพัฒนาพันธุ์อ้อยที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ และสามารถให้ผลผลิตดีในสภาพแล้ง เป็นแนวทางหนึ่งซึ่งช่วยให้ผลผลิตเฉลี่ยของอ้อยทั่วประเทศสูงขึ้นได้ โดยทั่วไปการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ทนทานความแล้ง ทำได้โดยการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ แล้วจึงคัดเลือกลูกผสมที่ได้ในสภาพแล้งทั้งในโรงเรือนและแปลงทดลอง แต่การพัฒนาพันธุ์เป็นไปได้ยาก เนื่องจากขาดความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับกลไกการทนแล้งของพืช อีกทั้งลักษณะทนแล้งเป็นลักษณะทางปริมาณที่ควบคุมด้วยยีนหลายตัวซึ่งทำหน้าที่ร่วมกัน การใช้วิธีปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ หรือ ความผันแปรทางพันธุกรรมจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีข้อจำกัด เนื่องจากความซับซ้อนของลักษณะทนแล้ง และการขาดเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือก นอกจากนี้ อ้อยยังเป็นพืชตระกูลหญ้ายืนต้นซึ่งออกดอกปีละครั้ง การปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐาน (conventional breeding) จึงใช้เวลานาน

ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้ร่วมกับวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐาน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการปรับปรุงพันธุ์ และใช้ในการทำ marker assisted selection (MAS) การใช้เทคนิคดังกล่าวจะช่วยลดภาระในการคัดเลือกทั้งในแปลงและในโรงเรือนทดลอง ทำให้สามารถคัดต้นที่ไม่มีลักษณะ (หรือไม่มียีน) ที่ต้องการออกไปได้ตั้งแต่ระยะที่เป็นต้นกล้า จึงเป็นการประหยัดแรงงาน เงินทุนวิจัย และเวลาปฏิบัติงานลงอย่างมาก และยังสามารถลดความแปรปรวนของสภาพแวดล้อมที่อาจมีผลต่อลักษณะที่ต้องการคัดเลือกได้ โดยเฉพาะลักษณะทนแล้งที่ต้องคัดเลือกในแปลงทดลองที่ไม่สามารถควบคุมความสม่ำเสมอได้เลย อย่างไรก็ตาม ในการใช้เทคนิคนี้ต้องอาศัยเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงอย่างใกล้ชิดกับลักษณะที่ต้องการคัดเลือก จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล สำหรับลักษณะที่ต้องการคัดเลือกให้สำเร็จเสียก่อน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาถึงลักษณะทางสรีรวิทยาบางประการที่เกี่ยวข้องกับการทนแล้งในอ้อย
2. เพื่อศึกษาวิธีการที่ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์อ้อยทนแล้ง
3. เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้บ่งชี้ถึงลักษณะความสามารถในการรักษาค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำและค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำในใบอ้อย ซึ่งจะนำไปใช้ในการคัดเลือกอ้อยทนแล้งต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. อ้อย

อ้อย (*Saccharum* spp.) เป็นพืชตระกูลหญ้ายืนต้น อยู่ในวงศ์ Poaceae (ชื่อเดิมคือ Gramineae) ขยายพันธุ์โดยการใช้ท่อนพันธุ์ มีถิ่นกำเนิดในแถบหมู่เกาะแปซิฟิกใต้และหมู่เกาะนิวกีนี แบ่งได้เป็น 5 สปีชีส์ ได้แก่ *S. officinarum* (อ้อยปลูกดั้งเดิม) อ้อยชนิดนี้มีลักษณะเด่นคือให้ความหวานสูง และมีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมน้ำตาลทรายของโลก พันธุ์อ้อยที่ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบันส่วนใหญ่สืบเชื้อสายมาจากอ้อยชนิดนี้ Chatwachirawong and Srinives (1999) ได้วิเคราะห์พันธุประวัติของอ้อยพันธุ์การค้าของไทย 26 พันธุ์ พบว่ามีบรรพบุรุษมาจาก *S. officinarum* เป็นส่วนใหญ่ อีก 4 สปีชีส์เป็นพันธุ์ป่า ได้แก่ *S. spontaneum* (อ้อยป่าแถบเขตร้อน) พบกระจายอยู่ทั่วไปในเขตร้อนและเขตอบอุ่นตั้งแต่แอฟริกา เอเชีย จนถึงหมู่เกาะแปซิฟิกตอนใต้ ในประเทศไทยมีอ้อยชนิดนี้เป็นจำนวนมากตั้งแต่ในที่ลุ่มไปจนถึงที่ราบสูง โดยแต่ละแห่งจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันมาก ลักษณะเด่นคือมีความต้านทานโรคและแมลง และทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี ในระยะเริ่มแรก นักปรับปรุงพันธุ์จึงนิยมผสมข้ามระหว่าง *S. officinarum* และ *S. spontaneum* เพื่อสร้างพันธุ์อ้อยที่ทนทานต่อโรคและให้ผลผลิตสูง *S. barberi* (อ้อยอินเดีย) อ้อยชนิดนี้มีปริมาณน้ำตาลปานกลางถึงสูง แต่แข็งแรงและต้านทานโรคได้ดีกว่าอ้อยปลูก จึงมีบทบาทสำคัญทั้งในด้านการผลิตและปรับปรุงพันธุ์ *S. siense* (อ้อยจีน) ในอดีตนักพฤกษศาสตร์จัดอ้อยชนิดนี้ให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *S. barberi* ลักษณะเด่นคือมีความแข็งแรงและต้านทานโรค แต่ต่อมาได้แยกออกมาเป็นอีกชนิดหนึ่ง สันนิษฐานว่า *S. siense* และ *S. barberi* เกิดจากการผสมข้ามระหว่าง *S. officinarum* และ *S. spontaneum* สปีชีส์สุดท้ายได้แก่ *S. robustum* (อ้อยป่านิวกีนี) อ้อยชนิดนี้มีปริมาณเส้นใยสูง ระบบรากลึก ผสมติดเมล็ดได้ง่าย แต่มีปริมาณน้ำตาลในต้นน้อย จึงนิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์อ้อยที่มีวัตถุประสงค์เฉพาะด้าน (เกษม, 2527; ประเสริฐ และคณะ, 2544) จากการสำรวจและรวบรวมพันธุ์อ้อยในประเทศไทย สามารถรวบรวมพันธุ์อ้อยและพืชสกุลใกล้เคียงโดยแบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. siense*, *Erianthus* spp., *Sclerostachya fusca* และ *Narenga porphyrocoma* (จเว, 2531)

ระบบการผสมพันธุ์อ้อยมีหลายรูปแบบ ทั้งการผสมตัวเอง และผสมข้าม พันธุ์อ้อยที่ปลูกเป็นการค้ามักเกิดจากการผสมข้ามชนิดหรือผสมกับสกุลใกล้เคียง ขึ้นกับวัตถุประสงค์ของแผน

งานปรับปรุงพันธุ์ที่จะกำหนดลักษณะทางการเกษตรของอ้อยที่ต้องการจะปรับปรุง ในปัจจุบัน พันธุ์อ้อยที่ปลูกเป็นการค้าส่วนใหญ่ได้มาจากการผสมข้ามชนิดระหว่าง *S. officinarum* และ *S. spontaneum* แล้วปรับปรุงจนกระทั่งได้พันธุ์ที่มีลักษณะตามต้องการ แต่การปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้พันธุ์ดีนั้นใช้เวลานาน เนื่องจากอ้อยเป็นพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด (polyploid) ในอ้อย แต่ละชนิดจึงมีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันมาก ยกเว้น *S. officinarum* ที่มีจำนวนโครโมโซมค่อนข้างคงที่ คือ $2n=80$ ส่วน *S. spontaneum* มีจำนวนโครโมโซมตั้งแต่ $2n=40$ จนถึง $2n=128$ ใน *S. siense* มีจำนวนโครโมโซม $2n=81$ ถึง $2n=124$ และ *S. barberi* มีจำนวนโครโมโซม $2n=111$ ถึง $2n=120$ สำหรับอ้อยพันธุ์ใหม่ ๆ ซึ่งเป็นลูกผสมที่ได้จาก *S. officinarum* x *S. spontaneum* จะมีจำนวนโครโมโซมระหว่าง $2n=100$ ถึง $2n=130$ ลักษณะที่พบทั่วไปมักจะมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มหรือลดเป็นแห่ง ๆ (aneuploid) ใน *S. officinarum* มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน $x=10$ และ *S. spontaneum* มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน $x=8$ แสดงว่าระดับ ploidy ในพันธุ์ลูกผสมเหล่านี้จะอยู่ระหว่าง 5-16 (Bremer, 1961; D' Hont *et al.*, 1996; Grivet and Arruda, 2001) ระยะเวลาเจริญเติบโตและความต้องการน้ำของอ้อย

อ้อยจะให้ผลผลิตมากที่สุด ต้องได้รับน้ำอย่างเพียงพอตลอดระยะเวลาเจริญเติบโต ปริมาณและความถี่ในการให้น้ำจะมากหรือน้อย ขึ้นกับสภาพภูมิอากาศ และช่วงระยะเวลาเจริญเติบโต ความต้องการน้ำของอ้อยตลอดช่วงระยะเวลาเจริญรวม 330 วัน ต้องการน้ำ 1,515 มิลลิลิตร (เกษตร, 2542) ซึ่งมีค่าโดยประมาณดังนี้

1. ระยะตั้งตัว (0-30 วัน) นับจากเริ่มงอกจนถึงมีใบจริง ควรให้น้ำน้อยแต่บ่อยครั้ง เพราะรากยังสั้น และการคายน้ำของพืชยังมีน้อย โดยมีความต้องการน้ำวันละ 4 มิลลิลิตร รวม 120 มิลลิลิตร
2. ระยะเจริญเติบโตทางลำต้น (31-170 วัน) เป็นระยะที่อ้อยมีการแตกกอ เป็นช่วงที่ยืดตัวทางลำต้นและมีการกระจายตัวของราก การแตกกอและความยาวของท่อนอ้อย จะเป็นปฏิภาคโดยตรงกับปริมาณน้ำที่ให้ อ้อยในระยะนี้มีความต้องการน้ำวันละ 4.5 มิลลิลิตร รวมทั้งสิ้น 630 มิลลิลิตร

3. ระยะเวลาปลั่งง หรือระยะสร้างน้ำตาล (171-295 วัน) เป็นระยะที่อ้อยมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และเริ่มสร้างผลผลิต มีการตอบสนองต่อน้ำที่ให้อ้อย ต้องการน้ำวันละ 5 มิลลิเมตร รวม 625 มิลลิเมตร

4. ระยะเวลาแก่ (256-330 วัน) เป็นระยะที่อ้อยต้องการน้ำน้อยลง อัตราการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบลดลง มีการเปลี่ยน reducing sugar เป็น sucrose ต้องการน้ำวันละ 4 มิลลิเมตร รวมทั้งสิ้น 140 มิลลิเมตร

2. การตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำของพืช

ในสภาพธรรมชาติพืชเผชิญกับความเครียดเนื่องจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมอยู่ตลอดเวลา พืชจึงสร้างกลไกเพื่อตอบสนองต่อภาวะเครียดเหล่านี้ที่อยู่ตลอดเวลา ความสามารถในการทนต่อภาวะเครียด (stress tolerance) จึงหมายถึงความสามารถของพืชในการจัดการตัวเองให้อยู่รอดในสภาวะที่ไม่เหมาะสมนี้ได้ ความทนทานนี้เป็นผลมาจากกลไกการป้องกันตัวเอง 2 รูปแบบคือ acclimation หรือ hardening คือการที่พืชเผชิญกับภาวะเครียดในระดับที่พืชสามารถทนได้ และเกิดการปรับตัวให้คุ้นชินและอยู่รอดได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมนี้ อีกกลไกหนึ่งคือ เมื่อพืชเผชิญกับความเครียดอย่างต่อเนื่อง จะเกิดการปรับตัวในลักษณะ adaptation ระดับความทนทานจะเกิดจากการคัดเลือกจากรุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่ง มักเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตสามารถอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมนั้นได้ อย่างไรก็ตามควรตระหนักไว้เสมอว่า ถิ่นอาศัยของพืชแต่ละชนิดจะมีสภาพแวดล้อมแตกต่างกันไปทั้งปริมาณธาตุอาหาร น้ำ แสงแดด อุณหภูมิ ซึ่งพืชจะสร้างรูปแบบการดำเนินชีวิตที่เหมาะสมกับการอยู่อาศัยในสภาพนั้น ดังนั้นสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกับพืชหนึ่งอาจไม่เหมาะสมสำหรับอีกพืชหนึ่ง และสภาพแวดล้อมที่ทำให้พืชชนิดหนึ่งเกิดความเครียดก็อาจไม่มีผลต่อพืชอีกชนิดหนึ่งเช่นกัน ในการศึกษาการตอบสนองของพืชต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจึงจำเป็นต้องพิสูจน์ให้ได้ว่าพืชอยู่ภายใต้สภาวะเครียดที่ไม่เหมาะสมจริง แล้วตรวจสอบว่าพืชมีการแสดงออกอย่างไรภายใต้สภาวะเหล่านี้ โดยรวมแล้วการตอบสนองของพืชแบ่งได้เป็น 4 ระยะ เริ่มจาก alarm reaction คือเมื่อพืชเริ่มได้รับความเครียด พืชจะตอบสนองโดยการลด physiological function บางอย่างลง นำไปสู่ระยะที่ 2 คือ state of resistance พืชจะสร้าง physiological standard ใหม่ขึ้นมา กลไกป้องกันตัวเอง และกลไกการซ่อมแซมเหล่านี้ จะทำให้พืชสามารถปรับตัวและทน (hardening) อยู่ในสภาพเครียดได้นานที่สุด แต่ถ้าพืชได้รับความเครียดยาวนานขึ้นหรือรุนแรงขึ้นเกินกว่าที่กลไกป้องกัน

กันและซ่อมแซมตัวเองของพืชจะรับไหว การตอบสนองของพืชจะเข้าสู่ระยะที่ 3 คือ end phase ระบบการทำงานต่าง ๆ ในพืชจะเสียหายรุนแรงและทำให้พืชตายในที่สุด แต่ถ้าสภาพเครียดที่พืชได้รับถูกกำจัดออกไปในเวลาที่เหมาะสม คือก่อนที่พืชจะได้รับความเสียหายหนักจนซ่อมแซมหรือปรับสภาพกลับมาไม่ได้ การตอบสนองของพืชจะอยู่ในระยะที่ 4 เรียกว่า regeneration phase คือ พืชจะซ่อมแซมตัวเองและกลับมาสู่กลไกการทำงานในสภาพปกติ (Lichtenthaler, 1998; Schulze *et al.*, 2002, Taiz and Zeiger, 2002)

ภัยแล้งเป็นสภาวะที่พบเห็นได้บ่อยครั้งในภูมิภาคเขตร้อน โดยเฉพาะในเขตพื้นที่ดอนและพื้นที่เกษตรกรรมโดยอาศัยน้ำฝน ในทางอุตุนิยมนวิทยา ภัยแล้งคือภัยที่เกิดจากการขาดแคลนน้ำในพื้นที่ใดพื้นที่หนึ่งเป็นเวลานาน ส่วนใหญ่เกิดจากฝนแล้งและฝนทิ้งช่วง ซึ่งภาวะฝนแล้งหมายถึงสภาวะที่มีฝนน้อยหรือไม่มีฝนตกเลยในช่วงเวลาหนึ่งซึ่งตามปกติควรจะต้องมีฝน และภาวะฝนทิ้งช่วงหมายถึง ช่วงที่มีปริมาณฝนตกไม่ถึงวันละ 1 มิลลิเมตรติดต่อกันเกิน 15 วันในช่วงฤดูฝน ในด้านการเกษตร ภัยแล้งหมายถึงสภาวะการขาดแคลนน้ำของพืช ซึ่งมีผลกระทบต่อการเกษตร ภาวะแล้งกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชโดยตรงเนื่องจากทำให้เกิดการขาดน้ำในต้นพืช คือระดับน้ำที่เป็นประโยชน์ในต้นพืชลดลง ผลทางอ้อมของการขาดน้ำคือ ระดับธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ในดินที่พืชสามารถดูดไปใช้ได้ลดลง ในประเทศไทย พื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากภัยแล้งมาก ได้แก่บริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนกลาง เพราะเป็นบริเวณที่อิทธิพลของมรสุมตะวันตกเฉียงใต้เข้าไปไม่ถึง และถ้าปีใดไม่มีพายุหมุนเขตร้อนเคลื่อนผ่านในแนวดังกล่าวแล้วจะก่อให้เกิดภัยแล้งรุนแรงมากขึ้น (กรมอุตุนิยมนวิทยา, 2549) ดังนั้นการทนแล้งของพืชในทางการเกษตรจึงหมายถึงพืชที่สามารถสร้างผลผลิตได้ในสภาพที่มีน้ำอยู่อย่างจำกัด การปรับตัวของพืชจะเกิดขึ้นทั้งในทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และทางชีวเคมี และเกิดขึ้นทั้งในระดับเซลล์ และระดับโมเลกุล ความสามารถในการทนแล้งของพืชจะแตกต่างกันไป ขึ้นกับชนิดและพันธุ์พืช ระดับความรุนแรงและระยะเวลาที่พืชขาดน้ำ ตลอดจนช่วงเวลาการขาดน้ำและระยะการเจริญเติบโตของพืช (Bray, 1997)

พืชมีกลไกมากกว่า 1 แบบ เพื่อจะตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดจากสภาวะขาดน้ำ (drought stress) กลไกเหล่านี้เกิดขึ้นพร้อมกันในหลายระดับ หลายรูปแบบ มีหน้าที่ต่างกันแต่มีวัตถุประสงค์เดียวกันคือ ทำให้พืชสามารถปรับตัวและอยู่รอดได้นานที่สุด กลไกดังกล่าวสรุปได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ (Taiz and Zeiger, 2002; Chaves *et al.*, 2003)) คือ

1. Drought escape เป็นลักษณะที่พืชสามารถเจริญเติบโตได้จนครบชีวิจักร์ในขณะที่ยังมีน้ำอยู่ เช่น การปรับตัวให้ดอกออกเร็วขึ้น เพื่อหลีกเลี่ยงภาวะขาดน้ำในช่วงสั้น (สมชาย และ คณะ, 2537)

2. Drought avoidance เป็นลักษณะที่พืชสามารถรักษาปริมาณน้ำในเซลล์ไว้ได้ภายใต้ภาวะขาดน้ำ โดยใช้กลไกหลายรูปแบบ เช่น การปิดปากใบ การม้วนใบ การปรับมุมของใบให้แผ่นใบขนานไปกับแสงแดด เพื่อลดอันตรายจากความเข้มแสง (จักรี, 2539) การสร้างสารเคลือบใบ (wax) การกำจัดใบแก่ทิ้งและเคลื่อนย้ายสารอาหารไปเก็บไว้ในใบที่อ่อนกว่า หรือเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับน้ำจากดินโดยมีการยึดตัวของเซลล์ที่ราก และมีพื้นที่ผิวของรากเพิ่มขึ้น (Hoogenboom *et al.*, 1987)

3. Drought tolerance เป็นลักษณะที่พืชที่สามารถดำเนินกิจกรรมภายในเซลล์ และรอดชีวิตอยู่ได้ถึงแม้ว่าเซลล์จะเผชิญกับภาวะขาดน้ำ ซึ่งเกี่ยวข้องกับความสามารถในการรักษาปริมาณน้ำในเซลล์ไว้ได้ เช่น การสะสมสารออสโมไลต์ (osmolytes) ต่าง ๆ การปรับโครงสร้างผนังเซลล์ให้แข็งแรงขึ้น การลดขนาดเซลล์ให้เล็กลง ทำให้ระบายความร้อนและควบคุมการสูญเสียน้ำได้ดีกว่า ตลอดจนการพักตัวของพืชบางชนิดในช่วงฤดูแล้ง โดยยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง (Mittler *et al.*, 2001)

การตอบสนองในระดับยีน

ความเครียดที่พืชเผชิญอยู่จะชักนำให้มีการแสดงออกของยีนต่าง ๆ จากการศึกษานี้พืชหลากหลายชนิด มียีนจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนแล้ง และการตอบสนองต่อสภาวะแล้งของพืช การที่มีจำนวนยีนเกี่ยวข้องมาก สะท้อนให้เห็นถึงความซับซ้อนของรูปแบบการแสดงออกของพืชเมื่อเผชิญกับสภาวะขาดน้ำ กลไกการแสดงออกและหน้าที่ของยีนส่วนใหญ่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด จากการรวบรวมงานวิจัยต่าง ๆ พบว่ายีนที่ถูกชักนำให้แสดงออกในช่วงที่พืชเผชิญสภาวะขาดน้ำ มีหน้าที่หลัก 2 ด้านคือ ช่วยป้องกันเซลล์จากการขาดน้ำและช่วยควบคุมการแสดงออกของยีนระหว่างที่พืชอยู่ภายใต้ภาวะเครียดจากการขาดน้ำ ดังนั้นผลผลิตของยีนเหล่านี้จึงแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม functional protein เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนต่อสภาวะแล้งโดยตรง ได้แก่ chaperones, LEA proteins, osmotin, antifreeze protein, mRNA binding protein, water channel proteins, sugar และ proline

transporters, detoxification enzyme และ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สาร
 ออสโมไลต์ ต่าง ๆ เป็นต้น โดยแต่ละชนิดจะมีหน้าที่เฉพาะต่างกันไป chaperones, LEA proteins
 และ mRNA binding protein ช่วยป้องกัน macromolecule เช่น เอนไซม์ต่าง ๆ ไขมัน และ
 mRNA ในส่วนของ proline, glycine betaine และน้ำตาลต่าง ๆ ทำหน้าที่เป็นสาร ออสโมไลต์
 เพื่อปรับแรงดันออสโมติก ช่วยป้องกันเซลล์สูญเสียน้ำ water channel proteins, sugar และ
 proline transporters มีหน้าที่ในการลำเลียงน้ำ น้ำตาล และ proline ผ่าน plasma membrane
 และ tonoplast เพื่อปรับค่าแรงดันออสโมติกภายใต้สภาพเครียด detoxification enzyme เช่น
 glutathione S-transferase, superoxide dismutase, soluble epoxide hydrolase ช่วยป้องกัน
 เซลล์จาก reactive oxygen species เอนไซม์ในกลุ่ม proteases เช่น thiol protease, ubiquitin
 จำเป็นสำหรับการหมุนเวียนและเปลี่ยนรูปโปรตีนไปเป็นโปรตีนตัวอื่นที่ทำงานได้ในขณะนั้น กลุ่ม
 ที่ 2 ได้แก่ กลุ่ม regulatory protein ประกอบด้วยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ signal
 transduction ทำหน้าที่ส่งสัญญาณทางเคมีเพื่อควบคุมการทำงานของยีนตัวอื่น ๆ ในการตอบ
 สนองต่อสภาพเครียดที่พืชได้รับ ได้แก่ กลุ่ม transcription factors ประกอบด้วย typical DNA
 binding motifs เช่น bZIP, MYB, MYC, ERF/AP2, zinc finger กลุ่ม protein kinases ชนิดต่าง ๆ
 เช่น MAP kinases, calcium dependent protein kinase (CDPK), SNF1, ribosomal s6 kinase
 และกลุ่มของเอนไซม์ใน phospholipids metabolism (Ingram and Bartels, 1996; Shinozaki
 and Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 2002)

