บทที่ 1

บทนำ

บทนำ

สภาวะการณ์ในปัจจุบันโลกกำลังประสบปัญหาภัยแล้งซึ่งส่งผลกระทบต่อการเกษตรเป็นอย่างมาก ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมซึ่งมีพื้นที่ส่วนใหญ่ใช้ในการปลูกข้าว ซึ่งข้าวนับได้ว่าเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญต่อประชากรโลกมากที่สุดชนิดหนึ่ง เนื่องจากนำมาทำเป็นอาหารเลี้ยงประชากรในอัตรามากกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรโลก สำหรับประเทศไทยมีการประมาณมูลค่าข้าวตามราคาที่เกษตรกรขายได้ในปี พ.ศ. 2532-2536 มีมูลค่าสูงเป็นอันดับหนึ่งคือ 64,491.6-72,330.3 ล้านบาท (ศูนย์สถิติทางการเกษตร, 2537) พื้นที่ปลูกข้าวในประเทศไทยมีทั้งหมดประมาณ 64.4 ล้านไร่ ในจำนวนนี้มีประมาณ 72% เป็นการปลูกข้าวโดยอาศัยน้ำฝน จึงเป็นปัญหาเนื่องจากสามารถปลูกข้าวได้ปีละฤดูเดียว โดยเฉพาะในพื้นที่ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการปลูกข้าวมากที่สุดในประเทศแต่กลับพบว่ามีการชลประทานเพียง 8% ยิ่งกว่านั้นพื้นที่ส่วนใหญ่ยังเป็นดินทรายจึงเกิดการสูญเสียน้ำเร็วมาก ทำให้ไม่สามารถนำน้ำมาใช้ในพื้นที่เพาะปลูกได้อย่างเต็มที่ การปลูกข้าวส่วนใหญ่ต้องอาศัยน้ำฝนเพียงอย่างเดียว แต่จากข้อมูลที่รายงานถึงปริมาณน้ำฝนในระยะเวลา 10 ปี ที่ผ่านมาพบว่าปริมาณน้ำฝนมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ และในปี พ.ศ. 2534 ปริมาณน้ำฝนลดลงมากกว่าร้อยละห้าสิบ การขาดน้ำจึงเป็นปัญหาสำคัญที่ขยายขอบเขตกว้างขวางยิ่งขึ้นทั่วพื้นที่เกษตรกรรมภายในประเทศ (ศูนย์สถิติทางการเกษตร, 2534) ในปี ค.ศ. 1991 Bajaj ได้รายงานว่าสถาบันที่มีโครงการวิจัยเกี่ยวกับข้าวทั่วโลกได้ให้ความสนใจในการวิจัยปัญหาความแห้งแล้ง เพื่อช่วยให้ผลผลิตข้าวดีขึ้น

การแก้ไขปัญหาความแห้งแล้งนั้นอาจทำได้ใน 2 แนวทางหลัก คือการปรับสภาพแวดล้อมให้มีปริมาณน้ำมากขึ้น และหรือทำการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่ต้านทานหรือทนต่อสภาวะแล้ง และการคัดเลือกพืชพันธุ์ที่มีความทนทานต่อความแห้งแล้งมาใช้ในการเกษตร การปรับสภาพแวดล้อมให้มีปริมาณน้ำมากขึ้นนั้นอาจทำได้หลายวิธี เช่น การขยายพื้นที่เขตชลประทาน และการทำฝนเทียมเป็นต้น แต่วิธีการนี้ต้องใช้งบประมาณสูงมาก การเลือกปลูกพืชพันธุ์ที่มีความทนทานต่อสภาวะแห้งแล้งโดยธรรมชาติก็เป็นวิธีหนึ่งที่จะทำให้เกษตรกรสามารถทำกินในพื้นที่ที่แห้งแล้งได้ แต่พืชเศรษฐกิจหลายชนิดไม่ทนทานต่อความแห้งแล้งจึงต้องมีการปรับปรุง และคัดเลือกพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการแก้ปัญหา ในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้สามารถทนต่อความแห้งแล้งนั้นได้มีการดำเนินงานอย่างกว้างขวางในหลายประเทศโดยใช้วิธีที่แตกต่างกันไป

ในงานวิจัยนี้ข้าว กข 23 เป็นพืชทดลองในการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากเป็นข้าวที่ไม่ไวแสง ปลูกได้ตลอดปี อายุสั้นประมาณ 120-130 วัน และมีลักษณะทางเกษตรหลายอย่างที่เป็นที่ยอมรับโดยทำการคัดเลือกจากการแปรผันของเซลล์ร่างกายจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากนั้นนำมาคัดเลือกความทนแล้งโดยใช้ PEG 6000 เป็นสารจำลองความแล้งเพื่อให้ได้ต้นข้าวที่ทนแล้ง เมื่อคัดเลือกได้ต้นที่ทนแล้งแล้วนำมาตรวจหาปริมาณโพรลีนและน้ำตาลในใบข้าว เมื่อให้อยู่ภายใต้สภาวะแล้ง เพื่อเป็นการยืนยันว่าข้าวทนแล้งที่คัดเลือกได้นั้น เป็นต้นที่มีศักยภาพในการทนแล้งจริง

วัตถุประสงค์ และขอบเขตของงานวิจัย

1. คัดเลือกความทนแล้งของข้าว กข 23 สายพันธุ์ทนแล้งในระดับต้นกล้าต่อไปอีก 3 รุ่น คือรุ่นที่ 4, 5 และ 6 (R4, R5 และ R6)
2. ศึกษาลักษณะที่ดีทางการเกษตรที่เกิดจากการแปรผันของเซลล์ร่างกาย เช่นการออกดอกเร็ว แตกกอมาก และต้นเตี้ย ว่าจะสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกหลานได้หรือไม่
3. ศึกษาการสะสมโพรลีน และน้ำตาลเพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ทนแล้งที่คัดเลือกได้ว่าใช้กลไกในการสะสมสารละลายที่สามารถละลายน้ำได้ เพื่อปรับค่าออสโมติกในการทนแล้งหรือไม่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจเอกสาร

การแปรผันของเซลล์ร่างกายเพื่อการปรับปรุงพันธุ์

วิธีการคัดเลือกพืชทนแล้งที่ทำกันมาส่วนใหญ่เป็นการผสมพันธุ์ และการคัดเลือกในระดับแปลงทดลองในภาคสนาม โดยพืชส่วนใหญ่ที่นำมาปลูกคือพืชไร่ เช่นข้าวโพด (Fishcher, Johnson, and Edmeades, 1982), ข้าวฟ่าง (Garrity, Sullivan, and Ross, 1982), ข้าวฟ่างไข่มุก (Seetharama *et al.*, 1982) และข้าวสาลี (Richard, 1982) ที่สถาบันข้าว IRRI (International Rice Research Institute) เป็นสถาบันหนึ่งที่ได้เริ่มคัดเลือกข้าวทนแล้งในภาคสนาม โดยเมื่อปี ค.ศ. 1975 ถึง 1980 ได้นำสายพันธุ์มาจาก GUE (Genetic Evaluation and Utilization Program) เพื่อมาคัดเลือกความทนแล้ง พบว่าข้าวสายพันธุ์ Salumpikit ทนต่อความแห้งแล้งได้ดีที่สุด (De Datta and Seshu, 1982) โดยการคัดเลือกข้าวทนแล้งในแต่ละครั้งนั้นได้ลักษณะของพืชทนแล้งที่ดีหลายประการดังที่ Chaudhary และ Rao (1982) รายงานไว้ว่าข้าวที่ทนต่อสภาพแล้งมีระบบรากที่ยาว หนา และหยั่งลึกลงไปในดิน มีใบที่มี cuticle หนา ใบยาวปานกลาง ค่อนข้างหนา และตั้งตรง มีการขยายของเซลล์ดี water potential ของใบอยู่ในระดับที่ต่ำ ต้นสูงปานกลาง มีอัตราส่วนของรากต่อต้นสูง รวงมีน้ำหนักดี เกสรตัวผู้เป็นหมันต่ำ และสามารถต้านทานต่อโรคและแมลงได้ดี แต่ข้าวที่ไม่สามารถทนแล้งนั้นพบลักษณะที่ไม่ดีอื่นๆ ตามมาด้วย คือ ลักษณะที่ไม่ทนต่อสภาพอากาศที่ร้อน และปากใบปิดช้า (De Datta and Seshu, 1982) นอกจากนั้นการคัดเลือกในแปลงทดลองนั้นยังมีปัญหาที่ทำให้การคัดเลือกอยู่ในขอบเขตที่แคบ เนื่องจากมีความแตกต่างของลักษณะดินแต่ละสถานที่ ปริมาณน้ำฝน และความเข้มแสง ส่วนการปรับปรุงโดยวิธีผสมพันธุ์ก็มีปัญหาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของดิน โรค และแมลง ที่สำคัญเป็นเรื่องยากที่จะทราบถึงปริมาณความชื้นในดินหรือสภาพแห้งแล้งในแปลงทดลองได้ (Chaudhary and Rao ,1982)

ต่อมามีการพัฒนาวิธีการอื่นๆ เพิ่มขึ้น เช่นการคัดเลือกในเรือนเพาะชำ โดยการเลี้ยงในสารละลายธาตุอาหารที่เรียกว่า การเลี้ยงแบบ hydroponic (IRRI, 1985) ซึ่งเป็นวิธีที่หลีกเลี่ยงปัญหาของสภาพดินที่แตกต่างกัน และยังสามารถกำหนดความแห้งแล้งได้ รวมถึงการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมด้วยการใช้รังสี สารเคมี (ประพาส, 2526) ต่อมาเมื่อเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการพัฒนาขึ้นมาจึงได้มีผู้นำเอาเทคนิคนี้มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะการใช้ประโยชน์จากการแปรผันของเซลล์ร่างกาย (somaclonal variation) ที่เกิดขึ้นในขณะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อ หรือการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ เพื่อให้สารเคมีสัมผัสกับเนื้อเยื่อโดยตรง หรือการเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยชักนำให้เกิดแคลลัส เพื่อกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์จำนวนมากในเวลาอันสั้น หรือการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย นอกจากนี้ยังอาจใช้รังสี หรือสารเคมีร่วมด้วยเพื่อเพิ่มการแปรผันให้สูงขึ้นไปอีก เมื่อพืช

เจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์แล้วสามารถพบการแปรผันได้อย่างชัดเจน การแปรผันของเซลล์ร่างกายที่เกิดขึ้นนี้มาจากการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1974, 1991; Larkin and Scrowcroft, 1981; Zakri, 1985., Lal and Lal, 1990., and Lynch *et al*., 1991) ซึ่งมีการศึกษามานานแล้ว โดยเฉพาะในกลุ่มของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าวสาลีพบลักษณะการแปรผันของความสูงที่เพิ่มขึ้น ลักษณะช่อดอก รูปร่างเมล็ด จำนวนเมล็ดต่อรวง และน้ำหนักของเมล็ดที่เพิ่มขึ้น (Mohmand and Nabors, 1990)

รายงานที่ยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดการแปรผันของเซลล์ร่างกายในขณะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบในกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* Pompadour 'Phra Tabha' และ *Dendrobium* May Neal 'Sri Sobhon' โดย Vajrabhaya และ Vajrabhaya (1974) พบว่าต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อมีลักษณะดอกผิดปกติ 89 ต้น โดยคัดจากต้นที่เกิดใหม่ 910 ต้น พบการแปรผันของขนาดรูปร่าง สีของกลีบดอก ปาก และ mid-lobe ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่กลีบดอก และปากทั้งอันมีการเปลี่ยนแปลงไปเพียงเล็กน้อย ซึ่งผลของการเปลี่ยนแปลงของกลีบดอกมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของดอกทั้งดอก การแปรผันในด้านของสีดอกก็พบเช่นกัน โดยพบทั้งความเข้มที่เปลี่ยนไป และลักษณะดอกด่าง ส่วนในด้านการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมนั้นไม่ว่าจะเป็นจำนวน หรือเพียงบางส่วนของโครโมโซมมีผลต่อลักษณะที่แสดงออกมา เมื่อนำต้นที่กลายพันธุ์ไปปลูกต่ออีกหลายรุ่น พบว่าลักษณะที่กลายไปยังคงที่แม้ว่าสิ่งแวดล้อมจะเปลี่ยนไปก็ตาม ต่อมามีการเสนอรายงานที่พบการแปรผันในด้านต่างๆ ของพืชที่มาจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อกันอย่างกว้างขวาง

การแปรผันของเซลล์ร่างกายในข้าวนั้นรายงานครั้งแรกโดย Nishi และคณะ (1968) ซึ่งพบว่าข้าวที่ได้จากการเลี้ยงแคลลัสมีลักษณะต้นเตี้ย และต้นที่บิดเบี้ยว อันเนื่องมาจากการเลี้ยงแคลลัสข้าว ต่อมาได้มีรายงานการแปรผันของเซลล์ร่างกายในข้าวมากขึ้นโดยลักษณะที่พบคือ ต้นเตี้ย ขาวเผือก (albino) จำนวนหน่อที่ให้ผลผลิตมากขึ้น การออกดอกเร็ว (9.3%) และช้า (46.7%) ความสมบูรณ์ของเมล็ดลดลง และจำนวนรวงต่อกอ จำนวนเมล็ดต่อรวง น้ำหนักเมล็ดที่ลดลง และลักษณะทางเมล็ดที่เปลี่ยนไป (Chang-zhang *et al*., 1984; Oono, 1984, 1985; and Oono, Okuno and Kawai, 1986) Zong-xiu และคณะ (1983) ได้รายงานว่าโอกาสในการเกิดการแปรผันได้มากหรือน้อยนั้นเกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ของพืชด้วย โดยพบว่าในข้าวที่ชักนำให้เกิดใหม่ 2 กลุ่ม คือ Hesien (indica type) และ Keng (japonica type) นั้นพบความผิดปกติต่างๆ กันไป ในกลุ่มแรกพบ polyploid ถึง 13.3 % ในขณะที่กลุ่มหลังไม่พบเลย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลักฐานดังกล่าวเป็นสิ่งบ่งชี้ว่าการแปรผันของเซลล์ร่างกายที่เกิดขณะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีโอกาสเกิดขึ้นได้มาก ดังนั้นการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงเป็นวิธีหนึ่งที่เพิ่ม genetic variation และยังพบว่าความถี่ในการเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) สูงกว่าในธรรมชาติ (Lal and Lal, 1990; and Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991) ลักษณะที่กลายไปนี้สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ หรือคงลักษณะเดิมแต่เพิ่มคุณสมบัติในการต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ลักษณะดินเค็ม ดินเปรี้ยว ความแห้งแล้ง โรค และแมลง เป็นต้น (Vajrabhaya *et al.*, 1984; Evans *et al.*, 1986; and Widholm, 1988) จึงมีนักวิจัยใช้เทคนิคนี้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้งขึ้นหลายชนิดด้วยกัน เช่น Vajrabhaya และคณะ (1987) ได้ศึกษาการคัดเลือกข้าวทนเค็มจากการแปรผันของเซลล์ร่างกายโดยใช้วิธีชักนำแคลลัสที่ชักนำจากเอมบริโอมากกว่า 450,000 เมล็ด ของข้าว 8 พันธุ์ คือ กข 25 กข 23 กข 8 ขาวดอกมะลิ 105 นางมล เอส-4 เหนียวสันป่าตอง เหลืองประทิว 123 และขาวตาแห้ง 17 การคัดเลือกนี้ทำโดยการนำชิ้นพืช (explant) มาเลี้ยงในอาหารที่เติม NaCl 1-2% เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นจึงย้ายเพาะชิ้นที่รอดตายไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ปราศจาก NaCl เพื่อให้มีการพัฒนาต่อไป การคัดเลือกนี้แบ่งเป็น 2 ส่วนด้วยกัน ส่วนแรกเป็นการคัดเลือกในระดับเซลล์หรือการคัดเลือกระดับแคลลัส ส่วนที่สองเป็นการคัดเลือกหลังจากชักนำแคลลัสให้มีการพัฒนาไปเป็นยอด (shoot) แล้วซึ่งเป็นการคัดเลือกในระดับอวัยวะ รวมทั้งนำต้นที่มีการพัฒนามาจากแคลลัสโดยไม่ได้ผ่านการคัดเลือกในหลอดแก้วมาทำการคัดเลือกในรุ่นถูกเพื่อให้โอกาสยีนด้อย (recessive) มีโอกาสแสดงออก จากผลการคัดเลือก พบว่าได้ข้าวสายพันธุ์ทนเค็มหลายสายพันธุ์ด้วยกัน โดยเฉพาะในพันธุ์เหลืองประทิวได้สายพันธุ์ที่มีอัตราการรอดตายสูงถึง 94% ในขณะที่สายพันธุ์หลักมีการรอดตายเพียง 3% เท่านั้น ซึ่ง Vajrabhaya และ Vajrabhaya (1991) เชื่อว่ายีนทนเค็มที่คัดเลือกมาได้นี้มาจาก somaclonal variation

สำหรับการคัดเลือกข้าวสายพันธุ์ทนแล้งโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ มนทกานติ และคณะ (2535) ได้คัดเลือก cell line ที่ทนแล้งของข้าวสายพันธุ์ กข 23 โดยนำ embryogenic callus มาเลี้ยงในอาหารที่เติม PEG6000 เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นจึงนำแคลลัสที่รอดตายมาเลี้ยงและ regenerate ต่อไปจนได้ต้นที่สมบูรณ์ ต่อจากนั้นจึงนำไปปลูกในสภาพปกติเพื่อเก็บเมล็ด และทำการคัดเลือกในรุ่นถูก และรุ่นต่อๆ ไปอีกหลายชั่ว (มนทกานติ, 2535)

สำหรับการคัดเลือกในรุ่นถูก และรุ่นต่อๆ ไป พบว่าการคัดเลือกด้วย PEG6000 ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร โดยปลูกข้าวอายุ 7 วัน ซึ่งมี coleoptile ยาวประมาณ 1 ซ.ม. ในน้ำปุ๋ยที่เติม PEG6000 เป็นเวลา 1 เดือน สายพันธุ์ใดที่มีอัตราการรอดตายสูงแสดงว่าเป็นสายพันธุ์ที่น่าจะทนแล้งได้ดี (พรทิพย์, 2539 และ มนทกานติ, 2535)

ข้าว กข 23 สายพันธุ์ทนแล้ง

งานวิจัยนี้ใช้ข้าว กข 23 สายพันธุ์ทนแล้งจำนวน 8 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1) เป็นพืชทดลองนี้ ซึ่งได้มาจากเมล็ดข้าวสายพันธุ์ทนแล้งของ กข 23 ที่คัดเลือกมาจากการ somaclonal variation ขณะเลี้ยงแคลลัสของโครงการ "การคัดเลือกข้าวทนแล้งจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ" ของ รศ.มนทกานติ วัชราภัย โดยการนำ embryogenic callus ของข้าว กข. 23 (ที่ชักนำมาจากเอมบริโอของเมล็ด) มาคัดเลือก cell line ที่ทนแล้งในอาหารสังเคราะห์ที่เติม PEG6000 ในระดับความเข้มข้น 125 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14 วัน การคัดเลือกในช่วงนี้จัดว่าเป็นชั่วอายุ R0 เลือกเฉพาะ embryogenic callus ที่รอดตายมาเลี้ยงต่อ และชักนำให้เกิด plant regeneration จนได้ต้นกล้าที่สมบูรณ์ นำกล้านี้มาปลูกในสภาพปกติเพื่อให้เกิด segregation และ recombination จากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เมล็ดที่ได้เรียกว่าชั่วอายุ R1 ซึ่งคัดเลือกสายพันธุ์ R1 โดยวิธีนี้ได้เมล็ด R1 ทั้งหมด 295 สายพันธุ์ ซึ่งพรทิพย์ ชินสงคราม (2539) ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ทนแล้งจาก 295 สายพันธุ์ คัดเลือกในระยะกล้าข้าวต่อมาอีก 3 ชั่วอายุคือ R1, R2 และ R3 การคัดเลือกนี้ใช้กล้าข้าวอายุ 7 วัน (มี coleoptile ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร) นำมาเลี้ยงในสารละลาย WP ที่เติม PEG6000 ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 30 วัน ซึ่งโดยวิธีนี้ พบว่าสายพันธุ์หลักที่ใช้เป็นสายพันธุ์ควบคุม (control) มีอัตรารอดตายเพียง 1.5-6.0 % ขณะที่สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาจาก somaclonal variation มีอัตราการรอดตายสูงสุดในชั่วอายุ R3 คือ 40% ที่เลือกใช้ข้าว กข 23 ชนิดสายพันธุ์หลัก (foundation seed) เนื่องมาจากมีลักษณะประจำพันธุ์ และข้อดีหลายประการ (กรมวิชาการเกษตร, 2534)

1. ไม่ไวต่อช่วงแสง (ปลูกได้ตลอดปี)
2. อายุการเก็บเกี่ยว 120 – 130 วัน
3. เป็นลูกผสมสามทางระหว่าง กข. 27 กับ IR 32 และ กข 1
4. เป็นข้าวเจ้า
5. ระยะพักตัวของเมล็ดประมาณ 5 สัปดาห์
6. รวงอยู่ใต้ใบ ใบธงตั้งตรงและค่อนข้างยาว
7. ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง ต้านทานต่อโรคเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และต้านทานต่อโรคจู๋

ตารางที่ 1 อัตราการรอดตาย และลักษณะพิเศษของกล้าข้าว กข 23 สายพันธุ์ทนแล้ง 8 สายพันธุ์และสายพันธุ์หลักในรุ่น R1 R2 และ R3 (พรทิพย์, 2539)

สายพันธุ์ TC RD 23	อัตราการรอดตาย (%)			ลักษณะพิเศษรุ่น R3			หมายเหตุ
	R1	R2	R3	ความสูง (ซม.)	จำนวนหน่อต่อกอ	อายุออกดอก (วัน)	
2768-13	20.00	13.00	30.00	48.00	21.00	112.00	ต้นเตี้ยที่สุด
2777-01*	21.60	11.70	36.00	63.00	39.00	90.00	ออกดอกเร็วที่สุด
2784-11*	27.50	15.00	38.00	65.00	41.00	95.00	ออกดอกเร็ว แตกกอมาก
2784-07	27.50	15.00	38.00	50.00	45.00	117.00	แตกกอมาก ต้นเตี้ย
2784-08*	27.50	15.00	38.00	60.00	35.00	100.00	ออกดอกเร็ว
2784-10	27.50	15.00	38.00	60.00	47.00	112.00	แตกกอมากที่สุด
2785-05	36.00	18.50	20.00	60.00	45.00	120.00	แตกกอมาก
2797-07*	66.00	11.90	40.00	60.00	43.00	108.00	ออกดอกเร็ว แตกกอมาก
control	1.50	3.30	6.00	57.20	33.80	115.00	ลักษณะปกติ

หมายเหตุ

อายุการอออกดอกนับจากวันที่เพาะเมล็ดถึงวันที่ช่อดอกโผล่ออกจากใบธง 50 % (ไม่รวมเวลาที่คัดเลือก PEG ในขวดเป็นเวลา 1 เดือน)

ความสูงวัดจากเหนือระดับทรายจนถึงฐานใบธง

เครื่องหมาย * แสดงสายพันธุ์ที่ใช้เป็นพืชทดลองในการทดสอบโพรลีนและน้ำตาล

R0 คือชั่วอายุใน *in vitro*

R1 คือ ลูก R0

Rx คือลูกของ R(n-1) เมื่อ n เป็นเลขจำนวนนับตั้งแต่ 1 ขึ้นไป

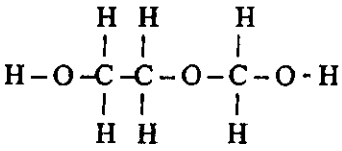
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาร osmoticum ที่ใช้ในการคัดเลือกพืชทนแล้ง

มีการทดลองที่ใช้สาร osmoticum หลายชนิด ในการคัดเลือกพืชเพื่อให้ได้สายพันธุ์ทนแล้ง สาร osmoticum ที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ polyethylene glycol หรือที่เรียกว่า PEG (Jackson, 1962 ; Kaufman and Eckard, 1971 ; Michel and Kaufman, 1973 ; Emmert, 1974 ; Hanson, Nelson, and Everson, 1977 ; Steuter, Mozafar, and Goodin, 1981 ; Handa *et al.*, 1983 ; Yeo and Flower, 1984 ; Plaut and Federman, 1985 ; Siddeswar and Kavi Kishor, 1989 ; Zekri and Parsons, 1990 and Venkateswarlu and Ramesh, 1993) เนื่องจากเป็นสารที่สามารถควบคุมการเกิด osmosis ระหว่างพืชกับน้ำเพื่อให้เกิดสภาวะขาดน้ำเช่นเดียวกับการงดให้น้ำกับพืชที่ปลูกตามสภาพธรรมชาติโดยใช้ดิน (Kaufman and Eckard, 1971 ; Michel and Kaufman, 1973 ; Emmert, 1974 ; Hanson, Nelson, and Everson,) และมีข้อดีหลายประการคือเป็นสารที่มีคุณสมบัติที่เป็นสารเฉื่อย (inert) ซึ่งเป็นพิษต่อคนและสัตว์น้อยมาก เนื่องจากสามารถใช้เป็นส่วนประกอบในการทำเครื่องสำอาง และยา (Jackson, 1962) ในพืชพบว่า PEG6000 ถูกดูดซึมโดยพืชหรือเซลล์พืชได้น้อยกว่าพวกที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า (Michel, 1970) และ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 2000 ถึง 6000 ก็ถูกนำมาใช้มากกว่า mannitol ทั้งนี้พบว่าในบางครั้ง mannitol สามารถซึมผ่านเมล็ดขณะงอกได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเปรียบ water potential ของ PEG ที่เตรียมขึ้นใหม่ๆ กับที่เตรียมไว้แล้ว 28 วัน มีค่าเท่ากันแสดงว่าสารละลาย PEG มี osmotic stability สูง (Thill *et al.*, 1979) และ PEG โมเลกุลใหญ่ เช่น PEG6000 ให้ค่า osmotic potential ในท่อลำเลียงน้ำที่ดงที่กว่า PEG โมเลกุลเล็ก เช่น PEG 400 อีกด้วย (Kaufman and Eckard, 1971) ส่วนการฟื้นตัวของต้นพืชที่ปลูกในสารละลายที่มี PEG ก็ทำได้ดีกว่าใน mannitol (Michel, 1970) จึงนับว่าเป็นสารที่เหมาะในการใช้เป็นชักนำให้เกิดความสภาวะแล้ง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ PEG เป็นสาร osmoticum

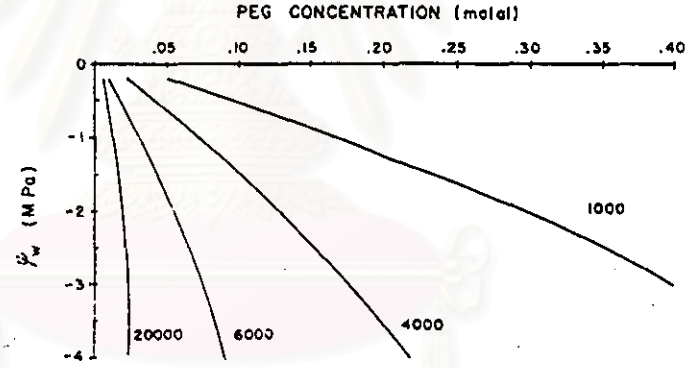
คุณสมบัติของ PEG

PEG หรือชื่อทางการค้าว่า carbowax มีลักษณะเป็นโพลิเมอร์สายยาว (long–chain polymer) น้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 300-20,000 สูตรทางเคมีคือ $HOCH_2 (CH_2 O CH_2)_X OH$ (Jackson, 1962 ; and Steuter, *et al.*, 1981) และสูตรโครงสร้างตามรูปที่ 1

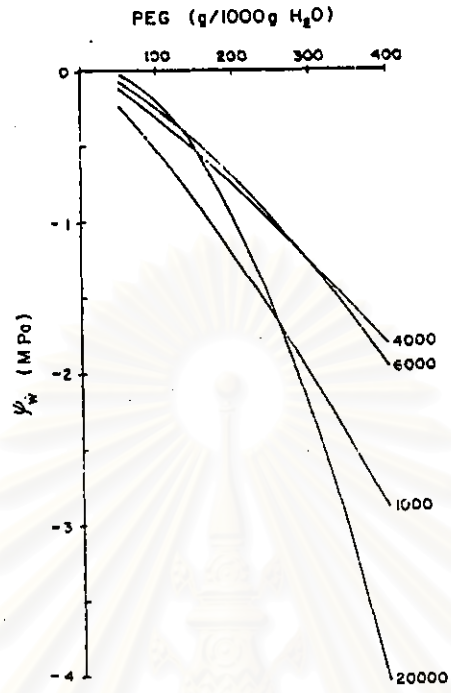


รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของ PEG

การวัด water potential โดยวิธี vapor – pressure deficit ใน PEG แต่ละความเข้มข้น พบว่า molality และ water potential มีความสัมพันธ์กันในแต่ละขนาดของโมเลกุลของ PEG (รูปที่ 2) แต่ water potential ที่เกิดจากความเข้มข้นของ molal ของ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ กันนั้นไม่มีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกับที่เกิดในขนาดของโมเลกุล เนื่องจากมีความแตกต่างกันของความยาวของสายโพลิเมอร์ ดังรูปที่ 3 (Steuter *et al.*, 1981)



รูปที่ 2 ค่า water potential แต่ละระดับที่เกิดจากความสัมพันธ์ของความเข้มข้นกับขนาดของโมเลกุลของ PEG (Steuter *et al.*, 1981)



รูปที่ 3 ค่า water potential แต่ละระดับที่เกิดจากความเข้มข้นของ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ (Steuter *et al.*, 1981)

ความสัมพันธ์ของสารละลายที่มี PEG ที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ กับ osmotic potential เป็นแบบเส้นโค้ง (รูปที่ 3) แต่ความสัมพันธ์ของ osmotic potential กับอุณหภูมิในแต่ละความเข้มข้นของ PEG นั้นเป็นแบบเส้นตรง ดังรูปที่ 4 (Michel and Kaufman, 1973) จากความสัมพันธ์นี้สามารถหาค่าของ osmotic potential ได้โดยการคำนวณจากสูตรของจากสูตร Michel และ Kaufman (1973) ดังนี้คือ

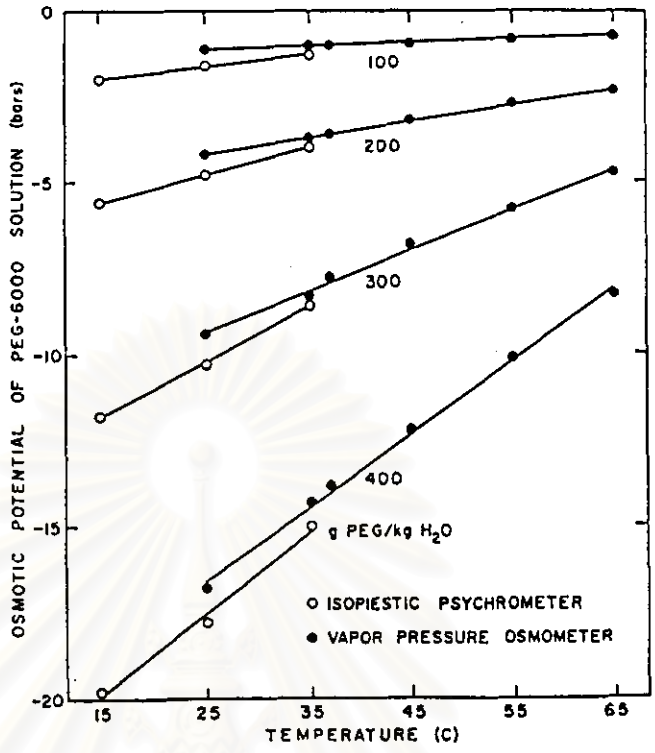
$$\psi_s = -(1.18 \times 10^{-2})C - (1.18 \times 10^{-4})C^2 + (2.67 \times 10^{-4})CT + (8.39 \times 10)C^2T$$

โดยที่

ψ_s = osmotic potential

C = ความเข้มข้นของ PEG6000 (กรัมต่อน้ำ 1 กิโลกรัม)

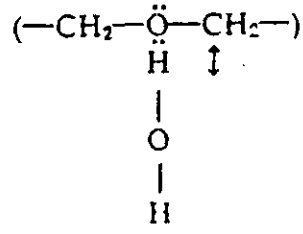
T = อุณหภูมิ ($^{\circ}C$)



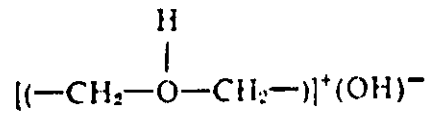
รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ของสารละลายที่มี PEG ที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ กับ osmotic potential และอุณหภูมิ (Michel and Kaufman, 1973)

ผล PEG ที่มีต่อการลด water potential

การที่ PEG สามารถลด water potential ลงได้นั้นเนื่องจากโมเลกุลของ ethylene oxide ซึ่งละลายได้ในน้ำไปยึดกับอะตอมของ ether oxygen ด้วยพันธะไฮโดรเจน (รูปที่ 5) หรืออาจเป็นไปได้ในอีกกรณีหนึ่งคือ เมื่อ ethylene oxide อยู่ในสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบจะเกิดเป็น cation–active polyoxonium compounds ดังรูปที่ 6 (Steuter *et al.*, 1981)



รูปที่ 5 การยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของ PEG กับน้ำ (Steuter *et al.*, 1981)



รูปที่ 6 การเกิด cation – active polyoxonium compounds จาก PEG ที่ละลายในน้ำ (Steuter *et al.*, 1981)

ข้อมูลการใช้ PEG เป็นสาร osmoticum

มีการนำ PEG มาใช้กับพืชหลายชนิดด้วยกัน อาทิเช่น ต้นพริก (*Capsicum frutescens* L.), (Kaufman and Eckard, 1971) เซลล์มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) (Handa *et al.*,1983 and Rhodes, Handa and Bressan, 1986) พันธุ์ Kadiri-3 และ JL-24, (Venkateswarlu and Ramesh, 1993) ข้าวฟ่างพันธุ์ Feterita, CK-60, Dwarf Yellow Milo, Western Blackhull Kafir, Manchu Brown Kaoliang, Dwarf White Durra, Shallu และ Early Hegari (Blum and Ebercon, 1976) ต้นข้าวโอดี *Avena sativa* พันธุ์. Victory, (Dhinda และ Cleland, 1975) ต้นบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* L.), (Stewart, 1977; Argandona and Pahlich, 1991; and Joyce, Aspinall, and Peleg, 1992) พันธุ์ Proctor, (Hanson and Tully, 1979; and Singh *et al.*, 1972) CI11806, (Hanson and Tully, 1979) Prior, Ketch, CI5611, Asahi (Singh, Aspinall, and Peleg, 1973) CI3576, (Singh *et al.*, 1973 and Singh *et al.*, 1972) Bankuti Korai, Excelsior, Prior A, BR1239, Princess, Arivat, Velvon และ Maraini (Singh *et al.*, 1972) ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) พันธุ์ BY-4, (Iwai *et al.*, 1979) ต้นมะนาว [*Citrus limon* (L.) Burm. f.], (Levy, 1980) ข้าวสาลี (*Triticum vulgare* L.) พันธุ์ Kalyan Sona, ผักกาดน้ำ (*Plantago ovata* Forsk-Isabgool), ฝิ่น (*Papaver somnifera* L. Opium poppy) และ mustard (*Brassica juncea* L.) สายพันธุ์. Varuna, (Patel และ Vora, 1985) ต้นหม่อน (*Morus alba* L.) สายพันธุ์. 5, (Veeranyaneyulu and Kumari, 1989) อัลฟาล์ฟา (*Medicago sativa* L.), (Griousse *et al.*, 1996) ทั้งนี้เพื่อศึกษาอิทธิพลของ PEG ที่มีต่อการตอบสนองของพืชต่อสภาวะแล้งในด้านต่างๆ เช่น การสะสมปริมาณโพรลีนและน้ำตาลในพืชแต่ละชนิด และแต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกันไป (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 2 ตัวอย่างการสะสมปริมาณโพรลีนและน้ำตาลในพืชแต่ละชนิด และแต่ละสายพันธุ์ เมื่อพืชอยู่ภายใต้สภาวะแล้ง

ชนิดของพืช	PEG			ปริมาณสารที่สะสม		Refferance
	น้ำหนักโมเลกุล	ความเข้มข้น	Water potential	โพรลีน	น้ำตาล	
ใบมะเขือเทศ พันธุ์	ไม่ระบุ	350 g/l	ไม่ระบุ			Stewart and
- Rheinlands Ruhm				3	-	Voetberg, 1987
- Flacca				1.7	-	
				μ mol / g dw		
ใบบาร์เลย์	ไม่ระบุ	350 g/l	ไม่ระบุ	7.5	-	Stewart and
- Larker				μ mol / g fw		Voetberg, 1987
บาร์เลย์ พันธุ์	2000	ไม่ระบุ	–36 Bars			Singh *et al.*,
- Prior				190.4	-	1973
- Ketch				142.8	-	
- CI3576				129.8	-	
- CI6511				108.2	-	
- Asahi				77.9	-	
				μ mol / g dw		
บาร์เลย์ พันธุ์	4000	ไม่ระบุ	–28 bars			Singh *et al.*,
- Bankuti Korai				208.6	-	1972
- Excelsior				160.1	-	
- Prior				135.9	-	
- BR1239				122.0	-	
- Princess				115.1	-	
- Arivat				111.6	-	
- Velvon II				106.4	-	
- CI3576				96.1	-	
- Maraini				78.7	-	
				μ mol / g dw		

ชนิดของพืช	PEG			ปริมาณสารที่สะสม		Refferance
	น้ำหนักโมเลกุล	ความเข้มข้น	Water potential	โพรลีน	น้ำตาล	
เซลล์มะเขือเทศ พันธุ์	4000	150 g/l	ไม่ระบุ			Venkateswarlu
- Kadiri-3				40	500	and Ramesh,
- JL-24				49	350	1993
				μ mol / g dw	μ mol / g dw	
ข้าวฟ่าง	6000	ไม่ระบุ	-22.1			Blum and
- Feterita			Bars	4.64	-	Ebercon, 1976
- CK-60				3.93	-	
- Dwarf Yellow-Milo				3.83	-	
- Western Blackhull-Kafir				3.51	-	
- Manchu Brown-Kaoliang				3.24	-	
- Dwarf White Durra					-	
- Shallu				2.97	-	
- Early Hegari				2.70	-	
				2.26	-	
				μ mol / g fw		
เซลล์มะเขือเทศ	6000	ไม่ระบุ	-2.2	37.69	-	Rhodes *et*
			MPa	μ mol / g fw		*al.*,1986
ใบบาร์เลย์	6000	400 g/l	ไม่ระบุ			Barnett and
- Proctor 197/1975				4	-	Naylor, 1966
- Excelsior CI11509				5	-	
				μmol / leaf		

หมายเหตุ

เครื่องหมาย - หมายถึงไม่มีการศึกษา

กลไกของพืชในการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในสภาวะแล้ง

ภายใต้สภาวะแล้งพืชจะมีวิธีการปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดได้ (Kramer, 1983; Blum, 1988; and Taiz and Zeiger, 1991) 3 แบบด้วยกัน

1. Drought escape เป็นการหลีกเลี่ยงความแห้งแล้ง โดยพืชกลุ่มนี้จะมีการปรับตัวให้มีวัฏจักรชีวิต (life cycle) ให้สั้นลง เพื่อให้สามารถดำรงอยู่ในสภาพแวดล้อม

2. Drought avoidance หรือ Desiccation postponment เป็นความสามารถที่พืชจะรักษาปริมาณน้ำในเนื้อเยื่อไว้ได้ดี แม้ว่าจะได้รับสภาวะแล้ง พืชกลุ่มนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือสรีรวิทยาที่ช่วยลดการคายน้ำ หรือเพิ่มความสามารถในการดูดน้ำ เช่นการเพิ่มความหนาของ cuticle การเปิดและปิดปากใบ การม้วนของใบ และการเพิ่มความลึกของระบบราก

3. Drought tolerance หรือ Desiccation tolerance เป็นความสามารถที่พืชยังคงรักษาบทบาทและหน้าที่ไว้ได้ เมื่ออยู่ในสภาวะแล้ง พืชกลุ่มนี้เป็นพืชที่ทนต่อความแห้งแล้ง เมื่ออยู่ในช่วงเวลาแห้งแล้งยาวนาน พืชจะมีการปรับ osmotic ภายในเซลล์ให้ต่ำลงเพื่อสามารถดูดน้ำมาใช้ได้เช่น

3.1 การสะสมสาร metabolite บางชนิด

3.1.1 ไอออน เช่นโปแตสเซียม ไอออน (K^+), คลอไรด์ ไอออน (Cl^-), ไนเตรท ไอออน (NO_3^-), แมกนีเซียม ไอออน (Mg^{2+}) (Kaufman and Eckard, 1971; Jones *et al.*, 1980; and Handa *et al*, 1983)

3.1.2 สาร solutes เช่น

- Amino acid (Barnett and Naylor, 1966; Thompson *et al.*, 1966; Tully and Hanson,1979; Cavlieri and Huang, 1980; Levy, 1983; and Shen, Orcutt, and Foster, 1990)
- Glycine betaine (Bohnert *et al.*, 1995)
- Polyol (Bohnert *et al.*, 1995) เช่น mannitol และ sorbitol (Bieleski, 1982)
- Quaternary nitrogen (Handa, *et al.*, 1983)
- โพรลีน (Routley, 1966; Singh *et al.*, 1972; Stewart, 1972; Bates, Waldren, and Teare, 1973; Singh *et al.*, 1973; Waldren, Teare, and Ehler, 1974; Stewart and Lee, 1974; Blum and Ebercon, 1976; McMichael and Elmore, 1977; Hanson *et al.*, 1977; Mali and Mehta, 1977; Tully, Hanson, and Nelsen, 1979; Huang and Cavalieri, 1979; Adams and Frank, 1980; Stewart, 1980; Tyankova, 1980; Levy, 1980; Levy, 1983; Stewart and Voetberg, 1985; Patel and Vora, 1985; Handa *et al.*, 1986; Pesci, 1988; Veeranjaneyulu and Kumari, 1989; Argandona and Pahlich, 1991; Badapati, Donald, and Lislile, 1992; Irigoyen *et al.*, 1992; Joyce *et al.*, 1992; and Griousse *et al.*, 1996)

- น้ำตาล (Cavlieri and Huang, 1980; Jones, Osmond, and Turner, 1980; Tyarkova, 1980; Munns and Weir, 1981; Handa, *et al.*, 1983; Irigoyen *et al.*, 1992; Veekateswarlu and Ramesh, 1993; and Premachandra, *et al.*, 1995)

โพรลีน

โพรลีนคือกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่ พบว่ามีการสะสมอย่างรวดเร็วและเพิ่มขึ้นปริมาณมาก เมื่อเทียบกับการสะสมในสภาวะปกติ พืชที่อยู่ในสภาวะขาดน้ำมีการสะสมมากถึง 10-100 เท่า ในขณะที่กรดอะมิโนตัวที่สะสมรองลงมาคือ asparagine มีการเพิ่มขึ้นเพียง 2-6 เท่า (Barnett and Naylor, 1966) และเพิ่มมากขึ้นกว่ากรดอะมิโนตัวอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ (Joyce *et al.*, 1992) ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้มีการเคลื่อนย้ายจากส่วนที่เหี่ยวไปยังส่วนที่ยังไม่เหี่ยวของพืช (Barnett and Naylor, 1966) การศึกษาโพรลีนในด้านต่างๆ ในพืชที่อยู่ภายใต้สภาวะแล้งทำกันอย่างกว้างขวางดังนี้

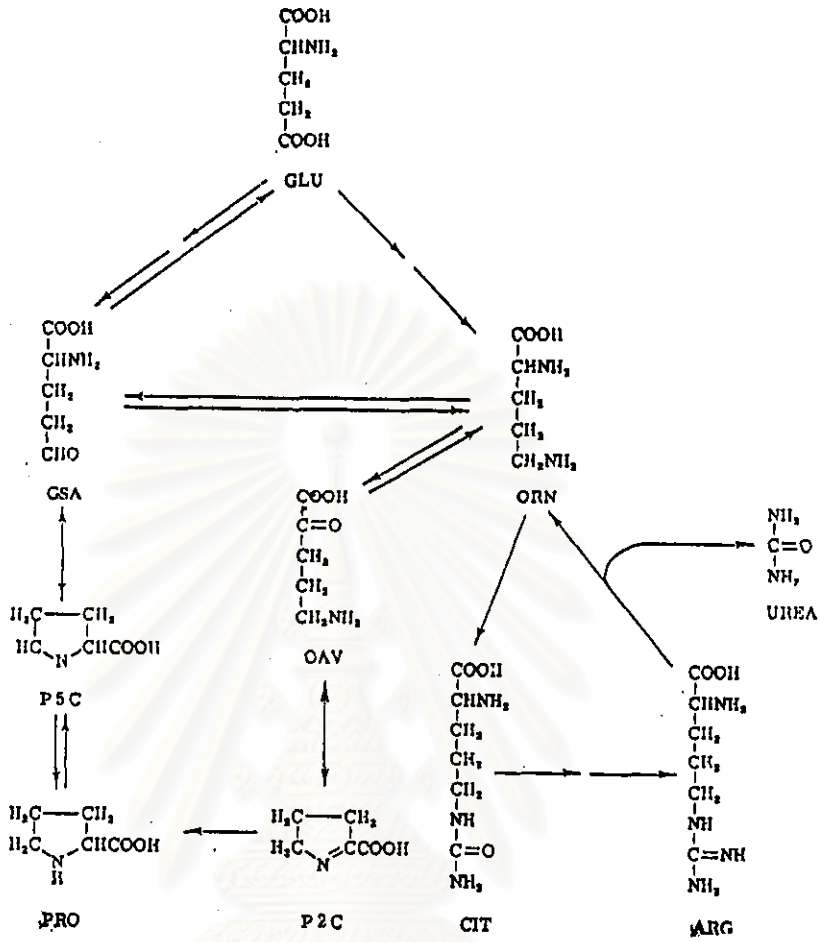
กระบวนการสังเคราะห์โพรลีน

โพรลีนถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยกระบวนการหลัก 2 กระบวนการ (Thompson, 1980) คือ

1. กระบวนการสังเคราะห์โพรลีนจาก arginine
2. กระบวนการสังเคราะห์โพรลีนจาก glutamic acid

