

## ผลและวิจารณ์

### การทดสอบวิธีการและพารามิเตอร์สำหรับใช้คัดเลือกอ้อยทนแล้ง

อุณหภูมิอากาศและความชื้นสัมพัทธ์ภายในโรงเรือนปลูกพืชทดลองแบบ evaporation มีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงตรงข้ามกันคือ ในตอนกลางวัน อุณหภูมิอากาศมีค่าสูงและความชื้นสัมพัทธ์มีค่าต่ำ แต่ในช่วงกลางคืน อุณหภูมิอากาศจะเริ่มลดลงและความชื้นสัมพัทธ์มีค่าสูงขึ้น โดยตลอดช่วงการทดลอง อุณหภูมิสูงสุดในช่วงเวลากลางวันอยู่ที่ประมาณ 32 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศมีค่าต่ำสุดประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงเวลากลางคืน อุณหภูมิอากาศต่ำสุดอยู่ที่ 24 องศาเซลเซียส สำหรับความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศในบางช่วงที่มีฝนตก วัดได้สูงสุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม สภาพอากาศที่ต้นพืชได้รับตลอดการทดลอง มีอุณหภูมิเฉลี่ย 28.2 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศเฉลี่ยเท่ากับ 82.6 เปอร์เซ็นต์ในช่วงกลางวัน สำหรับในช่วงกลางคืน มีอุณหภูมิเฉลี่ย 24.6 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศเฉลี่ยเท่ากับ 92.8 เปอร์เซ็นต์ จากค่าอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ที่ได้ เมื่อนำมาคำนวณค่าแรงดึงระเหยน้ำของอากาศ ( $VPD_{air}$ ) จะได้ค่าที่บ่งบอกถึงสภาพความแห้งของอากาศ ถ้าค่าแรงดึงระเหยน้ำของอากาศที่คำนวณได้มีค่าสูง หมายถึงสภาพอากาศที่แห้งมาก จะทำให้มีอัตราการระเหยน้ำสูง ค่าแรงดึงระเหยน้ำของอากาศในช่วงที่ทำการทดลองมีค่าต่ำสุดตั้งแต่ 0 กิโลพาสคาล ในช่วงเวลากลางคืน ถึง 1.3 กิโลพาสคาล ในช่วงกลางวัน โดยค่าแรงดึงระเหยน้ำของอากาศที่คำนวณได้ในช่วงที่เก็บข้อมูล (ประมาณเที่ยงคืน ถึง 3 นาฬิกา) อยู่ที่ช่วงประมาณ 0.23 กิโลพาสคาล ซึ่งถือว่าเป็นระดับที่ไม่รุนแรง

จากการจำลองสภาพขาดน้ำให้กับต้นอ้อย โดยสภาพขาดน้ำแบบที่ 1 เป็นการปลูกต้นอ้อยในวัสดุปลูก ได้แก่ทรายผสมซีเมนต์แกลบ และเพิ่มระดับการขาดน้ำที่ละน้อยโดยค่อย ๆ ลดปริมาณน้ำที่ให้กับต้นอ้อยลง สภาพขาดน้ำแบบที่ 2 เป็นการปลูกเลี้ยงอ้อยในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland ที่มีองค์ประกอบธาตุอาหารลดลง 10 เท่า ร่วมกับการใช้สาร PEG ทำให้พืชอยู่ภายใต้ภาวะขาดน้ำ โดยเพิ่มระดับความเข้มข้นของ PEG พบว่าสภาพขาดน้ำทั้ง 2 แบบ มีผลให้ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ ค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำ และค่าพลังงานความดันของน้ำมีการเปลี่ยนแปลง ดังนี้

### 1.1 ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ ( $\Psi_t$ )

จากการทดลองพบว่าค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบอ้อยที่วัดได้จากต้นที่ได้รับน้ำเต็มทีของพันธุ์กำแพงแสน 94-13 และโคลนพันธุ์ 93-1-25 ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อระดับความเครียดจากการขาดน้ำเพิ่มขึ้น พบว่าค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบมีการเปลี่ยนแปลง กล่าวคือเมื่อค่าพลังงานเท่ากับกอนดินของน้ำในวัสดุปลูกลดลง (สภาพขาดน้ำแบบที่ 1) หรือเมื่อระดับความเข้มข้นของ PEG เพิ่มขึ้น (สภาพขาดน้ำแบบที่ 2) ซึ่งสะท้อนถึงภาวะขาดน้ำที่รุนแรงขึ้น และพืชได้รับสภาวะเครียดจากการขาดน้ำเพิ่มขึ้น มีผลให้พลังงานศักย์รวมของน้ำในใบของอ้อยทั้งสองพันธุ์มีค่าลดลง โดยโคลนพันธุ์ 93-1-25 มีค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบลดลงเร็วกว่าและต่ำกว่าในพันธุ์กำแพงแสน 94-13 เมื่อเปรียบเทียบในระดับและระยะเวลาที่ได้รับ ความเครียดจากการขาดน้ำเท่ากัน

ภายใต้สภาพขาดน้ำแบบที่ 1 ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบอ้อยที่วัดได้จากต้นที่ได้รับน้ำเต็มทีของทั้ง 2 พันธุ์อยู่ในระดับสูงเท่า ๆ กัน โดยอยู่ในช่วง -120 ถึง -160 กิโลพาสคาล แต่เมื่อค่าพลังงานเท่ากับกอนดินของน้ำลดลงต่ำกว่าถึงระดับ -40 กิโลพาสคาล ซึ่งแสดงว่าวัสดุปลูกเริ่มแห้งถึงแห้งมาก ปริมาณน้ำที่รากดูดได้ย่อมไม่เพียงพอกับการคายน้ำในรอบวัน ในสภาวะเช่นนี้จะเห็นว่าค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบจะมีค่าลดลง เช่นเดียวกันกับการลดลงของค่าพลังงานเท่ากับกอนดินของน้ำในวัสดุปลูก โดยค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบที่วัดได้จากพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีค่าอยู่ในช่วง -1,200 ถึง -1,700 กิโลพาสคาล ขณะที่ในสายพันธุ์ 93-1-25 มีค่าอยู่ในช่วง -1,700 ถึง -2,000 กิโลพาสคาล และเมื่อค่าพลังงานเท่ากับกอนดินของน้ำลดลงต่ำกว่าถึงระดับ -80 กิโลพาสคาล ซึ่งเป็นค่าที่แสดงว่าดินแห้งมาก ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบที่วัดได้จากพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีค่าอยู่ในช่วง -2,100 ถึง -2,600 กิโลพาสคาล ขณะที่ในโคลนพันธุ์ 93-1-25 ให้ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบต่ำสุดเท่าที่ความสามารถของเครื่องวัดความดัน (pressure chamber) จะวัดได้คือ อยู่ที่ระดับ -4,000 กิโลพาสคาล หรือต่ำกว่า (ภาพที่ 1a)

การวัดค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบภายใต้สภาพขาดน้ำแบบที่ 2 ให้ผลที่สอดคล้องกันคือพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบที่วัดได้จากต้นอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่ไม่ได้เติม PEG อยู่ในระดับสูงเท่า ๆ กัน โดยอยู่ในช่วง -120 ถึง -200 กิโลพาสคาล เมื่อระดับความเข้มข้นของ PEG เพิ่มขึ้น พลังงานความเข้มข้นของน้ำในสารละลายธาตุอาหารที่มีค่าลดลงทำให้ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบมีค่าลดลงตามไปด้วย โดยเมื่อพลังงานความเข้มข้น

ของน้ำในสารละลายธาตุอาหารมีค่าลดลงจากระดับ  $-800$  กิโลพาสคาล (PEG 10 เปอร์เซนต์) จนถึงระดับ  $-3,800$  กิโลพาสคาล (PEG 40 เปอร์เซนต์) อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง  $-320$  กิโลพาสคาล จนถึง  $-2,900$  กิโลพาสคาล ขณะที่โคลนพันธุ์ 93-1-25 ให้ค่าโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง  $-520$  ถึง  $-3,700$  กิโลพาสคาล (ภาพที่ 2a)

ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบที่ลดลงนี้บ่งถึงสภาวะของน้ำในใบอ้อยได้ว่ามีอัตราเสียน้ำสูงกว่าอัตรานำน้ำเข้า กล่าวคืออัตราที่น้ำไหลเข้าสู่ต้นไม้ทันกับที่สูญเสียออกไป แสดงว่าอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 และโคลนพันธุ์ 93-1-25 มีระดับการตอบสนองต่อภาวะเครียดที่ต่างกัน และอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ทนทานต่อสภาพแล้งสามารถรักษาคุณภาพของน้ำในใบได้ดีกว่าโคลนพันธุ์ 93-1-25 ซึ่งอ่อนแอต่อสภาพแล้ง