การตอบสนองในเชิงสรีรวิทยาและชีวเคมี

1. อัตราสังเคราะห์แสงสุทธิลดลง

อัตราการสังเคราะห์แสงจึงนับเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ถูกกระทบจากสภาวะขาดน้ำ ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโต การพัฒนา และผลผลิตของพืช โดยอัตราสังเคราะห์แสงจะขึ้นกับค่าน้ำ
 ไหลปากใบซึ่งสะท้อนถึงการเปิดกว้างของปากใบ และความแตกต่างของ CO₂ ในใบและด้านนอก
 ใบ เมื่อพืชได้รับภาวะขาดน้ำ อัตราสังเคราะห์แสงสุทธิลดลง เนื่องจากปากใบปิดแคบลงเพื่อลด
 การสูญเสียน้ำ การควบคุมการเปิดปิดปากใบยังไม่มีคำอธิบายที่ชัดเจน โดยมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับ
 กลไกหลายรูปแบบทั้ง ABA-dependent pathway ABA-independent pathway และการ
 เคลื่อนย้ายไอออน การปิดแคบของปากใบมีผลทำให้คลอโรพลาสต์มีพลังงานที่จะกระตุ้นให้
 เลคตรอนของรงควัตถุอยู่ในสภาวะกระตุ้นได้มาก และพลังงานเหล่านี้จะเพิ่มขึ้นถ้าพืชยังคงได้รับ

สภาวะเครียดอยู่อย่างต่อเนื่อง พลังงานที่เกิดขึ้นนี้สามารถสลายตัวไปได้เองบางส่วนหรือถูกกำจัดไปได้โดยกลไกการป้องกันต่าง ๆ แต่ถ้าพลังงานดังกล่าวถูกปลดปล่อยออกไปได้ไม่หมด จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการส่งถ่ายอิเล็กตรอน โดยในสภาพปกติอิเล็กตรอนจะถูกใช้ไปในกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂ assimilation) มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และใช้ในกระบวนการ photorespiration ประมาณ 23 เปอร์เซ็นต์ แต่ในภาวะขาดน้ำ พบว่าเปอร์เซ็นต์ของอิเล็กตรอนที่ถูกใช้ในกระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ลดลงเหลือประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เปอร์เซ็นต์ของอิเล็กตรอนที่ถูกใช้ในกระบวนการ photorespiration เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า (Haupt-Herting and Fock, 2002) ในส่วนของระบบรับแสง photosystem II (PSII) เมื่อพืชเผชิญกับสภาวะขาดน้ำ โครงสร้างและหน้าที่ของระบบรับแสง PSII จะเปลี่ยนแปลงเพื่อป้องกันการเกิด photoinhibition และ oxidative stress (Aro *et al.*, 1993; Pastenes *et al.*, 2005) นอกจากนี้ความเครียดจากการขาดน้ำทำให้โครงสร้างของคลอโรพลาสต์ และ active PSII complex เสื่อมหาย (Ferrari-Iliou *et al.*, 1984; Meyer and de Kouchkovsky, 1993) และองค์ประกอบของ LHCII (light-harvesting complex of PSII) มีการเปลี่ยนแปลง (Hao *et al.*, 1999) เมื่อได้รับภาวะขาดน้ำอย่างต่อเนื่องยาวนานขึ้น การสร้างโปรตีนลดลง การลอกหลุดของยีนถูกยับยั้ง เช่น ยีน *psbA* และ *psbD* ซึ่งเป็นยีนที่ถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีน D1 และ D2 ใน PSII reaction centers ผลที่เกิดต่อมาคือ PSII activities ลดลง (He *et al.*, 1999)

2. การสะสมสาร osmolytes

เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะเครียดจากการขาดน้ำ หนึ่งในกลไกที่พืชใช้ป้องกันตัวเองได้แก่การสร้างและสะสมสารออสโมไลต์ (osmoprotectants หรือ compatible solutes) รูปแบบการทำงานของสารออสโมไลต์ แบ่งได้เป็น 2 กลไกคือ เป็น osmotic balancing agents ในเซลล์พืช ทำให้ค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในเซลล์ (osmotic potential) ต่ำลง จึงช่วยรักษาแรงดันเต่งของเซลล์ไว้ได้ อีกกลไกหนึ่งคือ โมเลกุลของสารออสโมไลต์ จะช่วยป้องกันการจับของ destabilizing molecule กับโมเลกุลของโปรตีน จึงช่วยไม่ให้โปรตีนเสียสภาพทำให้พืชสามารถอยู่รอดได้ภายใต้สภาพที่เซลล์ขาดน้ำ สารออสโมไลต์ มีหลายชนิด แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลัก (Bohnert *et al.*, 1995; Hoekstra *et al.*, 2001; Ramanjulu and Baetels, 2002) คือ

2.1 amino acid เช่น arginine, serine, threonine, tyrosine, valine, homoserine เป็นต้น แต่ที่เป็นตัวหลักคือ proline ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่เป็นสารประกอบไนโตรเจน

ช่วยป้องกันการเสียหายของเอนไซม์ และโครงสร้างเซลล์ การสังเคราะห์ proline มีสารตั้งต้น 2 ชนิด โดยในแบคทีเรียใช้ glutamate และในพืชชั้นสูงใช้ ornithine การศึกษากลไกการสร้างและสะสม proline เป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถนำไปใช้คัดเลือกพันธุ์พืชที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ (Thomas *et al.*, 1992)

2.2 Quaternary ammonium compounds and tertiary sulfonium compounds (QACs and TSCs) การสะสมสารในกลุ่มนี้ไม่ได้เกิดขึ้นในพืชทุกชนิด และชนิดของสารที่พบก็แตกต่างกันไปในแต่ละชนิดพืช นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะความเครียดต่างรูปแบบกัน ส่งผลให้มีการสะสมสารต่างชนิดกันด้วย เช่น alanine betaine พบสะสมในพืชที่เจริญอยู่ในสภาพดินเค็ม choline-o-sulfate พบสะสมในพืชที่เจริญอยู่ในสภาพดินที่มีซัลเฟต proline betaine พบสะสมในพืชที่เจริญอยู่ในสภาพแล้ง สารตัวสำคัญในกลุ่มนี้คือ glycine betaine ซึ่งเป็นสารประกอบ QACs และพบว่ามีการสะสมในพืชหลายชนิด (Hanson *et al.*, 1994)

2.3 Polyols เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ถูกรีดิวซ์จากน้ำตาล aldose และ ketose มีโครงสร้างเป็นเส้นตรง เช่น mannitol, sorbitol และแบบวงแหวน เช่น myo-inositol โดยปกติจะพบ polyols ทั้งใน prokaryotes และ eukaryotes (Da Costa *et al.*, 1998) polyols ที่พบในพืชคือ mannitol, sorbitol, galactitol, cyclitol ในใบพืชที่แก่จะพบ myo-inositol, mannitol และ sorbitol ซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์แสง (Noirud *et al.*, 2001) ภายใต้สภาวะขาดน้ำ มีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างการสะสม mannitol และ sorbitol กับความสามารถในการทนแล้ง โดยเฉพาะ mannitol จะถูกตรวจพบมากในพืชหลายชนิด (Stopp *et al.*, 1996)

3. การเกิด oxidative stress

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่า เมื่อพืชขาดน้ำอัตราสังเคราะห์แสงสุทธิจะลดลง เป็นผลจากการปิดปากใบเพื่อลดการสูญเสียน้ำ ซึ่งมีผลทำให้คลอโรพลาสต์มีพลังงานที่จะกระตุ้นให้อิเล็กตรอนของคลอโรฟิลล์ที่เป็นรงควัตถุอยู่ในสภาวะกระตุ้นได้มาก เรียกว่า triplet state of chlorophyll ทำให้คลอโรฟิลล์ไม่สามารถรับพลังงานแสงเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสงได้อีก คลอโรฟิลล์จึงต้องมีการถ่ายเทพลังงานให้กับตัวรับอิเล็กตรอนตัวอื่นเพื่อกลับสู่ ground state และการที่มีสัดส่วนจำนวนโมลของคาร์บอนไดออกไซด์ในคลอโรพลาสต์ลดลงเนื่องจากปากใบปิดนั้นทำให้เกิดการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ RuBP (ribulose-1,5-biphosphate) กับออกซิเจนเพิ่ม

ขึ้น ผลคือออกซิเจนกลายเป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนคาร์บอนไดออกไซด์ และเมื่อออกซิเจนรับพลังงานแล้วจะเกิดเป็นออกซิเจนในภาวะกระตุ้น เรียกว่า singlet oxygen (Salin, 1987; Yordanov *et al.*, 2003) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนโมเลกุลต่าง ๆ ได้อย่างรวดเร็ว เกิดเป็น reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเป็นผลผลิตของกระบวนการเมตาบอลิซึมในเซลล์ที่ผิดปกติไปเนื่องจากการขาดน้ำ เช่น hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide (O_2^-), hydroxyl radical (OH^\cdot) การสร้างและสะสม ROS นำไปสู่การเกิดการแตกสลายของไขมัน (lipid peroxidation) โดยเฉพาะไขมันที่เมมเบรนของคลอโรพลาสต์และไทลาคอยด์ เพราะมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวมาก และภายในคลอโรพลาสต์มีความเข้มข้นของออกซิเจนสูง ทำให้เมมเบรนเสียหาย เกิดการรั่วของเซลล์ กระบวนการเมตาบอลิซึมเสียสมดุล และการทำลายขององค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ รวมถึงดีเอ็นเอและโปรตีน ซึ่งความเสียหายที่เกิดขึ้นส่งผลกระทบต่อพืชทั้งต้น (Aziz and Larher, 1998)

3. ลักษณะทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการรักษาบน้ำในเซลล์พืช

