

ปัจจัยที่เหมาะสมในการตรวจวัดการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของ
หญ้ารูซี่ (*Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C.M. Evrard) Crins) ในสภาพเครียดจากการขาดน้ำ

Appropriate factors in electrolyte leakage measurement of ruzi grass
(*Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C.M. Evrard) Crins) under drought stress

มัทนภรณ์ ใหม่คามิ (Mattanaporn Maikami)* มาลี ณ นคร (Malee Na Nakorn)**

ศรีสม สุวรรณวงศ์ (Srisom Suwanwong)**

บทคัดย่อ

การวัดการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ (electrolyte leakage) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้บ่งบอกถึงความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิดจากภาวะเครียดจากการขาดน้ำ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดกรองพืชทนแล้งได้ แต่จำเป็นต้องศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการปฏิบัติ ดังนั้นจึงศึกษาการตอบสนองต่อสภาวะเครียดจากการขาดน้ำเมื่อชักนำด้วย PEG-6000 ในหญ้ารูซี่ (*Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C.M. Evrard) Crins) ที่มีระดับการทนแล้งแตกต่างกัน 2 โคลน คือ โคลน 16 และ 17 โดยโคลน 17 ทนแล้งได้มากกว่า โคลน 16 ซึ่งวิธีการมี 3 ขั้นตอนดังนี้ (1) washing เพื่อกำจัดสารต่างๆที่ผิวใบ และเซลล์ที่เสียหายบริเวณรอยตัด โดยวัดค่าอิเล็กโทรไลต์ที่ 0 15 30 45 60 75 และ 90 นาที (2) dehydration เพื่อชักนำให้ใบหญ้ารูซี่ขาดน้ำในช่วงเวลา 0.5 1 2 4 10 16 และ 24 ชั่วโมง โดยใช้ PEG-6000 ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ และ (3) rehydration ใช้เวลา 0 1 2 4 12 และ 24 ชั่วโมงเพื่อให้ใบคืนน้ำกลับ จากนั้นนำค่าที่ได้จากทั้ง 3 ขั้นตอนไปคำนวณค่าการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหญ้ารูซี่ พบว่าหญ้ารูซี่ทั้ง 2 โคลนมีระยะเวลาที่เหมาะสมในการล้าง 15 นาที โดยใช้ PEG-6000 ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อชักนำให้ใบหญ้ารูซี่อยู่ในสภาวะขาดน้ำ และขั้นตอนสุดท้ายในการให้ใบคืนน้ำกลับควรใช้เวลา 2 ชั่วโมง

ABSTRACT

The degree of cell membrane injury induced by water stress could be easily estimated through measurements of electrolyte leakage from the cells. The electrolyte leakage has been recommended as a valuable standard for screening of stress resistant cultivars. However measurements of electrolyte leakage must be use in an appropriate procedure. Therefore, the responses to drought stress of leaf tissues in two clones of ruzi (*Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C.M. Evrard) Crins) were induced by using PEG-6000 solution. These two clones were no. 17 and no. 16 which no.17 is more tolerant than no. 16. The 1st step of the procedure is a washing treatment to remove solutes from both leaf surfaces and cells damaged caused by cutting. Electrical conductivity (EC) of the same sample was measured at various washing times (0, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 min). The 2nd step is a dehydration treatment to find an optimum stress period (0.5, 1, 2, 4, 10, 16 and 24 h) and concentration of PEG-solution (0, 10, 20, 30% PEG-6000) for stress induction. The 3rd step is a rehydration treatment to find timing for recovery (0, 1, 2, 4, 12 and 24 h). All data were used to evaluate electrolyte leakage. The results showed that the washing period for removing solution was 15 min, the dehydration period should be induced by using 30% PEG-6000 for 2 h and the rehydration period should be recovered for 2 h.

คำสำคัญ: การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ หญ้ารูซี่ ความทนแล้ง

Key Words: electrolyte leakage, ruzi grass, drought tolerance

* มหบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พญกษศาสตร์) สาขาพญกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพญกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทนำ

หญ้ารูซี่ (*Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C.M. Evrard) Crins ชื่อพ้อง *Brachiaria ruziziensis* R. Germ. and C.M. Evrard) เป็นหญ้าอาหารสัตว์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ มีการเจริญเติบโตเร็ว แตกกอดี นอกจากนั้นมีความสามารถทนแล้งได้พอสมควร แต่มีข้อเสียเล็กน้อยคือ มีระยะพักตัวในช่วงฤดูแล้ง แม้ว่าจะมีการให้น้ำและใส่ปุ๋ยอย่างเต็มที่ก็ไม่สามารถเพิ่มผลผลิตของหญ้าในช่วงฤดูแล้งได้ ทำให้ขาดแคลนอาหารหยาบคุณภาพดีในช่วงฤดูแล้ง (กรมปศุสัตว์, 2545; สายพันธ์, 2547) จึงต้องมีการคัดเลือกพันธุ์หญ้ารูซี่ให้ทนสภาพแล้งได้มากขึ้น

การคัดเลือกพืชสายพันธุ์ทนแล้งโดยการใช้สารออสโมติก (osmoticum) บางชนิด เช่น โพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol, PEG) แมนนิทอล (mannitol) และซูโครส (sucrose) โดยสารเหล่านี้จะไปลด osmotic potential ของสารละลายที่อยู่ล้อมรอบเซลล์พืช ทำให้เซลล์อยู่ในสภาพที่ขาดน้ำ (Bressan *et al.*, 1981) เป็นวิธีการที่น่าสนใจ เนื่องจากการคัดเลือกพืชที่ทนต่อสภาพแห้งแล้งจากการขาดน้ำภายใต้สภาพธรรมชาติเป็นกระบวนการที่ใช้เวลานาน และขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ เมื่อพืชเกิดการขาดน้ำจะส่งผลต่อเชื้อหุ้มเซลล์เป็นลำดับแรก โดยทำให้ความสามารถในการเลือกผ่านลดลง จึงทำให้เกิดการรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ (Jones *et al.*, 1981; Matos *et al.*, 2002) ซึ่งการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ในภาวะขาดน้ำที่ชักนำโดย PEG มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของพืชในสภาพแปลงที่ขาดน้ำด้วย เพราะฉะนั้นอาจใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกพันธุ์ที่ทนแล้งของพืชไร่หลายๆชนิด (Bajji *et al.*, 2002) การตรวจสอบค่าการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ washing เป็นการล้างในเวลาที่เหมาะสมเพื่อกำจัดเซลล์ตาย และสารต่างๆที่ผิวใบ

จากนั้นทำการ dehydration เพื่อชักนำให้ใบอยู่ในสภาพขาดน้ำในระยะเวลา และความเข้มข้นของสารออสโมติกที่เหมาะสม และขั้นตอนสุดท้ายเป็นการ rehydration เพื่อให้ใบดูดน้ำกลับในระยะเวลาที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามปัจจัยที่เหมาะสมของการตรวจสอบใบขึ้นอยู่กับสาม จะแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิดจึงควรมีการศึกษา ก่อน เพื่อนำวิธีดังกล่าวไปใช้ในการคัดเลือกหญ้ารูซี่สายพันธุ์ทนแล้งต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การหาการนำไฟฟ้า (electrical conductivity; EC) ของสารละลายที่แช่ชิ้นส่วนใบเพื่อประเมินการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบหญ้ารูซี่ แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนคือ washing dehydration และ rehydration โดยนำใบหญ้ารูซี่ใบบนสุดที่มีแผ่นใบแผ่เต็มที่ จากโคลนที่มีความทนแล้งแตกต่างกัน จากการประเมินด้วยค่าความเข้มข้นของ PEG-6000 ที่ทำให้หญ้ารูซี่ตายร้อยละ 50 ของชุดควบคุม (LD₅₀) ในโคลน 17 มีค่า 31.37 %PEG ซึ่งมีระดับความทนแล้งมากกว่าโคลน 16 ที่มีค่า LD₅₀ เป็น 18.08 %PEG (จากการศึกษาเบื้องต้นไม่ได้แสดงข้อมูล) นำมาตัดให้มีขนาดประมาณ 1 ตร.ซม. โดยไม่มีเส้นกลางใบ ทำ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 10 ชิ้นส่วน เพื่อนำไปใช้ในการทดลองที่ 1 และ 2 ตามวิธีการของ Bajji *et al.* (2002)

1. การหาช่วงเวลาที่เหมาะสม สำหรับกำจัดสารต่างๆที่ผิวใบและเซลล์ที่ตายขณะตัด

ตัดใบหญ้ารูซี่ให้ได้ขนาดแล้วชั่งน้ำหนักทันที จากนั้นนำไปแช่ใน deionized water ปริมาตร 20 มิลลิลิตร วางบนเครื่องเขย่า (100 rpm) ที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดค่า electrical conductivity (EC) อย่างต่อเนื่องในตัวอย่างเดิมทุกๆ 15 นาที เป็นเวลา 90 นาที (0 15 30 45 60 75 และ 90 นาที) เพื่อหาความแตกต่างของค่า EC ทุกๆ 15 นาที ดังสมการ

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

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

2. การหาระยะเวลาและความเข้มข้นของ PEG ที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้ใบอยู่ในภาวะขาดน้ำ และระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อให้ใบดูดน้ำกลับ

2.1 การหาความเข้มข้นของ PEG ที่เหมาะสมในการชักนำให้ใบอยู่ในภาวะขาดน้ำ และระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อให้ใบดูดน้ำกลับ

นำชิ้นส่วนใบที่ตัดแล้วล้างใน deionized water ปริมาตร 20 มิลลิลิตร 15 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ใน PEG ที่ความเข้มข้น 0 10 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในที่มีด หลังจากนั้นนำไปผ่านการแช่ PEG มาล้างด้วย deionize water 3 ครั้ง แล้วนำชิ้นส่วนใบแช่ใน deionized water ปริมาตร 6 มิลลิลิตรเป็นเวลา 0 1 2 4 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปต้ม เพื่อให้เยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมสภาพแล้ววัด EC ที่อุณหภูมิห้อง คำนวณหาปริมาณการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ดังกล่าว

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

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

2.2 การหาเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้พืชอยู่ในสภาพขาดน้ำด้วย PEG

โดยนำชิ้นส่วนใบหน่อรูซี่ที่ตัดแล้วล้างใน deionized water ปริมาตร 20 มิลลิลิตร 15 นาที จากนั้นนำชิ้นส่วนใบมาแช่ใน PEG ที่ความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ และที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลอง 2.1 นาน 0.5 1 2 4 10 16 และ 24 ชั่วโมง ในที่มีด ล้างด้วย deionized water 3 ครั้ง จากนั้นแช่ชิ้นส่วนใน deionize

water ปริมาตร 6 มิลลิลิตร วัดค่า EC ทันที หลังจากนั้นวัด EC_f ที่เวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำชิ้นส่วนใบไปต้ม เพื่อให้เยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมสภาพ วัด EC_i ที่อุณหภูมิห้อง และคำนวณหาปริมาณการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ดังกล่าว

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

โดย EC_i คือค่า EC ที่เวลา 0 นาที EC_f คือค่า EC ที่ระยะเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมง และ EC_i คือค่า EC ของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เสื่อมสภาพแล้ว คำนวณเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า elactrolyte leakage ด้วยวิธี LSD-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

1. การหาช่วงเวลาที่เหมาะสม สำหรับกำจัดสารต่างๆ ที่ผิวใบและเซลล์ที่ตายขณะตัด

จากการวัดค่า EC ทุกๆ 15 นาที เป็นเวลา 90 นาที พบว่าโคลน 16 และโคลน 17 มีค่า EC ที่ 15 นาทีแรกที่สูง เป็น $62.23 \mu\text{s.cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ และ $83.14 \mu\text{s.cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ตามลำดับ จากนั้นที่ 30 นาทีมีค่าลดลง โดยโคลน 17 ค่า EC ลดลงอย่างชัดเจน ในขณะที่โคลน 16 ค่า EC ลดลงเล็กน้อย ในขณะที่ 60 นาทีโคลน 16 และโคลน 17 มีค่า EC เพิ่มขึ้นอีกครั้ง เป็น $37.06 \mu\text{s.cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ และ $93.11 \mu\text{s.cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ตามลำดับ และที่ 75 และ 90 นาทีหน่อรูซี่ทั้ง 2 โคลนมีค่า EC ลดลง (ภาพที่ 1) จากการรั่วของสารละลายจากเนื้อเยื่อพืชที่แช่ใน deionized water ช่วง 15 นาทีแรกที่วัดได้ ส่วนใหญ่มาจากบริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ เซลล์ที่ตายขณะตัด รวมทั้งสารต่างๆ ที่ผิวใบ สำหรับ EC ที่เพิ่มขึ้นที่ 60 นาทีนั้นอาจเกิดจากการรั่วของสารละลายจากไซโตพลาสซึมหรือแวคิวโอลของเซลล์ที่ได้รับการเสียหายจาก hypotonic stress (Ehwal et al., 1984; Prasil and Zamecnik, 1998) ทั้งนี้เนื่องจากการรั่วของสารผ่านพลาสมาเมมเบรนหรือโทโนพลาสต์เกิดขึ้นช้ากว่าการรั่วออกจากช่องว่างระหว่างเซลล์ หรือเซลล์ที่ตายขณะตัดดังที่กล่าวมาข้างต้น แต่จุดประสงค์

ของขั้นตอนนี้คือ การหาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับกำจัดสารต่างๆ ที่ผิวใบและเซลล์ตายขณะตัด (Bajji *et al.*, 2002) ซึ่งจากผลการทดลอง โคลน 16 ควรใช้เวลา 30 นาที ส่วนโคลน 17 อาจจะต้องใช้เวลา 15 นาที จึงทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการล้าง 15 และ 30 นาที ในการศึกษาระยะเวลา และความเข้มข้นของ PEG ที่เหมาะสมเพื่อชักนำให้ใบอยู่ในภาวะขาดน้ำ และระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อให้ใบดูดน้ำกลับ พบว่าให้ผลที่มีแนวโน้มเหมือนกัน (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ดังนั้น 15 นาทีจึงเป็นระยะเวลาที่เพียงพอสำหรับการใช้ล้างใบหนักรูซี่

2. การหาความเข้มข้นของ PEG ที่เหมาะสมในชักนำให้ใบอยู่ในภาวะขาดน้ำ และระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อให้ใบดูดน้ำกลับ

สำหรับการชักนำให้ใบหนักรูซี่ขาดน้ำ พบว่าค่า EL ของใบหนักรูซี่โคลน 16 และ 17 ที่แช่ใน PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกับที่แช่ใน PEG ความเข้มข้น 0-20 เปอร์เซ็นต์ อย่างชัดเจนทุกช่วงเวลา (ภาพที่ 2) พิจารณาที่ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่ชิ้นส่วนใบเป็นระยะเวลา 1 2 4 8 และ 24 ชั่วโมง หนักรูซี่ทั้ง 2 โคลน มีค่า EL ความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 1) โดยโคลน 16 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งต่ำ เมื่อใช้เวลาในการดูดน้ำกลับ 2 ชั่วโมงมีค่า EL เฉลี่ย 5.32 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มขึ้นเป็น 6.60 เปอร์เซ็นต์เมื่อแช่ถึง 24 ชั่วโมง ส่วนโคลน 17 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งมากกว่า มีค่า EL คงที่ในระหว่าง 1 และ 2 ชั่วโมง โดยมีค่า EL เฉลี่ย 3.29 และ 3.11 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 6.90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแช่ใบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเมื่อแช่ชิ้นส่วนใบเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง มีความแตกต่างของค่า EL ระหว่าง 2 โคลนมากกว่าที่เวลาอื่น ดังนั้นเวลา 2 ชั่วโมงจึงเป็นเวลาเหมาะสมในขั้นตอนการดูดน้ำกลับ เมื่อใช้ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับใช้

ในการดูดน้ำกลับของพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน และขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุล และความเข้มข้นของ PEG ที่ใช้ชักนำให้พืชเกิดความเครียด (Agarie *et al.*, 1995) ตัวอย่างเช่นในข้าวสาลี (*Triticum durum* Desf.) ใช้เวลา 4 ชั่วโมงในการดูดน้ำกลับ หลังจากแช่ในสารละลาย PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (Bajji *et al.*, 2002)

3. การหาเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้พืชอยู่ในสภาพขาดน้ำด้วย PEG-6000

เมื่อชักนำให้ใบหนักรูซี่อยู่ในสภาพขาดน้ำด้วย PEG ความเข้มข้น 0 และ 30 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นให้ใบหนักรูซี่ดูดน้ำกลับ 2 ชั่วโมง พบว่า ที่ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์มีค่า EL มากกว่าที่ความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3) และค่า EL เฉลี่ยจากชิ้นส่วนใบทั้งสองโคลนที่แช่ใน PEG 30 เปอร์เซ็นต์ในแต่ละชั่วโมงจะมีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2) แต่เมื่อพิจารณาค่า EL ของโคลน 16 และ 17 เมื่อแช่เป็นเวลา 2 และ 4 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเชื้อหุ้มเซลล์เกิดความเสียหายอย่างชัดเจน แต่เมื่อแช่เป็นเวลา 2 ชั่วโมงทำให้ค่า EL ทั้งสองโคลนแตกต่างกันมากที่สุด เมื่อแช่ใบโคลน 16 เป็นเวลา 10 ถึง 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 3) ค่า EL เพิ่มขึ้นแต่ค่อนข้างคงที่ ทั้งนี้อาจเกิดจากการปรับตัวของเชื้อหุ้มเซลล์ทำให้การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ไม่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (Bajji *et al.*, 2002) นอกจากนั้น โคลน 17 ซึ่งเป็นโคลนที่ทนแล้งมีค่า EL (4.04 %) ต่ำกว่าโคลน 16 (3.00 %) อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับหลายการทดลองที่ใช้ค่าการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์เป็นตัวชี้วัดความทนแล้งในพืชชนิดอื่น เช่น ใน *Oryza longistaminata* (Liu *et al.*, 2004) และข้าวโพด (*Zea mays* L.) (Kolarovic *et al.*, 2006) โดยพบว่าพันธุ์ที่ทนแล้งมีการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์น้อยกว่าพันธุ์ที่ไม่ทนแล้ง นอกจากนั้น Bajji *et al.* (2002) กล่าวว่า การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ในภาวะขาดน้ำมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของข้าวสาลี

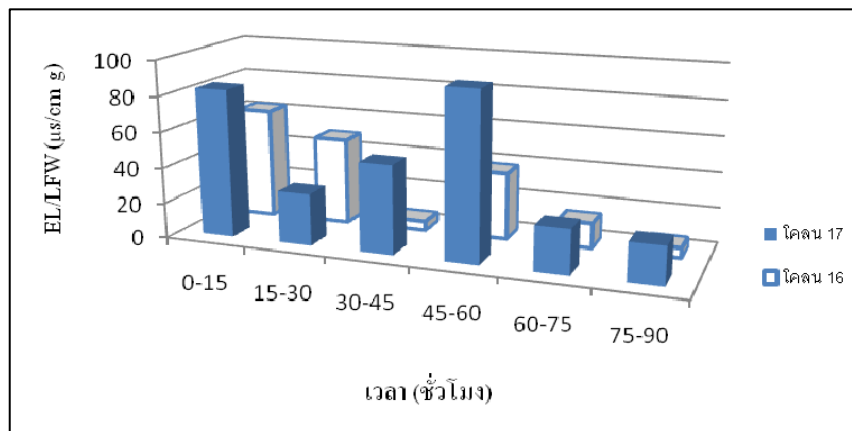
(*Triticum Triticum durum* Desf) ในสภาพแปลงที่ขาดน้ำ ดังนั้นจึงอาจใช้ค่าการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์เป็นเกณฑ์ในคัดเลือกพันธุ์โคลนที่ทนแล้งได้

สรุปผลการวิจัย

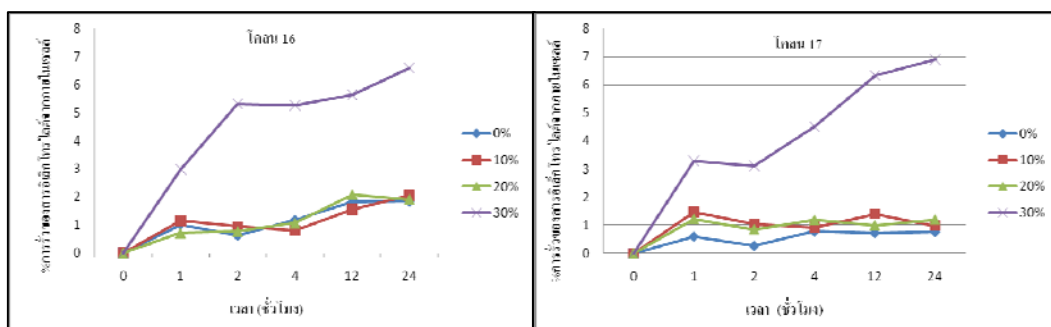
การตรวจสอบค่าการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ washing เป็นการล้างในเวลาที่เหมาะสมเพื่อกำจัดเซลล์ตาย และสารต่างๆที่ผิวใบ จากนั้นทำการ dehydration เพื่อชักนำให้ใบอยู่ในสภาพขาดน้ำในระยะเวลา และความเข้มข้นของสารออสโมติกัมที่เหมาะสม และขั้นตอนสุดท้ายเป็นการ rehydration เพื่อให้ใบดูดน้ำกลับในระยะเวลาที่เหมาะสม

1. การล้างเพื่อกำจัดเซลล์ตาย และสารต่างๆที่ผิวใบของพันธุ์ทั้งสองโคลน ควรใช้เวลาในการล้าง 15 นาที เนื่องจากเป็นช่วงที่ค่าอิเล็กโทรไลต์ที่วัดได้ส่วนใหญ่มาจากเซลล์ที่ตายขณะตัด และสารต่างๆที่ผิวใบ

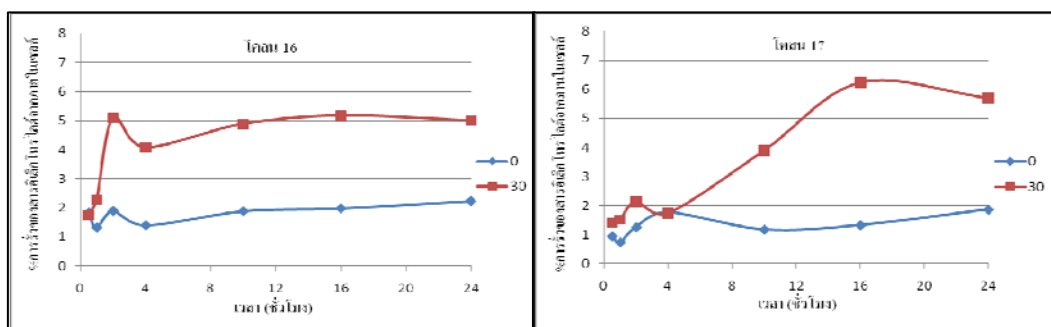
2. การใช้ PEG-6000 ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในการชักนำให้ใบพันธุ์ที่อยู่ในสภาพขาดน้ำ และใช้เวลา 2 ชั่วโมงในการให้ใบดูดน้ำกลับ ความเข้มข้นของ PEG และระยะเวลาดังกล่าวเป็นความเข้มข้น และเวลาที่เหมาะสมเนื่องจากทำให้การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ใบของพันธุ์ มีความแตกต่างระหว่างโคลน และความสัมพันธ์กับระดับการทนแล้งของทั้ง 2 โคลน



ภาพที่ 1 ค่าการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากชิ้นส่วนไบโพลีเมอร์ทุกๆ 15 นาที เป็นเวลา 90 นาที



ภาพที่ 2 การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของไบโพลีเมอร์ ซึ่งช่วงการดูดน้ำกลับของตัวอย่างควบคุม และที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 10 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในน้ำไร้ออนไนท์มืดเป็นเวลา 1 2 4 12 และ 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 3 การรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของไบโพลีเมอร์ที่ได้รับ PEG ความเข้มข้น 0 และ 30 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 0.5 1 2 4 10 และ 16 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในน้ำไร้ออนไนท์มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ตารางที่ 1. การร่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบเหี่ยวที่ได้อายุ 30 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปแช่ในน้ำไร้ไอออนในที่มีดเป็นเวลา 1 2 4 12 และ 24 ชั่วโมง

ช่วงเวลาการแช่น้ำกลับ (ชั่วโมง)	%การร่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์		ค่าเฉลี่ย ^{1/}
	โคลน 16	โคลน 17	
1	2.98	3.29	3.13 a
2	5.32	3.11	4.22 ab
4	5.26	4.51	4.89 bc
12	5.64	6.34	5.99 cd
24	6.60	6.90	6.75 d
ค่าเฉลี่ย ^{ns}	6.97	6.86	
CV (%)	22.3		

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

ตารางที่ 2. ผลของระยะเวลาที่ได้ PEG ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ต่อการร่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ของใบเหี่ยวที่แช่เป็นเวลา 0.5 1 2 4 10 และ 16 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในน้ำไร้ไอออนในที่มีดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ช่วงเวลาที่ได้รับ PEG (ชั่วโมง)	%การร่วของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์		ค่าเฉลี่ย ^{1/}
	โคลน 16	โคลน 17	
0	1.75	1.41	1.57 a
1	2.28	1.52	1.90 a
2	5.08	2.13	3.61 ab
4	4.09	1.74	2.91 a
10	4.89	3.89	4.39 b
16	5.17	6.23	4.78 b
24	5.00	5.70	5.45 c
ค่าเฉลี่ย ^{2/}	4.04 y	3.00 x	
CV (%)	34.6		

^{1/}, ^{2/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในลำดับเดียวกัน (a, b; x, y) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2545.
หญ้ารัฐ. โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตร
แห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.
- สายันท์ ทัดศรี. 2547. พืชอาหารสัตว์เขตร้อน.
สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ.
- Agarie S., N. Hanaoka, F. Kubota, W. Agata and B.
Kaufman. 1995. Measurement of cell
membrane stability evaluated by electrolyte
leakage as a drought and heat tolerance test in
rice (*Oryza sativa* L.). Journal of The Faculty
of Agriculture Kyushu University. 40: 233–
240.
- Bajji, M., J.M. Kinet and S. Lutts. 2002. The use of
the electrolyte leakage method for assessing
cell membrane stability as a water stress
tolerance test in durum wheat. Plant Growth
Regulation. 36(1): 61-70.
- Bressan, R. A., P. M. Hasegawa and A. K. Handa.
1981. Resistance of cultured higher plant
cells to polyethylene glycol-induced water
stress. Plant Science Letters. 21: 23-30.
- Ehwald, R., E. Richter and M. Schlangstedt. 1984.
Solute leakage from the isolated parenchyma
of *Allium cepa* and *Kalanchoe*
daigremontiana. Journal of Experimental
Botany. 35: 1095–1103.
- Jones, M.M., N.C. Turner and C.B. Osmond. 1981.
Mechanisms of drought resistance, pp. 15-
38. In L.G. Paleg and D. Aspinall, eds. The
Physiology and Biochemistry of Drought
Resistance in Plants. Academic Press,
Australia.
- Kocheva, K., P. Lambrev, G. Georgiev, V. Goltsev and
M. Karabaliyev. 2004. Evaluation of
chlorophyll fluorescence and membrane
injury in the leaves of barley cultivars under
osmotic stress. Bioelectrochemistry. 63: 121-
124.
- Kolarovic, L., M. Luxová and P. Valentovic. 2006.
Effect of osmotic stress in early stages of
ontogenesis on root respiration, growth, sugar
content, and cell injury in maize seedlings
differing in drought sensitivity. Journal of
Integrative Plant Biology. 48(7): 814-822.
- Liu L., R. Lafitte and D. Guan. 2004. Wild *Oryza*
species as potential sources of drought-
adaptive traits. Euphytica. 138: 149–161.
- Matos, M.C., P.S. Campos, J.C. Ramalho, M.C.
Medeira, M.I. Maia, J.M. Semedo, N.M.
Marques and A. Matos. 2002.
Photosynthetic activity and cellular integrity
of the andean legume (*Pachyrhizus*
ahipa (Wedd.) Parodi) under heat and water stress.
Photosynthetica. 40: 493-501.
- Pra's'il, I. and J. Za'mec'ni'k, 1990. Time course of
electrolyte leakage from various samples
killed by frost, liquid nitrogen or boiling.
Biologia Plantarum. 32: 77–80.