ในภาวะปกติการเปลี่ยนแปลงค่าพลังงานศักย์รวมของใบอ้อยขึ้นกับสภาพอากาศที่ใบสัมผัสอยู่ กลไกนี้เกิดเมื่อพืชเผชิญกับสภาพอากาศที่มีค่าแรงดึงระเหยน้ำของอากาศสูง และความชื้นแฉะมาก น้ำในใบพืชจะระเหยออกไปมาก ทำให้ปริมาณน้ำที่เก็บในใบลดลงอย่างรวดเร็ว มีผลให้ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบพืชลดลงด้วย (Schultz and Matthews, 1997) แต่เมื่อพืชเผชิญกับสภาวะขาดน้ำ ระดับพลังงานของน้ำต้นทางคือที่ปลายรากสัมผัสได้ จะเป็นตัวควบคุมค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ โดยค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบจะลดลงต่ำ ให้ผลสอดคล้องกับ Sellin (1998) ซึ่งพบว่าเมื่อมีน้ำในดินเพียงพอ ค่าพลังงานศักย์ของน้ำในส่วนยอดของ Norway spruce จะตอบสนองต่อค่าแรงดึงระเหยน้ำของอากาศ โดยมีค่าพลังงานศักย์ของน้ำในส่วนยอดไม่ต่ำกว่า  $-1.5$  MPa แต่ถ้าดินมีค่าพลังงานของน้ำต่ำกว่า  $-0.62$  MPa ใบจะตอบสนองต่อสภาพอากาศน้อยลง และมีค่าพลังงานศักย์ของน้ำในส่วนยอดต่ำกว่า  $-1.5$  MPa ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกที่จะเก็บข้อมูลในช่วงกลางคืน เพื่อกำจัดปัจจัยของสภาพเครียดอื่น ๆ เช่น อุณหภูมิสูง หรือ ค่าแรงดึงระเหยน้ำของอากาศสูง ซึ่งอาจมีผลให้ข้อมูลของค่าพลังงานศักย์ของน้ำคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงได้

## 1.2 พลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบ ( $\Psi\pi$ )

ค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบอ้อยที่วัดได้จากการทดลอง (ในสภาพขาดน้ำแบบที่ 1 และ 2) มีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกันกับค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ คือในสภาพที่ได้รับน้ำเต็มที่ อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 และโคลนพันธุ์ 93-1-25 มีค่าพลังงานความ

เข้มข้นของน้ำในใบใกล้เคียงกัน แต่ค่านี้จะลดลงเมื่ออ้อยเผชิญกับระดับความเครียดจากการขาดน้ำที่เพิ่มขึ้น และเนื่องจากค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำคำนวณจากค่าความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่มีในสารละลายในเซลล์ ดังนั้นค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำจึงลดลงตามความเข้มข้นของตัวถูกละลายในสารละลายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อระดับการขาดน้ำเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 1b และ 2b)

ผลการวัดค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบภายใต้สภาพขาดน้ำแบบที่ 1 พบว่าค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบอ้อยที่วัดได้จากต้นที่ได้รับน้ำเต็มที่ของทั้ง 2 พันธุ์อยู่ในระดับสูงเท่า ๆ กัน โดยอยู่ในช่วง -700 กิโลพาสคาล ถึง -800 กิโลพาสคาล เมื่อค่าพลังงานเท่ากับก่อนดินของน้ำลดลงถึงระดับ -40 กิโลพาสคาล พลังงานความเข้มข้นของน้ำมีค่าลดลงอยู่ที่ประมาณ -1,100 กิโลพาสคาล และ -1,400 กิโลพาสคาล ในพันธุ์กำแพงแสน 94-13 และ 93-1-25 ตามลำดับ และในพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีค่าลดลงต่ำสุดอยู่ที่ค่าเฉลี่ยในช่วง -2,100 กิโลพาสคาล ถึง -2,600 กิโลพาสคาล เมื่อค่าพลังงานเท่ากับก่อนดินของน้ำในวัสดุปลูกลดลงถึงระดับ -80 กิโลพาสคาล ขณะที่ในโคลนพันธุ์ 93-1-25 ไม่สามารถวัดค่าความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่มีในสารละลายในเซลล์ได้ จึงคำนวณค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำไม่ได้เช่นกัน (ภาพที่ 1c)

ในสภาพขาดน้ำแบบที่ 2 ใบอ้อยทั้งสองพันธุ์มีค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบที่ผันแปรไม่มากในช่วงแรกของการขาดน้ำ (ระดับความเข้มข้นของ PEG เท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในสารละลายธาตุอาหารเท่ากับ -200 กิโลพาสคาล) คือมีค่าเฉลี่ย -900 กิโลพาสคาล ถึง -1,000 กิโลพาสคาล เมื่อเทียบกับค่าที่วัดได้จากต้นที่ได้รับน้ำเต็มที่ ซึ่งมีค่าประมาณ -700 กิโลพาสคาล ถึง -900 กิโลพาสคาล ซึ่งสะท้อนว่าความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเซลล์ของใบอ้อยมีค่าค่อนข้างคงที่ด้วย แต่เมื่อระดับความเข้มข้นของ PEG เพิ่มขึ้น พลังงานความเข้มข้นของน้ำในสารละลายธาตุอาหารมีค่าลดลง ค่าความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อนำมาคำนวณจึงมีผลให้ค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในเซลล์ลดลง (ภาพที่ 2c) โดยในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีค่าของพลังงานความเข้มข้นของน้ำโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง -900 กิโลพาสคาล (เมื่อพลังงานความเข้มข้นของน้ำในสารละลายธาตุอาหารมีค่าเท่ากับ -200 กิโลพาสคาล) ถึง -2,300 กิโลพาสคาล (เมื่อพลังงานความเข้มข้นของน้ำในสารละลายธาตุอาหารมีค่าเท่ากับ -3,800 กิโลพาสคาล) ขณะที่อ้อยโคลนพันธุ์ 93-1-25 มีโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง -1,000 ถึง -2,800 กิโลพาสคาล เมื่อวัดที่ค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในสารละลายธาตุอาหารระดับเดียวกัน

เนื่องจากช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างใบเพื่อวัดความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเซลล์เป็นช่วงเวลากลางคืน ซึ่งไม่ใช่ช่วงที่มีการสังเคราะห์แสงและมีการเคลื่อนย้ายสารอาหาร ประกอบกับการวัดด้วยเครื่องออสโมมิเตอร์นี้เป็นการวัดความเข้มข้นของตัวถูกละลายทุกชนิดที่มีอยู่ในสารละลายในเซลล์ (Boyer, 1995) ทำให้ไม่อาจสรุปได้ว่าความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเซลล์ เกิดจากตัวถูกละลายที่เกิดขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์แสงและไม่สามารถลำเลียงออกจากเซลล์ได้ จึงเกิดการสะสมอยู่ในเซลล์ เมื่อน้ำในเซลล์ลดลง ค่าความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเซลล์ที่วัดได้จึงเพิ่มขึ้น หรือเกิดจากพืชมีการปรับตัวเมื่ออยู่ในสภาวะขาดน้ำ โดยการนำสารออสโมไลต์เข้าไปในเซลล์ จึงทำให้ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเซลล์เพิ่มขึ้น (Morgan, 1984)

### 1.3 พลังงานความดัน ( $\Psi_p$ )

เมื่อนำค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบและค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบมาคำนวณค่าพลังงานความดันหรือแรงเต่งของน้ำในเซลล์ พบว่า ในสภาพที่ไม่ขาดน้ำ ใบอ้อยมีระดับแรงเต่งใกล้เคียงกัน และจากการวัดผลในสภาพขาดน้ำทั้งแบบที่ 1 และ 2 พบว่า ให้ผลสอดคล้องกันคือ ระดับการขาดน้ำที่เพิ่มขึ้นมีผลให้แรงเต่งของน้ำในเซลล์ลดลง

ในสภาพขาดน้ำแบบที่ 1 ใบอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีค่าพลังงานความดันของน้ำเฉลี่ยเท่ากับ -289 กิโลพาสคาล และ -586 กิโลพาสคาล เมื่อค่าพลังงานเท่ากับก่อนดินของน้ำในวัสดุปลูกลดลงถึงระดับ -40 กิโลพาสคาล และ -80 กิโลพาสคาล ตามลำดับ ขณะที่สายพันธุ์ 93-1-25 วัดค่าได้เฉพาะที่ระดับค่าพลังงานเท่ากับก่อนดินของน้ำในวัสดุปลูกเท่ากับ -40 กิโลพาสคาล คือมีค่าพลังงานความดันของน้ำเฉลี่ยเท่ากับ -516 กิโลพาสคาล (ภาพที่ 1d) เนื่องจากไม่สามารถวัดค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำเมื่อค่าพลังงานเท่ากับก่อนดินของน้ำในวัสดุปลูกลดลงถึงระดับ -80 กิโลพาสคาลได้ จึงไม่สามารถคำนวณค่าพลังงานความดันของน้ำได้