น้ำเป็นองค์ประกอบหลักของพืช นอกจากทำหน้าที่หล่อเลี้ยงเซลล์เพื่อดำเนินกิจกรรมทางชีวเคมีให้เป็นปกติแล้ว ยังเป็นตัวการสำคัญในการระบายความร้อนของพืชโดยการคายน้ำ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการยืดขยายขนาดของเซลล์เพื่อการเจริญเติบโตและสร้างผลผลิต ค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบพืชเป็นค่าที่สะท้อนถึงการดำเนินกิจกรรมของพืชที่ตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นอยู่ โดยค่าพลังงานเหล่านี้จะเปลี่ยนแปลงและสัมพันธ์กับลักษณะประจำพันธุ์ ระยะเวลาเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อมที่เป็นอยู่ การศึกษาค่าพลังงานศักย์ของน้ำทำให้เข้าใจถึงพฤติกรรมและกลไกที่พืชใช้ในการเปลี่ยนแปลงสภาวะของน้ำในพืชเพื่อยังคงรักษาการเจริญเติบโตภายใต้สภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปได้

ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบพืชประกอบไปด้วยค่าพลังงานศักย์ย่อย ๆ ที่มีบทบาทสำคัญได้แก่ พลังงานความเข้มข้นน้ำ พลังงานความดันของน้ำ พลังงานน้ำที่เกิดจากแรงกระทำของเนื้อเซลล์ และพลังงานน้ำที่เกิดจากแรงดึงดูดของโลก ในพืชโดยทั่วไป ค่าพลังงานงานที่เกิดจากแรงดึงดูดของโลกมีบทบาทน้อยมากยกเว้นในกรณีที่พืชมีความสูงมาก ๆ ในกรณีของค่าพลังงานน้ำที่เกิดจากแรงกระทำของเนื้อเซลล์ เป็นค่าที่วัดแยกออกจากค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำได้ยาก และมีค่าน้อยเมื่อเทียบกับค่าพลังงานอื่น ๆ ของน้ำในเซลล์พืช ดังนั้นค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำที่วัดได้จึงเป็นค่าที่รวมค่าพลังงานน้ำที่เกิดจากแรงกระทำของเนื้อเซลล์แล้ว การศึกษาส่วนใหญ่

จึงมุ่งเน้นที่ค่าพลังงานสำคัญ 3 ประเภทคือ ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำ ค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำ และค่าพลังงานความดันของน้ำ หรือแรงเต่งในเซลล์ (Kramer and Boyer, 1995) ดังสมการ

$$\Psi_t = \Psi_\pi + \Psi_P$$

3.1 พลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ (total leaf water potential, Ψ_t)

ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ เป็นค่าที่บ่งบอกถึงดุลย์ของน้ำในใบว่าขณะนั้นพืชมีอัตราการนำน้ำเข้าเทียบกับอัตราการสูญเสียน้ำหรือไม่ โดยอัตรานำน้ำเข้าจะสะท้อนถึงสถานะของน้ำในดินและความสามารถในการดูดน้ำของราก ในขณะที่อัตราการสูญเสียน้ำหรือคายน้ำจะสะท้อนถึงระดับการเปิดปิดของปากใบพืชขณะนั้น ซึ่งขึ้นอยู่กับแรงดึงคายน้ำจากใบสู่อากาศ (leaf-air VPD) ค่าพลังงานที่ต่ำ (ติดลบมาก) แสดงถึงการสูญเสียน้ำมากกว่าได้รับน้ำเข้ามาแทน (สุนทรีและคณะ, 2544) ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบเป็นค่าที่มีความผันแปรได้มากในรอบวัน เนื่องจากสภาพแวดล้อมมีผลกับการเปลี่ยนแปลงของค่านี้ค่อนข้างมาก ค่าที่วัดได้ในช่วงกลางวัน ซึ่งพืชได้รับอุณหภูมิสูง ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศต่ำ และความเข้มแสงสูง แรงดึงระเหยน้ำของอากาศและแรงดึงคายน้ำจากใบจึงมีค่าสูง ซึ่งจะทำให้ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบมีค่าลดลงมากกว่าค่าที่วัดได้ในช่วงที่ไม่มีแดด เช่น ช่วงเช้ามีด พืชมีการดูดน้ำคืนจากดินเข้าสู่ต้นมากที่สุด และเป็นเวลาที่ที่มีแรงดึงระเหยน้ำจากอากาศและแรงดึงคายน้ำจากใบต่ำสุด ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ สามารถบ่งบอกถึงสถานะของน้ำในใบได้แม่นยำมากกว่าการวัดในช่วงกลางวัน (สุนทรี และคณะ, 2543)

ดังนั้นค่านี้จึงใช้แสดงถึงสถานะของน้ำในพืชได้ (Turner, 1982) ความสามารถในการรักษาพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบไว้ได้ในระดับที่สูงเกี่ยวข้องกับการตอบสนองในรูปแบบ drought avoidance (Levitt, 1980) ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานร่วมกันของหลายกลไก ได้แก่ ความสามารถของรากในการดูดน้ำจากดิน การลดการสูญเสียน้ำสู่บรรยากาศโดยกลไกการเปิดปิดของปากใบ ขนาดทรงพุ่ม การม้วนใบ และการทิ้งใบแก่ เป็นต้น ความสามารถในการรักษาพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบเป็นลักษณะนี้ที่ใช้เป็นดัชนีคัดเลือกพันธุ์ข้าวทนแล้งเพื่อใช้ปลูกในเขตพื้นที่เกษตรกรรมแบบอาศัยน้ำฝน (Jongdee *et al.*, 1997)

3.2 พลังงานความเข้มข้นน้ำ (osmotic potential, $\Psi\pi$)

ค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำในพืช เป็นค่าที่บ่งบอกถึงสถานะภาพของความเข้มข้นของน้ำในเซลล์พืช ค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำที่ติดลบมาก จะหมายถึงมีความเข้มข้นของน้ำต่ำ เนื่องจากตัวถูกละลายทุกชนิดรวมกัน (total solute, C_i) ในเซลล์มีความเข้มข้นสูง ค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำมีค่าเป็นลบเสมอ เนื่องจากค่าพลังงานของน้ำบริสุทธิ์มีค่าเท่ากับศูนย์ (สุนทรี และคณะ, 2543) ค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำสัมพันธ์กับความเข้มข้นของตัวละลาย โดยพลังงานความเข้มข้นน้ำลดลงตามความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่เพิ่มขึ้น แสดงโดยสมการของ van't Hoff (Nobel, 1983) คือ

$$\Psi\pi = -RTC_i$$

เมื่อ R = ค่าคงที่ของแก๊ส (gas constant) เท่ากับ $8.3143 \times 10^{-3} \text{ m}^3 \text{ กิโลพาสคาล mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

T = อุณหภูมิสัมบูรณ์ของสารละลายในขณะนั้น ๆ (absolute temperature), K

C_i = ผลรวมของความเข้มข้นของตัวถูกละลายทุกชนิดที่มีในสารละลายในเซลล์, $\text{mol}^{-1} \text{ m}^3$

การลดลงของค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำ เป็นการตอบสนองต่อภาวะขาดน้ำ โดยเป็นผลมาจาก simple passive solute concentration คือ สารละลายที่มีอยู่แล้วในเซลล์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีน้ำในเซลล์น้อยลง หรือ มีการนำสารบางชนิดเข้าไปในเซลล์เพื่อปรับค่าแรงดันออสโมติกให้ลดลง (net solute accumulation) ทำให้น้ำจากภายนอกเซลล์ไหลเข้ามาภายในเซลล์ได้ ซึ่งการลดลงของค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในเซลล์เนื่องมาจากการสะสมของตัวถูกละลายในเซลล์ ช่วยในเรื่องการรักษาแรงดันเต่งของเซลล์ และขนาดของเซลล์ระหว่างที่พืชเผชิญกับภาวะแล้ง และเกี่ยวข้องกับกลไกการตอบสนองในรูปแบบ drought tolerance (Morgan, 1984)

3.3 พลังงานความดันของน้ำ (turgor potential, Ψ_p)

ค่าพลังงานความดันของน้ำ บ่งบอกถึงแรงเต่งของน้ำในเซลล์ พืชจะรักษาพลังงานความดันของน้ำให้สูงเพื่อผลต่อการเติบโตในด้านการขยายขนาดเซลล์ ค่านี้เป็นค่าที่ได้จากการ

คำนวณระหว่างค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบและค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำ (สุนทรี และคณะ, 2543) ตามสมการ

$$\Psi_P = \Psi_t + \Psi_\pi$$

4. การตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในอ้อย

เนื่องจากการใช้น้ำของพืชเป็นระบบพลวัต การศึกษาใด ๆ เกี่ยวกับสภาวะของน้ำในพืช จึงควรคำนึงถึงความต่อเนื่องของน้ำในระบบดิน-พืช-อากาศ กล่าวคือ สภาวะของน้ำในพืชจะขึ้นกับสภาวะของน้ำในดิน และสภาพบรรยากาศขณะนั้น ความเข้าใจในเรื่องความสัมพันธ์ของน้ำในพืช นอกจากจะใช้ในการศึกษาเพื่อประเมินการใช้น้ำในแต่ละวัน แต่ละฤดูกาล และคำนวณการใช้น้ำอย่างมีประสิทธิภาพในพืชแล้ว ยังเป็นพื้นฐานสำคัญในการศึกษาผลของสภาพขาดน้ำที่มีต่อพืชด้วย งานวิจัยในอ้อยเกี่ยวกับเรื่องความสัมพันธ์ของน้ำและการตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำมีการทำวิจัยในหลายพื้นที่ ซึ่งมีสภาพแวดล้อมในการทดลองต่างกัน จากการรวบรวมงานวิจัย พบว่าภาวะขาดน้ำส่งผลกระทบต่ออ้อยในหลายลักษณะ ดังนี้

4.1 การงอกของท่อนพันธุ์

เปอร์เซ็นต์การงอกขึ้นกับปริมาณน้ำในดิน คือปริมาณน้ำมากไป เปอร์เซ็นต์การงอกจะต่ำ เนื่องจากออกซิเจนที่ละลายอยู่ในวัสดุเพาะมีค่าลดลง ถ้ามีปริมาณน้ำน้อยไป จะมีผลกับการพัฒนาและการงอกของราก ซึ่งจะส่งผลถึงประสิทธิภาพในการดูดน้ำและอาหารต่อไป (Burry *et al.*, 2004) นอกจากนี้ การเจริญของยอดและราก จะเกิดได้ดีที่สุด เมื่อพลังงานของน้ำในดินอยู่ที่ระดับใกล้ 0 (ได้น้ำเต็มที) และเริ่มลดลงเมื่อพลังงานของน้ำในดินลดลงถึง -0.5 เมกะพาสคาล การเจริญของยอดและรากจะถูกยับยั้งเมื่อค่าพลังงานของน้ำในดินลดลงถึงระดับ -2 เมกะพาสคาล (Singh and Srivastava, 1974)

4.2 การสร้างและการยืดขยายของใบ

ในอ้อยหรือพืชตระกูลหญ้าทั่วไป ใบที่สร้างขึ้นใหม่จะเป็นใบที่มีขนาดเล็กและม้วนอยู่ด้านใน การยืดตัวและการขยายขนาดของใบ เกิดจากทั้งการแบ่งเซลล์และขยายขนาดเซลล์ทั้งในใบและในลำต้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณน้ำในต้นพืช (Cosgrove,

