



โครงการ “การศึกษาผลของวอเตอร์สแตสที่ให้กับอ้อยใน
ระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ ต่อปริมาณการสะสมน้ำตาล การ
เปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลและระดับสรีรวิทยาของอ้อย”

โดย นางสาวสุดสวาสดี ดวงศรีไสย์และคณะ

15 กันยายน 2556

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาผลของวอเตอร์สเตสที่ให้กับอ้อยในระยะเวลาเจริญเติบโตต่าง ๆ ต่อปริมาณการ
สะสมน้ำตาล การเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลและระดับสรีรวิทยาของอ้อย

คณะผู้วิจัย สังกัด

1. นางสาวสุดสวาสดี ดวงศรีไสย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน
2. รศ.ดร.เรวัต เลิศฤทัยโยธิน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน
3. Dr.Raymond James Ritchie มหาวิทยาลัยซิดนีย์/Sydney University

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ.และสกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รูปแบบ Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MRG5380273

(รหัสโครงการ)

Project Title : การศึกษาผลของวอเตอร์สเตสที่ให้กับอ้อยในระยะเวลาเจริญเติบโตต่าง ๆ ต่อปริมาณการสะสมน้ำตาล การเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลและระดับสรีรวิทยาของอ้อย

Investigator : นางสาวสุดสวสดี ดวงศรีไสย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

E-mail Address : fscissw@ku.ac.th

Project Period : ทำสัญญา 1 ปี ตั้งแต่ 15 มิถุนายน 2553- 15 มิถุนายน 2554 (แต่ขอขยายโครงการถึง 15 สิงหาคม 2556)

ABSTRACT

Water is a vitally fundamental element for the chemical and biochemical processes supporting plant metabolism. However, some areas face the problem about water management, resulting in drought stress to plant. Drought is one kind of environmental stresses that can cause greatly reductions in yield. However, plants don't need a lot of water all the time. This study aimed to investigate the effect of water stress during sugarcane development on sucrose yield in order to gain the knowledge to find the good management for sugarcane growers. Moreover, It has been reported that water stress affects sugar accumulation in some plants. The objective of this study is to examine the effect of water stress on sucrose accumulation and physiological and molecular changes in sugarcane in order to determine what stage of sugarcane development can be induced by water stress to increase sugar accumulation to higher level.

In this study, 7 month-sugarcane and 10 month-sugarcane were treated with water stress. The level of water stress were divided into 4 groups ; control, 10 days no watering, 20 days no watering and 30 days no watering. At harvesting time, the physiological changes (such as the height, the number of internodes and the weight) and the values related with the sweetness of sugarcane (such as Brix, Pol and CCS) of each treatment were measured. The height and the weight of sugarcane of each treatment didn't differ significantly. But sugarcanes which were treated with 30 days no watering at 7 month-age have the smallest number of internodes, 14.33 internodes/plant, while the control plants have 21 internodes/plant. The value of Brix, Pol and CCS were affected by water stress. The lowest value of Brix , 10.14, was found in treatment with no watering 10 days at 7 month-age. While treatment with no watering 20 days at 7 month-age has the lowest value of Pol and CCS, 8.50 and 6.30 respectively. However, sugarcanes which were treated with water stress at 10 month old for 30 days showed similar value for Brix, Pol and CCS as those of control. This result suggested that we can reduce water use prior harvest for sugarcane without any effect on sugar yield. Moreover, the expression of Sucrose phosphate synthase (SPS) and cell wall invertase (CWI) were investigated. SPS and CWI were induced by water stress prior harvest. This suggested that SPS and CWI might involve in sugar accumulation in sugarcane.

Keywords : Water stress, Physiological changes, Brix, Pol, CCS, SPS, CWI, Gene expression, Sugarcane

บทคัดย่อ

น้ำเป็นปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญยิ่งที่จำเป็นต่อกระบวนการทางเคมีและชีวเคมีของเมแทบอลิซึมต่างๆ ของพืช อย่างไรก็ตามในบางพื้นที่ต้องประสบปัญหาเกี่ยวกับการจัดการน้ำทำให้เกิดความแห้งแล้งในพื้นที่ ขึ้น ความแห้งแล้งจัดเป็นความเครียดอย่างหนึ่งของพืชที่ส่งผลต่อการลดลงของผลผลิต อย่างไรก็ตามพืช ไม่ได้ต้องการใช้น้ำปริมาณมากตลอดอายุการเจริญเติบโต ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการศึกษาผลของวอเตอร์ สเตรสที่ให้แก่พืชในระยะการเจริญเติบโตช่วงต่างๆว่ามีผลต่อผลผลิต(ปริมาณน้ำตาลที่สะสมในลำอ้อย)หรือไม่ เพื่อนำความรู้มาใช้ในการออกแบบการให้น้ำแก่พืชที่ทำให้เกิดผลผลิตสูงสุดได้ โดยจะมีการศึกษาผลของ วอเตอร์สเตรสต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยา(ความสูง น้ำหนัก จำนวนปล้อง) และการเปลี่ยนแปลงทางโมเลกูลาร์ (การแสดงออกของยีนซูโครสฟอสเฟตซินเทสและยีนเซลล์วอลล์อินเวอร์เทส) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการให้วอเตอร์สเตรสแก่พืชในระยะการเจริญเติบโต 7 เดือนและ 10 เดือน ระดับ ความรุนแรงของวอเตอร์สเตรส แบ่งออกเป็น ชุดควบคุม (ให้น้ำสม่ำเสมอ) งดน้ำ 10 วัน งดน้ำ 20 วัน และงด น้ำ 30 วัน ทำการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาต่างๆหลังการเก็บเกี่ยว โดยพบว่าค่าน้ำหนัก และค่าความสูงและค่าจำนวนปล้องของแต่ละทรีทเมนต์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่พบว่าจำนวน ปล้องพบว่าในทรีทเมนต์ที่ทำการงดน้ำ 30 วันเมื่ออ้อยอายุ 7 เดือนมีค่าน้อยที่สุด คือ 14.33 ปล้องในขณะที่ ชุดควบคุมมีจำนวนปล้องมากที่สุด คือ 21 ปล้อง ค่าที่เกี่ยวข้องกับความหวาน (ค่าบrix ค่าโพล ค่าซีซีเอส) ได้รับผลกระทบจากวอเตอร์สเตรสเป็นอย่างมาก โดยพบว่าค่าบrixมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 10.14 ในทรีทเมนต์ที่ ทำการงดน้ำ 10 วันเมื่ออ้อยอายุ 7 เดือน ในขณะที่ค่าโพลและค่าซีซีเอสมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 8.50 และ 6.30 ตามลำดับในทรีทเมนต์ที่ทำการงดน้ำ 20 วันเมื่ออ้อยอายุ 7 เดือน อย่างไรก็ตามค่าซีซีเอสในทรีทเมนต์ที่ทำการ งดน้ำ 30 วันเมื่ออ้อยอายุ 10 เดือน(ก่อนการเก็บเกี่ยว)มีค่าไม่แตกต่างจากค่าซีซีเอสของกลุ่มควบคุมที่ ได้รับน้ำอย่างสม่ำเสมอ ผลการทดลองนี้แนะนำว่าเราสามารถทำการลดการให้น้ำแก่พืช 30 วันก่อนการ เก็บเกี่ยวได้โดยไม่มีผลกระทบต่อผลผลิต(ปริมาณน้ำตาลที่สะสมในลำอ้อย) นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษา การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงน้ำตาล (ยีนเซลล์วอลล์อินเวอร์เทส)และยีนที่สร้างน้ำตาลใน ลำอ้อย(ซูโครสฟอสเฟตซินเทส) พบว่าการแสดงออกของยีนทั้งสองเพิ่มมากขึ้นในทรีทเมนต์ที่ทำการงดน้ำ 30 วันเมื่ออ้อยอายุ 10 เดือน (ก่อนการเก็บเกี่ยว)เช่นกัน ผลการทดลองนี้เสนอแนะว่ายีนทั้งสองตัวนี้น่าจะ เกี่ยวข้องกับการสะสมน้ำตาลในลำอ้อย ถึงแม้ว่าในทรีทเมนต์อื่นๆไม่พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีนทั้ง สองก็ตาม อาจอธิบายได้ว่าเนื่องจากการสกัดสารพันธุกรรมจากเนื้อเยื่อพืชทำการหลังการเก็บเกี่ยว ดังนั้นใน ทรีทเมนต์ที่ได้รับสเตรสเมื่ออายุ 7 เดือน จึงมีการการแสดงออกของยีนใกล้เคียงกับชุดควบคุม เนื่องจาก หลังจากหมดช่วงการให้สเตรสแก่พืช อ้อยก็กลับมาได้รับน้ำปริมาณเท่าเดิมเหมือนชุดควบคุม

คำสำคัญ : วอเตอร์สเตรส การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา ค่าบrix ค่าโพล ค่าซีซีเอส ยีนเซลล์วอลล์อินเวอร์ เทส ยีนซูโครสฟอสเฟตซินเทส การแสดงออกของยีน อ้อย

Executive Summary

อ้อยถือเป็นพืชไร่ที่มีบทบาทสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก ซึ่งประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศผู้ส่งออกน้ำตาลจากอ้อยรายใหญ่ของโลกตามหลังประเทศบราซิลและประเทศออสเตรเลีย ปริมาณน้ำตาลที่ผลิตได้จากอ้อยนอกจากจะนำไปใช้เพื่อการบริโภคและการส่งออกแล้ว ยังมีความสำคัญต่อการผลิตเอทานอลเพื่อใช้ในผสมกับน้ำมันเบนซินหรือดีเซล เพื่อช่วยในการแก้ปัญหาคาขาดแคลนพลังงาน ในยุคน้ำมันแพงซึ่งปัจจุบันถือว่าอ้อยเป็นพืชหลักๆที่มีความสำคัญในการสร้างพลังงานทดแทน ดังนั้น ปริมาณน้ำตาลที่อ้อยสร้างได้ต่อตันที่เพิ่มขึ้นย่อมส่งผลต่อปริมาณการผลิตน้ำตาลของโรงงาน ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้และย่อมหมายถึงมูลค่าที่มากขึ้นของอ้อยนั่นเอง

ปัจจัยเรื่องน้ำจัดเป็นปัจจัยจำกัดที่สำคัญที่กำหนดอัตราการเจริญเติบโตของพืช ส่งผลถึงปริมาณผลผลิตที่จะเก็บเกี่ยวได้ในที่สุด ในการศึกษาครั้งนี้ศึกษาผลของวอเตอร์สเตรส(การให้ความเครียดเรื่องน้ำ/การงดน้ำ)ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา(ส่วนสูง น้ำหนัก จำนวนปล้อง ค่าความหวานต่างๆ ได้แก่ Brix, Pol, CCS) และทางโมเลกุลาร์ (การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน sucrose phosphate synthase และ cell wall invertase) โดยมีการให้อ้อยวอเตอร์สเตรสแก่อ้อยเมื่ออ้อยมีอายุได้ 7 เดือนและ 10 เดือน โดยมีความเครียด อยู่สามระดับ คือ งดน้ำ 10 วัน งดน้ำ 20 วัน และ งดน้ำ 30 วัน หลังการงดน้ำก็มีการให้น้ำปกติไปเรื่อยๆจนถึงระยะเก็บเกี่ยว ผลการทดลองพบว่าการงดน้ำแก่อ้อยไม่ทำให้ค่าส่วนสูง น้ำหนัก จำนวนปล้องของอ้อยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับอ้อยชุดควบคุมที่ได้รับน้ำสม่ำเสมอ แต่อ้อยวอเตอร์สเตรสมีผลอย่างยิ่งกับค่าความหวานของอ้อย เห็นได้จากค่า Brix, Pol และ CCS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทุกทรีทเมนต์ที่ได้รับวอเตอร์สเตรส โดยเฉพาะในอ้อยที่ได้รับวอเตอร์สเตรสในระยะ 7 เดือนมีค่าความหวานต่ำกว่าอ้อยในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ที่น่าสนใจคือในอ้อยที่ได้รับวอเตอร์สเตรสในระยะ 10 เดือนและทำการรดน้ำเป็นเวลา 30 วัน (ก่อนการเก็บเกี่ยว) พบว่ามีค่าความหวานไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับอ้อยชุดควบคุมที่ได้รับน้ำสม่ำเสมอมาตลอดการปลูก ส่วนการศึกษาเรื่องการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงน้ำตาลซูโครสเข้าสู่ลำอ้อย (cell wall invertase) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างน้ำตาลในอ้อย (sucrose phosphate synthase) พบว่าการแสดงออกสูงสุดในทรีทเมนต์ที่ได้รับวอเตอร์สเตรสในระยะ 10 เดือนและทำการรดน้ำเป็นเวลา 30 วัน (ก่อนการเก็บเกี่ยว) เช่นกัน ในขณะที่ทรีทเมนต์อื่นๆมีการแสดงออกที่ใกล้เคียงกัน แสดงว่าการให้ความเครียดเรื่องน้ำแก่อ้อยก่อนการเก็บเกี่ยวสามารถชักนำทำให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายน้ำตาลซูโครสและการสร้างน้ำตาลซูโครสมีการแสดงออกมากขึ้น

จากการทดลองสรุปได้ว่าการให้อ้อยวอเตอร์สเตรสแก่อ้อยควรให้ในระยะที่เหมาะสม ถ้าให้ในระยะที่ยังมีการเจริญเติบโตอยู่ อาจส่งผลกระทบทำให้การสะสมน้ำตาลในลำอ้อยลดลงได้ ช่วงเวลาที่ดีที่สุดที่ควรให้อ้อยวอเตอร์สเตรสแก่อ้อย คือ 30 วันก่อนทำการเก็บเกี่ยว เพราะถึงแม้จะไม่ได้ทำให้ปริมาณน้ำตาลที่สะสมมากกว่าในอ้อยชุดควบคุม แต่อย่างน้อยก็ทำให้มีการสะสมน้ำตาลในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการให้อ้อยวอเตอร์สเตรสก่อนการเก็บเกี่ยวจึงถือเป็นการประหยัดน้ำ เป็นการใช้ทรัพยากรน้ำให้คุ้มค่าและเกิดประโยชน์สูงสุดโดยไม่กระทบต่อผลผลิต

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ถูกนำไปใช้ในการผลิตน้ำตาลเพื่อการบริโภคภายในประเทศและส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศทำรายได้ให้แก่ประเทศไทยหลายหมื่นล้านบาทต่อปี น้ำตาลที่ผลิตจากอ้อยนอกจากจะถูกใช้เพื่อการบริโภคแล้ว ในยุคที่น้ำมันมีราคาแพง การแสวงหาพลังงานทดแทนจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง น้ำตาลจากอ้อยถูกนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลเพื่อใช้ผสมกับน้ำมันเบนซินเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับสินค้าเกษตรและลดการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงอีกด้วย

ดังนั้นปริมาณน้ำตาลที่อ้อยสร้างได้ต่อตันที่เพิ่มขึ้นย่อมส่งผลต่อปริมาณการผลิตน้ำตาลของโรงงาน ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ และย่อมหมายถึงมูลค่าที่มากขึ้นของอ้อยนั่นเอง

แม้ว่าประเทศไทยจะเป็นประเทศผู้ส่งออกน้ำตาลทรายอันดับต้นๆ แต่พบว่าต้นทุนการผลิตน้ำตาลของประเทศไทยสูงกว่าประเทศอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากผลผลิตต่อไร่และความหวาน (เปอร์เซ็นต์น้ำตาลต่อตันอ้อย) ต่ำ ทำให้ศักยภาพในการแข่งขันด้านต้นทุนและคุณภาพของน้ำตาลด้อยกว่าประเทศอื่นๆ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องมีการวิจัยเพื่อศึกษาปัจจัยและกลไกที่สามารถเพิ่มกระบวนการการสะสมน้ำตาลในอ้อยอย่างเร่งด่วน เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตต่อไร่และความหวานของอ้อยให้มากขึ้น

เนื่องจากมีรายงานว่าในพืชบางชนิดการได้รับ water stress มีผลต่อการสะสมน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น ในที่นี้จะศึกษาผลของน้ำ water stress ต่อการกระบวนการสะสมน้ำตาลและการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาในอ้อย เพื่อหาระยะเวลาและช่วงเวลาที่เหมาะสมในการให้ water stress แก่อ้อย แล้วทำให้อ้อยมีการสะสมน้ำตาลก่อนการเก็บเกี่ยวมากที่สุด ซึ่งอาจมีการนำความรู้นี้ไปต่อยอดให้กับเกษตรกรอ้อย ในการจัดโปรแกรมการให้ปริมาณน้ำที่เหมาะสมที่สามารถให้ผลผลิตสูงที่สุดได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของ water stress ต่อการสะสมน้ำตาลการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลและการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาต่างๆ ของอ้อย
2. เพื่อศึกษาว่าการให้ water stress ในระยะการเจริญช่วงใดของอ้อยที่สามารถชักนำให้เกิดการสะสมน้ำตาลในอ้อยมากที่สุด
3. เพื่อศึกษาว่าการให้ water stress แก่พืช ควรให้เป็นระยะเวลานานเท่าใดจึงจะดีที่สุด ที่สามารถชักนำให้เกิดการสะสมน้ำตาลในอ้อยมากที่สุด

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

อ้อยเป็นพืชไร่ที่ถูกจัดในกลุ่มของพืช C_4 ที่มีความสามารถในการสะสมน้ำตาลซูโครสถึงระดับ 650 mM (Welbaum and Meinzer, 1990) จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อการผลิตน้ำตาลเพื่อใช้ในการบริโภคและการสร้างพลังงานทดแทน ได้มีการศึกษากระบวนการสะสมน้ำตาลในอ้อยมาเป็นเวลาช้านาน ในหลายระดับ : การจำแนกและหาลักษณะจำเพาะของแต่ละยีนที่เกี่ยวข้องกับ sucrose pathway และการลำเลียงซูโครสภายในลำต้นพืช (Moore 1995; Moore, 2005), localization ของยีน (Casu et al., 2003 and Rae et al., 2005), การศึกษา transcriptome (Carson and Botha 2000; Carson and Botha 2002; Casu et al., 2004), และการศึกษาเอกภพวิทัศน์ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง (Lingle 1999; Rohwer and Botha 2001; Turner and Botha 2002; Hoepfner and Botha 2004) ตัวอย่างของการศึกษานี้ เช่น Lingle 1999 พบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สะสมในปล้องอ้อยขณะเจริญเติบโตมีความสัมพันธ์กับเอกภพวิทัศน์ที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์ sucrose phosphate synthase (SPS) แต่กลับพบว่าในปล้องที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ปริมาณน้ำตาลที่สะสมเพิ่มมากขึ้นไม่ได้มีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับน้ำตาลตัวใด จึงสนับสนุนสมมติฐานที่ว่าเอนไซม์ sucrose phosphate synthase (SPS) และ acid invertase (AIV) ทำหน้าที่สำคัญในการกำหนดความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่จะสะสมในปล้องที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้การสะสมน้ำตาลในปล้องอ้อยเพิ่มมากขึ้น เช่น การใช้ยากำจัดวัชพืช Fusilade Super (Fluazifop-butyl) เป็นตัวเร่งการสุกของอ้อย (Gronwald, 1991) และยังพบว่าการระบายน้ำออกจากไร่อ้อยก่อนการเก็บเกี่ยว สามารถเพิ่มปริมาณน้ำตาลในอ้อยได้อีกด้วย (Inman-Bamber and Smith, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ว่าพืช C_3 และ C_4 หลายชนิด เมื่อได้รับ water stress จะมีการสะสมสารประกอบโมเลกุลเล็กหลายชนิด เช่น น้ำตาล น้ำตาลแอลกอฮอล์ และกรดอะมิโนบางชนิดเพิ่มมากขึ้น (Lunn and Furbank, 1999; Lawlor and Cornic, 2002) ซึ่งมีการสันนิษฐานว่าการขาดน้ำไปยับยั้งการเจริญเติบโตและเร่งกระบวนการแก่ของพืช ทำให้มีการสลายน้ำตาลในใบที่แก่แล้วเคลื่อนย้ายมาสะสมในปล้อง อย่างไรก็ตามก็ดียังไม่มีการศึกษาในรายละเอียดว่าอ้อยควรได้รับ water stress ในระยะใดของการเจริญเติบโตดีที่สุด และระยะเวลาที่เหมาะสมของการทรมาน water stress ควรเป็นกี่วัน ที่จะได้ผลชักนำให้เกิดการสะสมน้ำตาลมากที่สุด ซึ่งจะได้ทำการศึกษาวิจัยในครั้งต่อไป

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้จะศึกษาเปรียบเทียบผลของ water stress ที่ให้กับอ้อยในระยะต่างๆต่อปริมาณน้ำตาลที่สะสมในอ้อยในระยะก่อนการให้ทรีทเมนต์ หลังการให้ทรีทเมนต์ และหลังเก็บเกี่ยว นอกจากนี้จะศึกษาหาช่วงเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่ควรให้ water stress แก้อ้อย และระยะเวลาความยาวนานของ water stress ที่เหมาะสม ที่สามารถชักนำให้อ้อยมีการสะสมน้ำตาลในปล้องมากที่สุด นอกจากนี้จะเปรียบเทียบลักษณะทางกายภาพอื่นๆของแต่ละทรีทเมนต์ แต่ละกลุ่มทดลอง เพื่อศึกษาเพิ่มเติมว่าการให้ water stress ในแต่ละช่วงของการเจริญเติบโต มีผลต่อผลผลิตและการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของอ้อยอย่างไรบ้าง เพื่อเชื่อมโยงความรู้เพื่อนำมาอธิบายความสัมพันธ์และกลไกของ water stress กับปริมาณน้ำตาลที่สะสมในอ้อยก่อนการเก็บเกี่ยว

ทฤษฎี

กระบวนการสะสมน้ำตาลในอ้อย

อ้อยมีการลำเลียงน้ำตาลซูโครสซึ่งได้จากการสังเคราะห์แสงที่ใบส่งมายัง sink organ ต่างๆ เช่น ราก ลำต้น ยอด เป็นต้น แต่อ้อยมีลักษณะเฉพาะที่ต่างจากพืชชนิดอื่น คือ พบว่าที่ลำต้นของอ้อยมีการสะสมน้ำตาลซูโครสสูงมากกว่าพืชชนิดอื่นๆ บางพันธุ์มีการสะสมน้ำตาลซูโครสเกินกว่า 62% ของน้ำหนักแห้ง หรือ 25% ของน้ำหนักสด ซึ่งมีค่าความเข้มข้นใกล้เคียง 0.6-0.8 M (Bull and Glasziou, 1963; Welbaum and Meinzer, 1990) โดยพบการสะสมน้ำตาลซูโครสในปล้องที่แก่มากกว่าปล้องที่ยังอ่อนอยู่ กลไกที่ควบคุมการสะสมน้ำตาลในพืชนั้น พบว่ามีความสัมพันธ์กับความสามารถในการดูดสารอาหารมาสะสมของอวัยวะที่กำลังเจริญเติบโต (sink strength) การเพิ่มความแข็งแรงให้กับ sink strength ของอวัยวะใด จะทำให้มีการลำเลียงน้ำตาลมายังอวัยวะนั้นๆมากยิ่งขึ้น ซึ่งน้ำตาลสุทธิที่เหลือจากการใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมก็จะถูกเก็บสะสมไว้ในอวัยวะนั้นๆต่อไป การเพิ่มความแข็งแรงให้กับ sink strength อาจทำได้โดย เช่น การให้ปุ๋ยภายนอกใดๆที่มีผลทำให้การเจริญของใบอ่อน (immature leaf) ลดลง ทำให้ราก ผล หรือ ลำต้น กลายเป็น sink strength ที่แข็งแรงขึ้น มีความสามารถในการดึงดูดการลำเลียงน้ำตาล (phloem unloading) มายังอวัยวะเหล่านี้มากขึ้น

Water stress

จัดเป็น abiotic stress ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยทั่วไป water stress มักหมายถึงสภาวะความเครียดของพืชที่เกิดจากการขาดน้ำในระยะเวลาหนึ่งๆ ซึ่ง water stress นี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางสรีรวิทยาหลายอย่าง เช่น เกิดการปิดของปากใบ เพื่อลดการคายน้ำ อัตราการสังเคราะห์แสงลดลง ในสภาวะที่พืชขาดน้ำ ความเต่งของเซลล์ลดลง กระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นพืชจึงมีการปรับตัวเพื่อที่จะสามารถอยู่รอดได้โดยกลไกหนึ่งคือการเพิ่มการ

สะสมตัวทำละลายโมเลกุลเล็ก เช่น น้ำตาล และกรดอะมิโนต่างๆ ซึ่งการสะสมตัวทำละลายเหล่านี้ ทำให้ค่า osmotic potential ของเซลล์ลดลง ซึ่งสันนิษฐานว่าอาจมีช่วยให้เซลล์ของใบที่เหี่ยวสามารถกลับมาเต่งและทำหน้าที่ได้เหมือนเดิมหลังจากได้รับน้ำตามปกติอีกครั้ง เรียกการปรับตัวแบบนี้ว่า Osmotic adjustment นอกจากนี้ยังพบว่าในพืชที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว (mature) เช่น ต้นฝ้าย จะตอบสนองต่อ water stress โดยเร่งกระบวนการ senescence ในใบ ซึ่งการปรับตัวแบบนี้ เรียกว่า Leaf area adjustment ซึ่งเป็นอีกหนึ่งกลไกเพื่อลดพื้นที่ใบและการหายใจ ในขณะที่มีน้ำจำกัด และนอกจากนี้เนื่องจากรากมีความไวในการตอบสนองต่อ น้อยกว่ายอด ทำให้อัตราส่วนการเติบโตของ ราก/ยอด เพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้มีการเคลื่อนย้ายสารอาหารไปยังรากและลำต้นมากขึ้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำความรู้จากงานวิจัยที่ได้ไปช่วยเพิ่มผลผลิตให้กับเกษตรกรชาวไร่อ้อย โดยทราบระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะใช้ water stress treatment เพื่อเพิ่มการสะสมน้ำตาลในอ้อย
2. สามารถนำความรู้ที่ได้ ไปต่อยอด ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปัจจัยร่วมอื่นๆที่สามารถเพิ่มการสะสมน้ำตาลในอ้อยได้

วิธีวิจัย

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

จากความรู้เรื่องการปรับตัวของพืชต่อ water stress โดยมีการสะสมตัวทำลาย เช่น น้ำตาล และกรดอะมิโน ในเซลล์เพิ่มมากขึ้น นำไปสู่แนวความคิดที่จะใช้ความรู้ทางสรีรวิทยาเพื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลที่สะสมในลำอ้อย และนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของผลผลิตของอ้อยต่อไป แต่อย่างไรก็ดีการให้ water stress ในช่วงการเจริญเติบโตที่ต่างกัน น่าจะมีผลต่อการสะสมน้ำตาลในปล้องอ้อยต่างกัน นอกจากนี้ระยะเวลาของการให้ water stress ย่อมมีผลต่อความรุนแรงของสภาวะเครียดของต้นพืชต่างกันด้วย เพราะถ้าให้ water stress นานเกินไป อาจทำให้พืชตายได้ หรือถ้าให้ water stress น้อยเกินไป ก็เป็นการใช้ความสามารถของพืชไม่เต็มประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องทำการทดสอบหาระยะเวลาจำนวนวัน และช่วงการเจริญเติบโตที่เหมาะสมที่เมื่อได้รับ water stress แล้ว ทำให้เกิดการสะสมน้ำตาลในลำอ้อยมากที่สุด นอกจากนี้การทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลงค่า water potential ค่าความชื้นในอากาศ และการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสรีรวิทยาอื่นๆ เช่น ความสูงของต้น พื้นที่ใบ จำนวนใบต่อต้น จะเป็นประโยชน์ในการใช้ประกอบการวิเคราะห์กลไกที่เป็นไปได้เพื่อใช้อธิบายผลของ water stress ต่อปริมาณการสะสมน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นในอ้อยต่อไป

สมมติฐาน

ถ้าให้ water stress แก่อ้อยในช่วงเวลาการเจริญเติบโต ในระยะเวลาที่เหมาะสม จะสามารถเพิ่มปริมาณการสะสมน้ำตาลในอ้อยได้

อุปกรณ์

1. พันธุ์อ้อยกำแพงแสน 01-12 ของศูนย์วิจัยและพัฒนาอ้อยและน้ำตาล
2. เครื่องมือที่ใช้เก็บข้อมูลสภาพอากาศ (data logger)
3. เครื่องมือที่ใช้เก็บข้อมูลความชื้นในดิน (Tensinometer)
4. เครื่องมือและสารเคมีที่ใช้วัดค่าที่เกี่ยวข้องกับความหวานในอ้อย บริกซ์ (Brix) โพล (Pol) และซีซีเอส (CCS)
5. เครื่อง Real-time PCR

วิธีการ

1. แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design จำนวน 3 ซ้ำ การศึกษาครั้งนี้ศึกษาสองปัจจัย คือ อายุอ้อยและจำนวนวันที่ทำการรดน้ำ โดยทำการศึกษาผลของการรดน้ำที่ให้แก่อ้อยในระยะ 7 เดือน และระยะ 10 เดือน ส่วนระดับของการรดน้ำแบ่งเป็น 4 ระดับ คือ รดน้ำปกติ รดน้ำ 10 วัน รดน้ำ 20 วัน และรดน้ำ 30 วัน

2. การปลูกอ้อย

เตรียมกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 80 เซนติเมตร นำท่อนพันธุ์มาสับเป็นท่อนยาว 30 cm แล้วนำไปปลูก โดยปลูก 3-5 ท่อนพันธุ์ต่อกระถาง ปลูกในโรงเรือนของศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุ์อ้อยและน้ำตาล สถาบันวิจัยและพัฒนากำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การรดน้ำ

วัดค่าความชื้นในดินทุกวันที่ 1, 5, 8, 11, 15, 18, 21, 25, 28 ของทุกเดือน การรดน้ำในชุดควบคุมรดวันเว้นวัน ส่วนกลุ่มทดลองจะแบ่งเป็น รดน้ำ 10 วัน รดน้ำ 20 วัน และรดน้ำ 30 วัน

4. การเก็บข้อมูล

4.1 เก็บข้อมูลด้านสรีรวิทยาโดยวัดค่าน้ำหนัก จำนวนข้อ ส่วนสูงของอ้อยหลังการเก็บเกี่ยวในต้นเดือนที่ 11

4.2 ค่าซีซีเอส ค่าบริกซ์ ค่าโพล

วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Sacchromat รุ่น NIR W2 ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาอ้อยและน้ำตาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

5. การวัดการแสดงออกของยีน

5.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ : โดยใช้ Trizol reagent

5.2 การสร้าง cDNA : โดยใช้ Superscript III 1st strand synthesis kit

5.3 การออกแบบ primer

โดยใช้เว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

gene	sequence	
	forward (5'-3')	reverse (5'-3')
Sucrose Phosphate Synthase (SPS)	AAGCACCAGGCAAGAAATAG	GGACGAGCAAGAGCAAGAAT
Cell wall Invertase (CWI)	GTTCTACCAGTACAACCCCAA	TTGATCCCAGTGTACAGGATC
Ubiquitin	CACTATTGACAATGTCAAGGC	TGGATCTTGGCCTTCACGTT

5.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค Real time PCR : โดยใช้ Express SYBR Greener qPCR supermix universal kit

วิธีการ

ผสม Master Mix ในอัตราส่วนต่างๆ ลงใน Tube strip ดังนี้ (ต่อ 1 Primer)

Super mix	10 μ L
10 μ M Forward primer	0.4 μ L
10 μ M Reverse primer	0.4 μ L
Rox Reference Dye	0.04 μ L
DEPC-treated water	8.16 μ L

จากนั้น เติม Template 1 μL และนำเข้าเครื่อง Real Time Quantitative PCR โดยตั้งค่าต่าง ๆ ดังนี้

Stage 1 50 °C 2 นาที

Stage 2 95 °C 2 นาที

Stage 3 - Step 1 95 °C 0.15 นาที

- Step 2 60 °C 1 นาที

Stage 4 - Step 1 95 °C 0.15 นาที

- Step 2 60 °C 1 นาที

- Step 3 95 °C 0.15 นาที

Cycle 45

6. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

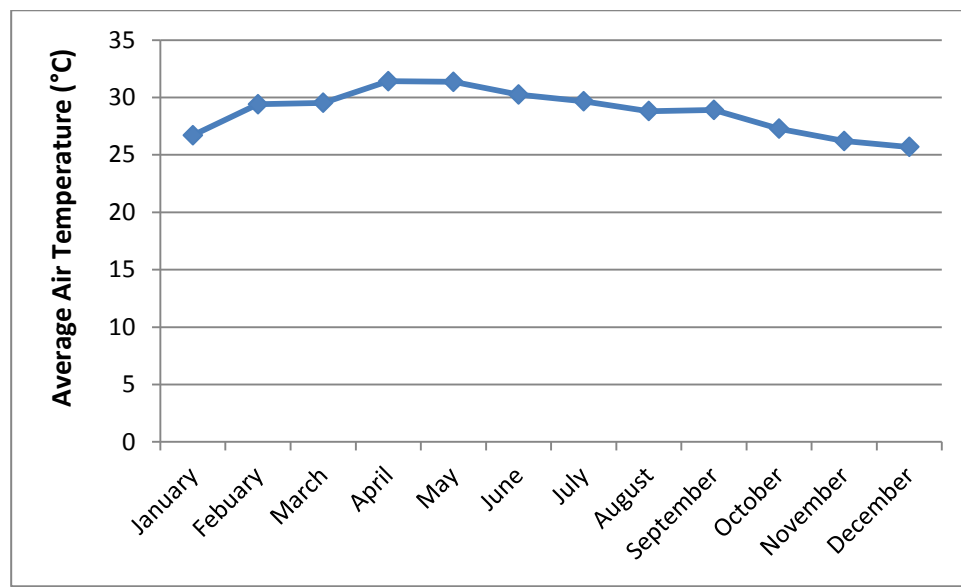
ทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม R (R-language and environment for statistical computing and graphics) โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Tukey's test

ผลและวิจารณ์

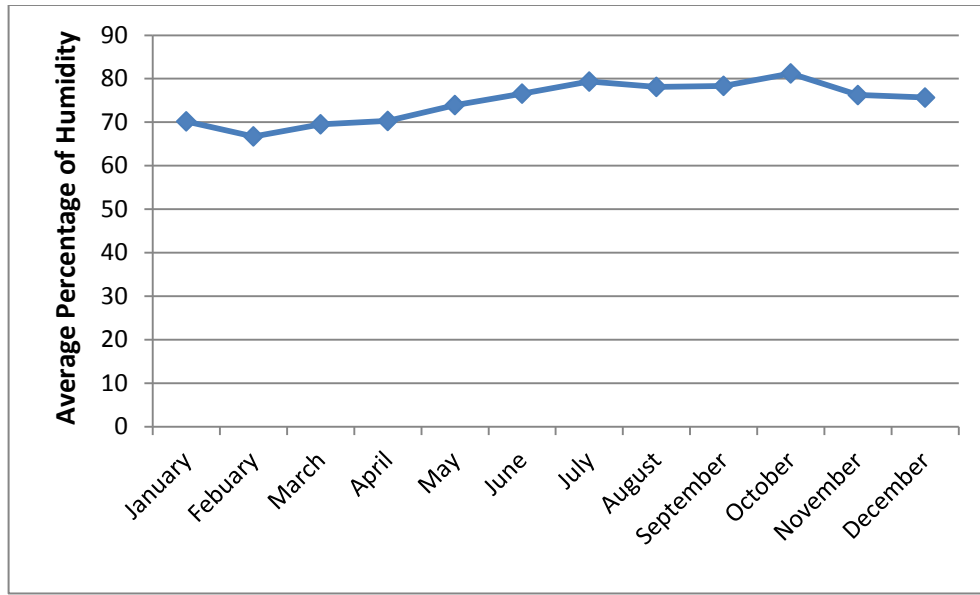
1. สภาพภูมิอากาศและความชื้นดินขณะทำการทดลอง

อุณหภูมิเฉลี่ยตลอดการทดลองอยู่ในช่วง $25.7 - 31.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ในช่วงฤดูร้อน (มีนาคม-พฤษภาคม) มีอุณหภูมิเฉลี่ย $30.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ในช่วงฤดูฝน (มิถุนายน-ตุลาคม) มีอุณหภูมิเฉลี่ย $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ และฤดูหนาว (พฤศจิกายน-กุมภาพันธ์) มีอุณหภูมิเฉลี่ย $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ภาพที่ 1) ความชื้นสัมพัทธ์ตลอดการทดลองอยู่ในช่วง $66.8 - 81.2\%$ ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยในช่วงฤดูร้อน 71.2% ในช่วงฤดูฝน 78.7% และฤดูหนาว 72.2% (ภาพที่ 2)

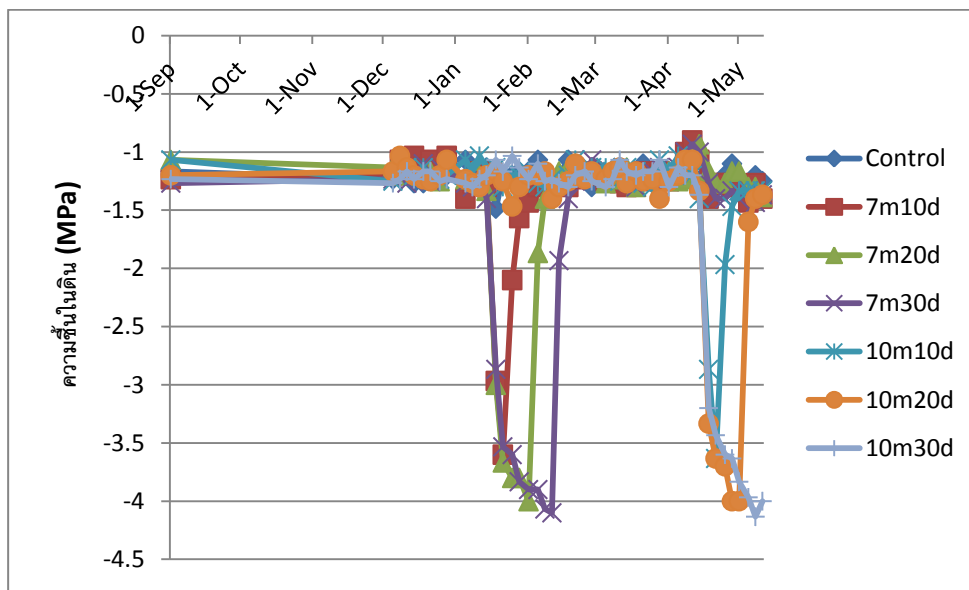
ค่าความชื้นในดินเฉลี่ยตลอดการทดลองเท่ากับ -1.2 MPa ในทรีทเมนต์ที่ได้รับวอเตอร์สเตรส 10 วัน มีค่าความชื้นในดินเฉลี่ย -2.3 MPa ทรีทเมนต์ที่ได้รับวอเตอร์สเตรส 20 วัน มีค่าความชื้นในดินเฉลี่ย -3.0 MPa และทรีทเมนต์ที่ได้รับวอเตอร์สเตรส 30 วัน มีค่าความชื้นในดินเฉลี่ย -3.2 MPa



ภาพที่ 1 อุณหภูมิเฉลี่ยในโรงปลูกอ้อยตลอดการทดลอง



ภาพที่ 2 ค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยในโรงปลูกอ้อยตลอดการทดลอง



ภาพที่ 3 ค่าความชื้นในดินของแต่ละทรีทเมนต์ตลอดการทดลอง

2. การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของอ้อย

2.1 ความสูงของอ้อย

เมื่อทำการวัดความสูงของต้นอ้อยหลังการเก็บเกี่ยวในต้นเดือนที่ 11 พบว่า ความสูงของต้นอ้อยอยู่ระหว่าง 163-191 เซนติเมตร ทรีทเมนต์ที่ได้รับการรดน้ำ 10 วันเมื่ออายุ 7 เดือนมีความสูงสูงสุด คือ 191 เซนติเมตร ส่วนทรีทเมนต์ที่ได้รับการรดน้ำ 30 วันเมื่ออายุ 10 เดือน มีความสูงต่ำสุด คือ 163 เซนติเมตร อย่างไรก็ตามความสูงแต่ละทรีทเมนต์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 1 ตารางแสดงค่าเฉลี่ยความสูง (cm) ของอ้อยหลังการเก็บเกี่ยวในทรีทเมนต์ที่ได้รับวอเตอร์สเตรสแตกต่างกัน และตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี Tukey's test

Treatment	ความสูงเฉลี่ย(kg) $\pm$ S.E
Control	190.67 $\pm$ 3.45
7m10d	191.00 $\pm$ 5.36
7m20d	188.33 $\pm$ 7.75
7m30d	171.33 $\pm$ 3.98
10m10d	190.33 $\pm$ 5.43
10m20d	173.00 $\pm$ 6.23
10m30d	163.00 $\pm$ 1.53

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Mon	2	533	266.3	0.554	0.587
Day	2	808	404.1	0.840	0.452
mon:day	2	849	424.5	0.883	0.436

2.2 จำนวนปล้องของอ้อย

เมื่อทำการวัดจำนวนปล้องของต้นอ้อยหลังการเก็บเกี่ยวในต้นเดือนที่ 11 พบว่า จำนวนปล้องของต้นอ้อยอยู่ระหว่าง 14.3-21 ข้อ ทรีทเมนต์ที่ได้รับน้ำปกติ (ชุดควบคุม) มีความจำนวนปล้องสูงสุด คือ 21 ปล้อง ส่วนทรีทเมนต์ที่ได้รับการรดน้ำ 30 วันเมื่ออายุ 7 เดือน มีความจำนวนปล้องต่ำสุด คือ 14.3 ข้อ และเมื่อคำนวณความสูงต่อปล้อง พบว่าทรีทเมนต์ที่ได้รับการรดน้ำ 30 วันเมื่ออายุ 7 เดือน มีความสูงต่อปล้องสูงสุด คือ 11.9 เซนติเมตรต่อหนึ่งปล้อง และพบว่ามีความสูงปล้องต่อต่ำที่สุดในชุดควบคุม คือ 9.16 เซนติเมตร แสดงให้เห็นว่าการให้วอเตอร์สเตรสแก่ต้นอ้อยในระยะย่างปล้องไม่ได้ส่งผลยับยั้งการยืดยาวของเซลล์แต่อย่างใด ในทางตรงกันข้ามกลับพบว่าความสูงต่อปล้องในทรีทเมนต์ที่ได้รับการรดน้ำมีค่ามากกว่าในชุดควบคุม เมื่อวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติพบว่าอายุของอ้อยขณะที่ได้รับวอเตอร์สเตรสมีผลต่อค่าจำนวนปล้องของอ้อย แต่ระดับของความเครียดของวอเตอร์สเตรสไม่ส่งผลต่อจำนวนปล้องของอ้อยอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 2 ตารางแสดง ค่าเฉลี่ยจำนวนปล้อง Ratio ความสูง(cm)/ปล้องของอ้อยหลังการเก็บเกี่ยวในทรีทเมนต์ที่ได้รับวอเตอร์สเตรสแตกต่างกันและตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี Tukey's test

Treatment	จำนวนปล้องเฉลี่ย (kg) $\pm$ S.E	Ratio ความสูง(cm/ปล้อง)
Control	21.00 $\pm$ 0.67	9.08
7m10d	17.00 $\pm$ 0.88	11.24
7m20d	16.33 $\pm$ 0.96	11.53
7m30d	14.33 $\pm$ 0.19	11.95
10m10d	18.33 $\pm$ 0.84	10.38
10m20d	18.67 $\pm$ 0.84	9.27
10m30d	17.33 $\pm$ 0.84	9.40

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Mon	2	63.37	31.68	4.465	0.0316 *
Day	2	12.33	6.17	0.869	0.4408
mon:day	2	2.11	1.06	0.149	0.8631

2.3 น้ำหนักของอ้อย

เมื่อทำการวัดน้ำหนักของต้นอ้อยหลังการเก็บเกี่ยวในต้นเดือนที่ 11 พบว่า น้ำหนักของต้นอ้อยอยู่ระหว่าง 1.1-1.5 กิโลกรัม ทรีทเมนต์ที่ได้รับการรดน้ำ 20 วันเมื่ออายุ 7 เดือนมีน้ำหนักสูงสุด คือ 1.5 กิโลกรัม ส่วนทรีทเมนต์ที่ได้รับการรดน้ำ 20 และ 30 วันเมื่ออายุ 4 เดือน มีน้ำหนักต่ำสุด คือ 1.1 กิโลกรัม อย่างไรก็ตามน้ำหนักแต่ละทรีทเมนต์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 3 ตารางแสดงน้ำหนักเฉลี่ยของอ้อยหลังการเก็บเกี่ยวในทรีทเมนต์ที่ได้รับวอเตอร์สเตรตแตกต่างกันและตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี Tukey's test

Treatment	น้ำหนักเฉลี่ย(kg) $\pm$ S.E
Control	1.30 $\pm$ 0.03
7m10d	1.23 $\pm$ 0.10
7m20d	1.50 $\pm$ 0.17
7m30d	1.40 $\pm$ 0.08
10m10d	1.27 $\pm$ 0.05
10m20d	1.13 $\pm$ 0.02
10m30d	1.13 $\pm$ 0.08

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Mon	2	0.1813	0.09063	1.236	0.320
Day	2	0.0144	0.00722	0.098	0.907
mon:day	2	0.1300	0.06500	0.886	0.434

3. ค่าที่เกี่ยวข้องกับความหวานของอ้อย

3.1 ค่าบrix

เมื่อพิจารณาค่าบrixเฉลี่ยของอ้อยหลังการเก็บเกี่ยว พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยชุดควบคุมมีค่าบrixสูงสุด 15.04 ในขณะที่ในทรีทเมนต์ที่ได้รับวอเตอร์สเตรสโดยการงดน้ำเป็นเวลา 10 วันเมื่ออายุ 7 เดือน มีค่าบrixต่ำสุด เท่ากับ 10.14 เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธีทางสถิติที่ละเอียด พบว่าปัจจัยเรื่องอายุและปัจจัยเรื่องระดับความเครียดของจำนวนวันที่ทำการงดน้ำของอ้อย ในขณะที่ได้รับวอเตอร์สเตรสต่างมีผลต่อค่าบrixอย่างมีนัยสำคัญ แต่ปฏิสัมพันธ์ระหว่างอายุของอ้อยและระดับความเครียดของวอเตอร์สเตรสไม่มีผลต่อค่าบrixอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 4 ตารางแสดงค่าบrixเฉลี่ยของอ้อยหลังการเก็บเกี่ยวในทรีทเมนต์ที่ได้รับวอเตอร์สเตรสแตกต่างกันและตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี Tukey's test

Treatment	ค่าบrixเฉลี่ย±S.E
Control	15.04±0.30 ^{ab}
7m10d	10.14±0.26 ^e
7m20d	10.24±0.19 ^e
7m30d	10.68±0.41 ^{de}
10m10d	12.06±0.14 ^{cd}
10m20d	11.70±0.25 ^{bc}
10m30d	15.12±0.14 ^a

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Mon	2	55.05	27.525	34.930	3.61e-06 ***
Day	2	7.67	3.833	4.864	0.0249 *
mon:day	2	3.23	1.613	2.047	0.1660

3.2 ค่าโพล

เมื่อพิจารณาค่าโพลเฉลี่ยของอ้อยหลังการเก็บเกี่ยว พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยชุดควบคุมมีค่าโพลสูงสุด 14.10 ในขณะที่ในทรีทเมนต์ที่ได้รับวอเตอร์สเตรสโดยการงดน้ำเป็นเวลา 20 วันเมื่ออายุ 7 เดือน มีค่าโพลต่ำสุด เท่ากับ 8.50 เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธีทางสถิติแต่ละปัจจัย พบว่าปัจจัยเรื่องอายุของอ้อยในขณะที่ได้รับวอเตอร์สเตรสและปัจจัยเรื่องระดับความเครียดของจำนวนวันที่ทำการงดน้ำต่างมีผลต่อค่าโพลอย่างมีนัยสำคัญ แต่ค่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างอายุของอ้อยและระดับความเครียดของวอเตอร์สเตรสไม่มีผลต่อค่าโพลอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 5 ตารางแสดงค่าโพลเฉลี่ยของอ้อยหลังการเก็บเกี่ยวในทรีทเมนต์ที่ได้รับวอเตอร์สเตรสแตกต่างกัน และตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี Tukey's test

Treatment	ค่าโพลเฉลี่ย±S.E
Control	14.10±0.21 ^a
7m10d	8.68±0.33 ^c
7m20d	8.50±0.26 ^c
7m30d	9.33±0.23 ^c
10m10d	11.68±0.12 ^b
10m20d	10.93±0.18 ^b
10m30d	13.58±0.05 ^a

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Mon	2	72.00	36.00	86.127	1.36e-08 ***
Day	2	9.85	4.93	11.787	0.000997 ***
mon:day	2	2.67	1.33	3.192	0.072078

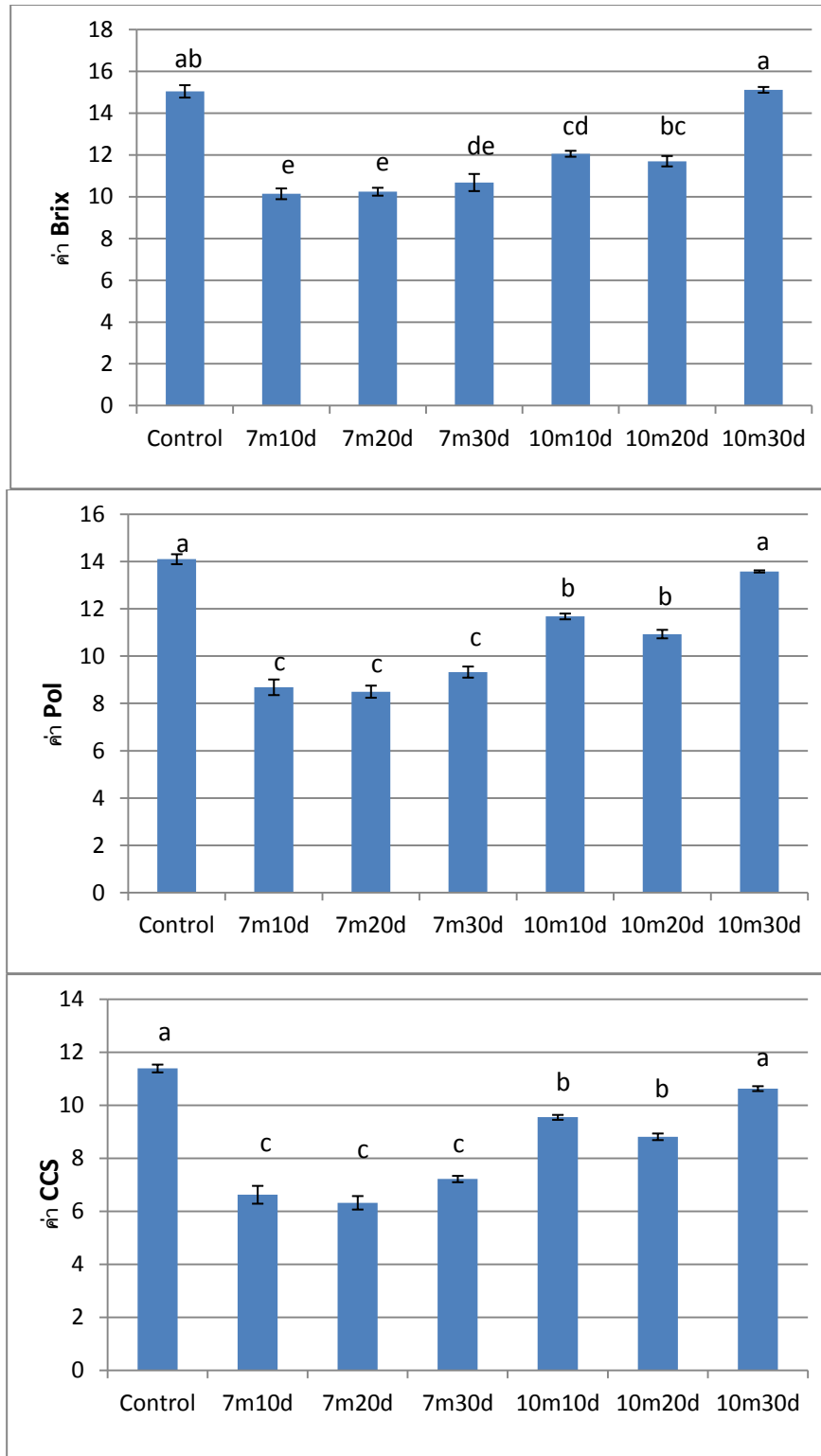
3.3 ค่าซีซีเอส

เมื่อพิจารณาค่าซีซีเอสเฉลี่ยของอ้อยหลังการเก็บเกี่ยว พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยชุดควบคุมมีค่าซีซีเอสสูงสุด 11.39 ในขณะที่ในทรีทเมนต์ที่ได้รับวอเตอร์สเตรสโดยการงดน้ำเป็นเวลา 20 วันเมื่ออายุ 7 เดือน มีค่าซีซีเอสต่ำสุด เท่ากับ 6.32 เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธีทางสถิติที่ละเอียด พบว่าปัจจัยเรื่องอายุของอ้อยในขณะที่ได้รับวอเตอร์สเตรสมีผลต่อค่าซีซีเอสอย่างมีนัยสำคัญ แต่ปัจจัยเรื่องของระดับความเครียดของจำนวนวันที่ทำการงดน้ำ และปฏิสัมพันธ์ระหว่างอายุของอ้อยและระดับความเครียดของวอเตอร์สเตรสไม่มีผลต่อค่าซีซีเอสอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 6 ตารางแสดงค่าซีซีเอสเฉลี่ยของอ้อยหลังการเก็บเกี่ยวในทรีทเมนต์ที่ได้รับวอเตอร์สเตรสแตกต่างกันและตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี Tukey's test

Treatment	ค่าซีซีเอสเฉลี่ย±S.E
Control	11.39±0.14 ^a
7m10d	6.62±0.34 ^c
7m20d	6.32±0.76 ^c
7m30d	7.22±0.36 ^c
10m10d	9.54±0.09 ^b
10m20d	8.81±0.12 ^b
10m30d	10.63±0.09 ^a

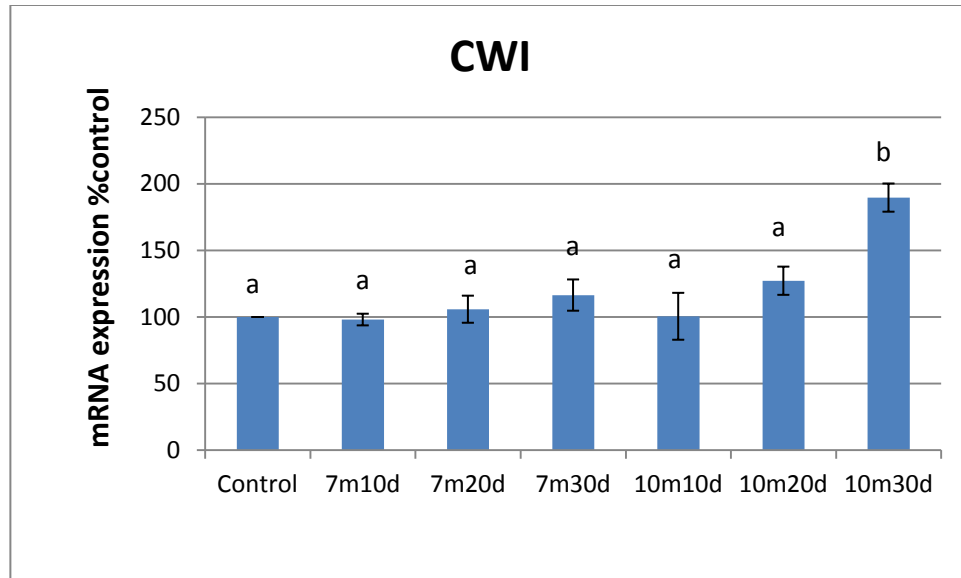
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Mon	2	60.54	30.270	90.062	1.01e-08 ***
Day	2	6.67	3.335	9.923	0.00207 **
mon:day	2	1.01	0.503	1.498	0.25741



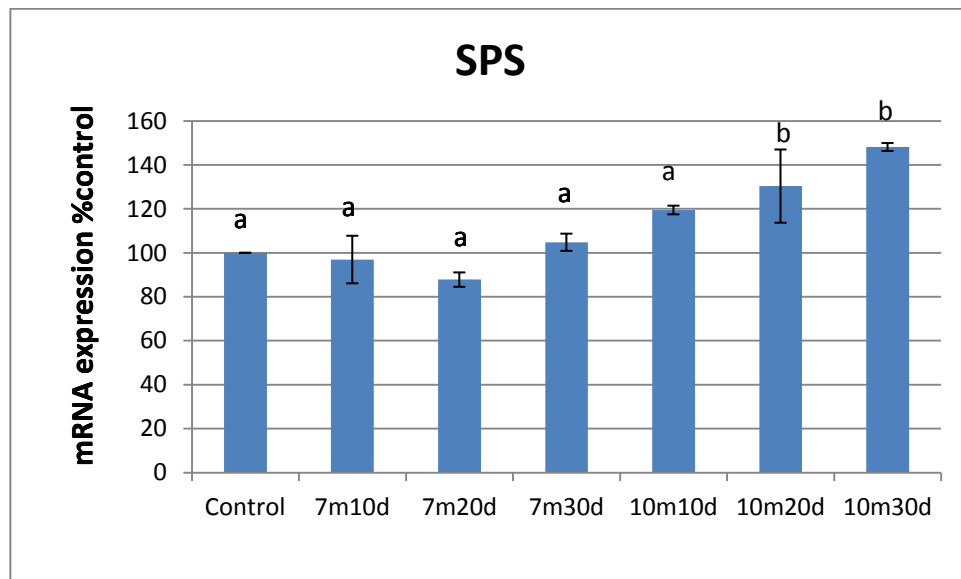
ภาพที่ 5 แสดงค่าบrixเฉลี่ย (A) ค่าโพลเฉลี่ย (B) และค่าซีซีเอสเฉลี่ย (C) ของอ้อยหลังการเก็บเกี่ยวในแต่ละวันที่

4. การแสดงออกของยีน

ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน Sucrose phosphate synthase (SPS) และ Cell wall invertase (CWI) โดยเทคนิค Real-time PCR โดยมี ubiquitin เป็น internal control พบว่า sucrose phosphate synthase มีการแสดงออกสูงสุดในทริทเมนต์ที่ได้รับสเตส 30 วันแก่อ้อยที่อายุ 10 เดือน เช่นเดียวกับ cell wall invertase ซึ่งต่างอย่างมีนัยสำคัญกับทุกทริทเมนต์ ถึงแม้การแสดงออกของยีน sucrose phosphate synthase และ cell wall invertase จะแตกต่างจากรูปแบบการสะสมน้ำตาลในอ้อยก็ตาม อาจจะอธิบายได้ว่าเนื่องจากการเก็บตัวอย่างพืชมาสกัด RNA เป็นการเก็บในระยะสุดท้าย ก่อนการเก็บเกี่ยว ดังนั้นทริทเมนต์ที่ได้รับการรดน้ำในระยะ 7 เดือนและชุดควบคุม เป็นกลุ่มที่น่าจะมีการปรับตัวเข้าสู่สภาวะปกติแล้ว ดังนั้นการแสดงออกของยีนทั้งสองจึงไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แต่การที่มีการแสดงออกของยีนทั้งสองเพิ่มสูงขึ้นในทริทเมนต์สุดท้าย (รดน้ำ 30 วันที่อายุ 10 เดือนก่อนการเก็บเกี่ยว) สันนิษฐานว่าความเครียดจากการรดน้ำไปชักนำให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ซึ่งการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ cell wall invertase น่าจะเกี่ยวข้องกับการลำเลียง sucrose เข้าสู่เซลล์ลำต้นมากขึ้น ส่วนการแสดงออกของ sucrose phosphate synthase น่าจะสัมพันธ์กับปริมาณซูโครสที่สะสมมากในทริทเมนต์สุดท้าย



(A)



(B)

ภาพที่ 6 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน (A) Cell wall invertase (CWI) และ (B) Sucrose phosphate synthase (SPS) จากปล้องบนสุดของอ้อยโดยมี ubiquitin เป็น internal control โดยใช้วิธี Real-time PCR

สรุปและเสนอแนะ

จากการทดลองให้อวเทอร์สเตสแก่้อยู่ในระยะ 7 เดือนและระยะ 10 เดือน โดยมีระดับความเครียดแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ งดน้ำ 10 วัน งดน้ำ 20 วัน งดน้ำ 30 วัน พบว่าพืชที่ได้รับอวเทอร์สเตสมีค่าความสูงและน้ำหนักของลำต้นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม แต่มีจำนวนปล้อง และความสูงต่อปล้องมากกว่ากลุ่มควบคุม โดยเฉพาะในทริทเมนต์ที่ได้รับการงดน้ำ 30 วันเมื่ออ้อยอายุ 7 เดือน ส่วนค่าที่เกี่ยวข้องกับความหวานของอ้อย ได้แก่ ค่าบrix ค่าโพล ค่าซีซีเอส โดยพบว่าในทุกกลุ่มทดลองมีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม ยกเว้นทริทเมนต์ที่ทำการงดน้ำ 30 วันให้อ้อยที่อายุ 10 เดือน (ก่อนการเก็บเกี่ยว)ซึ่งมีค่าบrix ค่าโพล และค่าซีซีเอสไม่ต่างกับกลุ่มควบคุม ส่วนการที่ Sucrose phosphate synthase มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นหลังจากได้รับอวเทอร์สเตสนั้น สันนิษฐานว่าความเครียดจากการงดน้ำสามารถชักนำทำให้ยีน cell wall invertase ที่เกี่ยวข้องกับการดึงน้ำตาลเข้าสู่ sink organ มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับ sucrose synthase ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นกัน ทำให้มีเคลื่อนย้ายและการสังเคราะห์น้ำตาล sucrose ในลำอ้อยเพิ่มขึ้น

ข้อค้นพบจากการทดลองนี้ เสนอแนะแก่เกษตรกรว่า ในการให้น้ำแก่อ้อยควรมีการให้น้ำอย่างสม่ำเสมอ แต่ในช่วง 30 วันก่อนการเก็บเกี่ยวสามารถงดน้ำได้ เพราะไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณน้ำตาลที่สะสมในอ้อยหลังการเก็บเกี่ยวเนื่องจากให้ค่าซีซีเอสที่มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม ในอนาคตปัญหาเรื่องการขาดแคลนทรัพยากรน้ำจะเป็นปัญหาใหญ่สำหรับการเกษตรกรรม ข้อค้นพบจากงานวิจัยนี้จะช่วยทำให้เกิดการวางแผนการจัดน้ำที่ดีแก่อ้อยโดยไม่กระทบต่อผลผลิตได้ ซึ่งจะเป็นการประหยัดทรัพยากรน้ำในอนาคตอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

- Carson, D.L. and Botha, F.C. 2000. Preliminary analysis of expressed sequence tags for sugarcane. *Crop Sci.* 40: 1769-1779.
- Carson, D.L. and Botha, F.C. 2002. Gene expressed in sugarcane maturing intermodal tissue. *Plant Cell Rep.* 20: 1075-1081.
- Casu, R.E., Dimmock, C.M., Chapman, S.C., Grof, C.P.L., McIntyre, C.L., Bonnett, G.D. and Manners, J.M. 2004. Identification of differentially expressed in maturing stem vascular tissues of sugarcane by expressed sequence tag and microarray analysis. *Plant Mol. Biol.* 52: 371-386..
- Casu, R.E., Grof, C.P.L., Rae, A.L., McIntyre, C.L., Dimmock, C.M. and Manners, J.M. 2003. Identification of a novel sugar transporter homologue strongly expressed in maturing stem vascular tissues of sugarcane by expressed sequence tag and microarray analysis. *Plant Mol. Biol.* 52: 371-381.
- Gronwald, J.W. 1991. Lipid biosynthesis inhibitors. *Weed Science.* 39: 435-449.
- Hoepfner, S.W. and Botha, F.C. 2004. Purification and characterization of fructokinase from the culm of sugarcane. *Plant Sci.* 167: 645-654.
- Inman-Bamber, N.G. 2004. Sugarcane water stress criteria for irrigation and drying off. *Field Crops Res.* 89: 107-122.
- Lawlor, D.W. and Cornic, G. 2002. Photosynthesis carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment*, 25, 275-294.
- Lingle, S.E. 1999. Sugar metabolism during growth and development in sugarcane internodes. *Crop sci.* 39: 480-486.
- Lunn, J.E. and Furbank, R.T. 1999. Transley Review No.105. Sucrose biosynthesis in plants. *New Phytologist.* 143, 221-237.
- Moore, P.H. 1995. Temporal and spatial regulation of sucrose metabolism in the sugarcane stem. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 661-679
- Moore, P.H. 2005. Integration of sucrose accumulation processes across hierarchical scales: towards developing an understanding of the gene-to-crop continuum. *Field Crops Res.* 92: 119-135.
- Rae, A.L., Grof, C.P.L., Casu, R.E. and Bonnett, G.D. 2005. Sucrose accumulation in the sugarcane stem: pathways and control points for transport and compartmentation. *Field Crop Res.* 92: 159-168.

- Rohwer, J.M. and Botha, F.C. 2001. Analysis of sucrose accumulation in the sugar cane culm on the basis of in vitro kinetic data. *Biochem. J.* 358: 437-445.
- Turner, W. and Botha, F.C. 2002. Purification and kinetic properties of UDP-glucose dehydrogenase from sugarcane. *Arch. Biochem. Biophys.* 407: 209-216.
- Welbaum, G.E., Meinzer, F.C., 1990. Compartmentation of solute and water in developing sugarcane stalk tissues. *Plant Physiol.* 93, 1147-1153.