ในการสร้างสภาวะขาดน้ำโดยใช้สารละลายธาตุอาหารร่วมกับการเพิ่มระดับความเข้มข้นของสาร PEG พบว่า เมื่อพลังงานความเข้มข้นของน้ำในสารละลายธาตุอาหารมีค่าลดลงจาก -200 กิโลพาสคาล จนถึง -3,800 กิโลพาสคาล ค่าพลังงานความดันของน้ำเฉลี่ยของอ้อยทั้งสองพันธุ์มีค่าลดลงเช่นกัน ใบอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีค่าลดลงจาก 583 กิโลพาสคาล ถึง -617 กิโลพาสคาล และในโคลนพันธุ์ 93-1-25 มีค่าลดลงจาก 547 กิโลพาสคาล ถึง -971 กิโลพาสคาล (ภาพที่ 2d) เปรียบเทียบจากต้นที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่ไม่ได้เติม PEG ซึ่งมีค่า

เฉลี่ยเท่ากับ 655 กิโลพาสคาล และ 633 กิโลพาสคาล ในพันธุ์กำแพงแสน 94-13 และโคลนพันธุ์ 93-1-25 ตามลำดับ

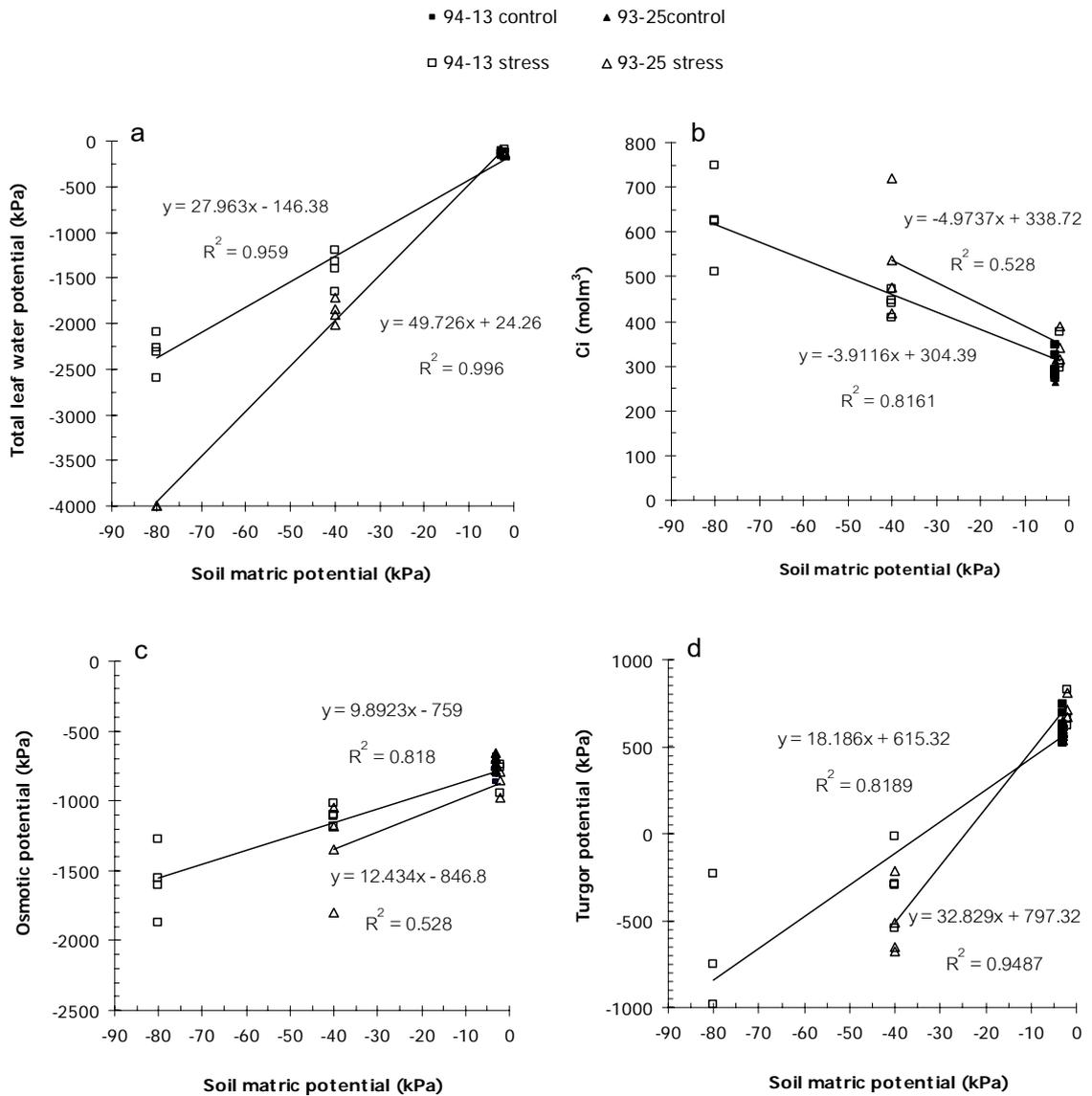
พลังงานความดันของน้ำในใบมีค่าต่ำและมีค่าติดลบเมื่อภาวะขาดน้ำรุนแรงมากขึ้น ค่าพลังงานความดันเป็นค่าที่เกิดจากการคำนวณ คือเป็นผลลบระหว่างค่าพลังงานศักย์รวมของ น้ำกับค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำ ซึ่งค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำได้มาจากการนำค่าความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่วัดได้ในใบมาคำนวณ และค่าความเข้มข้นของตัวละลายเป็นความเข้มข้นของตัวละลายทั้งในส่วนของ symplast และ apoplast ผสมกัน จึงมีผลให้ค่าความเข้มข้นของ ตัวละลายที่ได้ต่ำกว่าความเป็นจริง ประกอบกับใบในสภาพขาดน้ำมีค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำที่ ต่ำจึงมีโอกาสทำให้ค่าของพลังงานความดันติดลบได้ และไม่ใช่ค่าพลังงานความดันที่แท้จริงใน เซลล์ ซึ่งคล้ายกันกับการทดลองของ Mills *et al.* (1997) ที่ทำในผลแอปเปิ้ลในสภาพที่ขาดน้ำ และ การทดลองที่ทำในฝ้ายของ van Iersel and Oosterhuis (1996)

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ที่ได้จากแต่ละสายพันธุ์ใน แต่ละระดับการขาดน้ำ โดยการวิเคราะห์ t-test เพื่อหาระดับการขาดน้ำ และพารามิเตอร์ที่ใช้ใน การแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ย่อยที่ทนทานและอ่อนแอต่อการขาดน้ำ (ตารางที่ 1) พบว่า ภายใต้สภาพขาดน้ำแบบที่ 1 ซึ่งใช้ค่าพลังงานกำกับก่อนดินของน้ำในวัสดุปลูกเป็นตัวบอกถึง ระดับความเครียดจากการขาดน้ำที่พืชได้รับ ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบสามารถแสดงความ ต่างต่างระหว่างพันธุ์ย่อยที่ทนทานและอ่อนแอต่อการขาดน้ำได้ เมื่อวัดที่ระดับพลังงานกำกับ ก่อนดินเท่ากับ -40 กิโลพาสคาล หรือต่ำกว่า ค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำ และค่าพลังงาน ความดันของน้ำที่ค่าพลังงานกำกับก่อนดินเท่ากับ -40 กิโลพาสคาล ไม่สามารถแยกความต่าง ระหว่างพันธุ์ย่อยได้ และวัดค่าเหล่านี้ไม่ได้เมื่อค่าพลังงานกำกับก่อนดินลดลงถึงระดับ -80 กิโลพาสคาล ในขณะที่การใช้สารละลายธาตุอาหารร่วมกับ PEG สร้างสภาพขาดน้ำให้กับต้นย่อย สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ย่อยที่ทนทานและอ่อนแอต่อการขาดน้ำได้ โดยค่าพลัง งานศักย์รวมของน้ำในใบที่วัดในสภาพที่ค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในสารละลายธาตุอาหาร เท่ากับ -200 กิโลพาสคาล หรือต่ำกว่า (ระดับความเข้มข้นของ PEG เท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป) แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ย่อยที่ทนทานและอ่อนแอต่อการขาดน้ำได้ การวัดค่าพลังงาน ความเข้มข้นของน้ำสามารถใช้แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ย่อยได้เช่นกัน เมื่อวัดในสภาพที่มี ค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในสารละลายธาตุอาหารเท่ากับ -800 กิโลพาสคาล หรือต่ำกว่า (ระดับความเข้มข้นของ PEG เท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป) แต่ในส่วนของค่าพลังงานความดันของ

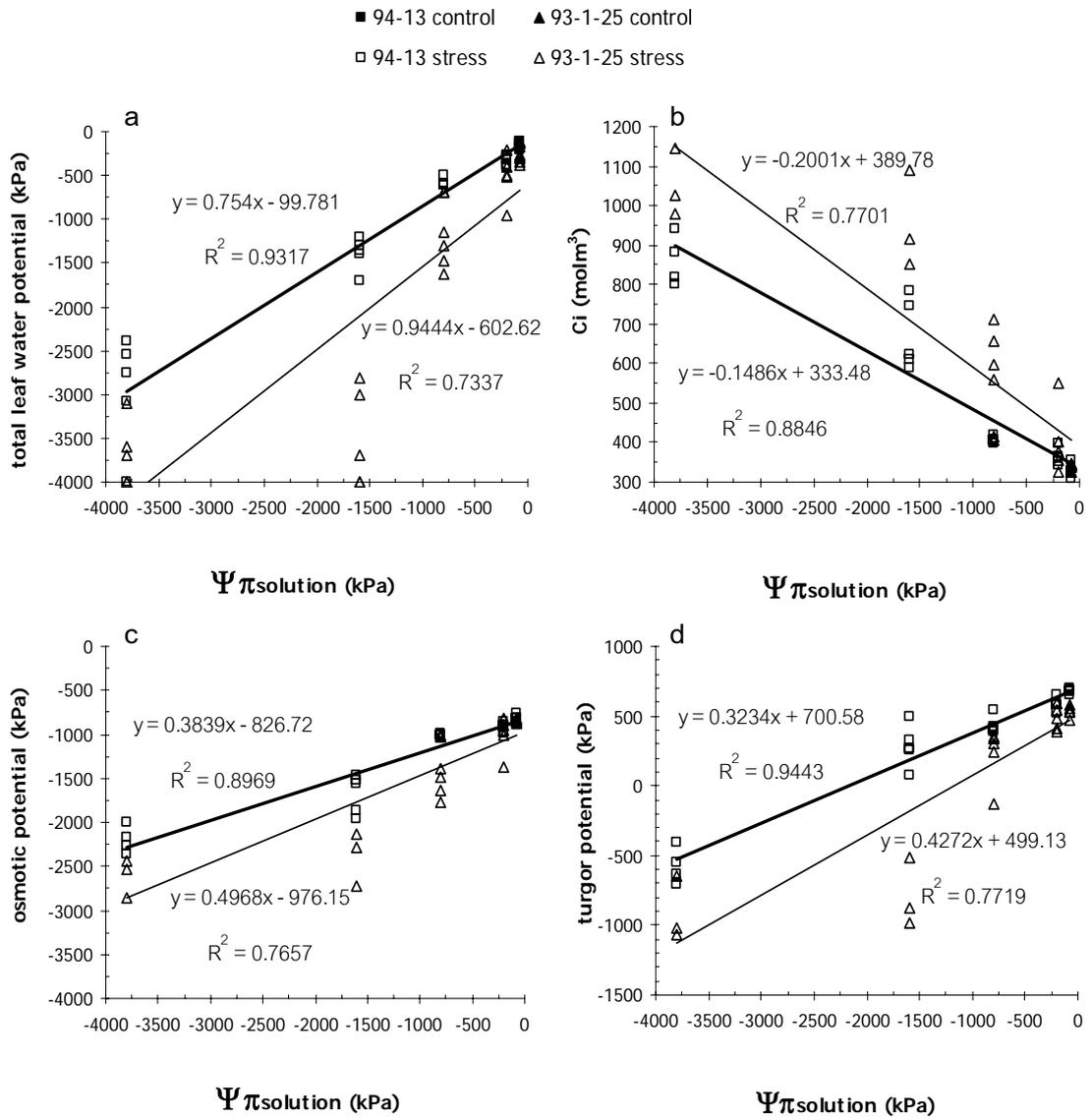
น้ำ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างพันธุ์อ้อยทั้งสองพันธุ์ ยกเว้นเมื่อวัดในสภาพที่มีค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในสารละลายธาตุอาหารเท่ากับ -1600 กิโลพาสคาล (ระดับความเข้มข้นของ PEG เท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์) และมีค่ากลับมาน้ำไม่แตกต่างกันอีกเมื่อภาวะการขาดน้ำรุนแรงเพิ่มขึ้น

เนื่องจากธรรมชาติในการดูดใช้น้ำของรากจะเป็นการดึงน้ำจากบริเวณรอบ ๆ ราก ภายในระยะไม่เกิน 1-2 มิลลิเมตรจากผิวราก ซึ่งบริเวณนี้จัดเป็นบริเวณที่มีค่าพลังงานเท่ากับก่อนดินลด ลงมากที่สุด ดังนั้นในขณะที่น้ำชั้นบางมารอบรากนั้นได้แห้งลงไปแล้ว น้ำส่วนใหญ่ในดินรอบนอกจะยังมีระดับสูงอยู่ โดยเฉพาะระยะห่างจากรากที่ฝังเครื่องมือวัดไว้ (สุนทรี, 2535) ดังนั้นค่าที่อ่านได้จากการใช้เครื่องวัดความเครียดของน้ำในดิน จึงไม่ใช่ค่าของระดับความเครียดที่แท้จริงที่ต้นพืชได้รับ เพราะเครื่องมือที่ใช้วัดไม่สามารถวัดระดับน้ำบริเวณรอบ ๆ รากได้จริง จึงมีผลให้เกิดความผิดพลาดในการเก็บข้อมูล และจะส่งผลต่อการทำการทดลองซ้ำ เพราะไม่สามารถกำหนดหรือประเมินระดับความเครียดจากการขาดน้ำที่แน่นอนที่พืชได้รับได้ เนื่องจากในการศึกษาเกี่ยวกับสรีรวิทยาของพืชภายใต้สภาพเครียดนั้น ระดับความเครียดที่ให้กับพืชเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญ เพราะการตอบสนองของพืชเกิดขึ้นแตกต่างกันตามระดับความเครียดที่พืชได้รับ

สำหรับการปลูกพืชในสารละลายธาตุอาหารร่วมกับการใช้สาร PEG เพื่อสร้างสภาพขาดน้ำ รากพืชจะสัมผัสกับสารละลายนั้นได้โดยตรง จึงเป็นสภาพขาดน้ำจำลองที่มีความสม่ำเสมอมากกว่าสภาพขาดน้ำในแบบแรก และมีการนำมาใช้เป็นเทคนิคในการศึกษาการตอบสนองของพืชที่อยู่ภายใต้ภาวะเครียดจากการขาดน้ำอย่างแพร่หลาย เช่น ในข้าวสาลี (Baisak *et al.*, 1994; Molnar *et al.*, 2004) ถั่วเขียว (Zayed and Zeid, 1997/98) ถั่วพิสตาชิโอ (Ranjbarfordoei *et al.*, 2000) และทานตะวัน (Zhang and Kirkham, 1995)



**ภาพที่ 1** ความสัมพันธ์ระหว่างพลังงานก่อกับกอนดินของน้ำในวัสดุปลูกกับพลังงานศักย์รวมของน้ำใน ใบ (a) ความเข้มข้นของตัวถูกละลายทั้งหมดในเซลล์ (b) พลังงานความเข้มข้นของน้ำ (c) และพลังงาน ความดันของน้ำ (d) ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 และโคลนพันธุ์ 93-1-25



## ภาพที่ 2

ความสัมพันธ์ระหว่างพลังงานความเข้มข้นของน้ำในสารละลายธาตุอาหารกับพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ (a) ความเข้มข้นของตัวถูกละลายทั้งหมดในเซลล์ (b) พลังงานความเข้มข้นของน้ำ (c) และพลังงานความดันของน้ำ (d) ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 และโคลนพันธุ์ 93-1-25

**ตารางที่ 1** การวิเคราะห์ t-test ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ ค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำ และ ค่าพลังงานความดันของน้ำที่วัดได้จากอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 และโคลนพันธุ์ 93-1-25 ภายใต้สภาพขาดน้ำทั้งสองแบบ

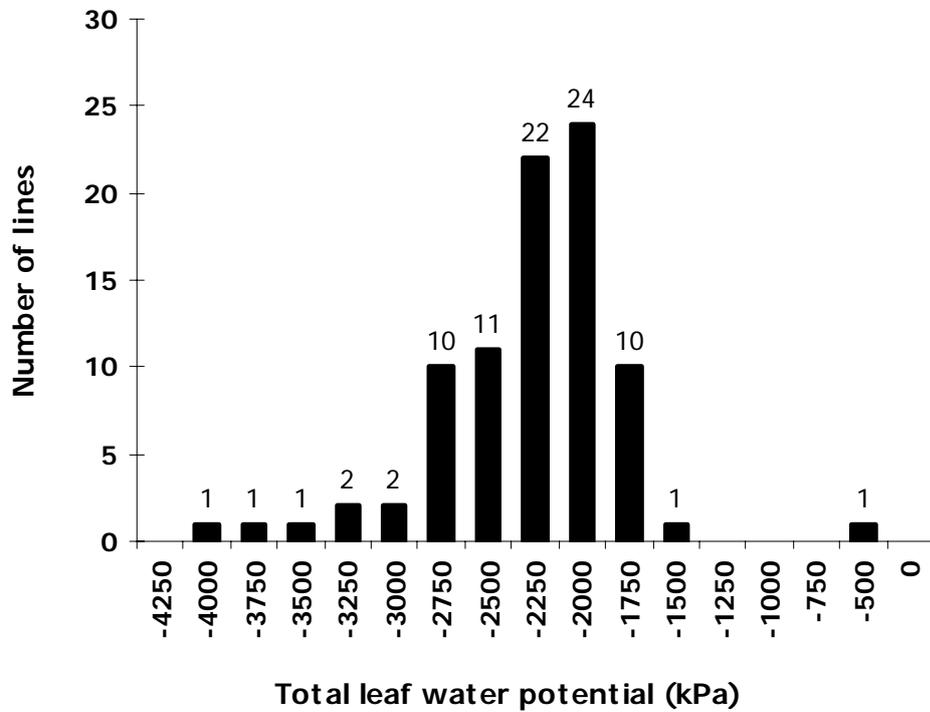
| พารามิเตอร์        | สภาพขาดน้ำ         | สายพันธุ์                               |                    | t- cal |       |    |
|--------------------|--------------------|---|--------------------|--------|-------|----|
|                    |                    | กำแพงแสน 94-13                          | 93-1-25            |        |       |    |
| $\Psi_t$ (kPa)     | วัสดุปลูก          | control                                 | -126               | -140   | ns    |    |
|                    |                    | $\Psi_m = -40$ kPa                      | -1390              | -1860  | *     |    |
|                    |                    | $\Psi_m = -80$ kPa                      | -2320              | -4000  | *     |    |
|                    | สารละลายธาตุอาหาร  | control                                 | -140               | -200   | ns    |    |
|                    |                    | $\Psi_{\pi\text{solution}} = -200$ kPa  | -320               | -520   | *     |    |
|                    |                    | $\Psi_{\pi\text{solution}} = -800$ kPa  | -588               | -1152  | *     |    |
|                    |                    | $\Psi_{\pi\text{solution}} = -1600$ kPa | -1392              | -3560  | *     |    |
|                    |                    | $\Psi_{\pi\text{solution}} = -3800$ kPa | -2860              | -3620  | *     |    |
|                    | $\Psi_{\pi}$ (kPa) | วัสดุปลูก                               | control            | -750   | -725  | ns |
|                    |                    |   | $\Psi_m = -40$ kPa | -1104  | -1344 | ns |
| $\Psi_m = -80$ kPa |                    |   | -1733              | -      | -     |    |
| สารละลายธาตุอาหาร  |                    | control                                 | -795               | -879   | ns    |    |
|                    |                    | $\Psi_{\pi\text{solution}} = -200$ kPa  | -903               | -1067  | ns    |    |
|                    |                    | $\Psi_{\pi\text{solution}} = -800$ kPa  | -1017              | -1492  | *     |    |
|                    |                    | $\Psi_{\pi\text{solution}} = -1600$ kPa | -1677              | -2589  | *     |    |
|                    |                    | $\Psi_{\pi\text{solution}} = -3800$ kPa | -2243              | -2815  | *     |    |
| $\Psi_p$ (kPa)     |                    | วัสดุปลูก                               | control            | 700    | 731   | ns |
|                    |                    |   | $\Psi_m = -40$ kPa | -289   | -515  | ns |
|                    | $\Psi_m = -80$ kPa |   | -586               | -      | -     |    |
|                    | สารละลายธาตุอาหาร  | control                                 | 655                | 633    | ns    |    |
|                    |                    | $\Psi_{\pi\text{solution}} = -200$ kPa  | 583                | 547    | ns    |    |
|                    |                    | $\Psi_{\pi\text{solution}} = -800$ kPa  | 429                | 340    | ns    |    |
|                    |                    | $\Psi_{\pi\text{solution}} = -1600$ kPa | 284                | -805   | *     |    |
|                    |                    | $\Psi_{\pi\text{solution}} = -3800$ kPa | -617               | -971   | ns    |    |

## การคัดเลือกประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ในสภาพขาดน้ำ

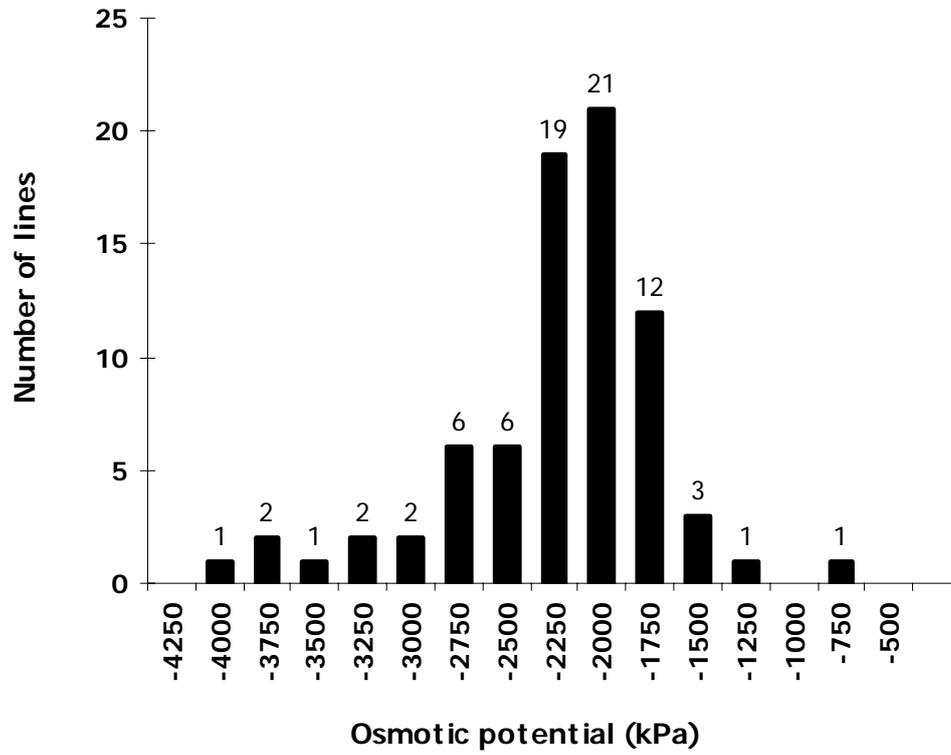
นำประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ของอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 จำนวน 90 สายพันธุ์ มาปลูกทดสอบในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland ร่วมกับสาร PEG ณ เรือนปลูกพืชทดลอง ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน วัดค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ และค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำ ตามการทดสอบวิธีการและพารามิเตอร์สำหรับใช้คัดเลือกอ้อยทนแล้งในส่วนแรก

ลักษณะที่ศึกษาในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 มีความแปรปรวนสูงมาก โดยมีค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบอยู่ในช่วง -517 กิโลพาสคาล ถึง -4,123 กิโลพาสคาล (ภาพที่ 3) และค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำอยู่ในช่วง -882 กิโลพาสคาล ถึง -4,044 กิโลพาสคาล (ภาพที่ 4) ขณะที่โคลนพันธุ์ 89-1-20 ซึ่งเป็นพันธุ์แม่ของพันธุ์กำแพงแสน 94-13 มีค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบอยู่ในช่วง -1,900 กิโลพาสคาล ถึง -2,100 กิโลพาสคาล และค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำอยู่ในช่วง -2,200 กิโลพาสคาล ถึง -2,800 กิโลพาสคาล การกระจายตัวของค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ และค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบเป็นไปในลักษณะความแปรปรวนอย่างต่อเนื่อง (continuous variation) หรือการกระจายตัวแบบปกติ (normal distribution) แสดงให้เห็นว่าลักษณะที่ศึกษานี้เป็นลักษณะทางปริมาณ มียีนมากกว่า 1 ยีนที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาการตอบสนองของพืชต่อสภาพเครียดจากการขาดน้ำ มีหลายรายงานที่กล่าวว่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในเนื้อเยื่อพืชแตกต่างกันระหว่างพันธุ์ที่ทนต่อการขาดน้ำและพันธุ์ที่อ่อนแอ และมีความแปรปรวนของค่านี้ในกลุ่มประชากรขนาดใหญ่ โดยพันธุ์ที่ทนต่อการขาดน้ำสามารถรักษาค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบไว้ได้สูงกว่าพันธุ์อ่อนแอ โดยจากการศึกษาพบปรากฏการณ์นี้ในพืชหลายชนิด เช่นในถั่วเหลือง (Cortes and Sinclair, 1986; Sammons et al., 1978) ข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* L.) (Matin et al., 1989) ข้าว (Jongdee et al., 1997, 1998, 2002) ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) (Blum, 1974) และข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) (Quarrie and Jones, 1979) รวมถึงในการศึกษาพืชตระกูลหญ้ายืนต้น เช่น *Agropyron elongatum* ที่มีรายงานว่าพันธุ์ที่ทนแล้ง เนื่องจากสามารถรักษาค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบไว้ได้สูงกว่าในพันธุ์ *A. scabrifolium* El Palmar INTA (García et al., 2002) ซึ่งส่งผลให้พันธุ์ที่ทนแล้งมีการเจริญและขยายขนาดของใบได้ดีกว่าพันธุ์ไม่ทนแล้ง (Busso and Richards, 1995)



**ภาพที่ 3** การกระจายความถี่ของค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบในประชากรอ้อยดุกผสม  
 ชั่วที่ 2 พันธุ์กำแพงแสน 94-13 จำนวน 90 สายพันธุ์



**ภาพที่ 4** การกระจายความถี่ของค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบในประชากรอ้อยลูกผสมชั่วที่ 2 พันธุ์กำแพงแสน 94-13 จำนวน 90 สายพันธุ์

ในทางทฤษฎี ค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำที่ลดลงเนื่องจากการสะสมสารออสโมไลท์ เพื่อรักษาแรงดันเต่งของเซลล์ขณะที่พืชอยู่ภายใต้สภาพขาดน้ำ จัดเป็นลักษณะที่บ่งบอกถึงความสามารถในการทนต่อการขาดน้ำ และเป็นกลไกที่ต้องอาศัยเวลาให้พืชได้ปรับตัว (Koehler *et al.*, 1982) แต่เนื่องจากในงานทดลองนี้ เป็นการวัดความเข้มข้นของตัวถูกละลายทุกชนิดที่มีอยู่ในสารละลายในเซลล์ แล้วนำมาคำนวณเป็นค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำ ไม่ได้ศึกษาการสะสมของสารออสโมไลท์ในเซลล์โดยตรง จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำที่ลดลง เป็นผลจากความพยายามรักษาแรงดันเต่งของเซลล์หรือไม่ และเป็นการยากที่จะสรุปว่า ค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำสูงหรือต่ำเป็นลักษณะที่ช่วยให้พืชทนต่อการขาดน้ำได้ดี ซึ่งในงานวิจัยอื่น ๆ ที่วัดค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำ ก็ยังให้ข้อสรุปที่ไม่ชัดเจน เช่น ในงานทดลองของ Lilley *et al.* (1996) ได้วัดค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำในใบข้าวพันธุ์ Moroberekan ซึ่งถูกจัดให้เป็นพันธุ์ทนแล้ง เนื่องจากเป็นพันธุ์ข้าวที่ปลูกในที่ดอน และมีระบบรากดี และ พันธุ์ Co39 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อสภาพแล้ง และเป็นพันธุ์ที่ปลูกในที่ลุ่ม พบว่า พันธุ์ Moroberekan ให้ค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำสูงกว่าในพันธุ์ Co39 แต่เมื่อนำค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำไปคำนวณเป็นค่าการปรับค่าแรงดันออสโมติก (osmotic adjustment) ผลสรุปที่ได้คือ พันธุ์ Co39 กลับเป็นพันธุ์ที่ทนต่อการขาดน้ำ เนื่องจากมีความสามารถในการปรับค่าแรงดันออสโมติกได้ดีกว่าพันธุ์ Moroberekan

อย่างไรก็ตาม เมื่อนำค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำมาพิจารณาร่วมกับค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ และความสามารถในการฟื้นตัวหลังจากกลับมาได้รับน้ำ (recovery) เป็นเวลา 7 วัน พบว่าโคลนพันธุ์  $F_2$  ที่รักษาพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบและค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำไว้ได้ในระดับที่สูง สามารถฟื้นตัวกลับมาได้ เช่น ต้นลำดับที่ 9, 87 ขณะที่โคลนพันธุ์  $F_2$  บางต้นที่ให้ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบและค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำในระดับที่ต่ำ (ในบางต้นไม่สามารถวัดค่าได้) ไม่สามารถฟื้นตัวกลับมาได้ เช่น ต้นลำดับที่ 66, 75 (ตารางภาค ผนวกที่ 1 และ 2)

จากข้อมูลที่ได้ จึงเลือกศึกษาลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการรักษาปริมาณน้ำในเซลล์ ได้แก่การรักษาพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบและค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำไว้ได้ในระดับที่สูง เพื่อนำไปตรวจหาความเชื่อมโยงกับเครื่องหมายโมเลกุลต่อไป

## การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับความสามารถในการรักษาค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบและค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำ

### 1. ผลการวิเคราะห์ bulked segregant

คัดเลือกเครื่องหมาย AFLP ที่เชื่อมโยงกับยีนควบคุมลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการรักษาค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบและค่าพลังงานความเข้มข้นน้ำโดยการวิเคราะห์แบบ bulked segregant ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 โดยการสร้างกลุ่มดีเอ็นเอ 2 กลุ่มจากต้นที่มีลักษณะการแสดงออกตรงข้ามกัน คือกลุ่มที่ให้ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบและค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบสูง และกลุ่มที่ให้ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบและค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบต่ำ แล้ววิเคราะห์ AFLP หาแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มดีเอ็นเอ ใช้ไพรมเมอร์ในการคัดเลือกจำนวน 320 คู่ไพรมเมอร์ โดยให้คะแนนแถบดีเอ็นเอเป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ และให้คะแนนเป็น 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ผลการตรวจสอบความแตกต่างพบว่า มีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มดีเอ็นเอของค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบที่เกิดจาก 71 คู่ไพรมเมอร์ และตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มดีเอ็นเอของค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบที่เกิดจาก 54 คู่ไพรมเมอร์โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในกลุ่มดีเอ็นเอที่ให้ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบและค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบสูง แต่ไม่ปรากฏในกลุ่มดีเอ็นเอที่ให้ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบและค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบต่ำ

การวิเคราะห์ bulked segregant เป็นวิธีการที่สะดวกในการตรวจสอบประชากรจำนวนมาก และใช้ได้กับประชากรหลายแบบ แต่เป็นวิธีที่เหมาะสมกับการศึกษาลักษณะทางคุณภาพ หรือลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนหลัก (major gene) จำนวนน้อยคู่ (Michelmore *et al.*, 1991; Wang and Peterson, 1994) แต่จากการกระจายตัวของค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบและค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบที่เป็นไปในลักษณะ normal distribution แสดงให้เห็นว่าลักษณะที่ศึกษานี้เป็นลักษณะทางปริมาณ มียีนจำนวนมากที่เกี่ยวข้อง ดังนั้นจึงวิเคราะห์ selective genotyping เพื่อยืนยันผลของคู่ไพรมเมอร์ที่คัดเลือกได้อีกครั้ง

## 2. ผลการวิเคราะห์ selective genotyping

ตรวจสอบผลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากคู่ไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้จากการวิเคราะห์ bulked segregant โดยวิเคราะห์ในตัวอย่างประชากร  $F_2$  แต่ละต้น ที่นำมารวมเป็นกลุ่มดีเอ็นเอ และให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยให้คะแนนเป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ และให้คะแนนเป็น 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ พบว่า คัดเลือกได้ 20 คู่ไพรเมอร์จาก 71 คู่ไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างประชากร  $F_2$  ของค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ (ตารางที่ 2) และ 24 คู่ไพรเมอร์จาก 54 คู่ไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างประชากร  $F_2$  ของค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบ (ตารางที่ 3) โดยกลุ่มตัวอย่างประชากร  $F_2$  ทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นำไพรเมอร์ทั้ง 44 คู่นี้ไปตรวจสอบการกระจายตัวของเครื่องหมาย AFLP ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 90 สายพันธุ์ต่อไป