2000) ในปี 1991 Inman-Bamber ได้รายงานไว้ว่า อัตราการสร้างใบใหม่ลดลงเมื่ออ้อยขาดน้ำ ซึ่งแสดงด้วยค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบที่ลดลง และเมื่อได้รับน้ำอีกครั้ง ใบที่มีวุ้นอยู่สามารถฟื้นตัวและคลี่ขยายออกได้อย่างรวดเร็ว ในส่วนของ leaf extension rate (LER) พบว่ามีความสัมพันธ์กับค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบมาก โดยในช่วงเริ่มต้นของการขาดน้ำ LER มีค่าประมาณ 40 มิลลิเมตรต่อวัน เมื่อค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบที่วัดในช่วงกลางวันอยู่ที่ระดับ -0.5 เมกะพาสคาล และเมื่อพลังงานศักย์ของน้ำในใบลดลงถึงระดับ -1.3 เมกะพาสคาล ค่า LER ลดลงจนมีค่าประมาณ 0 – 15 มิลลิเมตรต่อวัน ซึ่งค่าที่ได้แตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ จากการเก็บข้อมูลการเปลี่ยนแปลงค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบในรอบวัน พบว่า ค่า LER เปลี่ยนแปลงตามค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบ โดยค่าพลังงานศักย์ที่ลดต่ำลงในช่วงกลางวัน ที่ระดับตั้งแต่ -1 เมกะพาสคาล หรือต่ำกว่า มีผลให้ค่า LER ลดลง ถึงแม้ว่าอ้อยไม่ได้อยู่ในภาวะขาดน้ำ

4.3 การยืดตัวทางลำต้น

ในพื้นที่เขตชลประทาน จะกำหนดตารางการให้น้ำตามค่า RSER (relative of stalk elongation rate) เป็นหลัก โดยปริมาณน้ำที่อ้อยได้รับควรอยู่ในระดับที่รักษาค่าน้ำไว้ได้สูงกว่า 0.5 และควรให้น้ำเมื่อค่า RSER ต่ำกว่า 0.5 (Shannon, *et al.*, 1996)

ค่า RSER มีความสัมพันธ์กับค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบเช่นเดียวกับค่า LER คือค่า RSER ลดลงตามการลดลงของค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบที่วัดในช่วงกลางวัน ในอ้อยพันธุ์ H62-4671 ค่า RSER มีค่าประมาณ 0.1 เมื่อพลังงานศักย์ลดลงต่ำกว่า -1.3 เมกะพาสคาล Koehler (1982) ได้สรุปไว้ว่า ค่า RLER และ RSER มีรูปแบบการตอบสนองต่อระดับการขาดน้ำที่เพิ่มขึ้นเหมือนกัน แต่ค่า RSER ลดลงเร็วกว่า RLER แสดงว่า การยืดตัวของลำต้นได้รับผลกระทบจากการขาดน้ำมากกว่าการยืดตัวของใบ

4.4 พื้นที่ใบและจำนวนใบ

แนวทางหนึ่งของการตอบสนองของพืชต่อสภาพขาดน้ำคือการที่พืชพยายามลดความเครียดที่เกิดขึ้นจากการขาดน้ำ เช่น การม้วนใบ ซึ่งถือเป็นการปรับตัวที่มีประโยชน์ของพืชโดยม้วนใบเพื่อลดพื้นที่ใบ ช่วยลดพื้นที่รับแสง และป้องกันใบพืชจากการขาดน้ำและอุณหภูมิของใบที่สูงเกินไป ซึ่งเป็นการลดการคายน้ำที่ต้องนำมาใช้ในการระบายความร้อน (จักรี, 2539)

Inman-Bamber and de Jager (1986) ได้ศึกษาในอ้อยพันธุ์ NCo376 และ N11 พบว่าระดับการม้วนใบเพิ่มขึ้นตามการลดลงของค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบ โดยความกว้างของใบลดลง จากความกว้างของใบปกติ และเริ่มสังเกตเห็นการม้วนเมื่อค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบต่ำกว่า -1 เมกะพาสคาล และระดับการม้วนใบต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Turgut และ Kadioglu (1998) ที่รายงานว่า สภาวะขาดน้ำและอุณหภูมิอากาศที่สูงตั้งแต่ 38 องศาเซลเซียส เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการม้วนใบใน *Ctenanthe setosa* และเปอร์เซ็นต์การม้วนใบจะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาขาดน้ำเพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ยังพบว่าระดับการม้วนใบมีความสัมพันธ์กับการทนแล้ง กล่าวคือใบม้วนมาก หมายถึงอ่อนแอต่อการขาดน้ำมาก (Rutherford, 1989) สอดคล้องกับการทดลองของ นางลักษณีย์ และคณะ (2546) ซึ่งได้รายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างระดับการม้วนใบและค่าพลังงานของน้ำในดิน พบว่าเปอร์เซ็นต์การม้วนใบที่คำนวณได้จากการลดลงของความกว้างใบในสภาพที่ได้น้ำเต็มที่เพิ่มขึ้นตามค่าพลังงานน้ำในดินที่ลดลงและระยะเวลาที่พืชขาดน้ำเพิ่มขึ้น โดยอ้อยพันธุ์ทนแล้ง (KPS 94-13) มีเปอร์เซ็นต์การม้วนใบต่ำกว่าโคลนพันธุ์ 93-1-25 ซึ่งมีลักษณะไม่ทนแล้ง แต่อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลอย่างชัดเจนถึงหน้าที่และกลไกของการม้วนใบ และยังมีข้อโต้แย้งในเรื่องของการใช้ลักษณะการม้วนใบ ระดับการม้วนใบและระยะเวลาในการม้วนใบเป็นดัชนีที่ใช้เชื่อมโยงกับลักษณะทนแล้ง เนื่องจากมีบางแนวคิดที่ว่าพันธุ์ที่ม้วนใบเร็วหรือม้วนใบมาก น่าจะสามารถหลีกเลี่ยงผลกระทบจากการขาดน้ำได้ดีกว่า จึงน่าจะทำให้ทนการขาดน้ำได้ดีกว่า ในปี 2000 Moullia ได้ศึกษาลักษณะการม้วนใบในพืชตระกูลหญ้า โดยเลือกศึกษาในข้าว และข้าวโพด พบรูปแบบการม้วนใบ 2 แบบคือ ในข้าว ระดับการม้วนใบจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบลดลง โดยเริ่มแสดงการม้วนเมื่อค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบลดลงถึงระดับ -1 เมกะพาสคาล แต่ในข้าวโพด มีการตอบสนองต่อการลดลงของค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบในช่วงแคบกว่า คือเริ่มแสดงการม้วนใบเมื่อค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบอยู่ในช่วงประมาณ -1.4 ถึง -2 เมกะพาสคาล จากนั้นระดับการม้วนใบจะคงที่ถึงแม้ว่าค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบจะลดลงไปอีกก็ตาม

พื้นที่ใบ (area per leaf) เป็นอีกหนึ่งลักษณะที่ได้รับผลจากการขาดน้ำเช่นกัน โดยส่งผลให้การทิ้งใบแก่ (leaf senescence) เกิดเร็วขึ้น จำนวนใบที่สร้างใหม่ต่อลำ และเปอร์เซ็นต์การแตกหน่อใหม่ลดลง และยังทำให้ใบที่สร้างใหม่นี้มีขนาดเล็กลงด้วย (Inman-Bamber, 2004) ซึ่งในอ้อยแต่ละสายพันธุ์ก็จะตอบสนองต่อความเครียดจากการขาดน้ำในระดับที่ต่างกันไป

4.5 การสังเคราะห์แสง

เมื่อพืชได้รับภาวะขาดน้ำ อัตราสังเคราะห์แสงสุทธิลดลง เนื่องจากปากใบปิดแคบลง เพื่อลดการสูญเสียน้ำ เป็นผลให้ผลผลิตลดลงตามลำดับ พืชจึงต้องหาสมดุลของระดับการปิดแคบของปากใบเพื่อให้เสียน้ำน้อยที่สุดแต่สามารถตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ได้มากที่สุด กลไกควบคุมการเปิดปิดปากใบในอ้อยยังไม่มีข้อสรุปชัดเจน จากการรวบรวมงานวิจัยเกี่ยวกับปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเปิดปิดปากใบในอ้อยภายใต้สภาพขาดน้ำ พบว่างานวิจัยส่วนใหญ่กล่าวถึงสองปัจจัยหลักคือ การปิดแคบของปากใบได้รับอิทธิพลจากปริมาณ ABA ที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากรากพืชอยู่ในสภาพขาดน้ำ หรือมีความสัมพันธ์กับระดับพลังงานของน้ำในใบ

Grantz and Meinzer (1990) พบความเชื่อมโยงระหว่างค่าน้ำไหลปากใบกับปริมาณ ABA ในเนื้อเยื่อใบอ้อยภายใต้สภาพขาดน้ำ โดยค่าพลังงานศักย์ของน้ำไม่มีความสัมพันธ์กับค่าน้ำไหลปากใบ ปริมาณ ABA ที่เพิ่มมากขึ้นเกิดจากการกระตุ้นโดยสัญญาณเคมีที่ส่งมาจากราก Smith *et al.* (1999) พบว่าค่าน้ำไหลปากใบลดลง 30 % เมื่อรากอยู่ภายใต้ภาวะขาดน้ำเพิ่มขึ้น และค่าน้ำไหลปากใบนี้ไม่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบ ขณะที่ Assmann and Grantz (1990) รายงานไว้ว่าสภาวะน้ำใน epidermal cell บริเวณรอบเซลล์คุม มีผลต่อระดับการเปิดปากใบ งานวิจัยของ Saliendra and Meinzer ในปี 1989 พบว่าพันธุ์อ้อยของฮาวาย 2 พันธุ์แสดงค่าน้ำไหลปากใบแตกต่างกัน ในพันธุ์ H69-8235 ค่าน้ำไหลปากใบตอบสนองต่อการลดลงของค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบ และปากใบปิดอย่างรวดเร็ว เมื่อค่าพลังงานของน้ำในดินลดลงถึง -40 กิโลพาสคาล แต่ในพันธุ์ H65-7052 ค่าน้ำไหลปากใบจะลดลงเมื่อค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบลดลงต่ำกว่า -0.9 เมกะพาสคาล และปากใบจะปิดแคบลงเมื่อค่าพลังงานของน้ำในดินลดลงต่ำกว่า -80 กิโลพาสคาล จากข้อมูลประจำพันธุ์ พบว่าพันธุ์ H69-8235 เป็นพันธุ์ทนแล้ง อาจเพราะสามารถรักษาน้ำไว้ได้ดี เนื่องจากปากใบปิดเร็วตามการลดลงของค่าพลังงานของน้ำในดิน อย่างไรก็ตามข้อมูลเหล่านี้ยังไม่ได้รับการทดสอบและยืนยันผลจากพันธุ์อ้อยส่วนใหญ่ เนื่องจากพืชต่างพันธุ์กัน อาจมีรูปแบบการตอบสนองต่อการขาดน้ำต่างกัน

นอกจากนี้อัตราการสังเคราะห์แสงยังขึ้นกับกิจกรรมของเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์แสงด้วย จากการศึกษาของ Du *et al.* ในปี 1996 และ 1998 พบว่ากระบวนการสังเคราะห์แสงในอ้อยไวต่อภาวะขาดน้ำมาก โดยค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบที่ระดับตั้งแต่ -0.37 เมกะพาสคาลและต่ำกว่า เป็นระดับที่เริ่มมีผลยับยั้งการสังเคราะห์แสงในอ้อย ภายใต้ภาวะขาด

น้ำไม่รุนแรง ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบสูงกว่า -0.9 เมกะพาสคาล อัตราการสังเคราะห์แสงลดลงเนื่องจากปากใบปิดแคบลง ซึ่งแสดงด้วยค่าน้ำไหลปากใบที่ต่ำลง แต่เมื่อภาวะขาดน้ำรุนแรงขึ้น ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบลดลงต่ำกว่า -1.2 เมกะพาสคาล กิจกรรมของเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์แสงจะเป็นปัจจัยที่มีผลต่ออัตราสังเคราะห์แสง แสดงออกด้วยการลดลงของอัตราการแลกเปลี่ยนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (carbon exchange rate, CER) ค่าน้ำไหลปากใบ ปริมาณคลอโรฟิลล์ total soluble protein ตลอดจนกระบวนการทางชีวเคมี และกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น SPS (sucrose-phosphate synthase), FBPase (fructose-1,6-biphosphatase), AGPP (ADPglucose pyrophosphorylase), UGPP (UDPglucose pyrophosphorylase) โดยเฉพาะกิจกรรมของเอนไซม์ PPDK (pyruvate orthophosphate dikinase) ลดลงอย่างมาก จึงเป็นไปได้กว่า เอนไซม์ PPDK น่าจะเป็นตัวยับยั้ง (limiting enzyme) การสังเคราะห์แสงในอ้อยภายใต้ภาวะขาดน้ำรุนแรง

4.6 พลังงานศักย์ของน้ำ

การศึกษากลไกทางสรีรวิทยา พบว่าค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบสามารถใช้เป็นตัววัดการตอบสนองของพืชต่อสภาวะน้ำในดินได้ (Taiz and Zeiger, 2002) จากการวัดการเปลี่ยนแปลงค่าพลังงานศักย์ของน้ำในใบอ้อยในรอบวัน พบว่าในภาวะที่ได้รับน้ำปกติค่าพลังงานศักย์รวมของใบอ้อยขึ้นกับสภาพอากาศที่ใบสัมผัสอยู่ โดยสภาพอากาศที่มีค่าแรงดึงระเหยน้ำของอากาศสูง และความชื้นแสงมาก น้ำในใบจะระเหยออกไปมาก ทำให้ปริมาณน้ำที่เก็บในใบลดลงอย่างรวดเร็ว มีผลให้ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบลดลงด้วย (Schultz และ Matthews, 1997) แต่เมื่ออ้อยเผชิญกับสภาวะขาดน้ำ ระดับพลังงานของน้ำในดินจะเป็นตัวควบคุมค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ โดยค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบอ้อยลดลงตามค่าพลังงานของน้ำในดินที่ลดลง Robert *et al.* (1990) วัดค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในอ้อย ที่ปลูกในเขตพื้นที่ชลประทาน และในเขตอาศัยน้ำฝนของหมู่เกาะมอริเชียส พบว่า การวัดในช่วงเช้า (6.30 น.) ได้ค่าประมาณ -0.05 เมกะพาสคาล และ -0.2 เมกะพาสคาล ในช่วงกลางวัน (12.00 น.) วัดค่าได้ประมาณ -1 เมกะพาสคาล และ -1.5 เมกะพาสคาล ในเขตพื้นที่ชลประทาน และเขตอาศัยน้ำฝน ตามลำดับ

พลังงานความเข้มข้นของน้ำในเซลล์ เป็นอีกหนึ่งลักษณะที่มีการศึกษากัน เช่น Robert *et al.* (1990) วัดค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในสภาพที่เซลล์มีแรงเต่งเต็มที่ ได้ค่าประมาณ -1.04 เมกะพาสคาล จากต้นอ้อยที่ปลูกในพื้นที่เขตชลประทาน และ -1.45 เมกะพาส

กาล จากต้นอ้อยที่ปลูกในพื้นที่เขตอาศัยน้ำฝน สอดคล้องกับผลของ Koehler *et al.* (1982) ที่เก็บข้อมูลการเปลี่ยนแปลงค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในอ้อยที่ปลูกในเขตพื้นที่ชลประทาน และเขตอาศัยน้ำฝนที่ฮาวาย เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า ค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในอ้อยที่ปลูกในเขตพื้นที่ชลประทาน ลดลงจาก -0.68 เมกะพาสคาล จนถึง -1.05 เมกะพาสคาล ขณะที่ในเขตอาศัยน้ำฝน ค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำลดลงถึง -1.55 เมกะพาสคาล นอกจากนี้ยังตรวจพบว่าสารละลายในเซลล์มีความเข้มข้นมากขึ้น และพบการสะสมของ hexose, sucrose, potassium และ amino acid แต่ไม่อยู่ในระดับที่สูงพอสำหรับการทำให้ค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำลดลงได้ การเพิ่มขึ้นของสารละลายในเซลล์ เกิดขึ้นหลังจากการลดลงของการยืดตัวของลำต้น จึงเป็นไปได้ว่า การปรับแรงดันออสโมติกเกิดหลังจากพืชได้รับสภาพขาดน้ำไปแล้วระยะหนึ่ง ต่อมาในปี 1989 Rutherford ได้ค้นพบว่ามี organic acid บางตัวสะสมอยู่ในเซลล์ด้วย เช่น proline ซึ่งพบในใบ และมีปริมาณต่างกันระหว่างต้นที่อยู่ในสภาพขาดน้ำ และต้นที่ได้รับน้ำเต็มที่ และระหว่างพันธุ์อ้อยที่ทนแล้ง และอ่อนแอต่อสภาพแล้ง ซึ่งในอ้อยพันธุ์ N11 ซึ่งมีข้อมูลว่าเป็นพันธุ์ทนแล้งมีปริมาณของ proline สะสมในใบมากกว่าพันธุ์ NCo376

4.7 การพัฒนาทรงพุ่ม

บทบาทของขนาดและการพัฒนาทรงพุ่มมีความสำคัญต่อผลผลิต ได้แก่ เป็นตัวรับรังสีจากดวงอาทิตย์ ซึ่งช่วยขับเคลื่อนกระบวนการสังเคราะห์แสง เป็นแหล่งที่เกิดการระเหยน้ำ ช่วยบังแสงวัชพืช ซึ่งปัจจัยทั้งหมดนี้เกี่ยวข้องกับการสร้างผลผลิต มีรายงานที่กล่าวว่าความแตกต่างของการพัฒนาทรงพุ่มเกี่ยวข้องกับพันธุกรรม (Singels and Donaldson, 2000; Zhou *et al.*, 2003) สภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ (Inman-Bamber, 1994; Campbell *et al.*, 1998) และการเกษตรกรรม เช่น ระยะห่างระหว่างแถว (Singels and Smit, 2002; Singels *et al.*, 2005) Smit and Singels (2006) ได้ศึกษาการพัฒนาทรงพุ่มของอ้อยภายใต้ภาวะขาดน้ำ โดยเฉพาะอ้อย 2 สายพันธุ์ คือ NCo376 และ N22 จากท่อนพันธุ์ ให้น้ำโดยระบบน้ำหยด รักษาปริมาณน้ำในดินให้สูงกว่า 60% ของค่าปริมาณน้ำที่ความจุน้ำสนาม (field capacity) เมื่อต้นอ้อยมีอายุ 4 เดือน ให้สภาพขาดน้ำโดยดน้ำเป็นเวลา 42 วัน ปริมาณน้ำในดินลดลงเหลือ 15 % ของระดับปริมาณน้ำที่ความจุน้ำสนาม เมื่อดน้ำ 15 วัน และ 10.5% ของระดับปริมาณน้ำที่ความจุน้ำสนาม เมื่อดน้ำเป็นเวลา 40 วัน พบว่าภาวะขาดน้ำทำให้อัตราการสร้างใบใหม่ลดลงอย่างมาก ในใบที่แก่กว่า พบว่าการเปลี่ยนสีของใบ และใบแห้งเกิดได้เร็วขึ้น ไม่แตกต่างกันในอ้อยทั้งสองพันธุ์ สอดคล้องกับรายงานของ Inman-Bamber (2004) ซึ่งลักษณะทั้งสองอย่างนี้เกิดขึ้นในเวลาเดียวกัน และมีผล

ทำให้จำนวนใบที่ยังมีสีเขียวอยู่ลดลง ซึ่งทำให้พื้นที่รับแสง การใช้น้ำ และการสังเคราะห์แสงลดลง และเพิ่มปริมาณรังสีที่ผ่านทรงพุ่มลงไปสู่ดิน

5. การจำลองสภาพขาดน้ำโดยใช้สารโพลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG)

ในสภาพธรรมชาติ สภาพแล้งทำให้พลังงานน้ำในดินลดลงอย่างช้า ๆ ในทางตรงกันข้าม การสร้างสภาพแล้งโดยการงดน้ำโดยเฉพาะการงดน้ำพืชที่ปลูกในกระถาง พลังงานน้ำในดินจะลดลงในอัตราที่เร็วกว่ามาก และไม่สามารถควบคุมระดับพลังงานน้ำในดินได้แน่นอน ซึ่งในบางกรณีพืชได้รับภาวะเครียดจากการขาดน้ำเร็วเกินไป ทำให้พืชปรับตัวตามไม่ทัน มีผลให้การวัดข้อมูลเกิดความผิดพลาดได้ นอกจากนี้ เครื่องมือที่วัดพลังงานน้ำในดินยังมีข้อจำกัดในแง่ที่ว่าไม่สามารถวัดพลังงานน้ำบริเวณรอบ ๆ ปลายรากของพืช ซึ่งเป็นบริเวณที่พืชสามารถดูดน้ำไปใช้ได้จริง ส่งผลให้ไม่สามารถประเมินระดับความเครียดจากการขาดน้ำที่พืชได้รับได้อย่างถูกต้อง

ในปัจจุบัน การจำลองภาวะขาดน้ำสามารถใช้สารโพลิเอทิลีน ไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ช่วยให้อาจสามารถควบคุมระดับของภาวะขาดน้ำได้ตามต้องการ มีความสม่ำเสมอมากกว่าการปลูกและงดน้ำในดิน โดย PEG ทำให้พลังงานความเข้มข้นของน้ำในสารละลายธาตุอาหารที่ใช้ปลูกพืชลดลง (Blum, 2005) ซึ่ง PEG ที่มีมวลโมเลกุลตั้งแต่ 6000 ขึ้นไป ได้มีการศึกษาแล้วว่าสามารถนำมาใช้ในการจำลองภาวะขาดน้ำได้โดยไม่เป็นพิษต่อต้นพืช