1. กระบวนการสังเคราะห์โพรลีนจาก arginine

ในกระบวนการโพรลีนสร้างมาจาก glutamic acid พบว่าเกิด acetylation ของ glutamic acid แต่ในกระบวนสร้างโพรลีนจาก arginine ไม่มี cycliczation ของ acetylglutamic semialdehyde ดังนั้นจึงเป็นการช่วยรักษากระบวนการสังเคราะห์โพรลีนและ arginine (proline and arginine biosynthesis pathway) ให้เป็นอิสระ (Thompson, 1980) ขั้นตอนแรกของการเกิดโพรลีนมาจาก ornithine ที่ถูกสังเคราะห์มาจาก glutamic acid เปลี่ยนไปเป็น citruline และ arginine ในสภาวะขาดน้ำได้เกิดการสลายตัวของ arginine เป็น ornithine โดยให้ยูเรียออกมา จากนั้น ornithine จึงเปลี่ยนไปเป็น glutamic semiadehyde ซึ่งสามารถเป็นได้ทั้ง precursor และผลผลิตของโพรลีน โดยที่ ornithine ต้องเกิด transamination จึงสามารถเปลี่ยนไปเป็นโพรลีนได้ (Thompson, 1980 ; and Lazcano-Ferrat and Lovatt, 1997)

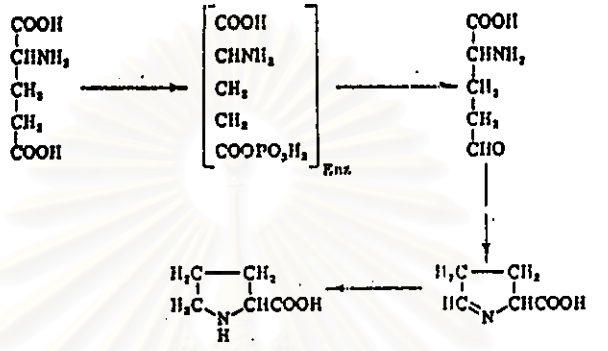


รูปที่ 7 กระบวนการสังเคราะห์โพรลีนจาก arginine (Thompson, 1980)

2. กระบวนการสังเคราะห์โพรลีนจาก glutamate acid

การเปลี่ยนกลับของ glutamic acid ไปเป็นโพรลีนใน 1 รอบ ทำให้สูญเสียออกซิเจน 2 อะตอม แต่ไม่มีการสูญเสียอะตอมของคาร์บอนและไนโตรเจน (Thompson, 1980) ขั้นตอนแรกเกิดจาก glutamic acid เปลี่ยนไปเป็น glutamic semiadehyde โดยอาศัยเอนไซม์ Δ-pyrroline-5-carboxylate synthease ซึ่งประกอบด้วย y-glutamyl kinase และ glutamate semialdehyde dehydrogenase activity (Krueger, Jager, and Hintz, 1986; and Rayapati, Stewart and Hack, 1989) ซึ่ง Argandona และ Pahlich (1991) ได้รายงานตรงกันว่ามีการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ pyrroline carboxylate reductase ประมาณ 4 เท่า ในชั้น epidermal tissue และ primary leave ของใบบาร์เลย์ที่อยู่ภายใต้สภาวะขาดน้ำ ในขณะเดียวกับที่ glutamate decarboxylase ยังไม่มีการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำ ปฏิกิริยาต่อมาคือ carboxyl group ของ glutamic acid ถูก reduced ไปเป็น adehyde group โดยไม่มีเอนไซม์มา

กระตุ้นปฏิกิริยานี้ และเป็นปฏิกิริยาที่ไม่สามารถเปลี่ยนกลับไปมาได้ซึ่งทำให้ α-amino group เกิดเป็น pyroline-5-carboxylic acid (cyclic schiff base) ที่พร้อมจะถูก reduced ไปเป็นโพรลีนในขั้นตอนสุดท้าย (Thompson, 1980) จากการติดตามกระบวนการนี้ด้วยสารกัมมันตรังสี ^{14}C พบว่า ^{14}C-glutamate เปลี่ยนแปลงไปเป็นโพรลีนในสภาพที่มีแสงได้ดีกว่าในที่มืด (Hanson and Tully, 1979)



รูปที่ 8 กระบวนการสังเคราะห์โพรลีนจาก glutamic acid (Thompson, 1980)

โพรลีนเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่พบว่ามีการสะสมในพืชหลายชนิดเมื่อพืชอยู่ภายใต้สภาวะแล้ง โพรลีนถูกสร้างจากทั้ง arginine และ glutamate (Thompson, 1980 ; and Lazcano-Ferrat and Lovatt, 1997) โดยที่ภายใต้สภาวะ anabolic metabolism ของโพรลีนและ arginine มีความเกี่ยวข้องกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่ในสภาวะ catabolic เช่น senescence หรือสภาวะพิเศษอื่นๆ โพรลีนและ arginine มีความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กัน และยังพบว่าโพรลีนและ arginine ถูกสังเคราะห์ได้อย่างอิสระแต่การสลายตัวไม่ได้เป็นแบบอิสระ(Thompson, 1980) Stewart (1977) ทดลองการใช้การติดตามของ [^{14}C] proline และ L-[3,4 ^{3}H] proline ในต้นบาร์เลย์ อายุ 2 อาทิตย์ ที่อยู่ในสภาวะแล้งพบว่ามีการยับยั้ง proline oxidation เพื่อเพิ่มปริมาณโพรลีนในเนื้อเยื่อพืช เช่นเดียวกันกับ Iwai และคณะ (1979) ที่รายงานถึงการยับยั้ง proline oxidation ในต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum* cv. BY-4) ที่อยู่ในสภาวะแล้งเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ Kumari (1989) พบว่าเกิดการยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ proline dehydrogenase และ proline oxidase ในต้นหม่อน (*Morus alba* L. var. 5) ที่อยู่ภายใต้ water potential เท่ากับ –27.7 บาร์ เพื่อให้เกิดมีการสะสมโพรลีนเพิ่มมากขึ้น โดย proline dehydrogenase ที่สะสมในรากของต้นหม่อนที่อยู่ในสภาวะขาดน้ำมีปริมาณ 9.85±0.54 nanokatals/g dw เทียบกับชุดเปรียบเทียบมีการสะสมปริมาณ 64.35±2.57 nanokatals/g dw ในใบของต้นหม่อนที่อยู่ในสภาวะขาดน้ำมีปริมาณ 8.40±0.59 nanokatals/g dw เทียบกับชุดเปรียบเทียบมีการสะสมปริมาณ 58.13±1.29 nanokatals/g dw

ในระยะแรกที่พืชอยู่ในสภาวะขาดน้ำพบว่ากระบานการสังเคราะห์โพรลีนที่มาจาก glutamic acid เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วกว่าจากการที่เปลี่ยนแปลงมาจาก arginine ซึ่งคล้ายคลึงกันทั้งใน prokaryote พืชชั้นต่ำและสูง และในสัตว์ (Thompson, 1980) เช่นเดียวกับที่ Stewart และคณะ (1977) ได้รายงานถึงการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของโพรลีนในใบข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะขาดน้ำ โดยโพรลีนที่พบนี้สร้างมาจาก glutamic acid ที่ถูกติดตามด้วยสารกัมมันตรังสี L-[^{14}C] proline และ L-[3,4 ^{3}H] proline เช่นเดียวกับที่ Stewart (1977) ได้รายงานไว้ในปีเดียวกัน นอกจากนี้ Boggess (1976) ได้ใช้สารกัมมันตรังสี L-U-^{14}C-arginine ติดตามกระบวนการสร้างโพรลีนในต้นบาร์เลย์ที่อยู่ในสภาวะที่มีน้ำคงเหลือในต้น 75% ของน้ำหนักสดเริ่มต้น พบว่าผลรวมของ arginine ที่หายไประหว่าง 12 และ 24 ชั่วโมงแรกนั้นมีปริมาณต่ำกว่า 10% ของโพรลีนที่สะสม คือมี L-U-^{14}C-arginine 0.7 μ mole/g fw ที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นโพรลีน 26.7 μ mole/g fw ผลสรุปนี้จึงเพิ่มความเป็นไปได้ที่การสะสมโพรลีนในระยะแรกไม่ได้เกิดจาก arginine แต่เกิดจากการสังเคราะห์ใหม่จาก glutamic acid (Barnett and Naylor, 1966 ; Morris, Thompson, and Johnson, 1969 ; and Boggess and Stewart, 1976)