**ตารางที่ 2** ผลวิเคราะห์ selective genotyping ของคู่ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 และเชื่อมโยงกับลักษณะความสามารถในการรักษาพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ

| Primer combination |             | R <sup>2</sup> | P      |
|--------------------|-------------|----------------|--------|
| <i>EcoRI</i>       | <i>MseI</i> |                |        |
| ACG                | ATC         | 0.265          | 0.050  |
| ACG                | ATG         | 0.465          | 0.007  |
| AGG                | ACG         | 0.647          | 0.005  |
| AGG                | ATA         | 0.479          | 0.006  |
| AGG                | AAG         | 0.274          | 0.050  |
| AGG                | CTC         | 0.854          | <.0001 |
| ACT                | AGT         | 0.462          | 0.010  |
| ACC                | ATC         | 0.278          | 0.047  |
| ACC                | ATT         | 0.434          | 0.014  |
| AAG                | ACA         | 0.307          | 0.039  |
| AAG                | ACG         | 0.467          | 0.007  |
| ACT                | CTG         | 0.281          | 0.047  |
| ACC                | GTA         | 0.401          | 0.026  |
| GCA                | CAC         | 0.631          | 0.002  |
| GCA                | ATG         | 0.279          | 0.046  |
| GCA                | AAG         | 0.383          | 0.018  |
| GCA                | CTA         | 0.289          | 0.046  |
| GCC                | AGC         | 0.438          | 0.009  |
| GCC                | AAG         | 0.554          | 0.002  |
| GCC                | CAA         | 0.391          | 0.016  |

**ตารางที่ 3** ผลวิเคราะห์ selective genotyping ของคู่ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 และเชื่อมโยงกับลักษณะความสามารถในการรักษาพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบ

| Primer combination |             | R <sup>2</sup> | P     |
|--------------------|-------------|----------------|-------|
| <i>EcoRI</i>       | <i>MseI</i> |                |       |
| ACT                | CTG         | 0.349          | 0.033 |
| ACT                | ATT         | 0.483          | 0.025 |
| ACT                | ATG         | 0.3111         | 0.050 |
| ACA                | CTG         | 0.610          | 0.001 |
| ACC                | ATG         | 0.443          | 0.009 |
| ACG                | ACG         | 0.560          | 0.005 |
| ACG                | AAG         | 0.316          | 0.036 |
| ACG                | ACT         | 0.388          | 0.017 |
| ACG                | AGG         | 0.436          | 0.010 |
| ACG                | ATT         | 0.569          | 0.004 |
| ACG                | AGC         | 0.531          | 0.007 |
| ACC                | ATC         | 0.491          | 0.011 |
| AAG                | ACA         | 0.317          | 0.046 |
| GCC                | CAA         | 0.528          | 0.003 |
| GCC                | AGC         | 0.356          | 0.040 |
| GCA                | CAC         | 0.528          | 0.003 |
| GCA                | ATG         | 0.388          | 0.017 |
| GCA                | CTA         | 0.487          | 0.008 |
| GCA                | CAG         | 0.354          | 0.041 |
| GCA                | AGC         | 0.406          | 0.035 |
| GCA                | ACG         | 0.461          | 0.015 |
| CGT                | CTC         | 0.658          | 0.002 |
| CGT                | CAG         | 0.326          | 0.046 |
| CAG                | CTC         | 0.421          | 0.031 |

### 3. การตรวจสอบเครื่องหมาย AFLP ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2

ตรวจสอบการกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุลที่คัดเลือกได้จากการวิเคราะห์แบบ selective genotyping ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 90 สายพันธุ์ โดยให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากคู่ไพรมอร์ และเกิดในตำแหน่งเดียวกันกับแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างประชากร  $F_2$  และวิเคราะห์ single marker analysis เพื่อตรวจสอบว่าเครื่องหมายใดเชื่อมโยงกับความสามารถในการรักษาค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบและค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำ

ผลการวิเคราะห์ single marker analysis ของเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 20 เครื่องหมาย พบว่ามี 2 เครื่องหมายที่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะความสามารถในการรักษาค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ โดยแต่ละเครื่องหมายให้ค่า  $R^2$  ที่สามารถอธิบายลักษณะนี้ได้แตกต่างกัน กล่าวคือ เครื่องหมาย AGG/CTC อธิบายได้ 8.5 เปอร์เซ็นต์ และ เครื่องหมาย AGG/ACG อธิบายได้ 6.2 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4)

สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะความสามารถในการรักษาค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบ จากการวิเคราะห์ single marker analysis พบว่ามี 3 เครื่องหมาย และให้ค่า  $R^2$  ที่สามารถอธิบายลักษณะนี้ได้แตกต่างกันคือ เครื่องหมาย CAG/CTC อธิบายได้ 8.3 เปอร์เซ็นต์ เครื่องหมาย AAG/ACA อธิบายได้ 5.5 เปอร์เซ็นต์ และเครื่องหมาย GCA/CAG อธิบายได้ 7.7 เปอร์เซ็นต์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4)

จากการวิเคราะห์ multiple regression โดยวิธี stepwise (ตารางที่ 5) เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ของเครื่องหมาย AFLP ทั้งหมดที่คัดเลือกได้ว่ามีอิทธิพลต่อลักษณะที่แสดงออกอย่างไร ในลักษณะความสามารถในการรักษาค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบไว้ได้สูง พบเครื่องหมาย AGG/CTC แสดงความสัมพันธ์กับ เครื่องหมาย AGG/ACG ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยมีอิทธิพลร่วมที่อธิบายลักษณะนี้ได้ 13 เปอร์เซ็นต์ สำหรับลักษณะความสามารถในการรักษาค่าพลังงานความเข้มข้นของน้ำในใบไว้ได้สูง พบเครื่องหมาย CAG/CTC แสดงความสัมพันธ์กับเครื่องหมาย AAG/ACA และเครื่องหมาย GCA/CAG ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และการเพิ่มเข้ามาของเครื่องหมาย AAG/ACA และเครื่องหมาย GCA/CAG ไม่มีผลต่อ regression ของเครื่องหมาย CAG/CTC คือไม่ทำให้ค่า  $R^2$  เปลี่ยนแปลงไป แสดงว่า

**ตารางที่ 4** ผลวิเคราะห์ single marker analysis ของเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะความสามารถในการรักษาปริมาณน้ำในเซลล์ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2

| Parameter  | Primer combination |             | $R^2$  | $P$    |
|------------|--------------------|-------------|--------|--------|
|            | <i>EcoRI</i>       | <i>MseI</i> |        |        |
| $\Psi_t$   | AGG                | ACG         | 0.0616 | 0.021  |
|            | AGG                | CTC         | 0.0854 | 0.006  |
| $\Psi_\pi$ | CAG                | CTC         | 0.083  | 0.011  |
|            | AAG                | ACA         | 0.055  | 0.040  |
|            | GCA                | CAG         | 0.077  | 0.0145 |

**ตารางที่ 5** การวิเคราะห์ multiple regression ของเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะที่ศึกษา โดยวิธี stepwise

| Parameter  | Primer combination |             | Partial R <sup>2</sup> | P     |
|------------|--------------------|-------------|------------------------|-------|
|            | <i>EcoRI</i>       | <i>MseI</i> |                        |       |
| $\Psi_t$   | AGG                | CTC         | 0.085                  | 0.006 |
|            | AGG                | ACG         | 0.045                  | 0.041 |
| $\Psi_\pi$ | CAG                | CTC         | 0.083                  | 0.011 |
|            | GCA                | CAG         | 0.037                  | 0.083 |
|            | AAG                | ACA         | 0.031                  | 0.108 |

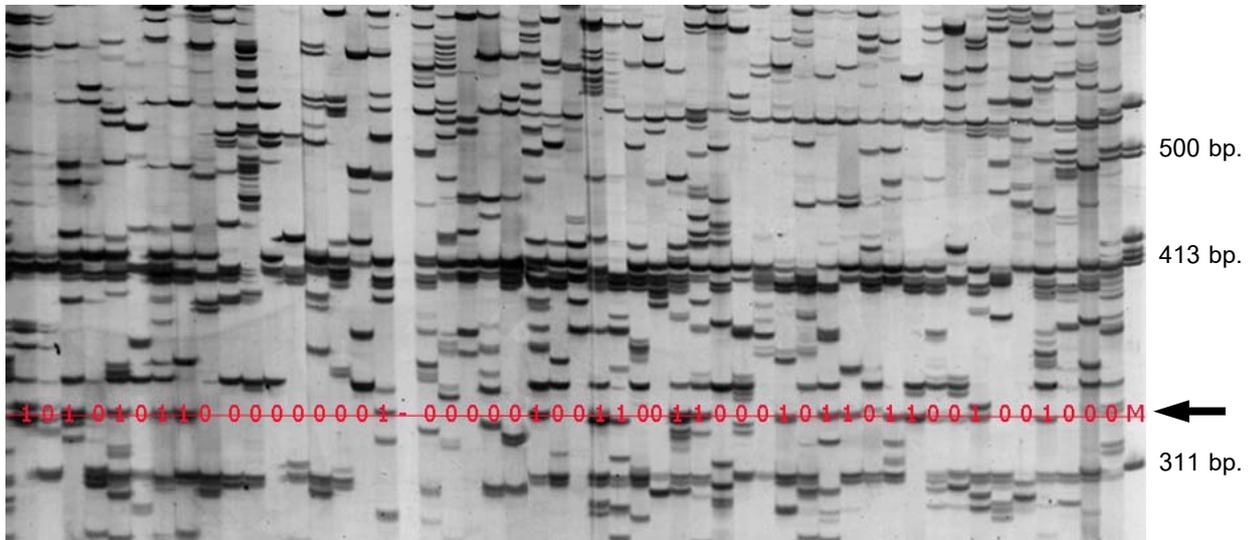
เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 3 เครื่องหมายนี้อธิบายลักษณะนี้ได้ในระดับที่แตกต่างกัน โดย CAG/CTC สามารถอธิบายได้มากที่สุด และสามารถอธิบายลักษณะนี้ร่วมกันได้ 15.1 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณา ค่า  $R^2$  ที่ใช้ในการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับความสามารถในการรักษาปริมาณน้ำในเซลล์ พบว่า แต่ละเครื่องหมายให้ค่าค่อนข้างต่ำ แสดงว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่พบอธิบายลักษณะนี้ได้ระดับหนึ่งเท่านั้น ซึ่งมีความเป็นไปได้สูง เนื่องจากลักษณะที่ทำการศึกษานี้เป็นลักษณะทางปริมาณ ควบคุมด้วยยีนหลายตัว และเป็นผลจากการทำงานหลายระบบร่วมกัน โดยทางทฤษฎีแล้ว อธิบายได้ว่ายังมียีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง แต่ไม่พบในการทดลองนี้ หรือ เครื่องหมายโมเลกุลที่ค้นพบยังมีตำแหน่งอยู่ห่างจากยีน หากมีการวิจัยเพิ่มเติมเพื่อหาลักษณะอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของค่าพลังงานน้ำในพืช หรือเพื่อเพิ่มชนิดและจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อหายีนที่เหลือ ก็จะสามารถอธิบายลักษณะนี้ได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งก็จะทำให้เกิดความแม่นยำ และสะดวกในการตรวจสอบสายพันธุ์ได้มากขึ้น เมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุลนี้ไปพัฒนาเป็นไพรเมอร์ที่ใช้ในการคัดเลือก

การศึกษาหาตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการรักษาปริมาณน้ำในเซลล์ต่อไป ในแง่ของการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย AFLP ไม่เหมาะที่จะใช้ในการศึกษาประชากรขนาดใหญ่ เนื่องจากเทคนิค AFLP ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก การตรวจสอบตำแหน่งที่แน่นอนของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเพื่อให้คะแนน สามารถเกิดความคลาดเคลื่อนได้ และในการคัดเลือกในกลุ่มประชากรจำนวนมาก การใช้เทคนิค AFLP จะเสียค่าใช้จ่ายและใช้เวลาในการวิเคราะห์หมาก ดังนั้นทางเลือกหนึ่งในการใช้ประโยชน์ คือเปลี่ยนเครื่องหมาย AFLP เป็นเครื่องหมายโมเลกุลเฉพาะตำแหน่งอย่างง่าย เช่น CAPS (cleaved amplified polymorphic site) (Konieczny and Ausubel, 1993) หรือ SCAR (sequence characterised amplified region) (Paran and Michelmore 1993) ซึ่งสามารถใช้ในการคัดเลือกประชากรขนาดใหญ่ได้ โดยการ clone และหาลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอ เพื่อใช้ออกแบบไพรเมอร์ที่จะใช้ในการตรวจสอบตำแหน่งของยีนหรือ QTL ต่อไป

ในการศึกษาพืชซึ่งสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการแสดงออกอย่างมาก เช่นลักษณะทนแล้งนี้ เครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับยีนประเภทนี้จะช่วยให้ทำการคัดเลือกได้โดยปราศจากข้อจำกัดจากปัจจัยสภาพแวดล้อม ทำได้ในระยะแรกของการเจริญเติบโตโดยที่ต้นพืชยังไม่เผชิญกับสภาพเครียดต่าง ๆ แต่เนื่องจากการแสดงออกของยีนเพื่อตอบสนองต่อสภาพเครียดเกิดขึ้นหลายรูปแบบ

พร้อมกัน และเกิดเป็นกลไกที่พืชใช้ต่อสู้เพื่อให้อยู่รอดได้ ดังนั้นการคัดเลือกลักษณะเพียงลักษณะเดียวและกำหนดว่าเป็นลักษณะที่ทำให้พืชทนแล้งนั้นเป็นสิ่งที่ไม่สามารถใช้คัดเลือกได้จริง แต่จำเป็นต้องมีหลายลักษณะที่ส่งเสริมให้พืชสามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้ในสภาพแล้งนั้น เป้าหมายหนึ่งที่สำคัญของการหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะที่สำคัญต่าง ๆ ทางการเกษตรนั้น ก็เพื่อสังสมลักษณะที่เป็นประโยชน์ไว้ (pyramiding gene) เพื่อที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ควรมีการวางแผนการทดลอง และนำเอาการวิเคราะห์ทางสถิติเข้ามาช่วยในการเก็บข้อมูล เนื่องจากการศึกษาเรื่องทนแล้ง ต้องเก็บข้อมูลกับประชากรขนาดใหญ่ ในหลายสภาพพื้นที่ แล้วนำมาเปรียบเทียบผลกัน ดังนั้นความสม่ำเสมอของสภาพทดลองเป็นปัจจัยสำคัญในการได้ข้อมูลที่ถูกต้อง เนื่องจากเป็นลักษณะที่สภาพแวดล้อมมีผลอย่างมากต่อการแสดงออกนั่นเอง



**ภาพที่ 5** ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย AFLP (E-GCA/M-CAG) (ครีซี) ที่เชื่อมโยงกับความสามารถในการรักษาค่าพลังงานความชื้นชั้นน้ำในใบไม้ได้สูงในประชากรย่อยลูกผสมชั่วที่ 2 พันธุ์กำแพงแสน 94-13

## สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบพารามิเตอร์ที่สามารถใช้คัดเลือกอ้อยภายใต้สภาพขาดน้ำ โดยเลือกศึกษาค่าพลังงานน้ำในพืช ได้แก่ พลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ พลังงานความเข้มข้นน้ำ และพลังงานความดันของน้ำ สรุปได้ว่า

1. การวัดค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ และพลังงานความเข้มข้นน้ำ สามารถใช้เป็นพารามิเตอร์ที่ใช้แยกความแตกต่างระหว่างอ้อยพันธุ์ทนแล้งและพันธุ์อ่อนแอต่อสภาพแล้งได้
2. การใช้สารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland ร่วมกับสารละลาย PEG เพื่อสร้างภาวะขาดน้ำ สามารถกำหนดระดับการขาดน้ำให้กับพืชทดลองได้แม่นยำ และพืชได้รับความเครียดจากการขาดน้ำสม่ำเสมอว่าการปลูกในดินหรือวัสดุปลูกพร้อมกึ่งดินน้ำ และประเมินระดับพลังงานน้ำในดินด้วยเครื่องวัด (tensiometer)
3. การใช้สารละลายธาตุอาหารร่วมกับการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย PEG ถึงระดับ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นสภาพที่เหมาะสมในการใช้แยกความแตกต่างระหว่างอ้อยพันธุ์ทนแล้งและพันธุ์อ่อนแอต่อสภาพแล้งได้ โดยใช้พารามิเตอร์คือ การวัดค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ และพลังงานความเข้มข้นน้ำ

จากการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับความสามารถในการรักษาปริมาณน้ำในเซลล์ ได้แก่ ลักษณะที่ให้ค่าพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบ และพลังงานความเข้มข้นน้ำในระดับสูง โดยการวิเคราะห์ bulked segregant analysis และ selective genotyping พบว่า

1. ลักษณะความสามารถในการรักษาพลังงานศักย์รวมของน้ำในใบไว้ได้ระดับสูง พบ 2 เครื่องหมาย AFLP ที่เชื่อมโยงกับลักษณะนี้ ได้แก่ เครื่องหมาย เครื่องหมาย AGG/CTC และ เครื่องหมาย AGG/ACG โดยมีอิทธิพลร่วมที่อธิบายลักษณะนี้ได้ 13 เปอร์เซ็นต์
2. ความสามารถในการรักษาพลังงานความเข้มข้นน้ำได้ระดับสูง พบว่ามี 3 เครื่องหมาย AFLP ที่เชื่อมโยงกับลักษณะนี้ คือ เครื่องหมาย CAG/CTC, AAG/ACA และ เครื่องหมาย GCA/CAG และสามารถอธิบายลักษณะนี้ร่วมกันได้ 15.1 เปอร์เซ็นต์