มีรายงานการวิจัยที่ศึกษาการตอบสนองของพืชภายใต้สภาพขาดน้ำที่เกิดจากการใช้ PEG ตัวอย่างเช่น Baisak *et al.* (1994) รายงานว่าปริมาณคลอโรฟิลล์และโปรตีนในข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L. cv. Sonalika) ลดลงมากขึ้นตามภาวะขาดน้ำที่เพิ่มขึ้นจากการใช้สารละลาย PEG ที่ให้ค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในสารละลายธาตุอาหารเท่ากับ -0.5 -1.0 และ -1.5 เมกะพาสคาล เช่นเดียวกับ Zayed and Zeid (1997/98) ต้นกล้าถั่วเขียว (*Vigna radiata*) ที่ปลูกในทรายและรดด้วยสารละลายธาตุอาหารที่เติม PEG ที่มีค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำในสารละลายธาตุอาหารเท่ากับ -0.05, -0.2 และ -0.5 เมกะพาสคาล พบว่าปริมาณ chlorophyll *a* ต่อ chlorophyll *b* และ ปริมาณ carotinoids ลดลงเมื่อระดับพลังงานความเข้มข้นน้ำในสารละลายธาตุอาหารลดลง และเห็นการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนที่ระดับ -0.5 เมกะพาสคาล ในทำนองเดียวกัน Zhang and Kirkham (1995) รายงานว่า อัตราสังเคราะห์แสง ค่าพลังงานศักย์ของน้ำใน

ใบ พลังงานความเข้มข้นของน้ำ และ อัตราการระเหยน้ำในทานตะวันลดลงเมื่อได้รับภาวะขาดน้ำ ที่ระดับ -0.57 เมกะพาสคาล สอดคล้องกับงานของ Jiang *et al.* (1995) ที่รายงานว่า การชักนำให้เกิดภาวะขาดน้ำกับ *Picea glauca* โดยใช้สารละลาย PEG ทำให้อัตราสังเคราะห์แสงสุทธิและค่าความดันเต่งลดลงอย่างชัดเจน นอกจากนี้ Johnson *et al.* (1996) รายงานว่าการใช้ PEG ทำให้พลังงานความเข้มข้นของน้ำของสารละลายธาตุอาหารลดลงถึงระดับ

-1.6 ถึง -2.0 เมกะพาสคาล กับ *Colophospermum mopane* มีผลทำให้แรงดันเต่งของเซลล์ลดลงอย่างชัดเจน Ranjbarfordoei *et al.* (2000) ได้รายงานไว้ว่า การจำลองภาวะขาดน้ำโดยใช้ PEG กับต้นถั่วพิสตาชิโอ (*Pistacia khinjuk* L. and *P. mutica* L.) ส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบลดลง และ Molnar *et al.* (2004) ใช้ PEG จำลองภาวะขาดน้ำให้กับข้าวสาลี พบว่า ที่ระดับความเครียด -1.8 เมกะพาสคาล ประสิทธิภาพการใช้แสงสูงสุดของระบบรับแสง PSII ไม่เปลี่ยนแปลง แต่ประสิทธิภาพการใช้แสงของใบในช่วงกลางวัน และอัตราการเคลื่อนย้ายอิลคตรอนลดลง

6. เครื่องหมายโมเลกุลกับการสืบค้นยีน

เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) หมายถึง ลำดับเบสช่วงหนึ่งบนโครโมโซมที่สามารถตรวจสอบได้ และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ ในลักษณะที่ติดไปกับยีนที่สนใจ ดังนั้นรูปแบบของการถ่ายทอดหรือการกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุล จึงเหมือนกับรูปแบบการกระจายตัวของยีนที่มันติดอยู่หรือเชื่อมโยงอยู่ จากความก้าวหน้าในงานวิจัยระดับโมเลกุลในปัจจุบัน การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับยีนที่มีความสำคัญทางการเกษตร สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม พบว่า การแสดงออกของเครื่องหมายโมเลกุลไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ไม่ขึ้นกับการข่มของยีนแบบใด และไม่ขึ้นกับการแสดงออกของยีนในระยะใด ๆ จึงมีประโยชน์ในการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงพันธุ์

เครื่องหมายโมเลกุลสามารถพัฒนาขึ้นได้โดยใช้เทคนิคต่าง ๆ เช่น RFLP (restriction fragment length polymorphism) ซึ่งเป็นวิธีการแรกที่ใช้กัน ปัจจุบันไม่นิยมใช้แล้ว เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วย RFLP ต้องการดีเอ็นเอปริมาณมากและมีคุณภาพดี ใช้เวลาและค่าใช้จ่ายสูง ตลอดจนระบบในการติดตามผลค่อนข้างซับซ้อน (Ranade *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังมีเทคนิคที่เรียกว่า PCR-based techniques เช่น random amplified polymorphic DNA (RAPD),

microsatellites หรือ simple sequence repeat (SSR), amplified fragment length polymorphism (AFLP), arbitrarily primed PCR (AP-PCR) เป็นต้น (Chawla, 2000)

AFLP (amplified fragment length polymorphism) เป็นวิธีการหนึ่งที่ยินยอมใช้กันมากในงานด้านเทคโนโลยีดีเอ็นเอในปัจจุบัน ถือเป็นเทคนิคพื้นฐานในการเริ่มต้นศึกษาทางด้านดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตทั้งหลาย ได้รับการพัฒนาโดย Vos *et al.* (1995) โดยประยุกต์จากเทคนิค RFLP และ RAPD กล่าวคือ เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่นเดียวกับเทคนิค RFLP จึงมีความแน่นอนของผลการตรวจสอบสูงเหมือน RFLP แต่ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยกว่า ชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจสอบจะถูกนำมาเพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยา PCR เหมือนเทคนิค RAPD แต่มีข้อได้เปรียบคือ สามารถทำซ้ำปฏิกิริยาแล้วให้ผลเหมือนเดิม และสามารถตรวจสอบความหลากหลายได้หลายตำแหน่งเหมือน RAPD ดังนั้น AFLP จึงเป็นการรวมหลักการของ RAPD และ RFLP เข้าด้วยกัน เทคนิค AFLP นี้ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ ย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด เลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนด้วย AFLP primer และวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

การย่อยดีเอ็นเอทำได้โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *EcoRI* ซึ่งมีความถี่ในการตัดต่ำ มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส และ *MseI* ซึ่งมีความถี่ในการตัดสูง มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส ดังนั้นจึงไม่มีดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าว จะเกิดเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเฉพาะเจาะจง 3 รูปแบบคือ ชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายทั้งสองข้างถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายทั้งสองข้างถูกตัดด้วยเอนไซม์ *MseI* และชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายข้างหนึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และปลายอีกข้างหนึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *MseI* จากนั้นเชื่อมต่อปลายทั้งสองข้างของชิ้นดีเอ็นเอที่ย่อยด้วยชิ้นดีเอ็นเอสังเคราะห์สายสั้น ๆ ที่รู้รหัส (adapter) เพื่อให้เป็นที่จับของไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณในขั้นตอนการทำ PCR ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้ปลายด้าน 5' มีเบสคู่สมกับ adapter และเพิ่มเบสคัดเลือกลงไปทางด้านปลาย 3' อีก 1-3 เบส เพื่อให้เกิดความจำเพาะต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ได้รับการคัดเลือก ช่วยลดปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณลง ไพรเมอร์แต่ละชนิดที่ใช้จะประกอบด้วยลำดับเบส 3 ส่วนคือ เบสหลัก (core base) ลำดับเบสที่เป็นรหัสของเอนไซม์ (enzyme code) และเบสคัดเลือกลงที่ต่อเข้าไปที่ปลาย 3' (selective base) การทำ PCR ที่เพิ่มเบสคัดเลือกลงไปทางด้านปลาย 3' จะทำ 2 ครั้ง การทำ PCR ครั้งแรกเรียกว่า pre-selective amplification ครั้งที่ 2 เรียกว่า selective amplification จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จะอยู่

ในช่วง 50-100 ขึ้น โดยขึ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จะมีขนาดแตกต่างกันตามขนาดที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นวิเคราะห์ขึ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) บน denaturing polyacrylamide gel แล้วย้อมเจลดด้วยซิลเวอร์ไนเตรท (silver staining) ซึ่งการตรวจสอบโดยวิธีนี้ประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าการตรวจสอบผลโดยการทำ Southern blot hybridization ของเทคนิค RFLP ข้อดีอีกประการของ AFLP คือสามารถทำได้โดยไม่จำเป็นต้องมีข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตนั้นมาก่อน จึงช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในส่วนการหาลำดับเบสซึ่งต้องใช้ทุนสูงไปได้ เทคนิค AFLP ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ใช้ในการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม การพิสูจน์พันธุ์ การทำลายพิมพีดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังใช้ตรวจหาความแตกต่างระหว่างพันธุกรรมเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบและคัดเลือกกลุ่มผสมต่าง ๆ โดยเฉพาะการคัดเลือกลักษณะที่แสดงความแตกต่างไม่ชัดเจน ประเมินผลยาก หรือต้องเสียค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบสูง วิธีการนี้จะ ต้องหาเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับยีนให้ได้ก่อน แล้วนำไปใช้ในการคัดเลือกโดยพิจารณาจากเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านั้น เนื่องจากเทคนิค AFLP ให้จำนวนที่แสดงความแตกต่างโดยเฉลี่ยสูงกว่าเทคนิคอื่น ๆ โอกาสที่จะพบความแตกต่างในเครื่องหมาย AFLP จึงเป็นไปได้สูง

การสืบหาเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับยีน (gene tagging) เป็นวิธีการค้นหายีนที่รวดเร็ว สามารถทำได้ในกลุ่มประชากรชนิดต่าง ๆ ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมของลักษณะที่ต้องการ หลักการสำคัญของ gene tagging คือ การสร้างกลุ่มตัวแทนสองกลุ่มที่มีความแตกต่างของลักษณะที่จะทำการศึกษาอย่างชัดเจน เครื่องหมายโมเลกุลถูกนำมาใช้เพื่อหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่าง โดยที่เครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างจะถือเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่น่าจะมีความเกี่ยวพันหรืออยู่ใกล้กับ QTL หรือยีนที่ควบคุมลักษณะดังกล่าวนั่นเอง (Ahn *et al.*, 1992) Collard *et al.* (2005) ได้กล่าวถึงวิธีการที่สะดวก รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพในการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลไว้ 2 วิธี ได้แก่ bulk segregants analysis (BSA) และ selective genotyping

การวิเคราะห์แบบวิธีการ bulk segregants analysis (BSA) ซึ่งเสนอโดย Michelmore *et al.* (1991) เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่มีรายงานว่า สามารถคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่สนใจได้สะดวก รวดเร็ว ประหยัดเวลา และค่าใช้จ่ายกว่าการศึกษาโดยตรงจากประชากรขนาดใหญ่ โดยใช้หลักว่า ประชากรรุ่น F_2 ที่เกิดจากการผสมตัวเองของรุ่น F_1 นั้น จะมีการกระจายตัวของยีนตำแหน่งต่าง ๆ ได้มาจากรุ่นพ่อแม่ตลอดทั่วทั้งจีโนม ถ้าแบ่งประชากร F_2 นี้ออกเป็น 2

กลุ่มโดยการคัดเลือกลักษณะหนึ่งลักษณะเดียว สมาชิกในกลุ่มเดียวกันจะมียีนที่คัดเลือคนั้นไว้เหมือนกัน สมาชิกอีกกลุ่มหนึ่งจะไม่มียีนชนิดนั้นอยู่เลย (สมาชิกทั้ง 2 กลุ่มอาจมีหรือไม่มียีนอื่นที่มีได้คัดเลือกหรือสนใจอยู่เลยก็ได้) ฉะนั้นสมาชิกในกลุ่มเดียวกันจะมีส่วนของโครโมโซมที่เกี่ยวข้องกับยีนที่คัดเลือกไว้เหมือน ๆ กัน นั่นคือจะมีเครื่องหมายโมเลกุลเหมือนกัน

การวิเคราะห์แบบ selective genotyping หรือ distribution extreme analysis หรือ trait-based marker analysis เป็นอีกหนึ่งวิธีการหนึ่งที่สามารถคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่สนใจได้อย่างรวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่าย เนื่องจากการวิเคราะห์กลุ่มประชากรย่อยที่แสดงฟีโนไทป์ของลักษณะที่ต้องการศึกษาแตกต่างกันอย่างมาก 2 กลุ่ม ซึ่งต่างกับวิธีการ bulk segregants analysis ตรงที่ไม่นำดีเอ็นเอจากแต่ละต้นมารวมกัน ข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธีการนี้สามารถนำไปสร้างแผนที่ยีนและวิเคราะห์ QTL ได้ (Lander and Botstein, 1989; Foolad and Jones, 1993; Zhang *et al.*, 2003)

ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลและลักษณะที่แสดงออก วิธีวิเคราะห์ทางสถิติถูกนำมาใช้เพื่อตรวจสอบความเชื่อมโยงระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลและตำแหน่งของยีนหรือ QTL โดยใช้หลักการ analysis of variance และ regression analysis แบ่งได้เป็น 3 วิธี

1. single marker analysis หรือ single factor analysis หรือ single point analysis การวิเคราะห์ทางสถิติที่ใช้สำหรับ single marker analysis สามารถใช้ได้ทั้ง t-test, ANOVA และ linear regression ความแตกต่างทางสถิติจะบอกให้ทราบถึงความเชื่อมโยงระหว่างลักษณะที่แสดงออกกับเครื่องหมายโมเลกุล 1 เครื่องหมาย หรืออีกนัยหนึ่งคืออธิบายถึงความเกี่ยวพันกันระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล 1 เครื่องหมายกับยีนหรือ QTL ที่ควบคุมลักษณะนั้น

2. simple interval mapping (SIM) วิธีการนี้ได้ถูกเสนอครั้งแรกโดย Lander and Botstein ในปี 1989 หลักการโดยทั่วไปในการวิเคราะห์คือการทดสอบ model สำหรับการปรากฏของ QTL ณ จุดต่าง ๆ ระหว่างสองเครื่องหมายโมเลกุลตลอดจีโนม การทดสอบ model ใช้หลักการของ maximum likelihood แต่จุดอ่อนของวิธีการนี้คือ การ fit QTL model เฉพาะตำแหน่งเดียวนั้นทำให้ผลรวมของ QTL ที่เพิ่มเข้ามา (additional QTL) ไปรวมอยู่กับ sampling variance

และถ้าหากมี 2 QTL ที่ linked กัน ผลรวมของอิทธิพลต่าง ๆ (QTL effect) จะทำให้เกิด biased ในการประเมิน

3. composite interval mapping (CIM) เป็นวิธีการทดสอบ model สำหรับผลรวมของ QTL ทั้งหมด ถูกเสนอโดย Zeng ในปี 1994 โดยทางทฤษฎีแล้ว วิธีการนี้จะมีประสิทธิภาพและความแม่นยำมากกว่าวิธีการวิเคราะห์แบบ SIM เนื่องจากผลกระทบของ QTL อื่น ๆ นั้นไม่ได้รวมอยู่กับ residual variance

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อติดตามยีนที่สนใจนั้น สามารถทำได้สำเร็จในพืชหลายชนิด เช่น ในอ้อย Mudge *et al.* (1996) ได้ศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับโรคในอ้อยด้วยเทคนิค RAPD โดยพบเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงอยู่กับความอ่อนแอต่อโรค eye spot (*Bipolaris sacchari*) ในกลุ่มประชากรที่ได้จากการผสมระหว่าง *S. officinarum* และ *S. robustum* การใช้เครื่องหมายโมเลกุลประเมินตำแหน่ง QTL ที่เชื่อมโยงกับลักษณะสำคัญทางการเกษตรของอ้อย เช่น การใช้เครื่องหมายโมเลกุล RFLP ในการหาตำแหน่ง QTL ที่เกี่ยวข้องกับปริมาณน้ำตาลในลำต้นในกลุ่มประชากรที่ได้จากการผสมระหว่าง *S. officinarum* และ *S. spontaneum* (Hoarau *et al.*, 2002; Ming *et al.*, 2001, 2002b) การศึกษาลักษณะทางไฟเบอร์ของอ้อย โดยใช้ bulk segregant analysis (BSA) (Msomi and Botha, 1994) ความสูงต้น และการออกดอก (Ming *et al.*, 2002a) ความยาวลำ ขนาดลำ และจำนวนลำ (Hoarau *et al.*, 2002) การทำแผนที่จีโนมอ้อยด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น RFLP (Da Silva *et al.*, 1993) และ AFLP (Hoarau *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังมีการสร้างฐานข้อมูลยีนต่าง ๆ ในอ้อย โดยการทำให้ EST (expressed sequence tag) เพื่อศึกษาจีโนมอ้อย (Carson and Botha, 2000; Grivet and Arruda, 2001) และพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลโดยเทคนิค SSR (simple sequence repeat) (Cordeiro *et al.*, 1999, 2000, 2001, 2003) ในพืชชนิดอื่น ๆ เช่น Chagu *et al.* (1996) พบ RAPD 4 เครื่องหมาย ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนต้านทานโรคไวรัส spotted wilt (Sw-5) ในมะเขือเทศ ซึ่งครอบคลุมระยะทางทั้งหมด 10.5 cM ในปีต่อมา Chagu *et al.* (1997) ศึกษาเครื่องหมาย RAPD ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีน QTL ที่ควบคุมความทนทานต่อโรคใบหงิกเนื่องจากไวรัสในมะเขือเทศ พบ RAPD 4 เครื่องหมายที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีน QTL ครอบคลุมระยะทางทั้งหมด 17.3 cM มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 6 สามารถอธิบายความต้านทานได้ 27.7 % Fang *et al.* (1998) หาเครื่องหมาย RAPD ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนต้านทานโรคไวรัส Ctv ในพืชตระกูลส้ม พบเครื่องหมาย RAPD กระจายตัวร่วมกับยีน Ctv โดยเครื่องหมาย C19 และ AD08 วางตัวขนานทั้งสอง

ด้านของยีน มีระยะทาง 0.5 และ 0.8 cM ตามลำดับ Lanceras (2000) ใช้การวิเคราะห์แบบ bulk segregants พบเครื่องหมาย AFLP ที่วางตัวอยู่ใกล้กับ QTL ที่ควบคุมปริมาณ amylose ในเมล็ดข้าว โดยพบ QTL หนึ่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 3 และอีก QTL หนึ่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 6

ในการปรับปรุงพันธุ์ให้ต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่จำกัด ไม่ว่าจะเป็นสภาพแล้ง ดินเค็ม ดินเป็นกรด และอื่น ๆ อาจทำได้โดยการแสวงหายีนที่ช่วยให้พืชลดความเครียดเนื่องจากสภาพแวดล้อมจำกัดนั้นลงได้ โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการทำแผนที่ยีนขึ้นมา เพื่อให้สามารถระบุตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการได้ Ramann *et al.* (1999) ศึกษาความทนทานต่ออุณหภูมิเย็นในข้าวบาเลย์ โดยใช้เทคนิค bulk segregants analysis ร่วมกับ AFLP ในประชากร F_2 พบ QTL 2 ตำแหน่งที่เชื่อมต่อกับยีนที่ควบคุมลักษณะทนทานอุณหภูมิเย็น Foolad and Chen (1998) ได้ทดลองใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD หาดำแหน่งของยีนในแผนที่ที่เกี่ยวข้องกับการทนเค็มในมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* x *L. pennellii*) ได้ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลต่อลักษณะทนเค็มในช่วงระยะการงอกของเมล็ด หรือการหาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุล RFLP กับลักษณะทนเค็มในมะเขือเทศ (Monforte *et al.*, 1996) ในข้าวสาลี (Dubcovsky *et al.*, 1996) และข้าว (Flowers *et al.*, 2000) สำหรับลักษณะทนแล้ง ยังไม่มีการศึกษาโดยตรงในอ้อย แต่ได้ทำในพืชใกล้เคียงโดย Frova *et al.* (1999) และ Ribaut *et al.* (1997) ได้ศึกษาตำแหน่งการวางตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทนแล้งในข้าวโพด โดยการหาจำนวนและตำแหน่งของ QTL ที่ควบคุมลักษณะองค์ประกอบผลผลิตของข้าวโพด คือ ลักษณะความยาวฝัก ผลผลิตฝักสด น้ำหนักเมล็ด น้ำหนักเมล็ดต่อฝัก โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR, AFLP และ RFLP ในการสร้างแผนที่พันธุกรรม ในปี 2002 Sanchez *et al.* ได้รายงานการศึกษารวบรวมตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทนแล้งในข้าวฟ่าง โดยการหาจำนวนและตำแหน่งของ QTL ที่ควบคุมลักษณะการคงความเขียวอยู่ได้เมื่อได้รับความเครียดจากภาวะแล้ง ซึ่งได้เลือกใช้ประชากร recombinant inbred lines และ near isogenic lines จากข้าวฟ่างลูกผสมระหว่าง B35 X Tx7000 โดยศึกษาลักษณะที่ต้านทานต่อภาวะแล้งทั้งก่อนและหลังการออกดอก จากการศึกษาพบตำแหน่ง QTL 4 ตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับลักษณะนี้ และในปีเดียวกัน Price *et al.* (2002) ได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุล microsatellite 6 เครื่องหมาย, AFLP 34 เครื่องหมาย และ RFLP 102 เครื่องหมาย ในการสร้างแผนที่พันธุกรรม เพื่อหาจำนวนและตำแหน่งของ QTL ที่ควบคุมลักษณะที่พืชหลีกเลี่ยงสภาวะเครียดจากการขาดน้ำ เช่น leaf rolling, leaf drying, leaf relative water content จากการศึกษาพบ QTL 5 ตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับลักษณะนี้ Altinkut *et al.* (2003) ใช้การวิเคราะห์แบบ bulk segregants ร่วมกับเทคนิค AFLP เพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับ

ลักษณะทนทานต่อสภาพขาดน้ำในข้าวบาเลย์ โดยเลือกศึกษา 3 ลักษณะคือความทนทานต่อสารพาราควอท ขนาดของใบ และปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบ ซึ่งได้มีการศึกษามาแล้วว่าทั้ง 3 ลักษณะนี้เกี่ยวข้องกับกลไกการทนทานต่อสภาพขาดน้ำ โดยใช้ ไพร์เมอร์ 40 คู่ ตรวจสอบในประชากร F₂ 80 สายพันธุ์ พบ 1 คู่ primer ที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มดีเอ็นเอทนทานและกลุ่มดีเอ็นเออ่อนแอ