ในพืชที่อยู่ภายใต้สภาวะขาดน้ำที่ยาวนาน arginine มีบทบาทมากกว่า glutamic acid ในการที่จะเปลี่ยนไปเป็นโพรลีน โดยพบว่าในใบถั่ว (*P. vugaris*) มีการสะสม arginine อิสระที่พร้อมเปลี่ยนแปลงไปเป็นโพรลีนมากว่าที่จะสะสม glutamate อิสระ และนอกจากนี้ยังพบว่าการสะสม arginine decarboxylase activity เพิ่มขึ้นภายใต้สภาวะแล้งที่เกิดทั้งการใช้สาร osmoticum และการงดให้น้ำ โดยที่ไม่พบการสะสมที่เพิ่มขึ้นของ ornithine decarboxylase activity (Lazcano-Ferrat and Lovatt, 1997)

น้ำตาล

น้ำตาล เป็นอีกตัวหนึ่งที่พบว่าเมื่อพืชอยู่ในสภาวะขาดน้ำแล้วมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมาก ซึ่งมาจากคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ กันเช่น มาจากการสลายตัวของแป้งและการเปลี่ยนรูป (transformed) ของคาร์โบไฮเดรตตัวอย่างเช่น uncommon monosacharide-2-octulose ไปเป็น ซูโครส (Bianchi *et al.*, 1993) จากนั้นเคลื่อนย้ายจากส่วนที่เหี่ยวไปยังส่วนที่ยังไม่เหี่ยวของพืชเช่นเดียวกันกับการเคลื่อนย้ายของโพรลีน (Barnett and Naylor, 1966) ดังนั้นน้ำตาลที่สะสมเพิ่มขึ้นน่าจะเป็นพวก non-reducing sugar เช่น ซูโครส manitol และ sorbitol เนื่องจากเป็นน้ำตาลที่สามารถเคลื่อนย้าย (translocated) ได้ในท่อลำเลียงอาหารของพืช ซึ่งต่างจาก reducing sugar เช่น glucose fructose และ mannose ที่ไม่สามารถเคลื่อนย้ายได้ในท่อลำเลียงอาหาร (phloem) ของพืช และจากการศึกษาเชื่อว่า non-reducing sugar เป็น

major translocate เนื่องจากมีความ active น้อยกว่า reducing sugar translocation sugars ที่พบมากที่สุด คือ ซูโครส (Tully and Hanson, 1979; and Taiz and Zeiger, 1991) ซึ่งในรายงานของ Bohnert และคณะ (1995) สนับสนุนว่าในพืชหลายชนิดมีการสะสมซูโครสในปริมาณที่มากขึ้นเมื่อพืชอยู่ภายใต้สภาวะขาดน้ำ โดยมักพบว่าซูโครสจะเกาะอยู่กับ mobile carbohydrate อื่นๆ เช่น galactose การที่ซูโครสเกาะอยู่กับ galactose จำนวนโมเลกุลไม่เท่ากันนี้ทำให้มีชื่อเรียกต่างกันไปเช่น การที่ซูโครส 1 โมเลกุลเกาะอยู่กับ galactose 1 โมเลกุลเรียกว่า raffinose และ ซูโครส 1 โมเลกุลเกาะอยู่กับ galactose 2 โมเลกุลเรียกว่า stachyose (Taiz and Zeiger, 1991) กระบวนการสังเคราะห์ raffinose และ stachyose เกิดจากปฏิกิริยาที่ catalyzed โดย galactinol synthase (UDP-galactose:inositol galactosyltransferase) (รูปที่ 9ก), raffinose synthase (galactinol:sucrose $6^{ลัน}$ -α-D-galactosyltransferase) (รูปที่ 9ข) และ stachyose synthase (galactinol:raffinose $6^{ลัน}$ -α-D-galactosyltransferase) (รูปที่ 9ค) และ pathway ตามขั้นตอนต่างๆ ดังรูปที่ 9 เป็นการสังเคราะห์ galactinol จาก myo-inositol และ UDP-galactose (Blackman, Obendorf, and Leopold, 1992)

UDP-galactose + myo-inositol ⟶ galactinol + UDP (ก)

galactinol + sucrose ⟶ raffinose + myo-inositol (ข)

raffinose + galactinol ⟶ stachyose + myo-inositol (ค)

รูปที่ 9 การสังเคราะห์ galactinol จาก myo-inositol และ UDP-galactose เพื่อร่วมกับซูโครส ในการสังเคราะห์ raffinose และ stachyose

Raffinose ที่สังเคราะห์ขึ้นมานั้นสามารถป้องกันการตกผลึกของซูโครส เมื่อซูโครสมีความเข้มข้นมากขึ้น และทำให้ซูโครสสามารถป้องกัน membrane ได้ดีขึ้น (Koster, 1991; Lin and Huang, 1994; Black *et al*, 1996) เมื่อสัดส่วนของซูโครส และ raffinose อยู่ในสัดส่วนที่พอเหมาะเป็นสิ่งจำเป็นในการชักนำให้ข้าวสาลีในระยะ embryo มีความทนแล้งมากขึ้น (Black *et al*, 1996) นอกจากนี้พบว่าน้ำตาลที่สามารถละลายน้ำได้ (soluble sugar) ที่เกิดขึ้นปริมาณมากภายในเซลล์ระหว่างที่พืชขาดน้ำสามารถป้องกันการทำลายเซลล์ได้ (Blackman *et al*., 1992) ไม่เพียงแต่ soluble sugar จะเป็น osmoregulator เท่านั้นเมื่อพืชอยู่ในสภาวะขาดน้ำที่ยาวนาน soluble sugar จะ form H-bond และไปแทนที่น้ำเพื่อรักษาโครงสร้างของ hydrophillic ทำให้เซลล์ทำงานต่อไปได้ (Koster, 1991) และเมื่อซูโครส

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทำงานร่วมกับ oligosaccharide ตัวอื่นๆ เช่น raffinose, stachyose, verbacose และ umbelliferous ทำให้พืชสามารถทนต่อความแห้งแล้งได้ดีขึ้น (Blackman *et al.*, 1992)

ต่อมามีรายงานของนักวิจัยที่สนับสนุนว่าเมื่อพืชอยู่ภายใต้สภาวะแล้งนั้นจะมีการสะสมซูโครสมากกว่าน้ำตาลตัวอื่นๆ เช่น Tyankova (1980) ได้ทดลองเด็ดใบยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L.) มาเก็บไว้ในจานเพาะเชื้อ โดยมีชุดเปรียบเทียบคือใบที่ให้ความชุ่มชื้นตลอดเวลา 72 ชั่วโมง เริ่มทดสอบเมื่อใบมีน้ำหนักลดลง 40% ของน้ำหนักเริ่มต้น พบว่าปริมาณของสารอื่นๆ เช่น โพรลีน y-amino butyric acid และ threonine เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแตกต่างจากปริมาณของ glucose และ fructose และพบว่าซูโครสมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในเวลา 1 ชั่วโมง นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของซูโครสยังคล้ายคลึงกับระบบการเคลื่อนที่ (dynamics) ของโพรลีน y-amino butyric acid และ threonine อีกด้วย และ Muller และคณะ (1997) รายงานว่ามีการเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรทที่ละลายน้ำได้ (soluble carbohydrate) หลายชนิดเช่น sucrose raffinose galactose glucose fructose และ inositol เมื่อพืช 3 ชนิดคือ *Ramonda nathaliae* Panc.&Petrov, *R. myconi* (L.) Reichen และ *Hgberlea rhodopesis* Friv ในวงศ์ Gesneriaceae อยู่ใต้สภาวะขาดน้ำ พบว่าซูโครสมีการสะสมเพิ่มขึ้นในปริมาณมากถึง 70.20 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ใน *R. myconi* รองลงมาคือ *H. rhodopesis* และ *R. nathaliae* มีซูโครส 56.90 และ 52.60 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ในขณะที่คาร์โบไฮเดรทที่ละลายน้ำได้ตัวอื่นมีปริมาณลดลงมาอยู่ในช่วง 8.20 ถึง 0.40 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย