การคัดเลือกข้าว (*ORYZA SATIVA* L.) ให้ทนต่ออะลูมิเนียม โดยการฉายแคลลัสจากเมล็ดข้าวด้วยรังสีแกมมา

นางสาวศิริลักษณ์ ชูแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิวเคลียร์เทคโนโลยี ภาควิชาวิศวกรรมนิวเคลียร์
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

SELECTION OF RICE (*ORYZA SATIVA* L.) FOR ALUMINIUM TOLERANCE BY GAMMA IRRADIATION OF EMBRYOGENIC CALLUS

MISS SIRILAK CHOOKAEW

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Nuclear Technology

Department of Nuclear Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกข้าว (*ORYZA SATIVA* L.) ให้ทนต่ออะลูมิเนียมโดยการฉายแคลลัสจากเมล็ดข้าวด้วยรังสีแกมมา
โดย	นางสาวศิริลักษณ์ ชูแก้ว
สาขาวิชา	นิวเคลียร์เทคโนโลยี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดุลยพงศ์ วงศ์แสวง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.กนกพร บุญศิริชัย

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุญสม เลิศหิรัญวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…… ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์สมยศ ศรีสถิตย์)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดุลยพงศ์ วงศ์แสวง)

…… อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.กนกพร บุญศิริชัย)

…… กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อรรถพร ภัทรสุมันต์)

…… กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. พิมพ์พร อุทยารัตน์)

ศิริลักษณ์ ชูแก้ว : การคัดเลือกข้าว (*ORYZA SATIVA* L.) ให้ทนต่ออะลูมิเนียมโดยการฉายแคลลัสจากเมล็ดข้าวด้วยรังสีแกมมา (SELECTION OF RICE (*ORYZA SATIVA* L.) FOR ALUMINIUM TOLERANCE BY GAMMA IRRADIATION OF EMBRYOGENIC CALLUS.) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ.ดร.ดุลยพงศ์ วงศ์แสวง, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร.กนกพร บุญศิริชัย, 70 หน้า.

ศึกษาผลของอะลูมิเนียมต่อการเจริญเติบโตของข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ กข31 ในระยะต้นกล้าและชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีเพื่อคัดเลือกต้นข้าวที่ทนอะลูมิเนียม ปลูกต้นกล้าในสารละลายธาตุอาหารที่เติมอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 - 100 mg/l ในรูปของ $AlCl_3$ ที่ pH 3.9 พบว่าอะลูมิเนียมแสดงผลเด่นชัดในราก อะลูมิเนียม 25 mg/l มีผลกระตุ้นความยาวราก แต่ที่ 50 – 100 mg/l มีผลยับยั้งความยาวราก จึงใช้อะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 50 และ 100 mg/l ในการคัดเลือกต้นข้าวที่ทนอะลูมิเนียม ฉายรังสีแกมมา 0, 35 และ 50 Gy แก่แคลลัสจากคัพภะข้าว แล้วย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีอะลูมิเนียมเป็นเวลา 10 วัน ก่อนชักนำให้เป็นต้น พบว่าเมื่อปริมาณรังสีและอะลูมิเนียมเพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์แคลลัสตายจะเพิ่มขึ้น ในขณะที่เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ไม่มีการพัฒนา แคลลัสที่พัฒนาเป็นราก และแคลลัสที่เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวลดลง เมื่อย้ายแคลลัสลงอาหารใหม่ พบว่าแคลลัส ที่ฉายรังสี 35 Gy ในอาหารที่เติมอะลูมิเนียม 50 mg/l สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ จึงนำออกปลูกเพื่อทดสอบความทนต่ออะลูมิเนียมต่อไป และได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *SR* (sulphur reductase) และ *LRR* (leucien rich repeat) ในตัวอย่างแคลลัสข้าวที่ใช้คัดเลือกข้าวทนอะลูมิเนียม พบว่ายีน *SR* มีการแสดงออกที่ลดลงเมื่อปริมาณรังสีและความเข้มข้นของอะลูมิเนียมเพิ่มขึ้น

ภาควิชา วิศวกรรมนิวเคลียร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา นิวเคลียร์เทคโนโลยี ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2555 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

5270523021 : MAJOR NUCLEAR TECHNOLOGY

KEYWORDS : RICE SEEDLINGS / AL-TOLERANCE / EMBRYOGENIC CALLI / GAMMA RAY / PLANTLET / GENE EXPRESSION / SR (SULPHUR REDUCTASE)

SIRILAK CHOOKAEW: SELECTION OF RICE (*ORYZA SATIVA* L.) FOR ALUMINIUM TOLERANCE BY GAMMA IRRADIATION OF EMBRYOGENIC CALLUS. ADVISOR: ASSIST. PROF. DOONYAPONG WONGSAWAENG, Ph.D., CO-ADVISOR: KANOKPORN BOONSIRICHAI, Ph.D., 70 pp.

The effects of aluminum (Al) on the growth of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) were studied, and radiation-induced Al-tolerant mutants were screened. RD31 rice seedlings were grown in the nutrient solution with 0 - 100 mg/l Al supplemented as $AlCl_3$ at pH 3.9. Al effects on growth were most prominent in the roots. 25 mg/l Al stimulated root elongation, while 50 – 100 mg/l Al inhibited it. 50 and 100 mg/l Al were chosen for the Al-tolerance screen. Embryogenic calli were gamma irradiated at 0, 35 and 50 Gy and were exposed to the Al stress at pH 3.9 for 10 days prior to plantlet regeneration. The percentage of senesced calli increased with the increasing gamma-ray dose and Al stress, while the percentage of white calli, roots and green-spots calli decreased. A green plantlet was obtained from 35 Gy irradiated calli with 50 mg/l Al treatment; it will be further tested for Al tolerance. Gene expression studies among embryogenic calli indicated a reduction in the expression of SR gene encoding sulphur reductase, with the increasing gamma-ray dose and Al stress.

Department : Nuclear Engineering Student's Signature .....

Field of Study : Nuclear Technology Advisor's Signature .....

Academic Year : 2012 Co-advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดุลยพงศ์ วงแสวง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้คำแนะนำ และชี้แนะแนวทางในการทำวิจัย ดร. พิมพ์พร อุทยารัตน์ และอาจารย์ในภาควิชาวิศวกรรมนิวเคลียร์ทุกคนที่ได้ให้ความรู้ และคำปรึกษาในด้านต่างๆ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ดร. กนกพร บุญศิริชัย ผู้ที่ให้โอกาสในการศึกษาระดับปริญญาโท คอยสนับสนุนด้านต่างๆ ให้คำปรึกษา และแนะนำในการทำวิจัย ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณสถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน) ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษา และทุนวิจัย ขอขอบคุณศูนย์ฉายรังสีอัญมณีที่อำนวยความสะดวกในการฉายรังสีแกมมาในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณวิชัย ภูริปัญญวานิช ผู้ให้เวลา สนับสนุนด้านอุปกรณ์การทดลองบางส่วนในงานวิจัย และสถานที่ในการทำวิทยานิพนธ์ คุณวรารัตน์ คำหวาน เพื่อนที่ช่วยทำแล็ปจนดึกดื่น คุณอาภรณ์ บุษมงคล ผู้ให้ความรู้ และช่วยเหลือในการวัดตัวอย่างด้วยเทคนิค NAA คุณสุธาทิพย์ คชสิงห์ ผู้คอยดูแลจัดการเรื่องอาหาร

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจ และช่วยเหลือในงานวิจัยมาโดยตลอด

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งต่อ บิดา มารดา น้องสาว ยาย หลานที่รักทั้งสองคน ผู้ที่คอยเป็นแรงผลักดัน แหล่งของกำลังใจ และให้การสนับสนุนทางด้านการเงิน รวมถึงสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่คอยให้กำลังใจมาโดยตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญภาพ..... ฏ

บทที่

1. บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2

1.4 ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย 2

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

1.6 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2. ทฤษฎี 6

2.1 ข้าว 6

2.2 บทบาทของอะลูมิเนียมต่อการเจริญเติบโตของพืช 7

2.2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างดินกรดกับอะลูมิเนียม 7

2.2.2 อิทธิพลของอะลูมิเนียมต่อการเจริญเติบโตของพืช 10

2.3 เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช 12

2.3.1 เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 12

2.3.2 การฉายรังสีเพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ 14

2.3.2.1 ปฏิกิริยาระหว่างรังสีกับเซลล์ 15

2.3.3.2 ผลกระทบของรังสีในระดับเซลล์ 16

บทที่ หน้า

2.4 การแสดงออกของยีน (gene expression) ที่ระดับโมเลกุล 19
2.4.1 การแสดงออกของยีน (gene expression) 19
2.4.2 การศึกษายีนที่ตอบสนองต่ออะลูมิเนียม (aluminium responsive genes) 21

3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 26
3.1 การศึกษาผลของอะลูมิเนียมต่อการเจริญเติบโตของข้าวในระยะต้นกล้า 26
3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทดลอง 26
3.1.2 สารเคมีในการทดลอง 26
3.1.2 วิธีการทดลอง 26
3.2 การคัดเลือกข้าวให้ทนต่ออะลูมิเนียมโดยการฉายรังสีแกมมากับแคลลัสของข้าว 27
3.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทดลอง 27
3.2.2 สารเคมีในการทดลอง 28
3.2.3 วิธีการทดลอง 28
3.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน 30
3.3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทดลอง 30
3.3.2 สารเคมีในการทดลอง 30
3.3.3 วิธีการทดลอง 31
3.4 การศึกษาปริมาณอะลูมิเนียมในแคลลัสข้าว 35
3.4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทดลอง 35
3.4.2 สารเคมีในการทดลอง 35
3.4.3 วิธีการทดลอง 36
4. ผลการทดลอง 37
4.1 การศึกษาผลของอะลูมิเนียมต่อการเจริญเติบโตของข้าวในระยะต้นกล้า 37
4.2 การคัดเลือกข้าวให้ทนต่ออะลูมิเนียมโดยการฉายรังสีแกมมากับแคลลัสของข้าว 40
4.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน 45
4.4 การศึกษาปริมาณอะลูมิเนียมในแคลลัสข้าว 46
5.วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง 48
5.1 วิจารณ์ผลการทดลอง 48

บทที่ **หน้า**

5.1.1 การศึกษาผลของอะลูมิเนียมต่อการเจริญเติบโตของข้าวในระยะต้นกล้า 48
5.1.2 การคัดเลือกข้าวให้ทนต่ออะลูมิเนียมโดยการฉายรังสีแกมมากับแคลลัสของข้าว 49
5.1.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน 51
5.1.4 การศึกษาปริมาณอะลูมิเนียมในแคลลัสข้าว 51
5.2 สรุปผลการทดลอง 52
5.3 ข้อเสนอแนะ 53
5.4 แนวทางการทดลองในอนาคต 53
รายการอ้างอิง 54
ภาคผนวก 62
ภาคผนวก ก. 63
ภาคผนวก ข. 66
ภาคผนวก ค. 68
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 70

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ระดับ pH และระดับความเป็นกรดเป็นด่างของดิน	7
2.2	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH ของดินกับค่าความอิ่มตัวด้วยอะลูมิเนียมในดินอันดับอุลติโซลส์ และออกซิโซลส์ จากเปอร์โตริโก	8
3.1	accession number และSequences ของ primers *SR* และ *LRR*	33
4.1	ผลของปริมาณรังสีแกมมาและความเข้มข้นของอะลูมิเนียมในอาหารเพาะเลี้ยงต่อการพัฒนาของแคลลัส (callus formation)	42
ก.1	ความยาวของยอดและรากของต้นกล้าข้าวพันธุ์ RD31 ที่อายุต่างๆ	64
ก.2	การเตรียมสารละลายธาตุอาหารในการทดลองที่1	65
ข.1	การเตรียม Stock solution ของ MS Stock (100x) & Working Dilution (1x)	67
ค.1	ความเข้มข้นของ RNA จากตัวอย่างแคลลัสข้าว	69

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH ของดินกับค่าความอิ่มตัวด้วยอะลูมิเนียม ในดินอันดับอุลติโซลส์ และออกซิโซลส์ จากเปอร์โตริโก	10
2.2	การเกิดโซมาโคลนอลแวริเอชัน (somaclonal variation) จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	13
2.3	การเกิดปฏิกิริยารังสีโดยตรงและโดยอ้อมต่อโมเลกุลของ DNA	18
2.4	กระบวนการสังเคราะห์สาย polypeptide	21
3.1	การประกอบอุปกรณ์ในการทดลองที่ 1	27
3.2	เมล็ดข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส (A) และแคลลัสเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (B)	29
3.3	ขั้นตอนการสกัด RNA	32
4.1	การเจริญเติบโตของต้นกล้าพันธุ์ กข31 ในสารละลายธาตุอาหารที่เติมอะลูมิเนียม 5 ระดับความเข้มข้น คือ อะลูมิเนียม 0 mg/l ที่ pH 6.0 และ pH 3.9 และอะลูมิเนียม 25, 50, 75, 100 mg/l pH 3.9 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา ที่อายุ 14 วัน (A) และอายุ 28 วัน (B)	38
4.2	แสดงความยาวเฉลี่ยของยอดข้าว (shoot length) (cm) ในสารละลายธาตุอาหารที่ประกอบด้วยอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่ออายุ 14, 21 และ 28 วัน	39
4.3	แสดงความยาวเฉลี่ยของรากข้าว (root length) (cm) ในสารละลายธาตุอาหารที่ประกอบด้วยอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่ออายุ 14, 21 และ 28 วัน	39
4.4	แสดงก้อนแคลลัสที่ไม่ฉายรังสีแกมมาเลี้ยงในอาหารทดสอบอะลูมิเนียม 0 mg/l (A) 50 mg/l (B) 100 mg/l (C) แคลลัสเจริญในอาหารที่เติมอะลูมิเนียม เป็นเวลา 10 วัน	40
4.5	แสดงก้อนแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา 35 Gy เลี้ยงในอาหารทดสอบอะลูมิเนียม แคลลัสเจริญในอาหารที่เติมอะลูมิเนียม 0 mg/l (A) 50 mg/l (B) 100 mg/l (C) เป็นเวลา 10 วัน	40

ภาพที่ หน้า

4.6 แสดงก้อนแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา 50 Gy เลี้ยงในอาหารทดสอบอะลูมิเนียม แคลลัสเจริญในอาหารที่เติมอะลูมิเนียม 0 mg/l (A) 50 mg/l (B) 100 mg/l (C) เป็นเวลา 10 วัน 41

4.7 แสดงลักษณะการพัฒนาของแคลลัสบนอาหารชักนำต้น เมื่ออายุ 4 สัปดาห์ แคลลัสอายุ 2 สัปดาห์ (A) แคลลัสตาย (B) แคลลัสที่ไม่มีการพัฒนา (C) แคลลัสที่พัฒนาเป็นราก (D) แคลลัสที่เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว (E) แคลลัสที่พัฒนาเป็นยอด (F) 43

4.8 การพัฒนาของแคลลัสเมื่อมีการสร้างยอดแต่มีการหยุดพัฒนา 44

4.9 ต้นกล้าอายุ 2 เดือน ที่พัฒนามาจากแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีปริมาณ 35 Gy ความเข้มข้นอะลูมิเนียม 50 mg/l 45

4.10 ระดับการแสดงออกของยีน *SR* เมื่ออยู่ในสภาวะต่าง ๆ 46

4.11 ความเข้มข้นของอะลูมิเนียมในแคลลัสข้าวจาการวัดด้วยเทคนิค Neutron Activation Analysis (NAA) 47

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวเป็นสินค้าทางการเกษตรที่มีมูลค่าการส่งออกเป็นอันดับต้นของประเทศ อีกทั้งยังเป็นที่นิยมบริโภคในประเทศเป็นอย่างมาก ทำให้เกษตรกรยังนิยมปลูกข้าวเพื่อผลิตเป็นสินค้าทางการเกษตร แต่ในปัจจุบันเกิดปัญหาในภาคการผลิตทำให้ผลผลิตต่อไร่ต่ำ จากการระบาดของโรคและแมลง ในไม่กี่ปีที่ผ่านมาเกษตรกรประสบปัญหาการระบาดของเพลี้ยกระโดดหลังขาวและเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเข้าทำลายต้นข้าวเป็นอย่างมาก จึงมีการพัฒนาพันธุ์ข้าว กข31 ที่ทนทานต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยกระโดดได้ [1] แต่สาเหตุที่สำคัญอีกประการหนึ่งของปัญหาในภาคการผลิตคือการเพาะปลูกข้าวในสภาพดินกรด ซึ่งประเทศไทยมีการกระจายตัวของดินกรดอยู่ทั่วประเทศ เป็นพื้นที่ประมาณ 44 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ทั้งประเทศ หรือประมาณ 143 ล้านไร่ [2] ในสภาวะที่ดินเป็นกรด (pH < 5) นี้จะทำให้อะลูมิเนียม (Aluminium, Al) ซึ่งเป็นธาตุที่พบมากบริเวณเปลือกโลกและอยู่ในรูป insoluble-silicate หรือ alumina [3] ซึ่งโดยปกติแล้วจะไม่เป็นพิษต่อพืชเปลี่ยนมาอยู่ในรูปไอออนซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต [4] โดยอะลูมิเนียมจะทำอันตรายต่อรากเป็นอันดับแรก [5] ยับยั้งการเจริญเติบโตของรากและรากแขนง [6] ขัดขวางการดูดธาตุอาหาร และการเคลื่อนย้ายธาตุอาหารในพืช [5,7,8,9] วิธีแก้ไขปัญหาดินกรดจากอะลูมิเนียมให้อยู่ในสภาพที่สามารถทำการเพาะปลูกได้นั้นต้องใช้ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ใช้แรงงานและเวลามาก อาจจะไม่คุ้มต่อการลงทุน ทำให้เกษตรกรปล่อยที่ดินรกร้างว่างเปล่า หรือทำการจัดสรรที่ดินไปในทางอื่น

ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพจะช่วยให้ผลผลิตข้าวเพิ่มขึ้น คือการพัฒนาพันธุ์ข้าวที่มีความทนทานต่อการเข้าทำลายของแมลงอยู่แล้วได้แก่ข้าวพันธุ์ กข31 ให้สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินกรด และทนต่อความเป็นพิษของอะลูมิเนียมได้ ส่วนวิธีการคัดเลือกเพื่อให้ได้พันธุ์ใด ๆ นั้นมักจะใช้เวลานาน จึงได้นำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาช่วยร่นระยะเวลา [10] มีรายงานว่าเทคนิคนี้สามารถใช้คัดเลือกพืชหลายชนิดให้ทนทานต่อโลหะหนักได้ [11,12,13] ร่วมกับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมา [14] มาใช้ในการคัดเลือกข้าวที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพกรดจัดจากอะลูมิเนียมในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะเป็นแนวทางเบื้องต้นในการคัดเลือกพันธุ์ที่จะสามารถผลิตเป็นสายพันธุ์ใหม่และสามารถเผยแพร่แก่เกษตรกรได้ต่อไป

ในขั้นตอนของการคัดเลือกพันธุ์ข้าวในระดับห้องปฏิบัติการได้ทำการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับความทนต่ออะลูมิเนียมในเนื้อเยื่อที่ใช้ทดลองด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ซึ่งเป็นวิธีการใหม่ที่พัฒนาขึ้น สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อสังเกตการตอบสนองของยีนในสภาวะที่มีอะลูมิเนียมในปริมาณต่างๆ ร่วมด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกข้าว (*Oryza sativa L.*) ให้ทนต่ออะลูมิเนียมโดยการฉายแคลลัสจากเมล็ดข้าวด้วยรังสีแกมมา
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนของข้าว (*Oryza sativa* L.) ที่ได้จากการคัดเลือก

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. คัดเลือกแคลลัสจากเมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.)ที่ผ่านการฉายด้วยรังสีแกมมา และสามารถเจริญได้ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีอะลูมิเนียม และมีสภาวะเป็นกรดจัดมาก (pH < 4)
2. ชักนำให้แคลลัสจากเมล็ดข้าวที่ผ่านการคัดเลือกแล้วพัฒนาไปเป็นต้นกล้าในระดับห้องปฏิบัติการ
3. เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในกลุ่มของแคลลัสจากเมล็ดข้าวปกติ และกลุ่มทนอะลูมิเนียม

1.4 ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาและค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2. เพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวที่ในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้คัพภะ (embryo) ของเมล็ดข้าวสามารถสร้างแคลลัสได้
3. ฉายรังสีแคลลัสจากเมล็ดข้าว
4. เพาะเลี้ยงแคลลัสจากเมล็ดข้าวในสูตรอาหารเพื่อการคัดเลือก (selective media) ที่มีอะลูมิเนียมความเข้มข้นต่างๆในสภาวะเป็นกรดจัดมาก (pH < 4)
5. ชักนำให้แคลลัสจากเมล็ดข้าวที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 4 แล้วพัฒนาไปเป็นต้นในระดับห้องปฏิบัติการ
6. เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในกลุ่มของแคลลัสจากเมล็ดข้าวปกติ และกลุ่มทนอะลูมิเนียม

7. วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลการทดลอง

8. เขียนวิทยานิพนธ์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่สามารถทนต่อดินกรดจัดจากอะลูมิเนียม (pH < 4) และได้องค์ความรู้ด้านการแสดงออกของยีนของแคลลัสจากเมล็ดข้าวปกติ และกลุ่มทนอะลูมิเนียมซึ่งสามารถเผยแพร่แก่เกษตรกรเพื่อการนำไปเพาะปลูกในสภาพดินกรด ในธรรมชาติต่อไปได้ เช่น ในเขต จังหวัดปทุมธานี นครนายก และยังช่วยให้คนในระดับรากหญ้ามองเห็นถึงข้อดีของเทคโนโลยีนิวเคลียร์

1.6 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Jianijun zhang [15] ศึกษาถึงการแสดงออกของยีนที่ควบคุมความต้านทานต่ออะลูมิเนียมในข้าวโดยทดลองนำข้าวสายพันธุ์ Xiangnuo 1(XN1) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่ออะลูมิเนียม และสายพันธุ์ Xiangzhongxian(XX2) ซึ่งอ่อนแอต่ออะลูมิเนียม ปลูกในสารละลายอาหาร ที่เติม $AlCl_3$ ความเข้มข้น 100 μM ปรับ pH 4.2 ส่วน control จะไม่เติม $AlCl_3$ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างรากความยาวประมาณ 3-4 เซนติเมตร ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากเติม $AlCl_3$ นำมาสกัด RNA วิเคราะห์ด้วยวิธี DDRT-PCR (differential display reverse transcription PCR) ใน northern bloting เปรียบเทียบกับ control โดยใช้ยีนที่เกี่ยวข้องกับ sulphur metabolism pathway ได้แก่ *SR* (sulphite reductase) พบว่ายีนมีการแสดงออกมากในข้าวสายพันธุ์ XN1 แต่ในพันธุ์ XX2 มีการแสดงออกที่น้อยกว่า

Minocha Rakesh., et al [16] ทดลองเลี้ยงเซลล์ของ red spruce (*Picea rubens*) ในอาหารที่เติมอะลูมิเนียมในรูป $AlCl_3$ ความเข้มข้น 0-1 mM พบว่าหลังจากเซลล์สัมผัสกับอะลูมิเนียมเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำให้เซลล์สูญเสียความมีชีวิต ยับยั้งการเจริญเติบโต และลดการทำงานของไมโทคอนเดรียของเซลล์ โครงสร้างของไซโทพลาสมิด หรือผนังเซลล์ถูกทำลาย ในเซลล์มีปริมาณโปรตีนที่ละลายได้เพิ่มขึ้น ปริมาตรของแวคิลโอล และเซลล์เพิ่มขึ้น โดยปริมาตรของนิวเคลียร์ไม่เปลี่ยนแปลง

Hossain M.F and M.S. Alam [14] ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการเจริญเติบโตของแคลลัสจากเมล็ดข้าวในข้าว (*Oryza sativa*) ด้วยการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 0-6 Gy พบว่าเมื่อปริมาณรังสีเพิ่มขึ้นจะทำแคลลัสมีการพัฒนาไปเป็นต้นลดลง โดยระดับ LD_{50} อยู่ที่ปริมาณรังสี 5 Gy

Hiroyuki koyama., et al [17] ศึกษาผลของอะลูมิเนียมที่ระดับ pH 5.5 ต่อการเจริญเติบโตของราก *Arabidopsis thaliana*. ในสารละลายธาตุอาหาร พบว่าอะลูมิเนียมยับยั้งการยืดยาวของราก

Claudio Sanzonowicz and Thomas Jot Smyth [18] ศึกษาผลของไฮโดรเจนต่อการเจริญเติบโตของรากต้นถั่วเหลืองที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีระดับ pH 3.7-5.5 พบว่าที่ระดับ pH< 4.3 เป็นต้นไปจะยับยั้งการเกิดรากแขนง

ประภา ศรีพิจิตต์ และพรทิพย์ ชีวเศรษฐธรรม [19] ศึกษาถึงผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต สารอินทรีย์และปัจจัยบางอย่างทีมีผลต่อการชักนำให้คัพภะข้าวหอม *(Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สร้างแคลลัสและพัฒนาไปเป็นต้น พบว่าคัพภะที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร Murashige และ Skoog (MS) ที่เติม 2,4-dichorophenoxyacetic acid 2 มก./ล. ร่วมกับ Casein hybrolysate 300 มก./ล. ในสภาพที่มีแสง สามารถสร้างแคลลัสได้ในอัตราสูง (96.3%) แคลลัสเมื่อถูกทำให้แห้งโดยการพักไว้ในจานแก้วที่มีฝาปิดเป็นเวลา 7 วัน จึงย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้น พบว่าแคลลัสสามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ในอัตราที่สูงกว่าแคลลัสที่ย้ายไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นโดยทันทีโดยไม่ได้ทำให้แคลลัสแห้งก่อน

Howeler R.H. and L.F. Cadavid [20] ทดลองคัดเลือกข้าวพันธุ์ปลูกที่ทนทานต่อความเป็นพิษของอะลูมิเนียมในสารละลายธาตุอาหาร เปรียบเทียบกับการคัดเลือกในแปลง พบว่ามีข้าวพันธุ์ปลูกที่ทนทานต่ออะลูมิเนียมจำนวนไม่น้อยที่สามารถผ่านการคัดเลือกในสารละลายธาตุอาหาร โดยใช้ค่าความยาวรากสัมพัทธ์ (relative rootlength (RRL)) ซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่างความยาวเฉลี่ยของรากที่เจริญในอาหารที่เติมอะลูมิเนียม 30 ppm และความยาวเฉลี่ยของรากที่

เจริญในอาหารที่เติมอะลูมิเนียม 3 ppm นอกจากนี้ยังพบอีกว่าระดับของอะลูมิเนียมความเข้มข้นต่ำๆ สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตในข้าวได้

Dameria Hutabarat [21] ศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อการพัฒนาของแคลลัสในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมอะลูมิเนียม โดยการฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณ 0-20 Gy กับแคลลัสจากอับละอองเรณู แล้วนำมาเลี้ยงต่อในอาหารที่เติมอะลูมิเนียมความเข้มข้น 8, 11 และ 14 ppm pH 4.1 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จึงย้ายลงอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น พบว่าที่อะลูมิเนียมความเข้มข้น 8 และ 11 ppm จะกระตุ้นการเกิดต้น ส่วนที่ความเข้มข้น 14 ppm จะยับยั้งการเกิดต้น ในส่วนปริมาณรังสีแกมมาที่ 20 และ 10+10 Gy สามารถกระตุ้นการเกิดต้นได้ ในขณะที่ปริมาณรังสี 40 และ 20+20 Gy แคลลัสไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้เลย โดยแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีปริมาณ 20 Gy ในอาหารที่มีอะลูมิเนียมปริมาณ 11 ppm สามารถพัฒนาเป็นต้นได้มากที่สุด

บทที่ 2
ทฤษฎี

2.1 ข้าว (*Oryza sativa* L.)

ข้าวเป็นพืชอาหารหลักที่นิยมบริโภคของคนทั่วโลก ประเทศไทยมีการบริโภคข้าวภายในประเทศปีละประมาณ 13.6-15.0 ล้านตันข้าวเปลือกหรือร้อยละ 56 ของผลผลิตข้าวทั้งหมดโดยมีการใช้เพื่อบริโภค 10.0-10.5 ล้านตันข้าวเปลือก ใช้ทำพันธุ์ 1.1-1.2 ล้านตันข้าวเปลือก และใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และแปรรูปผลิตภัณฑ์อื่น ๆ 2.2-3.7 ล้านตันข้าวเปลือก ซึ่งการเพิ่มขึ้นของประชากรส่งผลให้ความต้องการบริโภคข้าวของประเทศเพิ่มขึ้น [22] ซึ่งข้าวที่นิยมปลูกเป็นอาหารในประเทศนั้น คือ ข้าวสปีชีส์ (species) *Oryza sativa* L. ส่วนพันธุ์ที่นิยมปลูกนั้นมีอยู่หลายพันธุ์ เช่น ขาวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 60 เป็นต้น แต่เมื่อไม่นานมานี้มีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวขึ้นมาใหม่พันธุ์หนึ่ง คือ ข้าวเจ้าพันธุ์ กข31 (ปทุมธานี 80) ซึ่งได้ปรับปรุงพันธุ์ขึ้นให้มีลักษณะที่ดีขึ้น ดังนี้

2.1.1 ลักษณะประจำพันธุ์

1) เป็นข้าวเจ้าไม่ไวต่อช่วงแสง
2) กอตั้ง ต้นแข็ง ไม่ล้มง่าย ต้นสูงเฉลี่ย 117 เซนติเมตร
3) ใบสีเขียว กาบใบสีเขียว ใบธงตั้งตรง
4) เปลือกเมล็ดสีฟาง เมล็ดไม่มีหาง ท้องไข่น้อย รูปร่างเรียว ระยะพักตัวของเมล็ด 5 สัปดาห์
5) อายุเก็บเกี่ยว 118 วัน เมื่อปลูกโดยวิธีปักดำ และ 111 วัน เมื่อปลูกโดยวิธีหว่านน้ำตม
6) ปริมาณแอมิโลสสูง (27.3-29.8%) ข้าวสุขค่อนข้างแข็งไม่หอม

2.1.2 ผลผลิต

1) เฉลี่ย 745 กิโลกรัม/ไร่ (ปักดำ)
2) เฉลี่ย 738 กิโลกรัม/ไร่ (นาหว่านน้ำตม)

2.1.3 ลักษณะเด่น

1) คุณภาพเมล็ดทางกายภาพสม่ำเสมอกว่าพันธ์สุพรรณบุรี 1 คุณภาพการสีดี
2) ต้านทานเพลี้ยกระโดดหลังขาว ค่อนข้างต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โรคขอบใบแห้ง โรคใบจุดสีน้ำตาล และโรคเมล็ดด่าง
3) กอตั้ง ต้นแข็ง ไม่ล้มง่าย ให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 [23]

2.2. บทบาทของอะลูมิเนียมต่อการเจริญเติบโตของพืช

2.2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างดินกรดกับอะลูมิเนียม

ประเทศไทยมีการกระจาย (distribution) ของดินกรดอยู่ทั่วทั้งประเทศ และมีพื้นที่ถึงประมาณ 44 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ทั้งประเทศ คือประมาณ 228,098 ตารางกิโลเมตร หรือประมาณ 143 ล้านไร่ ดินกรดส่วนใหญ่จะอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งครอบคลุมพื้นที่ประมาณ 65 ล้านไร่ ภาคใต้ประมาณ 27 ล้านไร่ ภาคเหนือและภาคตะวันตกประมาณ 19 ล้านไร่ ภาคกลางประมาณ 25 ล้านไร่ และภาคตะวันออกประมาณ 7 ล้านไร่ [2] โดยความเป็นกรดของดินวัดได้จากปฏิกิริยาดิน (soil pH) ใช้บอกระดับความเป็นกรดเป็นด่างของดินโดยวัดจากค่าความเข้มข้นของ H^+ ที่แตกตัวได้ในสารละลายดิน ดินที่มี pH ต่างกันจะมีระดับความเป็นกรดเป็นด่างแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2.1 [24] ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชอย่างมาก เพราะพืชส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้เป็นปกติในสภาพดินเป็นกรดอ่อนถึงปานกลางคือ pH ระหว่าง 6.0-7.0 [24]

ตารางที่ 2.1 ระดับ pH และระดับความเป็นกรดเป็นด่างของดิน

pH ของดิน	ระดับความเป็นกรดเป็นด่างของ
<4.0	กรดจัดมาก
4.0-4.5	กรดจัด
4.5-5.0	กรดแก่มาก
5.0-5.5	กรดแก่
5.5-6.0	กรดปานกลาง
6.0-6.5	กรดเล็กน้อย
6.5-7.0	ปานกลาง
7.0-7.5	ด่างเล็กน้อย
7.5-8.0	ด่างปานกลาง
8.0-8.5	ด่างแก่
8.5-9.0	ด่างแก่มาก
9.0-9.5	ด่างจัด
>9.5	ด่างจัดมาก

จากการศึกษาและตรวจสอบสภาพความเป็นกรดของดินที่ใช้ทำการเกษตร ที่ระดับความลึก 0-30 เซนติเมตร ระหว่างปี 2535-2536 จำนวน 9,940 ตัวอย่างทั่วทั้งประเทศ พบว่า สภาพความเป็นกรดของดินโดยรวมในประเทศไทย จัดอยู่ในระดับกรดรุนแรง (pH ต่ำกว่า 4.5) 18.6 เปอร์เซ็นต์ และระดับกรดจัด (pH ระหว่าง 4.5- 5.4) 32.4 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าดินของ

ประเทศไทยมากกว่าครึ่งหนึ่งของดินที่ใช้ทำการเกษตร (51 เปอร์เซ็นต์) มี pH ต่ำกว่า 5.5 ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ปริมาณตัวอย่างดิน (%ของตัวอย่าง) ที่ใช้ประโยชน์ในการเกษตรของประเทศไทยที่มีความเป็นกรด-ด่าง ระดับต่าง ๆ [2]

ภาค	จำนวนตัวอย่างดินที่ระดับความเป็นกรด-ด่างต่างๆ(%)					
			กรดปาน			
	กรดรุนแรง	กรดจัด	กลาง	กรดเล็กน้อย	กลาง	ด่าง
	<4.5	4.5-5.4	5.5-6.4	6.5-6.9	7.0	>7.0
ภาคเหนือ	17.52	44.83	27.19	7.16	0.76	2.53
ภาคกลาง	13.49	20.26	17.89	22.39	1.43	24.53
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	23.58	46.51	14.02	20.21	0	5.67
ภาคตะวันออก	47.98	32.88	12.13	5.39	0	1.62
ภาคใต้	35.12	25.78	7.44	21.62	0	10.03
ผลรวมทั้งประเทศ	18.6	32.4	19.7	15.2	0.9	13.2

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของข้าวในดินกรด อาจแตกต่างกันในแต่ละแห่งเมื่อมีปัจจัยอื่นมากระทบซึ่งมีการรวบรวมรายงานและผลการทดลองของนักวิจัยหลายท่านได้ดังนี้ [25]

1) อันตรายจากไฮโดรเจนไอออน (H^+) โดยตรง

2) มี base status ต่ำอาจทำให้ข้าวขาดธาตุอาหารพวกแมกนีเซียม และโปแตสเซียม

3) ปัญหาความเป็นกรดจัดที่ pH ต่ำกว่า 5 มีผลต่อการเจริญ และการแผ่ขยายของรากข้าว คือรากข้าวจะชะงักการเจริญเติบโต ทำให้การดูดธาตุอาหารถูกจำกัด ต้นข้าวไม่สามารถเจริญเติบโตจนถึงระยะให้ผลผลิตได้ และตายในที่สุด

4) สภาพความเป็นกรดจัดจะทำให้มีสารพิษของเหล็ก และอะลูมิเนียมละลายออกมามากจนเป็นพิษต่อข้าวที่ปลูก

5) ขาดธาตุอาหารหลักไนโตรเจน และฟอสฟอรัส เนื่องจากความเป็นกรดจัดของดินทำให้จุลินทรีย์ในดิน ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมย่อยสลายอินทรียวัตถุทำให้มีไนโตรเจนไม่เพียงพอต่อ

ความต้องการของพืชที่ปลูก สำหรับฟอสฟอรัส สภาพความเป็นกรดของดินทำให้ฟอสฟอรัสตรึงอยู่ในรูปของเหล็กและอะลูมิเนียมทำให้พืชไม่สามารถนำมาใช้ได้

6) อันตรายจากพิษของไฮโดรเจนซัลไฟด์ เมื่อยกระดับ pH ของดินกรดให้สูงขึ้น

7) อาจทำให้ปัจจัยทางชีวภาพเกิดผิดปกติ เช่น วัฏจักรไนโตรเจนและกิจกรรมของไมคอร์ไรซา (mycorrhiza) ไม่สมบูรณ์ และอาจเพิ่มความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อราบางชนิด

ต่อมาได้มีการศึกษาพบว่าปัญหาความเป็นกรดของดินไม่ได้เกิดจากไฮโดรเจนไอออน (H^+) ที่แลกเปลี่ยนได้ แต่ความเป็นกรดของดินสัมพันธ์เด่นชัดกับอะลูมิเนียมที่แลกเปลี่ยนได้เป็นประจุบวก โดยไฮโดรเจนไอออนเหล่านี้จะไม่เสถียรในดินอนินทรีย์ ไฮโดรเจนไอออนจะทำปฏิกิริยากับแร่ดินเหนียว เกิดการปลดปล่อยอะลูมิเนียมที่แลกเปลี่ยนได้และกรด siliceous ในดินกรดอนินทรีย์จะพบไฮโดรเจนไอออนที่แลกเปลี่ยนได้ในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น [2]

ความเข้มข้นของอะลูมิเนียมไอออนในสารละลายดินมีผลกระทบต่อพืชมากกว่าความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน [26] มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH ของดินกับค่าความอิ่มตัวด้วยอะลูมิเนียม ในดินอันดับอุลติโซลส์ และออกซิโซลส์ จากเปอร์โตริโก พบว่าค่า pH ของสารละลายดินลดลงค่าความอิ่มตัวด้วยอะลูมิเนียมจะเพิ่มขึ้นดังแสดงในรูปที่ 2.1 [27] โดยค่าวิกฤตของความอิ่มตัวด้วยอะลูมิเนียมมีปริมาณระหว่าง 45-50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทำให้พืชส่วนใหญ่มีผลผลิตต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตสูงสุด [28]

ในสภาพดินกรด pH ของสารละลายดินจะบ่งบอกถึงปริมาณอะลูมิเนียมในสารละลายดินได้เป็นอย่างดี โดยอะลูมิเนียมจะละลายออกมาในรูปของโมโนเมอริกอะลูมิเนียม (monomeric Al) รูปของอะลูมิเนียมจะเปลี่ยนแปลงไปตาม pH ของสารละลายดิน [29] ดังนี้

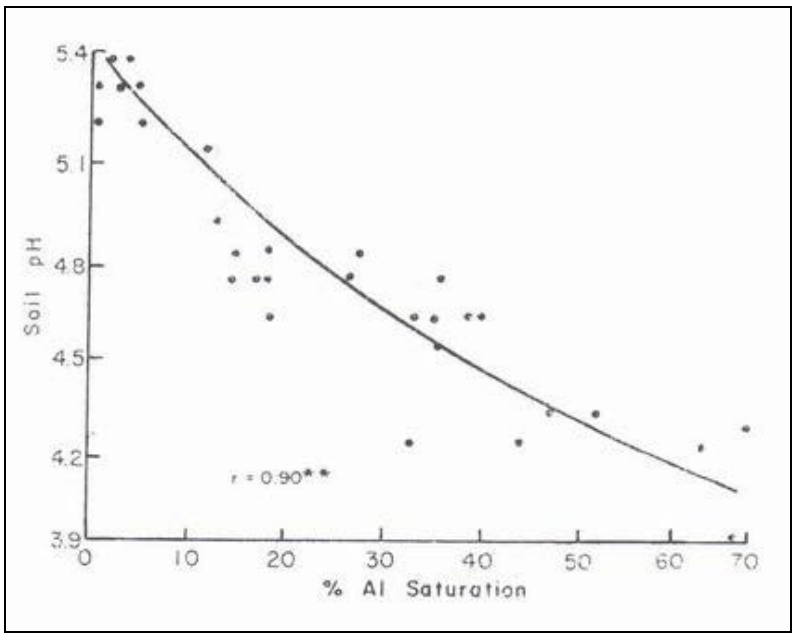
สารละลายดินมี pH < 4.7 จะพบอะลูมิเนียมในรูป Al^{3+} และ $Al(OH)^{2+}$

สารละลายดินมี pH 4.7 - 6.5 จะพบอะลูมิเนียมในรูป $Al(OH)^{2+}$

สารละลายดินมี pH 6.5 – 8.0 จะพบอะลูมิเนียมในรูป $Al(OH)_3^{0}$

สารละลายดินมี pH > 8.0 จะพบอะลูมิเนียมในรูป $Al(OH)_4^{1-}$

โดยเฉพาะที่ pH ต่ำกว่า 4.4 ลงไป ปริมาณอะลูมิเนียมไอออนจะเพิ่มขึ้นอย่างมากในสารละลายดินส่งผลต่อการเจริญเติบโตของข้าว [30]



รูปที่ 2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH ของดินกับค่าความอิ่มตัวด้วยอะลูมิเนียม ในดินอันดับอุลติโซลส์ และออกซิโซลส์ จากเปอร์โตริโก

2.2.2 อิทธิพลของอะลูมิเนียมต่อการเจริญเติบโตของพืช

ในสภาวะที่ pH ต่ำอะลูมิเนียมจะอยู่ในรูปที่เป็นพิษต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต คืออยู่ในรูป trivalent (Al^{3+}) [4] ซึ่งลักษณะอาการที่พืชแสดงออกเมื่อได้รับอะลูมิเนียมในปริมาณที่มากเกินไปแตกต่างกันตามชนิดของพืช แต่ลักษณะที่เหมือนกันทุกพืชก็คือ ลักษณะอาการที่เกิดกับราก [31] ดังนั้นลักษณะที่พืชแสดงอาการที่ใบไม่สามารถบอกได้ว่าเกิดจากความเป็นพิษของอะลูมิเนียมหรือขาดธาตุอาหารโดยตรงยกเว้นต้องขุดรากขึ้นมาดู [32]

การแสดงออกของพืชเมื่อได้รับพิษจากอะลูมิเนียมจะสังเกตได้ในรากเป็นอันดับแรก เนื่องจากเป็นส่วนที่สัมผัสกับอะลูมิเนียม โดยเฉพาะส่วนของผนังเซลล์ (cell wall) [4] พบว่า 85-99.9% ของอะลูมิเนียมจะสะสมอยู่บริเวณของผนังเซลล์ของรากพืช เช่น บาร์เลย์ *Chara coralline* [33, 34] ซึ่งอะลูมิเนียมจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชทางด้าน สัณฐาน สรีระ และชีวเคมีของพืช ดังนี้

1) อะลูมิเนียมยับยั้งการยืดยาวของเซลล์ และการแบ่งเซลล์ของราก [35] จึงทำให้ดูดธาตุอาหารลดลง [36]

2) อะลูมิเนียมทำให้การหายใจของเซลล์ลดลง จึงขัดขวางการดึงดูดไอออนทุกชนิด [36]

3) อะลูมิเนียมไปเพิ่มความหนืด (viscosity) ของโพรโทพลาซึมในเซลล์ของรากพืช ทำให้ permeability ต่อเกลือทุกชนิดลดลง [36]

4) อะลูมิเนียมไป blocks, neutralize หรือเปลี่ยน (reverse) พวกไอออนประจุลบในรู (pore) ในช่องว่างอิสระ (free space) ระหว่างเซลล์พืชทำให้ความสามารถในการเกาะ (binding ability) กับแคลเซียม ของรูเหล่านั้นลดลง [36]

5) อะลูมิเนียมไปแย่งที่ใน binding sites ทั่ว ๆ ไปที่ผิวราก หรือใกล้ ๆ ผิวราก ทำให้การดึงดูดโพแทสเซียมแคลเซียม แมกนีเซียม และทองแดงลดลง [36]

6) อะลูมิเนียมรบกวนการทำหน้าที่ของเอนไซม์บางชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสะสม polysaccharides ในผนังเซลล์ ลดความแข็งแกร่งของผนังเซลล์โดยอะลูมิเนียมไปเกาะกับเพคติน [36]

7) อะลูมิเนียมขัดขวางการดึงดูดธาตุอาหาร P Ca Mg K Zn Cu Fe และ Mn ทำให้พืชขาดธาตุอาหารดังกล่าว [8]

8) อะลูมิเนียมจะไปเกาะจับกับ DNA (deoxyribonucleic acid) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมทำให้เกิดการยับยั้งการแยกตัวของ DNA สายคู่ (double helix) มีผลต่อการแบ่งเซลล์ของพืช [37]

จากความเป็นพิษของอะลูมิเนียมในดินกรดทำให้การปลูกพืชโดยทั่วไปนั้นเกิดปัญหาจึงต้องยกระดับ pH ให้สูงขึ้นเพื่อลดปริมาณอะลูมิเนียมที่จะละลายออกมาในสารละลายดิน ซึ่งโดยทั่วไปจะมี 2 กรรมวิธีใหญ่ ๆ ได้แก่

1) <u>การจัดการด้านน้ำ</u> การใช้น้ำชะล้างความเป็นกรด เป็นการใช้น้ำชะล้างดินเพื่อล้างกรดทำให้ค่า pH เพิ่มขึ้นโดยวิธีการปล่อยน้ำให้ท่วมขังแปลงแล้วระบายออกประมาณ 2-3 ครั้งโดยทิ้งช่วงการระบายน้ำประมาณ 1-2 สัปดาห์ต่อครั้ง ดินจะเป็นกรดจัดในช่วงดินแห้งหรือฤดูแล้งดังนั้นการชะล้างควรเริ่มในฤดูฝนเพื่อลดปริมาณการใช้น้ำในชลประทานการใช้น้ำชะล้างความเป็นกรดต้องกระทำต่อเนื่องและต้องหวังผลในระยะยาวมิใช่กระทำเพียง 1-2 ครั้งเท่านั้นวิธีการนี้เป็นวิธีการที่ง่ายที่สุด แต่จำเป็นต้องมีน้ำมากพอที่จะใช้ชะล้างดินควบคู่ไปกับการควบคุมระดับน้ำใต้ดินให้อยู่เหนือดินเลนที่มีไพไรต์มากจากกระบวนการสร้างดิน เมื่อล้างดินกรดให้คลายลงแล้วดิน

จะมีค่า pH เพิ่มขึ้นอีกทั้งสารละลายเหล็กและอะลูมิเนียมที่เป็นพิษเจือจางลงจนทำให้พืชสามารถเจริญเติบโตได้ดี [38]

2) <u>การจัดการด้านดิน</u> โดยทั่วไปจะทำการปรับปรุงดินให้อยู่ในช่วง pH 6.0-6.5 ซึ่งเหมาะแก่การเจริญเติบโตของพืช โดยการเติมปูนเป็นวัสดุปรับปรุงดิน [2] ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถแก้ไขปัญหาดินกรดที่รวดเร็วที่สุด โดยชนิดของปูนที่ใช้ในการปรับปรุงดินในทางเกษตรที่นิยม ได้แก่ หินปูน (limestone) โดโลไมท์ (dolomite) ปูนมาร์ล์ (marl) ยิปซัม (Gypsume) [39]

เมื่อใส่วัสดุปูนลงไปในดินที่มีความชื้นจะแตกตัวให้ OH^- หรือ CO_3^{2-} แล้วแต่วัสดุปูนที่ใส่ ทำปฏิกิริยากับ H^+ ในสารละลายดินกรดเพื่อให้เป็นกลางส่วน Ca^{2+} จะเข้าไปแทนที่พวกที่กรดที่ถูกดูดซับที่คอลลอยด์ดิน ทั้ง Al^{3+} และ H^+ เพื่อให้ออกมาทำปฏิกิริยากับ OH^- จนกระทั่งปริมาณของ Al^{3+} และ H^+ ลดลงตามปริมาณปูนที่ใช้ ทำให้ pH ของดินเพิ่มขึ้น [32] แต่การใช้วิธีดังกล่าวเกษตรกรต้องรู้สภาพปัญหาของดินว่าอยู่ในระดับไหน จึงจะทราบว่าต้องใส่ปูนชนิดไหน ปริมาณเท่าใด เพื่อป้องกันสภาพปัญหาเกินปูน (over liming) ทำให้ดินมีสภาพเป็นด่าง ต้องใส่ปูนก่อนปลูกพืชประมาณ 2 สัปดาห์เพื่อป้องกันความร้อนจากปฏิกิริยาปูนกับดิน [39]

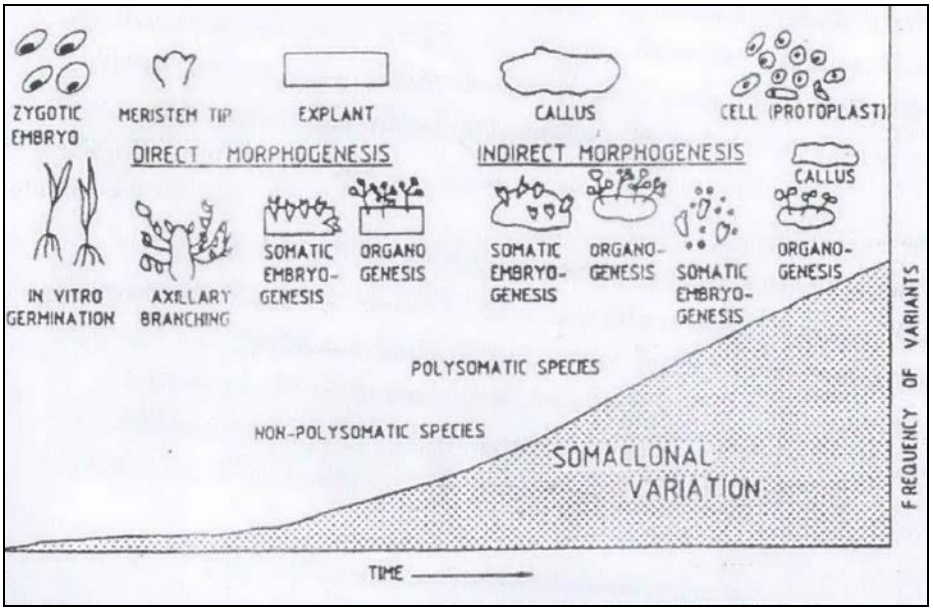
วัสดุปูนสามารถเคลื่อนที่ได้น้อยในระยะชั้นไถพรวน (15 เซนติเมตร) เท่านั้นไม่สามารถเคลื่อนที่ลงสู่ดินล่างได้ทำให้รากพืชไม่สามารถแผ่ขยายได้ [40] มีการศึกษาผลการใช้วัสดุปูนในการทำนา พบว่าเกษตรกรมีการยอมรับการใช้ปูนว่าสามารถเพิ่มผลผลิตข้าว แต่ไม่สามารถลงทุนด้วยตัวเองได้ เนื่องจากไม่มีเงินลงทุนเพียงพอและมีความเสี่ยงในการปลูกข้าวแต่ละปีสูง [41]

2.3 เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสีเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช

2.3.1 เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น ใบ ตายอด ตาข้าง เนื้อเยื่อ หรือเซลล์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วย แร่ธาตุ น้ำตาล วิตามิน และสารควบคุมการเจริญเติบโตนอกจากนี้ยังต้องทำการเพาะเลี้ยงในสภาพที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ และในสภาวะที่สามารถควบคุมสิ่งแวดล้อมได้ ได้แก่ อุณหภูมิ แสง และความชื้น ซึ่งชิ้นส่วนของพืชดังกล่าวจะมีการเจริญเติบโตและพัฒนาในรูปแบบต่างๆ เช่น เกิดเป็นยอด เกิดเป็นราก เกิดเป็นเอมบริโอ หรือเกิดเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า “แคลลัส” ซึ่งเป็นเซลล์พื้นฐานที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มยังไม่กำหนดทิศทางการเปลี่ยนแปลงหรือพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อหรืออวัยวะใด ที่สามารถชักนำให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ที่สมบูรณ์จำนวนมากได้ [42]การนำเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไปใช้

ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช (plant improvement) สามารถสร้างพันธุ์ต่าง ๆ ได้ตามต้องการ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถสร้างการแปรผัน (variation) ได้ ทำให้เราสามารถได้รับพืชสายพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะบางประการตามต้องการด้วยเทคโนโลยีนี้ [43] ซึ่งเรียกการแปรผันของพืชที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อโดยเฉพาะว่า "การแปรผันของเซลล์ร่างกาย (somaclonal variation)" เนื่องจากเป็นการแปรผันที่เกิดขึ้นในเซลล์ร่างกาย (somatic cell) ของพืชจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ หรือแคลลัส (callus) [44] ซึ่งในปัจจุบันนี้คำว่า "การแปรผันของเซลล์ร่างกาย" ได้ถูกนำมาใช้กันโดยทั่วไปในความหมายสำหรับสายพันธุ์แปรผันหรือผลจากการแปรผัน (variant) ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในทุกรูปแบบ [45] โดยปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแปรผันของเซลล์ร่างกาย พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งยังไม่มีการจัดระบบ เช่น โพรโทพลาสต์ (protoplast) หรือแคลลัส จะพบการแปรผันมากกว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งมีการจัดระบบแล้ว (รูปที่ 2.2) และพบว่าความเค้น (stress) เช่น ความเค็ม และสภาวะกรด ในขณะเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถชักนำให้เกิดการแปรผันของเซลล์ร่างกายได้ [45, 46]



รูปที่ 2.2 การเกิดโซมาโคลนอลแวริเอชัน (somaclonal variation) จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ [47]

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการชักนำผ่านสภาพการเป็นแคลลัสมาก่อน เป็นวิธีการที่มีการนำมาใช้ในการคัดเลือกพืชให้ทนทานต่อสภาวะต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง ได้แก่

Hossain Zahed., et al [48] การคัดเลือก *Chrysanthemum morifolium.* ให้ทนต่อความเค็ม โดยการคัดเลือกแคลลัสในอาหารที่เติม NaCl

สุริยันต์ ฉะอุ่ม และคณะ [49] การคัดเลือกพันธุ์ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลโฟเสทโดยการเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่เติมไกลโฟเสทความเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์ เป็นเวลา 4-8 สัปดาห์ สามารถชักนำให้แคลลัสที่รอดเป็นต้นได้

การใช้เทคโนโลยีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนทานต่อพิษของอะลูมิเนียมในสภาวะที่เป็นกรดนั้น มีรายงานว่าเทคนิคนี้มีหลักการใช้อยู่ 3 อย่าง คือ เพื่อคัดเลือกต้นที่มีจีโนไทป์ที่ทนทานต่ออะลูมิเนียม เพื่อระบุผลของการแปรผันของเซลล์ร่างกายเมื่อความทนทานเพิ่มขึ้น และเพื่อตรวจสอบการตอบสนองของเซลล์ต่อความเป็นพิษของอะลูมิเนียม [50] ได้มีการนำเทคนิคนี้มาใช้ในการคัดเลือกพืชหลายชนิดให้ทนอะลูมิเนียม ได้แก่

Srinives P., et al [51] การคัดเลือกถั่วเหลืองโดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่เติมอะลูมิเนียมในรูป $AlCl_3$ พบว่าแคลลัสของถั่วเหลืองพันธุ์ สจ.4 และ สจ.5 สามารถทนต่อความเป็นพิษของอะลูมิเนียมได้ที่ระดับความเข้มข้น 40 และ 60 mg/l

Parrot W.A. and Bouton J.H. [52] การคัดเลือกแคลลัสพันธุ์อัลฟัลฟาที่มีความทนทานต่ออะลูมิเนียมในอาหารสูตรที่เติมอะลูมิเนียมในรูป $AlCl_3$ ระดับความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ ลดความเป็นกรด-ด่างของอาหารลงเหลือ pH 4.0 เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสามารถแยกแคลลัสที่ทนทานต่ออะลูมิเนียมได้โดยไม่ต้องเสียเวลาคัดเลือกนาน

2.3.2 การฉายรังสีเพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ได้พันธุ์ทนทาน/ต้านทานต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาวะที่สามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมให้สม่ำเสมอได้ เช่น ต้องการสร้างสายพันธุ์พืชทนทานต่อสภาพดินเค็มสามารถทำได้โดยเติมโซเดียมคลอร์ไรด์ในอาหารเพาะเลี้ยงแล้วทำการคัดเลือกเซลล์ที่มีการรอดชีวิตซึ่งก็คือเซลล์ที่มีความแปรผันทางพันธุ์กรรม (variant cell) ถ้านำมาเพาะเลี้ยงต่อไปแล้วเซลล์นั้นยังคงลักษณะทนทานไว้ได้แสดงว่าเป็นเซลล์ที่

เกิดการกลายพันธุ์ (mutated cell) จะได้พืชพันธุ์ใหม่ ซึ่งนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้ [53] แต่เนื่องจากอัตราการกลายเกิดเอง (spontaneous mutation) มีค่าต่ำมาก จึงได้มีการชักนำการกลาย (induced mutation) เพื่อเพิ่มทั้งอัตรา และความถี่ของการกลาย [44 ,54]

สิ่งชักนำการกลาย แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ สิ่งชักนำการกลายทางกายภาพ (physical mutagen) เช่น รังสีแกมมา รังสีอัลตราไวโอเลต และอนุภาคนิวตรอน โดยจะก่อให้เกิดการแตกหักของโครโมโซม [55] และสิ่งชักนำการกลายทางเคมี (chemical mutagen) ซึ่งแบ่งตามปฏิกิริยาที่เข้าทำอันตรายต่อ DNA ได้เป็น 7 ชนิดใหญ่ ๆ และยังมีสารเคมีอีกหลายชนิดที่ไม่สามารถจัดเข้าไว้ในหมวดหมู่ใด ๆ ได้ เช่น ethylmethansulphonate (EMS), aflatoxin B1, actinomycin D, 5-bromouracil (5-Bu), nitrous acid (HNO_2), caffeine (56) แต่เนื่องจากสิ่งก่อกลายพันธุ์เคมีหลายชนิดเป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้นในปัจจุบันจึงหันมาใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์กายภาพโดยเฉพาะรังสีเพิ่มสูงขึ้น

รังสีแกมมา (gamma ray)ได้รับความนิยมในการนำมาใช้เพื่อการกลายพันธุ์ในพืช เนื่องจากรังสีแกมมามีความยาวคลื่นต่ำจึงมีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านวัตถุได้สูง [57] ในรูปแบบเฉียบพลัน (acute) หรือเรื้อรัง (chronic) ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการแปรผันทางพันธุกรรม ทำให้สามารถคัดเลือกลักษณะตามต้องการได้ การชักนำการกลายจึงช่วยเพิ่มความเป็นไปได้ของลักษณะสืบสายพันธุ์ที่มีความสำคัญเชิงเศรษฐกิจซึ่งไม่อาจพบได้ตามธรรมชาติหรืออาจสูญหายไประหว่างวิวัฒนาการ [58] นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้รังสีมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้สารเคมีในแง่ของการที่ไม่ต้องขจัดหรือล้างสิ่งก่อการกลายออกไป [59]

2.3.2.1 ปฏิกิริยาระหว่างรังสีกับเซลล์

รังสีแกมมาจัดอยู่ในกลุ่มของ ionizing radiation เนื่องจากมีคุณสมบัติเบื้องต้นในการทำให้เกิด ionization แก่อะตอม หรือโมเลกุลที่ได้รับรังสี [60] รังสีแกมมาเป็นคลื่นที่มีพลังงาน ดังนั้นเมื่อเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางจะถ่ายเทพลังงานให้กับตัวกลางนั้น โดยในส่วนของพืชนั้นตำแหน่งที่สำคัญ คือ เซลล์แต่ละเซลล์ของพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์ที่กำลังมีการแบ่งตัว และภายในเซลล์พืชโครโมโซมจะเป็นเป้าที่สำคัญ นอกจากนี้ในส่วนประกอบอื่น ๆ ที่ประกอบขึ้นเป็นเซลล์พืชก็จะได้รับพลังงานของรังสีไว้ด้วย ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ 2 ลักษณะ [61] ดังแสดงในรูปที่ 2.3 [62] คือ

1) <u>ปฏิกิริยาจากรังสีโดยตรง</u> คือ ผลกระทบจากรังสีที่เกิดเมื่อรังสีทำให้เกิด ionization และถูกดูดกลืนใน macromolecule ภายในเซลล์ (เช่น DNA, RNA, โปรตีน, เอนไซม์ เป็นต้น) ทำให้

โครงสร้าง ของ macromolecules เกิดความผิดปกติ ชักนำและเป็นจุดเริ่มต้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยา

2) ปฏิกิริยาจากรังสีโดยอ้อม คือ ผลกระทบเมื่อรังสีทำให้โมเลกุลโปรตีนและน้ำในเซลล์เกิด ionization โมเลกุลที่เกิดปฏิกิริยาทางอ้อมนี้มากที่สุดคือน้ำ ทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีเป็นอนุมูลอิสระ (free radicals) และเกิดสารประกอบ peroxide เมื่อมีปฏิกิริยาจำนวนมากจะเกิดการทำลายต่อเซลล์เมื่อสารประกอบ peroxide (H_2O_2) มีมากเกินไป [62] ตัวอย่างของการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ของพืช [61] เช่น

$$
\begin{aligned}
H_2O &\xrightarrow{h\nu} H_2O + e^- \\
e^- + H_2O &\longrightarrow H_2O^- \\
H_2O^+ &\longrightarrow H^+ + OH^0 \\
H_2O^- &\longrightarrow H^+ + OH^- \\
OH^0 + OH^0 &\longrightarrow H_2O_2
\end{aligned}
$$

2.3.3.2 ผลกระทบของรังสีในระดับเซลล์

ผลของรังสีในระดับเซลล์ แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ ผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์ และผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ [56]

1) ผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์

การที่เซลล์ได้รับรังสีปริมาณน้อยๆ จะทำให้เซลล์เกิดความล่าช้าในการแบ่งตัวของเซลล์ โดยรังสีไปทำให้มีการลดจำนวนเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวลง เรียกว่า ไมโตติกดีเลย์ (mitotic delay) ซึ่งจะเป็นอยู่ในช่วงหนึ่งภายหลังเซลล์ได้รับรังสี หลังจากนั้นเซลล์จะเริ่มกิจกรรมมีการแบ่งตัวใหม่เพิ่มจำนวนเซลล์โดยการแบ่งตัวแบบไมโตซิสขึ้น เรียกว่า ไมโตติคโอเวอร์ชูต (mitotic overshoot) ความล่าช้าในการแบ่งตัวของเซลล์ มีสาเหตุหลายประการ เช่น สารเคมีที่เกี่ยวข้องในการแบ่งเซลล์ถูกกระทบกระเทือน โดยรังสีอาจไปทำให้กระบวนการสร้างโปรตีนหยุดชะงักไม่มีการสร้างโปรตีนขึ้นมาใช้ในการแบ่งเซลล์ กระบวนการเข้ามารวมกลุ่มกันของโครโมโซม (chromosome assembly) ล่าช้าลงหรือเพิ่มความเหนียว (stickiness) ให้กับโครโมโซมทำให้โครโมโซมมีความยากลำบากในการแยกจากกันเพื่อไปสู่เซลล์ที่เกิดใหม่ (daughter cells) อย่างไรก็ตาม ความล่าช้า

ของเซลล์ในการเข้าสู่ไมโตซิสขึ้นอยู่กับปริมาณรังสีที่เซลล์ได้รับ และระยะของเซลล์ในขณะได้รับรังสีบางระยะ (stage of cell cycle) จะไวต่อรังสีมากกว่าระยะอื่น ๆ อย่างใดอย่างหนึ่ง รังสีในปริมาณสูงทำให้เซลล์หยุดชะงักการแบ่งตัวอย่างถาวร และไม่มีการฟื้นคืนกลับมาทำหน้าที่ได้อย่างเดิม ในที่สุดเซลล์จะตาย เซลล์อื่นที่ไม่ตายอาจแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเข้ามาแทนที่เซลล์ที่ตายได้ ในบางกรณีพบว่าเซลล์ที่ผ่านการฉายรังสีสามารถแบ่งตัวตามปกติได้ หลายครั้งหลังจากนั้นเซลล์จึงจะตาย

2) ผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์

การที่รังสีทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการเมตตาบอลิซึมของเซลล์น่าจะเป็นผลต่อเนื่องจากการที่รังสีทำอันตรายต่อเยื่อหุ้มต่าง ๆ ภายในเซลล์และเอนไซม์ ตัวอย่าง เช่น รังสีทำอันตรายกับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหายใจ อันเป็นผลเนื่องมาจากรังสีทำอันตรายต่อเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียซึ่งมีเอนไซม์เกาะติดอยู่ทำให้เอนไซม์ได้รับความกระทบกระเทือนด้วยการควบคุมการเข้าออกของสารผ่านเซลล์โดยวิธีแอกทีพทรานสปอร์ตเป็นไปอย่างยากลำบาก เช่น เมื่อเซลล์รากพืชได้รับรังสีเซลล์รากพืชจะดูดซึมไอออนได้น้อยลง [63]

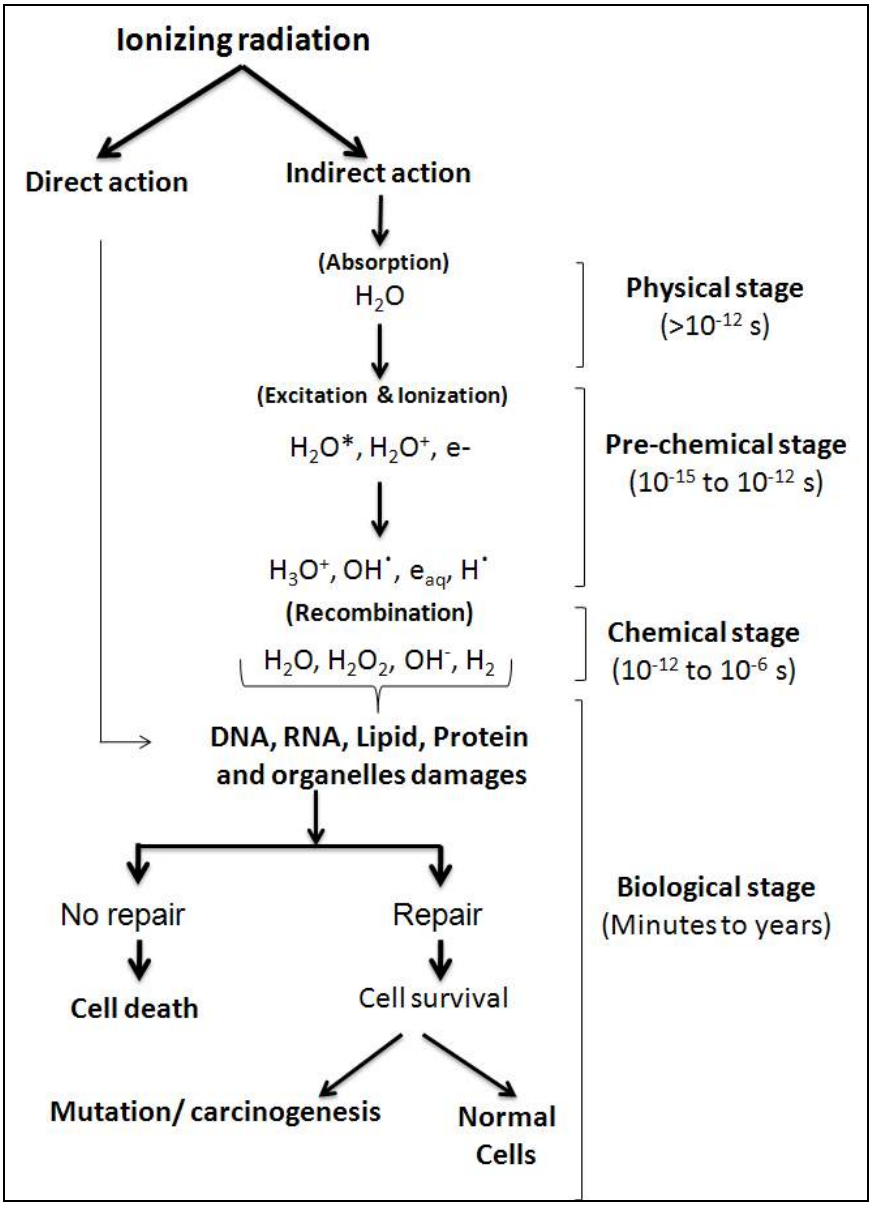
งานวิจัยที่ใช้รังสีแกมมาในการปรับปรุงพันธุ์พืชที่มีประโยชน์อย่างเห็นได้ชัด ได้แก่

ข้าวพันธุ์ กข6 ได้จากการนำข้าวขาวดอกมะลิ 105 ฉายรังสีแกมมาขนาด 200 เกรย์ คัดเลือกจนได้พันธุ์ข้าวเหนียวที่ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์เดิมถึงร้อยละ 23 มีความต้านทานต่อโรคไหม้และโรคใบจุดสีน้ำตาล [64]

ข้าวพันธุ์ กข15 ได้จากการนำข้าวขาวดอกมะลิ 105 ฉายรังสีแกมมาขนาด 150 เกรย์ คัดเลือกจนได้พันธุ์ข้าวเจ้าหอมเหมือนพันธุ์เดิม ต้นเตี้ยกว่า ผลผลิตเพิ่มขึ้นร้อยละ 4.6 ทนแล้งได้ดี [64]

ลักษณะที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมา ได้นำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตามการแปรผันที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นลักษณะที่เกิดอย่างอิสระ ไม่สามารถควบคุมบังคับให้ได้ลักษณะที่ต้องการโดยจำเพาะเจาะจงได้

อย่างไรก็ตามได้มีผู้ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการฉายรังสี ได้แก่ การชักนำข้าวพันธ์ปลูก (cultivar) Basmati 370 ให้ทนต่อความเค็มด้วยการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 50 เกรย์ กับแคลลัส [65]



รูปที่ 2.3 การเกิดปฏิกิริยารังสีโดยตรงและโดยอ้อมต่อเซลล์

2.4 การแสดงออกของยีน (gene expression) ที่ระดับโมเลกุล

2.4.1 การแสดงออกของยีน (gene expression)

การแสดงออกของยีน หมายถึง การถอดรหัสพันธุกรรมของยีนจาก DNA เป็น mRNA แล้วเกิดการแปลรหัสเป็นโปรตีน รหัสพันธุกรรมของยีนในดีเอ็นเอ เป็นตัวกำหนดชนิดของโปรตีนที่เซลล์สร้างโดยเริ่มจากการถอดรหัสพันธุกรรมที่อยู่ในดีเอ็นเอเป็น mRNA ในนิวเคลียสและแปลรหัสเป็นโปรตีนในไซโตพลาสซึมซึ่งโปรตีนนี้มีความเกี่ยวข้องในทุกกระบวนการของสิ่งมีชีวิต [66]

ยีน (gene) คือส่วนของ DNA ที่บรรจุข้อมูลทางพันธุกรรม (genetic information) สำหรับการสังเคราะห์ RNA ชนิดใดชนิดหนึ่ง DNA ทั้งหมดในเซลล์เรียกว่าจีโนม (genome) DNA และ RNA เป็นพอลีนิวคลิโอไทด์ทั้งคู่แต่มีหน้าที่และวิธีการสังเคราะห์แตกต่างกันโดย DNA เปรียบเสมือนเป็นคลังของข้อมูลทางพันธุกรรมซึ่งต้องเก็บรักษาไว้อย่างดี การสังเคราะห์เพื่อส่งไปยังเซลล์ใหม่ต้องถอดแบบออกให้ครบชุดเรียกว่า DNA replication เพื่อให้เซลล์ใหม่นั้นได้รับข้อมูลทางพันธุกรรมครบถ้วนสำหรับการดำรงชีวิตส่วน RNA นั้นเป็นข้อมูลทางพันธุกรรมเพียงส่วนหนึ่งของ DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมาเพื่อใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนบางอย่างที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตหรือการดำรงชีวิตของเซลล์ในระยะใดระยะหนึ่งเมื่อหมดหน้าที่แล้ว RNA นั้น ๆ ก็จะสลายไปและถ้ามีความจำเป็นก็สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ได้อีก [67]

โครงสร้างหลักของยีน ประกอบด้วยส่วนหลัก 2 ส่วน คือ [68]

<u>เอ็กซอน</u> (exon) หมายถึงลำดับเบสบนโมเลกุล DNA ที่สามารถถอดรหัสเป็น mRNA ได้

<u>อินทรอน</u> (intron) หมายถึงลำดับเบสที่แทรกอยู่ระหว่างเอ็กซอนซึ่งจะถูกตัดออกจาก RNA หลังการถอดรหัส และไม่เป็นส่วนหนึ่งของ mature mRNA

ยีนมีการแสดงออกที่ระดับโมเลกุลเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1) การถอดรหัส (transcription) เป็นกระบวนการคัดลอกรหัสพันธุกรรมจาก DNA ไปยัง messenger RNA (mRNA) ซึ่งเกิดในนิวเคลียสของเซลล์ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ

- กระบวนการเริ่มต้น (initiation) เริ่มการคลายเกลียวของสาย DNA จากนั้นสาย DNA 3’ ⟶ 5' จะถูกใช้เป็นสายต้นแบบในการถอดรหัสพันธุกรรมเพื่อสังเคราะห์สาย RNA เรียกสาย DNA สายต้นแบบนี้ว่า sense strand DNA

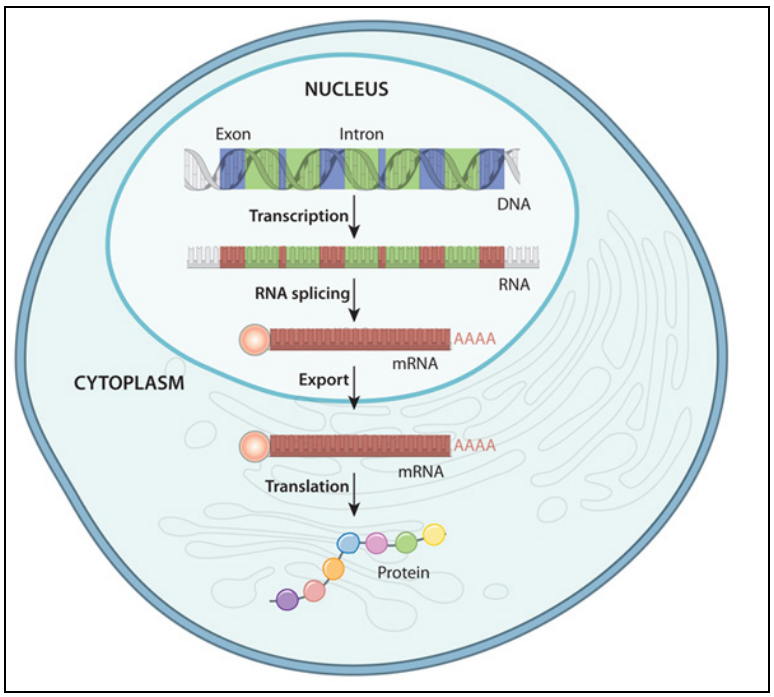
- กระบวนการต่อสายยาว (elongation) RNA polymerase มาจับที่จุดเริ่มต้นของยีนที่ด้าน 5' ที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ของ DNA และเริ่มถอดรหัสที่โคดอนเริ่มต้น RNA polymerase จะเคลื่อนที่และเติมนิวคลีโอไทด์ต่อไป แต่ใน RNA จะมีการทดแทนเบส T (thymine) ใน DNA ด้วยเบส U (uracil) โดยลำดับเบสของ RNA เป็นเบสคู่สม (complementary) กับ DNA แม่แบบที่ถูกใช้คัดลอกรหัส

- กระบวนการสิ้นสุดการสังเคราะห์ (termination) RNA polymerase จะแยกจาก DNA และ DNA จะกลับมาพันเกลียวกันใหม่จะได้สาย RNA ที่สังเคราะห์ขึ้นเป็นสายเดี่ยว

การสังเคราะห์ RNA นั้นจะได้ polynucleotide ซึ่งยังทำหน้าที่ไม่ได้ต้องมีการเปลี่ยนแปลงบางประการจะมีการดัดแปลงรูปร่างของสาย RNA เพื่อเพิ่มความคงตัวและไม่ให้ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์นิวคลีเอสนอกจากนี้ยังส่งผลให้สาย RNA เคลื่อนที่ออกจากนิวเคลียสไปสู่ไซโตพลาสซึมได้ง่ายขึ้นผ่านกระบวนการ RNA processing โดยตัดเอาอินทรอนออกไปและนำเอ็กซอนมาเชื่อมต่อกัน เติม polyadenylation เป็นการเติมเบส A หลายตัว (poly A) tail ที่ปลาย 3' RNA ที่ได้เรียกชื่อใหม่ว่า mRNA และพร้อมที่จะออกนอกนิวเคลียสโดยผ่านทางนิวเคลียร์พอร์ (nuclear pore) เพื่อออกไปสู่ไซโตพลาสซึม

2) การแปลรหัส (translation) เป็นกระบวนการแปลรหัสจาก mRNA เป็นโปรตีน ซึ่งกระบวนการที่เกิดขึ้นที่ไรโบโซมในไซโตพลาสซึมของเซลล์ โดยมีทรานสเฟอร์ อาร์เอ็นเอ (transfer RNA, tRNA) จะอ่านเบสของ mRNA จากจุดที่เป็นรหัสเริ่มต้น (initiation codon) คือ AUG แล้วอ่านไปทีละ 3 เบส โดยทุก ๆ 3 เบส จะมีรหัสตรงกับ tRNA 1 ชนิด และ tRNA แต่ละชนิดก็จะนำกรดอะมิโน (amino acid) จำเพาะมาต่อเป็นสายโปรตีน การสังเคราะห์โปรตีนจะดำเนินการไปเรื่อย ๆ จนกระทั่ง tRNA อ่านมาถึงโคดอน UGA, UAA, UAG ซึ่งเป็นโคดอนหยุด (stop codon) ที่จะไม่มีกรดอะมิโนจับอยู่ กระบวนการแปลรหัสก็จะหยุดและการสร้างสาย polypeptide ก็จะเสร็จสิ้น

สาย polypeptide ที่สร้างเสร็จจะออกมาในไซโตพลาสซึม และถูกปรับปรุงเพิ่มเติมในที่สุดก็จะได้เป็นโปรตีนที่สามารถทำหน้าที่ได้อย่างสมบูรณ์ ดังแสดงใน รูปที่ 2.4 [69]



รูปที่ 2.4 กระบวนการสังเคราะห์สาย polypeptide

2.4.2 การศึกษายีนที่ตอบสนองต่ออะลูมิเนียม (aluminium responsive genes)

การแสดงออกของยีนในพืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่ดินมีปริมาณอะลูมิเนียมที่เป็นพิษต่อพืชสูงมากนั้นย่อมมีกลไกภายในแตกต่างจากการเจริญเติบโตของพืชในสภาวะปกติ เนื่องจากในธรรมชาติเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วยปัจจัยต่าง ๆ จะมีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นในระดับโมเลกุล เช่น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน ปริมาณโปรตีน และระดับการแสดงออกของยีน เป็นต้น ซึ่งผลของการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลนี้ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์ที่สังเกต และวัดได้ง่าย เช่น การเปลี่ยนแปลงขนาด รูปร่าง ความสูง และการเจริญเติบโต เป็นต้น แต่การวัดการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลยุ่งยาก และมีเทคนิคซับซ้อน จึงได้มีการพัฒนาเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ขึ้นมาใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอในหลอดทดลอง จากปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่แบบ (DNA template) เพียงเล็กน้อย จนได้ผลผลิตเป็นพันล้านโมเลกุล [68] อย่างไรก็ดี PCR แบบดั้งเดิม (conventional PCR) มีข้อจำกัดในการใช้อยู่หลายประการ ได้แก่

1) เทคนิค PCR แบบดั้งเดิม ต้องใช้เวลาหลายชั่วโมงในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลองด้วยเครื่อง Thermal Cycler และต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis ทำให้รู้ผลช้าเกินกว่าที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยใน

ห้องปฏิบัติการที่ต้องการผลเร่งด่วนได้ นอกจากนี้เทคนิค Agarose Gel Electrophoresis ยังทำให้เกิดการฟุ้งกระจายและการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วไปทั่วบริเวณ (carry over contamination) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) ได้ [70]

2) การตรวจสอบความแม่นยำและถูกต้องของกระบวนการ PCR ทำโดยใช้วิธี dot blot เช่น Southern blot hybridization วิธีนี้ต้องใช้ดีเอ็นเอตรวจตาม (DNA probe) ที่ติดฉลากด้วยสารรังสี เข้า hybridize กับ ดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนแล้ว ซึ่งต้องใช้เวลานานประมาณ 2-3 วัน ทำให้เกิดการฟุ้งกระจายและปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว [70]

3) กระบวนการ PCR แบบดั้งเดิมสามารถบอกได้เพียงว่ามีดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่ในสิ่งส่งตรวจหรือไม่เท่านั้น ไม่สามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นได้

จากข้อจำกัดข้างต้นจึงได้พัฒนาเทคนิค real time PCR ขึ้น ความสำเร็จของ real time PCR เกิดจากการพัฒนาเทคโนโลยี 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจหา PCR product ในสารละลายโดยการใช้สารเรืองแสง (fluorescence reporters) ต่าง ๆ และการพัฒนาเครื่อง thermocycler ซึ่งแต่เดิมเป็นแค่เครื่องควบคุมอุณหภูมิขึ้นลงตามระยะเวลาที่กำหนด มาเป็นเครื่อง real time thermocycler โดยเพิ่มส่วนที่เป็นแหล่งกำเนิดของแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองของแสง PCR product และส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดจาก PCR product ในหลอดปฏิกิริยา ดังนั้นการทำ real time PCR จึงเป็นการทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ โดยที่เราสามารถตรวจวัดปริมาณ PCR product ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น ๆ [71]

การแสดงออกของยีนเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นจากปัจจัยที่ศึกษาทำให้ยีนเกิดการสังเคราะห์ mRNA เพื่อใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตในช่วงนั้น เช่น เซลล์ที่ตกอยู่ภายใต้สภาวะเค็มจากดินที่มีเกลือ จะทำให้พืชสร้างสารอนุมูลอิสระออกมาเป็นจำนวนมาก สารประกอบนี้จะสร้างความเสียหายต่อระบบต่าง ๆ ภายในเซลล์ของพืชอย่างรุนแรง พืชจึงมีกลไกตอบสนองต่อสภาวะนี้โดยการควบคุมแสดงออกของยีนที่มีบทบาทในการกำจัดสสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ SOD, CAT APX และ DHAR ยีนเหล่านี้จะกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อเข้าจับหรือทำลายสารอนุมูลอิสระ ช่วยให้พืชรักษาสมดุลในเซลล์เอาไว้ได้ [72] ดังนั้นเทคนิค RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) ซึ่งวัดการแสดงออกของยีนจากปริมาณ mRNA ในเซลล์จึงนิยมนำมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในสภาวะต่าง ๆ โดยมีสองขั้นตอนหลัก คือ [73]

1. การถอดรหัสผันกลับ (reverse transcription) เป็นการเปลี่ยน mRNA ที่สกัดได้จากเซลล์ เป็น cDNA (complementary DNA) ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase

2. ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction) เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA บริเวณที่สนใจจาก cDNA ให้มากพอที่จะวัดปริมาณได้ ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ

1) Denaturation step เป็นการทำลายพันธะระหว่าง nucleotides ทำให้สาย DNA ที่ม้วนเกลียวอยู่เป็นคู่แยกออกจากกันเป็นเส้นตรง 2 เส้น โดยใช้อุณหภูมิ 90-96 °C และที่อุณหภูมินี้ปฏิกิริยาต่าง ๆ จากเอนไซม์ในรอบก่อนหน้านั้นจะหยุดลงหมด

2) Annealing step การจับกันอย่างจำเพาะระหว่างไพรเมอร์ (primer) กับ DNA แม่แบบ(DNA template) โดยในกรณีนี้ คือ cDNA ที่ได้จากการถอดรหัสผันกลับ ที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 °C

3) Extension step เป็นการสร้างสาย DNA จากปลาย 3' ของไพรเมอร์ด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ทำให้มีการนำ base ต่าง ๆ มาต่อโดยให้ complementary กับ sequence บน template ที่ไพรเมอร์มาเกาะไว้แล้วโดยใช้อุณหภูมิ 72 °C ทำให้เกิดการสร้างสาย DNA ที่ต่อเนื่อง

จากปฏิกิริยาข้างต้นก็จะสามารถเพิ่มจำนวน DNA บริเวณที่สนใจจาก cDNA ได้จำนวนมากพอที่จะวัดปริมาณได้

จากข้อได้เปรียบของ real time PCR และ RT-PCR จึงได้มีการประยุกต์ใช้ทั้งสองเทคนิคร่วมกัน นั่นคือเทคนิค real time RT-PCR โดยค่าแสงที่วัดได้จะใช้ในการคำนวณปริมาณของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ cDNA ต้นแบบ ซึ่งสะท้อนถึงการแสดงออกของยีนในตัวอย่างนั้น ๆ ซึ่งค่าที่วัดได้จำเป็นต้องมีการปรับค่าที่วัดได้ (normalization) ของตัวอย่างนั้น ๆ กับค่าที่วัดได้จากการแสดงออกของ house-keeping gene ของตัวอย่างนั้น ๆ เสมอ ตัวอย่างของ house-keeping gene ได้แก่ เบต้าแอคติน (ß-actin) ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA) เป็นต้น โดยมีสมมุติฐานว่าในเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่างชนิดกัน การแสดงออกของ house-keeping gene มีค่าคงที่ และการแสดงออกของยีนดังกล่าวจะไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับการกระตุ้นจากปัจจัยที่ศึกษา ดังนั้นการปรับค่าที่วัดด้วยค่าการแสดงออกของ ของ house-keeping gene จึงเป็นการ

ปรับค่าคลาดเคลื่อนอันเกิดมาจากความแตกต่างของปริมาณอาร์เอ็นเอ และประสิทธิภาพของปฏิกิริยาถอดรหัสผันกลับของแต่ละตัวอย่าง ทำให้การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่างตัวอย่างมีค่าที่ถูกต้องขึ้นได้ [73]

จากหลายรายงานการวิจัยพบว่ามียีนหลายตัวที่เกี่ยวข้องกับการทนทานต่ออะลูมิเนียม ซึ่งยีนที่เห็นสมควรที่จะนำมาศึกษาถึงระดับการแสดงออกในแคลลัสข้าวระหว่างขั้นตอนการคัดเลือกข้าวที่ทนทานอะลูมิเนียม ได้แก่ ยีน *SR* (sulphite reductase) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ sulphur metabolism pathway โดยเป็นกระบวนการสำคัญในเซลล์ที่มีชีวิต ทำให้เกิดโมเลกุลอินทรีย์ ที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ cysteine, methionin, coenzyme ที่มีความจำเป็นต่อในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน กระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน เป็นต้น ถ้าการทำงานของยีนดังกล่าวผิดปกติไป ก็อาจจะส่งผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ได้

ยีน LRR (leucine-rich repeat family protein) เป็นยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเกิด protein-protein interaction ที่เกิดขึ้นในกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ ตัวอย่างเช่น DNA repair, cell adhesion, signal transduction, development, transcription และ RNA processing เป็นต้น ซึ่งหากยีนดังกล่าวตอบสนองต่อระดับการทนทานต่ออะลูมิเนียมก็น่าจะมีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงให้เห็นอย่างเด่นชัด [74]

ยังมีรายงานการศึกษาการแสดงออกของยีนในสภาวะที่มีความเป็นพิษของอะลูมิเนียมในพืชหลายชนิด ได้แก่

Riede CR. and Anderson JA [75] รายงานว่ามียีน Alt_{BH} ที่อยู่บนโครโมโซม 4DL ที่ควบคุมความทนทานต่ออะลูมิเนียมในข้าวสาลีพันธุ์ BH1146

Kimberley C Snowden and Richard C. Cardner [76] รายงานว่ามีการค้นพบยีน *wali* (**w**heat **al**uminum **i**nduced) ในปลายรากข้าวสาลี ซึ่งจะแสดงออกมากขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอะลูมิเนียม โดยจะแสดงออกหลังจากรากสัมผัสกับอะลูมิเนียมในช่วง 24-96 ชั่วโมง

Sasaki T., et al [77] รายงานว่ายีน *ALMT1* มีความสัมพันธ์กับการปลดปล่อย malate ที่มีอะลูมิเนียมเป็นตัวกระตุ้น และยังสัมพันธ์กับการทนทานต่ออะลูมิเนียมในเซลล์ต้นยาสูบ

Nguyen VT., et al [78] รายงานว่ามีบริเวณบนจีโนมอย่างน้อย 9 ตำแหน่งจาก 8 โครโมโซม ที่มีความเกี่ยวข้องกับความทนทานต่ออะลูมิเนียมในข้าว (*Oryza sativa* subsp. Indica) โดยการปลูกข้าวทดสอบอะลูมิเนียมในสารละลายธาตุอาหาร

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 การศึกษาผลของอะลูมิเนียมต่อการเจริญเติบโตของข้าวในระยะต้นกล้า

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทดลอง

1) เมล็ดข้าวเปลือกพันธุ์ กข31

2) ท่อ PVC ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 ซม. สูง 7.5 ซม.

3) แผ่นโฟมเจาะรู หนา 1.5 นิ้ว

4) ตาข่ายไนลอน

5) กระบะพลาสติก ขนาด 25 x32 ซม.

6) เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

7) เครื่องเขย่า (Shaker)

8) เครื่องชั่งน้ำหนัก (2 และ 3 ตำแหน่ง)

9) บีกเกอร์ (100 200 500 และ 1,000 ml)

10) กระบอกตวง (50 และ 100ml)

11) ถุงมือ

12) ไม้บรรทัด

13) ช้อนตักสาร

3.1.2 สารเคมีในการทดลอง

1) 1N HCl

2) 1N NaOH

3) $AlCl_3$

4) Yoshida stock solution

3.1.3 วิธีการทดลอง

1) เพาะต้นกล้าจากเมล็ดข้าวพันธุ์ กข31 บนกระดาษทิชชูจนมีอายุ 7 วัน (รูปที่ 3.1 A)

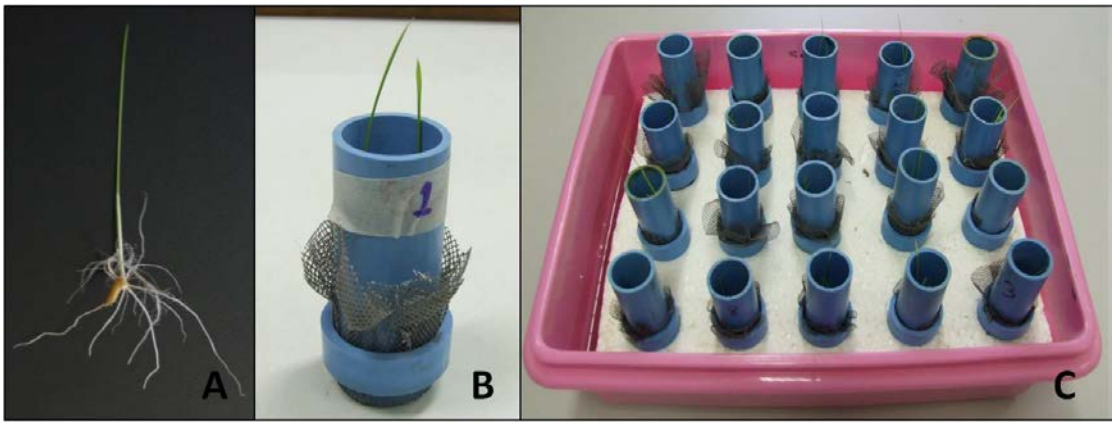
2) ย้ายปลูกในท่อ PVC ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 ซม. สูง 7.5 ซม. ซึ่งปลายด้านหนึ่งหุ้มด้วยตาข่ายไนล่อนเพื่อใช้สำหรับพยุงรากต้นกล้า (รูปที่ 3.1 B)

3) เตรียมสารละลายธาตุอาหารสูตร Yoshida [9] ที่เติมอะลูมิเนียม 5 ระดับความเข้มข้น คือ อะลูมิเนียม 0 mg/l pH 6.0 และ pH 3.9 และอะลูมิเนียม 0, 25, 50, 75, 100 mg/l pH 3.9 ในรูปของ $AlCl_3$ ซึ่งเตรียมไว้ในกระบะพลาสติก โดยให้ปริมาตรสารละลายในแต่ละกลุ่มทดลองเป็น 3 ลิตร

4) วางท่อ PVC บนแผ่นโฟมเจาะรูเพื่อประคองไม่ให้ล้ม นำแผ่นโฟมไปแช่ในสารละลายธาตุอาหารที่เตรียมไว้ (รูปที่ 3.1 C)

5) ปรับ pH ในสารละลายธาตุอาหารให้คงที่วันเว้นวันโดยใช้ 1N HCl หรือ 1N NaOH และเติมสารละลายธาตุอาหารให้เป็น 3 ลิตรทุกสัปดาห์ โดยไม่เติมอะลูมิเนียมเพิ่ม

6) วัดความยาวของรากและลำต้นเมื่อต้นกล้าอายุ 14, 21 และ 28 วัน โดยสุ่มเก็บต้นกล้ามาครั้งละ 10 ต้น



รูปที่ 3.1 การประกอบอุปกรณ์ในการทดลองที่ 1 (A = ต้นข้าวอายุ 7 วัน) (B = การบรรจุต้นกล้าลงในท่อ PVC) (C = การวางท่อ PVC ในกระบะบรรจุสารละลายธาตุอาหาร)

3.2 การคัดเลือกข้าวให้ทนต่ออะลูมิเนียมโดยการฉายรังสีแกมมากับแคลลัสของข้าว

3.2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทดลอง

1) ตู้ปลอดเชื้อ (larminarflow)

2) เครื่องฉายรังสี GIC Multipurpose Irradiator

3) เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

4) ห้องควบคุมอุณหภูมิ และแสง

5) เครื่องวัดความเข้มแสง (lux meter)

6) ปากคีบ (forceps)

7) ถุงมือ

8) ตู้นึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)

9) บีกเกอร์ (100 200 500 และ 1,000 ml)

10) กระบอกตวง (50 และ 100ml)

11) ช้อนตักสาร

12) จานแก้ว (petri-dish)

3.2.2 **สารเคมีในการทดลอง**

1) Marashige and Skoog (MS) stock

2) sucrose

3) casein hydrolysate

4) L-proline

5) 2, 4-Dichlorophenoxyacetic (2, 4-D)

6) phytagel

7) เอทานอล (70 และ 95%)

8) 1-Naphathaleneacetic acid (NAA)

9) kinetin

10) agarose

11) $AlCl_3$

3.2.3 **วิธีการทดลอง**

1) นำเมล็ดข้าวพันธุ์ กข31 ที่แกะเปลือกแล้วมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยเอทานอล 95% นาน 2 นาที แล้วแช่ในสารละลายคลอรอกซ์ 30 % ผสมสารจับใบ 2 หยด เป็นเวลา 15 นาที จึงล้างคลอรอกซ์ออกด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจนไม่มีฟองอากาศจับบนเมล็ดข้าว

2) นำเมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้วมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม sucrose 20 mg/l casein hydrolysate 1 mg/l L- proline 1 mg/l 2,4-Dichlorophenoxyacetic (2, 4-D) 2 mg/l และ phytagel 0.25 g/l เพื่อชักนำให้เมล็ดสร้างแคลลัส (รูปที่ 3.2 A)

3) เก็บขวดเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวไว้ในสภาพที่มีแสง 2,000 ลักซ์ ให้ได้รับแสง 12 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน นับจำนวนแคลลัสที่เกิดขึ้น

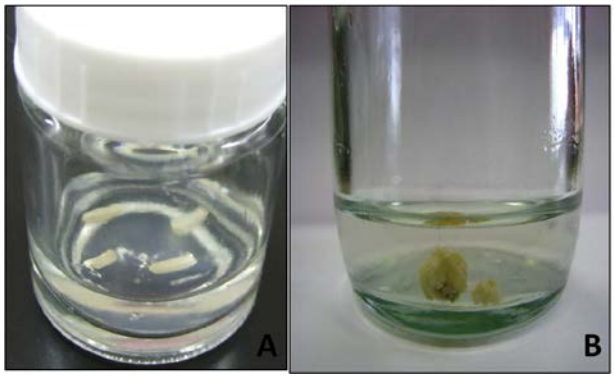
4) นำแคลลัสอายุ 14 วัน ย้ายเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิม ที่เติมอะลูมิเนียม 5 mg/l pH 3.9 เป็นเวลา 1 คืน บนเครื่องเขย่า นำแคลลัสออกและซับให้แห้งบนกระดาษทิชชูปลอดเชื้อ

5) นำแคลลัสไปฉายรังสีแกมมาด้วยเครื่องฉายรังสี GIC Multipurpose Irradiator อัตราปริมาณรังสี 3.52 Gy/min ที่ปริมาณรังสี 0, 35 และ 50 Gy

6) ย้ายแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิมที่เติม Al ในรูปของ $AlCl_3$ ความเข้มข้น 0, 50, และ 100 mg/l ที่ pH 3.9 บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 วัน (รูปที่ 3.2 B) จึงนำแคลลัสออกมาซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูปลอดเชื้อ แล้วพักให้แห้งในเป็นเวลา 5 วัน

7) ย้ายแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม sucrose 30 mg/l 1-Naphathaleneacetic acid (NAA) 0.5 mg/l kinetin 3 mg/l agarose 6.5 g/l เพื่อชักนำให้แคลลัสพัฒนาไปเป็นต้น

8) เก็บรักษาขวดเพาะเลี้ยงแคลลัสไว้ในสภาพเดิมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ นับจำนวนแคลลัสตาย แคลลัสที่ไม่มีการพัฒนา แคลลัสที่พัฒนาเป็นราก และแคลลัสที่เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวและแคลลัสที่พัฒนาไปเป็นยอด



รูปที่ 3.2 เมล็ดข้าวที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส (A) และแคลลัสเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (B)

3.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน

3.3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทดลอง

1) เครื่องปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge)
2) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
3) เครื่อง Real-Time PCR
4) ตู้แช่อุณหภูมิ -20
5) ตู้แช่อุณหภูมิ -70
6) ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 ºc
7) เครื่องดูดสารละลายแบบอัตโนมัติ (autopipete)
8) Filter-tranfer tip (10, 100, 200, 1000 µl)
9) microcentrifuge tube (0.5, 1.5 ml)
10) strip tube 0.2 ml
11) ถุงมือ
12) ไนโตรเจนเหลว
13) ไม้บด

3.3.2 สารเคมีในการทดลอง

1) NanoPure H_2O
2) Revert Aid^{TM} Frist Starand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)
3) DNase I (Fermentas)
4) DNase I buffer (Fermentas)
5) 25 mM EDTA (Fermentas)
6) oligo $(dT)_{18}$
7) SR primers and probe (Gene plus)
8) LRR primers and probe (Gene plus)
9) 2x Taqman Mix
10) OsACTIN1 (PN 4331348)
11) Total RNA Mini Kit (plants) (Geneaid)

3.3.3 วิธีการทดลอง

เก็บตัวอย่างแคลลัสข้าวในขั้นตอนที่ 6.) จากการทดลองที่ 3.2 การคัดเลือกข้าวให้ทนต่ออะลูมิเนียมโดยการฉายรังสีแกมมากับแคลลัสของข้าวที่เวลา 1 วันหลังจากเลี้ยงในอาหารคัดเลือก เก็บตัวอย่างแคลลัสไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

3.3.3.1 การสกัด total RNA

สกัด total RNA โดยใช้ชุดสกัด Total RNA Mini Kit (plants) (Geneaid, สาธารณรัฐประชาชนจีน) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1) เตรียม PRB Buffer ปริมาตร 500 μl เติม β-mercaptoethanol ปริมาตร 5 μl ต่อตัวอย่างแคลลัส 100 mg

2) เติม PRB Buffer (β-mercaptoethanol) แล้วบดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยไม้บด vortex ให้เข้ากัน

3) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เพื่อทำให้เซลล์แตก

4) ย้ายตัวอย่างทั้งหมดลงใน Filter Column ปั่นเหวี่ยง 1 นาที ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เพื่อกรองเศษผนังเซลล์ออก

5) ดูดตัวอย่างสารละลาย ใน collection tube ใส่ใน microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม absolute ethanol 0.5 เท่าของปริมาตรลงในสารละลายผสมกันอย่างรวดเร็วโดยใช้ pipette ดูดขึ้นลง

6) ย้ายสารละลายทั้งหมดลงใน RB column ปั่นเหวี่ยง 2 นาทีที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที RNA จะจับอยู่ที่ membrane ของ RB column

7) เทสารละลายที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง เติม W1 Buffer ปริมาตร 400 μl ปั่นเหวี่ยง 1 นาทีที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที

8) เทสารละลายที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง เติม Wash Buffer ปริมาตร 600 μl ปั่นเหวี่ยง 1 นาทีที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที แล้วเทสารละลายที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง (ทำขั้นตอนนี้ 2 ครั้งเพื่อล้าง RNA ให้สะอาด)

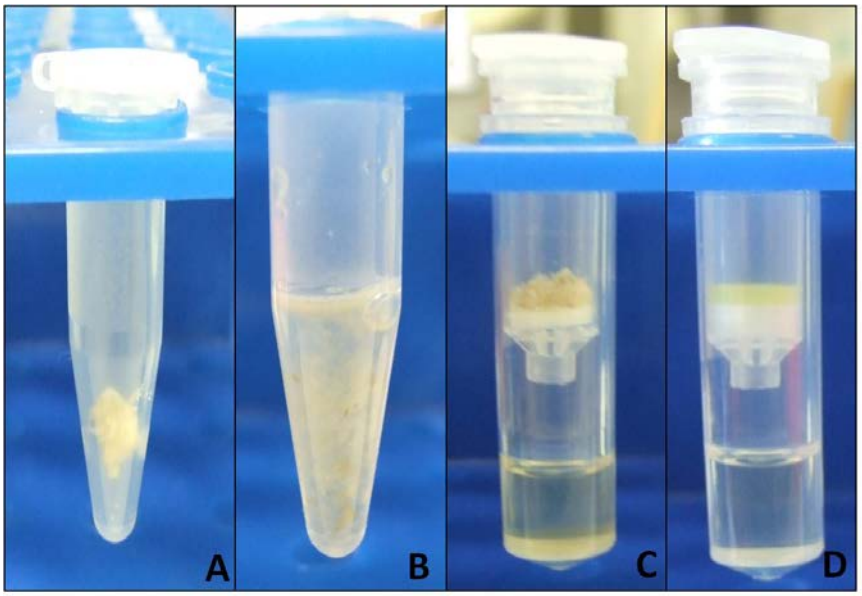
9) ย้าย RB column ลงใน collection tube อันใหม่ ปั่นเหวี่ยง 3 นาทีที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เพื่อกำจัด Buffer ที่ยังตกค้างอยู่ใน RB column membrane

10) ย้าย RB column ลงใน microcentrifuge tube อันใหม่ เติม RNase - free water 30 µl ลงบน RB column membrane รอจนน้ำจะซึมใน membrane จนหมดประมาณ 3 นาที ปั่นเหวี่ยง 1 นาที ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เพื่อชะ RNA ออก

11) เติม RNase-free water ปริมาตร 20 µl ลงบน RB column membrane รอจนน้ำจะซึมใน membrane จนหมดประมาณ 3 นาที ปั่นเหวี่ยง 1 นาทีที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เพื่อชะ RNA ออกเพิ่มเติม

12) วัดความเข้มข้นของ RNA ที่สกัดได้ โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ 260 nm ด้วยเครื่อง UV spectrophotometer

13) เก็บสารละลาย RNA เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส สำหรับใช้งานต่อไป



รูปที่ 3.3 ขั้นตอนการสกัด RNA ประกอบด้วย (A= ก้อนแคลลัสที่แช่แข็ง) (B= ก้อนแคลลัสที่บดแล้วในบัฟเฟอร์) (C = เศษผนังเซลล์และสารละลายที่กรองโดย filter column) (D= RB column ซึ่ง RNA ถูกจับไว้ที่ membrane และสารละลายถูกกรองผ่านลงมาที่ collection tube)

3.3.3.2 การสืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และการออกแบบ primers และ probe

1) สืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SR* (sulphite reductase) และ *LRR* (leucine-rich repeat family protein) จากฐานข้อมูล GeneBank ของ NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

2) ออกแบบ primers และ probe ที่จำเพาะกับยีน *SR* และ *LRR* โดยใช้โปรแกรม Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, สหรัฐอเมริกา)

ตารางที่ 3.1 accession number และSequences ของ primers *SR* และ *LRR*

Gene	Genebank accession no.	Forward (5′→3′)	Reverse (5′→3′)
SR	AK073969	CCACTCGCTTCGACACTCTCT	GCCTTGGCTCGAGGTTTTCT
LRR	AK240876	GCAGAACATGACCATTGTGCAT	CCATAAGAGCAGCTATCAGTCCATT

Probe ที่จำเพาะกับยีน *SR* ได้แก่ 5′ CCCCTTCTTCTCCC 3′ และ *LRR* ได้แก่ 5′TAGCGGGTGTTACGCC 3′

3.3.3.3 การทำ RNA ให้บริสุทธิ์

ในตัวอย่างสารละลาย RNA ที่สกัดได้นั้นจะยังคงมี genomic DNA ปนเปื้อนอยู่ จึงต้องมีการกำจัดออกไปโดยใช้เอนไซม์ DNase I ในการย่อย genomic DNA โดยมีกรรมวิธี ดังนี้

DNaseI treatment protocol

8 μl total RNA (1.25 μg) + nanoPure H_2O

1 μl 10x DNase I buffer

1 μl DNase I

ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 30 นาที เพื่อย่อยดีเอ็นเอ

เติม 1 μl 25 mM EDTA

บ่มที่อุณหภูมิ 65 ºC เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์

3.3.3.4 การสังเคราะห์ First-strand cDNA

ทำการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) จากสาย RNA ต้นแบบ ที่ผ่านการกำจัด genomic DNA ออกแล้ว

First-strand cDNA synthesis protocol

8 µl DNaseI-treated RNA

3 µl nanoPure H_2O

1 µl oligo $(dT)_{18}$

ผสมให้เข้ากันแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 65 ºC เป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างเบสของ RNA เป็นการเตรียมพร้อมสำหรับปฏิกิริยา transcription

แช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 2-3 นาที

เติม 8 µl reaction mix

บ่มที่อุณหภูมิ 42 ºC เป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา transcription

บ่มที่อุณหภูมิ 70 ºC เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์

เก็บที่อุณหภูมิ -20 ºC จนกว่าจะใช้งาน

3.3.3.5 การทำ Real-time PCR

เป็นการทำปฏิกิริยาเพื่อเปรียบเทียบปริมาณ cDNA จากยีน SR และ LRR ในสภาวะที่แคลลัสข้าวได้รับอะลูมิเนียมที่ปริมาณต่าง ๆ

Real-time PCR protocol

1 µl cDNA

8 µl primers+ probe+ H_2O

10 µl 2x TaqMan Mix (Applied Biosystems)

โดยมีขั้นตอนการทำปฏิกิริยา ดังนี้

ขั้นที่ 1 บ่มที่ 95 ºC 20 วินาที เพื่อแยกสาย cDNA ออกจากกันในครั้งแรก

ขั้นที่ 2 บ่มที่ 95 ºC 3 วินาที เพื่อแยกสาย cDNA ออกจากกัน

ขั้นที่ 3 บ่มที่ 60 ºC 30 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์เกาะกับสาย cDNA และเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน

ทำขั้นตอนที่ 2 และ 3 ซ้ำจำนวน 40 รอบ

ทำการเก็บสัญญาณ Fluorescence ที่อุณหภูมิ 60 ºC ของแต่ละรอบปฏิกิริยา

วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน

ค่าความเข้มแสงที่วัดได้ จะนำไปใช้วิเคราะห์ถึงปริมาณ cDNA ที่เพิ่มขึ้น โดยวัดปริมาณเชิงเปรียบเทียบ (relative quantification) โดย

1) normalize ปริมาณ cDNA จากยีน SR และ LRR ด้วยปริมาณ cDNA จากยีน *ACTIN1* ซึ่งมีระดับการแสดงออกที่คงที่ภายใต้สภาวะการเจริญต่าง ๆ

2) เปรียบเทียบปริมาณ cDNA จากยีน SR และ LRR ในสภาวะที่แคลลัสได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 50 และ 100 mg/l ที่ปริมาณรังสีต่าง ๆ กับสภาวะที่ได้รับอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 mg/l และได้รับรังสี 0 Gy

3.4 การศึกษาปริมาณอะลูมิเนียมในแคลลัสข้าว

3.4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทดลอง

1) เครื่องปฏิกรณ์ปรมาณูวิจัย-1/1 (ปปว-1/1)

2) ระบบ pneumatic

3) เครื่องตรวจวัดรังสีแกมมาพร้อมหัววัดรังสีชนิด GMX Series HPGe (High-Purity Germanium) Coaxial Detector System ของบริษัท ORTEC รุ่น GMX60P4-83

- Resolution (FWHM) ที่ 1.33 MeV (^{60}Co) เป็น 2.3 keV
- Relative Efficiency ที่ 1.33 MeV (^{60}Co) เป็น 67%

4) หลอดพอลีเอทิลีน

5) เตารีด

6) ตู้อบความร้อน (hot air oven)

7) นาฬิกาจับเวลา

8) ตู้ดูดความชื้น

9) โกร่งบดตัวอย่าง

10) ถุงมือ

11) ช้อนตักสาร

3.4.2 สารเคมีในการทดลอง

1) สารมาตรฐานเปรียบเทียบ NIST 1550a (spinach leaves)

2) สารมาตรฐานเปรียบเทียบ NIST 1573a (tomato leaves)

3.4.3 วิธีการทดลอง

1) นำตัวอย่างแคลลัสมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่ง

2) อบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 50 ºC เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3) นำตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งประมาณ 0.05 g บรรจุในหลอดพอลิเอทิลีน ปิดผนึกด้วยความร้อน

4) บรรจุหลอดพอลิเอทิลีนในวัสดุสำหรับอาบรังสี

5) นำตัวอย่างที่ได้ไปอาบรังสีด้วยระบบ pneumatic ใช้เวลาอาบรังสี 8 วินาที

6) ใช้เวลาในการนับวัด 100 วินาที

7) อ่านค่า net area ที่พลังงาน 1779 KeV แล้วคำนวณหาปริมาณอะลูมิเนียมในตัวอย่างแคลลัสข้าวโดยใช้สูตร

$$W_s = \frac{[A_0(sample)][M_2\,(std)]}{[A_0(std)][M_1\,(sample)]} W(std)$$

เมื่อ W_s คือ ความเข้มข้นของธาตุในสารตัวอย่าง

W_{std} คือ ความเข้มข้นของธาตุในสารตัวอย่าง

M_1 คือ น้ำหนักของสารตัวอย่าง

M_2 คือ น้ำหนักของสารมาตรฐาน

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาผลของอะลูมิเนียมต่อการเจริญเติบโตของข้าวในระยะต้นกล้า

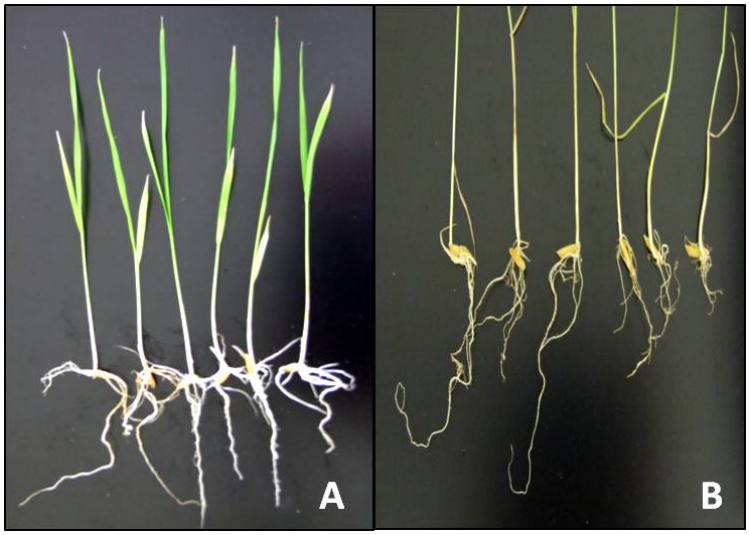
จากการทดลองเมื่อเปรียบเทียบความยาวเฉลี่ยของยอดและรากในสารละลายธาตุอาหารที่ไม่เติมอะลูมิเนียม pH 6.0 และ pH 3.9 ในช่วงอายุต้นข้าว 14 21 และ 28 วัน พบว่าเมื่อ pH ของสารละลายธาตุอาหารลดลงส่งผลให้ความยาวยอดและรากของต้นกล้ามีแนวโน้มลดลงแต่ไม่แตกต่างทางสถิติในทุกช่วงอายุ (รูปที่ 4.2 และ 4.3)

เมื่อต้นกล้าอายุ 14 วัน เปรียบเทียบความยาวเฉลี่ยของยอดระหว่างต้นกล้าที่ได้รับอะลูมิเนียมความเข้มข้นต่าง ๆ ในสารละลายธาตุอาหาร (รูปที่ 4.1A) พบว่าความยาวเฉลี่ยของยอดในสารละลายธาตุอาหารที่มีอะลูมิเนียมทั้ง 5 ระดับความความเข้มข้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยความเข้มข้นของอะลูมิเนียมที่สูงขึ้นมีแนวโน้มทำให้ความยาวเฉลี่ยของยอดลดลง เว้นแต่ความยาวเฉลี่ยของยอดที่ระดับอะลูมิเนียมความเข้มข้น 25 mg/l ซึ่งมีความยาวเฉลี่ยยอดยาวกว่าในอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 mg/l pH 3.9 ในส่วนของรากพบว่าความยาวเฉลี่ยของรากในสารละลายธาตุอาหารที่มีอะลูมิเนียมความเข้มข้นเพิ่มขึ้นทำให้ความยาวเฉลี่ยของรากลดลง (รูปที่ 4.1B) ยกเว้นความยาวเฉลี่ยของรากในสารละลายธาตุอาหารที่มีอะลูมิเนียมความเข้มข้น 25 mg/l พบว่าความยาวเฉลี่ยของรากยาวกว่าความยาวเฉลี่ยของรากในอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 mg/l pH 3.9 ซึ่งเป็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

เมื่อต้นกล้าอายุ 21 วัน พบว่าความเข้มข้นของอะลูมิเนียมในสารละลายธาตุอาหารที่สูงขึ้นทำให้ความยาวเฉลี่ยของยอดลดลงตามลำดับ ในส่วนของความยาวเฉลี่ยของรากพบว่าเมื่อความเข้มข้นของอะลูมิเนียมในสารละลายธาตุอาหารเพิ่มขึ้นทำให้ความยาวเฉลี่ยของรากลดลงอย่างต่อเนื่อง ยกเว้นความยาวเฉลี่ยของรากในสารละลายธาตุอาหารที่มีอะลูมิเนียมความเข้มข้น 25 mg/l พบว่าความยาวเฉลี่ยของรากยาวกว่าความยาวเฉลี่ยของรากในอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 mg/l pH 3.9

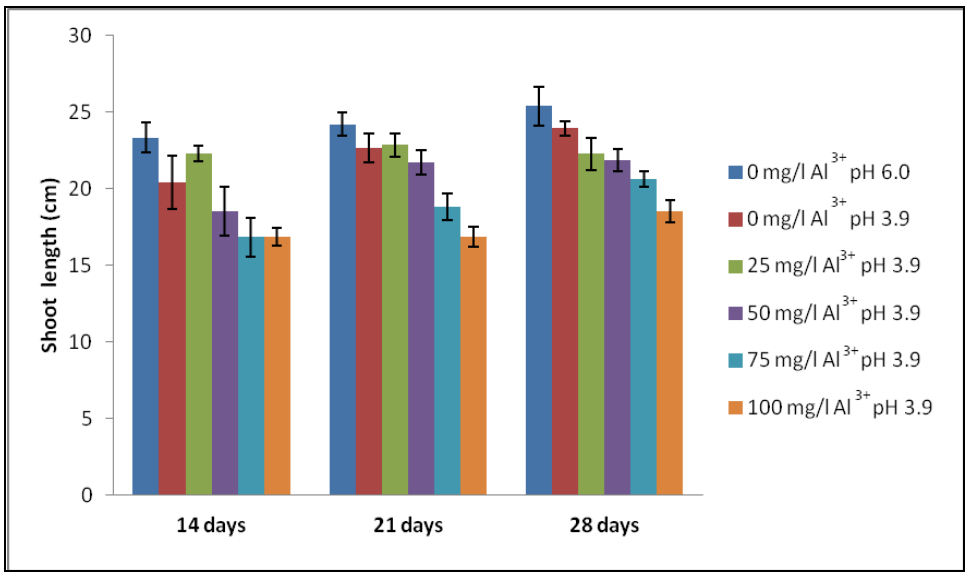
เมื่อต้นกล้าอายุ 28 วัน พบว่าความเข้มข้นของอะลูมิเนียมในสารละลายธาตุอาหารที่เพิ่มขึ้นทำให้ความยาวเฉลี่ยของยอดลดลงอย่างต่อเนื่อง ในส่วนความยาวเฉลี่ยของรากให้ผลเช่นเดียวกัน คือเมื่อระดับความเข้มข้นของอะลูมิเนียมในสารละลายเพิ่มขึ้น ความยาวเฉลี่ยของรากจะลดลงอย่างต่อเนื่อง

โดยเฉพาะเมื่อเปรียบเทียบระหว่างความยาวเฉลี่ยของรากในสารละลายธาตุอาหารอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 mg/l pH 3.9 กับอะลูมิเนียมความเข้มข้น 100 mg/l pH 3.9 พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

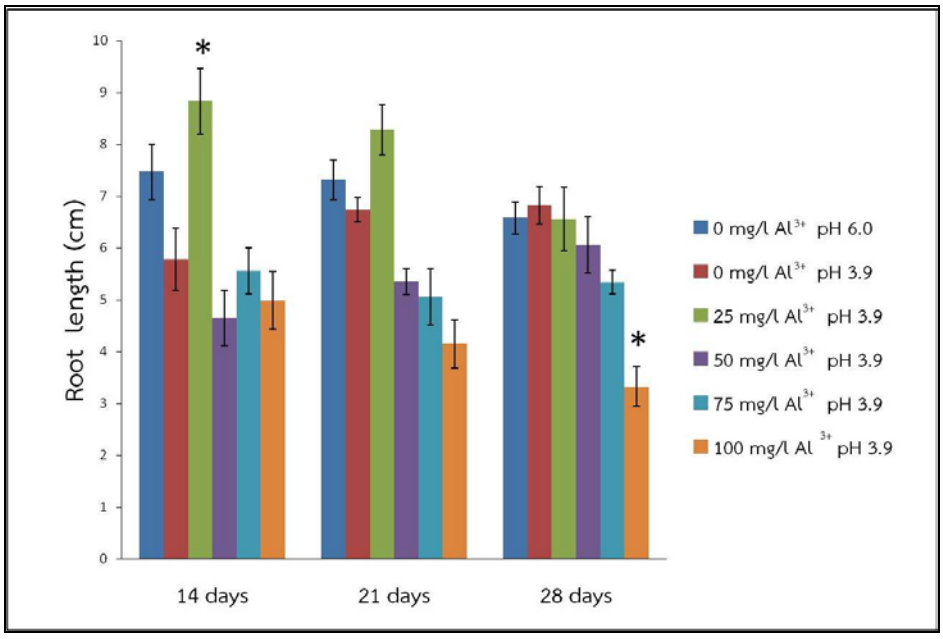


รูปที่ 4.1 การเจริญเติบโตของต้นกล้าพันธุ์ กข31 ในสารละลายธาตุอาหารที่เติมอะลูมิเนียม 5 ระดับความเข้มข้น คือ อะลูมิเนียม 0 mg/l ที่ pH 6.0 และ pH 3.9 และอะลูมิเนียม 25, 50, 75, 100 mg/l pH 3.9 ตามลำดับจากซ้ายไปขวา (A = ที่อายุ 14 วัน) (B = ที่อายุ 28 วัน)

จึงได้คัดเลือกความเข้มข้นของอะลูมิเนียมในสารละลายธาตุอาหารระดับ 50 และ 100 mg/l pH 3.9 ใช้ในการคัดเลือกข้าวทนอะลูมิเนียมในการทดลองที่ 2



รูปที่ 4.2 ความยาวเฉลี่ยของยอดข้าว (shoot length) (cm) ในสารละลายธาตุอาหารที่ประกอบด้วยอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่ออายุ 14, 21 และ 28 วัน (* = แตกต่างจากความยาวของยอดที่ปริมาณรังสีแกมมา 0 Gy อะลูมิเนียม 0 mg/l อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$))

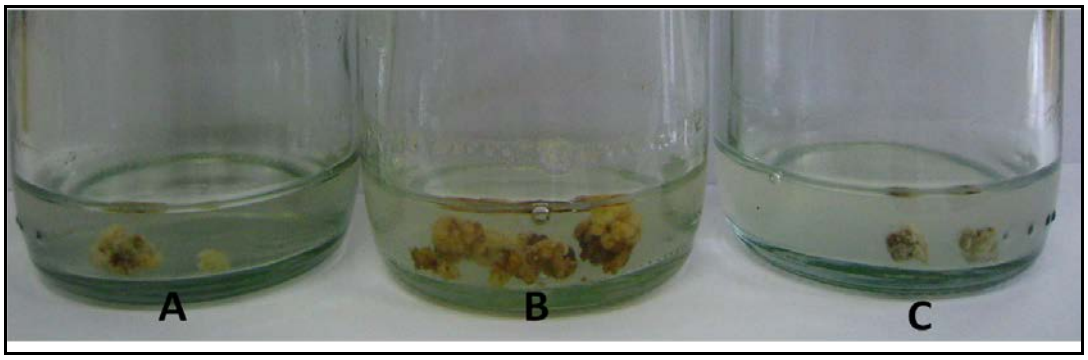


รูปที่ 4.3 ความยาวเฉลี่ยของรากข้าว (root length) (cm) ในสารละลายธาตุอาหารที่ประกอบด้วยอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่ออายุ 14, 21 และ 28 วัน (* = แตกต่างจากความยาวของรากที่ปริมาณรังสีแกมมา 0 Gy อะลูมิเนียม 0 mg/l อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$))

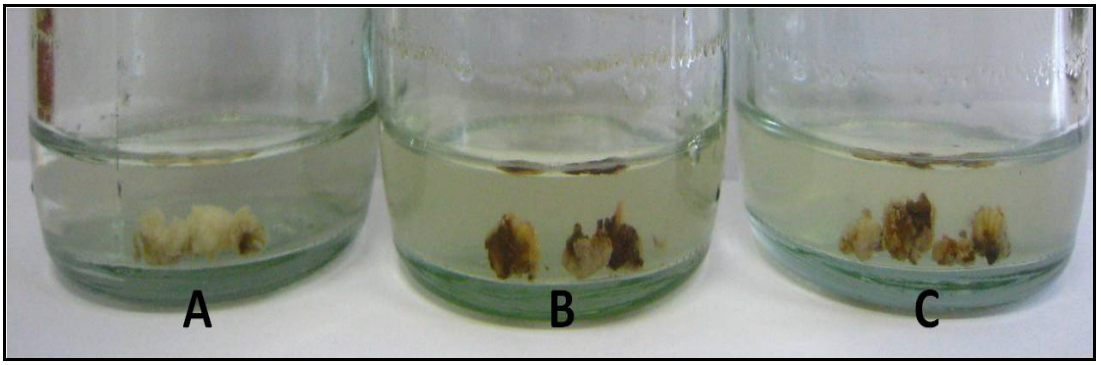
4.2 การคัดเลือกข้าวให้ทนต่ออะลูมิเนียมโดยการฉายรังสีแกมมากับแคลลัสของข้าว

นำเมล็ดข้าวพันธุ์ กข31 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสเป็นเวลา 2 สัปดาห์ มาตรวจดูการเกิดแคลลัส พบว่าเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่สร้างแคลลัสเท่ากับ 52.70 เปอร์เซ็นต์

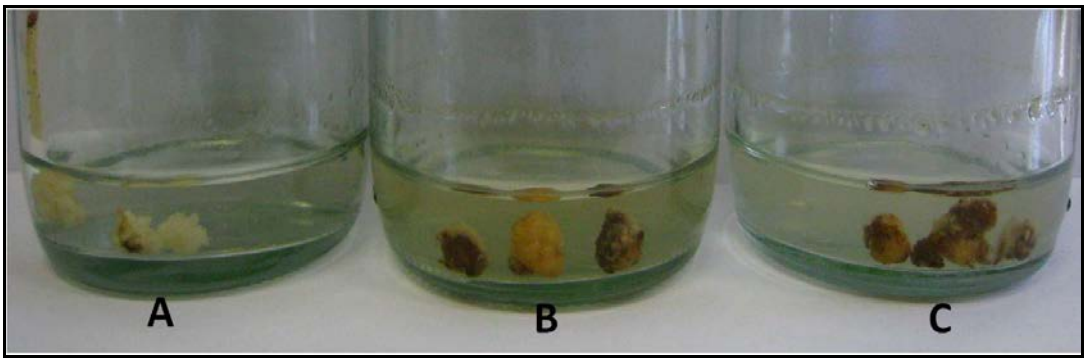
เมื่อนำแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารสูตรคัดเลือกที่เติมอะลูมิเนียมในระดับต่าง ๆ พบว่าแคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงของสีของก้อนแคลลัสในเบื้องต้น ดังรูปที่ 4.4, 4.5 และ 4.6



รูปที่ 4.4 ก้อนแคลลัสที่ไม่ฉายรังสีแกมมาเลี้ยงในอาหารทดสอบอะลูมิเนียม (A = แคลลัสเจริญในอาหารที่เติมอะลูมิเนียม 0 mg/l) (B = 50 mg/l) (C = 100 mg/l) เป็นเวลา 10 วัน



รูปที่ 4.5 ก้อนแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา 35 Gy เลี้ยงในอาหารทดสอบอะลูมิเนียม (A = แคลลัสเจริญในอาหารที่เติมอะลูมิเนียม 0 mg/l) (B = 50 mg/l) (C = 100 mg/l) เป็นเวลา 10 วัน



รูปที่ 4.6 ก้อนแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา 50 Gy เลี้ยงในอาหารทดสอบอะลูมิเนียม (A = แคลลัสเจริญในอาหารที่เติมอะลูมิเนียม 0 mg/l) (B = 50 mg/l) (C = 100 mg/l) เป็นเวลา 10 วัน

หลังจากเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตรชักนำต้นเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบการพัฒนาของแคลลัส (callus formation) (รูปที่ 4.7) ระหว่างแคลลัสที่ไม่ฉายรังสี และผ่านการฉายรังสีปริมาณ 35 และ 50 Gy พบว่าแคลลัสที่ไม่ผ่านการฉายรังสีมีเปอร์เซ็นต์แคลลัสตาย 24.20 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่ไม่มีการพัฒนา 44.40 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่พัฒนาเป็นราก 25.00 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว 6.50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.1)

แคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีปริมาณ 35 และ 50 Gy มีเปอร์เซ็นต์แคลลัสตายเพิ่มขึ้นเป็น 42.50 และ 42.10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ที่ปริมาณรังสี 35 Gy แคลลัสที่ไม่มีการพัฒนามีเปอร์เซ็นต์ลดลงคือ 17.50 เปอร์เซ็นต์ แต่ในส่วนแคลลัสที่พัฒนาเป็นรากจะเพิ่มขึ้นเป็น 38.80 เปอร์เซ็นต์ และที่ปริมาณรังสี 50 Gy เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่ไม่มีการพัฒนาจะเพิ่มขึ้นสูงกว่าที่ระดับรังสี 35 Gy เป็น 39.50 เปอร์เซ็นต์ แต่เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่พัฒนาเป็นรากจะน้อยกว่าที่ปริมาณรังสี 35 Gy ที่ 13.2 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนแคลลัสที่เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวจะลดลงจาก 0 Gy อยู่ที่ 1.3 เปอร์เซ็นต์ สำหรับทั้งปริมาณรังสี 35 และ 50 Gy

ตารางที่ 4.1 ผลของปริมาณรังสีแกมมาและความเข้มข้นของอะลูมิเนียมในอาหารเพาะเลี้ยงต่อการพัฒนาของแคลลัส (callus formation)

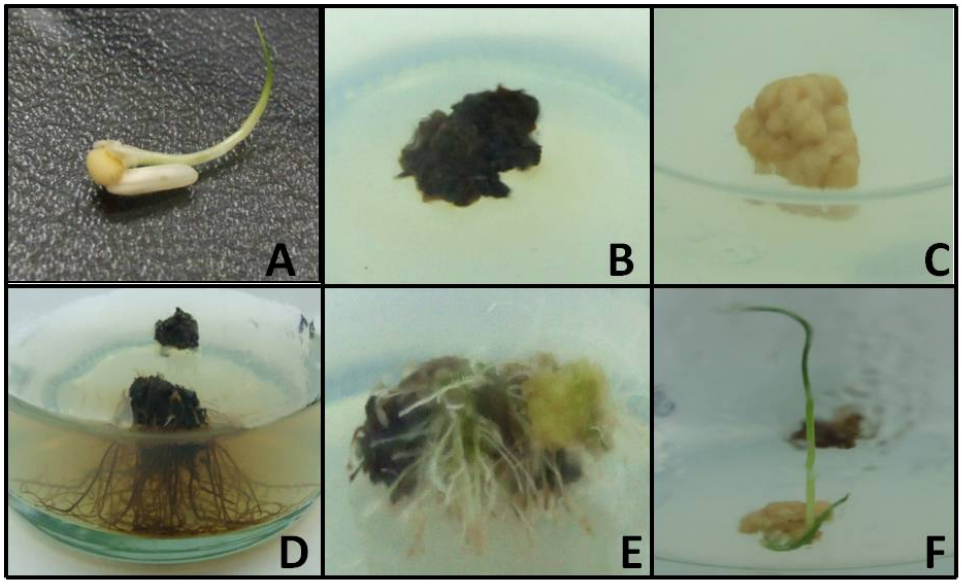
Gamma-ray dose (Gy)	Al^{3+} dose (mg/l)	No. of calli cultured	% calli				Plantlet
			Black	White	Root	Green-spots	
0	0	124	24.20	44.40	25.00	6.50	0
	50	98	65.30	3.10	28.60	3.10	0
	100	82	76.80	7.30	12.20	3.70	0
35	0	80	42.50	17.50	38.80	1.30	0
	50	78	60.30	11.50	11.50	1.30	1
	100	87	86.20	9.20	4.60	0.00	0
50	0	76	42.10	39.50	13.20	1.30	0
	50	73	72.60	21.90	5.50	0.00	0
	100	104	90.40	9.60	0.00	0.00	0

เมื่อเปรียบเทียบผลของอะลูมิเนียมต่อการพัฒนาของแคลลัส (percentage of callus formation) ที่ไม่ผ่านการฉายรังสี พบว่าเมื่อปริมาณอะลูมิเนียมเพิ่มขึ้นเป็น 50 และ 100 mg/l ทำให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสตายเพิ่มขึ้นเป็น 65.30 และ 76.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แคลลัสที่ไม่มีการพัฒนา ลดลงเป็น 3.10 และ 7.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แคลลัสที่เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวลดลงเป็น 3.10 และ 3.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แคลลัสที่พัฒนาเป็นรากเพิ่มขึ้นเป็น 28.60 และลดลงเป็น 12.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การพัฒนาของแคลลัสที่ปริมาณรังสี 35 Gy พบว่าเมื่อปริมาณอะลูมิเนียมเพิ่มขึ้นเป็น 50 และ 100 mg/l ทำให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสตายเพิ่มขึ้นเป็น 60.30 และ 86.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แคลลัสที่ไม่มีการพัฒนา ลดลงเป็น 11.50 และ 9.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แคลลัสที่พัฒนาเป็นรากลดลงเป็น 11.50 และ 4.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แคลลัสที่เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวที่ปริมาณอะลูมิเนียม 100 mg/l ลดลงเป็น 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การพัฒนาของแคลลัสที่ปริมาณรังสี 50 Gy พบว่าเมื่อปริมาณอะลูมิเนียมเพิ่มขึ้นเป็น 50 และ 100 mg/l ทำให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสตายเพิ่มขึ้นเป็น 72.60 และ 90.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แคลลัสที่ไม่มีการพัฒนาลดลงเป็น 21.90 และ 9.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แคลลัสที่พัฒนาเป็นรากลดลงเป็น 5.50 และ 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไม่พบการพัฒนาของแคลลัสที่เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวที่ปริมาณอะลูมิเนียม 50 และ 100 mg/l เลย

เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณรังสีกับความเข้มข้นของอะลูมิเนียมในสารละลายธาตุอาหารต่อการพัฒนาของแคลลัสพบว่า เมื่อปริมาณรังสีและความเข้มข้นของอะลูมิเนียมเพิ่มขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสตายเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่ในทางตรงกันข้ามจะทำให้เปอร์เซ็นต์แคลลัสที่พัฒนาเป็นราก แคลลัสที่ไม่มีการพัฒนา และแคลลัสที่เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวลดลง โดยเฉพาะการพัฒาของแคลลัสที่ฉายรังสีแกมมาปริมาณรังสี 50 Gy ในอาหารที่มีอะลูมิเนียมปริมาณ 100 mg/l จะไม่พบแคลลัสที่มีสัญญาณบ่งบอกถึงการพัฒนาไปเป็นต้นได้เลย

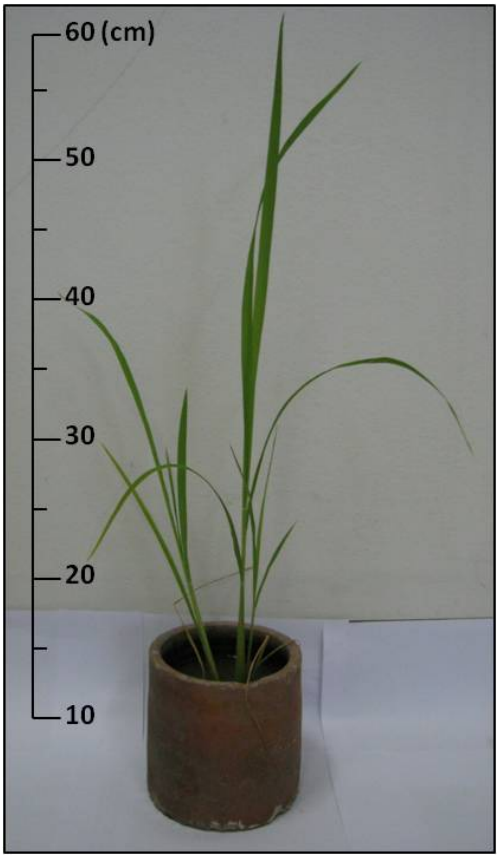


รูปที่ 4.7 ลักษณะการพัฒนาของแคลลัสบนอาหารชักนำต้น เมื่ออายุ 4 สัปดาห์ (A= แคลลัสอายุ 2 สัปดาห์) (B= แคลลัสตาย) (C = แคลลัสที่ไม่มีการพัฒนา) (D=แคลลัสที่พัฒนาเป็นราก) (E = แคลลัสที่เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว) (F= แคลลัสที่พัฒนาเป็นยอด)

ในกรณีของแคลลัสที่เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียวพบว่า แคลลัสจะพัฒนาไปจนถึงระยะหนึ่ง ประมาณสัปดาห์ที่ 3 ก็จะหยุดการเจริญเติบโต เริ่มเปลี่ยนเป็นจุดสีน้ำตาลและตายในที่สุด (รูปที่ 4.8)

รูปที่ 4.8 การพัฒนาของแคลลัสเมื่อมีการสร้างยอดแต่มีการหยุดพัฒนา (ในวงกลม)

อย่างไรก็ตามเมื่อนำแคลลัสที่ไม่มีการพัฒนาออกมาทำให้แห้งอีกครั้งในสภาพปลอดเชื้อเป็นเวลา 3 วัน และย้ายลงเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำต้นอีกครั้งเพื่อชักนำให้เกิดต้น พบว่าแคลลัสที่ปริมาณรังสี 35 Gy ความเข้มข้นอะลูมิเนียม 50 mg/l สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ แต่ต้นมีลักษณะไม่แข็งแรง บริเวณปลายใบมีลักษณะเป็นรอยไหม้เล็กน้อย (รูปที่ 4.9)



รูปที่ 4.9 ต้นกล้าอายุ 2 เดือน ที่พัฒนามาจากแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีปริมาณ 35 Gy ความเข้มข้นอะลูมิเนียม 50 mg/l

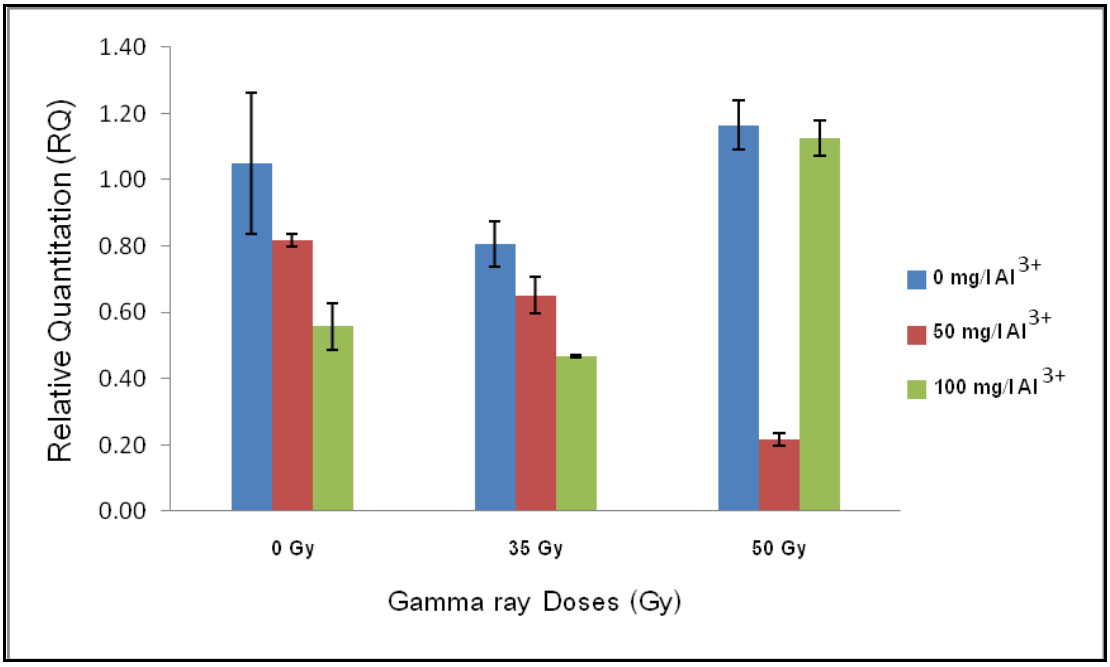
4.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน

ระดับการแสดงออกของยีนดูได้จากค่าความเข้มแสงที่วัดได้จากเครื่อง Real-Time PCR แล้วคำนวณกลับไปเป็นปริมาณของ DNA ที่เพิ่มจำนวนได้จากการใช้ cDNA ต้นแบบ โดยแสดงในรูปค่า Relative quantification (RQ) พบว่า ในกลุ่มที่ไม่ผ่านการฉายรังสี ยีน *SR* เมื่ออยู่ในสภาวะปกติมีการแสดงออกสูง แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอะลูมิเนียมการแสดงออกของยีน *SR* จะลดลงเมื่อปริมาณของอะลูมิเนียมเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.10)

ในกลุ่มที่ผ่านการฉายรังสีปริมาณ 35 Gy พบว่ายีนมีการแสดงออกที่ลดลงเมื่อปริมาณอะลูมิเนียมเพิ่มขึ้นเช่นกัน

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ฉายรังสีกับกลุ่มที่ฉายรังสีปริมาณ 35 Gy พบว่าการแสดงออกของยีนลดลงเมื่อปริมาณอะลูมิเนียมเท่ากัน

ในกลุ่มที่ผ่านการฉายรังสีปริมาณ 50 Gy พบว่ายีนมีการแสดงออกที่สูงมากกว่าในกลุ่มอื่น ยกเว้นที่ปริมาณอะลูมิเนียม 50 mg/l ที่มีการแสดงออกน้อยที่สุด



รูปที่ 4.10 ระดับการแสดงออกของยีน *SR* เมื่ออยู่ในสภาวะต่าง ๆ

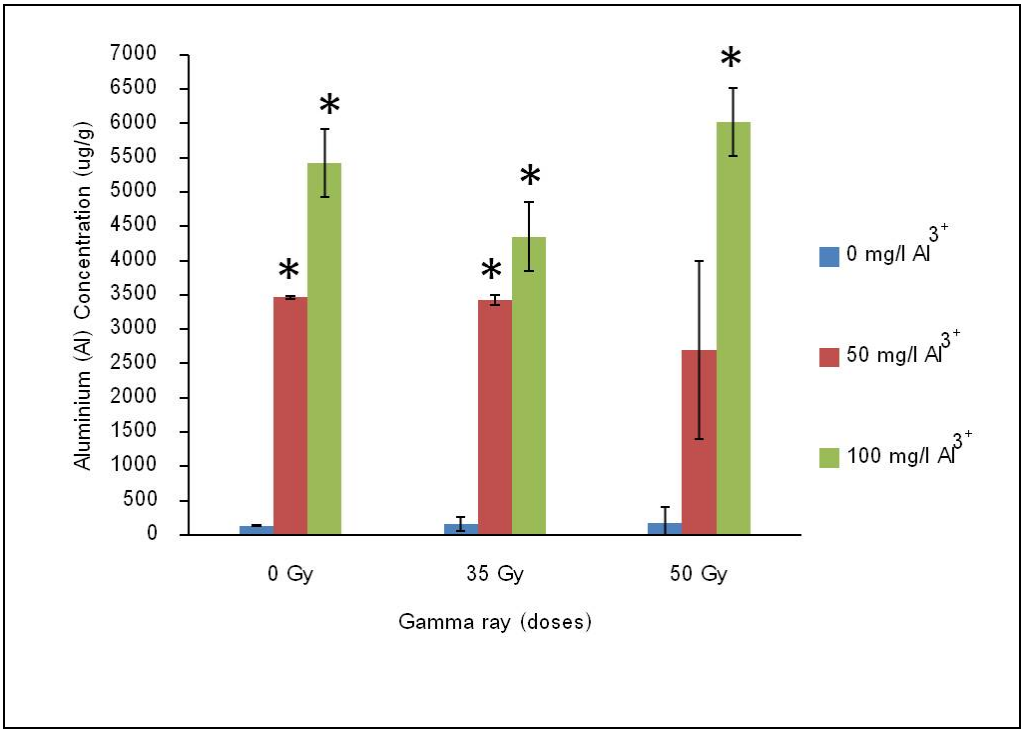
ในส่วนของยีน *LRR* ไม่สามารถแสดงการแสดงออกของยีนได้ เนื่องจากเครื่องไม่สามารถเก็บสัญญาณได้

4.4 การศึกษาปริมาณอะลูมิเนียมในแคลลัสข้าว

จากการวัดปริมาณอะลูมิเนียมในตัวอย่างแคลลัสข้าว พบว่าเมื่อปริมาณอะลูมิเนียมในอาหารสูตรคัดเลือกเพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณอะลูมิเนียมในตัวอย่างแคลลัสข้าวเพิ่มขึ้นด้วย (รูปที่ 4.11)

เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มแคลลัสข้าวที่ไม่ผ่านการฉายรังสี กลุ่มที่ผ่านการฉายรังสี 35 และ 50 Gy ที่ปริมาณอะลูมิเนียมเท่ากัน พบว่ารังสีไม่มีผลต่อปริมาณของอะลูมิเนียมในแคลลัสข้าว ($p > 0.05$) โดยค่าเฉลี่ยของปริมาณอะลูมิเนียมในแคลลัสที่ปริมาณรังสีต่าง ๆ มีค่า 3431.18 ±71.78 และ 2697.19 ± 857.50 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อได้รับอะลูมิเนียม 50 mg/lใน

อาหารเพาะเลี้ยง และ 4349.28±1300.89 และ 6022.74±871.26 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เมื่อได้รับอะลูมิเนียม 100 mg/l ในอาหารเพาะเลี้ยง (รูปที่4.11)



รูปที่ 4.11 ความเข้มข้นของอะลูมิเนียมในแคลลัสข้าวจากการวัดด้วยเทคนิค Neutron Activation Analysis (NAA) (* = แตกต่างจากปริมาณอะลูมิเนียมที่ 0 Gy 0 mg/l อะลูมิเนียม อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$))

บทที่ 5
วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

5.1 วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1.1 การศึกษาผลของอะลูมิเนียมต่อการเจริญเติบโตของข้าวในระยะต้นกล้า

เมื่อศึกษาการเจริญของต้นกล้าข้าวที่ได้รับสารละลายธาตุอาหาร pH 6.0 และ 3.9 โดยปราศจากอะลูมิเนียม พบว่าความยาวเฉลี่ยของยอดและรากของต้นกล้าข้าวลดลงเมื่อระดับ pH ลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากเมื่อระดับ pH ลดลงทำให้ในสารละลายมีปริมาณของ H^+ เพิ่มขึ้น ซึ่งความเป็นพิษของ H^+ จะยับยั้งการเจริญเติบโตของรากและรากแขนง [16] และยับยั้งการดูดซึมประจุบวกและลบของราก [78] ทำให้ประสิทธิภาพในการดูดซึมสารอาหารน้อยลง ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของยอดข้าวเช่นกัน ผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชจากความเข้มข้นของ H^+ มีผลน้อยกว่าความเข้มข้นของอะลูมิเนียมในสภาวะ pH ต่ำ [26]

ผลของอะลูมิเนียมต่อการเจริญเติบโตของยอดและรากของต้นกล้าข้าวในช่วงแรกพบว่าอะลูมิเนียมมีผลต่อความยาวของรากเด่นชัดกว่าในยอด และส่วนอื่น ๆ ของพืช [79] บริเวณรากจะมีการสะสมของอะลูมิเนียมสูงมากกว่าในยอด [15] นั่นเพราะรากจะสัมผัสกับอะลูมิเนียมในสารละลายธาตุอาหารโดยตรงทำให้ได้รับพิษจากอะลูมิเนียมเป็นอันดับแรก [80] โดยอะลูมิเนียมมีผลยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ (cell division) และการยืดยาวของเซลล์ (cell elongation) [35] ทำให้รากมีลักษณะกุด หยาบ และรากเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม [32] ในกรณีที่ความยาวเฉลี่ยของรากที่ระดับอะลูมิเนียมความเข้มข้น 25 mg/l มีความยาวเฉลี่ยยาวกว่ารากในสารละลายธาตุอาหารที่ไม่เติมอะลูมิเนียม pH 3.9 นั้น มีรายงานว่าความเข้มข้นของอะลูมิเนียมในระดับต่ำจะกระตุ้นการเจริญเติบโตของรากข้าวได้ [15] ในระยะยาวพบว่าความยาวเฉลี่ยของรากลดลงเนื่องจากเมื่อข้าวอายุเพิ่มขึ้นรากจะมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้นสามารถยึดเกาะกับวัสดุปลูกได้มากยิ่งขึ้นซึ่งอาจทำให้เกิดการฉีกขาดของปลายรากขณะเก็บตัวอย่างได้ อะลูมิเนียมมีผลน้อยต่อความยาวของรากอาจเกิดจากต้นข้าวมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีขึ้น แต่ความยาวรากที่อะลูมิเนียมความเข้มข้น 100 mg/l มีผลลดลงอย่างเด่นชัดอาจเป็นเพราะระดับความเข้มข้นดังกล่าวเป็นระดับวิกฤติของอะลูมิเนียมของข้าวพันธุ์ กข31 ซึ่งข้าวพันธุ์ ITRAT2 ก็มีระดับวิกฤติ

ของอะลูมิเนียมที่ 100 mg/l เช่นเดียวกัน [36] จากการทดลองนี้ ได้คัดเลือกความเข้มข้นของอะลูมิเนียมที่ระดับ 50 และ100 mg/l มาใช้ในการทดลองที่ 2 เนื่องจากที่ระดับ 25 mg/l พบการกระตุ้นการเจริญเติบโตของยอดและราก

5.1.2 การคัดเลือกข้าวให้ทนต่ออะลูมิเนียมโดยการฉายรังสีแกมมากับแคลลัสของข้าว

แคลลัสที่ใช้เมล็ดในการเพาะเลี้ยงจะเจริญมาจากเนื้อเยื่อส่วน scutellum และ mesocotyl โดยเซลล์ของเนื้อเยื่อทั้งสองมีการขยายขนาดและแบ่งตัวอย่างรวดเร็วเกิดขึ้นตรงบริเวณคัพภะใกล้กับส่วนโคนของยอดที่งอกออกมา [18]

เมื่อนำแคลลัสไปฉายรังสีพบว่ารังสีแกมมามีผลต่อการพัฒนาของแคลลัสในลักษณะต่างๆ ได้แก่ แคลลัสตาย แคลลัสที่ไม่มีการพัฒนา และแคลลัสที่เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว สำหรับแคลลัสที่ตาย มีรายงานว่ารังสีแกมมาจะช่วยเร่งประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ polygalacturonase และ pectin methyl esterase [81] ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมีหน้าที่หลักที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายของเพกทิน (pectin) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช [82] ทำให้เซลล์อ่อนนิ่มลง โดยเฉพาะเอนไซม์ pectin methyl esterase จะย่อยสลายเพกทินได้เป็นเมทานอล (methanol) ขึ้นภายในเซลล์และอาจทำความเสียหายให้กับเซลล์ได้ สำหรับแคลลัสที่ไม่มีการพัฒนา มีรายงานว่าแคลลัสที่ได้รับรังสีในปริมาณที่สูงเซลล์จะหยุดการเจริญเติบโต [83] สำหรับแคลลัสที่เกิดกลุ่มเซลล์สีเขียว มีรายงานว่า คลอโรพลาสต์ (chloroplast) ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์ (organelle) ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์แสงภายในเซลล์ จะเป็นออร์แกเนลล์ที่ไวต่อรังสีมากเมื่อเทียบกับออร์แกเนลล์อื่น ๆ โดยเฉพาะส่วนของไทลาคอยด์ (thylakoid) จะเกิดการบวมเป็นอย่างมาก นอกจากนี้บางส่วนของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และ เอนโดพลาสมิกเรติคิวลัม (endoplasmic reticulum) เกิดการบิดตัวและบวมน้ำอีกด้วย [84] โดยรวมแล้วการพัฒนาของพืชจากการได้รับรังสีนั้นขึ้นอยู่กับธรรมชาติและความเสียหายที่เกิดขึ้นกับโครโมโซม โดยเมื่อระดับรังสีเพิ่มขึ้นก็จะเพิ่มความถี่ที่จะเกิดความเสียหายกับโครโมโซมซึ่งอาจส่งผลต่อการตอบสนองต่อการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของพืช และก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ [85] มีรายงานการใช้รังสีร่วมกับเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการปรับปรุงพันธุ์ขิงแดง โดยการฉายรังสีแกมมาในปริมาณ 0-90 Gy กับกลุ่มหน่อขนาดเล็กของขิงแดง พบว่าสามารถแยกพันธุ์กลายที่มีลักษณะแตกต่างไปจากเดิมออกมาได้ 2 แบบที่ปริมาณรังสี 10 Gy [86]

อะลูมิเนียมมีผลต่อการพัฒนาของแคลลัสเนื่องจากมีรายงานว่าอะลูมิเนียมจะสะสมอยู่ในส่วนของผนังเซลล์ (cell wall) ไซโทพลาซึม (cytoplasm) พลาสติด (plastids) และ แวคิวโอล (vacuoles) ทำให้เซลล์สูญเสียความมีชีวิต ยับยั้งการเจริญเติบโต และลดการทำงานของไมโทคอนเดรีย ภายในเซลล์มีปริมาณ soluble protein เพิ่มขึ้น พื้นที่ของกอลจิเมมเบรน (gogi membranes) และเอนโดพลาสมิกเรติคิวลัมเพิ่มขึ้น เพิ่มปริมาตรของแวคิวโอล และปริมาตรของเซลล์ โดยที่ปริมาตรของนิวเคลียสไม่เปลี่ยนแปลง [81] จากสาเหตุดังกล่าวจึงทำให้แคลลัสเกิดความเสียหายและมีการพัฒนาที่ผิดไปจากปกติ มีรายงานการคัดเลือกอัลฟัลฟาซึ่งเป็นพืชอาหารสัตว์ให้ทนทานต่ออะลูมิเนียมผ่านแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารที่เติมไอออนของอะลูมิเนียมในรูป hydrated $AlSO_4$ ปริมาณ 150 ไมโครโมลาร์ สามารถแยกพันธุ์อัลฟัลฟาได้ เมื่อนำไปปลูกในสภาพดินกรดก็ไม่แสดงอาการจากความเป็นพิษของอะลูมิเนียม [82]

ในแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสี และทดสอบในอาหารที่เติมอะลูมิเนียมมีการพัฒนาไปในแนวทางต่าง ๆ นั้นก็เกิดจากผลของรังสีแกมมา และความเป็นพิษของอะลูมิเนียม ในกรณีของแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ก็อาจจะเกิดจากการกลายพันธุ์ โดยรังสีก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอ ก่อให้เกิดพันธุกรรมที่ทนต่ออะลูมิเนียมดังเช่นในอัลฟัลฟาที่ได้ยกตัวอย่างไว้ และการนำแคลลัสออกมาทำให้แห้งในจานแก้วอีกครั้งในระหว่างชักนำให้เกิดต้นเป็นการช่วยกระตุ้นให้แคลลัสสามารถตอบสนองต่ออาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นได้มากขึ้น มีรายงานว่าความชื้นสัมพัทธ์ภายในจานแก้วต่ำกว่าความชื้นภายในเซลล์ของแคลลัส จะทำให้เซลล์มีการคายน้ำ ปริมาณน้ำภายในเซลล์จึงลดลง และพร้อมจะรับน้ำหรือสารอื่น ๆ จากภายนอกเข้าไปในเซลล์ได้อีกครั้งหนึ่ง เมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น แคลลัสจึงสามารถดูดซึมสารอาหารและฮอร์โมนได้ดีและสามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้มากขึ้น [18] ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ทนต่อความเป็นพิษของอะลูมิเนียมโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้รังสีแกมมานั้น พบว่ามีการปรับปรุงข้าวพันธุ์ sentani ผ่านการฉายรังสีแกมมาปริมาณ 0-40 Gy กับแคลลัสจากอับละอองเรณูให้ทนต่อความเป็นพิษของอะลูมิเนียมในสภาวะที่เป็นกรดได้สำเร็จ [20]

5.1.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน

ยีน *SR* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ sulphur metabolism pathway เมื่อทดสอบระดับการแสดงออกของยีน *SR* ในแคลลัสข้าว แสดงให้เห็นว่าในสภาวะปกติระดับการแสดงออกของยีนจะอยู่ในระดับสูง แต่เมื่อได้รับสภาวะเครียดจากอะลูมิเนียม และรังสีแกมมาจะยับยั้งการแสดงออกของยีนเอาไว้ทำให้มีการแสดงออกลดลง แต่การแสดงออกในกลุ่มของแคลลัสที่ผ่านการฉายรังสีปริมาณ 50 Gy มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น มีรายงานการทดลองปลูกข้าวพันธุ์ที่ทนทานต่ออะลูมิเนียม และอ่อนแอต่ออะลูมิเนียมเพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *SR* พบว่ายีนดังกล่าวจะมีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในพันธุ์ที่ทนทาน แต่ในพันธุ์ที่อ่อนแอต่ออะลูมิเนียมการแสดงออกจะลดลงเมื่อระยะเวลาที่รากสัมผัสกับอะลูมิเนียมเพิ่มขึ้น [12] อาจจะเป็นไปได้ว่ารังสีแกมมาที่ปริมาณ 50 Gy จะกระตุ้นการแสดงออกของยีน *SR* ในแคลลัสทำให้มีระดับความทนทานต่ออะลูมิเนียมเพิ่มขึ้น

5.1.4 การศึกษาปริมาณอะลูมิเนียมในแคลลัสข้าว

แคลลัสข้าวสามารถดูดซึมและสะสมอะลูมิเนียมจากอาหารสูตรคัดเลือกไว้ภายในเซลล์ได้ โดยเมื่ออะลูมิเนียมในอาหารมีปริมาณเพิ่มขึ้น เซลล์ก็จะดูดซึมและสะสมไว้มากขึ้น ซึ่งมีรายงานว่าเมื่อปริมาณอะลูมิเนียมในสารละลายธาตุอาหารเพิ่มขึ้น จะทำให้พืชหลายชนิดมีการสะสมอะลูมิเนียมเพิ่มขึ้นด้วย [90] โดยอะลูมิเนียมจะสะสมในส่วนของผนังเซลล์พืช ทำให้ออร์แกเนลล์ในเซลล์ทำงานผิดปกติ [81] และรังสีไม่มีผลต่อการดูดซึมและสะสมอะลูมิเนียมภายในเซลล์

ปริมาณของอะลูมิเนียมที่ตรวจวัดได้ในแคลลัสมีปริมาณที่สูงกว่าในอาหารเพาะเลี้ยงอยู่มากอาจเกิดจากสารเคมีที่ใช้ในการทดลองในส่วนของอาหารสังเคราะห์ตั้งแต่ที่ใช้เพาะเลี้ยงแคลลัสจนกระทั่งถึงอาหารสูตรคัดเลือกนั้นเป็นสารเคมีในลักษณะที่เป็น commercial grade และ laboratory reagent grade ซึ่งยังมีสารตัวอื่นปะปนอยู่บ้างอาจจะทำปฏิกิริยากันในขั้นตอนการทดลอง ส่งผลรบกวนต่อการวัดได้ แต่ในเบื้องต้นก็เป็นข้อมูลทำให้ทราบว่าเทคนิค Neutron Activation Analysis (NAA) มีขีดความสามารถที่จะใช้วัดปริมาณธาตุในตัวอย่างเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้ และปริมาณอะลูมิเนียมในอาหารสูตรคัดเลือกที่เพิ่มขึ้น เซลล์ก็สามารถดูดซึมอะลูมิเนียมได้เพิ่มขึ้นเช่นกัน

5.2 สรุปผลการทดลอง

5.2.1 ความเข้มข้นของอะลูมิเนียมที่ระดับต่ำ ๆ สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นข้าวพันธุ์ กข31 ได้ ในขณะที่ความเข้มข้นของอะลูมิเนียมที่ระดับสูงจะเป็นพิษต่อข้าวส่งผลต่อการเจริญเติบโต โดยจะแสดงความเป็นพิษอย่างเด่นชัดในราก

5.2.2 อะลูมิเนียมและรังสีมีผลต่อพัฒนาการของแคลลัสข้าวพันธุ์ กข31 ในด้านต่าง ๆ

5.2.3 สามารถประยุกต์ใช้เทคโนโลยีด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับรังสีเพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในพืชได้

5.2.4 ในสภาวะปกติยีน *SR* จะมีระดับการแสดงออกของยีนอยู่ในระดับสูง แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเครียดจากอะลูมิเนียมจะมีการแสดงออกที่ลดลง

5.2.5 แคลลัสข้าวสามารถดูดซึมและสะสมปริมาณอะลูมิเนียมเพิ่มขึ้น เมื่อปริมาณอะลูมิเนียมในอาหารสูตรคัดเลือกเพิ่มขึ้น และสามารถใช้เทคนิค NAA (Neutron Activation Analysis) ในการวัดปริมาณธาตุในตัวอย่างที่มีชีวิตได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดลองที่1 วิธีที่ใช้วัดการเจริญเติบโตของต้นข้าวควรจะใช้การวัดน้ำหนักแห้ง เพราะเมื่อต้นข้าวเจริญเติบโตมากขึ้นในช่วง 28 วันพบว่ารากเกาะติดกับวัสดุปลูกมากทำให้รากในบางต้นฉีกขาด

2. ในการทดลองที่2 หลังจากเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารทดสอบอะลูมิเนียมแล้วก่อนจะทำให้แคลลัสแห้งในจานแก้วควรจะย้ายแคลลัสเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสก่อนเพื่อเพิ่มโอกาสให้เซลล์ที่รอด หรือเกิดการกลายพันธุ์เพิ่มจำนวน ก่อนย้ายแคลลัสลงเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำต้น

3. ในการทดลองที่ 3 ควรจะมีการตรวจสอบยีนที่มีความสัมพันธ์กับความทนต่ออะลูมิเนียมเพิ่มเติม เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในงานการปรับปรุงพันธุ์พืช

5.4 แนวทางการทดลองในอนาคต

จากการทดลองที่ได้ทำไปแล้ว พบว่าการฉายรังสี 35 Gy ช่วยให้สามารถคัดเลือกต้นข้าวที่สามารถเจริญจากแคลลัสที่ประสบกับสภาวะอะลูมิเนียมในอาหารสูง 50 mg/l ที่ pH 3.9 ได้ จึงมีความจำเป็นต้องทดสอบความทนต่ออะลูเมิเนียมและการถ่ายทอดลักษณะทนต่ออะลูมิเนียม ของสายพันธุ์ข้าวที่จะเกิดขึ้นจากข้าวต้นนี้ต่อไป ซึ่งสามารถทำได้โดยปลูกเลี้ยงข้าวต้นนี้ (เรียกกว่าต้น M1) จนออกรวง แล้วนำเมล็ดที่ได้ไปเพาะพันธุ์ (เป็นต้นข้าวรุ่น M2) นำต้นข้าวที่ได้จำนวนหนึ่งไปทดสอบความทนต่ออะลูมิเนียม โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยอะลูมิเนียมความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0 – 100 mg/l และทดสอบการแสดงออกของยีน *SR* ในสภาวะดังกล่าวเปรียบเทียบกับต้นข้าวพันธุ์เดิมที่ไม่เคยผ่านการอาบรังสีเพื่อปรับปรุงพันธุ์

หากสายพันธุ์ข้าวที่คัดเลือกได้สามารถทนต่ออะลูมิเนียมอย่างสม่ำเสมอได้อย่างน้อยสามชั่วรุ่น จะสามารถสรุปได้ว่ารังสีก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอย่างถาวร ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ที่สามารถถ่ายทอดได้ทางพันธุกรรม ได้ข้าวสายพันธุ์กลายที่มีความทนต่ออะลูมิเนียมในสภาวะกรดจัด

รายการอ้างอิง

[1] กลุ่มถ่ายทอดวิทยาการผลิตเมล็ดพันธุ์ดี ศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวขอนแก่น. พันธุ์ข้าว กข31. [ออนไลน์]. แหล่งที่มาhttp://kkn-rsc.ricethailand.go.th/rice/pedigree /02/RD31.html [2 สิงหาคม 2555]

[2] เจริญ เจริญจำรัสชีพ, กำชัย กาญจนธนเศรษฐ, และเมธิน ศิริวงษ์. 2540. การจัดการดินกรดในประเทศไทย. กรมพัฒนาที่ดิน. กรุงเทพฯ

[3] Nan Zhou., et al. 2011. The effects of rapeseed root exudates on the form of aluminium in aluminium stressed rhizosphere soil. Crop Protection 30: 631-636.

[4] Jian Feng Ma. 2007. Syndrome of Aluminium toxicity and Diversity of aluminium resistance in Higher Plants. Internationnal Review of Cytology 264: 225-252

[5] Wallace, S.U., and I.C.Anderson. 1984. Aluminium toxicity and DNA synthesis in wheat root. Agronomic 76: 5-8.

[6] Thornton, F.C., M. Schaele., and D.J. Raynal. 1986. Effects of aluminium on growth, development, and nutrient composition of honeylocust (*Gleditsia Triacanthos* L.) seedling. Tree physiology 2: 307-316.

[7] Munn, D.A., and R.E. McCollum. 1976. Solution culture evaluation of sweet potato cultivar tolerance to aluminum. Agronomy 68: 989-991.

[8] Haynes, R.J. 1982. Effects of liming on phosphate availability in acid soil: A critical review. Plant and Soil 68: 289-308.

[9] สุนิยม ตาปราบ. 2532. ความสัมพันธ์ระหว่างความทนต่ออลูมินัมกับความทนต่อดินเปรี้ยวของพันธุ์ข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[10] Van Sint Jan, V., et al. 1997. Selection of al resistance plants from a sensitive rice cultivar using somaclonal variation in vitro and hydroponic cultures. Euphytica 97: 303-310.

[11] Samantaray, S., G.R. Rout., and P.Das. 1999. Invitro selection and regeneration of zinc tolerant calli from *Setaria italic*. Plant Science 143: 201-209.

[12] Merediton, C.P. 1978. Selection and Characterization of Aluminum-resistant Variants from tomato cell cultures. Plant Science 12: 25-34.

[13] Mansur, L.M. 1992. Resistance to iron-deficiency chlorosis in PI 437654 Soybean. Crop Science 32: 1137-1138.

[14] Hossain, M.F., and M.S. Alam. 2001. Effect of Gamma Irradiation on the callus, Developed from Indica Rice. Journal of Biological Sciences 4: 670-671.

[15] Jianijun zhang. 2007. Identification of aluminium-responsive genes in rice cultivars with different aluminium sensitivities. Journal of Experimental Botany 58: 2269-2278.

[16] Minocha Rakesh., et al. 2001. Effects of aluminum in red spruce (*Picea rubens*) cell cultures: Cell growth and viability, mitochondrial activity, ultrastructure and potential sites of intra- cellular aluminum accumulation. Physiologia plantarum 113: 486-498.

[17] Hiroyuki koyama., et al.1995. Effects of aluminum and pH on root growth and cell Viability in *Arabidosis thaliana* Lands berg in hydroponic culture. Plant cell physiol 36(1): 201-205.

[18] Claudio Sanzonowicz, and Thomas Jot Smyth. 1995. Effect of Hydrogen on Soybean Root Growth in a Subsurface Solution. Pesq.agropec.bras 30: 255-261.

[19] ประภา ศรีพิจิตต์ และพรทิพย์ ชีวเศรษฐธรรม. 2537. การพัฒนาไปเป็นต้นของแคลลัสที่เจริญมาจากคัพภะของข้าวหอม (*Oryza sativa* L.) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย์) 28:27-37.

[20] Howeler, R.H., and L.F. Cadavid. 1976. Screening of rice cultivars for tolerance to Al-toxicity in nutrient solutions as compared with a field screening method. Agronomy Journal 68, July-August: 551-555

[21] Dameria Hutabarat. Effect of gamma radiation on differentiation of rice calli under aluminum stressed. [Online]. 1996. Available from: https://www.digilib.batan.go.id/.../ Dameria_Hutabarat-43.pdf [2011, Mach 7]

[22] Google.การตลาดข้าว [ออนไลน์]. แหล่งที่มา http://daravadi.org/moncldocument/market-01-pdf [2 สิงหาคม 2555]

[23] สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมข้าว. องค์ความรู้เรื่องข้าว กข31 [ออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.brrd.in.th/rkb/varies/index.php-file=conten.php$id=61.htm. [2 สิงหาคม 2555]

[24] คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2544. ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[25] มูนเวทย์ ศรีเสน และวิศิษฐ์ โชลิตกูล. 2523. ดินเปรี้ยวในที่ราบลุ่มกรุงเทพฯ. งานวิจัยเคมีและความสมบูรณ์ของดิน กองเกษตรเคมี กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 31 น.โรเนียว

[26] อภิรดี อิ่มเอิบ. 2536. สถานภาพของดินเกษตรก่อนเริ่มโครงการดินและปุ๋ยปี 2535. วารสารพัฒนาที่ดิน 29 (319): 33-40

[27] Sanchez, P. A. 1976.Properties and management of soils in the tropics. Philippine graphic arts,Ins .Caloocan cith. 618 p.

[28] Kamprath, E. J. 1980. Soil acidity in well dainty in well drain soils of the tropics as a constraint to food production. Cited by 13. Boonsompobpan. The role of aluminum in soil acidity .19 p.

[29] Wagatsuma, T., and Ezoe, y. 1985. Effect of pH on ionic species of aluminum in medium and on aluminum toxicity under solution culture. Soil science Plant Nutrition 4: 547-561.

[30] ทัศนีย์ อัตตะนีทน์, สรสิทธิ์ วัชโรทยาน และเค.คยูมา. 2524. การเปรียบเทียบวิธีการใส่ปุ๋ยฟอสเฟตในดินเปรี้ยวจัด วารสารดินและปุ๋ย 3: 5-10.

[31] สุมาลี สุทธิประดิษฐ์. 2536. ความอุดมสมบูรณ์ของดิน. ภาควิชาธรณีศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

[32] สรัญญา คำอำภัย. 2548. ผลของสารปรับปรุงดินบางชนิดต่อสมบัติของดินและการเจริญเติบโตของพืชที่ปลูกในดินกรดที่ดอนภาคใต้ของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรดิน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

[33] Clarkson, p.r. 1967. Interactions between aluminum and phosphorus on root surfaces and cell wall material. Plant soil 27: 347-356.

[34] Rengel, Z., and Reid, R.J. 1997. Uptake of Al across the plasma membrane of plant cells. Plant Soil 192: 31-35.

[35] Doncheva, S., et al. 2005. Root cell patterning: A primary target for aluminum toxicity in maize. Experimental Botany 56: 1213-1220.

[36] Fageria, N.K., and J.R.P. Cavalno.1982. Influence of aluminum in nutrient solutions on chemical composition in upland rice cultivars. Plant and soil 69: 31-44.

[37] Mengel, k., and kirkby, E.A. 1987. Principles of Plant nutrition. A edition. Worblaiten Bern: International Potash Insitue.

[38] Google.วิธีแกล้งดินตามพระราชดำริ. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.baanjomyut.com/library_2/soil/07.html [2 สิงหาคม 2555]

[39] กรมพัฒนาที่ดิน. การใช้วัสดุปูนเพื่อการเกษตร (Agricultural lime) ในการปรับปรุงดิน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.ldd.go.th/web_ord/km/องค์ความรู้ส่วนดินเปรี้ยว.pdf [2 สิงหาคม 2555]

[40] นงคราญ มณีวรรณ และเมธิน ศิริวงศ์. การจัดการดินเปรี้ยวจัด และดินกรด เพื่อการปลูกพืช [ออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.ldd.go.th/Lddwebsite/web_ord/.../pdf/P_Technical04016.pdf [2 สิงหาคม 2555]

[41] รสมาลิน ณ ระนอง. 2548. การพัฒนาพื้นที่ดินเปรี้ยวจัดแบบบูรณาการเพื่อการเกษตรในพื้นที่ ต.แหลม อ.หัวไทร จ.นครศรีธรรมราช. สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน กรมพัฒนาที่ดินกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 50 น.

[42] ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2538. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.

[43] Larkin, P.J., and W.R. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation -a novel source of variability from cell cultures for protoplast improvement. Theoretical and Applied Genetics 60: 197–214.

[44] กิตติ โพธิปัทมะ, สุริยา ฤธาทิพย์ และกรวิศฎ์ ณ ถลาง. 2555. การแปรผันและการกลายพันธุ์ของพืชจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วารสารวิชาการพระจอมเกล้านครเหนือ 22. no 1:225-231

[45] Bairu, M.W., A.O, Aremu., and J. Van Staden. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regul 63: 147–173.

[46] Karp, A.1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. Euphytica 85: 295–302.

[47] Novak, J. D.1990. Concept maps and Vee diagrams: Two metacognitive tools for science and mathematics education. Instructional Science 19: 29-52.

[48] Hossain, Zahed., et al. 2007. Development of NaCl-tolerant line in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. through shoot organogenesis of selected callus line. Journal of Biotechnology 129: 658–667.

[49] สุริยันต์ ฉะอุ่ม และคณะ. 2542. การคัดเลือกแคลลัสข้าวของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 ให้ทนทานต่อสารกำจัดวัชพืชไกลฟอเสต. เกษตรศาสตร์ (วิทย์) 33: 507-524.

[50] Deborah A, Samac and Mesfin Tesfaye. 2003. Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils – a review. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 75: 189–207

[51] Srinives, P., et al. 1989. *In vitro* Selection for soybean line tolerant to saline soils. RD & E Project Semi-annual Report. no.4. 14 p.

[52] Parrot, W.A., and Bouton, J.H. 1990. Aluminum tolerance in alfalfa as expressed in tissue culture. Crop science 30:387-389.

[53] มหาวิทยาลัยรามคำแหง. บทที่ 10 การเพาะลี้ยงเซลล์และการปรับปรุงพันธุ์พืช. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา http://e-book.ram.edu/e-book/b/BT465/BT465-10.pdf [14 สิงหาคม 2555]

[54] Coimbra, J.L.M., F.I.F. de Carvalho., and A.C. de Oliveira. 2004. Genetic variability induced by chemical and physical mutagenic agents in oat genotypes. Crop Breed. Appl. Biotechnol 4:48–56.

[55] Sigurbjornson, B. 1983. Induced mutation. *In* D.R. Wood (ed.). Crop Breeding. Amer. Sor. Agron. And Crop Sci. Soc. Amer., Madison, Wisconsin: 153-176.

[56] สิรนุช ลามศรีจันทร์. 2527. พันธุศาสตร์รังสี. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

[57] Wood, D. R. 1983. Crop Breeding. The American Society of Agronomy, Inc., and the Crop Science Society of American Inc., Wisconsin, USA.

[58] Brunner, H. 1995. Radiation induced mutations for plant selection. Appl. Radiat. Isot 46: 589–594.

[59] Khan, S.J., et al. 2000. Development of sugarcane mutants through in vitro mutagenesis. Pak. J. Biol. Sci 3: 1123–1125.

[60] สิรินุช ลามศรีจันทร์. 2540. การกลายพันธุ์ของพืช. ภาควิชารังสีประยุกต์และไอโซโทป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

[61] อดิศร กระแสชัย. บทที่ 8 การปรับปรุงพันธุ์พืช. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา http//:www. mis.agri.cmu. ac.th/ course/course_lecture_download.asp?...CID... [3 สิงหาคม 2555]

[62] กนกพร บุญศิริชัย วไลลักษณ์ แพทย์วิบูลย์ และวิชัย ภูริปัญญวานิช. การกลายพันธุ์[ออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.tint.or.th/nkc/nkc5003/nkc5003l.html [13 กุมภาพันธ์ 2555]

[63] นพรัตน์ อินศร. 2552. การปรับปรุงพันธุ์บานชื่นเลื้อยใบด่างโดยใช้รังสีแกมมา.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[64] วไลลักษณ์ แพทย์วิบูลย์. การปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยรังสี. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.tint.or.th/application/apply-plant.html [1 มิถุนายน 2555]

[65] Saleem, M. Y., et al. 2005. Induced mutation and *in vitro* techniques as a method to induce salt tolerance in Basmati rice (*Oryza sativa* L.) In.t .Y J.. SEanleveirmon, *e. tS acli*.. Tech. © Summer 2, no. 2: 141-145.

[66] วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. RNA interference. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา http://th.wikipedia.org/wiki/RNA_interference [8 สิงหาคม 2555]

[67] รัชนีกร กัลล์ประวิทธ์. ยีนและการแสดงออกของยีน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา www.si. mahidol. ac.th/.../บทที่12_ยีนและการแสดงออกของยีน. [9 สิงหาคม 2555]

[68] สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย. 2548. สาระน่ารู้อณูพันธุ์ศาสตร์. สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. เท็กซ์ แอนด์เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด. กรุงเทพฯ.

[69] Scitable by nature education. Gene expression. [Online]. Available from: http://www.nature.com/scitable/topicpage/gene-expression-14121669 [2012, August 7]

[70] EQA center. วิชาการ 1 นาที ครั้งที่ 22 เรื่อง เครื่อง Thermal cycler กับ เทคนิค PCR. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.eqacenter.com/2010/11/blog-post.html [16 สิงหาคม 2555]

[71] วีระพงศ์ ลุลิตานนท์. 2008. Real Time Polymerase Chain Reaction. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา http//:microbio.md.kku.ac.th/.../พื้นฐาน_Real_Time_PCR_ June_08.pdf [18 สิงหาคม 2555]

[72] สุรเชษฐ เอี่ยมสำอาง และดวงกมล แม้นศิริ. 2011. การใช้วิตามินซีในการส่งเสริมความทนต่อสภาวะเครียดเกลือในข้าว. The 12th graduate research conference. มหาวิทยาลัยขอนแก่น: 544-553.

[73] อดิลัน หนิมัน. 2549. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับตรวจแยกเชื้อเลปโตสไปรา โดยใช้ยีนที่สร้างโปรตีนที่มีส่วน Leucine-Rich Repeat. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุวิศวกรรม บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[74] สิรินาฏ ศิริ. 2547. เทคนิค Real Time RT-PCR กับการศึกษาการแสดงออกของยีน. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 32(2): 86-92.

[75] Riede, CR. and Anderson, JA .1996. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. Crop Science 36: 905–909.

[76] Kimberley C, Snowden and Richard C. Cardner. 1993. Five Genes induced by Aluminum in Wheat *(Trificum aestivum* .) roots. Plant physiology 103: 855-861.

[77] Sasaki, T., et al. 2004. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. The Plant Journal 37:645–653.

[78] Nguyen VT., et al. 2001. Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics 102: 1002–1010.

[79] Moore, D.P. 1971. Physiological effects of pH on roots. In E.W Carson (ed). The plant Root and its Environment, 135-151. University of Virginia Press, Charlottesville.

[80] Rincon, M., and Gonzales, R.A. 1992. Aluminium partitioning in intact roots of Aluminium-tolerant and aluminium-sensitive wheat (*Triticum aestivum*) Cultivars. Plant Physiology 99: 1021-1028.

[81] Charlotle Poschenrieder., et al. 2008. A Glance into aluminium toxicity and resistance in plants. Science of the Total Environment 400: 356-368.

[82] Kovacs, E., and A. Kerestes. 2002. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. Micron 33: 199-210.

[83] ทิพวรรณ ทองสุข. 2553. ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อสัมผัสและเทคนิคการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ผักผลไม้แปรรูป. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 29, 2: 456-469.

[84] Bajaj, Y.P.S., A.W. Saettler, and M.W. Adams.1970. Gamma irradiation studies on seeds, seedling and callus tissue culture of *Phaseolus vulgaris* L. Radiation Botany 10: 119-124.

[85] Seung Gon wi., et al. 2007. Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. Micron 38:553-564.

[86] J nor A Hasbullah., el al. 2012. Irradiation affection in vitro organogenesis, callus growth and plantlet development of *Gerbera jamesonii*. Horticultura brasileira 30: 252-257.

[87] สิรินุช ลามศรีจันทร์ และคณะ. 2539. การเหนี่ยวนำให้กลายพันธุ์ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของขิงแดง (Alpinia purpurata). ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีนิวเคลียร์ครั้งที่ 6, 2-4 ธันวาคม 2539. ณ โรงแรมเซ็นทรัลพลาซ่า, กรุงเทพ 116-122.

[88] Minocha, Rakesh., et al. 2001. Effects of aluminum in red spruce (*Picea rubens*) cell cultures: Cell growth and viability, mitochondrial activity, ultrastructure and potential sites of intra- cellular aluminum accumulation. Physiologia plantarum 113: 486-498.

[89] Kamp-Glass., et al.1993. Biotechniques for improving acid aluminum tolerance in alfalfa. Plant cell Rep.12: 590-592.

[90] Rout, G.R., S. samantaray, P. das. 2001. Aluminium toxicity in plants: a review. Agronomies 21: 3–21.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางที่ ก.1 ความยาวของยอดและรากของต้นกล้าข้าวพันธุ์ RD31 ที่อายุต่างๆ (Mean±SE)

Length / Days	Shoot (cm)					
	0 mg/l Al pH 6.0	0 mg/l Al pH 3.9	25 mg/l Al pH 3.9	50 mg/l Al pH 3.9	75 mg/l Al pH 3.9	100 mg/l Al pH 3.9
14 day	23.34±0.98	20.41±1.73	22.32±0.51	18.55±1.58	16.83±1.24	16.85±0.57
21 day	24.21±0.76	22.67±0.96	22.85±0.77	21.73±0.82	18.80±0.86	16.86±0.65
28 day	25.40±1.29	23.93±0.48	22.28±1.07	21.86±0.75	20.64±0.50	18.51±0.73
Root (cm)						
14 day	7.47±0.54	5.78±0.60	8.83±0.63	4.65±0.53	5.56±0.44	4.99±0.56
21 day	7.32±0.38	6.74±0.23	8.28±0.49	5.35±0.25	5.06±0.54	4.15±0.47
28 day	6.58±0.31	6.82±0.36	6.56±0.61	6.06±0.54	5.34±0.23	3.33±0.38

ตารางที่ ก.2 การเตรียมสารละลายธาตุอาหาร Yoshida stock solution

Chemical compound	ปริมาณสารที่ใช้ g/l	ความเข้มข้นของ stock solที่ได้	ปริมาณ stock sol ที่ใช้เพื่อเตรียมสารละลายธาตุอาหาร 8 ลิตร	ความเข้มข้นของธาตุในสารละลายธาตุอาหาร(mg/l)
$(NH_4)_2 SO_4$	75.42	16,000	20	40 mg/l N
KH_2PO_4	7.02	1,600	20	4 mg/l P
K_2SO_4	35.69	16,000	20	40 mg/l K
$CaCl_2$.$2H_2o$	44.00	16,000	20	40 mg/l Ca
$MgSO_4 7H_2O$	164.00	16,000	20	40 mg/l Mg
$MnSO_4 4H_2O$	2.46	800	5	0.50 mg/l Mn
$Na_2MoO_4 2H_2O$	0.20	80	5	0.05 mg/l Mo
$Na_2B_4\ O_7 10H_2O$	2.82	320	5	0.20 mg/l B
$ZnSO_4 7H_2O$	0.07	16	5	0.01 mg/l Zn
$CuSO_4 5H_2O$	0.063	16	5	0.01 mg/l Cu
$FeSO_4 7H_2O$	15.92	3,200	5	2.00 mg/l Fe

ภาคผนวก ข

ตารางที่ ข.1 การเตรียม Stock solution ของ MS Stock (100x) & Working Dilution (1x)

Stock No.	Chemical compound	Mg/l
1	NH_4No_3	1650
	KNO_3	1900
2	$CaCl_3 2H_2o$	440
3	KH_2PO_4	170
	H_3BO_3	6.2
	$Na_2MoO_4 2H_2O$	0.25
	KI	0.83
	$COCl_2 6H_2O$	0.025
4	$MgSO_4 7H_2O$	370
	$MnSO_4 4H_2O$	22.3
	$ZnSO_4 7H_2O$	8.6
	$CuSO_4 5H_2O$	0.025
5	$FeSO_4 7H_2O$	27.8
	Na_2-EDTA	37.3
6	My-onositol	100
	Nicotinic Acid (B3)	0.5
	Glycine	2.0
	Pyridoxine-HCl (B6)	0.5
	Thiamine-HCl (B1)	0.1

ภาคผนวก ค

ตารางที่ ค.1 ความเข้มข้นของ RNA จากตัวอย่างแคลลัสข้าว

Sample	OD_{260nm}	Conc(ng/ul)	Total volumn (8 ul)	
			1250 (ng/ ul)	dH_2O
0,0	0.32	804.48	1.55	6.45
0,50	0.197	495.26	2.52	5.48
0,100	0.267	671.24	1.86	6.14
35,0	0.135	339.39	3.68	4.32
35,50	0.194	487.72	2.56	5.44
35,100	0.23	578.22	2.16	5.84
50,0	0.08	201.12	6.22	1.78
50,50	0.102	256.43	4.87	3.13
50,100	0.265	666.21	1.88	6.12

RNA Concentrations (ng/ul) = OD_{260} x 50.28 x dilution factor (50)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศิริลักษณ์ ชูแก้ว เกิดเมื่อวันที่ 1 เมษายน พ.ศ. 2525 ที่โรงพยาบาลรัตภูมิ สำเร็จการศึกษาในระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนรัตภูมิวิทยา และสำเร็จการศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ เมื่อปีการศึกษา 2548 จากนั้นเข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีนิวเคลียร์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2552 และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2555 โดยได้รับทุนการศึกษาจากสถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน)

ประวัติการทำงานตั้งแต่ ปี พ.ศ.2548 ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ของสำนักงานปรมณูเพื่อสันติ

พ.ศ. 2551-ปัจจุบัน ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ของสถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน)