การประเมินพันธุ์ข้าวทนทานธาตุอะลูมิเนียมและการตอบสนองด้านสรีรวิทยาและชีวเคมีของข้าวพันธุ์ไทยต่อสภาวะดินกรดและอะลูมิเนียมเป็นพิษ

โดย

นางสาวสุวรรณา พู่กันแกมแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา แผน ก แบบ ก 1 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การประเมินพันธุ์ข้าวทนทานธาตุอะลูมิเนียมและการตอบสนองด้านสรีรวิทยาและชีวเคมีของข้าวพันธุ์ไทยต่อสภาวะดินกรดและอะลูมิเนียมเป็นพิษ

โดย
นางสาวสุวรรณา พู่กันแกมแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา แผน ก แบบ ก 1 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

EVALUATION OF ALUMINUM-TOLERANCE AND PHYSIOL-BIOCHEMICAL RESPONSES OF THAI RICE CULTIVARS UNDER ACIDIC PH AND ALUMINUM TOXICITY

By

MISS Suwanna PHUKUNKAMKAEW

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for Master of Science (BIOLOGY)
Department of BIOLOGY
Silpakorn University
Academic Year 2022
Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ การประเมินพันธุ์ข้าวทนทานธาตุอะลูมิเนียมและการตอบสนองด้านสรีรวิทยาและชีวเคมีของข้าวพันธุ์ไทยต่อสภาวะดินกรดและอะลูมิเนียมเป็นพิษ

โดย นางสาวสุวรรณา พู่กันแกมแก้ว

สาขาวิชา ชีววิทยา แผน ก แบบ ก 1 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศรัณยพร มากทรัพย์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. สุริยันตร์ ฉะอุ่ม

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นรงค์ ฉิมพาลี)

พิจารณาเห็นชอบโดย

....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพรรณญิกา เส็งสาย)

....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศรัณยพร มากทรัพย์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ดร. สุริยันตร์ ฉะอุ่ม)

....ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

(ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล)

620720013 : ชีววิทยา แผน ก แบบ ก 1 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
คำสำคัญ : ดินกรด, เหล็ก, อะลูมิเนียม, การแสดงออกของยีน, ขาวหมากแขก

นางสาว สุวรรณา พู่กันแกมแก้ว: การประเมินพันธุ์ข้าวทนทานธาตุอะลูมิเนียมและการตอบสนองด้านสรีรวิทยาและชีวเคมีของข้าวพันธุ์ไทยต่อสภาวะดินกรดและอะลูมิเนียมเป็นพิษ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศรัณยพร มากทรัพย์

ดินกรด (Acid soils) เป็นสาเหตุทำให้ธาตุโลหะหนักบางชนิด เช่น เหล็ก (Fe) และอะลูมิเนียม (Al) ละลายในดินกรดและมีการลำเลียงไปสะสมในต้นพืชมากขึ้น จึงส่งผลเสียต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชต่าง ๆ รวมถึงข้าว (*Oryza sativa* L.) ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากของประเทศไทย ข้าวไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก โดยข้าวแต่ละพันธุ์อาจให้ผลผลิตและมีความสามารถในการทนต่อสภาวะดินกรดที่มีธาตุโลหะหนักสูงแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามการศึกษากลไกการตอบสนองต่อสภาวะดินกรดที่มีธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมสูงในข้าวไทยยังมีข้อมูลน้อยมาก และยังขาดการทดสอบและจัดกลุ่มพันธุ์ข้าวไทยที่ทนต่อสภาวะดังกล่าว ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกการตอบสนองและคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่สามารถทนต่อสภาวะดินกรดที่มีปริมาณธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมเป็นพิษ จากการศึกษากลไกการตอบสนองของข้าว 28 พันธุ์เมื่อได้รับ $FeSO_4$ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และ $Al_2(SO4)_3$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมมีการสะสมสูงในส่วนรากและมีการสะสมในปริมาณสูงที่ใบในข้าว 13 ชนิด ส่งผลให้ข้าวแต่ละพันธุ์มีการเจริญเติบโตและตอบสนองทางสรีรวิทยาต่างกัน โดยสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มพันธุ์ทน (Tolerance) และกลุ่มพันธุ์ไม่ทน (Sensitive) ต่อสภาวะดินกรดที่มีปริมาณธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมเป็นพิษ จำนวน 13 พันธุ์ และ 15 พันธุ์ ตามลำดับ ในกลุ่มพันธุ์ทนพบว่าข้าวพันธุ์ขาวหมากแขก (KMK) พบการสะสมเหล็กและอะลูมิเนียมที่รากและใบมากที่สุดและมากกว่าพันธุ์ Azucena (Positive check) เมื่อทำการทดลองในข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 ที่ได้รับ $Al_2(SO_4)_3$ ความเข้มข้น 0, 10, 25 และ 50 mM พบว่าความเข้มข้นของอะลูมิเนียมที่สูงขึ้นส่งผลต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยา โดยทำให้อุณหภูมิในใบสูงและอัตราการปิดปากใบสูงขึ้น ส่งผลให้ข้าวมีการคายน้ำลดลงและการสังเคราะห์แสงลดลงในข้าวทั้งสามพันธุ์ นอกจากนี้ผลการศึกษาพบว่าสารประกอบอะลูมิเนียมในรูปแบบที่ต่างกันอาจส่งผลต่อการลำเลียงอะลูมิเนียมเข้าสู่รากของพืชต่างกัน โดยข้าวสามารถดูดซึมอะลูมิเนียมในรูปของ $AlCl_3$ เข้าสู่รากได้สูงกว่าและเป็นพิษต่อต้นข้าวมากกว่าในรูปของ $Al_2(SO_4)_3$ และเมื่อข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 ได้รับ $AlCl_3$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ พบว่าธาตุอะลูมิเนียมจะถูกสะสมไว้ในรากของข้าวพันธุ์ Azucena กับ IR64 แต่ไม่ถูกลำเลียงไปที่ใบเหมือนข้าวพันธุ์ RD35 จึงทำให้เกิดความเป็นพิษน้อยกว่าและทนต่อธาตุอะลูมิเนียมได้สูงกว่า นอกจากนี้เมื่อศึกษาจากการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงและสะสมอะลูมิเนียมในข้าวพันธุ์ Azucena (Tolerant), KMK (Tolerant) และ IR64 (Sensitive) ด้วยเทคนิค quantitative real-time PCR พบว่ายีน *OsNrat1*, *OsALS1* และ *OsVIT2* มีการแสดงออกในข้าวพันธุ์ KMK มากกว่าพันธุ์ Azucena และ IR64 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณอะลูมิเนียมที่สะสมในรากและใบ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าข้าวแต่ละพันธุ์มีกลไกการทนต่ออะลูมิเนียมเป็นพิษแตกต่างกันโดยพันธุ์ IR64 ไม่ทนต่ออะลูมิเนียม ส่วน Azucena อาจทนต่ออะลูมิเนียมเป็นพิษโดยการไม่ลำเลียงอะลูมิเนียมเข้าสู่เซลล์ราก ในขณะที่พันธุ์ KMK อาจลำเลียงและสะสมอะลูมิเนียมไว้ในแวคิวโอล เพื่อลดความเป็นพิษ ซึ่งลักษณะดังกล่าวอาจเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนต่อสภาวะดินกรดที่มีอะลูมิเนียมเป็นพิษในอนาคตได้

620720013 : Major (BIOLOGY)
Keyword : Acid soil Iron Aluminum Gene expression KaoMakKeak

MISS Suwanna PHUKUNKAMKAEW : Evaluation of aluminum-tolerance and physiol-biochemical responses of Thai rice cultivars under acidic pH and aluminum toxicity Thesis advisor : Assistant Professor Sarunyaporn Maksup

Acidic soil increases the solubility of heavy metals, such as iron (Fe) and aluminum (Al), which are transported and accumulated in plant tissues. This adversely affects the growth and productivity of various crops, including rice (*Oryza sativa* L.), which is a crucial economic crop in Thailand. Thai rice exhibits significant genetic diversity; each rice variety may have varying yields and the ability to withstand acidic stresses. However, limited information is available regarding the response mechanisms of Thai rice to acidic soil conditions with high Fe and Al content. Furthermore, there is a lack of testing and classification of Thai rice varieties that are resistant to such conditions. Hence, this study aims to investigate the response mechanisms and select rice varieties capable of withstanding acidic stresses with toxic Fe and Al content. The response mechanisms of 28 rice cultivars were examined under treatment with 100 mM of $FeSO_4$ and 50 mM of $Al_2(SO_4)_3$, in comparison to the control. It was observed that Fe and Al accumulation was high in the roots and leaves of 13 rice cultivars, resulting in distinct growth and physiological responses for each cultivar. These cultivars can be categorized into two groups: 13 tolerant cultivars and 15 sensitive cultivars to acidic stresses with toxic Fe and Al content, respectively. Among the tolerant group, Kao Mak Kaek (KMK) exhibited higher Fe and Al accumulation in roots and leaves compared to Azucena (positive check). An experiment conducted on RD35, Azucena, and IR64 cultivars exposed to 0, 10, 25, and 50 mM $Al_2(SO_4)_3$ revealed that higher Al concentrations affected physiological responses by increasing leaf temperature and the rate of stomatal closure, thereby reducing transpiration and photosynthesis in all 3 rice cultivars. Furthermore, the results demonstrated that different forms of Al compounds could have varying effects on Al uptake by plant roots. Rice plants were capable of absorbing more Al in the form of $AlCl_3$, which caused greater toxicity than when absorbed as $Al_2(SO_4)_3$. When RD35, Azucena, and IR64 were exposed to 1 mM $AlCl_3$, Al was deposited in the roots of Azucena and IR64 but not transported to the leaves, unlike RD35, resulting in reduced toxicity and higher Al tolerance. Moreover, gene expression analysis using quantitative real-time PCR technique revealed differential expression of genes involved in Al transport and accumulation in rice cultivars Azucena (tolerant), KMK (tolerant), and IR64 (sensitive). The expression levels of *OsNrat1*, *OsALS1*, and *OsVIT2* genes were higher in KMK than in Azucena and IR64, which correlated with the amount of Al deposited in roots and leaves. In conclusion, different rice cultivars exhibit distinct tolerance mechanisms to Al stress, with IR64 being intolerant to Al, while Azucena may tolerate Al stress by preventing Al transport into root cells. On the other hand, KMK may reduce Al toxicity by transporting and accumulating Al in vacuoles. These characteristics hold promise for selecting and improving rice varieties resistant to acidic soil conditions with Al toxicity in the future.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรัณยพร มากทรัพย์ (อาจารย์ที่ปรึกษา) ดร.สุริยันตร์ ฉะอุ่ม (อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม) ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล (อาจารย์กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ) รองศาสตราจารย์ ดร.กุลนาถ อบสุวรรณ (ประธานหลักสูตรปริญญาโท) คณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่านเป็นอย่างสูงที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำ คำสอนต่างๆ และชี้แนะในเรื่องการเรียน การจัดทำวิทยานิพนธ์ รวมทั้งการใช้ชีวิต

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) (National Science and Technology Development Agency; NSTDA) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (National Center for Genetic Engineering and Biotechnology; BIOTEC) Plant Physiology and Biochemistry Program โครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (Thailand Graduate Institute of Science and Technology; TGIST) และศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว (Rice Science Center) ที่ให้โอกาสและสถานที่ในการศึกษา การทำงานวิจัย รวมถึงการสนับสนุนทุนการศึกษาตลอดระยะเวลาการศึกษาในระดับปริญญาโท

ขอขอบคุณ ดร.สุริยันตร์ ฉะอุ่ม ดร.รุจิรา ทิศารัมย์ ดร.คัทรินทร์ ธีระวิทย์ ดร.ณัฐวดี จินตโกวิท คุณฐาปนีย์ สามพุ่มพวง รวมทั้งพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ในทีมวิจัยนวัตกรรมด้านพันธุศาสตร์และสรีรวิทยาพืช (APPT) ทุกคนที่คอยให้การสนับสนุนห้องปฏิบัติการ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และให้ความช่วยเหลือในการทดลองต่างๆ ทำให้งานวิจัยเป็นไปอย่างราบรื่น และสำเร็จตามเป้าหมาย นอกจากนี้ยังคอยให้คำปรึกษา คำแนะนำในการทำงานวิจัย การเขียนงานวิจัย และหลักการใช้ชีวิตตลอดช่วงระยะเวลาที่ผ่านมา

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคนทั้งในสถาบันเดียวกันและต่างสถาบันที่คอยช่วยเหลือเป็นกำลังใจ คอยรับฟังและให้คำปรึกษาในทุก ๆ เรื่อง และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณคุณพ่อ คุณแม่ และน้องมิว ที่คอยเป็นกำลังใจ เติมเต็มใจ เป็นแรงบันดาลใจ คอยสนับสนุนและส่งเสริมในเรื่องการเรียนมาโดยตลอด จนทำให้ข้าพเจ้าจัดทำวิทยานิพนธ์ได้สำเร็จลุล่วง

นางสาว สุวรรณา พู่กันแกมแก้ว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ

กิตติกรรมประกาศ .... ช

สารบัญ .... ซ

สารบัญตาราง .... ฐ

สารบัญรูปภาพ .... ฒ

บทที่ 1 บทนำ 18

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 18

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย 19

1.3 ขอบเขตการศึกษา 19

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 20

บทที่ 2 เอกสารและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 21

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าวและความสำคัญของข้าวในประเทศไทย 21

2.2 ดินกรด (acid soil) 21

2.3 กลไกการลำเลียงธาตุเหล็กในพืชและในต้นข้าว 24

2.4 กลไกการลำเลียงอะลูมิเนียมในพืชและในต้นข้าว 28

2.5 การเจริญเติบโตและการตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของข้าวในดินกรดที่มีเหล็กและอะลูมิเนียมในปริมาณสูง 32

2.6 การตอบสนองในระดับยีนของข้าวที่ปลูกในดินกรดซึ่งมีเหล็กและอะลูมิเนียมในปริมาณสูง 33

2.7 เทคนิคที่ใช้ศึกษากลไกการตอบสนองต่อความเครียดของข้าวต่อสภาวะดินกรด 34

2.7.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของข้าว 34

2.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณการสะสมธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมในข้าว 35

2.7.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน 35

บทที่ 3 วิธีการทดลอง 37

3.1 พืชที่ใช้ในการศึกษาวิจัย 37

3.2 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี 38

3.3 สารเคมี 39

3.4 วิธีการทดลอง 42

การทดลองที่ 1 การคัดเลือกและศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าว 28 พันธุ์ ภายใต้สภาวะดินกรดที่มีปริมาณของเหล็กและอะลูมิเนียมสูง 42

3.1.1 การเตรียมพืชและชุดการทดลอง 42

3.1.2 การวัดการเจริญเติบโต 43

3.1.3 การวัดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา 43

3.1.4 การสะสมของเหล็กและอะลูมิเนียม 44

3.1.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 44

การทดลองที่ 2 การศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของข้าวพันธุ์ไทยต่อสภาวะดินกรดและอะลูมิเนียมเป็นพิษ 45

3.2.1 การศึกษาความเป็นพิษของอะลูมิเนียมซัลเฟต $Al_2(SO_4)_3$ ต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีในข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ RD35 45

3.2.2 การศึกษาความเป็นพิษของอะลูมิเนียมในรูปของ $Al_2(SO_4)_3$ และ $AlCl_3$ ในสภาวะที่เป็นกรด 45

3.2.3 การศึกษาความเป็นพิษของอะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) ต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีในข้าว 45

การทดลองที่ 3 การศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยา ชีวเคมีและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงอะลูมิเนียมในข้าวพันธุ์ไทยที่ทนต่อสภาวะดินกรดที่มีปริมาณอะลูมิเนียมสูง 47

3.3.1 การเตรียมพืชและชุดการทดลอง 47

3.3.2 การสกัดอาร์เอ็นเอในข้าว (RNA extraction) 48
3.2.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง nanodrop 49
3.2.3 การตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis 49
3.2.4 การกำจัด genomics DNA ด้วย DNase Treatment 49
3.2.5 การสังเคราะห์ cDNA (cDNA conversion) 49
3.2.6 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) 50
บทที่ 4 ผลการทดลอง 52
4.1 การทดลองที่ 1 การคัดเลือกและศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าว 28 พันธุ์ ภายใต้สภาวะดินกรดที่มีปริมาณของเหล็กและอะลูมิเนียมสูง 52
4.1.1 ปริมาณการสะสมธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมในเซลล์รากและใบของข้าว 28 พันธุ์ ภายใต้สภาวะดินกรดที่มีธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมสูง 52
4.1.2 การเจริญเติบโตของข้าว 28 พันธุ์ ภายใต้สภาวะดินกรดที่มีธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมเป็นพิษ 55
4.1.3 ผลการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าว 28 พันธุ์ ภายใต้สภาวะดินกรดที่มีธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมเป็นพิษ 60
4.2 การทดลองที่ 2 การศึกษากลไกและการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าว 3 พันธุ์ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมเป็นพิษที่ความเข้มข้นสูง 67
4.2.1. การศึกษาความเป็นพิษของอะลูมิเนียมต่อการเจริญเติบโต การตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีในข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ RD35 67
4.2.2 การศึกษาความเป็นพิษของอะลูมิเนียมในรูปของ $Al_2(SO_4)_3$ และ $AlCl_3$ ในสภาวะที่เป็นกรด 73
4.2.3 การศึกษาความเป็นพิษของ $AlCl_3$ ต่อการเจริญเติบโต การตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีในข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 ที่ทนดินกรดต่างกัน 76

4.3 การทดลองที่ 3 การศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยา ชีวเคมี และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงอะลูมิเนียมในข้าวพันธุ์ไทยที่ทนต่อสภาวะดินกรดที่มีปริมาณอะลูมิเนียมสูง 85

4.3.1 การเจริญเติบโตของข้าวหลังได้รับ $AlCl_3$ ที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์ 85

4.3.2 การตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าวหลังได้รับอะลูมิเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์ 86

4.3.3 ปริมาณการสะสมธาตุอะลูมิเนียมในรากและใบของข้าวภายใต้อะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์ 88

4.3.4 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่ออะลูมิเนียมของข้าวเมื่อได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์ 90

บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง 95

5.1 การคัดเลือกและศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าว 28 พันธุ์ ภายใต้สภาวะดินกรดที่มีปริมาณของเหล็กและอะลูมิเนียมสูง 95

5.2 กลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของข้าวพันธุ์ไทยต่อสภาวะดินกรดและอะลูมิเนียมเป็นพิษ 98

5.2.1 การศึกษาความเป็นพิษของอะลูมิเนียมต่อการเจริญเติบโต การตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีในข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ RD35 98

5.2.2 การศึกษาความเป็นพิษของอะลูมิเนียมในรูปของ $Al_2(SO_4)_3$ และ $AlCl_3$ ในสภาวะที่เป็นกรด 100

5.2.3 การศึกษาความเป็นพิษของอะลูมิเนียมต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีในข้าวพันธุ์ทนดินกรดต่างกัน 101

5.3 การศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยา ชีวเคมีและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง ในข้าว Azucena, IR64 และ KMK ที่ทนต่อสภาวะดินกรดที่มีปริมาณอะลูมิเนียมสูง 103

สรุปผลการศึกษา 105

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย 109

รายการอ้างอิง 110

ภาคผนวก.......... 122

    การเตรียมสารเคมี 122

ประวัติผู้เขียน.......... 127

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 พันธุ์ข้าว 28 พันธุ์ สำหรับนำมาคัดเลือกและศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าว 28 พันธุ์ ภายใต้สภาวะดินกรดที่มีปริมาณของเหล็กและอะลูมิเนียมสูง 37

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์สำหรับใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนของข้าวภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์ 51

ตารางที่ 3 ปริมาณการเพิ่มขึ้นของธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมในเซลล์รากและใบของข้าว 28 พันธุ์ โดยแสดงเป็นจำนวนเท่าของการเพิ่มขึ้นของอะลูมิเนียมเปรียบเทียบกับชุดควบคุม......................... 54

ตารางที่ 4 ค่าความสูง (SH) ความยาวราก (RL) น้ำหนักสดต้น (SHFW) น้ำหนักแห้งต้น (SHDW) น้ำหนักสดราก (RFW) และน้ำหนักแห้งราก (RDW) ของข้าว 28 พันธุ์ภายใต้ดินกรดที่มีปริมาณธาตุเหล็กและธาตุอะลูมิเนียมสูง 56

ตารางที่ 5 ค่า Chlorophyll fluorescence (F_v/F_m), Photon yield of PSII (Φ_{PSII}), Total chlorophyll contents (TC; mg g^{-1} FW), Stomatal conductance (G_s; mmol H_2O $m^{-2}s^{-1}$), Transpiration rate (E; mmol H_2O $m^{-2}s^{-1}$), Net photosynthesis rate (P_n; mmol $m^{-2}s^{-1}$), Leaf temperature (LT; °C) และ crop water stress index (CWSI) ของข้าว 28 พันธุ์ภายใต้ดินกรดที่มี ปริมาณธาตุเหล็กและธาตุอะลูมิเนียมสูง.. 61

ตารางที่ 6 ค่า Leaf greenness (SPAD) และ chlorophyll fluorescence (F_v /F_m) ของข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 หลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 10 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน ข้อมูลนี้ได้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วใน (Phukunkamkaew et al., 2021) 70

ตารางที่ 7 ค่า Chlorophyll fluorescence (F_v/F_m), การรับส่งอิเล็คตรอนในระบบแสงสอง (Φ_{PSII}), ค่าการเปิด-ปิดปากใบ (g_s) และอัตราการคายน้ำ (E) ของข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์ ข้อมูลนี้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วใน (Phukunkamkaew et al, 2022)... 82

ตารางที่ 8 ค่าความสูง (SH) ความยาวราก (RL) น้ำหนักสดต้น (STFW) น้ำหนักแห้งต้น (STDW) น้ำหนักสดราก (RFW) และน้ำหนักแห้งราก (RDW) ของข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ Azucena IR64 และ KaoMakKaek ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลา 14 วัน 86

ตารางที่ 9 ค่า chlorophyll fluorescence (F_v/F_m), photon yield of PSII (Φ_{PSII}) และ SPAD ของข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ Azucena, IR64 และ KaoMakKeak ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์เป็นระยะเวลา 14 วัน 88

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 ความสามารถในการละลายของธาตุอาหารของพืชที่ช่วงพีเอชต่างๆ (Robson, 2012)....... 23

รูปที่ 2 การลำเลียงธาตุเหล็กในสภาวะขาดธาตุเหล็กในพืช (Zhang et al., 2011) 26

รูปที่ 3 การแสดงออกของยีนและการทำหน้าที่ของโปรตีนในข้าวภายใต้สภาวะขาดธาตุเหล็กและธาตุ 27

รูปที่ 4 กลไกการลำเลียงและการตอบสนองต่ออะลูมิเนียมในพืช (Singh et al., 2017)............... 29

รูปที่ 5 กลไกการตอบสนองและการลำเลียงอะลูมิเนียมในเซลล์รากของพืชและข้าวที่ทนต่อสภาวะ 31

รูปที่ 6 แผนผังแสดงการจัดกลุ่มของข้าว 28 พันธุ์ภายใต้ดินกรดที่มีปริมาณธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมสูง.. 66

รูปที่ 7 กราฟแสดงความสูง (Shoot height) ความยาวราก (Root length) น้ำหนักแห้งต้น (Shoot dry weight) น้ำหนักแห้งราก (Root dry weight) ของข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 หลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 10 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ ข้อมูลนี้ได้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วใน (Phukunkamkaew et al., 2021)... 68

รูปที่ 8 กราฟแสดงค่า A) Leaf temperature, B) Crop water stress index, C) Photon yield of PSII (F_{PSII}), D) Net photosynthetic rate (P_n), E) Stomatal conductance (g_s) และ F) Transpiration rate (E) ของข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 หลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 10 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน ข้อมูลนี้ได้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วใน (Phukunkamkaew et al, 2021)... 71

รูปที่ 9 กราฟแสดงค่า Al content ในรากและใบของข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 หลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 10 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน ข้อมูลนี้ได้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วใน (Phukunkamkaew et al, 2021) 72

รูปที่ 10 ลักษณะของต้นกล้าข้าวหอมนิลหลังการทดสอบด้วย EDTA 5 mM, $Al_2(SO_4)_3$ 20 mM, $Al_2(SO_4)_3$ 20 mM + EDTA 5 mM, $AlCl_3$ 20 mM, $AlCl_3$ 20 mM + EDTA 5 mM, $AlCl_3$ 10 mM และ $AlCl_3$ 1 mM เป็นเวลา 7 วัน 74

รูปที่ 11 ลักษณะของต้นกล้าข้าวหอมนิลหลังการทดสอบด้วย EDTA 5 mM, $Al_2(SO_4)_3$ 20 mM, $Al_2(SO_4)_3$ 20 mM + EDTA 5 mM, $AlCl_3$ 20 mM, $AlCl_3$ 20 mM + EDTA 5 mM, $AlCl_3$ 10 mM และ $AlCl_3$ 1 mM เป็นเวลา 14 วัน 74

รูปที่ 12 กราฟแสดง Al content ในรากและใบของต้นกล้าข้าวหอมนิล เมื่อได้รับ EDTA 5 mM, $Al_2(SO_4)_3$ 20 mM, $Al_2(SO_4)_3$ 20 mM + EDTA 5 mM, $AlCl_3$ 20 mM, $AlCl_3$ 20 mM + EDTA 5 mM, $AlCl_3$ 10 mM และ $AlCl_3$ 1 mM เป็นเวลา 14 วัน 76

รูปที่ 13 กราฟแสดงความยาวราก (A) น้ำหนักสดราก (B) และน้ำหนักแห้งราก (C) ของข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ RD35, Azucena และ IR64 ภายใต้สภาวะ $AlCl_3$ ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์ ข้อมูลนี้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วใน (Phukunkamkaew et al., 2023)........ 78

รูปที่ 14 กราฟแสดงความสูงต้น (A) น้ำหนักสดต้น (B) และน้ำหนักแห้งต้น (C) ของข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ RD35, Azucena และ IR64 ภายใต้สภาวะ $AlCl_3$ ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์ ข้อมูลนี้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วใน (Phukunkamkaew et al, 2022)........ 79

รูปที่ 15 กราฟแสดง (A) ค่าความเขียวของใบ (SPAD) และ (B) ค่าอัตราการสังเคราะห์แสง (P_n) ของข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์ ข้อมูลนี้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วใน (Phukunkamkaew et al, 2022)........ 81

รูปที่ 16 กราฟแสดงปริมาณธาตุอะลูมิเนียม (Aluminum content) ในราก (A) และในใบ (B) ของข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์ ข้อมูลนี้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วใน (Phukunkamkaew et al, 2022)........ 84

รูปที่ 17 ลักษะทางฟีโนไทป์ของข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ KaoMakKeak ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์เป็นระยะเวลา 14 วัน........ 85

รูปที่ 18 กราฟแสดงค่าอัตราการสังเคราะห์แสง (P_n ; A) อัตราการเปิด-ปิดปากใบ (g_s; B) และอัตราการคายน้ำ (E; C) ของข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ KMK ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์เป็นระยะเวลา 14 วัน........ 87

รูปที่ 19 กราฟแสดงปริมาณธาตุอะลูมิเนียม (Aluminum content) ในราก (A) และใบ (B) ของข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ KMK ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์........ 89

รูปที่ 20 กราฟการแสดงออกของยีน *OsNrat1* ในข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ KMK ในช่วงเวลาที่ 0 6 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง หลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ 91

รูปที่ 21 กราฟการแสดงออกของยีน OsALS1 ในข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ KMK ในช่วงเวลาที่ 0 6 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง หลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ 91

รูปที่ 22 กราฟการแสดงออกของยีน *OsVIT2* และ *OsYSL* ในข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ KMK ในช่วงเวลาที่ 0 6 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง หลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์.. 93

รูปที่ 23 กราฟการแสดงออกของยีน OsORC3 ในข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ KMK ในช่วงเวลาที่ 0 6 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง หลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์.... 94

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ดินกรด (Acid soils) เป็นดินที่อยู่ในสภาวะ pH ต่ำกว่า 7 เมื่อดินมีความเป็นกรดมากจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช และพบว่าพื้นดินร้อยละ 50 ของโลกประสบปัญหากับสภาวะดินกรด (Kochian et al., 2004) สาเหตุของดินกรดเกิดจากหลายปัจจัย เช่น เกิดจากการแลกเปลี่ยนของไฮโดรเจนอิออนกับแคทอิออนในดิน การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนในการทำการเกษตร หรือเกิดจากฝนกรดที่เป็นกรดอ่อน (H_2CO_3) เมื่อแตกตัวจะได้กรดคาร์บอเนต (HCO_3^-) และไฮโดรเจนอิออน (H^+) สะสมในดินเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ดินกรดสามารถเกิดได้จากการมีปริมาณธาตุกำมะถันในดินสูงและเกิดปฏิกิริยากับด่างในดิน ทำให้ดินเป็นกรดมากขึ้น (เอิบ เขียวรื่นรมย์, 2550) การลดลงของ pH ในดินส่งผลต่อการละลายของธาตุโลหะหนักบางชนิด ได้แก่ เหล็ก (Fe) อะลูมิเนียม (Al) และแมงกานีส (Mn) โดยพบว่าธาตุโลหะชนิดดังกล่าวมักมีความสามารถในการละลายมากขึ้น ในขณะที่การละลายของธาตุอาหารพืชทั้งธาตุอาหารหลัก (Macronutrients) และธาตุอาหารรอง (Micronutrients) มีการละลายลดลงทำให้พืชไม่สามารถดูดซึมธาตุอาหารเหล่านี้ไปใช้ได้ และทำให้พืชอยู่ในสภาวะขาดธาตุอาหาร สาเหตุดังกล่าวส่งผลต่อการเจริญเติบโตรวมถึงปริมาณผลผลิตของพืชที่ลดลง

ประเทศไทยประสบกับปัญหาดินกรดและพบการกระจายของดินกรดในหลายพื้นที่ เช่น บริเวณพื้นที่ราบลุ่มภาคกลาง ชายฝั่งทะเล และคาบสมุทรของประเทศไทยในบริเวณสามจังหวัดชายแดนภาคใต้ ทั้งนี้บริเวณพื้นที่ราบลุ่มภาคกลางเป็นพื้นที่ที่เกษตรกรนิยมปลูกข้าวเป็นจำนวนมาก ดังนั้นปัญหาดินกรดจึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้คุณภาพและผลผลิตของข้าวลดต่ำลง (Palykaew et al., 2015) ปัจจุบันการปลูกข้าวในประเทศไทยมีการปลูกข้าวพันธุ์ผสมและมีการใช้เทคโนโลยีในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ได้ผลผลิตดี ทนต่อโรคและแมลง หรือทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม อย่างไรก็ตามพันธุ์ข้าวแต่ละพันธุ์มีความสามารถในการทนต่อสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งมีเพียงไม่กี่พันธุ์ที่สามารถให้ผลผลิตดีและทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เมื่อดินอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดย่อมส่งผลทำให้เกิดการละลายของเหล็กมากขึ้นด้วย นอกจากนี้พบว่าดินที่มีสีเทาคล้ำมีปริมาณแร่จาโรไซต์ ซึ่งเป็นแร่องค์ประกอบของอนุภาคดินเหนียวที่มีลักษณะคล้ายผงกำมะถัน แร่ชนิดนี้ส่งผลทำให้ดินอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดจัด ตัวอย่างดินที่มีลักษณะดังกล่าวเช่น ชุดดินรังสิต ชุดดินองครักษ์ ชุดดินธัญญบุรี และชุดดินเสนา (Palykaew et al., 2015) ดินกรดส่งผลทำให้โลหะหนักมีการละลายออกสู่สารละลายในดินมากขึ้นโดยเฉพาะเหล็กและอะลูมิเนียม ซึ่งสามารถเข้าไปยับยั้งการเจริญเติบโตของข้าว ส่งผลทำให้ความยาวราก ความสูงของต้น และกระบวนการเมตาบอลิซึมในต้นข้าวลดลง ทำให้การดูดซึมและการลำเลียงของธาตุอาหารในต้นพืชเปลี่ยนไป ซึ่งกลไกดังกล่าวยังเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการลำเลียงธาตุอาหารในข้าว จาก

รายงานวิจัยต่างๆ ที่ผ่านมาพบว่าเมื่อปลูกข้าวในสภาวะดินกรดที่มีธาตุเหล็กสูง ยีนต่าง ๆ ที่ทำหน้าที่ในการตอบสนองต่อธาตุเหล็กมีการแสดงออกมากขึ้นหรือแสดงออกลดลงแตกต่างกันนั้นขึ้นอยู่กับหน้าที่และกลไกในการป้องกันตัวเองของข้าว อย่างไรก็ตามพบว่า กลไกการตอบสนองของข้าวภายใต้สภาวะดินกรดที่มีธาตุอะลูมิเนียมสูงยังมีการศึกษาไม่ชัดเจน ดังนั้นผู้วิจัยจึงปลูกข้าวไทยจำนวน 28 พันธุ์ ในสภาวะดินกรดที่มีปริมาณธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมสูง เพื่อคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีหรือทนต่อสภาวะดินกรด แต่พบว่ามีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษากลไกและการตอบสนองของข้าวต่อสภาวะธาตุเหล็กเป็นพิษในดินกรดรวมถึงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องต่อการทนธาตุเหล็กในข้าวทำให้เข้าใจกลไกการตอบสนองและการแสดงออกของยีนในข้าวที่ทนต่อธาตุเหล็กเป็นพิษ (Mahender et al., 2019b) เช่น การศึกษากลไกการดูดซับและขนส่งธาตุเหล็กไปสู่เมล็ดข้าว (Bashir et al., 2010) นอกจากนี้ได้มีรายงานเกี่ยวกับการสะสมธาตุเหล็กในต้นข้าวจากรากสู่ยอด (Sperotto et al., 2012) และได้มีการคัดเลือกพันธุ์ข้าวและศึกษากลไกการตอบสนองของข้าวพันธุ์ที่ทนต่อสภาวะธาตุเหล็กเป็นพิษ (Wu et al., 2014) แต่การศึกษาการทนต่อธาตุโลหะหนักอะลูมิเนียมยังมีการศึกษาไม่มากนักในข้าวและยังไม่เป็นที่เข้าใจแน่ชัด ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมี รวมถึงการลำเลียงอะลูมิเนียมในต้นข้าวไทย โดยศึกษาจากการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงธาตุโลหะหนักอะลูมิเนียม เพื่อให้เข้าใจและได้รับองค์ความรู้พื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไทยที่ทนต่อสภาวะดินกรดที่มีอะลูมิเนียมเป็นพิษต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่สามารถทนต่อสภาวะดินกรดที่มีปริมาณเหล็กและอะลูมิเนียมสูงในดิน

2. เพื่อศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของข้าวพันธุ์ไทยต่อสภาวะดินกรดและอะลูมิเนียมเป็นพิษ

3. เพื่อศึกษากลไกการลำเลียงอะลูมิเนียม และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงธาตุโลหะอะลูมิเนียมในข้าวพันธุ์ที่ทนต่อสภาวะดินกรดและธาตุอะลูมิเนียมสูง

1.3 ขอบเขตการศึกษา

คัดเลือกพันธุ์ข้าวที่สามารถทนต่อสภาวะดินกรดที่มีปริมาณเหล็กและอะลูมิเนียมในดินสูงจากข้าวทั้งหมดจำนวน 28 พันธุ์ ศึกษาความเข้มข้นของอะลูมิเนียมที่ส่งผลต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าว โดยศึกษาในข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ Azucena, IR64 และ กข35 (RD35) และศึกษารูปแบบของสารประกอบอะลูมิเนียม ได้แก่ $AlCl_3$ และ $Al_2(SO_4)_3$ ที่ส่งผลต่อการตอบสนองของข้าว ศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมี รวมถึงการลำเลียงอะลูมิเนียม และการแสดงออก

ของยีนเกี่ยวข้องกับการลำเลียงธาตุโลหะอะลูมิเนียมในข้าวพันธุ์ที่ทนต่อดินกรด และอะลูมิเนียมเป็นพิษ 2 พันธุ์ ได้แก่ Azucena และ KMK และพันธุ์ที่ไม่ทนต่อดินกรด 1 พันธุ์ ได้แก่ IR64

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้พันธุ์ข้าวที่สามารถทนต่อสภาวะดินกรด และธาตุอะลูมิเนียมเป็นพิษ โดยจะต้องนำพันธุ์ข้าวที่คัดเลือกได้ไปปลูกในพื้นที่จริงที่เป็นดินกรดและมีปริมาณอะลูมิเนียมสูง เพื่อยืนยันผลกระทบต่อผลผลิตของข้าว

2. พัฒนาองค์ความรู้ด้านกลไกการตอบสนองของข้าวต่อสภาวะดินกรดที่มีปริมาณอะลูมิเนียมในดินที่อยู่ในระดับเป็นพิษ

3. ฐานข้อมูลพันธุ์ข้าวที่ได้จะถูกนำมาใช้ในการส่งเสริมการปลูก บริหารจัดการแปลงปลูกและเป็นฐานพันธุกรรมในการพัฒนาพันธุ์ข้าวให้สามารถทนต่อสภาวะดินกรดและธาตุอะลูมิเนียม

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 2 เอกสารและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าวและความสำคัญของข้าวในประเทศไทย

ข้าวเป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ Gramineae หรือ Poaceae ซึ่งถูกจัดอยู่ในวงศ์หญ้า นับว่าเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญในทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก นิยมปลูกในพื้นที่เขตร้อนและเขตอบอุ่น โดยข้าว (*Oryza sativa* L.) สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดย่อย (subspecies) ได้แก่ Indica, Japonica และ Javanica ซึ่งทั้ง 3 subspecies มีความแตกต่างกันในเขตพื้นที่การเจริญเติบโต โดย Indica สามารถเจริญเติบโตได้ในพื้นที่เขตร้อน ส่วน Japonica และ Javanica พบการเจริญเติบโตในเขตอบอุ่น ข้าวในสกุล *Oryza* ระบบรากเป็นระบบรากฝอย ลำต้นตั้งตรงทรงกระบอกภายในกลวง มีตาอยู่ตามข้อด้านล่างของลำต้นสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นใหม่ได้หรือที่เรียกกันว่า ข้าวแตกกอหรือแตกหน่อ โดยข้าว 1 ต้น สามารถแตกหน่อได้ต้นข้าวจำนวน 5-15 หน่อต่อกอ และมีความสูงที่แตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ข้าว ใบข้าวมีลักษณะเรียวยาว เส้นใบเรียงตัวแบบขนาน มีกาบใบห่อหุ้มตาข้างไว้ เหนือกาบใบจะพบลิ้นใบที่มีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมแผ่นบางๆ และพบหูใบยื่นออกมาด้านข้างมีลักษณะเป็นหางกระรอก ซึ่งเป็นลักษณะของข้าวที่ทำให้มีความแตกต่างจากพืชตระกูลหญ้าชนิดอื่นๆ ดอกข้าวมีลักษณะเป็นช่ออยู่เหนือใบธง ภายในช่อ 1 ช่อดอกจะมีดอกย่อย (spikelets) จำนวนมาก ภายในดอกมีเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียอยู่ในดอกเดียวกัน เมื่อเกสรเพศเมียในแต่ละดอกได้รับการผสมก็จะกลายเป็นเมล็ดข้าว และช่อดอกก็คือรวงข้าว เปลือกหุ้มเมล็ดข้าวมีสีที่ต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวแต่ละพันธุ์ มีทั้งสีเขียวอ่อน เหลือง สีฟาง สีม่วงและสีดำ (YANG et al., 2012) ในประเทศไทยข้าวจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญมาก เป็นพืชอาหารหลักของคนไทย เกษตรกรนิยมปลูกข้าวเป็นจำนวนมาก โดยพบการปลูกข้าวในภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคตะวันตก ซึ่งมีพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมดประมาณ 58 ล้านไร่ การส่งออกข้าวในประเทศไทยพบว่าในปี 2017 ประเทศไทยส่งออกข้าวเป็นอับดับ 2 ของโลก โดยเฉลี่ยปริมาณที่ส่งออกอยู่ที่ 11.6 ล้านตัน หรือ 24% ของการส่งออกข้าวทั่วโลก (Napasintuwong, 2019) แต่ปัจจุบันบางปีมีผลผลิตข้าวลดลงเนื่องจากภัยธรรมชาติ และสภาพดินที่ไม่เหมาะสม เช่น ปัญหาดินกรด ก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตข้าวลดลง

2.2 ดินกรด (acid soil)

ดินกรด (acid soil) คือ ดินที่มีค่าพีเอช (pH) ต่ำกว่า 7.0 และประกอบไปด้วยกรดกำมะถันปริมาณมากซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดความเป็นพิษต่อพืช โดยช่วงพีเอชในดินที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชหรือเกิดความเป็นพิษกับพืชจะอยู่ในช่วงที่ต่ำกว่า 5.0 (Bot et al., 2000)

การเกิดดินกรดมีหลายสาเหตุ ได้แก่

1. การใช้ปุ๋ยไนโตรเจน ปุ๋ยไนโตรเจนที่เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมใช้เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตและปริมาณผลผลิตในพืช สามารถเพิ่มความเป็นกรดในดินได้ โดยไนโตรเจนจะอยู่ในฟอร์มของแอมโมเนียม (NH_4^+) เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำจะมีการปลดปล่อยไฮโดรเจนอิออน (H^+) ออกมา (Fageria & Nascente, 2014) นอกจากปุ๋ยไนโตรเจนยังมีปุ๋ยอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ โดยไนโตรเจนสามารถถูกเปลี่ยนเป็นไนเตรท (NO_3^-) และปล่อยไฮโดรเจนอิออนออกมาในดินมากขึ้น ทำให้ค่าพีเอชในดินลดลงมากขึ้นจึงทำให้ดินเป็นกรดมากขึ้นได้ (Guo et al., 2010; Hue, 1992)

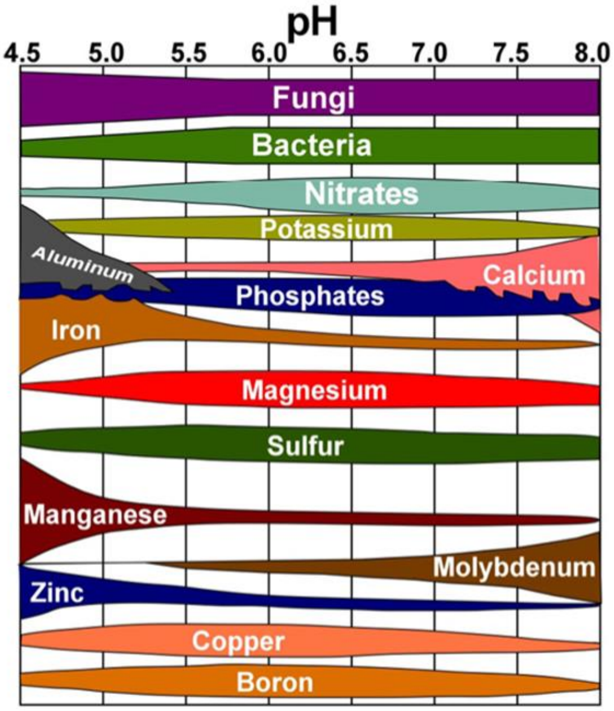
2. สภาพภูมิอากาศ โดยเกิดจากฝนกรดที่เป็นกรดอ่อน (H_2CO_3) เมื่อแตกตัวจะได้กรดคาร์บอเนต (HCO_3^-) และไฮโดรเจนอิออน (H^+) สะสมในดินเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำฝนที่เพิ่มขึ้นจะชะล้างหน้าดินและธาตุอาหารในดิน (Sanchez, 1977; Tadesse et al., 2001) ได้แก่ แคลเซียม (Ca), แมกนีเซียม (Mg), โซเดียม (Na) และโพแทสเซียม (K) และเกิดการแทนที่ของโลหะหนัก เช่น อะลูมิเนียม (Al) ทำให้สารละลายในดินมีธาตุที่เป็นโลหะหนักมากขึ้น (Brady et al., 2008)

3. การสลายตัวของสารอินทรีย์ โดยจุลินทรีย์และพืชชั้นสูงสามารถเปลี่ยนสารอินทรีย์ให้เป็นกรดคาร์บอนิก รวมทั้งกระบวนการทางชีวภาพและเคมีที่เกิดขึ้นในดินก็ทำให้ดินมีความเป็นกรดเพิ่มมากขึ้น (Paul, 2016) นอกจากนี้เมื่อค่าพีเอชในดินลดลงจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) และปล่อยไฮโดรเจนอิออนออกมาเป็นอีกสาเหตุที่ทำให้ดินเป็นกรด (Agegnehu et al., 2021)

4. กรดกำมะถัน กรดกำมะถันที่สะสมในดินเกิดจากกระบวนการเกิดและการสะสมของสารประกอบไพไรต์ และยังเกิดได้จากกระบวนการออกซิเดชัน (Oxidation) ของสารประกอบไพไรต์กับแบคทีเรียไทโอบาซิลลัส (Thiobacillus)

จากการจำแนกดินกรดในประเทศไทยสามารถจำแนกได้เป็น 3 ระดับ โดยจำแนกจากชั้นของกรดกำมะถัน (Jarosite) ได้แก่ ชั้นดินกรดกำมะถันระดับตื้น ความลึกอยู่ที่ระดับ 0-50 เซนติเมตร ระดับปานกลางที่ความลึก 50-100 เซนติเมตร และที่ระดับความลึกซึ่งจะมีความลึกอยู่ที่ 100-150 เซนติเมตร โดยชั้นดินกรดแต่ละชนิดมีเนื้อที่ประมาณ 970,731 2,441,098 และ 1,844,953 ไร่ ตามลำดับ พื้นที่ดินกรดในประเทศไทยจะพบมากในพื้นที่ภาคใต้และที่ราบลุ่มน้ำภาคกลางเป็นส่วนใหญ่ (Palykaew et al., 2015) ปัญหาดินกรดนั้นส่งผลต่อระบบการเจริญของรากพืช ทำให้การเจริญเติบโตของพืชลดลง ผลผลิตที่ได้จึงลดลง ค่าความเป็นกรดของดินที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตหรือเป็นพิษต่อพืชมีค่า pH ต่ำกว่า 5 ซึ่งพบว่าช่วง pH ดังกล่าวเป็นช่วงที่พบการละลายของธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมมาก รวมทั้ง Cu, Zn, B และ Mn แต่ในทางกลับกันพบการละลายของธาตุอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น N, P, K, S, Ca และ Mg ละลายในดินได้น้อยลง ซึ่งส่งผลให้พืชขาดธาตุอาหารและเจริญเติบโตได้ไม่ดีและยังเป็นพิษต่อพืช และพบว่าช่วงพีเอชที่ธาตุอาหาร N, P, K, S,

Ca และ Mg สามารถละลายได้ดีคือช่วง pH 6.0-7.5 ส่วน Mo ละลายได้ดีในช่วง pH 5.0-8.5 ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 ความสามารถในการละลายของธาตุอาหารของพืชที่ช่วงพีเอชต่างๆ (Robson, 2012)

ดินกรดที่พบในประเทศไทย สามารถจำแนกตามพื้นที่ที่พบได้เป็น 3 กลุ่ม (Palykaew et al., 2015) ดังนี้

1. กลุ่มดินกรดที่มีพัฒนาการต่ำมาก เป็นดินกรดที่พบบริเวณพื้นที่ในภาคใต้และตะวันออกเฉียงใต้แถบชายฝั่งทะเล ซึ่งได้รับอิทธิพลจากน้ำทะเล ตัวอย่างชุดดินกรดที่พบ ได้แก่ ชุดดินตะกั่วทุ่ง ชุดดินบางปะกง และชุดดินเชียรใหญ่

2. กลุ่มดินกรดที่พบในพื้นที่ราบลุ่มภาคกลาง ได้แก่ ชุดดินรังสิต ชุดดินองครักษ์ ชุดดินเสนา ชุดดินธัญญบุรี และชุดดินชะอำ เป็นต้น และในพื้นที่ภาคกลางยังพบชุดดินกรดที่เป็นดินร่วน ได้แก่ ชุดดินดอนเมือง

3. กลุ่มดินกรดที่พบในพื้นที่ภาคใต้ ได้แก่ ชุดดินมูโนะ ชุดดินปัตตานี ชุดดินต้นไทร และพบชุดดินกรด ที่เป็นดินกรดอินทรีย์ ได้แก่ ชุดดินกาบแดง เป็นต้น

ในประเทศไทยเคยมีรายงานการวัดปริมาณธาตุโลหะหนักในพื้นที่อำเภอด่านซ้าย จังหวัดเลย พบปริมาณธาตุเหล็กในดินอยู่ในช่วง 85.92-593.98 mg kg^{-1} (Pamonpol & Tokhun, 2019) ปริมาณธาตุเหล็กที่พบในดินมาก ทำให้พืชสามารถนำธาตุเหล็กไปเก็บสะสมไว้ในรากและใบได้ ใน

พื้นที่อำเภอนครหลวง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา มีรายงานปริมาณธาตุเหล็กที่พบในดินสูงถึง 25,772.80 mg/kg และพบธาตุเหล็กในรากและใบ 17,630.36 และ 548.12 mg/kg ตามลำดับ (Klinsawathom et al., 2017) จากรายงานแสดงให้เห็นว่าในแต่ละพื้นที่มีปริมาณธาตุเหล็กที่พบแตกต่างกัน ในส่วนของปริมาณอะลูมิเนียมในดินยังไม่มีการรายงานที่ชัดเจน

2.3 กลไกการลำเลียงธาตุเหล็กในพืชและในต้นข้าว

ดินกรดส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช เนื่องจากทำให้การละลายของธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชลดลง ทำให้พืชอยู่ในสภาวะขาดธาตุอาหาร แต่ในทางตรงข้ามพบการละลายของโลหะหนักมากขึ้น ได้แก่ เหล็กและอะลูมิเนียม ในดินกรดธาตุเหล็กจะละลายอยู่ในรูปของเฟอรัสอิออน (Fe^{2+}) และเฟอริกอิออน (Fe^{3+}) ซึ่งเป็นรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ และยังพบเหล็กที่เป็นเหล็กคีเลต (Fe-chelate) ซึ่งเป็นรูปที่พืชนำไปใช้ได้ยากด้วย เหล็กมีบทบาทต่อพืช เช่น เป็นองค์ประกอบในไซโตโครมที่มีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ที่เกิดขึ้นในไมโตคอนเดรีย เป็นองค์ประกอบของเฟอริตินในระบบแสงที่ 1 (Photosystem I) ของกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชที่เกิดขึ้นภายในคลอโรพลาส และยังเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์บางชนิด (Thomine & Lanquar, 2011a) เหล็กเป็นธาตุที่พืชต้องการในปริมาณน้อย แต่เมื่อมีการละลายของเหล็กมากในดินจะส่งผลให้พืชแสดงความเป็นพิษ เช่น อาการใบบรอนซ์ ใบเหลือง และใบไหม้ เป็นต้น

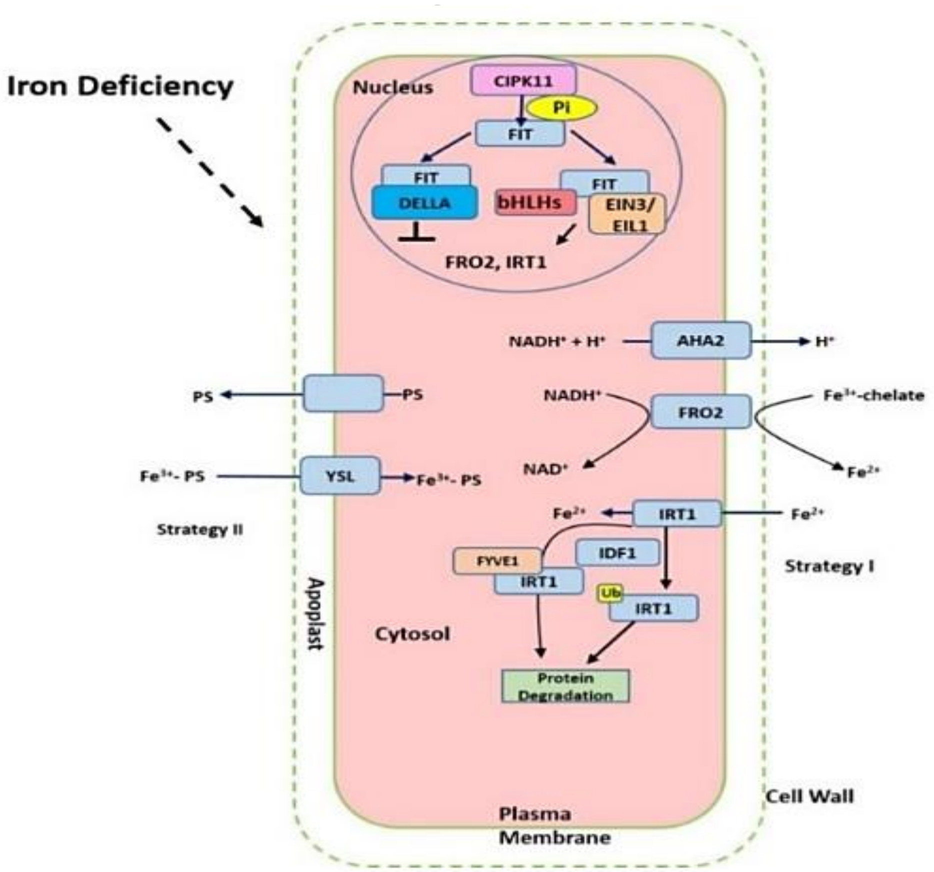
กลไกการลำเลียงธาตุเหล็กในพืชประกอบไปด้วย 2 กลไก โดยกลไกแรกเป็นการลำเลียงธาตุเหล็กที่พบในพืชใบเลี้ยงคู่และพืชใบเลี้ยงเดี่ยว แต่ไม่พบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวตระกูลหญ้า (Nongraminaceous) ในสภาวะขาดธาตุเหล็ก พืชจะปลดปล่อยโปรตอนออกมาที่ผิวรากหรือบริเวณที่เรียกว่า rhizophere เพื่อให้ดินมีความเป็นกรดมากขึ้น โดยโปรตอนจะถูกปล่อยออกมาผ่านทางช่องโปรตีน AHA2/7 ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Santi & Schmidt, 2009) กระบวนการนี้เรียกว่า H^+-ATPase pump เมื่อดินเป็นกรดมากขึ้นทำให้มีเฟอริกมาก เฟอริกอิออนที่รวมตัวกับคีเลตจะถูกแยกออกและถูกเปลี่ยนเป็นรูปเฟอรัสอิออนด้วย โดยเหล็กเฟอริกคีเลตจะถูกเปลี่ยนรูปเป็นเฟอรัสและแยกออกจากคีเลตโดยอาศัยโปรตีนชื่อ Ferric (III)-chelate reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์เกิดจากการถอดรหัสของยีน *FRO2* เอนไซม์ชนิดนี้จะอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ในเซลล์ราก และทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะขาดธาตุเหล็ก (Mukherjee et al., 2006) จากนั้นเฟอรัสอิออนจะเข้าไปในเซลล์รากผ่านทางโปรตีนลำเลียง (Transporter protein) ที่ชื่อ IRT1 (Iron-regulated transporter 1) ซึ่งพบบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และถูกลำเลียงเข้าไปในไซโตซอล (Thomine & Lanquar, 2011a) กลไกที่สองพบในพืชตระกูลหญ้า (Graminaceous) ในสภาวะขาดธาตุเหล็ก ภายในเซลล์รากของพืชจะสร้างสารที่มีคุณสมบัติเป็นคีเลตและปล่อยออกมาที่บริเวณผิวราก สารดังกล่าวมีชื่อว่า

phytosiderophores (PS) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นกรด mugineic acid (MA) family ในปัจจุบันพบว่ามี MAs ที่จำแนกได้ 9 ชนิด (Ueno et al., 2007) MAs จะเข้าจับกับเฟอริกอิออนเป็นสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{3+}-MA และกลับเข้าสู่เซลล์รากโดยอาศัยโปรตีนพาหะ YS1 (Yellow-stripe 1) ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ในจีโนมของข้าวพบว่ามียีน *OsYSLs* (Yellow-stripe 1 like genes) มากถึง 18 ยีน (Koike et al., 2004) และพบว่ายีน *OsYSL15* แสดงออกมากที่บริเวณชั้นเอพิเดอมิส (epidermis) และสตีล (stele) ซึ่งยีนเหล่านี้เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนลำเลียงและทำหน้าที่นำ Fe^{3+}-MA, Fe^{3+}-2’-deoxymugineic acid complexs (Fe^{3+}-DMA) เข้าสู่รากภายใต้สภาวะขาดธาตุเหล็ก (Lee et al., 2009)

นอกจากนี้ยังพบว่าข้าวสามารถดูด Fe^{2+}-EDTA complexes และ Fe^{3+}-PS complexes ผ่านโปรตีนลำเลียง OsIRT1 และ OsIRT2 เข้าไปในเซลล์รากได้ (Ishimaru et al., 2006) เมื่อธาตุเหล็กถูกลำเลียงเข้าไปในไซโตซอล บางส่วนจะถูกเก็บไว้ในแวคิวโอลและบางส่วนจะถูกส่งไปยังไมโตคอนเดรียและคลอโรพลาสเพื่อใช้เป็นองค์ประกอบในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (Thomine & Lanquar, 2011b) แวคิวโอลเป็นออร์แกเนลที่พืชใช้ในการสะสมสารต่างๆ รวมทั้งโลหะหนัก (Pich et al., 2001) พืชจะสะสมธาตุเหล็กไว้ในแวคิวโอลผ่านทางโปรตีนลำเลียง AtVIT1 ที่ถูกควบคุมการสร้างโดยยีน *AtVIT1* ซึ่งพบว่าจะแสดงออกในรากและยอดของพืช จากรายงานพบว่าเหล็กสามารถเข้าสู่แวคิวโอลได้ผ่านทางโปรตีนลำเลียง FPN2 และในระยะที่เมล็ดเกิดการงอก (germination) โปรตีนที่ช่วยนำเหล็กที่เก็บสะสมไว้ในแวคิวโอลออกมาสู่ไซโตพลาสซึมคือ AtNRAMP3 และ AtNRAMP4 (Morrissey & Guerinot, 2009) จากการทดลองศึกษายีน *nramp3*, *nramp4* (double mutant) ในเมล็ดพบว่าไม่ส่งผลต่อความเข้มข้นของธาตุเหล็กในแวคิวโอลในสภาวะขาดธาตุเหล็ก (Roschzttardtz et al., 2009) แสดงให้เห็นว่าโปรตีน AtNRAMP3, AtNRAMP4 ถูกควบคุมและสร้างจากยีน *NRAMP3*, *NRAMP4* ที่ทำหน้าที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดธาตุเหล็กในพืช (Lanquar et al., 2005)

คลอโรพลาสเป็นออร์แกเนลหนึ่งที่มีความสำคัญมาก โดยพืชจะสร้างอาหารที่ประกอบไปด้วยแป้งและน้ำตาลภายในออร์แกเนลชนิดนี้ ธาตุเหล็กมีความสำคัญเพราะเป็นองค์ประกอบของตัวขนส่งอิเล็กตรอนที่ชื่อว่าเฟอริติน (ferritin) ที่พบในขั้นตอนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในระบบแสงที่ 1 (Photosystem I) ของกระบวนการสังเคราะห์แสงและลำเลียงธาตุเหล็กเข้าสู่คลอโรพลาสผ่านโปรตีนชื่อ PIC1 (Permease In Chloroplast 1) (Duy et al., 2007) และ FRO7 (Jeong et al., 2008) ในไมโตคอนเดรียพืชจะมีกลไกการรักษาสมดุลของธาตุเหล็กโดยอาศัยโปรตีน ATM และโปรตีน ATM3 มีหน้าที่นำธาตุเหล็กออกจากไมโตคอนเดรียเพื่อเป็นการรักษาสมดุลธาตุเหล็ก (Teschner et al., 2010) (รูปที่ 2)

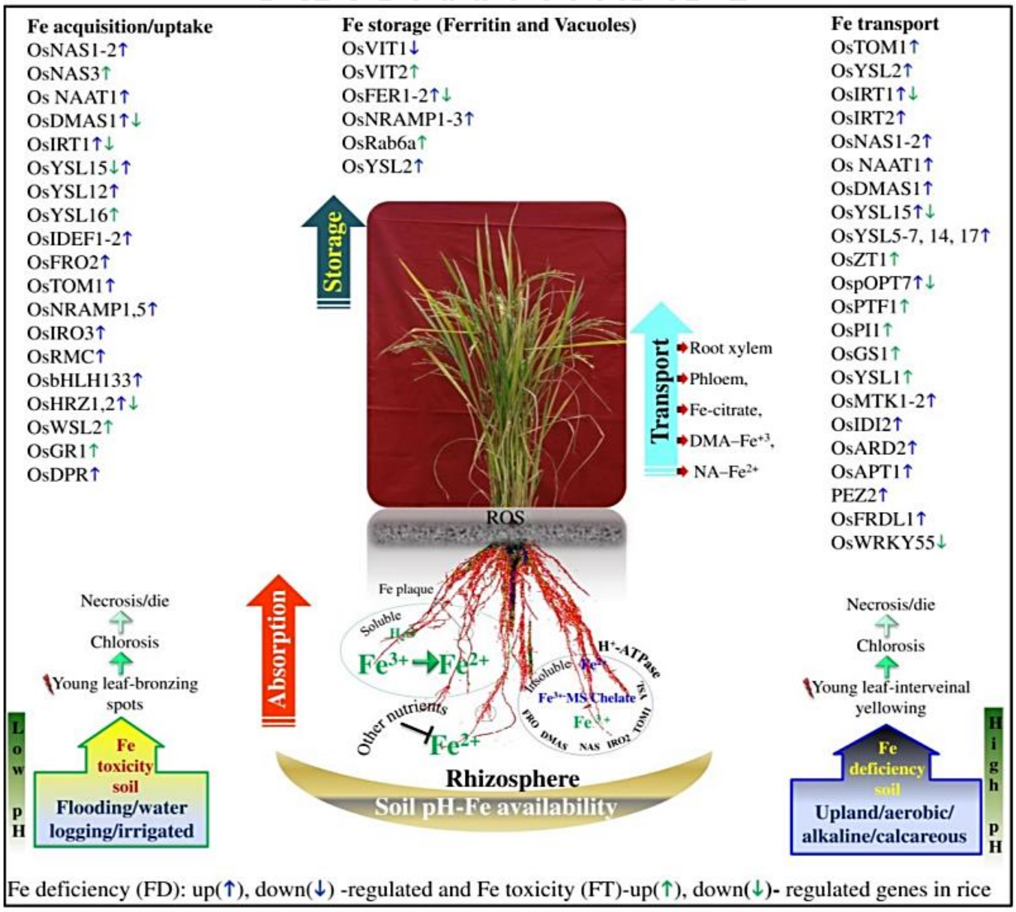
พืชมีกลไกการลำเลียงธาตุเหล็กผ่านเนื้อเยื่อท่อลำเลียงโดยสามารถลำเลียงธาตุเหล็กที่อยู่ในไซโตซอลเข้าสู่ไซเล็ม (Xylem) ได้โดยธาตุเหล็กจะเข้าจับกับ nicotianamine (NA) หรือจับกับ mugineic acid (MA) ถูกลำเลียงในรูปของสารประกอบเชิงซ้อน Ferric-citrate complexes ผ่านทางโปรตีน Ferric Reductase Defective 3 (FRD3) (Durrett et al., 2007) และมีการลำเลียงธาตุเหล็กเข้าสู่โฟลเอ็ม (Phloem) ในรูป Fe-NA, Fe-MA ผ่านทางกลุ่มโปรตีน YS1-like protein (YSL) ยีน *OsYSL2* แสดงออกมากในโฟลเอ็มและในระยะการเจริญของเมล็ด และยังพบว่ามีหน้าที่ในการลำเลียงธาตุเหล็กเข้าสู่โฟลเอ็มและลำต้น



รูปที่ 2 การลำเลียงธาตุเหล็กในสภาวะขาดธาตุเหล็กในพืช (Zhang et al., 2011)

ในสภาวะที่มีธาตุเหล็กสูงกลไกการลำเลียงและการตอบสนองต่อธาตุเหล็กในพืชนั้นมีความแตกต่างจากในสภาวะขาดธาตุ โดยโปรตีนที่ทำหน้าที่ลำเลียงธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์ราก เช่น โปรตีน OsIRT1, OsIRT2 กลุ่มของโปรตีน OsYSL และโปรตีน FRO2 มีการทำงานลดลง ทำให้พืชไม่สามารถนำธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์รากได้ ซึ่งเป็นกลไกการป้องกันตัวของพืช และพบว่ายีน *OsVIT1, OsVIT2*

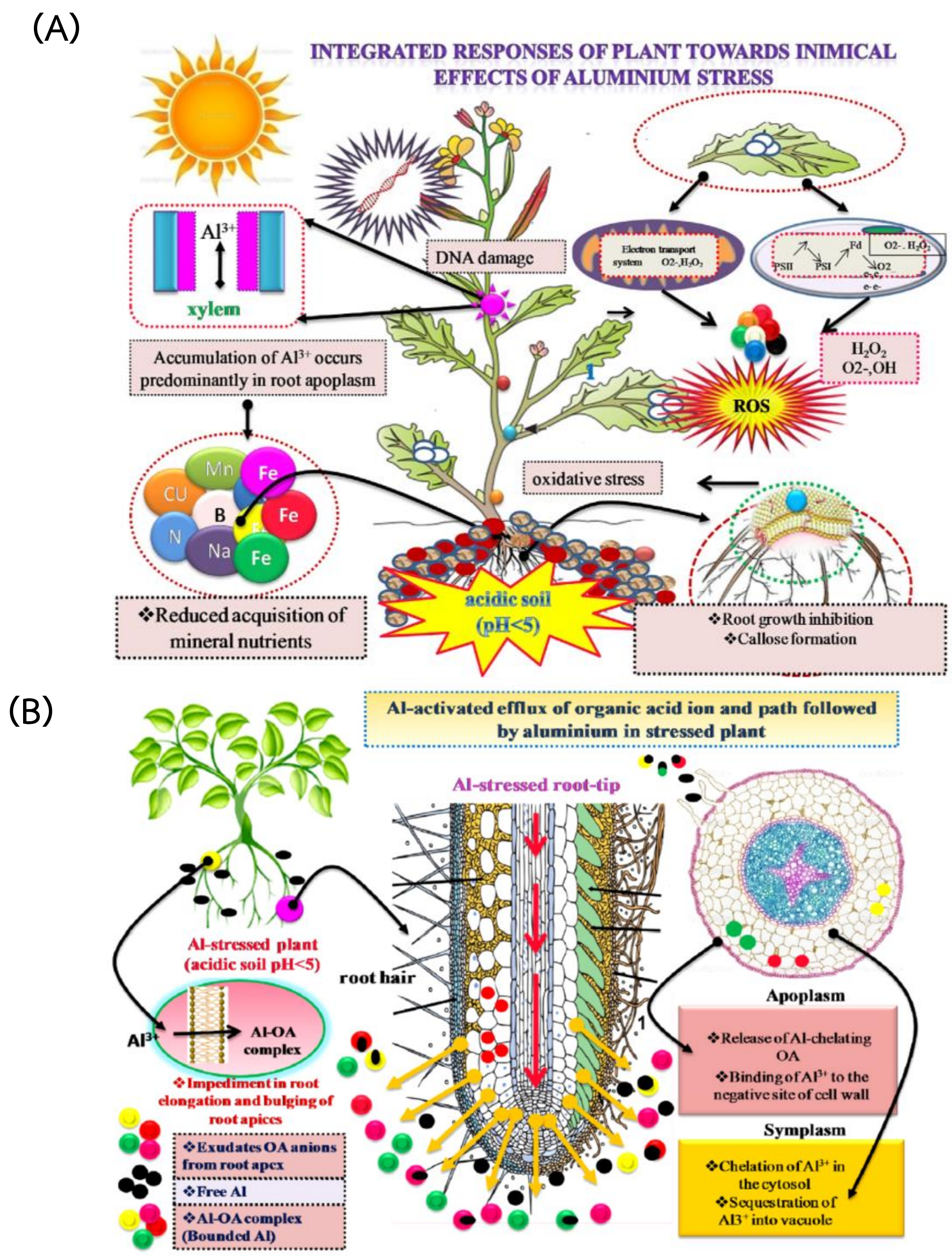
และ *OsDMAS1* แสดงออกมากขึ้นและทำหน้าที่สร้างโปรตีนลำเลียงธาตุเหล็กเข้าไปเก็บสะสมไว้ในแวคิวโอล (Zhang et al., 2012) นอกจากนี้กลุ่มยีนที่ทำหน้าที่ลำเลียงและรักษาสมดุลของธาตุเหล็กในข้าวได้แก่ *OsYSL1, OsZIT1, OsNRAMP, OsPTF1* และ *OsGS1* จะมีการแสดงออกสูงขึ้น (Mahender et al., 2019a) และพบว่ายีนในกลุ่ม Transcription factor super family ได้แก่ กลุ่มของยีน *WRKY* ที่ทำหน้าที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงทางด้านสัณฐานวิทยาและการตอบสนองของข้าวจะมีการแสดงออกสูงขึ้น (Viana et al., 2017) นอกจากนี้พบว่ายีนในคลอโรพลาสที่ทำหน้าที่รักษาสมดุลของธาตุเหล็กและนำธาตุเหล็กมาใช้ในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน เช่น *OsFER1* และ *OsFER2* มีการแสดงออกลดลง (Quinet et al., 2012) ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชทำให้มีประสิทธิภาพลดลง นอกจากนี้ยังพบอาการของข้าวที่เกิดจากความเป็นพิษของธาตุเหล็ก ซึ่งจะพบจุดสีน้ำตาลที่ใบอ่อน โดยพบที่บริเวณปลายใบหรือทั่วทั้งใบ การแสดงออกของยีนและการทำหน้าที่ของโปรตีนในข้าวภายใต้สภาวะขาดธาตุเหล็กและ/หรือธาตุเหล็กเป็นพิษดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 การแสดงออกของยีนและการทำหน้าที่ของโปรตีนในข้าวภายใต้สภาวะขาดธาตุเหล็กและธาตุเหล็กเป็นพิษ (Mahender et al., 2019a)

2.4 กลไกการลำเลียงอะลูมิเนียมในพืชและในต้นข้าว

อะลูมิเนียมเป็นโลหะหนักที่ละลายได้ดีในดินกรดที่มีค่า pH ต่ำกว่า 5.0 อะลูมิเนียมที่ละลายในดินกรดมีทั้งชนิดที่เป็นพิษและไม่เป็นพิษต่อพืช มีรายงานว่าอะลูมิเนียมในสารละลายที่เป็นกรดค่า pH ต่ำกว่า 4.6 จะอยู่ในรูปของ Al^{3+} เป็นรูปที่เป็นพิษต่อพืช ชนิดของอะลูมิเนียมที่พบว่าไม่เป็นพิษต่อพืช ได้แก่ $AlOH^{2+}$, $Al(OH)_2^+$ และ $Al(OH)_3^0$ (Kinraide, 1997; Kopittke & Blamey, 2016) สารประกอบเชิงซ้อนของ Al-SO_4 ที่อยู่ในรูป $AlSO_4^+$และ $Al(SO_4)_2^-$ไม่เป็นพิษต่อพืช (Kinraide & Parker, 1987) แต่พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนของ Al-F เช่น AlF^{2+}, AlF_2^+, AlF_3^0 และ AlF_4^- เป็นรูปที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อพืช (Façanha & Okorokova-Façanha, 2002) การลำเลียงอะลูมิเนียมในพืชทั่วไปเริ่มจาก Al^{3+} จะถูกลำเลียงเข้าสู่เซลล์รากพืชโดยผ่านโปรตีนลำเลียงและวิถีการลำเลียงจะเป็นแบบ symplast (Lazof et al., 1994) แต่อะลูมิเนียมสามารถถูกลำเลียงในวิถีแบบ apoplast ได้ Rengel (1996) และ Kopittke และคณะ (2015) ยืนยันว่าอะลูมิเนียมเมื่อลำเลียงเข้าสู่เซลล์รากพืชจะถูกลำเลียงด้วยวิถีแบบ apoplast เมื่ออะลูมิเนียมเข้าไปในเซลล์รากจะมีอะลูมิเนียมบางส่วนถูกลำเลียงเข้าไปเก็บไว้ในแวคิวโอล บางส่วนไปกระตุ้นและ/หรือยับยั้งการแสดงออกของยีนในนิวเคลียสให้การแสดงออกมากขึ้นและตอบสนองต่อปริมาณอะลูมิเนียมที่เพิ่มขึ้น บางส่วนไปจับกับกรดอินทรีย์ทำให้อยู่ในฟอร์มที่ไม่เป็นพิษ และอะลูมิเนียมยังกระตุ้นให้เกิด Reactive Oxygen Species (ROS) มากขึ้น โครงสร้างของผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงและเกิดความเสียหาย แต่พืชพยายามป้องกันตนเองด้วยการปลดปล่อยอะลูมิเนียมออกจากเซลล์เพื่อลดความเป็นพิษของอะลูมิเนียมในเซลล์ และยังสร้างกรดอินทรีย์และปลดปล่อยออกไปนอกเซลล์เพื่อจับกับอะลูมิเนียม ทำให้อะลูมิเนียมอยู่ในฟอร์มที่ไม่สามารถลำเลียงเข้าสู่เซลล์ได้ นอกจากนี้อะลูมิเนียมยังถูกขนส่งและลำเลียงไปสู่ใบและยอดของพืชผ่านช่องทางการลำเลียงน้ำและอาหารของพืชโดยอาศัยโปรตีนตัวพา ทำให้อะลูมิเนียมบางส่วนถูกเก็บสะสมไว้ที่ใบพืชบางชนิด และจากรายงานของ Rengel ปี 1996 พบว่าอะลูมิเนียมถูกเก็บสะสมไว้ในรากสูง 30-90% ซึ่งแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด โดยปกติแล้วพืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นพิษของอะลูมิเนียมได้ต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของอะลูมิเนียมในข้าว (*Oryza sativa*) ข้าวโพด (*Zea mays*) ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) และข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) พบว่าข้าวสามารถทนต่ออะลูมิเนียมเป็นพิษได้ดีที่สุด (Famoso et al., 2010) รองลงมาคือ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และข้าวสาลี ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม กลไกการลำเลียงและการตอบสนองต่ออะลูมิเนียมในพืชต่างๆ มีความซับซ้อน ดังแสดงในรูปที่ 4A และ 4B (Singh et al., 2017) โดยกลไกของพืชแต่ละชนิดอาจมีความแตกต่างกันไปในรายละเอียดจึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป



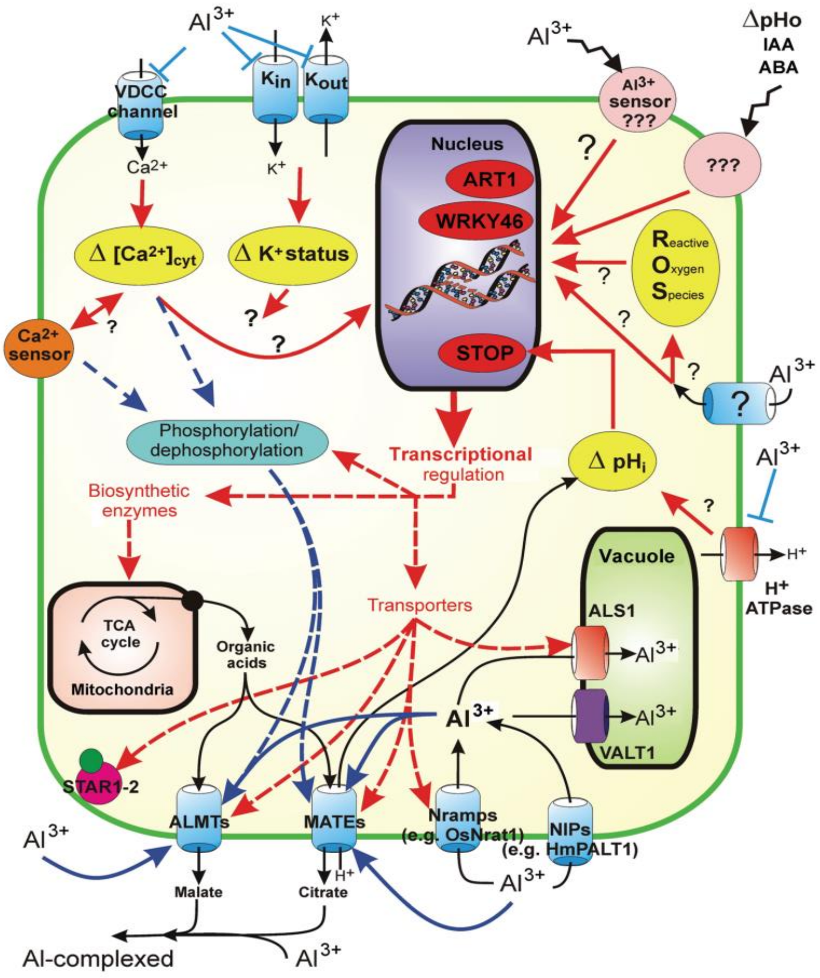
รูปที่ 4 กลไกการลำเลียงและการตอบสนองต่ออะลูมิเนียมในพืช (Singh et al., 2017)

สำหรับกลไกการลำเลียงอะลูมิเนียมในข้าว พบว่าอะลูมิเนียมจะถูกลำเลียงเข้าสู่เซลล์รากในรูปของ Al^{3+} ผ่านช่องโปรตีน NRAMPs, NRAT1 ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Famoso et al., 2011) และ Al^{3+} สามารถลำเลียงเข้าผ่านทางช่อง aquaporin ที่เรียกว่า PALT ได้ (Liu et al., 2014) อะลูมิเนียมบางส่วนจะถูกลำเลียงเข้าไปเก็บสะสมไว้ในแวคิวโอลผ่านทางช่องโปรตีน ALS1 และ VALT1 (Famoso et al., 2011; Huang et al., 2012) และบางส่วนจะไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ทนต่ออะลูมิเนียมในนิวเคลียส ได้แก่ยีน *ART*1, *STOP*1 และ *WRKY*46 (Yamaji et al., 2009) นอกจากนี้ความเป็นพิษของอะลูมิเนียมจะไปกระตุ้นให้เกิด ROS จากนั้น ROS จึงไปกระตุ้นการแสดงออกของยีน *ART1*, *STOP1* และ *WRKY46* ให้เกิดการแสดงออกมากขึ้น เพื่อสร้างโปรตีน จากนั้นโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นจะถูกส่งออกไปยังไซโตพลาสซึม และเข้าสู่กระบวนการ post-transcriptional regulation โปรตีนบางส่วนที่ถูกส่งออกไปจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอนไซม์และส่งเข้าไปในไมโตคอนเดรียเพื่อเข้าสู่กระบวนการ Tricaboxylic acid cycle หรือ TCA cycle และสร้างสารประกอบอินทรีย์ เช่น Malate, Citrate และ Oxalate เพื่อปลดปล่อยออกมายังไซโตพลาสซึม โปรตีนบางส่วนถูกนำเข้าสู่กระบวนการ Phosphorylation / Dephosphorylation และได้โปรตีนที่เป็นตัวส่งสัญญาณไปกระตุ้นให้ช่องโปรตีน MATEs และ ALMTs ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ให้เปิดออกเพื่อปลดปล่อย Al^{3+} หรือ aluminum organic acid complexes (Al-OA) ออกมาสู่ภายนอกเซลล์ราก (Liu et al., 2014) (รูปที่ 5)

นอกจากนี้สารประกอบอินทรีย์ที่ถูกสร้างขึ้นจะถูกปลดปล่อยออกไปสู่ภายนอกเซลล์ผ่านทางช่องโปรตีน MATEs และ ALMTs เพื่อเข้าจับกับ Al^{3+} ที่อยู่บริเวณ rhizophere ให้อยู่ในรูป Al-OA complexes ซึ่งเป็นรูปที่ไม่สามารถถูกลำเลียงเข้าสู่เซลล์รากได้ ดังแสดงในรูปที่ 4 และยีน *OsSTAR1/OsSTAR2* ควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีส่วนช่วยในการปลดปล่อย UDP-glucose ผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์สู่ผนังเซลล์ เพื่อเป็นองค์ประกอบในการสร้างสารป้องกัน หรือลดการเข้าจับของอะลูมิเนียมกับผนังเซลล์พืช (Huang et al., 2012) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าแคลโลส (callose) จะเข้าไปสะสมที่บริเวณผนังเซลล์และปิดกั้นการลำเลียงสารต่างๆ รวมทั้งอะลูมิเนียมในการลำเลียงแบบ apoplast (Sivaguru et al., 2000) และอะลูมิเนียมยังส่งผลทำให้การลำเลียงของแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) และโพแทสเซียมอิออน (K^{+}) ไม่สามารถลำเลียงผ่านเข้าออกเซลล์ได้ ซึ่งมีผลต่อสมดุลของแคลเซียมและโพแทสเซียมในเซลล์พืช (Huang et al., 1996)

กลไกการลำเลียงและการตอบสนองต่ออะลูมิเนียมในพืชและในข้าวมีความแตกต่างกัน จากการรายงานของงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า นอกจากอะลูมิเนียมจะส่งผลต่อความเป็นพิษในพืชแล้วยังเป็นประโยชน์ โดยช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้เช่นกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นและฟอร์มของอะลูมิเนียมที่พืชได้รับ พันธุ์ทนต่ออะลูมิเนียมเมื่อได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 160 และ 200 ไมโครโมลาร์ ทำให้ความยาวของรากเพิ่มขึ้น (Famoso et al., 2011; Moreno-Alvarado et

al., 2017) ในพืชชนิดอื่นเช่น ชา พบว่าอะลูมิเนียมสามารถส่งเสริมการเจริญของรากได้และยังช่วยเพิ่มชีวมวล (biomass) ให้กับพืชที่ได้รับความเข้มข้นของอะลูมิเนียมต่ำ (Xu et al., 2016) ในพืชบางชนิด เช่น ข้าว พบว่าอะลูมิเนียมยังสามารถช่วยลดความเป็นพิษต่อแมงกานีส (Mn toxicity) โดยอะลูมิเนียมจะไปช่วยลดการสะสมแมงกานีสในรากและใบ อีกทั้งยังช่วยลดการดูดซึมธาตุแมงกานีสที่เซลล์รากและเพิ่มโครงสร้างของผนังเซลล์ให้เข็งแรงมากขึ้น (Wang et al., 2015) นอกจากช่วยเพิ่มความยาวราก ชีวมวล และลดความเป็นพิษจากธาตุโลหะหนักชนิดอื่น อะลูมิเนียมยังช่วยส่งเสริมการดูดซึมของธาตุอาหารบางชนิด อีกทั้งยังเพิ่มกิจกรรมในกระบวนการเมทาบอลิซึมต่างๆ ในต้นพืชและกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ (Bojórquez-Quintal et al., 2017)



รูปที่ 5 กลไกการตอบสนองและการลำเลียงอะลูมิเนียมในเซลล์รากของพืชและข้าวที่ทนต่อสภาวะอะลูมิเนียมเป็นพิษ (Liu et al., 2014)

2.5 การเจริญเติบโตและการตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของข้าวในดินกรดที่มีเหล็กและอะลูมิเนียมในปริมาณสูง

ปริมาณธาตุเหล็กสูงที่พบในดินกรดส่งผลต่อการเจริญเติบโตของข้าว ในข้าวพันธุ์ที่ทนเหล็กและพันธุ์ไม่ทนเหล็กจะมีกลไกการตอบสนองที่แตกต่างกัน การเจริญของระบบรากในข้าวพันธุ์ทนเหล็ก เช่น พันธุ์ Azucena พบว่ามีการเจริญพัฒนาของ root border cells ที่ดีกว่าพันธุ์ IR64 (Zhang et al., 2011) ในพันธุ์ IR64 เกิด Iron plaque ที่บริเวณผิวรากทำให้รากมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ และมีการสะสมของเหล็กในรากสูง ทำให้การเจริญของรากลดลง ส่วนที่ใบพบปริมาณการสะสมของเหล็กมาก และพบจุดสีน้ำตาลเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นอาการของพืชที่เรียกว่า bronzing (Li et al., 2016) นอกจากนี้พบว่าการแตกกอของข้าวจะลดจำนวนลงซึ่งส่งผลต่อผลผลิตของข้าวที่ลดลง (Audebert, 2006) ปริมาณเหล็กที่มากขึ้นทำให้การดูดซับธาตุอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตลดลง เช่น แคลเซียม โพแทสเซียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส (Fageria et al., 2007; Fageria et al., 2008) ทำให้กระบวนการเมทาบอลิซึมในเซลล์ลดลง กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ลดลง และจากการศึกษาของ Pereira และคณะ (2013) พบว่า 10 mM Fe-EDTA ส่งผลให้อัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลงในข้าวพันธุ์ BRA041171 และพันธุ์ BRA041152 นอกจากนี้ยังส่งผลต่อระดับการแสดงออกของยีน ทำให้การแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนลำเลียงชนิดต่าง ๆ มีการแสดงออกเปลี่ยนไป ส่งผลให้การขนส่งและการลำเลียงธาตุอาหารจากดินเข้าสู่เมล็ดข้าวผิดปกติ (Müller et al., 2015)

นอกจากปริมาณธาตุเหล็กที่สูงและส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการตอบสนองของข้าวแล้ว อะลูมิเนียมยังจัดเป็นโลหะหนักอีกชนิดหนึ่งที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อข้าว โดยการเจริญเติบโตและการตอบสนองของข้าวเมื่อได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้นสูงจะส่งผลต่อระบบรากทำให้การเจริญของระบบรากลดลง ยับยั้งการยืดยาวของราก เยื่อหุ้มเซลล์เกิดความเสียหาย ซึ่งทำให้ดูดซับธาตุอาหารในดินที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตเข้าสู่รากได้น้อยลง และข้าวบางพันธุ์ที่ทนต่ออะลูมิเนียมพบว่าที่ปลายรากและรากแขนงมีความหนากว่าปกติ (Mossor-Pietraszewska et al., 1997) โดยอาจพบการสะสมของสารแคลโลสที่ผนังเซลล์มากขึ้น เพื่อสร้างความแข็งแรงและป้องกันไม่ให้อะลูมิเนียมลำเลียงเข้าสู่รากได้ (Sivaguru et al., 2000) งานวิจัยของ Moreno-Alvarado และคณะในปี 2017 พบว่า $AlCl_3$ ที่ความเข้มข้น 200 µM ส่งเสริมการเจริญของระบบรากในข้าวระยะ vegetative และในงานวิจัยการศึกษาการตอบสนองของข้าวในระยะต้นกล้า (Seedling) พบว่า $AlCl_3$ ที่ความเข้มข้น 100 µM ส่งผลทำให้การเจริญของระบบรากลดลง จะเห็นได้ว่าผลของอะลูมิเนียมที่ส่งผลต่อการเจริญหรือยับยั้งระบบรากนั้นขึ้นอยู่กับระยะการเจริญของข้าว (Awasthi et al., 2019) นอกจากนี้ยังมีอาการซีดขาว (chlorosis) ที่ใบโดยเริ่มจากบริเวณปลายใบของใบอ่อน และเกิดการตายของใบได้หรือที่เรียกว่าการเกิด necrosis อัตราการเปิด-ปิดของปากใบ อัตราการสังเคราะห์แสงและอัตราการ

หายใจลดลง และยังส่งผลให้จำนวนใบ ขนาดของใบ และน้ำหนักชีวมวล (biomass) ลดลง (Thornton et al., 1986) กระบวนการสร้างสารเมทาบอไลต์ในเซลล์พืชลดลง มีการสร้าง ROS และโพรลีนมากขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการได้รับความเครียดจากสภาวะที่ได้รับอะลูมิเนียมสูงในข้าว (Hare & Cress, 1997)

2.6 การตอบสนองในระดับยีนของข้าวที่ปลูกในดินกรดซึ่งมีเหล็กและอะลูมิเนียมในปริมาณสูง

การตอบสนองระดับยีนในข้าวเมื่อได้รับธาตุเหล็กสูง พบว่าเหล็กจะส่งสัญญาณไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนในนิวเคลียส เช่น ยีน *OsIRT1*, *OsIRT2*, *OsFRO2* และ *OsYSL15* ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับกลไกการนำเหล็กเข้าสู่เซลล์ราก ทำให้ Fe^{2+}, Fe^{3+} และ Fe-chelating ถูกลำเลียงเข้าสู่เซลล์รากผ่านโปรตีน IRT1 และ IRT2 ซึ่งยีน *OsIRT1* และ *OsIRT2* จะถูกกระตุ้นให้แสดงออกมากขึ้นเมื่อมีเหล็กมากขึ้น (Ishimaru et al., 2006) นอกจากนี้ยีน *FRO2* ถูกกระตุ้นให้แสดงออกมากขึ้นเพื่อทำหน้าที่เปลี่ยนเฟอริกอิออนให้เป็นเฟอรัสอิออน (Mukherjee et al., 2006) และยีน *OsYSL1* จะแสดงออกมากเพื่อกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนลำเลียงและช่วยนำ Fe-PS เข้าสู่เซลล์ดังกลไกการลำเลียงธาตุเหล็กแบบที่ 2 (รูปที่ 2) นอกจากยีนที่ลำเลียงธาตุเหล็กเข้าสู่รากแล้ว ยีนที่ทำหน้าที่ขนส่งและลำเลียงธาตุเหล็กเข้าสู่แวคิวโอล ได้แก่ *OsVIT1* และ *OsFPN2* ยีนในคลอโรพลาสได้แก่ *OsPIC1* และยีนในไมโตคอนเดรียได้แก่ *OsFRO7* ซึ่งยีนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการลำเลียงธาตุเหล็กเข้าออกเพื่อรักษาสมดุลธาตุเหล็ก ยีนที่ลำเลียงธาตุเหล็กผ่านทางท่อลำเลียงที่มีการแสดงออกมากขึ้น ได้แก่ ยีน *OsFRD3*, *OsFPN1* และ *OsYSL*s (Thomine & Lanquar, 2011) เมื่อยีนเหล่านี้มีการแสดงออกมากขึ้น และช่วยทำให้เกิดการลำเลียงธาตุเหล็กไปเก็บสะสมไว้ในใบ จึงทำให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสะสมธาตุเหล็กในใบเช่น *OsFER1* และ *OsFER2* แสดงออกมากขึ้น (Mahender et al., 2019)

การตอบสนองของยีนในข้าวเมื่อได้รับอะลูมิเนียม โดยอะลูมิเนียมจะไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนในนิวเคลียสผ่านการส่งสัญญาณเป็นลำดับขั้นของกระบวนการ mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway (Ligterink & Hirt, 2001; Osawa & Matsumoto, 2001) โดยสัญญาณจะถูกส่งไปยังนิวเคลียสกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน *OsART1*, *OsWRKY46* และ *OsSTOP* (Yamaji et al., 2009) ซึ่งเป็นยีนควบคุมการสร้างโปรตีนทำหน้าที่เป็นโปรตีนขนส่ง และ/หรือเป็นโปรตีนที่ช่วยในส่งสัญญาณในการตอบสนองต่ออะลูมิเนียมของเซลล์ ยีน *OsNRAMPs* และ *OsNRAT1* มีการแสดงออกมากขึ้นเพื่อทำหน้าที่สร้างโปรตีนในการลำเลียงอะลูมิเนียมเข้าสู่เซลล์ผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ในเซลล์ราก ทำให้ช่วยรักษาความสมดุลของอะลูมิเนียมที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ ยีน *OsALS1* และ *OsVALT1* จะแสดงออกมากเพื่อสร้างโปรตีนลำเลียงอะลูมิเนียมเข้าสู่แวคคิวโอล (Famoso et al., 2011; Huang et al., 2012) ส่วนยีนที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนในการลำเลียงสารประกอบอินทรีย์ออกสู่ภายนอกเซลล์รากเพื่อไปจับกับ Al^{3+} ที่บริเวณ rhizophere ได้แก่

OsALMTs และ *OsMATEs* จะมีการแสดงออกมากขึ้นเช่นกัน (Liu et al., 2014) นอกจากนี้ยังพบว่ามียีน *OsSTAR1* และ *OsSTAR2* แสดงออกมากขึ้นเพื่อทำหน้าที่ขนส่ง UDP-glucose ออกนอกเซลล์เพื่อทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในการสร้างสารประกอบของคาร์โบไฮเดรตที่ผนังเซลล์พืช เป็นอีกวิธีหนึ่งในการป้องกันการลำเลียงอะลูมิเนียมเข้าสู่เซลล์พืช (Huang et al., 2009) ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีความสนใจและต้องการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการสร้างโปรตีนลำเลียงอะลูมิเนียมเข้าสู่เซลล์ราก และโปรตีนที่ทำหน้าที่ลำเลียงและขนส่งอะลูมิเนียมสู่ใบ ได้แก่ *OsNrat1, OsALS1, OsVIT2, OsYSL1* และ *OsORC3*

2.7 เทคนิคที่ใช้ศึกษากลไกการตอบสนองต่อความเครียดของข้าวต่อสภาวะดินกรด

2.7.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของข้าว การศึกษาการเปลี่ยนแปลงด้านการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของข้าวมักมีการวัดจากความสูงของต้น ความยาวราก จำนวนใบ จำนวนต้นต่อกอ ลักษณะของใบที่แสดงอาการเมื่อได้รับหรืออยู่ภายใต้สภาวะดินกรด และการศึกษาทางสรีรวิทยาของข้าวมักมีการวัดการเปลี่ยนแปลงในหลายปัจจัย แต่ปัจจัยที่นิยมวัด ได้แก่ การวัดประสิทธิภาพในการรับแสงและส่งผ่านอิเล็กตรอนของพืช (Chlorophyll fluorescence) การวัดอัตราการสังเคราะห์แสงสุทธิ (Photosynthesis rate ; P_n; μmol m^{-2} s^{-1}) ศักยภาพการปิด-เปิดปากใบ (stomatal conductance; g_s; mmol H_2O m^{-2} s^{-1}) และอัตราการคายน้ำ (transpiration rate; E; mmol m^{-2} s^{-1}) การวัดประสิทธิภาพในการรับแสงและส่งผ่านอิเล็กตรอนของพืช (Chlorophyll fluorescence) มีหลักการของการวัดคือ ใบพืชที่ถูกปิดด้วย leaf clip หรืออยู่ในที่มืดจะไม่เกิดการสังเคราะห์แสงทำให้สามารถวัดค่า Minimal fluorescence (F_o) ได้ และเมื่อทำการวัดจะเปิดแผ่นใบให้ได้รับแสงในระดับสูงสุด ให้สามารถวัดค่า Maximal fluorescence (F_m) ดังนั้นจึงสามารถคำนวณหาค่า Variable fluorescence (F_v) โดย F_v เป็นค่าฟลูออเรสเซ็นซ์แปรปรวน (F_v) คำนวณได้จากสมการ $F_v = F_m - F_0$ และ Potential quantum yield (F_v/F_m) ถูกคำนวณเป็นผลผลิตของระบบแสงสอง (PSII) นอกจากนี้ผลรวมของการเก็บเกี่ยวพลังงานและการส่งผ่านอิเล็กตรอนในระบบแสงสอง (Φ_{PSII}) ถูกคำนวณด้วยสมการ: $\Phi_{PSII} = (F_m'-F_t) / F_m'$ (Loggini et al., 1999; Maxwell & Johnson, 2000)

นอกจากนี้ยังมีการวัดค่าดัชนีความเครียดของพืชด้านน้ำ (crop water stress index; CWSI) เป็นตัวบ่งชี้การตอบสนองของพืชต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำในพืช โดยที่ความต้องน้ำเพื่อการคายระเหยของน้ำสู่อากาศมีมากกว่าอัตราการคายน้ำในต้นพืชทำให้การคายระเหยของน้ำในต้นพืชลดลง ทำให้เกิดการชักนำการเปิดปิดปากใบ การวัดค่า CWSI วัดโดยวัดความแตกต่างของอุณหภูมิใบและอุณหภูมิอากาศ เมื่อพืชมีการคายน้ำจะทำให้อุณหภูมิใบลดลงต่ำกว่าอุณหภูมิอากาศ หากพืชขาดน้ำ การคายน้ำของพืชจะลดลง เกิดการชักนำให้ปากใบปิดมากขึ้น เป็นผลทำให้อุณหภูมิในใบมีค่าสูง

กว่าพืชที่ไม่ขาดน้ำ ค่า CWSI สัมพันธ์กับค่าศักย์ของน้ำในใบที่ลดลงและค่าการปิดปากใบที่เพิ่มมากขึ้น โดยสมการที่ใช้คำนวณเป็นดังนี้

$$CWSI = (T_{canopy} - T_{wet})/(T_{dry} - T_{wet})$$

โดย T_{canopy} คือ ค่าอุณหภูมิใบที่วัดได้ตามสภาพแวดล้อมหนึ่งๆ

T_{wet} คือ ค่าอุณหภูมิอ้างอิงต่ำสุดของใบที่เป็นไปได้ตามสภาพแวดล้อมหนึ่งๆ ที่ปากใบเปิดมากที่สุดและไม่มีความเครียดของน้ำในพืช

T_{dry} คือ ค่าอุณหภูมิอ้างอิงสูงสุดของใบที่เป็นไปได้ตามสภาพแวดล้อมหนึ่งๆ ที่ปากใบเปิดมากที่สุด และพืชไม่เกิดการคายน้ำ

เมื่อค่า CWSI มีค่าเข้าใกล้หรือเท่ากับ 0 หมายถึง พืชไม่มีความเครียดด้านน้ำ หากค่า CWSI มีค่าเข้าใกล้หรือเท่ากับ 1 หมายถึง พืชมีความเครียดด้านน้ำ

2.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณการสะสมธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมในข้าว การวิเคราะห์ธาตุโดยการใช้เครื่องวิเคราะห์ปริมาณธาตุด้วยเทคนิค Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) เช่น เครื่อง ICP-OES รุ่น PerkinElmer Aviofwfh9k 200 เทคนิคนี้สามารถวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของธาตุและโลหะหนักได้ โดยอาศัยหลักการการเหนี่ยวนำของคลื่นวิทยุที่คบพลาสมา (Plasma torch) ทำให้ธาตุเกิดการแตกตัวเป็นอะตอม และอยู่ในระดับพลังงานที่สูงขึ้น (Exited state) อะตอมของธาตุแต่ละธาตุประกอบด้วยนิวเคลียสเป็นศูนย์กลางและมีอิเล็กตรอนล้อมรอบ เมื่อให้พลังงานแก่อะตอม พลังงานเหล่านี้จะกระตุ้นให้อิเล็กตรอนที่อยู่ในระดับพลังงานต่ำหรืออยู่ในสภาวะพื้น (Ground state) มีระดับพลังงานที่สูงขึ้น (Excited state) จากนั้นอิเล็กตรอนจะคายพลังงานออกมาและกลับเข้าสู่สภาวะพื้นหรือระดับที่มีพลังงานต่ำกว่าอีกครั้ง และพลังงานที่คายออกมาจะเป็นในรูปแบบของรังสีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงสเปคตรัมต่างๆ จึงสามารถตรวจวัดได้จากสเปคตรัมที่ถูกปล่อยออกมาในช่วงความยาวคลื่นต่างๆ ที่เฉพาะของแต่ละธาตุ (Olesik, 1996)

2.7.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) หรือ Quantitative PCR (qPCR) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา และสามารถติดตามปริมาณการเพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอได้ในทุกรอบของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ติดตามได้ด้วยการวัดปริมาณของสารเรืองแสง เช่น SYBR Green I ที่มีคุณสมบัติในการเข้าจับที่ตำแหน่ง minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่ (double strand DNA) ซึ่งสามารถติดตามการเรืองแสงของสารเรืองแสงได้ตั้งแต่ต้นจนจบปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ซึ่งต่างจากเทคนิค PCR แบบดั้งเดิม ซึ่งจะเป็นแบบ end-point detection นั่นคือต้องรอให้เกิดปฏิกิริยาในรอบสุดท้ายให้เสร็จสิ้นก่อนจึงจะสามารถตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ และในการ

ตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR จะใช้สีย้อมเช่น Ethidium bromide ในการย้อมและนำไปตรวจสอบการเรืองแสงภายใต้แสง UV ซึ่งการใช้ Ethidium bromide นั้นเป็นอันตรายต่อสุขภาพ เนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็ง แต่ปัจจุบันได้มีการเปลี่ยนมาใช้สีชนิดอื่นเช่น Redsafe ซึ่งปลอดภัยและง่ายต่อการย้อมสามารถใส่สีย้อมลงไปในเจลอะกาโรส เทคนิค real-time PCR เหมาะสำหรับใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอเชิงปริมาณ (Quantitative analysis) และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจหาการขาดหายไปของสารพันธุกรรม (DNA deletion) การเพิ่มขึ้นของสารพันธุกรรม (DNA duplication) หรือการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรมเฉพาะจุด (Point mutation) การตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค real-time PCR สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี วิธีแรกเป็นการตรวจวัดด้วยการใช้สารฟลูออเรสเซนซ์ที่เข้าจับกับสายดีเอ็นเอสายคู่ นิยมใช้ SYBR Green I ดังที่กล่าวไปข้างต้น ความเข้มของสัญญาณเรืองแสงจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น วิธีที่สอง Probe-based assay เป็นการใช้โพรบในการไฮบริไดเซชัน (Hybridization) กับสายดีเอ็นเอที่ถูกสร้างใหม่ โพรบที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ TaqMan, FRET และ Scorpion probe โพรบแต่ละชนิดนั้นมีหลักการทำงานที่แตกต่างกัน ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค real-time PCR มาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่สนใจในพืชและสัตว์ หรือนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสในผู้ป่วย เป็นต้น (Mitchell & Iadarola, 2010)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 3 วิธีการทดลอง

3.1 พืชที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

ข้าว (*Oryza sativa* L.) ใช้ข้าว 28 พันธุ์ โดยข้าวที่นำมาเป็นพันธุ์ข้าวที่ผ่านการทดสอบในสภาวะธาตุเหล็กเป็นพิษ ซึ่งมีพันธุ์ที่ทนและไม่ทนต่อธาตุเหล็กเป็นพิษ และได้เมล็ดพันธุ์มาจากหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว (Rice Gene Discovery Unit) ซึ่งมีรายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 1 ดังนี้

ตารางที่ 1 พันธุ์ข้าว 28 พันธุ์ สำหรับนำมาคัดเลือกและศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าว 28 พันธุ์ ภายใต้สภาวะดินกรดที่มีปริมาณของเหล็กและอะลูมิเนียมสูง

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ข้าว	ลักษณะเฉพาะ	
		ไวแสง/ไม่ไวแสง	ทน/ไม่ทนต่อ Fe
1	คาลูบาลา (Kalubala)	ND	ND
2	นาขวัญ (NaKwaon)	ไวแสง	ND
3	เหลืองทอง (LuengThong)	ND	ND
4	IR64	ไวแสง	Sensitive
5	Pawsan hmwe	ไวแสง	ND
6	หมากน้ำ (MakNam)	ND	ND
7	หอมจันทร์ (HomJan) ; GW238	ไวแสง	ND
8	หอมจันทร์ (HomJan) ; DP037	ไวแสง	ND
9	ขาวหมากแขก (KaoMakKaek, KMK)	ไวแสง	ND
10	ดอดอกไม้ (DorDawkMai)	ND	ND
11	รวงเดียว (RaungDaew)	ไวแสง	ND
12	เหนียวมะลิ (NeawMali)	ND	ND
13	เหลืองควายล้า (LuengKwaiLa)	ไวแสง	ND
14	716 54R	ไวแสง	ND
15	Azucena	ไวแสง	Tolerant
16	FR13A	ไวแสง	ND
17	หอมมะลิ 805 (HomMali 805)	ND	ND
18	หอมมะลิ 831 (HomMali 831)	ND	ND

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ข้าว	ลักษณะเฉพาะ	
		ไวแสง/ไม่ไวแสง	ทน/ไม่ทนต่อ Fe
19	Pokkali	ND	ND
20	เก้ารวง 88 (GaoRuang 88)	ไวแสง	ND
21	เฉี้ยงพัทลุง (ChiangPataloong)	ไวแสง	ND
22	เหนียวหอม (NeawHom)	ไวแสง	ND
23	เหลืองหอม (LuengHom)	ไวแสง	ND
24	ไข่มดริ้น 3 (KhaiModRhin 3)	ไวแสง	ND
25	กข35 (รังสิต 80; RD35)	ไวแสง	ND
26	ขาวโป่งไคร้ (KaowPongKrai)	ไวแสง	ND
27	นางมล S4 (NangMol S4)	ไวแสง	ND
28	ปทุมธานี 60 (Pathumthani 60)	ไวแสง	ND

หมายเหตุ : ND หมายถึง ไม่ทราบข้อมูล

3.2 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

วัสดุและอุปกรณ์

1. เครื่องแก้วสำหรับเตรียมสารเคมี
2. Micropipette ขนาด 2.5, 10, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
3. Microcentrifuge ขนาด 1.5 และ 2.0 มิลลิลิตร
4. Tube ขนาด 15 มิลลิลิตร
5. Tip ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
6. Syringe ขนาด 3 มิลลิลิตร
7. Filter PTFE 0.45 µm (VertiClean™)
8. Screw Cap Digestion Vessel ขนาด 15 มิลลิลิตร
9. HotBlock
10. Fume hood
11. Mortar และ Pestle
12. เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง
13. Aluminum foil
14. ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometer) รุ่น PerkinElmer Avio 200

15. Chlorophyll Meter SPAD-502 Plus Model FMS 2; Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, United Kingdom

16. Chlorophyll fluorometer (model FMS 2; Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, United Kingdom)

17. Portable Photosynthesis System (Model LI 6400XT, LI-COR® Inc., Lincoln, NE, United States)

18. Centrifuge 5415R (Mondotech, Thailand, Co., Ltd.)

19. Gel electrophoresis (Gibthai Co.,Ltd.)

20. Gel documentation model Syngene Genious

21. PCR model BIORAD C1000 Thermal Cycler

22. Real Time PCR model BIORAD CFX96 #1 (For Real Time PCR Works and use Low profile tube/ plate Only)

23. Nanodrop

24. Cool Block 0°C-120°C (Bio-Active Co., Ltd.)

25. Thermal cycle รุ่น C1000^{TM} บริษัท ธีระเทรดดิ้ง จำกัด

26. pH meter รุ่น PCSTestr 35 Multi-Parameter

27. ถาดหลุมสำหรับเพาะปลูก ขนาด 40x50 เซนติเมตร

28. ปากกาเคมี

29. ถุงปลูกขนาด 80 หลุม

30. Vermiculite 3 กิโลกรัม

31. ขวดกาแฟ 170 ขวด

มหาวิทยาลัยศิลปากร

3.3 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้สำหรับการคัดเลือกพันธุ์ข้าว และการศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าว

1. $Al_2(SO_4)_3$ 10, 25 และ 50.00 mM

2. $AlCl_3$ 1.00 และ 10.00 mM

3. $FeSO_4$ 100.00 mM

4. 3 M H_2SO_4

5. 3 M NaOH

6. 5 mM EDTA

สารเคมีสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ธาตุอะลูมิเนียมด้วยเครื่อง ICP-OES

1. 69% HNO_3 (Loba Chemie PVT. LTD.)
2. 50% HNO_3
3. H_2O_2
4. HCl
5. 2% HNO_3
6. Deionize water
7. Standard Aluminum (Aluminum, 1000 ± 3 **μ**g mL^{-1}) เตรียมที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10, 15, 20, 25 และ 50 ppm

สารเคมีสำหรับฆ่าเชื้อและทำความสะอาดเนื้อเยื่อพืช

1. 75% Ethanol
2. 5% Clorox
3. 25% Clorox
4. น้ำกลั่น

สารเคมีสำหรับเตรียมสูตรอาหาร MS

Stock 1 MS-major salts (50x)

KNO_3	95.00	g L^{-1}
NH_4NO_3	82.50	g L^{-1}
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	22.00	g L^{-1}

Stock 2 MS-minor salts (100x)

H_3BO_3	0.62	g L^{-1}
KH_2PO_4	17.00	g L^{-1}
KI	0.083	g L^{-1}
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.025	g L^{-1}
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.0025	g L^{-1}

Stock 3 MS-minor salts (100x)

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	37.00	g L^{-1}
$MnSO_4 \cdot H_2O$	1.69	g L^{-1}
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.86	g L^{-1}
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0025	g L^{-1}

Stock 4 EDTA sodium ferric salts (100x)

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$) Na_2EDTA	3.725	g L^{-1}
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2.785	g L^{-1}

Stock 5 MS-vitamins (100x)

Glycine	0.20	g L^{-1}
Nicotinic acid	0.05	g L^{-1}
Thiamine hydrochloride	0.01	g L^{-1}
Pyridoxine hydrochloride	0.05	g L^{-1}
Myo-Inositol	10.00	g L^{-1}
น้ำตาลทราย	30.00	g L^{-1}
Phytagel	5.00	g L^{-1}

สารเคมีสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction)

1. liquid nitrogen
2. Plant RNA Reagent
3. 5M NaCl
4. Chloroform
5. isopropanol
6. 75% ethanol
7. DEPC water

สารเคมีสำหรับตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอ

1. 1.5% agarose gel
2. 0.5% TBE buffer
3. 0.01% Ethidium bromide
4. Loading dry
5. Ladder 100 bp
6. DEPC water

สารเคมีสำหรับการกำจัด genomics DNA ด้วย DNase treatment

1. DNase I 10x buffer
2. DNase I enzymes
3. EDTA
4. DEPC water

สารเคมีสำหรับการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณ cDNA

1. iScript RT Supermix (gray cap, 25 or 100 reactions)
2. iScript No-RT Control Supermix (clear cap, 50 reactions)
3. Nuclease-free water
4. RNA template (1 μg) total RNA

สารเคมีสำหรับใช้ในขั้นตอนวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Quantitative Real-time reverses transcription PCR (qRT-PCR)

1. cDNA 500 ng
2. 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus
3. Primer Forward (10 pmol μl^{-1})
4. Primer Reverse (10 pmol μl^{-1})
5. Nuclease-free water

3.4 วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การคัดเลือกและศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าว 28 พันธุ์ ภายใต้สภาวะดินกรดที่มีปริมาณของเหล็กและอะลูมิเนียมสูง

3.1.1 การเตรียมพืชและชุดการทดลอง

นำเมล็ดข้าว 28 พันธุ์ ซึ่งมีรายละเอียดดังตารางที่ 1 แช่น้ำเป็นเวลา 1 วัน เมื่อครบ 1 วัน นำเมล็ดข้าวแต่ละพันธุ์ไปปลูก นำดินปลูก (ดินสีดา) บรรจุลงในถุงปลูกที่มีขนาด 4x8 นิ้ว โดยในหนึ่งถุงจะปลูกข้าว 1 พันธุ์ จำนวน 200 เมล็ด รดน้ำ และนำไปเพาะเลี้ยงในโรงเรือนปลูกพืช เมื่อต้นข้าวมีอายุ 7 วัน แยกต้นข้าวลงถาดหลุมสำหรับเพาะปลูก และนำไปวางในภาชนะพลาสติก ขนาด 12.5 ลิตร (380×290×170 mm) เติมน้ำลงไป 5 ลิตร เมื่อต้นข้าวมีอายุ 60 วัน (เริ่มนับตั้งแต่วันแช่เมล็ดข้าว) จึงย้ายลงในสารละลายเหล็กและอะลูมิเนียมโดยแบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ 1) ชุดควบคุม (Control) ซึ่งเป็นน้ำกลั่นที่ไม่เติมธาตุเหล็กและอะลูมิเนียม 2) สารละลาย $Al_2(SO_4)_3$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ผสมกับ $FeSO_4$ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 ลิตร เตรียมสารละลาย $FeSO_4$ ที่ความเข้มข้น 100 และ $Al_2(SO_4)_3$ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ โดยการชั่งสาร $FeSO_4$ น้ำหนัก 278.05 กรัม และ $Al_2(SO_4)_3$ น้ำหนัก 166.60 กรัม ตามลำดับ ผสมสารทั้งสองในน้ำ 10 ลิตร ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 4.5 (ปรับด้วย 3 M H_2SO_4 และ/หรือ 3 M NaOH) ส่วนชุดควบคุมใช้น้ำ 10 ลิตรปรับเป็น pH 4.5 แต่ไม่ใส่สาร $FeSO_4$ และ $Al_2(SO_4)_3$ จากนั้นเทสารละลายลงในภาชนะที่มีพืชที่เตรียมไว้ หลังจากใส่สารละลายอะลูมิเนียมและเหล็กที่ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นเวลา 5 วัน จึงบันทึกผลการทดลองด้านการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา และการสะสมของ

เหล็กและอะลูมิเนียมจากนั้นจึงวิเคราะห์ผลเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนต่อสภาวะดินกรดที่มีปริมาณธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมในดินสูงเพื่อนำไปใช้ศึกษาต่อไป

3.1.2 การวัดการเจริญเติบโต

ทำการวัดการเจริญเติบโต ได้แก่ ความสูงต้น (เซนติเมตร) โดยใช้ตลับเมตรในการวัด วัดจากโคนต้นจนถึงความยาวใบสุดท้ายบนยอด ความยาวราก (เซนติเมตร) ใช้ไม้บรรทัดวัดจากโคนรากจนถึงปลายรากที่ยาวที่สุด นับจำนวนต้นต่อกอ น้ำหนักต้นสด (กรัม) น้ำหนักต้นแห้ง (กรัม) น้ำหนักรากสด (กรัม) น้ำหนักรากแห้ง (กรัม)

3.1.3 การวัดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา

(1) วัดประสิทธิภาพในการรับแสงและส่งผ่านอิเล็กตรอนของพืช (Chlorophyll fluorescence) ทำการวัดประสิทธิภาพในการรับแสงและส่งผ่านอิเล็กตรอนของพืชโดยใช้เครื่อง Chlorophyll fluorometer (model FMS 2; Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, United Kingdom) ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือของบริษัท ซึ่งมีขั้นตอนโดยย่อ ดังนี้ เริ่มจากประกอบอุปกรณ์และเปิดเครื่อง ใช้ leaf clip หนีบใบข้าวใบที่ 2 ซึ่งเป็นใบที่แผ่รับแสงเต็มที่โดยหนีบบริเวณแผ่นใบเลื่อนปิดแผ่นโลหะ จับเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาจึงเปิด leaf clip เพื่อให้แผ่นใบรับแสงแล้ววัดค่า Chlorophyll fluorescence โดยใช้เครื่อง Chlorophyll fluorometer บันทึกค่า F_o, F_m, F_v/F_m, F_s และ Φ_{PSII}

(2) วัดปริมาณคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll content) ทำการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบข้าวโดยใช้เครื่อง Chlorophyll Meter SPAD-502 Plus Model FMS 2; Hansatech Instruments Ltd ., Norfolk, United Kingdom ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในคู่มือของบริษัท ตัวเครื่องมีหัวหนีบใช้สำหรับหนีบบริเวณกลางใบ ค่าที่วัดได้จะเป็นค่าที่ได้จากการผ่านของแสง 2 ช่วงความยาวคลื่น ได้แก่ แสงสีแดง (red LED) ที่ช่วงความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร และแสงเหนือแดง (infrared LED) ที่ช่วงความยาวคลื่น 940 นาโนเมตร โดยช่วงความยาวคลื่นของแสงสีแดงเป็นช่วงความยาวคลื่นที่คลอโรฟิลล์ดูดนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง ส่วนแสงเหนือแดงที่ความยาวคลื่นดังกล่าวคลอโรฟิลล์มีการดูดแสงต่ำ เมื่อแสงทั้งสองช่วงส่องผ่านเนื้อใบ ปริมาณแสงบางส่วนจะถูกคลอโรฟิลล์ดูดซับไว้ ค่าที่คำนวณได้เป็นสัดส่วนของแสงสองช่วงคลื่นที่ทะลุผ่านเนื้อใบกับสัดส่วนเริ่มแรกที่วัดโดยไม่มีใบ ค่าที่วัดได้นี้เรียกว่า ค่า SPAD ซึ่งเป็นค่าที่แปรผันกับปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบ (Anonymous, 1989) โดยวิธีการวัดเริ่มจากเปิดเครื่อง Chlorophyll Meter SPAD-502 แล้วนำตัวหนีบที่อยู่บริเวณส่วนบนของเครื่องมือหนีบที่ใบข้าวใบที่ 2 นับจากยอด โดยหนีบบริเวณแผ่นใบ ใน 1 ซ้ำจะวัด 1 ใบ วัดใบละ 3 บริเวณคือ ปลายใบ กลางใบ และบริเวณใกล้โคนใบ กดวัดค่า 3 ครั้ง และกดปุ่ม average บันทึกค่าเฉลี่ยปริมาณคลอโรฟิลล์ที่วัดได้ลงในตารางบันทึกผลการทดลอง

(3) การวัดอัตราการสังเคราะห์แสง (Net photosynthesis rate) ศักยภาพการปิด-เปิดปากใบ (Stomatal conductance) และอัตราการหายใจ (Transpiration rate)

วัดอัตราการสังเคราะห์แสง ศักยภาพการปิด-เปิดปากใบ และอัตราการหายใจ โดยใช้เครื่อง Portable Photosynthesis System (Model LI 6400XT, LI-COR® Inc., Lincoln, NE, United States) โดยวัดจากใบที่ 2 เช่นเดียวกับการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์

(4) การวัดค่าความเครียดของพืชหรือค่า crop water stress index (CWSI) เป็นการวัดสัดส่วนความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิใบ (Canopy temperature; T_{canopy}) กับค่าอ้างอิงอุณหภูมิต่ำสุดในใบในสภาวะที่พืชคายน้ำหรือไม่เกิดความเครียด (T_{wet}) และค่าอ้างอิงอุณหภูมิสูงสุดใบในสภาวะที่พืชไม่คายน้ำ (T_{dry}) ซึ่งสามารถวัดได้โดยใช้เครื่อง FLIR camera (model E50, spectral range 7.5–14.0 µm and resolution of 240 × 180 pixel)

3.1.4 การสะสมของเหล็กและอะลูมิเนียม

การวัดปริมาณเหล็กและอะลูมิเนียมที่สะสมในรากและใบข้าวด้วยเครื่อง ICP-OES รุ่น Perkin Elmer Avio 200 วิธีการย่อยตัวอย่างดัดแปลงจากวิธีของ Agra Bezerra da Silva และคณะในปี 2013 โดยนำตัวอย่างรากและใบข้าว (ใบที่ 2) ที่อบแห้งเป็นเวลา 3 วัน มาบดกับไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด และชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 50 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอด Screw Cap Digestion Vessel ขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างเข้าสู่กระบวนการย่อยตัวอย่าง โดยเติม 50% HNO_3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำตัวอย่างไปต้มใน HotBlock™ ที่อุณหภูมิ 95±5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำออกจาก HotBlock™ และตั้งทิ้งไว้ในตู้ดูดควัน (ประมาณ 5-10 นาที) เพื่อให้อุณหภูมิของตัวอย่างลดลง เติม 69% HNO_3 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และนำไปไว้ใน HotBlock™ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบ 2 ชั่วโมงจึงเจือจางสารละลายตัวอย่าง 10 เท่าด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionize water) และกรองสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรด้วยแผ่นกรอง (filter PTFE ขนาด 0.45 µm) จากนั้นเจือจางสารละลายตัวอย่างด้วย 2% HNO_3 ให้มีความเข้มข้น 5 เท่าในปริมาตรสารละลาย 5 มิลลิลิตร โดยดูดสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร + 2% HNO_3 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าหลอดเพื่อผสมสารละลาย และนำไปวิเคราะห์เหล็กและอะลูมิเนียมในสารละลายตัวอย่างด้วยเครื่อง ICP-OES โดยใช้ Standard Aluminum ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10, 15, 20, 25 และ 50 ppm

3.1.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics ทุกการทดลองมีจำนวนซ้ำเท่ากับ 4 ซ้ำ (n=4) และค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบโดย Tukey’s HSD และจัดกลุ่มความความสัมพันธ์จากการสร้าง Dendrogram ใช้วิธี Ward Linkage โดยใช้ข้อมูลจากทุกพารามิเตอร์มาใช้ในการจัดกลุ่ม

การทดลองที่ 2 การศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของข้าวพันธุ์ไทยต่อสภาวะดินกรดและอะลูมิเนียมเป็นพิษ

3.2.1 การศึกษาความเป็นพิษของอะลูมิเนียมซัลเฟต $Al_2(SO_4)_3$ ต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีในข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ RD35

นำเมล็ดข้าว 3 พันธุ์ แช่น้ำเป็นเวลา 1 วัน นำเมล็ดข้าวแต่ละพันธุ์ไปปลูกในดินสีดา โดยบรรจุดินลงในถุงปลูกที่มีขนาด 4x8 นิ้ว โดยปลูกข้าวจำนวน 200 เมล็ดต่อพันธุ์ นำไปเพาะเลี้ยงในโรงเรือนปลูกพืช เมื่อต้นข้าวมีอายุครบ 7 วัน แยกต้นข้าวลงถาดหลุมสำหรับเพาะปลูก และนำไปวางในภาชนะพลาสติก ขนาด 12.5 ลิตร (380×290×170 mm) เติมน้ำลงไป 5 ลิตร เมื่อต้นข้าวมีอายุ 60 วันหรือเข้าสู่ระยะตั้งท้อง (เริ่มนับตั้งแต่วันแช่เมล็ดข้าว) จึงย้ายลงในสารละลายอะลูมิเนียมโดยแบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง คือ 1) ชุดควบคุม ใช้น้ำกลั่นและไม่เติมอะลูมิเนียม 2) สารละลาย $Al_2(SO_4)_3$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ 3) สารละลาย $Al_2(SO_4)_3$ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ และ 4) สารละลาย $Al_2(SO_4)_3$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปรับค่า pH ของสารละลายเป็น 4.5 หลังจากนั้น 14 วันจึงบันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต การตอบสนองทางสรีรวิทยา และปริมาณการสะสมของธาตุอะลูมิเนียมในต้นข้าว

3.2.2 การศึกษาความเป็นพิษของอะลูมิเนียมในรูปของ $Al_2(SO_4)_3$ และ $AlCl_3$ ในสภาวะที่เป็นกรด

นำต้นข้าวพันธุ์หอมนิล อายุ 2 สัปดาห์ (ระยะต้นกล้า) ย้ายลงในชุดการทดลองที่มีความเข้มข้นของสารละลายดังนี้ Control, 5 mM EDTA, 20 mM $Al_2(SO_4)_3$, 20 mM $Al_2(SO_4)_3$ + 5 mM EDTA, 1 mM $AlCl_3$, 10 mM $AlCl_3$, 20 mM $AlCl_3$, 20 mM $AlCl_3$ + 5 mM EDTA ทุกชุดการทดลองปรับ pH 4.5 เมื่อครบ 14 วันหลังใส่สารละลาย จึงเก็บผลการทดลองโดยเก็บส่วนของรากและใบ อย่างละ 50 mg และนำไปวิเคราะห์ปริมาณอะลูมิเนียมด้วยเครื่อง ICP-OES การทดลองนี้เพื่อศึกษาผลของรูปแบบอะลูมิเนียมต่อการตอบสนองของข้าว

3.2.3 การศึกษาความเป็นพิษของอะลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) ต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีในข้าว

3.2.3.1 การเตรียมพืชและชุดการทดลอง

นำเมล็ดข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ กข35 (RD35), พันธุ์ Azucena ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ทนต่อดินกรดและพันธุ์ IR64 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไม่ทนต่อดินกรด มาแช่น้ำเป็นเวลา 1 วัน เมื่อครบ 1 วัน นำเมล็ดข้าวแต่ละพันธุ์ไปปลูก นำดินปลูก (ดินสีดา) บรรจุลงในถุงปลูกที่มีขนาด 4x8 นิ้ว โดยในหนึ่งถุงจะปลูกข้าว 1 พันธุ์ จำนวน 200 เมล็ด รดน้ำ และนำไปเพาะเลี้ยงในโรงเรือนปลูกพืช เมื่อต้นข้าวมีอายุ 30 วัน (ระยะแตกกอ) แยกต้นข้าวลงแผ่นโฟมสำหรับเพาะปลูกในสารละลายที่มีอะลูมิเนียมโดยแบ่งออกเป็น 3 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลอง เติม $AlCl_3$ ที่ความเข้มข้น 0 และ 1 ตามลำดับ และเติมปุ๋ย

ออสโมโคสสูตร 13-13-13 อัตราส่วนของปุ๋ย 3 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ปรับ pH เท่ากับ 4.5 บันทึกผลการทดลองหลังจากเติมอะลูมิเนียมไป 14 วัน โดยบันทึกผลการศึกษาการเจริญเติบโต กลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยาและปริมาณการสะสมของอะลูมิเนียม วิธีการวัดผลการทดลองใช้วิธีการเหมือนในการทดลองที่ 1

3.2.3.2 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics ชุดการทดลองมีจำนวนซ้ำเท่ากับ 4 (n=4) และค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบโดย Tukey’s HSD

มหาวิทยาลัยศิลปากร

การทดลองที่ 3 การศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยา ชีวเคมีและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงอะลูมิเนียมในข้าวพันธุ์ไทยที่ทนต่อสภาวะดินกรดที่มีปริมาณอะลูมิเนียมสูง

3.3.1 การเตรียมพืชและชุดการทดลอง

3.3.1.1 การเพาะและเตรียมต้นกล้า

การเตรียมพืชเริ่มจากพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลองมีจำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ Azucena, RD35 และ KaoMakKaek ซึ่งข้าวพันธุ์ KaoMakKaek ได้การคัดเลือกจากการทดลองที่ 1 สามารถทนต่อดินกรดที่มีปริมาณของเหล็กและอะลูมิเนียมสูงในดิน โดยเริ่มจากเตรียมเมล็ดข้าวพันธุ์ละ 300 เมล็ด จากนั้นแกะเปลือกเมล็ดข้าวออกและล้างด้วย 75% Ethanol 1-2 นาที และฆ่าเชื้อด้วย 5% Clorox นำไปใส่ไว้ในเครื่องเขย่า (shaker) ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเปลี่ยนจาก 5% Clorox เป็น 25% Clorox และนำใส่เครื่องเขย่าอีกครั้งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ความร้อน 121 องศาเซลเซียสแล้ว โดยล้างน้ำกลั่น 3-5 ครั้ง และย้ายเมล็ดข้าวแต่ละพันธุ์ลงในอาหาร MS ในขวด vial (1 เมล็ดต่อขวด) เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นย้ายต้นกล้าข้าวลงในขวดกาแฟที่ภายในมี vermiculite และอาหารเหลว MS โดยใช้ต้นกล้า 4 ต้นต่อขวด เป็นเวลา 14 วันเพื่อปรับสภาพของต้นกล้าข้าว ในการทดลองจะแบ่งต้นข้าวออกเป็น 4 ซ้ำ/พันธุ์/treatment/ช่วงเวลา

3.3.1.2 การเตรียมอาหารสูตร MS สำหรับเพาะเมล็ด

เตรียมสารละลาย stock 1-5 สำหรับทำสูตรอาหาร MS สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม stock อยู่ในหัวข้อสารเคมีข้างต้น เมื่อเตรียม stock ของสารละลายเสร็จแล้ว นำ stock 1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และ stock 2-5 อย่างละ 10 มิลลิลิตร ผสมรวมกันต่อน้ำ 1 ลิตร (ถ้าต้องการเตรียมอาหาร MS มากกว่า 1 ลิตร ให้ใช้ปริมาณ stock ที่เพิ่มขึ้นตามอัตราส่วน) จากนั้นใส่น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร เมื่อน้ำตาลละลายเข้ากับสารละลายจึงปรับค่า pH เป็น 4.5 และใส่ phytagel 2.5 กรัมต่อลิตร คนให้เข้ากันและนำไปอุ่นในไมโครเวฟ 25-30 นาที จนได้สารละลายใส และนำมาเทลงในขวด vial ขนาด 8 ออนซ์ ปิดฝาคลายเกลียว (ไม่ปิดแน่น) นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C หลังจากฆ่าเชื้อแล้วจึงปิดฝาขวดให้แน่น รออาหารแข็งตัวและนำมาใช้งานได้

หมายเหตุ : ไม่ควรเตรียมอาหารไว้นาน เพราะอาจทำให้เกิดการปนเปื้อน (contaminate) จึงควรทำก่อนวันทำการทดลอง 1 วัน

3.3.1.3 การเตรียมอาหารสูตร MS เหลว

ใช้วิธีการเตรียมเหมือนกับการเตรียมอาหารสูตร MS ในข้อที่ 3.3.1.2 แตกต่างตรงที่อาหารสูตร MS สูตรนี้ไม่ใส่ phytagel ลงไปทำให้อาหารมีลักษณะเหลว และในส่วนของการเตรียม vermiculite ทำได้โดยนำ vermiculite ล้างด้วยน้ำสะอาด 8-10 รอบ จากนั้นนำมาใส่ในถุงผ้าขาวบางและใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 7 วัน เมื่อ vermiculite แห้ง นำออกจากตู้อบและชั่ง

ใส่ขวดกาแฟขวดละ 15 กรัม และเติมอาหารสูตร MS เหลวลงไป 45 มิลลิลิตรต่อขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 ℃ หลังจากฆ่าเชื้อเสร็จปิดฝาขวดให้สนิทรอให้อุณหภูมิลดลงจนถึงอุณภูมิห้องและสามารถนำมาใช้งานได้

3.3.1.4 การปลูกในสภาวะเป็นกรดที่มีธาตุอะลูมิเนียมสูง

ในชุดการทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มการทดลอง คือ Control และ 1 mM $AlCl_3$ ปรับค่า pH 4.5 พารามิเตอร์ที่ศึกษา ได้แก่ 1. การเจริญเติบโต 2. การตอบสนองทางสรีรวิทยา 3. ปริมาณการสะสมอะลูมิเนียมในส่วนรากของข้าว นอกจากนี้มีการศึกษาเพิ่มเติม ได้แก่ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการลำเลียงอะลูมิเนียม ได้แก่ *OsNrat1, OsALS1, OsVIT2* และ *OsYSL* นอกจากนี้ยังมียีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเซลล์ในเซลล์รากของข้าว ได้แก่ *OsORC3* การศึกษาจากการแสดงออกของยีนเหล่านี้จะศึกษาที่เซลล์รากของพืช โดยศึกษาในช่วงเวลาที่ 0, 6, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หลังได้รับ $AlCl_3$ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

3.3.2 การสกัดอาร์เอ็นเอในข้าว (RNA extraction)

นำตัวอย่างข้าวของแต่ละกลุ่มการทดลองที่ช่วงเวลา 0, 6, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ แช่ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) (เก็บที่อุณหภูมิ -80°C ในกรณีที่ยังไม่เริ่มการสกัด RNA) ชั่งตัวอย่างประมาณ 100 มิลลิกรัม และนำมาบดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดเป็นผงละเอียด ตักตัวอย่างใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Plant RNA Reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ปั่นผสมด้วยเครื่อง vortex และนำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสใส่ microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม 5 M NaCl ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และ chloroform ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และผสมโดยพลิกหลอดไปมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาจึงดูดสารละลายส่วนใสใส่ microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม isopropanol ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ปล่อยไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งและเติม 75% ethanol ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาให้ดูด ethanol ทิ้ง ทำตะกอนให้แห้งโดยปล่อยทิ้งไว้ 5-10 นาที และละลายตะกอนด้วย DEPC water ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

3.2.2 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง nanodrop

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ โดยดูดสารละลายอาร์เอ็นเอ 1 ไมโครลิตร หยดลงบนฐานวัดของเครื่อง nanodrop และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร ใช้ DEPC water เป็น blank และบันทึกปริมาณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ ค่า $OD_{230/260}$ และค่า $OD_{260/280}$ อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดีค่า $OD_{230/260}$ ต้องมากกว่า 1.80 และค่า $OD_{260/280}$ ต้องอยู่ระหว่าง 1.80-2.00

3.2.3 การตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5% TBE buffer นำไปอุ่นด้วยไมโครเวฟจนผงวุ้นละลาย และเทเจลลงในถาดเตรียมเจล รอเจลแข็งตัวนำไปวางในเครื่อง gel electrophoresis ที่มี 0.5% TBE buffer และโหลดตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ลงในหลุมเจล โดยใช้อาร์เอ็นเอ 1 ไมโครลิตรผสมกับ Loading dry ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เปิดเครื่อง electrophoresis ค่าความต่างศักย์ที่ใช้ 100 โวลต์ เป็นเวลา 25-30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำเจลไปย้อมด้วยสาร ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 0.01% เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำอาร์เอ็นเอไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (UV) ใช้ซอฟแวร์ GeneSys และถ่ายภาพเจลด้วยเครื่อง Gel document โดยใช้โปรแกรม GeneSnap

3.2.4 การกำจัด genomics DNA ด้วย DNase Treatment

วิธีนี้เป็นการกำจัด genomics DNA โดยใช้เอนไซม์ DNase I เริ่มจากเติมอาร์เอ็นเอความเข้มข้น 5.00 ไมโครกรัม และเติม DNase I 10x buffer 3 ไมโครลิตร เติม DNase I enzymes ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเติม DEPC water จนสารละลายมีปริมาตรรวมเป็น 30 ไมโครลิตร จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา เติม EDTA 5.00 ไมโครลิตร และนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณอาร์เอ็นเออีกครั้งด้วยเครื่อง Nanodrop และนำอาร์เอ็นเอไปสังเคราะห์เป็น cDNA

3.2.5 การสังเคราะห์ cDNA (cDNA conversion)

การสังเคราะห์ cDNA โดยเริ่มจากอาร์เอ็นเอที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม, เติม Nuclease-free water ให้มีปริมาตรรวมเป็น 16 ไมโครลิตร จากนั้นเติม iScript RT Supermix 4 ไมโครลิตร (โดย iScript RT Supermix ประกอบไปด้วย 5x RT supermix with RNase H+Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase, RNase inhibitor, dNTPs, oligo(dT), random primers, buffer, $MgCl_2$ และ stabilizers) นำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (ขั้นตอน Priming) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส 20 นาที และที่อุณหภูมิ 95

องศาเซลเซียส 1 นาที นำ cDNA ที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำไปใช้ในขั้นตอนการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค qRT-PCR

3.2.6 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR)

ระดับการแสดงออกของยีนวิเคราะห์ด้วยเทคนิค qRT-PCR ดัดแปลงมาจากวิธีของ Caldana และคณะ 2007 โดยนำ cDNA ของตัวอย่างข้าวในแต่ละกลุ่มการทดลองที่ระยะเวลา 0, 6, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง มาวัดระดับการแสดงออกของยีนที่สนใจ ได้แก่ *OsNRAT1, OsVIT2* และ *OsYSL* ทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งและลำเลียงอะลูมิเนียมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ยีน *OsALS1* ยีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงอะลูมิเนียมเข้าไปเก็บไว้ในแวคิวโอล เพื่อรักษาสมดุลในเซลล์ และ *OsORC3* ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนาของรากแขนง โดยการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนเริ่มจากนำ cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และใช้ชุดน้ำยา SYBR Green master mix (Applied Biosystems Applera, Darmstadt, Germany) ตามวิธีการที่ปรากฏในคู่มือ และตั้งโปรแกรมของปฏิกิริยา PCR โดยในขั้นตอนที่ 1 initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที, ขั้นตอนที่ 2 denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และขั้นตอนที่ 3 annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 20 วินาที และขั้นตอนที่ 4 extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 20 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 ให้ได้จำนวน 39 รอบ จากนั้นทำ melting curve analysis ตามด้วยการวิเคราะห์และคำนวณระดับการแสดงออกของยีนตามวิธีการ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak & Schmittgen, 2001) และใช้ยีน *Ubiquitin, Tubulin* เป็นยีนอ้างอิง (ตารางที่ 2)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์สำหรับใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนของข้าวภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์

primers	Sequence of primers
Ubq	F 5’-CTCCGTGGTGGTATGCAGAT-3’
	R 5’-CACGTTGTCAATGGTGTCG-3’
Tubulin	F 5’-GGAAGCTTGCGTCCCATCTCCCTCA-3’
	R 5’-GGGTACCATCAGCCTGAAAGGACAAAA-3’
OsNrat1	F 5’-TCGCATTGGCTCGCACCCT-3’
	R 5’-TCGTCTTCTTCAGCCGCACGAT-3’
OsALS1	F 5’-GGTCGTCAGTCTCTGCCTTGTC-3’
	R 5’-CCTCCCCATCATTTTCATTTGT-3’
OsVIT2	F 5’-ATCAGCGCCTTCCAGACCGC-3’
	R 5’-CGCAGCAAACGTACATAAAT-3’
OsYSL	F 5’-CACCTGGAAGCTAAGAGGTGTAGTGTGTT-3’
	R 5’-ATGCCAAACTAAACAATTCTCAAGT-3’
OsORC3	F 5’-CAGTGTGAGGATCACAAAGGATAAG-3’
	R 5’-GAAAAGGTAAACACTCAACAGAGACC-3’

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 การทดลองที่ 1 การคัดเลือกและศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าว 28 พันธุ์ภายใต้สภาวะดินกรดที่มีปริมาณของเหล็กและอะลูมิเนียมสูง

4.1.1 ปริมาณการสะสมธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมในเซลล์รากและใบของข้าว 28 พันธุ์ภายใต้สภาวะดินกรดที่มีธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมสูง

ผลการทดลองการคัดเลือกพันธุ์ข้าว 28 พันธุ์ ภายใต้สภาวะดินกรดที่มีปริมาณเหล็กและอะลูมิเนียมสูง พบว่าข้าว 28 พันธุ์สามารถดูดซึมธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมในดินเข้าสู่ภายในเซลล์รากได้ โดยปริมาณของธาตุทั้งสองที่พบในเซลล์รากมีปริมาณที่แตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ โดยในส่วนของรากพบว่ามีการสะสมอะลูมิเนียมสูงขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ได้แก่ ข้าวพันธุ์ กข35 (RD35), ปทุมธานี 60 (Pathumthani 60), เก้ารวง88 (GaoRuang 88), ขาวโป่งไคร้ (KaoPongKrai) และขาวหมากแขก (KMK) เป็นต้น โดยปริมาณธาตุอะลูมิเนียมเพิ่มขึ้นเป็น 4.97, 4.60, 3.42, 3.23 และ 3.20 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 3) และพันธุ์ข้าวที่พบธาตุอะลูมิเนียมต่ำในเซลล์ราก ได้แก่ ข้าวพันธุ์เหลืองควายล้า (LuengKwaiLa), ไข่มดริ้น 3 (KaiModRhin 3) และรวงเดียว (RuangDeaw) (1.01, 1.11 และ 1.13 เท่า ตามลำดับ) นอกจากธาตุอะลูมิเนียมแล้วต้นข้าวยังสามารถดูดซึมธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์รากได้สูง โดยพบว่าข้าวพันธุ์เฉียงพัทลุง (ChiangPataloong), พันธุ์ IR64 และ ไข่มดริ้น 3 (KaiModRhin 3) สะสมธาตุเหล็กเมื่อเทียบกับชุดควบคุมสูงถึง 6.27, 6.24 และ 5.45 เท่า ตามลำดับ ธาตุอะลูมิเนียมและเหล็กเป็นธาตุที่ไม่สามารถเคลื่อนที่จากเซลล์รากไปสู่ใบได้ (immobilized) จึงต้องอาศัยโปรตีนขนส่ง เพื่อช่วยในการนำธาตุอะลูมิเนียมและเหล็กขนส่งและลำเลียงไปสู่เนื้อเยื่อใบหรือออร์แกเนลอื่นๆ ได้ จากการทดลองพบว่าในข้าว 28 พันธุ์ มีการลำเลียงธาตุอะลูมิเนียมและเหล็กขึ้นไปยังเนื้อเยื่อในส่วนของใบได้แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยพบว่าในข้าวพันธุ์ขาวหมากแขกธาตุอะลูมิเนียมและเหล็กถูกลำเลียงไปยังเนื้อเยื่อใบในปริมาณสูงมากถึง 986.40 และ 140.80 เท่า ตามลำดับ จากผลการทดลองยังพบว่าข้าว 14 พันธุ์ มีปริมาณธาตุอะลูมิเนียมสะสมในใบสูง 42.44 ถึง 140.80 เท่า ได้แก่ KMK, RuangDeaw, NeawMali, Azucena, DorDawkMai, LuengKwaila, 716 54R, FR13A, Hommali 805, Hommali 831, Pokkali, GaoRuang88, ChiangPataloong และ HomJan (GW238) และข้าวอีก 13 พันธุ์ พบว่ามีการสะสมธาตุเหล็กในใบสูง 363.11 ถึง 986.41 เท่า ได้แก่ KMK, RuangDeaw, NeawMali, Azucena, DorDawkMai, LuengKwaila, 716 54R, FR13A, Hommali805, Hommali 831, Pokkali, GaoRuang88 และ ChiangPataloong ในทางตรงกันข้ามพบข้าว 14 พันธุ์ที่มีปริมาณอะลูมิเนียมต่ำในใบ ได้แก่ NeawHom, LuengHom, KhaiModRhin 3, RD35, KaoPongKrai, NangMol S4, Pathumthani 60, Kalubala, NaKwan,

LuengThong, IR64, Pawsan hmwe, MakNam และ HomJam (DP037) และพบข้าว 15 พันธุ์ที่มีปริมาณเหล็กต่ำในใบ ได้แก่ NeawHom, LuengHom, KhaiModRhin 3, RD35, KaoPongKrai, NangMol S4, Pathumthani 60, Kalubala, NaKwan, LuengThong, IR64, Pawsan hmwe, MakNam, HomJan (GW238) และ HomJam (DP037) (ตารางที่ 3)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 3 ปริมาณการเพิ่มขึ้นของธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมในเซลล์รากและใบของข้าว 28 พันธุ์ โดยแสดงเป็นจำนวนเท่าของการเพิ่มขึ้นของอะลูมิเนียมเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

	Leafs		Roots	
Cultivars	**Fold Al**	**Fold Fe**	**Fold Al**	**Fold Fe**
KaoMakKaek	**140.77**	**986.41**	**3.20**	4.15
RuangDeaw	**110.33**	**855.60**	1.34	2.84
NeawMali	**100.17**	**786.77**	2.51	4.68
Azucena	**101.47**	**844.88**	1.31	3.52
DorDawkMai	**64.06**	**514.85**	1.67	4.48
LuengKwaila	**65.34**	**483.58**	1.00	4.21
716 54R	**64.62**	**479.19**	1.18	3.22
FR13A	**79.52**	**665.88**	1.80	2.66
Hommali 805	**58.46**	**575.07**	2.11	2.32
Hommali 831	**42.44**	**363.11**	1.74	2.83
Pokkali	**58.48**	**388.90**	2.50	2.04
GaoRuang 88	**67.40**	**590.19**	**3.39**	2.18
ChiangPataloong	**85.95**	**635.86**	2.26	**6.27**
NeawHom	9.78	42.44	1.13	3.18
LuengHom	24.01	98.72	1.44	3.17
KhaiModRhin 3	3.97	50.75	1.11	**5.45**
RD35	10.60	80.11	**4.96**	4.70
KaoPongKrai	4.60	26.44	**3.23**	3.63
NangMol S4	8.44	53.62	2.60	4.07
Pathumthani 60	7.55	66.55	**4.59**	3.35
Kalubala	14.44	90.21	2.73	3.94
NaKwan	11.22	79.54	1.32	3.35
LuengThong	17.62	112.96	1.58	4.16
IR64	6.37	67.29	2.34	**6.24**
Pawsan hmwe	3.91	24.36	2.07	5.04
MakNam	28.28	88.44	2.63	3.67
HomJan (GW238)	**71.71**	128.20	3.37	4.98
HomJan (DP037)	3.79	61.78	2.50	3.70

หมายเหตุ: * ค่าในตารางคำนวณจากค่าเฉลี่ยของธาตุอะลูมิเนียมและเหล็กที่พบในตัวอย่างจำนวน 4 ซ้ำ, ** ตัวหนา แสดงปริมาณการสะสมธาตุอะลูมิเนียมและเหล็กสูงในรากและใบของข้าว

มหาวิทยาลัยศิลปากร

4.1.2 การเจริญเติบโตของข้าว 28 พันธุ์ ภายใต้สภาวะดินกรดที่มีธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมเป็นพิษ

จากการทดลองพบว่าปริมาณของธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมที่พบในเนื้อเยื่อใบมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งสามารถใช้เป็นพารามิเตอร์หนึ่งในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวได้ การพบธาตุอะลูมิเนียมและเหล็กในเซลล์รากและใบในปริมาณที่แตกต่าง อาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชที่แตกต่างกัน ซึ่งจากผลการทดลองด้านการเจริญเติบโตในข้าว 28 พันธุ์ ภายใต้สภาวะดินกรดที่มีธาตุอะลูมิเนียมและเหล็กในปริมาณสูงพบว่า การเจริญเติบโตและการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าว 28 พันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันในข้าวแต่ละพันธุ์ โดยพบว่าผลของสภาวะดินกรดที่มีปริมาณอะลูมิเนียมและเหล็กสูงส่งผลทำให้ความสูงของกอข้าวลดลงในข้าวพันธุ์ Pokkali, กข35 (RD35), ปทุมธานี 60 (Pathumthani 60) และหอมจันทร์ (HomJan: GW238) ส่วนข้าวอีก 24 พันธุ์พบว่าสภาวะดังกล่าวไม่ทำให้ความสูงลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม จากตารางที่ 4 พบว่าข้าวพันธุ์หอมจันทร์ (HomJan: GW238) นอกจากความสูงที่ลดลงแล้วยังส่งผลให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งต้นลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่ในข้าวพันธุ์ไข่มดริ้น 3 (KaiModRhin 3), Kalubala และ Pawsan hmwe ไม่พบการเปลี่ยนแปลงความสูง แต่พบว่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งต้นลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ในส่วนของความยาวรากพบว่ารากมีความยาวลดลงในข้าว 6 พันธุ์ ได้แก่ FR13A, เหลืองหอม (LuengHom), ปทุมธานี 60 (Pathumthani 60), Kalubala, หอมจันทร์ (HomJan: GW238) และพันธุ์หอมจันทร์ (HomJan: DP037) แต่การลดลงของความยาวรากในข้าวทั้ง 6 พันธุ์ไม่ส่งผลต่อการลดลงของน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของราก โดยพบว่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของรากลดลงในข้าวพันธุ์ 716 54R, นาขวัญ (NaKwan) และ Pawsan hmwe แต่พบว่าพันธุ์ข้าวส่วนใหญ่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในด้านการเจริญเติบโตเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะดินกรดและธาตุอะลูมิเนียมและเหล็กสูงในดิน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการตอบสนองต่อการเจริญเติบโตของข้าวแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกัน (ตารางที่3)

ตารางที่ 4 ค่าความสูง (SH) ความยาวราก (RL) น้ำหนักสดต้น (SHFW) น้ำหนักแห้งต้น (SHDW) น้ำหนักสดราก (RFW) และน้ำหนักแห้งราก (RDW) ของข้าว 28 พันธุ์ภายใต้ดินกรดที่มีปริมาณธาตุเหล็กและธาตุอะลูมิเนียมสูง

Genotypes	Treatments	SH (cm)	RL (cm)	SHFW (g)	SHDW (g)	RFW (g)	RDW (g)
KaoMakKaek	Control	125.75	21.30	15.75	2.38	9.70	0.73
	Fe+Al	114.58	24.90	9.98	1.93	7.35	0.69
		(8.89%)	(0.00%)	(36.63%)	(19.20%)	(24.26%)	(6.48%)
	T-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DorDawkMai	Control	121.63	28.95	13.59	2.15	10.11	0.76
	Fe+Al	123.90	21.20	7.19	1.72	7.01	0.48
		(0.00%)	(26.77%)	(47.11%)	(20.21%)	(30.64%)	(36.72%)
	T-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns
RuangDeaw	Control	133.13	25.45	16.23	2.78	13.84	0.98
	Fe+Al	122.00	28.30	8.59	2.24	10.27	0.81
		(8.36%)	(0.00%)	(47.06%)	(19.35%)	(25.79%)	(18.07%)
	T-test	ns	ns	*	ns	ns	ns
NeawMali	Control	143.40	30.80	31.32	4.88	10.74	0.97
	Fe+Al	140.30	29.00	13.88	1.76	11.04	0.71
		(2.16%)	(5.84%)	(55.68%)	(63.93%)	(0.00%)	(26.94%)
	T-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns
LuengKwaiLa	Control	110.63	30.35	14.41	2.25	10.56	0.83
	Fe+Al	130.63	17.33	4.29	1.08	5.39	0.29
		(0.00%)	(-42.91%)	(-70.21%)	(-52.11%)	(-49.01%)	(-64.35%)
	T-test	ns	ns	*	ns	ns	*
716 54R	Control	134	29.45	18.38	3.16	15.91	1.78
	Fe+Al	134.00	27.60	9.82	2.62	9.46	0.71
		(0.00%)	(6.28%)	(46.57%)	(17.15%)	(40.52%)	(59.97%)
	T-test	ns	ns	*	ns	*	*
Azucena	Control	126.38	24.90	11.67	2.05	5.65	0.46
	Fe+Al	133.50	24.50	6.45	1.78	5.80	0.34
		(0.00%)	(1.61%)	(44.78%)	(13.08%)	(0.00%)	(26.63%)
	T-test	ns	ns	**	ns	ns	ns
FR13A	Control	147.83	22.50	18.46	4.38	7.22	0.76
	Fe+Al	146.50	29.28	11.28	3.39	7.25	0.54
		(0.90%)	(0.00%)	(38.90%)	(22.61%)	(0.00%)	(28.38%)
	T-test	ns	*	*	ns	ns	ns

หมายเหตุ: ค่าในตารางคำนวณจากค่าเฉลี่ยของธาตุอะลูมิเนียมและเหล็กที่พบในตัวอย่างจำนวน 4 ซ้ำ n=4, ค่า % แสดงถึงเปอร์เซ็นการลดลงของพารามิเตอร์ต่างๆหลังได้รับธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมเทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 4 (ต่อ) ค่าความสูง (SH) ความยาวราก (RL) น้ำหนักสดต้น (SHFW) น้ำหนักแห้งต้น (SHDW) น้ำหนักสดราก (RFW) และน้ำหนักแห้งราก (RDW) ของข้าว 28 พันธุ์ภายใต้ดินกรดที่มีปริมาณธาตุเหล็กและธาตุอะลูมิเนียมสูง

Genotypes	Treatments	SH (cm)	RL (cm)	SHFW (g)	SHDW (g)	RFW (g)	RDW (g)
Hommali 805	Control	138.83	19.25	14.61	2.85	6.80	0.79
	Fe+Al	146.13	29.30	12.30	3.56	10.40	0.89
		(0.00%)	(0.00%)	(15.78%)	(0.00%)	(0.00%)	(0.00%)
	T-test	ns	ns	ns	ns	*	ns
Hommali 831	Control	123.88	28.75	12.22	2.19	9.33	0.86
	Fe+Al	118.00	23.38	2.70	1.72	7.97	0.56
		(4.74%)	(18.70%)	(77.93%)	(21.64%)	(14.55%)	(35.65%)
	T-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Pokkali	Control	144.00	16.65	21.34	3.23	12.50	1.21
	Fe+Al	132.55	22.30	13.20	2.95	11.91	1.35
		(0.00%)	(0.00%)	(38.13%)	(8.74%)	(4.72%)	(0.00%)
	T-test	*	ns	*	ns	ns	ns
GaoRuang88	Control	107.58	26.35	14.57	2.46	9.23	0.78
	Fe+Al	108.75	29.95	10.33	2.89	10.99	1.12
		(0.00%)	(0.00%)	(29.15%)	(0.00%)	(0.00%)	(0.00%)
	T-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Chiang Pataloong	Control	131.60	26.05	12.48	2.09	10.81	0.93
	Fe+Al	135.13	25.00	7.55	1.79	9.17	0.47
		(0.00%)	(4.03%)	(39.51%)	(14.01%)	(15.11%)	(49.60%)
	T-test	ns	ns	*	ns	ns	ns
NeawHom	Control	139.73	24.75	19.73	3.33	9.64	0.97
	Fe+Al	131.50	20.93	10.16	2.21	8.69	0.53
		(5.89%)	(15.45%)	(48.52%)	(33.46%)	(9.81%)	(45.10%)
	T-test	ns	ns	*	ns	ns	*
Lueng Hom	Control	124.38	22.9	29.57	4.96	19.43	3.11
	Fe+Al	126.75	14.98	16.38	4.07	15.07	1.26
		(0.00%)	(34.61%)	(44.61%)	(17.96%)	(22.42%)	(59.34%)
	T-test	ns	*	ns	ns	ns	ns
KhaiModRhin 3	Control	138.68	18.25	13.43	2.29	5.66	0.44
	Fe+Al	130.88	16.73	5.55	1.49	3.98	0.24
		(5.62%)	(8.36%)	(58.68%)	(34.97%)	(29.70%)	(45.14%)
	T-test	ns	ns	**	**	*	ns

หมายเหตุ: ค่าในตารางคำนวณจากค่าเฉลี่ยของธาตุอะลูมิเนียมและเหล็กที่พบในตัวอย่างจำนวน 4 ซ้ำ n=4, ค่า % แสดงถึงเปอร์เซ็นการลดลงของพารามิเตอร์ต่างๆหลังได้รับธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมเทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 4 (ต่อ) ค่าความสูง (SH) ความยาวราก (RL) น้ำหนักสดต้น (SHFW) น้ำหนักแห้งต้น (SHDW) น้ำหนักสดราก (RFW) และน้ำหนักแห้งราก (RDW) ของข้าว 28 พันธุ์ภายใต้ดินกรดที่มีปริมาณธาตุเหล็กและธาตุอะลูมิเนียมสูง

Genotypes	Treatments	SH (cm)	RL (cm)	SHFW (g)	SHDW (g)	RFW (g)	RDW (g)
RD35	Control	125.33	13.75	11.19	2.06	4.62	0.36
	Fe+Al	103.5	13.88	7.78	1.83	4.63	0.34
		(17.41%)	(0.00%)	(30.46%)	(11.29%)	(0.00%)	(3.52%)
	T-test	*	ns	*	ns	ns	ns
KaoPongKrai	Control	151.33	27.75	20.23	3.23	8.41	0.75
	Fe+Al	148.63	17.6	9.86	2.04	6.39	0.51
		(1.78%)	(36.58%)	(51.28%)	(36.84%)	(24.00%)	(32.11%)
	T-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NangMol S4	Control	135.38	16.05	10.94	1.94	5.18	0.46
	Fe+Al	138.13	34.50	9.99	2.57	8.72	0.57
		(0.00%)	(0.00%)	(8.66%)	(0.00%)	(0.00%)	(0.00%)
	T-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Pathumthani 60	Control	128.63	15.80	13.22	2.38	7.01	0.60
	Fe+Al	112.00	28.38	11.00	2.84	13.09	0.84
		(12.93%)	(0.00%)	(16.78%)	(0.00%)	(0.00%)	(0.00%)
	T-test	*	*	ns	ns	*	ns
Kalubala	Control	152.13	26.10	19.42	4.86	7.90	0.79
	Fe+Al	156.50	16.18	8.95	3.22	5.37	0.47
		(0.00%)	(38.03%)	(53.91%)	(33.81%)	(32.09%)	(40.88%)
	T-test	ns	**	*	*	ns	ns
NaKwan	Control	132.75	20.00	25.20	3.40	13.36	1.27
	Fe+Al	133.78	17.93	11..34	2.91	8.21	0.57
		(0.00%)	(10.38%)	(55.00%)	(14.42%)	(38.52%)	(55.12%)
	T-test	ns	ns	**	ns	*	**
Lueng Thong	Control	134.5	18.15	19.98	3.31	9.79	0.82
	Fe+Al	134.93	20.4	11.21	2.85	9.03	0.69
		(0.00%)	(0.00%)	(43.88%)	(13.89%)	(7.84%)	(15.29%)
	T-test	ns	ns	**	ns	ns	ns
IR64	Control	89.65	21.4	8.12	1.66	3.58	0.26
	Fe+Al	89.98	16.00	6.71	1.81	4.71	0.31
		(0.00%)	(25.23%)	(17.31%)	(0.00%)	(0.00%)	(0.00%)
	T-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns

หมายเหตุ: ค่าในตารางคำนวณจากค่าเฉลี่ยของธาตุอะลูมิเนียมและเหล็กที่พบในตัวอย่างจำนวน 4 ซ้ำ n=4, ค่า % แสดงถึงเปอร์เซ็นการลดลงของพารามิเตอร์ต่างๆหลังได้รับธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมเทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 4 (ต่อ) ค่าความสูง (SH) ความยาวราก (RL) น้ำหนักสดต้น (SHFW) น้ำหนักแห้งต้น (SHDW) น้ำหนักสดราก (RFW) และน้ำหนักแห้งราก (RDW) ของข้าว 28 พันธุ์ภายใต้ดินกรดที่มีปริมาณธาตุเหล็กและธาตุอะลูมิเนียมสูง

Genotypes	Treatments	SH (cm)	RL (cm)	SHFW (g)	SHDW (g)	RFW (g)	RDW (g)
Pawsan hmwe	Control	161.38	20.05	26.02	3.90	13.97	1.54
	Fe+Al	120.75	13.63	5.58	1.48	5.26	0.49
		(25.17%)	(32.04%)	(78.56%)	(62.18%)	(62.35%)	(68.23%)
	T-test	ns	ns	**	**	**	**
MakNam	Control	134.00	20.7	19.84	3.59	8.99	0.89
	Fe+Al	129.00	27.1	11.25	2.88	11.75	0.95
		(3.73%)	(0.00%)	(43.27%)	(19.90%)	(0.00%)	(0.00%)
	T-test	ns	ns	*	ns	ns	ns
HomJan (GW238)	Control	133.90	25.05	15.71	2.91	7.99	0.77
	Fe+Al	112.25	16.75	7.91	2.14	7.80	0.58
		(16.17%)	(33.13%)	(49.68%)	(26.33%)	(2.44%)	(24.35%)
	T-test	**	**	**	*	ns	ns
HomJan (DP037)	Control	113.40	15.65	12.95	2.14	4.99	0.50
	Fe+Al	109.75	24.8	7.67	2.11	7.62	0.67
		(3.22%)	(0.00%)	(40.73%)	(1.64%)	(0.00%)	(0.00%)
	T-test	ns	*	ns	ns	ns	ns

หมายเหตุ: ค่าในตารางคำนวณจากค่าเฉลี่ยของธาตุอะลูมิเนียมและเหล็กที่พบในตัวอย่างจำนวน 4 ซ้ำ n=4, ค่า % แสดงถึงเปอร์เซ็นการลดลงของพารามิเตอร์ต่างๆหลังได้รับธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมเทียบกับชุดควบคุม

มหาวิทยาลัยศิลปากร

4.1.3 ผลการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าว 28 พันธุ์ ภายใต้สภาวะดินกรดที่มีธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมเป็นพิษ

นอกการเจริญเติบโตของพืชที่แตกต่างกัน พบว่าปริมาณการเพิ่มขึ้นของธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมในเซลล์รากและใบของข้าว 28 พันธุ์ส่งผลต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาของพืชที่ต่างกัน โดยพบว่าในข้าวพันธุ์ปทุมธานี 60 (Pathumthani 60) มีการตอบสนองทางสรีรวิทยาลดลงในทุกพารามิเตอร์ และโดยส่วนใหญ่พบว่าข้าวมีอัตราการเกิดกระบวนการสังเคราะห์แสงลดลง เนื่องจากปากใบปิดทำให้พืชไม่สามารถคายน้ำและไม่สามารถนำคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงได้ (ตารางที่ 5) นอกจากนี้พบว่าการปิดปากใบของพืชส่งผลต่ออุณหภูมิในใบพืช เนื่องจากไม่มีการแลกเปลี่ยนก๊าซและไม่เกิดการคายน้ำ ทำให้อุณหภูมิในใบพืชเพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในใบพืชเพียง 1 องศาเซลเซียส สามารถส่งผลต่อกระบวนการต่างๆที่เกิดขึ้นในใบพืชได้ ไม่ว่าจะเป็นการรับแสงและกระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอนในพืช การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในใบสอดคล้องกับค่า CWSI (crop water stress index) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความเครียดของพืชเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด โดยในข้าวเมื่อค่า CWSI จะอยู่ในช่วง 0.1 ถึง 1.0 แต่ถ้าพบว่าค่า CWSI > 0.4 นั้นแสดงถึงความเครียดของข้าวที่เพิ่มขึ้น จากผลการทดลองพบว่าในข้าว 28 พันธุ์ มีค่า CWSI > 0.4 และพบว่าในข้าวพันธุ์ Kalubala มีค่า CWSI เท่ากับ 0.85 ซึ่งการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าวจากผลการทดลองในตารางที่ 3 พบความแตกต่างกัน เช่น ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 60 (Pathumthani 60) การตอบสนองทางสรีรวิทยาลดลงในทุกพารามิเตอร์ แต่ในข้าวพันธุ์เหนียวมะลิ (NeawMali) พบว่ากระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลง เนื่องจากการปิดปากใบที่มากขึ้นและอัตราการคายน้ำลดลงในขณะที่พารามิเตอร์อื่นๆไม่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งในทางตรงข้ามกลับพบว่าข้าวพันธุ์หอมมะลิ 805 (Hommali 805) มีอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลงเนื่องจากประสิทธิภาพของกระบวนการแตกตัวและถ่ายทอดอิเล็คตรอนลดลง แต่อุณหภูมิของใบและพารามิเตอร์อื่นๆไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงในทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าว 28 พันธุ์มีการตอบสนองที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ค่า Chlorophyll fluorescence (F_v/F_m), Photon yield of PSII (Φ_{PSII}), Total chlorophyll contents (TC; mg g^{-1} FW), Stomatal conductance (G_s; mmol H_2O $m^{-2}s^{-1}$), Transpiration rate (E; mmol H_2O $m^{-2}s^{-1}$), Net photosynthesis rate (P_n; mmol $m^{-2}s^{-1}$), Leaf temperature (LT; °C) และ crop water stress index (CWSI) ของข้าว 28 พันธุ์ภายใต้ดินกรดที่มี ปริมาณธาตุเหล็กและธาตุอะลูมิเนียมสูง

Genotypes	Treatments	Fv/Fm	ΦPSII	TC	Gs	E	Pn	LT	CWSI
KaoMakKaek	Control	0.83	0.67	42.25	0.06	1.42	8.98	32.03	0.38
	Fe+Al	0.37	0.16	30.50	0.02	0.54	0.75	34.56	0.72
		(55.96%)	(75.20%)	(27.81%)	(67.11%)	(61.96%)	(91.63%)	(7.32%)	(46.94%)
	T-test	**	**	ns	**	**	**	**	**
DorDawkMai	Control	0.80	0.70	36.78	0.07	1.62	7.90	32.63	0.50
	Fe+Al	0.67	0.46	34.43	0.01	0.45	1.29	34.56	0.67
		(16.62%)	(34.88%)	(6.39%)	(77.90%)	(72.17%)	(83.67%)	(5.58%)	(23.88%)
	T-test	**	**	ns	**	**	**	**	**
Ruang Deaw	Control	0.69	0.70	41.08	0.08	1.93	9.49	32.67	0.48
	Fe+Al	0.64	0.31	42.33	0.02	0.63	1.05	34.46	0.77
		(7.52%)	(55.69%)	(0.00%)	(71.91%)	(67.55%)	(88.91%)	(5.19%)	(37.6%)
	T-test	ns	**	ns	**	**	**	**	**
Neaw Mali	Control	0.72	0.66	44.23	0.11	2.50	11.23	32.53	0.52
	Fe+Al	0.76	0.57	48.50	0.02	0.59	1.35	25.66	0.52
		(0.00%)	(13.10%)	(0.00%)	(82.24%)	(76.52%)	(87.96%)	(0.00%)	(0.00%)
	T-test	ns	ns	ns	**	**	**	ns	ns
LuengKwaiLa	Control	0.81	0.63	43.20	0.07	1.71	9.10	31.53	0.34
	Fe+Al	0.69	0.61	43.60	0.02	0.50	0.95	34.69	0.68
		(15.26%)	(3.20%)	(0.00%)	(75.45%)	(70.56%)	(89.54%)	(9.11%)	(50.00%)
	T-test	**	ns	ns	**	**	**	**	**
716 54R	Control	0.81	0.67	38.98	0.12	2.69	12.26	33.4	0.59
	Fe+Al	0.62	0.25	48.63	0.03	0.82	1.37	34.42	0.69
		(23.18%)	(62.32%)	(0.00%)	(75.52%)	(69.52%)	(88.80%)	(2.96%)	(14.49%)
	T-test	**	**	ns	**	**	**	**	**
Azucena	Control	0.85	0.68	36.48	0.12	2.58	13.2	32.15	0.39
	Fe+Al	0.75	0.53	36.78	0.02	0.43	1.04	35.1	0.72
		(11.81%)	(21.93%)	(0.00%)	(87.11%)	(83.21%)	(92.13%)	(8.40%)	(45.83%)
	T-test	**	**	ns	**	**	**	**	**
FR13A	Control	0.83	0.59	39.45	0.05	1.22	6.91	33.23	0.54
	Fe+Al	0.60	0.20	38.58	0.02	0.48	1.87	35.03	0.77
		(27.63%)	(66.37%)	(2.22%)	(66.23%)	(60.91%)	(72.88%)	(5.14%)	(30.23%)
	T-test	**	**	ns	**	**	**	**	**

หมายเหตุ: ค่าในตารางคำนวณจากค่าเฉลี่ยของธาตุอะลูมิเนียมและเหล็กที่พบในตัวอย่างจำนวน 4 ซ้ำ n=4, ค่า % แสดงถึงเปอร์เซ็นการลดลงของพารามิเตอร์ต่าง ๆ หลังได้รับธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมเทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 5 (ต่อ) ค่า Chlorophyll fluorescence (F_v/F_m), Photon yield of PSII (Φ_{PSII}), Total chlorophyll contents (TC; mg g^{-1} FW), Stomatal conductance (G_s; mmol H_2O $m^{-2}s^{-1}$), Transpiration rate (E; mmol H_2O $m^{-2}s^{-1}$), Net photosynthesis rate (P_n; mmol $m^{-2}s^{-1}$), Leaf temperature (LT; °C) และ crop water stress index (CWSI) ของข้าว 28 พันธุ์ภายใต้ดินกรดที่มี ปริมาณธาตุเหล็กและธาตุอะลูมิเนียมสูง

Genotypes	Treatments	Fv/Fm	Φ_{PSII}	TC	Gs	E	Pn	LT	CWSI
Hommali 805	Control	0.8	0.62	36.15	0.05	1.16	7.12	32.4	0.51
	Fe+Al	0.77	0.35	36.78	0.01	0.45	0.86	33.68	0.56
		(4.57%)	(44.00%)	(0.00%)	(68.56%)	(60.98%)	(87.89%)	(3.80%)	(9.09%)
	T-test	ns	**	ns	ns	ns	*	ns	ns
Hommali 831	Control	0.78	0.72	37.48	0.03	0.88	6.1	32.85	0.49
	Fe+Al	0.77	0.68	35.73	0.02	0.55	2.12	34.26	0.70
		(1.94%)	(5.77%)	(4.67%)	(47.14%)	(38.17%)	(65.26%)	(4.11%)	(29.96%)
	T-test	ns	ns	ns	*	*	**	**	*
Pokkali	Control	0.84	0.64	38.6	0.06	1.41	8.3	32.59	0.54
	Fe+Al	0.22	0.11	39.43	0.01	0.34	0.71	34.42	0.67
		(73.31%)	(82.36%)	(0.00%)	(79.79%)	(75.54%)	(91.42%)	(5.29%)	(19.40%)
	T-test	**	**	ns	**	**	**	**	**
GaoRuang88	Control	0.82	0.66	40.88	0.05	1.31	6.53	31.96	0.54
	Fe+Al	0.77	0.73	42.58	0.01	0.32	0.63	34.29	0.67
		(5.95%)	(0.00%)	(0.00%)	(79.86%)	(75.44%)	(90.29%)	(6.78%)	(19.88%)
	T-test	ns	ns	ns	**	**	**	**	**
ChiangPataloong	Control	0.83	0.59	41.58	0.05	1.18	7.45	31.69	0.38
	Fe+Al	0.20	0.15	40.28	0.02	0.66	1.01	34.15	0.72
		(75.22%)	(74.03%)	(3.13%)	(50.71%)	(44.08%)	(86.48%)	(7.20%)	(46.96%)
	T-test	**	**	ns	ns	ns	**	**	**
NeawHom	Control	0.80	0.61	35.35	0.02	0.64	5.46	32.37	0.39
	Fe+Al	0.79	0.75	37.30	0.01	0.23	0.87	34.05	0.63
		(1.53%)	(0.00%)	(0.00%)	(69.22%)	(64.75%)	(84.05%)	(4.94%)	(38.09%)
	T-test	ns	*	ns	ns	ns	**	*	**
LuengHom	Control	0.82	0.62	40.30	0.07	1.73	8.16	32.37	0.44
	Fe+Al	0.15	0.09	39.30	0.01	0.46	1.12	34.19	0.68
		(82.04%)	(85.97%)	(2.48%)	(78.88%)	(73.42%)	(86.30%)	(5.32%)	(35.29%)
	T-test	**	**	ns	**	**	**	**	*
KhaiModRhin 3	Control	0.83	0.63	40.28	0.03	0.88	5.72	32.02	0.56
	Fe+Al	0.58	0.36	30.93	0.01	0.34	0.87	34.98	0.69
		(30.73%)	(42.33%)	(23.22%)	(69.18%)	(61.82%)	(84.76%)	(8.46%)	(18.84%)
	T-test	*	**	ns	ns	ns	**	**	*

หมายเหตุ: ค่าในตารางคำนวณจากค่าเฉลี่ยของธาตุอะลูมิเนียมและเหล็กที่พบในตัวอย่างจำนวน 4 ซ้ำ n=4, ค่า % แสดงถึงเปอร์เซ็นการลดลงของพารามิเตอร์ต่าง ๆ หลังได้รับธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมเทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 5 (ต่อ) ตารางแสดงค่า Chlorophyll fluorescence (F_v/F_m), Photon yield of PSII (Φ_{PSII}), Total chlorophyll contents (TC; mg g^{-1} FW), Stomatal conductance (G_s; mmol H_2O $m^{-2}s^{-1}$), Transpiration rate (E; mmol H_2O $m^{-2}s^{-1}$), Net photosynthesis rate (P_n; mmol $m^{-2}s^{-1}$), Leaf temperature (LT; °C) และ crop water stress index (CWSI) ของข้าว 28 พันธุ์ภายใต้ดินกรดที่มี ปริมาณธาตุเหล็กและธาตุอะลูมิเนียมสูง

Genotypes	Treatments	Fv/Fm	Φ_{PSII}	TC	Gs	E	Pn	LT	CWSI
RD35	Control	0.84	0.65	43.35	0.05	1.23	6.14	32.19	0.55
	Fe+Al	0.72	0.27	35.1	0.01	0.44	1.53	34.79	0.70
		(14.91%)	(57.95%)	(19.03%)	(70.97%)	(63.97%)	(75.06%)	(7.50%)	(21.43%)
	T-test	**	**	**	*	ns	**	**	**
KaoPongKrai	Control	0.83	0.63	37.4	0.03	0.88	4.55	32.22	0.57
	Fe+Al	0.1	0.04	39.65	0.01	0.3	1.41	34.92	0.74
		(87.71%)	(93.62%)	(0.00%)	(70.10%)	(65.43%)	(69.06%)	(7.73%)	(22.97%)
	T-test	**	**	ns	*	*	*	**	**
Nang Mol S4	Control	0.83	0.61	38	0.05	1.22	4.58	31.39	0.43
	Fe+Al	0.65	0.48	38.98	0.02	0.58	1.68	34.74	0.75
		(22.42%)	(21.34%)	(0.00%)	(59.66%)	(52.20%)	(63.28%)	(9.64%)	(42.67%)
	T-test	**	*	ns	*	*	ns	**	**
Pathumthani60	Control	0.80	0.64	41.38	0.03	0.97	3.25	31.91	0.49
	Fe+Al	0.35	0.13	35.13	0.01	0.44	0.68	34.35	0.65
		(56.58%)	(79.34%)	(15.11%)	(59.04%)	(54.51%)	(78.96%)	(7.10%)	(24.62%)
	T-test	**	**	*	*	*	**	**	**
Kalubala	Control	0.70	0.52	47.68	0.06	1.76	7.33	31.17	0.37
	Fe+Al	0.59	0.27	37.85	0.01	0.31	1.32	35.98	0.85
		(14.89%)	(47.39%)	(20.61%)	(85.10%)	(82.69%)	(82.05%)	(13.37%)	(56.47%)
	T-test	ns	*	ns	**	**	**	**	**
NaKwan	Control	0.83	0.67	38.75	0.06	1.70	10.47	31.72	0.36
	Fe+Al	0.47	0.28	35.53	0.01	0.21	1.62	35.44	0.75
		(43.15%)	(58.10%)	(8.32%)	(89.10%)	(87.50%)	(84.53%)	(10.50%)	(51.47%)
	T-test	**	**	ns	**	**	**	**	**
LuengThong	Control	0.84	0.58	39.48	0.04	1.14	7.94	31.90	0.32
	Fe+Al	0.32	0.31	37.05	0.01	0.36	1.62	35.33	0.64
		(61.94%)	(45.50%)	(6.14%)	(71.28%)	(68.41%)	(79.65%)	(9.72%)	(50.00%)
	T-test	**	**	ns	**	**	*	**	**
IR64	Control	0.83	0.62	39.4	0.04	1.16	4.31	32.34	0.45
	Fe+Al	0.78	0.33	37.4	0.03	0.93	3.44	35.39	0.65
		(5.73%)	(46.89%)	(5.08%)	(23.74%)	(19.52%)	(20.15%)	(8.62%)	(30.77%)
	T-test	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	**

หมายเหตุ: ค่าในตารางคำนวณจากค่าเฉลี่ยของธาตุอะลูมิเนียมและเหล็กที่พบในตัวอย่างจำนวน 4 ซ้ำ n=4, ค่า % แสดงถึงเปอร์เซ็นการลดลงของพารามิเตอร์ต่าง ๆ หลังได้รับธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมเทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 5 (ต่อ) ค่า Chlorophyll fluorescence (F_v/F_m), Photon yield of PSII (Φ_{PSII}), Total chlorophyll contents (TC; mg g^{-1} FW), Stomatal conductance (G_s; mmol H_2O $m^{-2}s^{-1}$), Transpiration rate (E; mmol H_2O $m^{-2}s^{-1}$), Net photosynthesis rate (P_n; mmol $m^{-2}s^{-1}$), Leaf temperature (LT; °C) และ crop water stress index (CWSI) ของข้าว 28 พันธุ์ภายใต้ดินกรดที่มี ปริมาณธาตุเหล็กและธาตุอะลูมิเนียมสูง

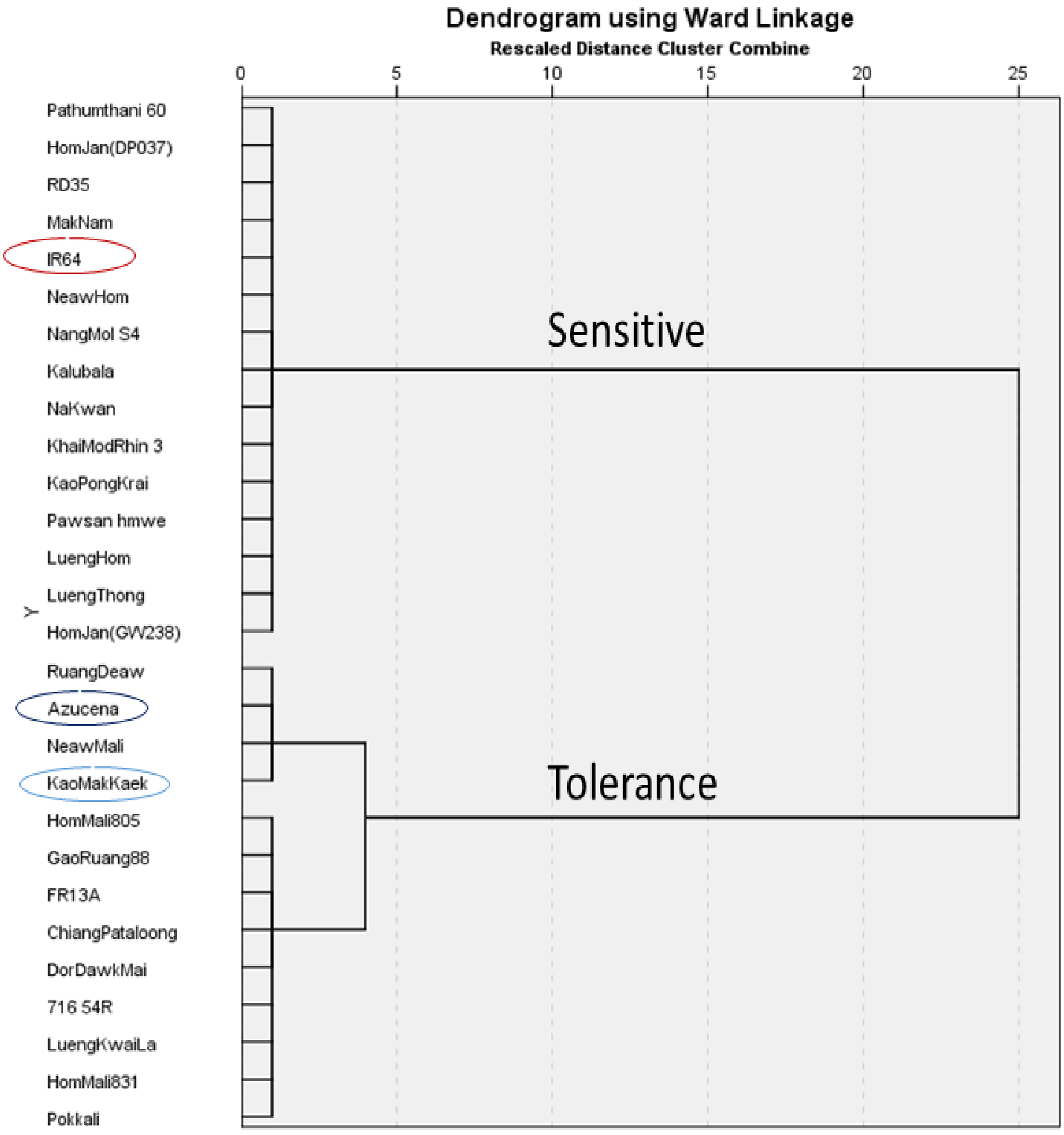
Genotypes	Treatments	Fv/Fm	ΦPSII	TC	Gs	E	Pn	LT	CWSI
Pawsanhmwe	Control	0.83	0.62	39.88	0.03	0.94	4.97	32.10	0.42
	Fe+Al	0.06	0.25	35.3	0.01	0.39	1.61	35.79	0.72
		(92.39%)	(59.03%)	(11.47%)	(61.66%)	(58.02%)	(67.73%)	(10.32%)	(41.67%)
	T-test	** ns		ns	*	*	**	**	**
MakNam	Control	0.82	0.63	44.43	0.05	1.37	6.00	32.34	0.43
	Fe+Al	0.66	0.20	40.23	0.02	0.80	1.49	35.43	0.73
		(19.48%)	(68.47%)	(9.45%)	(46.42%)	(41.53%)	(75.19%)	(8.72%)	(41.09%)
	T-test	**	**	ns	**	**	**	**	**
HomJan	Control	0.82	0.68	40.15	0.06	1.54	9.48	32.05	0.38
(GW238)	Fe+A	0.20	0.22	43.13	0.004	0.13	2.36	35.26	0.73
		(75.32%)	(66.98%)	(0.00%)	(92.69%)	(91.78%)	(75.10%)	(9.10%)	(47.95%)
	T-test	**	ns	ns	**	**	**	**	**
HomJan	Control	0.82	0.61	35.90	0.03	0.83	5.67	32.60	0.44
(DP037)	Fe+Al	0.27	0.21	33.38	0.01	0.42	1.90	34.99	0.75
		(67.00%)	(66.59%)	(7.03%)	(53.56%)	(49.61%)	(66.52%)	(6.83%)	(41.33%)
	T-test	**	**	ns	ns	ns	**	**	**

หมายเหตุ: ค่าในตารางคำนวณจากค่าเฉลี่ยของธาตุอะลูมิเนียมและเหล็กที่พบในตัวอย่างจำนวน 4 ซ้ำ n=4, ค่า % แสดงถึงเปอร์เซ็นการลดลงของพารามิเตอร์ต่าง ๆ หลังได้รับธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมเทียบกับชุดควบคุม

มหาวิทยาลัยศิลปากร

จากการนำข้อมูลของพารามิเตอร์ Chlorophyll fluorescence *(F_v/F_m)*, Photon yield of PSII *(Φ_{PSII})*, Total chlorophyll contents (TC), Stomatal conductance *(g_s)*, Transpiration rate *(E)*, Net photosynthesis rate *(P_n)*, Leaf temperature (LT), crop water stress index (CWSI) และพารามิเตอร์การสะสมอะลูมิเนียม (Al content) ในรากและใบ มาใช้ในการวิเคราะห์และจัดกลุ่มพันธุ์ข้าวด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS และจัดกลุ่มโดยการสร้าง Dendrogram ใช้วิธี Ward Linkage พบว่าสามารถจัดกลุ่มพันธุ์ข้าวได้ดังแสดงในรูปที่ 6 จากแผนผังการจัดกลุ่มพบว่าสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือกลุ่มที่ไม่ทนต่อสภาวะดังกล่าว (Sensitive) และกลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ทนดินกรดที่มีปริมาณธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมเป็นพิษ (Tolerance) โดยในกลุ่มแรกจะพบพันธุ์ข้าวที่ไม่ทนต่อสภาวะดินกรดที่มีธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมเป็นพิษ นั่นคือพันธุ์ IR64 (sensitive plant) และในกลุ่มที่ 2 พบข้าวพันธุ์ Azucena ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ทนต่อสภาวะดังกล่าว จึงทำให้สามารถระบุข้าวพันธุ์ทนและไม่ทนได้ในข้าวทั้ง 28 พันธุ์ จากผลการทดลองพารามิเตอร์ที่แสดงให้เห็นได้ชัดของข้าวทั้ง 2 กลุ่ม คือ การสะสมอะลูมิเนียมในใบ (Al content in shoots) ในกลุ่มไม่ทน (Sensitive) พบการสะสมอะลูมิเนียมในใบน้อยกว่ากลุ่มที่ทน (Tolerance) ในกลุ่มพันธุ์ข้าวที่ทนต่อสภาวะดินกรดที่มีธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมเป็นพิษ จากรูปที่ 6 พบว่าข้าวพันธุ์ RuangDeaw, NeawMali และ KaoMakKaek ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับข้าวพันธุ์ Azucena (tolerance) และเมื่อพิจารณาจากพารามิเตอร์ในตารางที่ 3 พบว่า ข้าวพันธุ์ KaoMakKaek มีการสะสมธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมมากที่สุดในใบ ซึ่งเป็นข้อมูลที่น่าสนใจว่าเพราะเหตุใดข้าวพันธุ์ KaoMakKaek จึงสามารถเก็บสะสมธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมในใบได้มากกว่าข้าวพันธุ์ทนอย่าง Azucena และในสภาวะที่เป็นกรดมีธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมสูงนี้ ข้าวพันธุ์ KaoMakKaek จะมีกลไกการป้องกันตนเองเหมือนหรือต่างจากข้าวพันธุ์ Azucena อย่างไร ผู้วิจัยมีความสนใจและจึงเลือกพันธุ์ข้าว KaoMakKaek นี้เพื่อใช้ศึกษากลไกการป้องกันและลำเลียงต่อไป

มหาวิทยาลัยศิลปากร



รูปที่ 6 แผนผังแสดงการจัดกลุ่มของข้าว 28 พันธุ์ภายใต้ดินกรดที่มีปริมาณธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมสูง

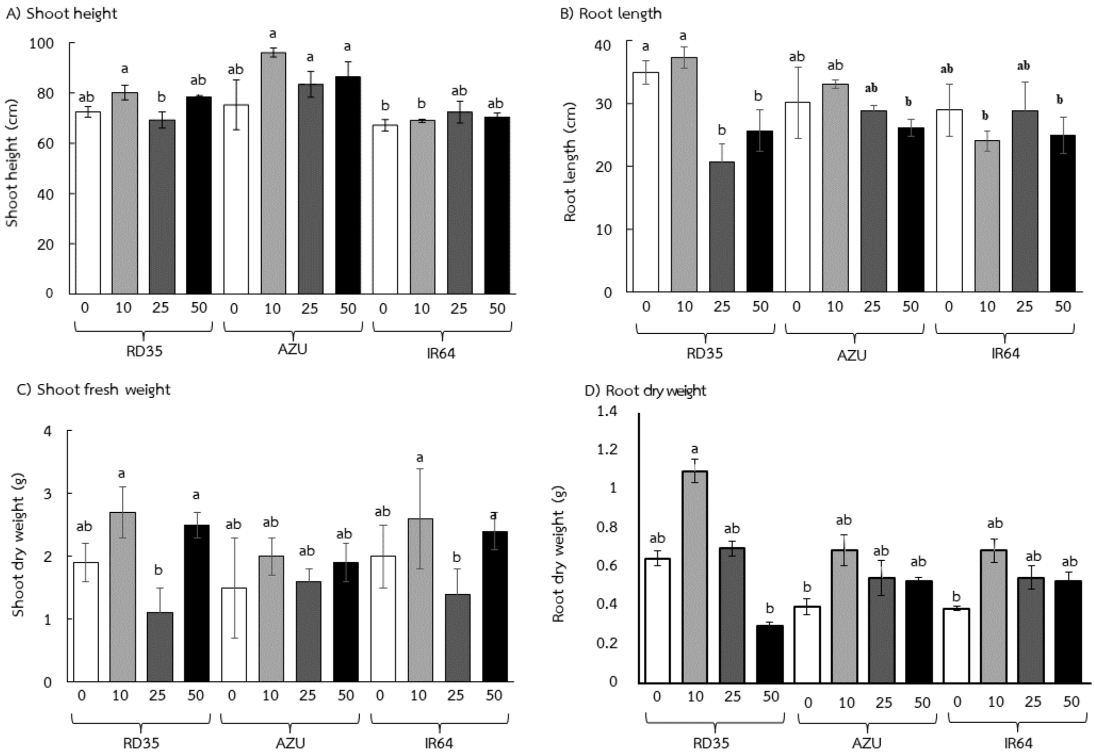
4.2 การทดลองที่ 2 การศึกษากลไกและการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าว 3 พันธุ์ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมเป็นพิษที่ความเข้มข้นสูง

4.2.1. การศึกษาความเป็นพิษของอะลูมิเนียมต่อการเจริญเติบโต การตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีในข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ RD35

4.2.1.1 การเจริญเติบโตของข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ RD35 หลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 10 25 และ 50 มิลลิโมลาร์

การศึกษาความเข้มข้นของอะลูมิเนียมที่ 0, 10, 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองพบว่าในข้าวพันธุ์ RD35 เมื่อได้รับความเข้มข้นอะลูมิเนียมสูงขึ้น ไม่ส่งผลต่อความสูงของต้นข้าว แต่พบการเปลี่ยนแปลงความยาวราก โดยความยาวรากลดลงเท่ากับ 20.8 และ 25.7 เซนติเมตร (ลดลง 40.57% และ 26.57% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม) หลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้นของอะลูมิเนียม 25 มิลลิโมลลาร์ พบว่าน้ำหนักแห้งต้นของข้าวพันธุ์ RD35 มีค่าลดลงเท่ากับ 59.26% และ 56.00% เมื่อเทียบกับที่ระดับความเข้มข้นที่ 10 และ 50 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และในส่วนของน้ำหนักแห้งรากพบว่าไม่มีความแตกต่างในข้าวพันธุ์ RD35 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่หลังจากได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พบว่าค่าน้ำหนักแห้งรากมีค่าลดลง 63.79% เมื่อเทียบกับความเข้มข้นอะลูมิเนียมที่ 10 มิลลิโมลาร์

สำหรับข้าวพันธุ์ Azucena เป็นพันธุ์ที่ทนต่อสภาวะอะลูมิเนียมเป็นพิษได้ดี แต่จากผลการทดลองหลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0, 10, 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงในด้านความสูง ความยากราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้งต้น และน้ำหนักแห้งราก ในขณะเดียวกันพบว่าข้าวพันธุ์ IR64 (Al sensitive) หลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของความสูง ความยาวราก น้ำหนักแห้งต้น และน้ำหนักแห้งรากเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่พบว่าที่ความเข้มขน 25 มิลลิโมลาร์ น้ำหนักแห้งรากของข้าวพันธุ์ IR64 มีค่าลดลงเท่ากับ 46.15% และ 41.66% เมื่อเทียบกับที่ระดับความเข้มข้นของอะลูมิเนียมที่ 10 และ 50 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 กราฟแสดงความสูง (Shoot height) ความยาวราก (Root length) น้ำหนักแห้งต้น (Shoot dry weight) น้ำหนักแห้งราก (Root dry weight) ของข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 หลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 10 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ ข้อมูลนี้ได้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วใน (Phukunkamkaew et al., 2021)

4.2.1.2 การตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ RD35 หลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 10 25 และ 50 มิลลิโมลาร์

เมื่อข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 ได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 14 วัน ผลการทดลองในข้าวพันธุ์ RD35 หลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิใบเท่ากับ 34.46°C และพบว่าค่า crop water stress index (CWSI) มีค่าเท่ากับ 0.60 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของอะลูมิเนียมไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของทำงานของระบบแสงสอง (photon yield of PSII; Φ_{PSII}) จึงไม่พบการเปลี่ยนแปลงในข้าวพันธุ์ RD35 ในขณะเดียวกันพบว่าค่าการเปิดปิดปากใบ (g_s) มีการเปลี่ยนแปลงหลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ข้าวพันธุ์ RD35 มีการปิดปากใบมากถึง 69.38% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม การปิดปากใบที่มากขึ้นส่งผลให้อัตราการคายน้ำ (E) ลดลง ข้าวพันธุ์ RD35 พบว่าอัตราการคายน้ำลดลงภายใต้อะลูมิเนียมความเข้มข้น 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีค่าลดลง

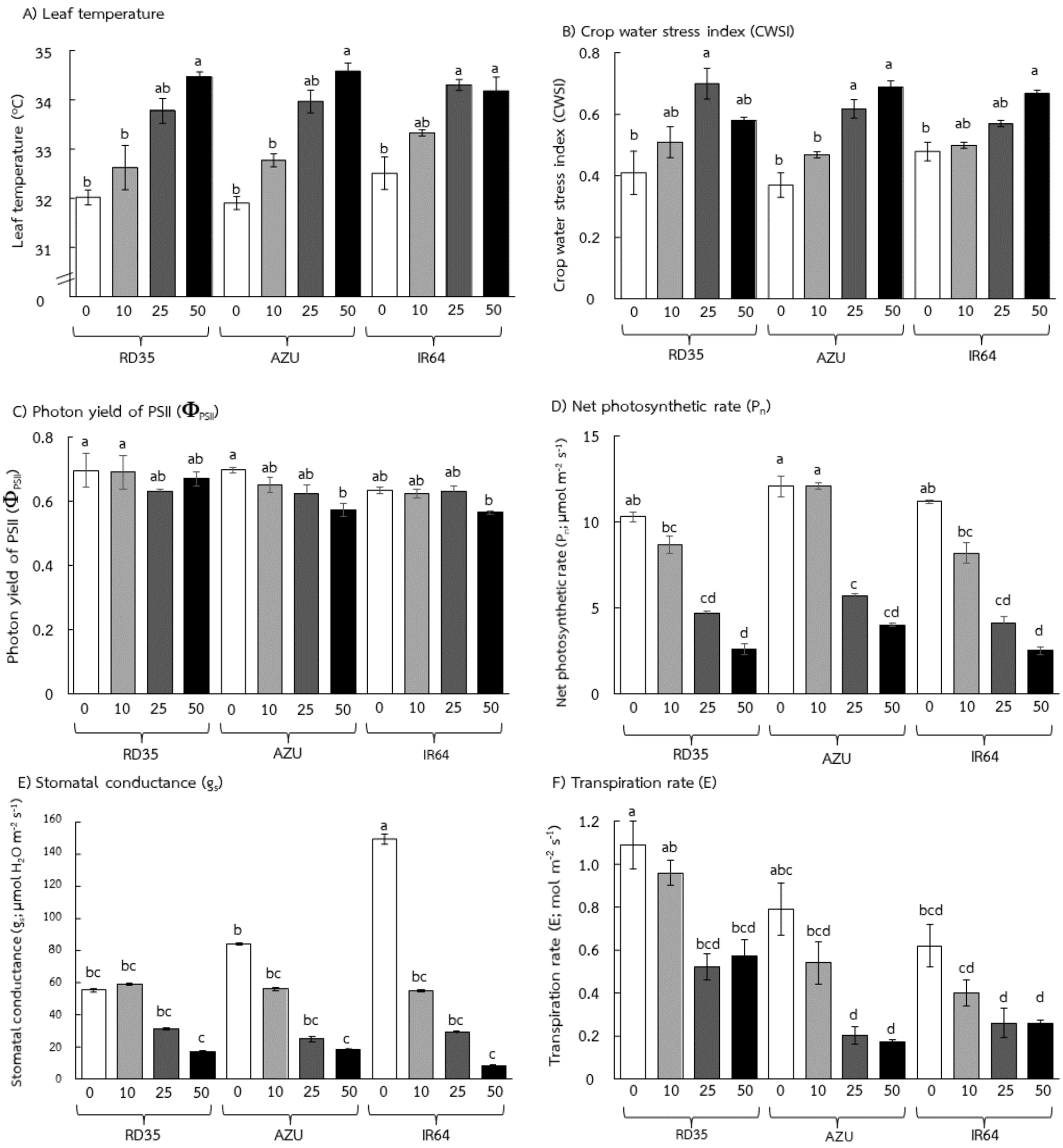
52.29% และ 47.71% และส่งผลทำให้ค่าอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงลดลงเหลือ 4.7 และ 2.6 μmol $m^{-2}s^{-1}$ และในส่วนของความเขียวของใบข้าว (SPAD) หลังได้รับผลกระทบจากอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเขียวของใบลดลง 18.3% เทียบกับชุดควบคุม แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่า maximum quantum yield of PSII (F_v/F_m) หลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ในส่วนของข้าวพันธุ์ Azucena (Al tolerance) การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาหลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ผลการทดลองพบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่า F_v/F_m แต่ในขณะที่การทำงานของระบบแสงสอง (Φ_{PSII}) มีค่าลดลง 17.77% หลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในส่วนของความเขียวของใบข้าว (SPAD) ได้รับผลกระทบจากอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 10 และ 25 มิลลิโมลาร์ โดยมีค่าความเขียวของใบเพิ่มขึ้น 33.21% และ 33.95% เทียบกับชุดควบคุม และที่ความเข้มข้นอะลูมิเนียมที่ 50 มิลลิโมลาร์ พบว่า Azucena มีอุณหภูมิในใบที่เพิ่มขึ้นเป็น 34.58°C ทำให้ค่า CWSI มีค่า 0.62 และ 0.69 หลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เมื่อใบข้าวมีอุณหภูมิสูงขึ้นจะส่งผลกระทบต่อการสังเคราะห์แสง จากผลการทดลองพบว่าอัตราการสังเคราะห์แสง (P_n) ของ Azucena มีค่าลดลงที่ความเข้มข้นอะลูมิเนียม 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ โดยลดลงเหลือ 5.7 และ 4.0 μmol $m^{-2}s^{-1}$ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับค่าการปิดปากใบที่พบว่ามีการปิดปากใบมากขึ้น 78.78% ในข้าวพันธุ์ Azucena หลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และค่าอัตราการคายน้ำที่ลดลง 74.68% และ 78.48% หลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

การตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าวพันธุ์ IR64 (Al sensitive) หลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ F_v/F_m และการทำงานของระบบแสงสอง (Φ_{PSII}) ในส่วนของความเขียวของใบข้าว (SPAD) พบว่าที่ความเข้มข้นของอะลูมิเนียม 25 มิลลิโมลาร์ ค่าความเขียวของใบเพิ่มขึ้น 34.25% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และพบอุณหภูมิใบเพิ่มขึ้นหลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ มีค่าเท่ากับ 34.30°C และ 34.20°C ตามลำดับ และสอดคล้องกับค่า CWSI ที่เพิ่มสูงขึ้นหลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ มีค่าเท่ากับ 0.67 และที่ความเข้มข้นของอะลูมิเนียมที่สูงขึ้นส่งผลต่ออัตราการสังเคราะห์แสง (P_n) โดยพบว่าในข้าวพันธุ์ IR64 พบอัตราการสังเคราะห์แสงที่ลดลงเหลือ 4.1 และ 2.5 μmol $m^{-2}s^{-1}$ หลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับค่าอัตราการปิดปากใบมีค่าลดลง 63.45%, 80.48% และ 94.50% ตามลำดับ หลังจากได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ แต่ในทางตรงข้ามพบว่าอัตราการคายน้ำของข้าวพันธุ์ IR64 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้นต่างๆ (ตารางที่ 6 และรูปที่ 8)

ตารางที่ 6 ค่า Leaf greenness (SPAD) และ chlorophyll fluorescence (F_v /F_m) ของข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 หลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 10 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน ข้อมูลนี้ได้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วใน (Phukunkamkaew et al., 2021)

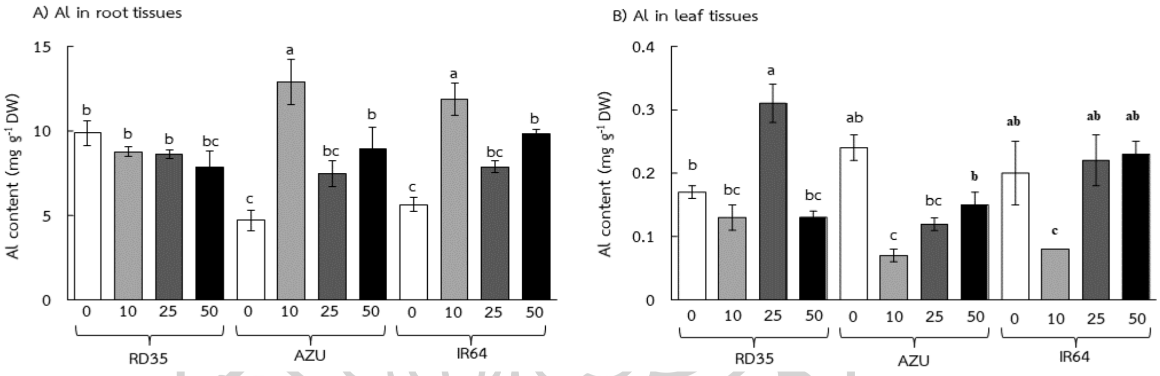
Var	Al (mM)	Leaf greenness (SPAD)	F_v/F_m
RD35	0	37.7±0.3a	0.833±0.010
	10	34.7±0.6ab	0.830±0.009
	25	32.6±1.3abc	0.816±0.005
	50	30.8±1.9bc	0.833±0.005
AZU	0	26.8±1.9c	0.839±0.005
	10	35.7±0.3a	0.846±0.006
	25	35.9±0.7a	0.847±0.008
	50	32.3±1.1abc	0.842±0.004
IR64	0	25.4±1.5c	0.832±0.006
	10	32.2±0.4abc	0.826±0.004
	25	34.1±1.4ab	0.840±0.004
	50	30.1±1.7bc	0.820±0.008
Significant level			
Var		*	ns
Al		**	ns
Var × Al		*	ns



รูปที่ 8 กราฟแสดงค่า A) Leaf temperature, B) Crop water stress index, C) Photon yield of PSII (F_{PSII}), D) Net photosynthetic rate (P_n), E) Stomatal conductance (g_s) และ F) Transpiration rate (E) ของข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 หลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 10 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน ข้อมูลนี้ได้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วใน (Phukunkamkaew et al, 2021)

4.2.1.3 การสะสมของธาตุอะลูมิเนียมในข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ RD35 หลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 10 25 และ 50 มิลลิโมลาร์

เมื่อข้าวทั้ง 3 พันธุ์อยู่ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 14 วัน ผลการทดลองพบว่าปริมาณการสะสมของธาตุอะลูมิเนียมในเซลล์รากและใบมีปริมาณการสะสมที่สูงขึ้น การสะสมธาตุอะลูมิเนียมในเซลล์รากของข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 มีปริมาณการสะสมอะลูมิเนียมสูงที่สุดภายใต้อะลูมิเนียมความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ มีการสะสมสูงถึง 2.04 เท่า (9.88 mg g^{-1}), 2.74 เท่า (12.86 mg g^{-1}) และ 2.10 เท่า (11.85 mg g^{-1}) ตามลำดับเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่การสะสมอะลูมิเนียมที่ใบข้าวผลการทดลองพบว่าสะสมมากที่สุดในข้าวพันธุ์ RD35 มีค่าเท่ากับ 4.43 เท่า (0.31 mg g^{-1}) ภายใต้อะลูมิเนียมความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในทางตรงข้าม ข้าวพันธุ์ Azucena และ IR64 ภายใต้ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พบว่าธาตุอะลูมิเนียมสะสมที่ใบเท่ากับ 3.75 และ 4.40 เท่า (0.15 mg g^{-1} และ 0.23 mg g^{-1} ตามลำดับเมื่อเทียบกับชุดควบคุม) (รูปที่ 9)



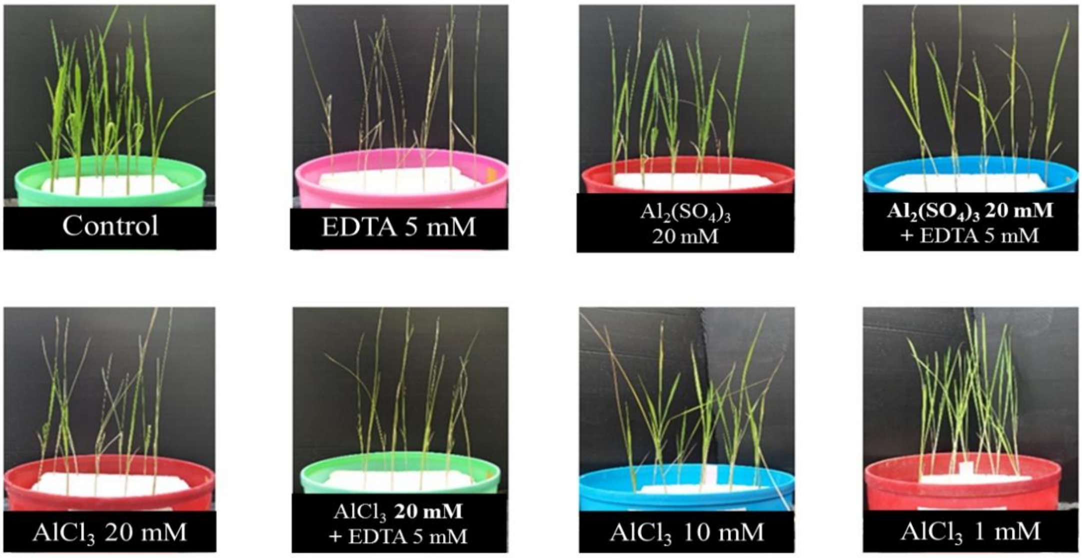
รูปที่ 9 กราฟแสดงค่า Al content ในรากและใบของข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 หลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 10 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน ข้อมูลนี้ได้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วใน (Phukunkamkaew et al, 2021)

จากการศึกษาในงานวิจัยอื่นๆ พบว่าอะลูมิเนียมที่ใช้ในการทดสอบส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปแบบของ $Al_2(SO_4)_3$ และ $AlCl_3$ และรูปแบบการทดลองมีทั้งที่เป็นการทดลองในระบบไฮโดรโปรนิก และระบบที่ใช้ดินในการปลูก ซึ่งมีปัจจัยหลายอย่างที่ส่งผลต่อการละลายของอะลูมิเนียม ผู้วิจัยมีความสนใจว่ารูปแบบของอะลูมิเนียมรูปแบบใดที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษมากกว่ากัน ดังนั้นจึงทำงานทดลองต่อไปในหัวข้อที่ 4.2.2

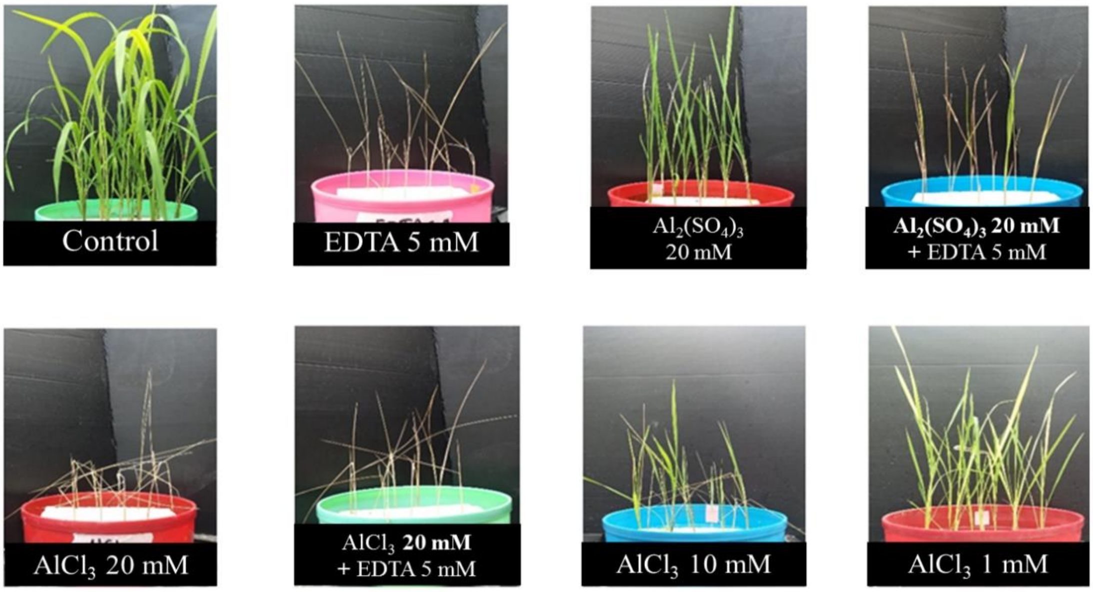
4.2.2 การศึกษาความเป็นพิษของอะลูมิเนียมในรูปของ $Al_2(SO_4)_3$ และ $AlCl_3$ ในสภาวะที่เป็นกรด

4.2.2.1 การเจริญเติบโตของข้าวหลังได้รับอะลูมิเนียมในรูปของ $Al_2(SO_4)_3$ และ $AlCl_3$ ในสภาวะที่เป็นกรด

จากการทดลองปลูกข้าวในสารละลายชุดการทดลองต่างๆ ที่มีรูปแบบของอะลูมิเนียมที่ต่างกันดังนี้ Control, 5 mM EDTA, 20 mM $Al_2(SO_4)_3$, 20 mM $Al_2(SO_4)_3$ + 5 mM EDTA, 1 mM $AlCl_3$, 10 mM $AlCl_3$, 20 mM $AlCl_3$, 20 mM $AlCl_3$ + 5 mM EDTA ทุกชุดการทดลองปรับ pH 4.5 ผลการศึกษาพบว่าเมื่อผ่านไป 7 วันหลังการทดลอง ชุดการทดลองควบคุมต้นกล้าข้าวเจริญเติบโตได้ดี ส่วนชุดการทดลองที่ใส่ EDTA 5 มิลลิโมลาร์ ต้นกล้าข้าวมีลักษณะเหี่ยวแห้งและตาย ในขณะที่สารละลายความเข้มข้น $Al_2(SO_4)_3$ 20 มิลลิโมลาร์ พบว่าปลายใบของต้นกล้าข้าวมีลักษณะซีดขาว และเหี่ยวเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่เมื่อเปรียบเทียบชุดการทดลองที่ใส่ $Al_2(SO_4)_3$ 20 มิลลิโมลาร์ + EDTA 5 มิลลิโมลาร์ ลักษณะต้นข้าวไม่แตกต่างกัน ผลการทดลองในชุดการทดลองที่ใส่ $AlCl_3$ 20 มิลลิโมลาร์ ลักษณะต้นและใบข้าวเล็ก ปลายใบซีดขาว ซึ่งเหมือนกันกับลักษณะของข้าวในชุดการทดลอง $AlCl_3$ 20 มิลลิโมลาร์ + EDTA 5 มิลลิโมลาร์ เมื่อลดความเข้มข้นของ $AlCl_3$ เป็น 10 และ 1 มิลลิโมลาร์ พบว่าปลายใบของต้นกล้าข้าวมีสีน้ำตาลและเหี่ยวที่ความเข้มข้น $AlCl_3$ 10 มิลลิโมลาร์ ส่วนที่ความเข้มข้น $AlCl_3$ 1 มิลลิโมลาร์ ลักษณะต้นกล้าข้าวเล็กไม่แตกใบอ่อนและเจริญเติบโตได้ไม่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน ผลการทดลองการเจริญเติบโตของข้าวในชุดการทดลองที่ใส่ EDTA 5.0 มิลลิโมลาร์ ต้นกล้าข้าวมีลักษณะเหี่ยวแห้งและตาย ในขณะที่การทดลองชุด $Al_2(SO_4)_3$ ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พบว่าปลายใบของต้นกล้าข้าวมีลักษณะซีดขาว และเหี่ยวเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ชุดการทดลอง $Al_2(SO_4)_3$ 20.0 มิลลิโมลาร์ + EDTA 5.0 มิลลิโมลาร์ ลักษณะต้นข้าวเหี่ยวแห้งและตาย ในส่วนของชุดการทดลองที่ใส่ $AlCl_3$ ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองเหมือนกับชุดการทดลองที่ใส่ $AlCl_3$ 20 มิลลิโมลาร์ผสมกับ EDTA 5 มิลลิโมลาร์ โดยต้นข้าวมีลักษณะซีดขาวและแห้งตาย และเมื่อลดความเข้มข้นของ $AlCl_3$ เหลือ 10 และ 1 มิลลิโมลาร์ พบว่าหลังจากได้รับ $AlCl_3$ 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน ลักษณะของใบข้าวเหี่ยวและปลายใบหัก ต้นข้าวไม่แตกใบอ่อนเพิ่ม และบางต้นตาย ในขณะที่ความเข้มข้น $AlCl_3$ 1 มิลลิโมลาร์ พบว่าต้นข้าวมีลักษณะปลายใบเหลือง และพบลักษณะของใบที่เล็กและมีสีเหลืองที่ปลายใบเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 10 และ 11)



รูปที่ 10 ลักษณะของต้นกล้าข้าวหอมนิลหลังการทดสอบด้วย EDTA 5 mM, $Al_2(SO_4)_3$ 20 mM, $Al_2(SO_4)_3$ 20 mM + EDTA 5 mM, $AlCl_3$ 20 mM, $AlCl_3$ 20 mM + EDTA 5 mM, $AlCl_3$ 10 mM และ $AlCl_3$ 1 mM เป็นเวลา 7 วัน



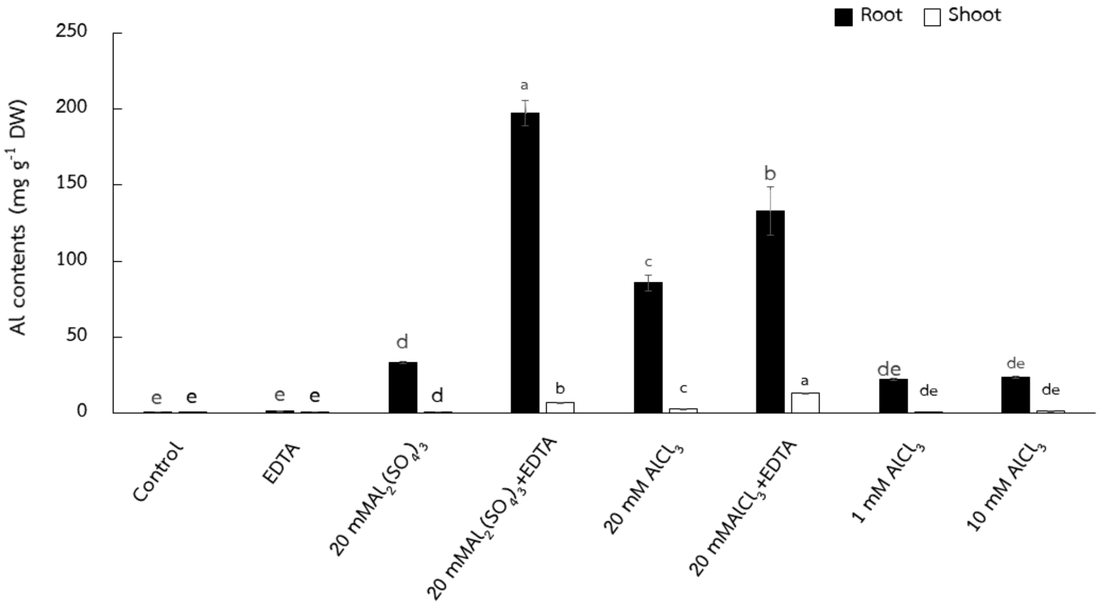
รูปที่ 11 ลักษณะของต้นกล้าข้าวหอมนิลหลังการทดสอบด้วย EDTA 5 mM, $Al_2(SO_4)_3$ 20 mM, $Al_2(SO_4)_3$ 20 mM + EDTA 5 mM, $AlCl_3$ 20 mM, $AlCl_3$ 20 mM + EDTA 5 mM, $AlCl_3$ 10 mM และ $AlCl_3$ 1 mM เป็นเวลา 14 วัน

4.2.2.2 การสะสมของธาตุอะลูมิเนียมในข้าวหลังได้รับอะลูมิเนียมในรูปของ $Al_2(SO_4)_3$ และ $AlCl_3$ ในสภาวะที่เป็นกรด

เมื่อตรวจสอบปริมาณอะลูมิเนียมในรากและใบของต้นกล้าข้าว เมื่อได้รับ $Al_2(SO_4)_3$, $AlCl_3$, EDTA และ Al-EDTA ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 14 วัน พบว่าเมื่อใส่ EDTA ลงไปในสารละลายที่มีอะลูมิเนียมทำให้มีปริมาณอะลูมิเนียมสะสมมากขึ้นในราก โดยพบมากในชุดการทดลองที่ใส่ $Al_2(SO_4)_3$ 20 มิลลิโมลาร์ + EDTA 5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีปริมาณการสะสมอะลูมิเนียมในรากมากถึง 200 มิลลิกรัม/กรัม และรองลงมาพบมากในชุดการทดลอง $AlCl_3$ 20 มิลลิโมลาร์ + EDTA 5 มิลลิโมลาร์ มีปริมาณอะลูมิเนียมสะสม 150 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ และในชุดการทดลองที่ไม่ได้เติม EDTA ได้แก่ ชุดการทดลอง $Al_2(SO_4)_3$ 20 มิลลิโมลาร์, $AlCl_3$ 20 มิลลิโมลาร์, $AlCl_3$ 10.0 มิลลิโมลาร์ และ 1.0 มิลลิโมลาร์ มีปริมาณอะลูมิเนียมสะสมในราก 40, 90, 30 และ 30 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (รูปที่ 12)

รูปแบบของอะลูมิเนียมที่แตกต่างกันส่งผลกระทบต่อต้นกล้าข้าวด้านการตอบสนองทางสรีรวิทยาต่างกัน โดยรูปแบบ $AlCl_3$ ก่อให้เกิดความเป็นพิษมากกว่ารูปแบบ $Al_2(SO_4)_3$ และที่ความเข้มข้นของ $AlCl_3$ 1.0 มิลลิโมลาร์ เป็นระดับความเข้มข้นที่เริ่มก่อให้เกิดความเป็นพิษในต้นกล้าข้าว ส่วน EDTA เป็นคีเลตที่ช่วยกระตุ้นให้พืชสามารถดูดซับธาตุโลหะหนักเข้าไปในรากได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกความเข้มข้นของ $AlCl_3$ ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ไปใช้ในการศึกษาการตอบสนองของต้นกล้าข้าวต่อระดับความเข้มข้นของอะลูมิเนียมในข้าวพันธุ์มาตรฐาน จำนวน 3 พันธุ์ต่อไป

มหาวิทยาลัยศิลปากร



รูปที่ 12 กราฟแสดง Al content ในรากและใบของต้นกล้าข้าวหอมนิล เมื่อได้รับ EDTA 5 mM, $Al_2(SO_4)_3$ 20 mM, $Al_2(SO_4)_3$ 20 mM + EDTA 5 mM, $AlCl_3$ 20 mM, $AlCl_3$ 20 mM + EDTA 5 mM, $AlCl_3$ 10 mM และ $AlCl_3$ 1 mM เป็นเวลา 14 วัน

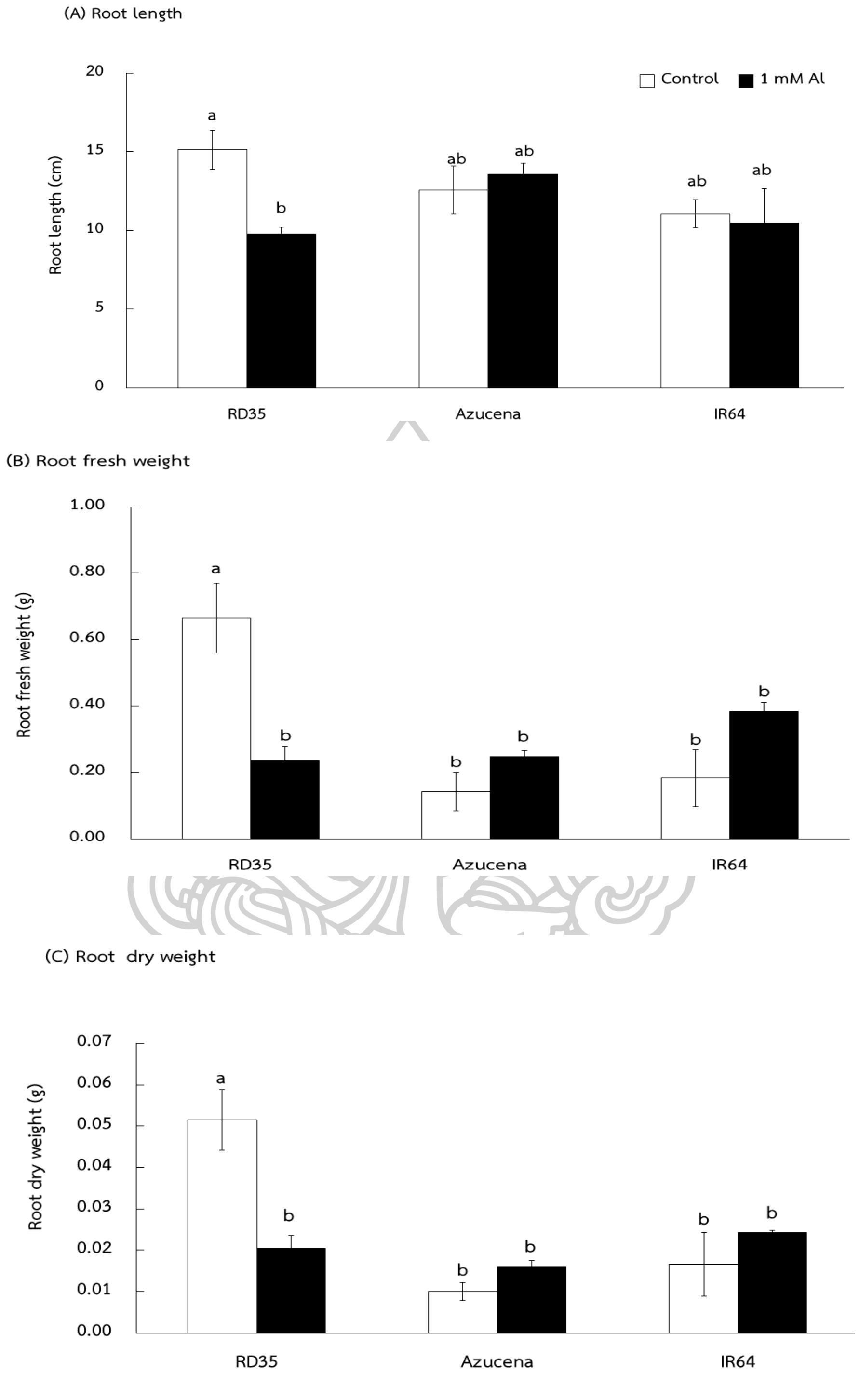
4.2.3 การศึกษาความเป็นพิษของ $AlCl_3$ ต่อการเจริญเติบโต การตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีในข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 ที่ทนดินกรดต่างกัน

4.2.3.1 การเจริญเติบโตในข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 หลังได้รับ $AlCl_3$ ที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์

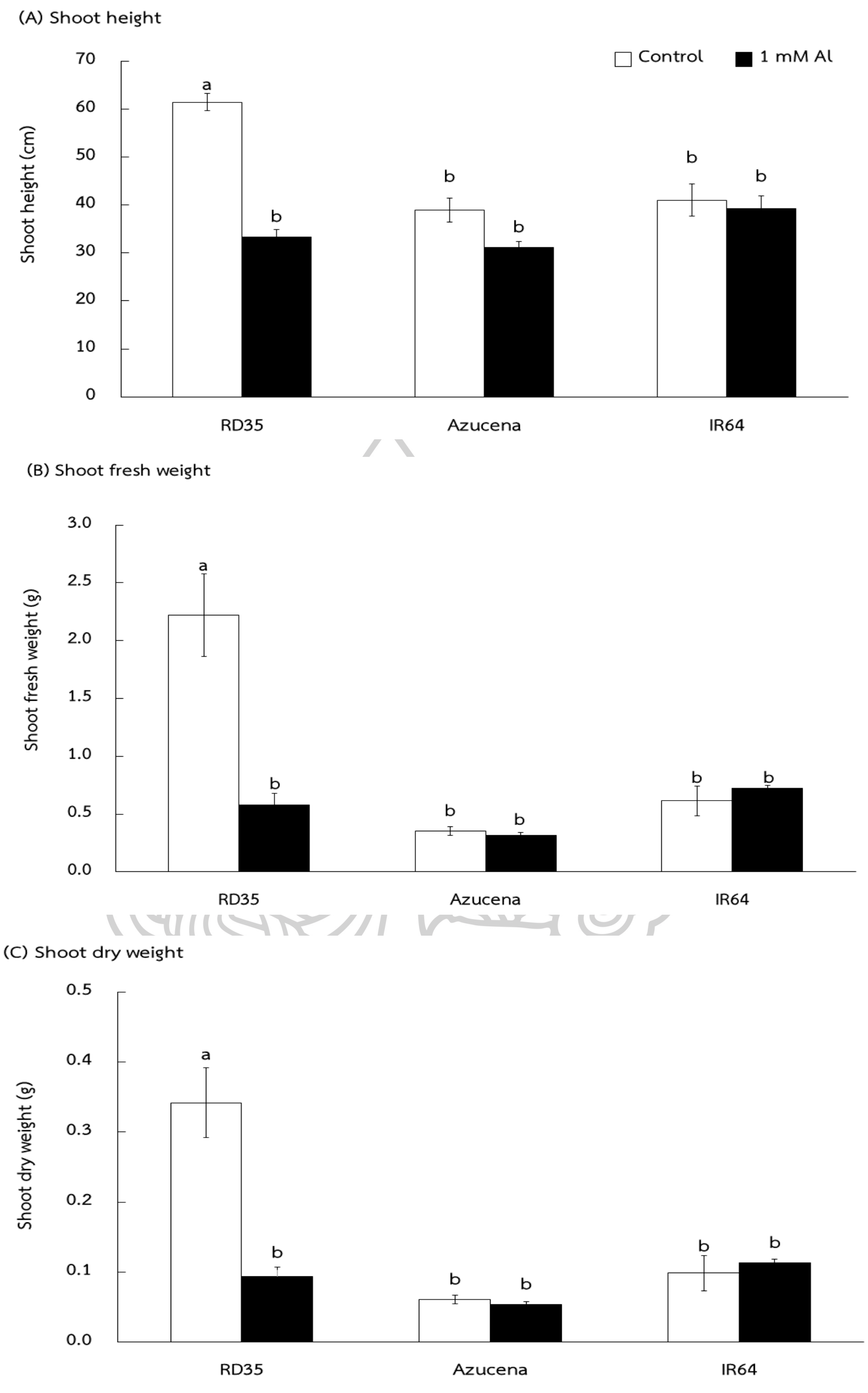
ปริมาณ $AlCl_3$ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้การเจริญเติบโตในข้าวบางพันธุ์ลดลง โดยในข้าวพันธุ์ RD35 พบการเจริญเติบโต เช่น ความยาวราก ความสูง และชีวมวล (biomass) ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ความยาวรากที่ลดลงในข้าวพันธุ์ RD35 ลดลง 1.55 เท่า ในขณะที่ข้าวพันธุ์ Azucena และ IR64 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 13) ความยาวรากที่ลดลงของข้าวพันธุ์ RD35 สัมพันธ์กับการลดลงของ biomass รากพืช โดยพบว่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งรากนั้นมีค่าลดลง โดยค่าน้ำหนักสดรากหลังได้รับอะลูมิเนียมเป็นเวลา 2 สัปดาห์มีค่าเท่ากับ 0.23 กรัม (2.87 เท่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุม) ในขณะเดียวกันน้ำหนักแห้งรากของข้าวพันธุ์ RD35 ลดลงเหลือ 0.02 กรัม (2.50 เท่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุม) ในทางตรงกันข้ามกลับพบว่าข้าวพันธุ์ Azucena และ IR64 ไม่พบการเปลี่ยนเปลงของน้ำหนักสด-แห้งของราก ซึ่งสอดคล้องกับความ

ยาวรากที่ไม่เปลี่ยนแปลง (รูปที่ 13) รากพืชเป็นส่วนสำคัญในการดูดซับน้ำและธาตุอาหารในดินเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต แต่เมื่อได้รับอะลูมิเนียมอาจส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงและดูดซับน้ำและแร่ธาตุได้ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวนั้นสอดคล้องกับการเจริญเติบโตในด้านความสูงของพืช ซึ่งพบว่าเมื่อได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ข้าวพันธุ์ RD35 แสดงให้เห็นถึงการลดลงของความสูงได้อย่างชัดเจน จากรูปที่ 14 พบว่าความสูงของพืชนั้นลดลงเท่ากับ 33.25 เซนติเมตร (1.85 เท่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุม) ความสูงที่ลดลงของข้าวพันธุ์ RD35 นั้น ส่งผลต่อค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งต้นทำให้มีค่าลดลงเช่นกัน โดยค่าน้ำหนักสดต้นลดลงเท่ากับ 0.58 กรัม ลดลงมากถึง 3.83 เท่าของชุดควบคุม ในทางเดียวกันน้ำหนักแห้งลดลงถึง 3.77 เท่า (0.09 กรัม) และในส่วนของข้าวพันธุ์ Azucena และ IR64 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในด้านความสูงและน้ำหนักของต้น จากผลการทดลองด้านการเจริญเติบโตพบว่าข้าวพันธุ์ RD35 มีการเจริญเติบโตที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัดหลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (รูปที่ 14)

มหาวิทยาลัยศิลปากร



รูปที่ 13 กราฟแสดงความยาวราก (A) น้ำหนักสดราก (B) และน้ำหนักแห้งราก (C) ของข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ RD35, Azucena และ IR64 ภายใต้สภาวะ $AlCl_3$ ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์ ข้อมูลนี้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วใน (Phukunkamkaew et al., 2023)

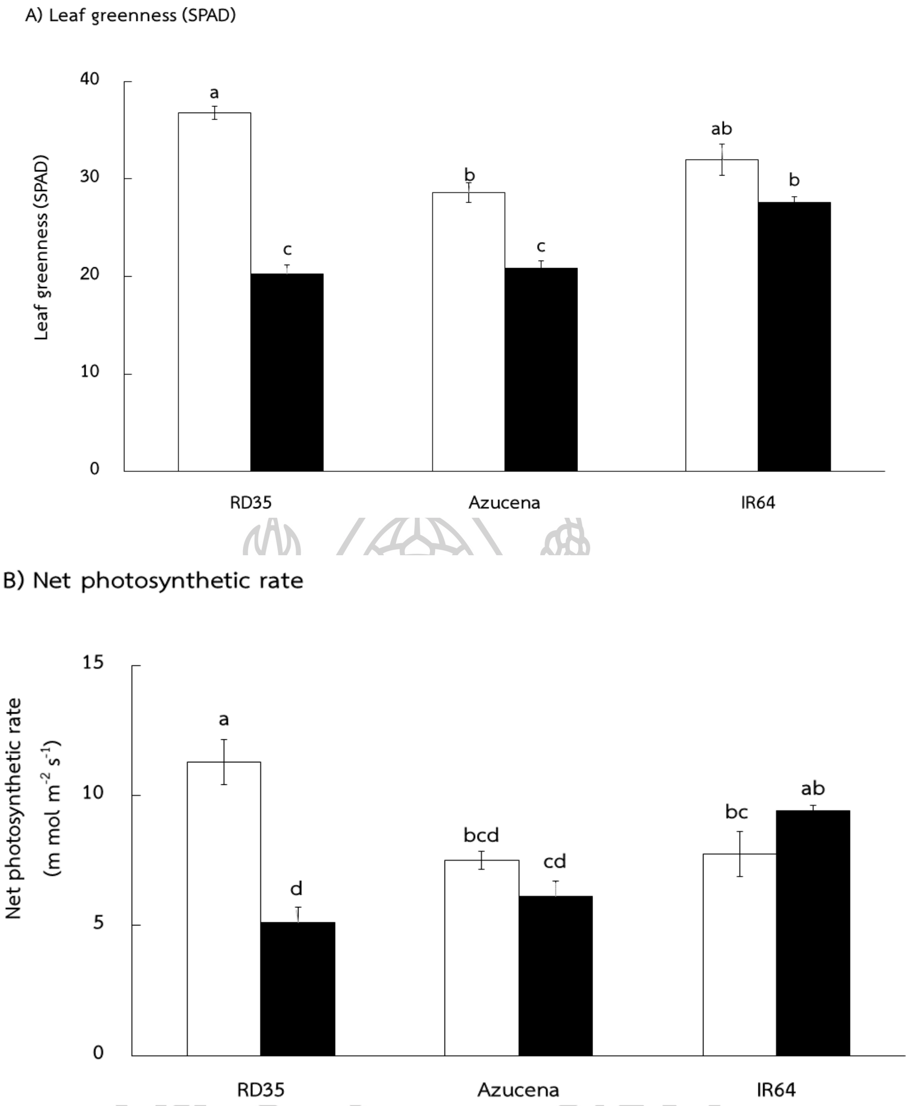


รูปที่ 14 กราฟแสดงความสูงต้น (A) น้ำหนักสดต้น (B) และน้ำหนักแห้งต้น (C) ของข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ RD35, Azucena และ IR64 ภายใต้สภาวะ $AlCl_3$ ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์ ข้อมูลนี้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วใน (Phukunkamkaew et al, 2022)

4.2.3.2 การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของข้าวหลังได้รับ $AlCl_3$ ที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์

การเปลี่ยนแปลงของข้าว 3 พันธุ์แสดงให้เห็นได้ชัดเจนในด้านการเจริญเติบโต ในส่วนของการตอบสนองทางสรีรวิทยามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น โดยพบว่าค่าความเขียวของใบ (SPAD) ลดลงในข้าวพันธุ์ RD35 และ Azucena แต่ไม่พบความแตกต่างของพันธุ์ IR64 ข้าวพันธุ์ RD35 พบค่าความเขียวลดลงเท่ากับ 20.25 หรือลดลง 1.81 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งพบว่ามีค่าลดลงมากกว่าพันธุ์ Azucena ที่มีค่าความเขียวเท่ากับ 20.80 หลังจากได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ค่าความเขียวที่ลดลงสอดคล้องกับอัตราการสังเคราะห์แสงที่ลดลงในข้าวพันธุ์ RD35 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.12 µmol $m^{-2}s^{-1}$ (2.20 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม) แต่ในข้าวพันธุ์ Azucena อัตราการสังเคราะห์แสงไม่สอดคล้องกับค่าความเขียวของใบที่ลดลง ในขณะที่พันธุ์ IR64 พบว่าอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ไม่ส่งผลต่อการตอบสนองต่ออัตราการสังเคราะห์แสง (รูปที่ 15) ในส่วนของพารามิเตอร์อื่นที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางสรีรวิทยา ได้แก่ ค่า F_v/F_m, การรับส่งอิเล็คตรอนในระบบแสงสอง (Φ_{PSII}), ค่าการเปิด-ปิดปากใบ (g_s) และอัตราการคายน้ำ (E) ซึ่งไม่พบความแตกต่างกันในระหว่างพันธุ์ และที่ความเข้มข้นของอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ดังกล่าว (ตารางที่ 7)

มหาวิทยาลัยศิลปากร



รูปที่ 15 กราฟแสดง (A) ค่าความเขียวของใบ (SPAD) และ (B) ค่าอัตราการสังเคราะห์แสง (P_n) ของข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์ ข้อมูลนี้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วใน (Phukunkamkaew et al, 2022)

ตารางที่ 7 ค่า Chlorophyll fluorescence (F_v/F_m), การรับส่งอิเล็คตรอนในระบบแสงสอง (Φ_{PSII}), ค่าการเปิด-ปิดปากใบ (g_s) และอัตราการคายน้ำ (E) ของข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์ ข้อมูลนี้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วใน (Phukunkamkaew et al, 2022)

Var	Al (mM)	F_v/F_m	Φ_{PSII}	g_s	E
RD35	0	0.866±0.003	0.691±0.009	0.076±0.014	0.977±0.171
	1	0.826±0.041	0.531±0.057	0.107±0.036	1.481±0.377
Azucena	0	0.874±0.003	0.719±0.012	0.079±0.018	1.016±0.234
	1	0.814±0.022	0.659±0.025	0.101±0.031	1.422±0.364
IR64	0	0.865±0.003	0.664±0.016	0.051±0.003	0.678±0.032
	1	0.748±0.101	0.541±0.121	0.040±0.007	0.648±0.102
Significant					
level		ns	ns	ns	ns
Var		ns	ns	ns	ns
Al		ns	ns	ns	ns
Var × Al					

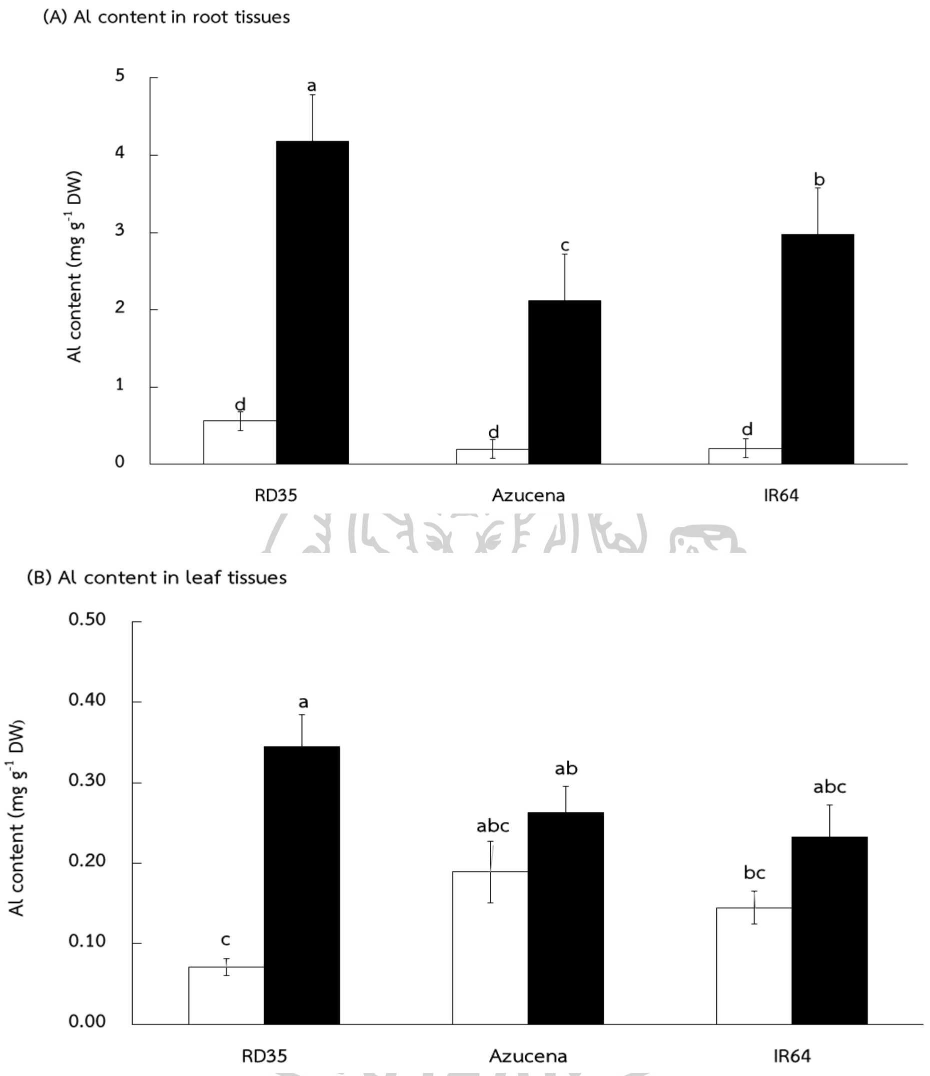
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโต โดยยับยั้งการเจริญของรากและใบ ทำให้ชีวมวลของพืชลดลง นอกจากนี้ยังส่งผลต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยา ทำให้กระบวนการสังเคราะห์แสงลดลง พืชจึงไม่สามารถสร้างพลังงานเพื่อมาใช้ในการเจริญเติบโตได้ การตอบสนองดังกล่าวพบในข้าวพันธุ์ RD35 ในขณะที่ข้าวพันธุ์ Azucena และ IR64 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา หลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ แสดงให้เห็นว่าข้าวพันธุ์ Azucena และ IR64 น่าจะทนต่อ 1 mM $AlCl_3$ ได้ดีกว่าข้าวพันธุ์ RD35

4.2.3.3 การสะสมอะลูมิเนียมของข้าวหลังได้รับ $AlCl_3$ ที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์

ผลการศึกษาปริมาณอะลูมิเนียมที่สะสมในข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์ พบว่าในเซลล์รากของข้าวทั้ง 3 พันธุ์ มีปริมาณอะลูมิเนียมเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ในข้าวพันธุ์ RD35 พบอะลูมิเนียม 4.18 mg g^{-1}DW ข้าวพันธุ์ Azucena พบ 2.12 mg g^{-1}DW และข้าวพันธุ์ IR64 พบ 2.98 mg g^{-1}DW (7.46, 11.16 และ 14.19 เท่าตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม) ปริมาณอะลูมิเนียมที่พบในเซลล์รากในข้าวพันธุ์ IR64 พบว่ามีปริมาณการเพิ่มขึ้นมากกว่าข้าวพันธุ์ RD35 และ Azucena โดยเพิ่มสูงถึง 14.19 เท่า (รูปที่ 16) นอกจากปริมาณอะลูมิเนียมที่พบในเซลล์รากแล้ว ยังพบปริมาณอะลูมิเนียมที่สะสมที่ใบ โดยพบว่าข้าวทั้ง 3 พันธุ์มีเพียงข้าวพันธุ์ RD35 ที่พบปริมาณอะลูมิเนียมเพิ่มสูงขึ้น 0.37 mg g^{-1}DW (4.86 เท่า) ในขณะที่ข้าวพันธุ์ Azucena และ IR64 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของปริมาณอะลูมิเนียมที่พบในใบ

ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าข้าวทั้ง 3 พันธุ์มีความสามารถในการดูดซับและเก็บสะสมอะลูมิเนียมในรากและใบต่างกัน ปริมาณการสะสมของอะลูมิเนียมนั้นส่งผลต่อการเจริญเติบโต การตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าวแตกต่างกันออกไปในแต่ละพันธุ์ข้าว ในการศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงทางด้านการเจริญเติบโต และสรีรวิทยาของข้าวหลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ผู้วิจัยจึงเลือกความเข้มข้นของอะลูมิเนียมที่ 1 มิลลิโมลาร์ นำไปใช้ในการทดลองส่วนที่ 3 การศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยา ชีวเคมีและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในข้าวพันธุ์ไทยที่ทนต่อสภาวะดินกรดที่มีปริมาณอะลูมิเนียมสูงต่อไป

มหาวิทยาลัยศิลปากร

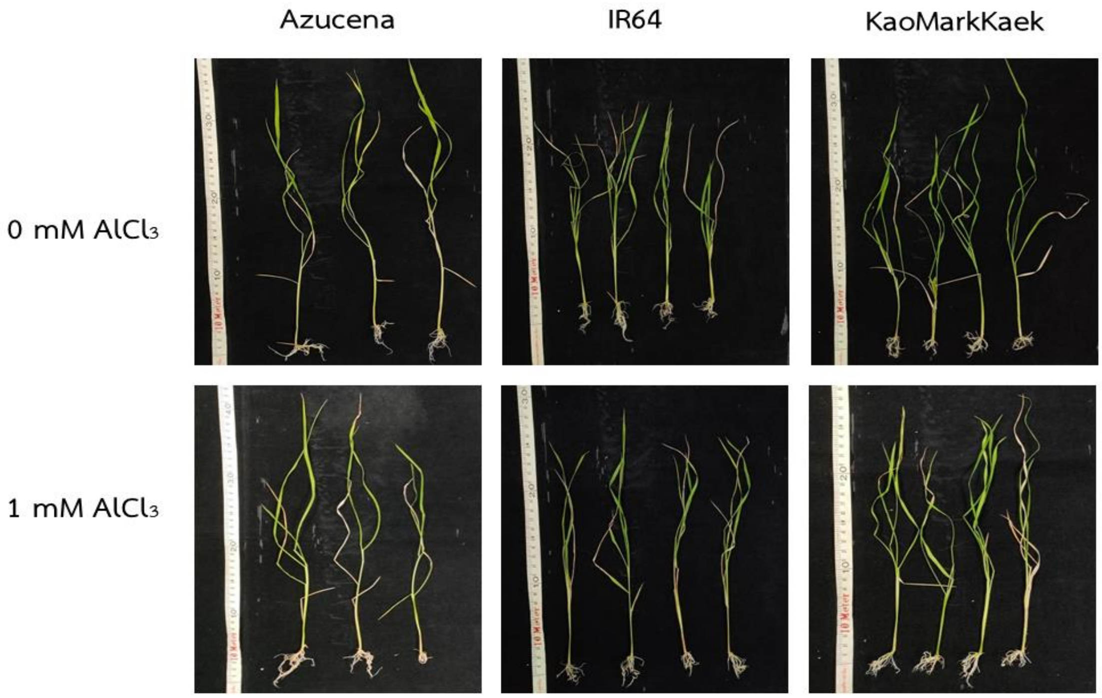


รูปที่ 16 กราฟแสดงปริมาณธาตุอะลูมิเนียม (Aluminum content) ในราก (A) และในใบ (B) ของข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์ ข้อมูลนี้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วใน (Phukunkamkaew et al, 2022)

4.3 การทดลองที่ 3 การศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยา ชีวเคมี และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงอะลูมิเนียมในข้าวพันธุ์ไทยที่ทนต่อสภาวะดินกรดที่มีปริมาณอะลูมิเนียมสูง

4.3.1 การเจริญเติบโตของข้าวหลังได้รับ $AlCl_3$ ที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์

พันธุ์ข้าวจากการทดลองที่ 1 คัดเลือกมาใช้ในการศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยา ชีวเคมีและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในข้าว ได้แก่ พันธุ์ Azucena (Al-tolerant), IR64 (Al-sensitive) และ KaoMakKeak (KMK) ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มทนอะลูมิเนียมสูง โดยศึกษาภายใต้อะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน จากผลการศึกษาพบว่าการแสดงออกด้านการเจริญเติบโตในส่วนของความสูงไม่พบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าว และไม่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบในพันธุ์เดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าในข้าว 3 พันธุ์ไม่มีความแตกต่างของความยาวรากเมื่อรับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสอดคล้องกับชีวมวล (biomass) ของข้าวที่ไม่แตกต่างกัน ได้แก่ น้ำหนักสดต้น (shoot fresh weight: STFW) น้ำหนักแห้งต้น (shoot dry weight: STDW) น้ำหนักสดราก (root fresh weight: RFW) และน้ำหนักแห้งราก (root dry weight: RDW) (รูปที่ 17 และ ตารางที่ 8)



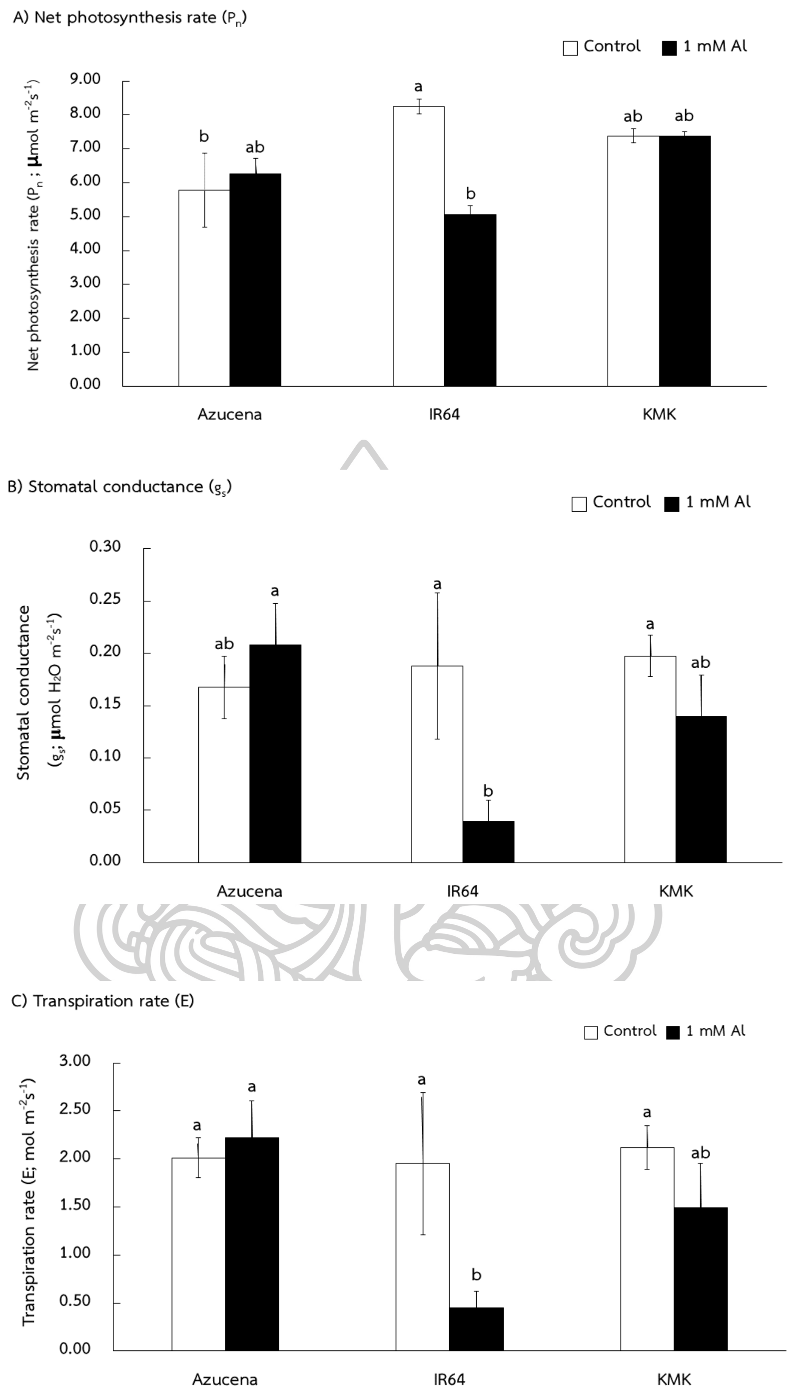
รูปที่ 17 ลักษะทางฟีโนไทป์ของข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ KaoMakKeak ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์เป็นระยะเวลา 14 วัน

ตารางที่ 8 ค่าความสูง (SH) ความยาวราก (RL) น้ำหนักสดต้น (STFW) น้ำหนักแห้งต้น (STDW) น้ำหนักสดราก (RFW) และน้ำหนักแห้งราก (RDW) ของข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ Azucena IR64 และ KaoMakKaek ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์ เป็นระยะเวลา 14 วัน

Var	Al (mM)	SH (cm)	RL (cm)	STFW (g)	STDW (g)	RFW (g)	RDW (g)
Azucena	0	26.6±8.8	3.5±1.3	0.20±0.06	0.025±0.010	0.057±0.020	0.005±0.002
	1	28.0±9.4	4.1±1.5	0.21±0.07	0.027±0.010	0.047±0.020	0.006±0.002
IR64	0	22.7±0.3	5.0±0.1	0.18±0.02	0.029±0.002	0.067±0.005	0.007±0.001
	1	25.4±0.6	5.5±0.9	0.19±0.01	0.028±0.001	0.062±0.005	0.006±0.001
KaoMakKeak	0	30.5±2.0	4.2±0.4	0.23±0.01	0.031±0.002	0.065±0.003	0.006±0.001
	1	26.6±1.2	3.4±0.6	0.22±0.02	0.028±0.002	0.047±0.015	0.006±0.001
Significant level							
Var		ns	ns	ns	ns	ns	ns
Al		ns	ns	ns	ns	ns	ns
		na	ns	ns	ns	ns	ns

4.3.2 การตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าวหลังได้รับอะลูมิเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์

การตอบสนองทางสรีรวิทยาที่เปลี่ยนแปลงในข้าวหลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน พบค่าอัตราการสังเคราะห์แสงลดลงในข้าวพันธุ์ IR64 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.07 μmol $m^{-2}s^{-1}$ (1.63 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม) การลดลงของค่าอัตราการสังเคาะห์แสงในข้าวพันธุ์ IR64 สอดคล้องกับการลดลงของค่าอัตราการเปิด-ปิดของปากใบที่ลดลงเท่ากับ 0.04 μmol H_2O $m^{-2}s^{-1}$ (4.75 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม) และมีค่าอัตราการคายน้ำ 0.45 mol $m^{-2}s^{-1}$ (4.33 เท่า) แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่า chlorophyll fluorescence (F_v/F_m), photon yield of PSII (Φ_{PSII}) และค่าความเขียวของใบ (SPAD) ในส่วนของข้าวพันธุ์ Azucena และ KMK ไม่พบการลดลงของอัตราการสังเคราะห์แสง อัตราการเปิด-ปิดปากใบ อัตราการคายน้ำ chlorophyll fluorescence (F_v/F_m), photon yield of PSII (Φ_{PSII}) และ SPAD จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ส่งผลกระทบต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าวพันธุ์ IR64 แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อข้าวพันธุ์ Azucena และ KaoMakKaek (รูปที่ 18 และ ตารางที่ 9)



รูปที่ 18 กราฟแสดงค่าอัตราการสังเคราะห์แสง (*P_n* ; A) อัตราการเปิด-ปิดปากใบ (*g_s*; B) และอัตราการคายน้ำ (*E*; C) ของข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ KMK ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์เป็นระยะเวลา 14 วัน

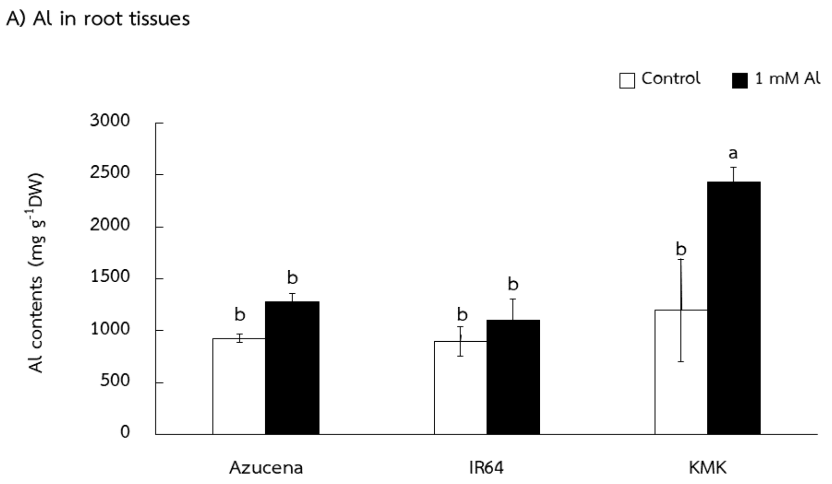
ตารางที่ 9 ค่า chlorophyll fluorescence (F_v/F_m), photon yield of PSII (Φ_{PSII}) และ SPAD ของข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ Azucena, IR64 และ KaoMakKeak ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์เป็นระยะเวลา 14 วัน

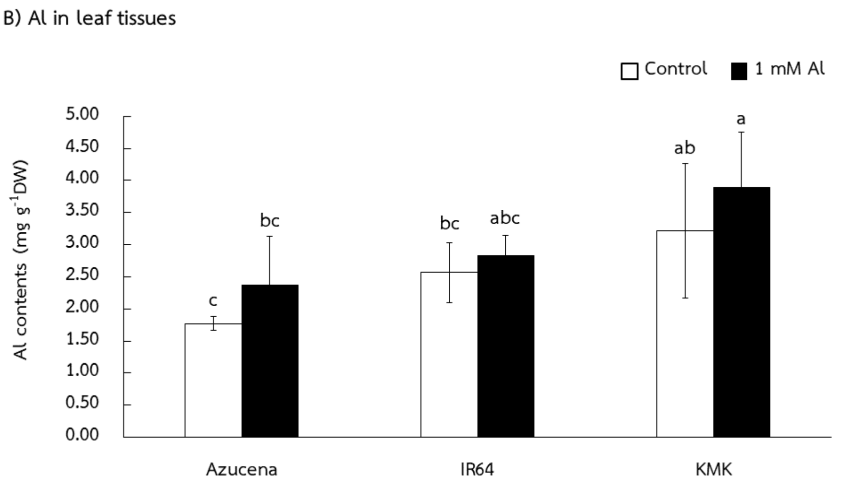
Var	Al (mM)	F_v/F_m	*PSII*	SPAD
Azucena	0	0.63±0.21	0.24±0.10a	9.82±3.39b
	1	0.65±0.21	0.33±0.12ab	15.57±5.19ab
IR64	0	0.81±0.04	0.33±0.10ab	18.55±0.99a
	1	0.85±0.01	0.41±0.10ab	20.87±0.91a
KaoMakKeak	0	0.87±0.01	0.51±0.03a	21.57±0.48a
	1	0.87±0.01	0.50±0.02a	21.62±0.67a
Significant level				
Var		ns	ns	ns
Al		ns	ns	ns
Var × Al		ns	ns	ns

4.3.3 ปริมาณการสะสมธาตุอะลูมิเนียมในรากและใบของข้าวภายใต้อะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์

จากการแสดงออกของลักษณะทางฟีโนไทป์ ความสูง และความยาวรากของข้าวทั้ง 3 พันธุ์ที่ไม่พบความแตกต่าง แต่พบว่าข้าวพันธุ์ IR64 มีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา และเมื่อทำการวัดปริมาณอะลูมิเนียมในเนื้อเยื่อพืช โดยเริ่มจากเนื้อเยื่อในส่วนของรากของข้าวทั้ง 3 พันธุ์ พบว่าปริมาณอะลูมิเนียมสูงในรากของข้าวพันธุ์ KaoMakKaek ซึ่งมาค่าเท่ากับ 2.43 × 10^3 มิลลิกรัมต่อต้น หรือประมาณ 2.04 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่ข้าวพันธุ์ Azucena และ IR64 ไม่พบความแตกต่างของปริมาณอะลูมิเนียมที่สะสมในเนื้อเยื่อของราก ผลการทดลองแสดงให้เห็นปริมาณการสะสมของธาตุอะลูมิเนียมในรากไม่ส่งผลต่อน้ำหนักของรากจึงสอดคล้องกับค่าน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของรากในข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ KaoMakKaek (รูปที่ 19 และ ตารางที่ 8) นอกจากนี้ในเนื้อเยื่อใบเมื่อตรวจสอบแล้วพบปริมาณอะลูมิเนียมไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบในพันธุ์เดียวกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ข้าวพบว่าปริมาณอะลูมิเนียมในข้าวพันธุ์ KMK (3.88 มิลลิกรัมต่อต้น) มีค่ามากกว่าข้าวพันธุ์ Azucena (Al-tolerant) ถึง 1.64 เท่า โดยปริมาณอะลูมิเนียมที่พบในข้าวพันธุ์ Azucena เท่ากับ 2.37 มิลลิกรัมต่อต้น ในขณะที่ข้าวพันธุ์ IR64 ปริมาณอะลูมิเนียม

มีค่าเท่ากับ 2.38 มิลลิกรัมต่อต้น (รูปที่ 19) แสดงให้เห็นว่าปริมาณอะลูมิเนียมในเนื้อเยื่อใบไม่ส่งผลต่อน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งใบของข้าว 3 พันธุ์ (ตารางที่ 8)

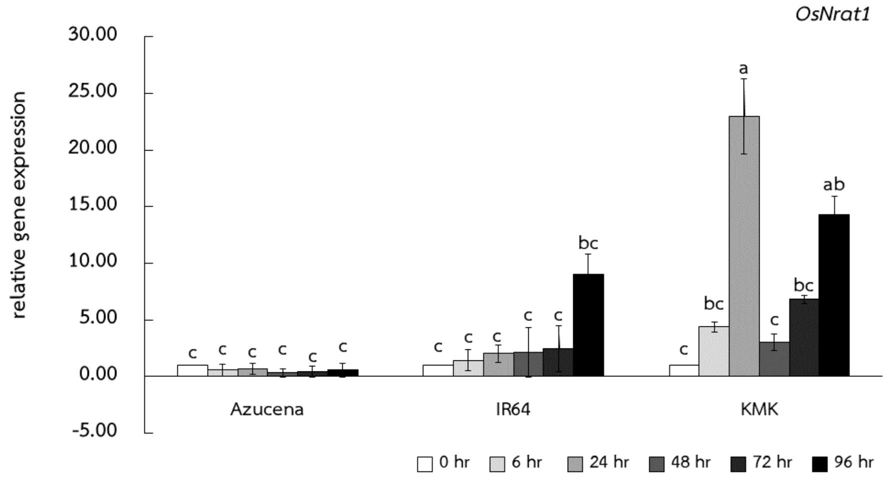




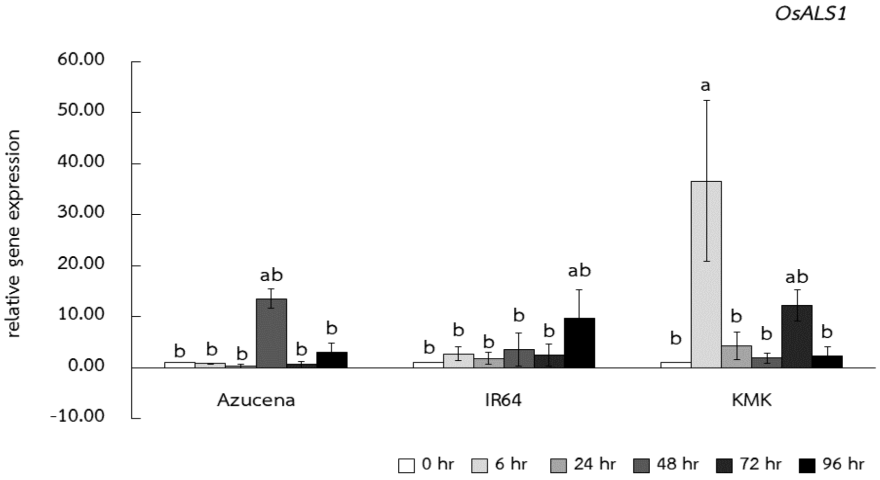
รูปที่ 19 กราฟแสดงปริมาณธาตุอะลูมิเนียม (Aluminum content) ในราก (A) และใบ (B) ของข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ KMK ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์

4.3.4 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่ออะลูมิเนียมของข้าวเมื่อได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์

นอกจากการเจริญเติบโตและการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าวและปริมาณของอะลูมิเนียมที่พบแล้ว ผู้วิจัยยังสนใจศึกษาต่อไปเกี่ยวกับปริมาณอะลูมิเนียมที่พบในเนื้อเยื่อพืชว่ามีความสัมพันธ์กับการขนส่ง และลำเลียงอะลูมิเนียมภายในเซลล์อย่างไร และเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่สร้างโปรตีนลำเลียงธาตุอะลูมิเนียมหรือไม่ โดยศึกษาจากการแสดงออกของยีนในเซลล์รากและใบของพืช ยีนที่สนใจศึกษามีจำนวน 5 ยีน ได้แก่ *OsNrat1*, *OsALS1*, *OsVIT2*, *OsYSL* และ *OsORC3* ยีนเหล่านี้เป็นยีนที่เกี่ยวข้องในการสร้างโปรตีนลำเลียงอะลูมิเนียมในพืช ซึ่งจากผลการทดลองในข้าว 3 พันธุ์พบว่า ยีน *OsNrat1* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนสำหรับทำหน้าที่นำอะลูมิเนียมจากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์รากของพืช โปรตีนดังกล่าวจัดเป็น plasma membrane protein พบบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของยีน *OsNrat1* ในข้าวพันธุ์ Azucena ที่ชั่วโมงที่ 0 6 24 48 72 และ 96 หลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์ พบการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างกัน และในข้าวพันธุ์ IR64 การแสดงออกของยีนดังกล่าวมีการแสดงออกที่ไม่แตกต่างกันเช่นเดียวกับข้าวพันธุ์ Azucena แต่ในข้าวพันธุ์ KMK พบว่าการแสดงออกของยีน *OsNrat1* มีการแสดงออกมากที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ แต่หลังจากช่วงเวลาดังกล่าวการแสดงออกของยีนมีระดับลดลง (รูปที่ 20) นอกจากนี้พบว่ายีน *OsALS1* ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนสำหรับลำเลียงธาตุอะลูมิเนียมเข้าสู่แวคคิวโอล เพื่อรักษาสมดุลและลดความเป็นพิษของเซลล์ การแสดงออกของยีน *OsALS1* ในข้าวพันธุ์ Azucena และพันธุ์ IR64 พบการแสดงออกของยีนดังกล่าวไม่แตกต่างกันในช่วงเวลา 0 ถึง 96 ชั่วโมง ในขณะที่ข้าวพันธุ์ KMK การแสดงออกของยีน *OsALS1* แสดงออกมากที่เวลา 72 ชั่วโมงหลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 21) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลการแสดงออกของยีน *OsNrat1* และ*OsALS1* มีความสอดคล้องกับผลของปริมาณธาตุอะลูมิเนียมที่พบในรากของข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ KMK (รูปที่ 19)



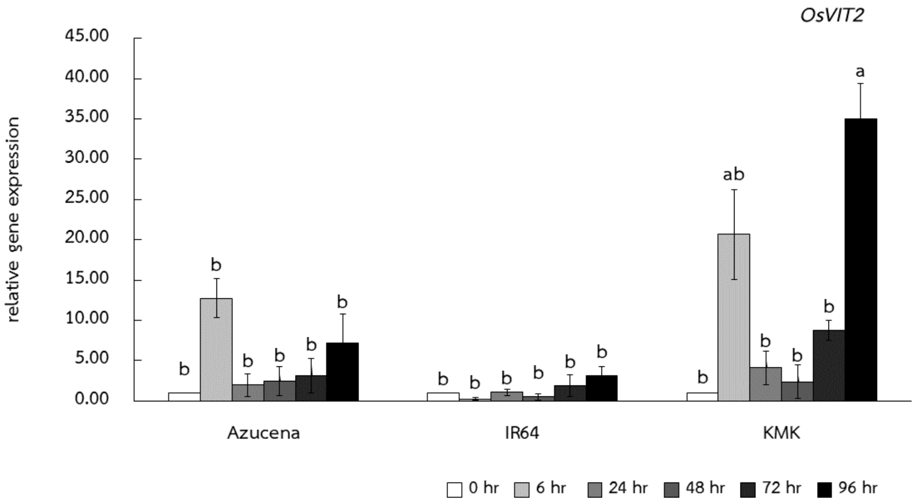
รูปที่ 20 กราฟการแสดงออกของยีน *OsNrat1* ในข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ KMK ในช่วงเวลาที่ 0 6 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง หลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

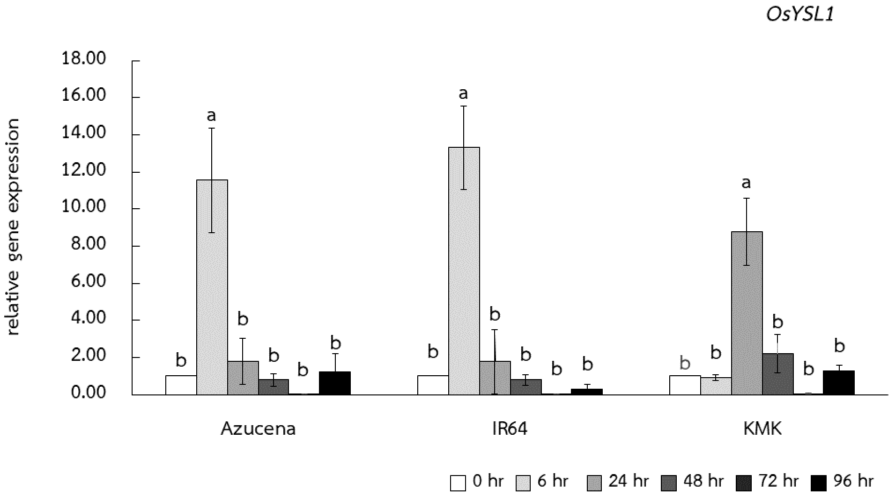


รูปที่ 21 กราฟการแสดงออกของยีน *OsALS1* ในข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ KMK ในช่วงเวลาที่ 0 6 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง หลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงธาตุอะลูมิเนียมในเซลล์ราก นอกจากยีน *OsNrat1* และ *OsALS1* พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องอีก 2 ชนิดที่น่าสนใจคือ *OsVIT2* และ *OsYSL* ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนลำเลียงในเซลล์ (transporter protein) โปรตีนลำเลียงทั้งสองชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการลำเลียงอะลูมิเนียมในเซลล์ราก นอกจากนี้ยังพบโปรตีนดังกล่าวในเซลล์พาเรงคิมาที่ใบ ผู้วิจัยสันนิษฐานว่ายีน *OsVIT2* และ *OsYSL* สามารถสร้างโปรตีนลำเลียงธาตุอะลูมิเนียมจากรากขึ้นไปสู่ใบได้ จากการศึกษาพบว่าข้าวพันธุ์ Azucena และ IR64 มีระดับการแสดงออกของยีน *OsVIT2* ในช่วงเวลา 0 6 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง หลังได้รับอะลูมิเนียมความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ไม่แตกต่างกัน แต่ว่าในข้าวพันธุ์ KMK การแสดงออกของยีน *OsVIT2* แสดงออกมากในชั่วโมงที่ 96 ส่วนการแสดงออกของยีน *OsYSL* พบว่าในข้าวพันธุ์ Azucena และ IR64 พบการแสดงออกของยีนดังกล่าวสูงในชั่วโมงที่ 6 และหลังจากชั่วโมงที่ 6 การแสดงออกของยีนลดลง ในขณะที่ข้าวพันธุ์ KMK การแสดงออกของยีน *OsYSL* ต่ำที่ชั่วโมงที่ 6 แต่เมื่อเวลาผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 24 หลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ การแสดงออกของยีน *OsYSL* นั้นสูงขึ้น และหลังจากชั่วโมงที่ 24 การแสดงออกของยีนลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 96 (รูปที่ 22)

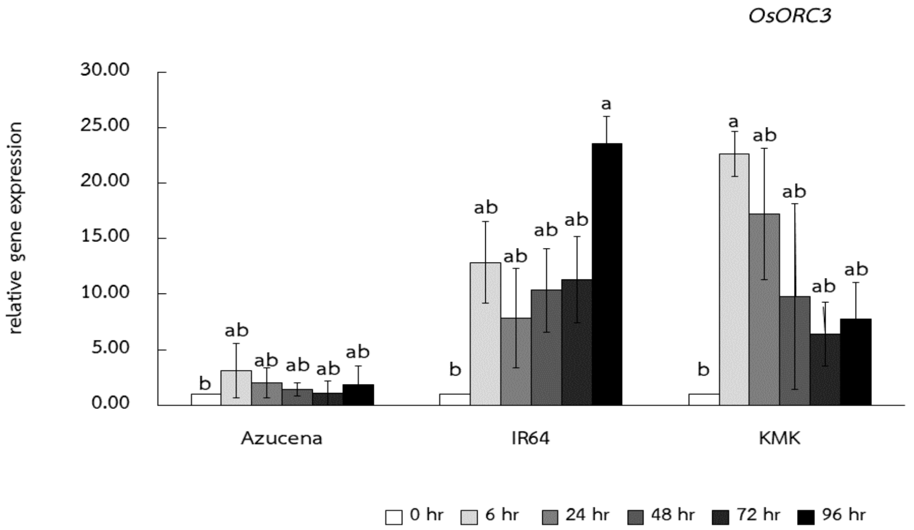
มหาวิทยาลัยศิลปากร





รูปที่ 22 กราฟการแสดงออกของยีน *OsVIT2* และ *OsYSL* ในข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ KMK ในช่วงเวลาที่ 0 6 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง หลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *OsORC3* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างรากแขนงของพืช พบว่า การแสดงออกของยีน *OsORC3* ในข้าว 3 พันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันในช่วงเวลาที่ 0 ถึง 96 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 23)



รูปที่ 23 กราฟการแสดงออกของยีน *OsORC3* ในข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ KMK ในช่วงเวลาที่ 0 6 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง หลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 และ 1 มิลลิโมลาร์

บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง

5.1 การคัดเลือกและศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าว 28 พันธุ์ ภายใต้สภาวะดินกรดที่มีปริมาณของเหล็กและอะลูมิเนียมสูง

การตอบสนองของข้าว 28 พันธุ์ ภายใต้สภาวะดินกรดที่มีปริมาณเหล็กและอะลูมิเนียมสูง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าข้าวแต่ละพันธุ์มีการตอบสนองที่แตกต่างกัน รากเป็นโครงสร้างแรกของพืชที่สัมผัสกับอะลูมิเนียมและเหล็กในดิน ซึ่งเป็นไปได้ว่าธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมสามารถสะสมไว้ในเซลล์รากได้ (Phukunkamkaew et al., 2021) การตรวจสอบปริมาณของธาตุสามารถทำได้ด้วยเทคนิค ICP-OES นอกจากนี้ยังทำได้โดยใช้วิธีการย้อมสีฮีมาโตไซลิน (Hematocylin) และมอริน (morin) ซึ่งวิธีนี้สามารถบอกการสะสมของธาตุที่ในเซลล์ได้โดยดูจากความเข้มจางของสีย้อม ไม่สามารถบอกปริมาณของธาตุได้ (Alvim et al., 2012) ปริมาณธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมที่สะสมในรากนั้นมีปริมาณที่ต่างกัน ตัวอย่างในข้าวพันธุ์ Hari ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นสูงพบปริมาณอะลูมิเนียมในรากมากถึง 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (Qi-Long et al., 2011; Ramachandran et al., 2004) และในข้าวที่ทดลองด้วยปริมาณความเข้มข้นของธาตุเหล็กเพิ่มขึ้น ส่งผลต่อการสะสมธาตุเหล็กในรากเพิ่มขึ้นเช่นกัน (Bashir et al., 2014) นอกจากนี้ธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมสามารถพบได้ที่ใบ โดยงานวิจัยของ Wu และคณะ 2014 รายงานว่าปริมาณธาตุเหล็กในใบของข้าวพันธุ์ IR29 มีปริมาณมากกว่าข้าวพันธุ์ Pokkali และ FL510 และมีงานวิจัยยืนยันว่าธาตุอะลูมิเนียมสามารถถูกเคลื่อนย้ายไปที่ใบได้ (Chen & Shen, 2008) ซึ่งอาจต้องอาศัยโปรตีนลำเลียงในการลำเลียงธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมไปไว้ที่ใบ (Mahender et al., 2019b; Roselló et al., 2015) ซึ่งจากงานวิจัยอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าปริมาณของธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมที่สะสมในรากและใบมีปริมาณที่แตกต่างกัน

นอกจากพันธุ์ข้าวแต่ละพันธุ์ที่พบปริมาณเหล็กและอะลูมิเนียมที่ต่างกันแล้ว ระบบการปลูกก็ส่งผลด้วยเช่นกัน การปลูกด้วยระบบไฮโดรโปนิก (Hydroponic) เป็นวิธีที่ใช้สารละลายที่มีสูตรอาหารของพืชที่เหมาะสม การละลายของสารสามารถละลายได้ดี ทำให้พืชสามารถดูดซึมไปใช้ได้อย่างเต็มที่ ซึ่งต่างจากการปลูกโดยใช้ดินเพราะในดินมีธาตุอาหารที่ไม่สามารถควบคุมได้ การละลายของสารหรือธาตุอาหารละลายได้ไม่ดีเท่าการปลูกด้วยระบบไฮโดรโปนิก นอกจากนี้ในดินยังมี chelate ชนิดต่างๆ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการดูดซับแร่ธาตุ และการเจริญเติบโตของพืช ในส่วนของการเจริญเติบโตเป็นลักษณะที่สามารถใช้ในการจัดกลุ่มของข้าวพันธุ์ที่ทนและไม่ทนต่อสภาวะที่มีธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมสูงได้ ลักษณะที่สำคัญที่สามารถนำมาใช้ในการระบุว่าข้าวมีความทนหรือไม่ทนต่อสภาวะดังกล่าวได้ คือ ความยาวราก จำนวนราก (Bidhan & BHADRA, 2014) แต่จากผลการทดลองการคัดเลือกข้าว 28 พันธุ์นี้พบว่า ความยาวรากของข้าวแต่ละพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน และ

ในส่วนของความสูง น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งไม่ต่างกัน ดังนั้นผู้วิจัยจึงไม่นำพารามิเตอร์ดังกล่าวมาใช้ในการจัดกลุ่ม การตอบสนองของข้าว 28 พันธุ์มีความแตกต่างกันภายใต้สภาวะดินกรดที่มีปริมาณธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมสูง เนื่องจากการสะสมของเหล็กและอะลูมิเนียมในข้าวทั้ง 28 พันธุ์ มีการสะสมในเซลล์รากและใบต่างกัน จากงานทดลองของ Rout และคณะ 2015 ได้คัดเลือกพันธุ์ข้าวที่ทดสอบด้วยธาตุเหล็กที่ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าการเจริญเติบโตและการตอบสนองทางสรีรวิทยาในข้าวแต่ละพันธุ์นั้นมีความแตกต่างกัน (Rout & Sahoo, 2015) และในงานวิจัยของ Asch และคณะ 2005 ได้ศึกษาคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่ทดสอบด้วยธาตุเหล็กในปริมาณสูง พบว่าพืชมีการสะสมธาตุเหล็กในปริมาณมากที่เนื้อเยื่อในส่วนของใบ ทำให้ใบแสดงลักษณะ bronzing และลักษณะดังกล่าวสามารถใช้ค่าความเป็นพิษ (Toxic score) ในการจัดจำแนกพันธุ์ข้าวได้ (Asch et al., 2005) ซึ่งจากผลการศึกษาในงานวิจัยคัดเลือกพันธุ์ข้าว 28 พันธุ์นี้พบว่าปริมาณธาตุเหล็กตรวจพบมากที่เนื้อเยื่อรากและใบ แต่การสะสมธาตุเหล็กที่เนื้อเยื่อใบนั้นแสดงให้เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจน การลำเลียงธาตุเหล็กในข้าวนั้นอาศัยโปรตีนลำเลียงไปสะสมไว้ในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืช ซึ่งการตอบสนองคล้ายกับการลำเลียงอะลูมิเนียม แต่ต่างกันที่ชนิดของโปรตีนลำเลียง ซึ่งในส่วนของอะลูมิเนียมจากการทดลองของ Ramachandran และคณะ 2004 พบว่าปริมาณอะลูมิเนียมในข้าวพันธุ์ Hari เพิ่มสูงขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณของ $Al_2(SO_4)_3$ และยังพบว่าอัตราการลำเลียงอะลูมิเนียมสูงขึ้น

จากการศึกษาก่อนหน้ามีรายงานว่าในข้าวพันธุ์ทนต่ออะลูมิเนียมมีกลไกการนำอะลูมิเนียมในเซลล์รากปล่อยออกมานอกเซลล์ราก เพื่อลดความเป็นพิษในเซลล์ (Yang et al., 2008) และยังสามารถลำเลียงอะลูมิเนียมโดยอาศัยโปรตีนลำเลียง (transporter protein) ไปสะสมไว้ในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ลำเลียงไปสะสมไว้ใน vacuole หรือเกิดกลไกใน cytoplasm เช่น สร้างกรดอินทรีย์มาจับกับอะลูมิเนียมไอออน (Al^{3+}) เพื่อทำให้อะลูมิเนียมอยู่ในฟอร์มที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์พืช และยังสามารถสร้างสาร เช่น lignin สะสมบริเวณผนังเซลล์ของพืชได้ ซึ่งเป็นอีกกลไกหนึ่งที่พืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันอะลูมิเนียมเข้าสู่เซลล์ได้ ในขณะที่ความเข้มข้นของอะลูมิเนียมเพิ่มขึ้น ส่งผลให้อุณหภูมิในใบพืชเพิ่มขึ้น เนื่องจากอะลูมิเนียมที่สะสมมากในเซลล์ราก ส่งผลกระทบต่อการลำเลียงน้ำจากดินเข้าสู่เซลล์ราก ทำให้พืชไม่สามารถลำเลียงน้ำจากเซลล์รากไปยังส่วนต่าง ๆ เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตได้ พืชที่ทนต่ออะลูมิเนียมจะสงวนน้ำไว้ได้โดยเกิดการปิดปากใบมากขึ้นเพื่อลดการสูญเสียน้ำ อีกทั้งอะลูมิเนียมยังไปกระตุ้นการสร้างสารอนุมูลอิสระจำพวก reactive oxygen species (ROS) และยังกระตุ้นการสร้างกรดแอบไซซิก (Abscisic acid; ABA) มากขึ้น ซึ่งปริมาณของกรดแอบไซซิกที่มากขึ้นส่งผลทำให้ปากใบปิดมากขึ้น และอัตราการคายน้ำลดลง จึงทำให้อุณหภูมิในใบพืชสูงขึ้น (Sivaguru et al., 2003) ซึ่งสอดคล้องกับค่า CWSI ที่บ่งบอกระดับความเครียดของพืช และ

เป็นสาเหตุทำให้การตอบสนองทางสรีรวิทยาของพืชเปลี่ยนแปลงไป (Poirier-Pocovi et al., 2020; Xu et al., 2016) การเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยา ปริมาณคลอโรฟิลล์ในพืชเป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญ เนื่องจากเป็นรงควัตถุที่สำคัญในกระบวนการส่งถ่ายพลังงานและอิเล็กตรอนในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงในพืช แต่จากผลการทดลองในข้าว 28 พันธุ์ พบการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่แตกต่างกัน แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางด้านความสูง ความยาวราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเมื่อความเข้มข้นของธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมสูงขึ้น แต่พารามิเตอร์ที่แสดงให้เห็นความแตกต่างและสามารถใช้เป็นข้อมูลในการจัดกลุ่มของข้าวพันธุ์ทนได้อย่างชัดเจนคือ ปริมาณธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมที่สะสมที่เนื้อเยื่อใบ

ส่วนพารามิเตอร์อื่นที่สามารถใช้ในการจัดกลุ่มพันธุ์ข้าวได้ในการทดลองนี้ได้แก่ Chlorophyll fluorescence (F_v/F_m), Photon yield of PSII (Φ_{PSII}), Total chlorophyll contents (TC), Stomatal conductance (g_s), Transpiration rate (E), Net photosynthesis rate (P_n), Leaf temperature (LT), crop water stress index (CWSI) และพารามิเตอร์การสะสมอะลูมิเนียม (Al content) ในรากและใบ จากผลการจัดกลุ่มแสดงให้เห็นว่า สามารถแบ่งกลุ่มพันธุ์ข้าวได้เป็น 2 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มทนต่อสภาวะเหล็กและอะลูมิเนียมเป็นพิษ (Tolerance) ซึ่งส่วนใหญ่จะมีการสะสมธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมในใบสูง พันธุ์ข้าวส่วนใหญ่ไม่พบความแตกต่างของค่า total chlorophyll content (TC), Chlorophyll fluorescence (F_v/F_m) และ Photon yield of PSII (Φ_{PSII}) เมื่อเทียบกับชุดการทดลองควบคุม และมีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มพันธุ์ข้าวที่ไม่ทน 2) กลุ่มไม่ทนต่อสภาวะเหล็กและอะลูมิเนียมเป็นพิษ (Sensitive) ซึ่งส่วนใหญ่มีการสะสมธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมในใบต่ำกว่าพันธุ์ข้าวในกลุ่มทน และพันธุ์ข้าวส่วนใหญ่มีการตอบสนองทางสรีรวิทยาเปลี่ยนแปลงไปมากโดยมีการตอบสนองที่ลดลง ไม่ว่าจะเป็นค่า Chlorophyll fluorescence (F_v/F_m), Photon yield of PSII (Φ_{PSII}), Total chlorophyll contents (TC), Stomatal conductance (g_s), Transpiration rate (E), Net photosynthesis rate (P_n), Leaf temperature (LT) และ crop water stress index (CWSI) การเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ดังกล่าวนี้พบในจำนวนพันธุ์ข้าวในกลุ่มไม่ทนมากกว่ากลุ่มทนต่อสภาวะดินกรดที่มีธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมสูง อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงและการตอบสนองของข้าวในแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยและกลไกต่าง ๆ ในต้นพืช การสะสมของธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้มีการตอบสนองของข้าวเปลี่ยนแปลงไป เพื่อความเข้าใจในกลไกและกระบวนการตอบสนองของพืชจึงควรมีการศึกษาลึกลงไปถึงกระบวนการเชิงลึก รวมทั้งกลไกการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องต่อการตอบสนองของพืช

5.2 กลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของข้าวพันธุ์ไทยต่อสภาวะดินกรดและอะลูมิเนียมเป็นพิษ

5.2.1 การศึกษาความเป็นพิษของอะลูมิเนียมต่อการเจริญเติบโต การตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีในข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ RD35

5.2.1.1 ผลของ $Al_2(SO_4)_3$ ต่อการตอบสนองของข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64

เมื่อข้าวได้รับ $Al_2(SO_4)_3$ ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นจะส่งผลต่อการสะสมอะลูมิเนียมในเนื้อเยื่อรากและใบ และยังส่งผลต่อการเจริญของรากและความยาวราก ทำให้ความยาวรากลดลงโดยเฉพาะข้าวพันธุ์ RD35 และที่น่าสนใจคือ หลังได้รับ $Al_2(SO_4)_3$ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ แล้วพบว่า Al สะสมมากในรากข้าวพันธุ์ Azucena และ IR64 (2.74 และ 2.10 เท่า) แต่ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของข้าวทั้ง 2 พันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ จากรายงานของ (Sun et al., 2010) รายงานว่าธาตุอะลูมิเนียมถูกดูดซึมเข้าไปในเซลล์รากได้อย่างรวดเร็วและพบมากในข้าวพันธุ์ Kasalath (indica) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไม่ทนต่ออะลูมิเนียม (Al-sensitive) ในทางตรงกันข้ามกลับพบว่าในข้าวพันธุ์ Koshihikari (japonica) ซึ่งเป็นพันธุ์ทนต่ออะลูมิเนียม (Al-tolerant) มีปริมาณอะลูมิเนียมสะสมในรากน้อยกว่า การสะสมอะลูมิเนียมในรากและใบจะมีปริมาณมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะลูมิเนียมซัลเฟต ($Al_2(SO_4)_3$ และพันธุ์ข้าว (Bhatnagar-Mathur et al., 2007) จากการทดลองในรากข้าวพันธุ์ IR64 และพันธุ์ Krowal เมื่อย้อมด้วยสี hematoxylin เพื่อศึกษาการดูดซึมธาตุอะลูมิเนียมในเซลล์ราก โดยสังเกตจากจากความเข้มของสีย้อม พบว่าข้าวพันธุ์ IR64 มีปริมาณอะลูมิเนียมที่พบในรากมากกว่าพันธุ์ Krowal (MIFTAHUDIN et al., 2007) จากงานวิจัยเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าข้าวพันธุ์ทนและไม่ทนต่ออะลูมิเนียมขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว นอกจากนี้ความเข้มข้นของอะลูมิเนียมยังเป็นปัจจัยสำคัญต่อการพบปริมาณธาตุอะลูมิเนียมในเซลล์ราก ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าปริมาณอะลูมิเนียมที่พบในรากและใบของข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 แตกต่างกันที่ความเข้มข้น 0 10 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ และพบในปริมาณที่มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ ($Al_2(SO_4)_3$ สูงขึ้น

ธาตุอะลูมิเนียมเป็นโลหะหนักที่ต้องอาศัยโปรตีนในการลำเลียงธาตุ โดยธาตุอะลูมิเนียมสามารถถูกลำเลียงได้จากเซลล์รากไปยังเซลล์ใบของพืช (Roselló et al., 2015) ข้าวแต่ละพันธุ์สามารถทนต่อสภาวะอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้นสูงได้ต่างกัน ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมารายงานว่าทั้งพันธุ์ข้าวที่ทน (Aluminum-tolerant) และไม่ทนต่ออะลูมิเนียม (Aluminum-sensitive) จะพบปริมาณธาตุอะลูมิเนียมสะสมในรากมากกว่าในใบ (Bhoomika et al., 2013) ซึ่งเป็นไปได้ว่าการลำเลียงอะลูมิเนียมไปสู่ใบอาจมีข้อจำกัด (Cao et al., 2011) ธาตุอะลูมิเนียมถูกลำเลียงเข้าสู่เซลล์รากโดยอาศัยโปรตีนลำเลียงที่ถูกสร้างจากยีน *Nrat1* (NRAMP aluminum transporter) โดย *OsNrat1*

เป็นยีนที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีน OsNrat1 ซึ่งเป็น membrane transporter ทำหน้าที่เกี่ยวข้องในการนำธาตุอะลูมิเนียมเข้าสู่เซลล์ราก นอกจากนี้ยังพบว่ายีน *OsALS1* (Aluminum-sensitive 1) สร้างโปรตีน OsALS1 เพื่อช่วยลำเลียงอะลูมิเนียมเข้าสู่ vacuole เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์เกิดความเป็นพิษจากอะลูมิเนียม ธาตุอะลูมิเนียมส่งผลต่อความยาวราก น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง ความยาวรากที่ลดลงในข้าวพันธุ์ AS6 (Al-sensitive) หลังได้รับธาตุอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0 และ 1.1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าความยาวรากลดลง ในขณะที่ข้าวพันธุ์ AT6 (Al-tolerant) พบความยาวรากลดลงที่เวลา 72 ชั่วโมง (Silva et al., 2012) นอกจากนี้ในข้าวพันธุ์ IR64 ภายใต้ความเข้มข้นของอะลูมิเนียม 0 20 และ 40 ไมโครโมลาร์ พบความยาวรากลดลงมากกว่าข้าวพันธุ์ Azucena (Ma et al., 2012) และเมื่อศึกษาที่ความเข้มข้นของอะลูมิเนียมเท่ากับ 540 750 และ 1300 ไมโครโมลาร์ พบว่าความยาวรากของข้าวพันธุ์ Azucena และ IR64 ลดลง (Hidayatun et al., 2017) ความยาวรากที่ลดลงสอดคล้องกับการลดลงของน้ำหนักแห้ง ในข้าวพันธุ์ HUR-105 และยังมีรายงานว่าความยาวรากและน้ำหนักแห้งรากลดลงเมื่อได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 178 µM (Bhoomika et al., 2013)

5.2.1.2 อุณหภูมิของใบและค่า CWSI เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ (indicator) ในการวิเคราะห์ความสามารถทนต่ออะลูมิเนียมเป็นพิษ

จากผลการทดลองข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 มีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในใบข้าว อุณหภูมิในใบข้าวเพิ่มสูงขึ้นสอดคล้องกับความเข้มข้นของอะลูมิเนียมที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานใน soybean ที่ได้รับธาตุแคดเมียม (Cd) ที่ความเข้มข้น 4-20 ไมโครโมลาร์ พบว่าอุณหภูมิใบสูงขึ้น (Thakur & Singh, 2012) จากการศึกษาการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิสอดคล้องกับค่า CWSI ในข้าวค่า CWSI สามารถบอกได้ว่าพืชอยู่ในสภาวะเครียด โดยค่า CWSI จะมีค่ามากกว่า 0.5 เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียดและจะส่งผลต่ออัตราการคายน้ำ การเปิด-ปิดปากใบ และอัตราการสังเคราะห์แสงที่เปลี่ยนแปลงไป (Poirier-Pocovi et al., 2020) ในข้าวบาร์เลย์พันธุ์ Shang (Al-sensitive) พบว่าอัตราการสังเคราะห์แสงลดลงสัมพันธ์กับการคายน้ำและการเปิดปิดปากใบ (Ali et al., 2011) ข้าวพันธุ์ IR64 และ RD35 พบอัตราการคายน้ำ และการเปิดปิดปากใบลดลงเมื่ออุณหภูมิใบสูงขึ้น (Júnior et al., 2014) นอกจากนี้ธาตุอะลูมิเนียมยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของความเขียวของใบ (Chlorophyll contents) การลดลงของความเขียวของใบเกิดจากการถูกทำลายของคลอโรฟิลล์ จากผลการศึกษานี้พบว่าข้าวพันธุ์ Azucena และ IR64 ภายใต้ความเข้มข้นของอะลูมิเนียม 50 มิลลิโมลาร์ ค่า Chlorophyll contents ไม่แตกต่างกับชุดควบคุม แต่ลดลงในข้าวพันธุ์ RD35 สอดคล้องกับในการศึกษาของข้าวบาร์เลย์พันธุ์ Dayton แล(Ma & Furukawa, 2003)ะ XZ-16 (Al-tolerant) ซึ่ง

ไม่พบการลดลงของค่า Chlorophyll contents ในขณะที่พันธุ์ ZU-9 พบว่าคลอโรฟิลล์มีการถูกทำลายหลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ (Muhammad et al., 2019)

5.2.2 การศึกษาความเป็นพิษของอะลูมิเนียมในรูปของ $Al_2(SO_4)_3$ และ $AlCl_3$ ในสภาวะที่เป็นกรด

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใส่ EDTA ลงไปในสารละลายที่มีอะลูมิเนียม ทำให้ปริมาณการสะสมอะลูมิเนียมในรากข้าวมากขึ้น เนื่องจาก EDTA สามารถช่วยดึงดูดอะลูมิเนียมโดยเกิดการเข้าจับของอะลูมิเนียมกับ EDTA กลายเป็น Al-EDTA complex ซึ่งเป็นโครงสร้างที่พืชสามารถดูดซึมเข้าไปได้ และพบว่าสารละลายอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้นเดียวกัน รูปแบบของอะลูมิเนียมที่เป็น $Al_2(SO_4)_3$ สามารถแตกตัวได้ Al 2 โมเลกุล ซึ่งมากกว่า $AlCl_3$ ที่แตกตัวได้ Al เพียง 1 โมเลกุล และเมื่อเข้าจับกับ EDTA ทำให้ปริมาณ Al-EDTA complex ที่เกิดจาก $Al_2(SO_4)_3$ มากกว่าที่เกิดจาก $AlCl_3$ ทำให้ผลการทดลองชุดที่ใส่ $Al_2(SO_4)_3$ 20.0 มิลลิโมลาร์ + EDTA 5.0 มิลลิโมลาร์มีอะลูมิเนียมสะสมในรากมากกว่าชุดการทดลองที่ใส่ $AlCl_3$ 20.0 มิลลิโมลาร์ + EDTA 5.0 มิลลิโมลาร์ 200 และ 150 มิลลิกรัม/กรัม ตามลำดับ (รูปที่ 12) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสรีรวิทยา พบว่าพืชในชุดการทดลองที่ใส่ $Al_2(SO_4)_3$ + EDTA มีลักษณะที่ดีกว่า $AlCl_3$+ EDTA เนื่องจากอะลูมิเนียมถูกลำเลียงไปสะสมที่ใบน้อยกว่า ทำให้พืชยังคงสังเคราะห์แสงสร้างอาหารได้ ในชุดการทดลอง $AlCl_3$ พบการสะสมอะลูมิเนียมในรากมากกว่าชุดการทดลอง $Al_2(SO_4)_3$ เนื่องจาก $AlCl_3$ แตกตัวได้เร็วกว่าพืชจึงดูดเข้าไปสะสมในรากได้เร็วและมากกว่า (RITCHIE, 1989) เมื่อเปรียบเทียบชุดการทดลองที่ใส่ $AlCl_3$ ที่ความเข้มข้น 20.0, 10.0 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าที่ความเข้มข้น 10.0 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ มีปริมาณอะลูมิเนียมสะสมในรากไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะต้นกล้าพบว่าที่ความเข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์มีลักษณะที่เหี่ยวแห้งมากกว่าแสดงถึงความเป็นพิษในต้นกล้าข้าว และที่ความเข้มข้น 20.0 มิลลิโมลาร์มีอะลูมิเนียมสะสมในรากมากและลักษณะต้นไม้เหี่ยวแห้งและตาย เนื่องจากพืชไม่สามารถดึงน้ำเข้าสู่รากได้ และจากการทดลองชี้ให้เห็นว่ารูปแบบของอะลูมิเนียมที่แตกต่างกันส่งผลกระทบต่อต้นกล้าข้าวด้านการตอบสนองทางสรีรวิทยา โดยสาร EDTA ช่วยกระตุ้นให้พืชดูดซับอะลูมิเนียมได้ดีกว่าสารละลายอะลูมิเนียมที่ไม่ใส่ EDTA เนื่องจาก $AlCl_3$ ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ สามารถแตกตัวได้ง่ายและเป็นพิษได้มากกว่า $Al_2(SO_4)_3$ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน นอกจากนี้อัตราการดูดซึมอะลูมิเนียมไอออนของพืชขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ความเข้มข้นของอะลูมิเนียมในสารละลาย ลักษณะของรากพืช พื้นที่ผิวราก โปรตีนลำเลียงอะลูมิเนียมในราก และกลไกการดูดซับเฉพาะของพืชแต่ละสายพันธุ์ (Ma & Furukawa, 2003)

5.2.3 การศึกษาความเป็นพิษของอะลูมิเนียมต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีในข้าวพันธุ์ทนดินกรดต่างกัน

จากการศึกษาความเป็นพิษของอะลูมิเนียมในรูปของ $Al_2(SO_4)_3$ และ $AlCl_3$ ในสภาวะที่เป็นกรด ผู้วิจัยได้เลือกใช้ความเข้มข้นของ $AlCl_3$ 1.0 มิลลิโมลาร์ ในการศึกษาความเป็นพิษของอะลูมิเนียมต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีในข้าวพันธุ์ Azucena IR64 และ RD35 ที่ทนดินกรดต่างกัน จากผลการทดลองพบว่าเมื่อข้าวได้รับ $AlCl_3$ ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ ธาตุ Al จะถูกสะสมไว้ในรากของข้าวพันธุ์ Azucena กับ IR64 และไม่ถูกลำเลียงไปที่ใบเหมือนข้าวพันธุ์ RD35 จึงทำให้เกิด Al toxicity น้อยกว่า ทำให้ทนต่อธาตุ Al ได้สูงกว่า ส่วนข้าวพันธุ์ RD35 มีการลำเลียงไปที่ใบมากกว่า จึงทำให้เกิด Al toxicity มากกว่าข้าวพันธุ์ Azucena และ IR64 ทำให้ไม่ทนต่อธาตุ Al ซึ่งแสดงให้เห็นจากพารามิเตอร์ต่าง ๆ (การทดลองหัวข้อ 4.2.3) การลำเลียงอะลูมิเนียมไปที่ใบของข้าวพันธุ์ RD35 ส่งผลให้การตอบสนองทางสรีรวิทยามีการเปลี่ยนแปลง เช่น ความเขียวของใบลดลง ซึ่งสอดคล้องกับค่าอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงที่ลดลง จากรายงานผลของอะลูมิเนียมที่ส่งผลต่อการลดลงของความเขียวของใบหรือการลดลงของปริมาณสารสี (pigment) รายงานว่าอะลูมิเนียมส่งผลให้คลอโรฟิลล์ลดลงในข้าว (Kuo & Kao, 2003) และยังยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ O-aminolevulinic acid dehydratase (EC 4.2.1.24) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำงานในขั้นตอนการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ (Alzahrani et al., 2020)

จากผลการทดลองธาตุอะลูมิเนียมยังส่งผลกระทบต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาเพียงบางพารามิเตอร์ แต่บางพารามิเตอร์พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลง เช่น ค่า Fv/Fm ในข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 ไม่พบความแตกต่างเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งค่า Fv/Fm ในช่วง 0.80-0.85 เป็นช่วงที่บ่งบอกว่าพืชไม่ได้รับความเครียดจากสภาวะแวดล้อม (Amirjani, 2010) และจากผลการทดลองดังกล่าวค่า Fv/Fm ของข้าวพันธุ์ RD35 และ Azucena มีค่าเท่ากับ 0.826 และ 0.814 หลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ส่วน IR64 พบว่าหลังได้รับอะลูมิเนียม มีค่าเท่ากับ 0.748 ซึ่งค่าทางสถิติแสดงให้เห็นว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากค่า standard error มีค่ามากถึง 0.101 ในส่วนของค่า ΦPSII ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในข้าวทั้งสามพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับค่า Fv/Fm

อะลูมิเนียมสามารถทำให้การเปิดปิดปากใบ (g_s) ในข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64 ลดลงเมื่อพืชได้รับความเครียดจะมีการสร้างสาร Abscisic acid (ABA) และนำไปสู่การควบคุมการปิดปากใบเพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ เมื่อปากใบปิดทำให้อัตราการคายน้ำ (E) ลดลง และส่งผลให้อัตราการสังเคราะห์แสงลดลง (Awasthi et al., 2019) แต่จากผลการทดลองการลดลงของอัตราการสังเคราะห์ด้วยแสงในข้าวพันธุ์ RD35 ไม่สอดคล้องกับค่าการเปิดปิดปากใบและอัตราการคายน้ำ แต่การลดลงจากการสังเคราะห์แสงนั้นอาจเกิดจากการลดลงของคลอโรฟิลล์

ผลกระทบของอะลูมิเนียมต่อราก เช่น ความยาวรากพบว่าในข้าวพันธุ์ RD35 มีความยาวลดลง แต่ไม่เปลี่ยนแปลงในข้าวพันธุ์ Azucena และ IR64 ซึ่งผลการทดลองแตกต่างจากอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 540, 750 และ 1300 ไมโครโมลาร์ ทำให้ความยาวรากลดลงในข้าวพันธุ์ Azucena และ IR64 (Hidayatun et al., 2017) ธาตุอะลูมิเนียมส่งผลต่อการเจริญของราก ความยาวของรากลดลง เนื่องจากอะลูมิเนียมมีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ราก ขนาดและจำนวนรากลดลง และมีการสร้างสาร ABA ขึ้นเมื่อพืชได้รับสภาวะเครียด และส่งผลต่อน้ำหนักสด น้ำหนักแห้งลดลง (Roselló et al., 2015) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในข้าวพันธุ์ RD35 หลังได้รับอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ รากของพืชมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืชเป็นอย่างมาก เนื่องจากรากเป็นออร์แกเนลที่ทำหน้าที่ดูดซึมน้ำและธาตุอาหารที่จำเป็นเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการต่าง ๆ ในพืชและสำคัญต่อการเจริญเติบโต เมื่อข้าวได้รับอะลูมิเนียมในปริมาณมากพบว่าความสูงของข้าวลดลง ซึ่งการลดลงของความสูงในข้าวแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกัน จากรายงานการทดลอง $AlCl_3$ เข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ ในข้าวพันธุ์ Cotaxtia, Tres Rios, Huimanguillo และ Temporalero พบว่าความยาวรากและความสูงลดลง แต่ที่ $AlCl_3$ 200 ไมโครโมลาร์ อะลูมิเนียมส่งผลกระตุ้นให้ความยาวรากและความสูงของข้าวเพิ่มขึ้น (Moreno-Alvarado et al., 2017) จากงานวิจัยที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าอะลูมิเนียมที่ความเข้มข้นต่างๆ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตในข้าวแตกต่างกัน

5.3 การศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยา ชีวเคมีและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง ในข้าว Azucena, IR64 และ KMK ที่ทนต่อสภาวะดินกรดที่มีปริมาณอะลูมิเนียมสูง

การตอบสนองของข้าวภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมสูงนอกจากการเปลี่ยนแปลงทางด้านการเจริญเติบโตและสรีรวิทยาแล้ว การแสดงออกของยีนก็เป็นสิ่งสำคัญสามารถนำมาศึกษาและอธิบายความสัมพันธ์ควบคู่กับพารามิเตอร์อื่นได้ รากพืชเป็นออร์แกเนลที่สำคัญต่อการดูดซึมน้ำและธาตุอาหาร เมื่อเกิดสภาวะเครียดในดินไม่ว่าจะเป็นความแห้งแล้งในดิน สารพิษปนเปื้อนในดิน ดินเค็มหรือการสะสมของธาตุโลหะหนักมากในดิน สภาวะดังกล่าวเหล่านี้ส่งผลโดยตรงต่อรากพืช ในสภาวะอะลูมิเนียมเข้มข้นสูง ความเป็นพิษจะส่งผลต่อเซลล์รากเป็นลำดับแรก ผนังเซลล์ของรากสามารถสะสมธาตุอะลูมิเนียมได้ในปริมาณมาก ธาตุอะลูมิเนียมที่สะสมในผนังเซลล์สามารถเกิดการ cross-link กับ pectin และเกิดการยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์ของรากได้ (root cell division and elongation) จากงานวิจัยที่มีการศึกษาก่อนหน้ารายงานว่ายีน *OsNrat1* แสดงออกมากในข้าวพันธุ์ทนต่ออะลูมิเนียมเป็นพิษ (Li et al., 2014) แต่จากผลการทดลองข้าวพันธุ์ Azucena (Al-tolerant, positive check) และพันธุ์ IR64 (Al-sensitive, negative check) พบการแสดงออกของยีน *OsNrat1* ไม่แตกต่างกันหลังได้รับอะลูมิเนียมเมื่อเทียบกับช่วงเวลาที่ 0 ชั่วโมง ซึ่งการแสดงออกของยีน *OsNrat1* สอดคล้องกับปริมาณอะลูมิเนียมที่พบในราก ส่วนในข้าวพันธุ์ KMK พบการแสดงออกของยีน *OsNrat1* มากที่เวลา 24 และ 72 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณอะลูมิเนียมที่เพิ่มขึ้นในเซลล์รากและสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *OsALS1* ซึ่งเป็นยีนลำเลียงที่พบได้ที่เยื่อหุ้มเซลล์แวคิวโอล (Huang et al., 2012; Xia et al., 2010) การแสดงออกของยีน *OsALS1* เกี่ยวข้องกับการรักษาและปรับสมดุลความเป็นพิษในเซลล์ ในกรณีที่เกิดความเป็นพิษของอะลูมิเนียม ยีน *OsALS1* สามารถแสดงออกและสร้างเป็นโปรตีนที่ช่วยลำเลียงอะลูมิเนียมเข้าไปเก็บสะสมในแวคิวโอลได้ (Chandra & Keshavkant, 2021) จากผลการแสดงออกของยีน *OsNrat1* และ *OsALS1* นั้นสอดคล้องกับผลของปริมาณธาตุอะลูมิเนียมที่พบในรากของข้าวพันธุ์ Azucena, IR64 และ KaoMakKaek นอกจากยีน *OsALS1* ที่สามารถพบได้ในแวคิวโอลแล้วยังมียีน *OsVIT2* เป็นยีนที่สร้างโปรตีน OsVIT2 ซึ่งพบบริเวณเยื่อหุ้มของแวคิวโอลเช่นกัน (Aung & Masuda, 2020) ทำหน้าที่นำธาตุเหล็กเข้าไปเก็บสะสมไว้ในแวคิวโอล (Pradhan et al., 2020) และเป็นไปได้ที่โปรตีน OsVIT2 จะสามารถนำธาตุอะลูมิเนียมเข้าไปเก็บสะสมไว้ในแวคิวโอลเพื่อลดความเป็นพิษของเซลล์ (Tisarum et al., 2021) การแสดงออกของยีนดังกล่าวในข้าวพันธุ์ Azucena และ IR64 พบการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างจากช่วงเวลาที่ 0 ชั่วโมง ซึ่งตรงข้ามกับการศึกษาของ Tisarum และคณะ ปี 2021 ที่พบว่าการแสดงออกของยีน *OsVIT2* ในข้าวพันธุ์ Azucena พบการแสดงออกของยีนมากหลังได้รับ

อะลูมิเนียม ($Al_2(SO_4)_3$) ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ การแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันนี้อาจเกิดจากระยะของต้นข้าวและปริมาณธาตุอะลูมิเนียมที่พืชได้รับแตกต่างกัน จากผลการทดลองพบว่ายีน *OsYSL1* แสดงออกมากในข้าวพันธุ์ Azucena และ IR64 ที่เวลา 6 ชั่วโมง และแสดงออกในข้าวพันธุ์ KMK ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งน่าสนใจว่าทำไมยีน *OsYSL1* มีการแสดงออกมาก ยีน *OsYSL1* เป็นยีนที่สร้าง plasma membrane protein ทำหน้าที่ในการลำเลียงธาตุเหล็ก โดยยีนนี้สามารถพบได้ที่เยื่อหุ้มเซลล์แวคิวโอล (Kobayashi et al., 2019; Muhammad et al., 2019) อาจเป็นเพราะโปรตีน OsYSL1 ทำหน้าที่ลำเลียงธาตุเหล็ก แม็กนีเซียม และหรือแมงกานีส ที่เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารที่ใช้ในการเตรียมอาหาร MS จึงเป็นสาเหตุให้ยีน *OsYSL1* มีการแสดงออกในข้าวทั้งสามพันธุ์ได้ ในส่วนการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยา จากผลการทดลองพบว่าในข้าวพันธุ์ IR64 พบการลดลงของอัตราการสังเคราะห์แสง (P_n) อัตราการคายน้ำ (E) การเปิด-ปิดปากใบ (g_s) ซึ่งไม่ความสัมพันธ์กันปริมาณอะลูมิเนียมในรากและใบ การลดลงของการเปิด-ปิดปากใบอาจเกิดจากพืชถูกกระตุ้นให้สร้างสาร ABA ที่เซลล์รากเมื่อพืชได้รับสภาวะเครียด และลำเลียงไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืชรวมถึงใบ ปริมาณสาร ABA จะไปช่วยยับยั้งให้การเปิด-ปิดปากใบลดลง และจะส่งผลต่ออัตราการคายน้ำและการสังเคราะห์แสงในพืช (Merlot et al., 2002; Roselló et al., 2015) กลไกการป้องกันตัวเองในข้าวมีความแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ ดังนั้นจากผลการทดลองพบว่าธาตุอะลูมิเนียมไม่ได้ส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของข้าวพันธุ์ IR64 โดยตรง ในขณะที่ข้าวพันธุ์ Azucena และ KMK มีกลไกการป้องกันตัวเองต่อสภาวะอะลูมิเนียมเป็นพิษ โดยข้าวพันธุ์ Azucena ไม่ลำเลียงธาตุอะลูมิเนียมเข้าสู่เซลล์รากเนื่องจากอาจมีการสร้างกรดอินทรีย์และปล่อยออกมาจับกับ Al ทำให้ Al ไม่สามารถลำเลียงเข้าสู่เซลล์ได้ (Kopittke et al., 2015; Rengel, 1996) ในทางกลับกันข้าวพันธุ์ KMK สามารถลำเลียงอะลูมิเนียมเข้าสู่เซลล์ราก และอาจลำเลียงไปเก็บสะสมไว้ในแวคิวโอล เพื่อช่วยลดความเป็นพิษของเซลล์ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าข้าวแต่ละพันธุ์มีกลไกการป้องกัน และการตอบสนองที่แตกต่างกันเมื่อได้รับอะลูมิเนียมในปริมาณสูงภายใต้สภาวะที่เป็นกรด

สรุปผลการศึกษา

การทดลองที่ 1

การศึกษากลไกการตอบสนองของข้าว 28 พันธุ์เมื่อได้รับ FeSO4 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และ $Al_2(SO_4)_3$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมมีการสะสมสูงในส่วนรากและมีการสะสมในปริมาณสูงที่ใบในข้าว 13 ชนิด ส่งผลให้ข้าวแต่ละพันธุ์มีการเจริญเติบโตและตอบสนองทางสรีรวิทยาต่างกัน โดยสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มพันธุ์ทน (Tolerance) และกลุ่มพันธุ์ไม่ทน (Sensitive) ต่อสภาวะดินกรดที่มีปริมาณธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมเป็นพิษจำนวน 4 พันธุ์ และ 24 พันธุ์ ตามลำดับ ในกลุ่มพันธุ์ทนพบว่าข้าวพันธุ์ขาวหมากแขก (KMK) พบการสะสมเหล็กและอะลูมิเนียมที่รากและใบมากที่สุดและมากกว่าพันธุ์ Azucena (Positive check) นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าปริมาณการสะสมธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมในข้าวสามารถนำมาใช้เป็นพารามิเตอร์ในการจัดกลุ่มพันธุ์ข้าวทน และไม่ทนต่อสภาวะดินกรดที่มีธาตุเหล็กและอะลูมิเนียมเป็นพิษได้

การทดลองที่ 2

2.1 การศึกษากลไกและการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าว 3 พันธุ์ ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมเป็นพิษที่ความเข้มข้นสูง จากการทดลองพบว่า $Al_2(SO_4)_3$ ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น ส่งผลทำให้การตอบสนองทางสรีรวิทยาลดลง อุณหภูมิของใบสูงขึ้น เนื่องจากอัตราการปิดปากใบสูง ข้าวลดการคายน้ำ และยังส่งผลต่อการลดลงของการสังเคราะห์แสงในข้าวพันธุ์ RD35, Azucena และ IR64

2.2 การศึกษาความเป็นพิษของอะลูมิเนียมในรูปของ $Al_2(SO_4)_3$ และ $AlCl_3$ ในสภาวะที่เป็นกรด พบว่า $AlCl_3$ สามารถแตกตัวให้ Al^{3+} ได้เร็วกว่า $Al_2(SO_4)_3$ ทำให้รากข้าวดูดซึมไปใช้ได้เร็วกว่า จึงทำให้เกิดความเป็นพิษในข้าวมากกว่า และที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ เป็นระดับความเข้มข้นที่พบว่าก่อให้เกิด Al toxicity ในข้าว และเมื่อความเข้มข้นของ $AlCl_3$ มากขึ้นจะส่งผลกระทบต่อข้าวรุนแรงมากยิ่งขึ้น

2.3 การศึกษาความเป็นพิษของ $AlCl_3$ ต่อการเจริญเติบโต การตอบสนองทางสรีรวิทยาและชีวเคมีในข้าว 3 พันธุ์ที่ทนดินกรดต่างกัน พบว่าข้าวพันธุ์ RD35 เกิดอาการเป็นพิษเนื่องจากธาตุอะลูมิเนียม (Al toxicity) มากกว่าข้าวพันธุ์ Azucena และ IR64 เนื่องจาก RD35 ลำเลียงอะลูมิเนียมไปที่ใบมากกว่าข้าวอีกสองพันธุ์ จึงทำให้การตอบสนองทางสรีรวิทยาลดลงและเกิดความเครียดสูงกว่า

การทดลองที่ 3

การศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยา ชีวเคมี และการแสดงออกของยีนลำเลียง Al ในข้าวพันธุ์ไทยที่ทนต่อสภาวะดินกรดที่มีปริมาณอะลูมิเนียมสูง พบว่าข้าวพันธุ์ Azucena และ KMK มีกลไกการทนต่อ Al ที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของยีนลำเลียงที่ต่างกัน แสดงให้เห็นว่าข้าวแต่ละพันธุ์มีกลไกการป้องกันต่อสภาวะกรดและ Al เป็นพิษต่างกัน โดยพันธุ์ IR64 ไม่ทนต่ออะลูมิเนียม ส่วน Azucena อาจทนต่ออะลูมิเนียมเป็นพิษโดยการไม่ลำเลียงอะลูมิเนียมเข้าสู่เซลล์ราก ในขณะที่พันธุ์ KMK อาจลำเลียงและสะสมอะลูมิเนียมไว้ในแวคิวโอล เพื่อลดความเป็นพิษ ซึ่งลักษณะดังกล่าวอาจเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนต่อสภาวะดินกรดที่มีอะลูมิเนียมเป็นพิษในอนาคตได้

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

1. ได้พันธุ์ข้าวที่สามารถทนต่อสภาวะดินกรดที่มีธาตุเหล็กและธาตุอะลูมิเนียมเป็นพิษ จากการจัดกลุ่มพันธุ์ข้าว 28 พันธุ์ ซึ่งได้ข้าว 13 พันธุ์เป็นพันธุ์ทน และ 15 พันธุ์ เป็นพันธุ์ที่ไม่ทน โดยจะต้องนำพันธุ์ข้าวที่คัดเลือกได้ไปปลูกในพื้นที่จริงที่เป็นดินกรดและมีปริมาณอะลูมิเนียมสูง เพื่อยืนยันผลกระทบต่อผลผลิตของข้าว

2. พัฒนาองค์ความรู้ด้านกลไกการตอบสนองของข้าวต่อสภาวะดินกรดที่มีปริมาณอะลูมิเนียมในดินที่อยู่ในระดับเป็นพิษ

3. ฐานข้อมูลพันธุ์ข้าวที่ได้จะถูกนำมาใช้ในการส่งเสริมการปลูกให้กับเกษตรกรในพื้นที่ที่เป็นเป็นดินกรดและมีปริมาณอะลูมิเนียมสูง โดยสามารถบริหารจัดการแปลงปลูกให้เหมาะสมกับพันธุ์ข้าวที่ต้องการปลูกในพื้นที่จริง และสามารถใช้เป็นฐานพันธุกรรมในการพัฒนาพันธุ์ข้าวให้สามารถทนต่อสภาวะดินกรดและธาตุอะลูมิเนียมได้

4. สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีคุณสมบัติตามความต้องการ หรือสามารถนำไปต่อยอดในเรื่องของการใช้เป็นเทคโนโลยีการบำบัดโดยพืช (Phytoremediation)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

รายการอ้างอิง

Agegnehu, G., Amede, T., Erkossa, T., Yirga, C., Henry, C., Tyler, R., Nosworthy, M. G., Beyene, S., & Sileshi, G. W. (2021). Extent and management of acid soils for sustainable crop production system in the tropical agroecosystems: a review. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science*, 71(9), 852-869.

Ali, S., Zeng, F., Qiu, L., & Zhang, G. (2011). The effect of chromium and aluminum on growth, root morphology, photosynthetic parameters and transpiration of the two barley cultivars. *Biologia Plantarum*, 55, 291-296.

Alvim, M., Ramos, F., Oliveira, D., Isaias, R., & Franca, M. (2012). Aluminium localization and toxicity symptoms related to root growth inhibition in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Journal of biosciences*, 37(Suppl 1), 1079-1088.

Alzahrani, Y., Alharby, H. F., Hakeem, K. R., & Alsamadany, H. (2020). Modulating effect of EDTA and SDS on growth, biochemical parameters and antioxidant defense system of *Dahlia variabilis* grown under cadmium and lead-induced stress. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48(2), 906-923.

Amirjani, M. R. (2010). Effect of NaCl on some physiological parameters of rice. *European Journal of Behavioral Sciences*, 3(1), 6-16.

Asch, F., Becker, M., & Kpongor, D. S. (2005). A quick and efficient screen for resistance to iron toxicity in lowland rice. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168(6), 764-773.

Audebert, A. (2006). Iron toxicity in rice: Environmental conditions and symptoms. *Agritrop*, 18-33.

Aung, M. S., & Masuda, H. (2020). How does rice defend against excess iron?: Physiological and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1102.

Awasthi, J. P., Saha, B., Panigrahi, J., Yanase, E., Koyama, H., & Panda, S. K. (2019). Redox balance, metabolic fingerprint and physiological characterization in contrasting North East Indian rice for aluminum stress tolerance. *Scientific Reports*, 9(1), 1-21.

Bashir, K., Hanada, K., Shimizu, M., Seki, M., Nakanishi, H., & Nishizawa, N. K. (2014). Transcriptomic analysis of rice in response to iron deficiency and excess. *Rice*, 7, 1-15.

Bashir, K., Ishimaru, Y., & Nishizawa, N. K. (2010). Iron uptake and loading into rice grains. *Rice*, 3(2), 122-130.

Bhatnagar-Mathur, P., Devi, M. J., Reddy, D. S., Lavanya, M., Vadez, V., Serraj, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Sharma, K. K. (2007). Stress-inducible expression of *AtDREB1A* in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) increases transpiration efficiency under water-limiting conditions. *Plant Cell Reports*, 26, 2071-2082.

Bhoomika, K., Pyngrope, S., & Dubey, R. (2013). Differential responses of antioxidant enzymes to aluminum toxicity in two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars with marked presence and elevated activity of Fe SOD and enhanced activities of Mn SOD and catalase in aluminum tolerant cultivar. *Plant growth regulation*, 71, 235-252.

Bidhan, R., & BHADRA, S. (2014). Effects of toxic levels of aluminium on seedling parameters of rice under hydroponic culture. *Rice Science*, 21(4), 217-223.

Bojórquez-Quintal, E., Escalante-Magaña, C., Echevarría-Machado, I., & Martínez-Estévez, M. (2017). Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1767.

Bot, A., Nachtergaele, F., & Young, A. (2000). *Land resource potential and constraints at regional and country levels*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Brady, N. C., Weil, R. R., & Weil, R. R. (2008). *The nature and properties of soils* (Vol. 13). Prentice Hall Upper Saddle River, NJ.

Cao, Y., Lou, Y., Han, Y., Shi, J., Wang, Y., Wang, W., & Ming, F. (2011). Al toxicity leads to enhanced cell division and changed photosynthesis in *Oryza rufipogon* L. *Molecular biology reports*, 38, 4839-4846.

Chandra, J., & Keshavkant, S. (2021). Mechanisms underlying the phytotoxicity and genotoxicity of aluminum and their alleviation strategies: a review. *Chemosphere*, 278, 130384.

Chen, R. F., & Shen, R. F. (2008). Root phosphate exudation and pH shift in the rhizosphere are not responsible for aluminum resistance in rice. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 817-824.

Durrett, T. P., Gassmann, W., & Rogers, E. E. (2007). The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant physiology*, 144(1), 197-205.

Duy, D., Wanner, G., Meda, A. R., von Wiren, N., Soll, J., & Philippar, K. (2007). PIC1, an ancient permease in Arabidopsis chloroplasts, mediates iron transport. *The Plant Cell*, 19(3), 986-1006.

Façanha, A. R., & Okorokova-Façanha, A. L. (2002). Inhibition of phosphate uptake in corn roots by aluminum-fluoride complexes. *Plant physiology*, 129(4), 1763-1772.

Fageria, N., Baligar, V., & Zobel, R. (2007). Yield, nutrient uptake, and soil chemical properties as influenced by liming and boron application in common bean in a no-tillage system. *Communications in soil science and plant analysis*, 38(11-12), 1637-1653.

Fageria, N., Santos, A., Barbosa Filho, M., & Guimarães, C. (2008). Iron toxicity in lowland rice. *Journal of plant nutrition*, 31(9), 1676-1697.

Fageria, N. K., & Nascente, A. S. (2014). Management of soil acidity of South American soils for sustainable crop production. *Advances in agronomy*, 128, 221-275.

Famoso, A. N., Clark, R. T., Shaff, J. E., Craft, E., McCouch, S. R., & Kochian, L. V. (2010). Development of a novel aluminum tolerance phenotyping platform used for comparisons of cereal aluminum tolerance and investigations into rice aluminum tolerance mechanisms. *Plant physiology*, 153(4), 1678-1691.

Famoso, A. N., Zhao, K., Clark, R. T., Tung, C.-W., Wright, M. H., Bustamante, C., Kochian, L. V., & McCouch, S. R. (2011). Genetic architecture of aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa*) determined through genome-wide association analysis and QTL mapping. *PLoS genetics*, 7(8), e1002221.

Guo, J., Liu, X., Zhang, Y., Shen, J., Han, W., Zhang, W., Christie, P., Goulding, K., Vitousek, P., & Zhang, F. (2010). Significant acidification in major Chinese croplands. *science*, 327(5968), 1008-1010.

Hare, P., & Cress, W. (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant growth regulation*, 21, 79-102.

Hidayatun, N., Diaz, Q., Genaleen, M., & Ismail, A. M. (2017). Exploring aluminum tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa*, Linn) by using modified magnavaca nutrient solution. *Buletin Plasma Nutfah*, 23(2), 81-90.

Huang, C. F., Yamaji, N., Chen, Z., & Ma, J. F. (2012). A tonoplast‐localized half‐size ABC transporter is required for internal detoxification of aluminum in rice. *The Plant Journal*, 69(5), 857-867.

Huang, J. W., Pellet, D. M., Papernik, L. A., & Kochian, L. V. (1996). Aluminum interactions with voltage-dependent calcium transport in plasma membrane vesicles isolated from roots of aluminum-sensitive and-resistant wheat cultivars. *Plant physiology*, 110(2), 561-569.

Hue, N. (1992). Correcting soil acidity of a highly weathered Ultisol with chicken manure and sewage sludge. *Communications in soil science and plant analysis*, 23(3-4), 241-264.

Ishimaru, Y., Suzuki, M., Tsukamoto, T., Suzuki, K., Nakazono, M., Kobayashi, T., Wada, Y., Watanabe, S., Matsuhashi, S., & Takahashi, M. (2006). Rice plants take up iron as an Fe^{3+}‐phytosiderophore and as Fe^{2+}. *The Plant Journal*, 45(3), 335-346.

Jeong, J., Cohu, C., Kerkeb, L., Pilon, M., Connolly, E. L., & Guerinot, M. L. (2008). Chloroplast Fe (III) chelate reductase activity is essential for seedling viability under iron limiting conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(30), 10619-10624.

Júnior, E. F., Cambraia, J., Ribeiro, C., Oliva, M., Oliveira, J., & DaMatta, F. (2014). The effects of aluminium on the photosynthetic apparatus of two rice cultivars. *Experimental Agriculture*, 50(3), 343-352.

Kinraide, T. B. (1997). Reconsidering the rhizotoxicity of hydroxyl, sulphate, and fluoride complexes of aluminium. *Journal of Experimental Botany*, 48(5), 1115-1124.

Kinraide, T. B., & Parker, D. R. (1987). Non‐phytotoxicity of the aluminum sulfate ion, $AlSO_4^+$. *Physiologia Plantarum*, 71(2), 207-212.

Klinsawathom, T., Songsakunrungrueng, B., & Pattanamahakul, P. (2017). Heavy metal concentration and risk assessment of soil and rice in and around an open dumpsite in Thailand. *Environment Asia*, 10(2).

Kobayashi, T., Nozoye, T., & Nishizawa, N. K. (2019). Iron transport and its regulation in plants. *Free Radical Biology and Medicine*, 133, 11-20.

Kochian, L. V., Hoekenga, O. A., & Pineros, M. A. (2004). How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 459-493.

Koike, S., Inoue, H., Mizuno, D., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S., & Nishizawa, N. K. (2004). OsYSL2 is a rice metal-nicotianamine transporter that is regulated by iron and expressed in the phloem. *The Plant Journal*, 39(3), 415-424.

Kopittke, P. M., & Blamey, F. P. C. (2016). Theoretical and experimental assessment of nutrient solution composition in short-term studies of aluminium rhizotoxicity. *Plant and Soil*, 406, 311-326.

Kopittke, P. M., Moore, K. L., Lombi, E., Gianoncelli, A., Ferguson, B. J., Blamey, F. P. C., Menzies, N. W., Nicholson, T. M., McKenna, B. A., & Wang, P. (2015). Identification of the primary lesion of toxic aluminum in plant roots. *Plant physiology*, 167(4), 1402-1411.

Kuo, M., & Kao, C. (2003). Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biologia Plantarum*, 46, 149-152.

Lanquar, V., Lelièvre, F., Bolte, S., Hamès, C., Alcon, C., Neumann, D., Vansuyt, G., Curie, C., Schröder, A., & Krämer, U. (2005). Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron. *The EMBO journal*, 24(23), 4041-4051.

Lazof, D. B., Goldsmith, J. G., Rufty, T. W., & Linton, R. W. (1994). Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips (a microanalytical study using secondary ion mass spectrometry). *Plant physiology*, 106(3), 1107-1114.

Lee, S., Chiecko, J. C., Kim, S. A., Walker, E. L., Lee, Y., Guerinot, M. L., & An, G. (2009). Disruption of OsYSL15 leads to iron inefficiency in rice plants. *Plant physiology*, 150(2), 786-800.

Li, G., Kronzucker, H. J., & Shi, W. (2016). Root developmental adaptation to Fe toxicity: mechanisms and management. *Plant signaling & behavior*, 11(1), e1117722.

Li, J.-Y., Liu, J., Dong, D., Jia, X., McCouch, S. R., & Kochian, L. V. (2014). Natural variation underlies alterations in Nramp aluminum transporter (NRAT1) expression and function that play a key role in rice aluminum tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17), 6503-6508.

Ligterink, W., & Hirt, H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways in plants: versatile signaling tools. *International Review of Cytology*, 201, 209-275.

Liu, J., Piñeros, M. A., & Kochian, L. V. (2014). The role of aluminum sensing and signaling in plant aluminum resistance. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(3), 221-230.

Loggini, B., Scartazza, A., Brugnoli, E., & Navari-Izzo, F. (1999). Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant physiology*, 119(3), 1091-1100.

Ma, B., Gao, L., Zhang, H., Cui, J., & Shen, Z. (2012). Aluminum-induced oxidative stress and changes in antioxidant defenses in the roots of rice varieties differing in aluminum tolerance. *Plant Cell Reports*, 31, 687-696.

Ma, J. F., & Furukawa, J. (2003). Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. *Journal of inorganic biochemistry*, 97(1), 46-51.

Mahender, A., Swamy, B., Anandan, A., & Ali, J. (2019a). Tolerance of iron-deficient and-toxic soil conditions in rice. *Plants*, 8(2), 31.

Mahender, A., Swamy, B. P. M., Anandan, A., & Ali, J. (2019b). Tolerance of iron-deficient and -toxic soil conditions in rice. *Plants*, 8(2), 31. https://www.mdpi.com/2223-7747/8/2/31

Maxwell, K., & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51(345), 659-668.

Merlot, S., Mustilli, A. C., Genty, B., North, H., Lefebvre, V., Sotta, B., Vavasseur, A., & Giraudat, J. (2002). Use of infrared thermal imaging to isolate *Arabidopsis* mutants defective in stomatal regulation. *The Plant Journal*, 30(5), 601-609.

MIFTAHUDIN, M., NURLAELA, N., & JULIARNI, J. (2007). Uptake and distribution of aluminum in root apices of two rice varieties under aluminum stress. *Hayati Journal of Biosciences*, 14(3), 110-110.

Mitchell, K., & Iadarola, M. J. (2010). RT-PCR analysis of pain genes: use of gel-based RT-PCR for studying induced and tissue-enriched gene expression. *Methods and Protocols*(617), 279-295.

Moreno-Alvarado, M., García-Morales, S., Trejo-Téllez, L. I., Hidalgo-Contreras, J. V., & Gómez-Merino, F. C. (2017). Aluminum enhances growth and sugar concentration, alters macronutrient status and regulates the expression of NAC transcription factors in rice. *Frontiers in Plant Science*, 8, 73.

Morrissey, J., & Guerinot, M. L. (2009). Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. *Chemical reviews*, 109(10), 4553-4567.

Mossor-Pietraszewska, T., Kwit, M., & Legiewicz, M. (1997). The influence of aluminium ions on activity changes of some dehydrogenases and aminotransferases in yellow lupine. *Biological Bulletin of Poznań. Supplement*, 34.

Muhammad, N., Zvobgo, G., & Zhang, G.-p. (2019). A review: The beneficial effects and possible mechanisms of aluminum on plant growth in acidic soil. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(7), 1518-1528.

Mukherjee, I., Campbell, N. H., Ash, J. S., & Connolly, E. L. (2006). Expression profiling of the Arabidopsis ferric chelate reductase (*FRO*) gene family reveals differential regulation by iron and copper. *Planta*, 223, 1178-1190.

Müller, C., Kuki, K. N., Pinheiro, D. T., de Souza, L. R., Siqueira Silva, A. I., Loureiro, M. E., Oliva, M. A., & Almeida, A. M. (2015). Differential physiological responses in rice upon exposure to excess distinct iron forms. *Plant and Soil*, 391, 123-138.

Napasintuwong, O. (2019). *Rice economy of Thailand*.

Olesik, J. W. (1996). Peer reviewed: Fundamental research in ICP-OES and ICPMS. *Analytical Chemistry*, 68(15), 469A-474A.

Osawa, H., & Matsumoto, H. (2001). Possible involvement of protein phosphorylation in aluminum-responsive malate efflux from wheat root apex. *Plant physiology*, 126(1), 411-420.

Palykaew, S., Kheoruenromne, I., Suddhiprakarn, A., Prakongkep, N., Samrit, B., Wongpornprateep, C., & Gilkes, R. (2015). Understanding inland acid sulfate soils in Thailand. *Songklanakarin Journal of Plant Science*, 2(3), 41-47.

Pamonpol, K., & Tokhun, N. (2019). Heavy metal contamination at highland agricultural soil at Dan Sai District, Loei Province, Thailand. *Journal of Public Health and Development*, 17(3), 13-22.

Paul, E. A. (2016). The nature and dynamics of soil organic matter: Plant inputs, microbial transformations, and organic matter stabilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 98, 109-126.

Phukunkamkaew, S., Tisarum, R., Pipatsitee, P., Samphumphuang, T., Maksup, S., & Cha-Um, S. (2021). Morpho-physiological responses of indica rice (*Oryza sativa* sub. *indica*) to aluminum toxicity at seedling stage. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 29321-29331.

Phukunkamkaew, S., Tisarum, R., Sotesaritkul, T., Maksup, S., Singh, H. P., & Cha-Um, S. (2023). Aluminum uptake, translocation, physiological changes, and overall growth inhibition in rice genotypes (*Oryza sativa*) at vegetative stage. *Environmental Geochemistry and Health*, 45(1), 187-197.

Pich, A., Manteuffel, R., Hillmer, S., Scholz, G., & Schmidt, W. (2001). Fe homeostasis in plant cells: does nicotianamine play multiple roles in the regulation of cytoplasmic Fe concentration? *Planta*, 213, 967-976.

Poirier-Pocovi, M., Volder, A., & Bailey, B. N. (2020). Modeling of reference temperatures for calculating crop water stress indices from infrared thermography. *Agricultural Water Management*, 233, 106070.

Pradhan, S., Pandit, E., Pawar, S., Pradhan, A., Behera, L., Das, S., & Pathak, H. (2020). Genetic regulation of homeostasis, uptake, bio-fortification and efficiency enhancement of iron in rice. *Environmental and Experimental Botany*, 177, 104066.

Qi-Long, Z., Rong-Fu, C., Xue-Qiang, Z., Huo-Yan, W., & Ren-Fang, S. (2011). Aluminium uptake and accumulation in the hyperaccumulator *Camellia oleifera* Abel. *Pedosphere*, 21(3), 358-364.

Quinet, M., Vromman, D., Clippe, A., Bertin, P., Lequeux, H., Dufey, I., Lutts, S., & Lefevre, I. (2012). Combined transcriptomic and physiological approaches reveal strong differences between short-and long-term response of rice (*Oryza sativa*) to iron toxicity. *Plant, Cell & Environment*, 35(10), 1837-1859.

Ramachandran, V., Patel, D., & Kumar, S. (2004). Influence of aluminium on mineral nutrients of rice seedlings grown in solution culture. *Indian Journal of Plant Physiology (India)*.

Rengel, Z. (1996). Uptake of aluminium by plant cells. *New Phytologist*, 389-406.

RITCHIE, G. (1989). The chemical behaviour of aluminium, hydrogen, and manganese in acid soils. *Soil acidity and plant growth*, 1, 1-60.

Robson, A. (2012). *Soil acidity and plant growth* (Vol. 1). Elsevier.

Roschzttardtz, H., Conéjéro, G., Curie, C., & Mari, S. (2009). Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the *Arabidopsis* embryo. *Plant physiology*, 151(3), 1329-1338.

Roselló, M., Poschenrieder, C., Gunsé, B., Barceló, J., & Llugany, M. (2015). Differential activation of genes related to aluminium tolerance in two contrasting rice cultivars. *Journal of inorganic biochemistry*, 152, 160-166.

Rout, G. R., & Sahoo, S. (2015). Role of iron in plant growth and metabolism. *Reviews in Agricultural Science*, 3, 1-24.

Sanchez, P. A. (1977). Properties and management of soils in the tropics. *Soil science*, 124(3), 187.

Santi, S., & Schmidt, W. (2009). Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. *New Phytologist*, 183(4), 1072-1084.

Silva, S., Santos, C., Matos, M., & Pinto-Carnide, O. (2012). Al toxicity mechanism in tolerant and sensitive rye genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, 75, 89-97.

Singh, S., Tripathi, D. K., Singh, S., Sharma, S., Dubey, N. K., Chauhan, D. K., & Vaculík, M. (2017). Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 137, 177-193.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

Sivaguru, M., Ezaki, B., He, Z.-H., Tong, H., Osawa, H., Baluška, F. e., Volkmann, D., & Matsumoto, H. (2003). Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 132(4), 2256-2266.

Sivaguru, M., Fujiwara, T., Sˇamaj, J., Baluška, F. e., Yang, Z., Osawa, H., Maeda, T., Mori, T., Volkmann, D., & Matsumoto, H. (2000). Aluminum-induced 1⟶ 3-β-d-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. *Plant physiology*, 124(3), 991-1006.

Sperotto, R. A., Ricachenevsky, F. K., Waldow, V. d. A., & Fett, J. P. (2012). Iron biofortification in rice: it's a long way to the top. *Plant Science* 190, 24-39.

Sun, P., Tian, Q.-Y., Chen, J., & Zhang, W.-H. (2010). Aluminium-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. *Journal of Experimental Botany*, 61(2), 347-356.

Tadesse, T., Nichols, M., Hewett, E., & Fisher, K. (2001). Relative humidity around the fruit influences the mineral composition and incidence of blossom-end rot in weet pepper fruit. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 76(1), 9-16.

Teschner, J., Lachmann, N., Schulze, J., Geisler, M., Selbach, K., Santamaria-Araujo, J., Balk, J., Mendel, R. R., & Bittner, F. (2010). A novel role for *Arabidopsis* mitochondrial ABC transporter ATM3 in molybdenum cofactor biosynthesis. *The Plant Cell*, 22(2), 468-480.

Thakur, A. K., & Singh, K. J. (2012). Leaf temperature as thermal bio-indicator of heavy metal pollutants. *Journal of Agricultural Science and Technology* 2(1A), 131.

Thomine, S., & Lanquar, V. (2011a). Iron transport and signaling in plants. *Signaling and Communication in Plants*, 99-131.

Thomine, S., & Lanquar, V. (2011b). Iron transport and signaling in plants. In *Transporters and pumps in plant signaling* (pp. 99-131). Springer.

Thornton, F., Schaedle, M., & Raynal, D. (1986). Effect of aluminum on the growth of sugar maple in solution culture. *Canadian Journal of Forest Research*, 16(5), 892-896.

Tisarum, R., Pongprayoon, W., Sithtisarn, S., Sampumphuang, T., Sotesaritkul, T., Datta, A., Singh, H. P., & Cha-Um, S. (2021). Expression levels of genes involved in metal homeostasis, physiological adaptation, and growth characteristics of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes under Fe and/or Al toxicity. *Protoplasma*, 1-16.

Ueno, D., Rombola, A., Iwashita, T., Nomoto, K., & Ma, J. (2007). Identification of two novel phytosiderophores secreted by perennial grasses. *New Phytologist*, 174(2), 304-310.

Viana, V., Marini, N., Finatto, T., Ezquer Garin, J., Busanello, C., Dos Santos, R., Pegoraro, C., Colombo, L., & Costa de Oliveira, A. (2017). Iron excess in rice: From phenotypic changes to functional genomics of WRKY transcription factors. *Genetics and Molecular Research*, 3, 1-16.

Wang, W., Zhao, X. Q., Hu, Z. M., Shao, J. F., Che, J., Chen, R. F., Dong, X. Y., & Shen, R. F. (2015). Aluminium alleviates manganese toxicity to rice by decreasing root symplastic Mn uptake and reducing availability to shoots of Mn stored in roots. *Annals of botany*, 116(2), 237-246.

Wu, L.-B., Shhadi, M. Y., Gregorio, G., Matthus, E., Becker, M., & Frei, M. (2014). Genetic and physiological analysis of tolerance to acute iron toxicity in rice. *Rice*, 7, 1-12.

Xia, J., Yamaji, N., Kasai, T., & Ma, J. F. (2010). Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(43), 18381-18385.

Xu, Q., Wang, Y., Ding, Z., Song, L., Li, Y., Ma, D., Wang, Y., Shen, J., Jia, S., & Sun, H. (2016). Aluminum induced metabolic responses in two tea cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 101, 162-172.

Yamaji, N., Huang, C. F., Nagao, S., Yano, M., Sato, Y., Nagamura, Y., & Ma, J. F. (2009). A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. *The Plant Cell*, 21(10), 3339-3349.

YANG, J.-c., Zhang, H., & ZHANG, J.-h. (2012). Root morphology and physiology in relation to the yield formation of rice. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(6), 920-926.

Yang, J. L., Li, Y. Y., Zhang, Y. J., Zhang, S. S., Wu, Y. R., Wu, P., & Zheng, S. J. (2008). Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. *Plant physiology*, 146(2), 602.

Zhang, Y., Xu, Y. H., Yi, H. Y., & Gong, J. M. (2012). Vacuolar membrane transporters OsVIT1 and OsVIT2 modulate iron translocation between flag leaves and seeds in rice. *The Plant Journal*, 72(3), 400-410.

Zhang, Y., Zheng, G. H., Liu, P., Song, J. M., Xu, G. D., & Cai, M. Z. (2011). Morphological and physiological responses of root tip cells to Fe^{2+} toxicity in rice. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 683-689.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมีสำหรับการทดลองที่ 1 การคัดเลือกและศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าว 28 พันธุ์ ภายใต้สภาวะดินกรดที่มีปริมาณของเหล็กและอะลูมิเนียมสูง

1.1 การเตรียมสารละลาย $Al_2(SO_4)_3$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ผสมกับสารละลาย $FeSO_4$ ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 ลิตร

1.1.1 ชั่งสาร $FeSO_4$ 278.05 กรัม และ $Al_2(SO_4)_3$ 166.60 กรัม

1.1.2 ผสมสารทั้งสองในน้ำปริมาตร 10 ลิตร

1.1.3 ปรับค่า pH ของสารละลายด้วย 3 M H_2SO_4 และ/หรือ 3 M NaOH

1.2 การเตรียมสารละลาย 3 M H_2SO_4 ในปริมาตร 250 มิลลิลิตร

1.2.1 ชั่งสาร H_2SO_4 0.073 กรัม ละลายในน้ำ 250 มิลลิลิตร

1.3 การเตรียมสารละลาย 3 M NaOH ในปริมาตร 250 มิลลิลิตร

1.3.1 ชั่งสาร NaOH 0.03 กรัม ละลายในน้ำ 250 มิลลิลิตร

1.4 การเตรียมสารละลาย 50% HNO_3

1.4.1 เตรียมสาร HNO_3 50 มิลลิลิตร

1.4.2 เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ผสมกับ HNO_3 ที่เตรียมไว้ 50 มิลลิลิตร

1.4.3 จะได้สารละลาย 50% HNO_3

1.5 การเตรียมสาร 69% HNO_3

5.1 69% HNO_3 เป็นความเข้มข้นของสารในขวดสารเคมี ซึ่งสามารถนำมาใช้ได้เลย แต่ถ้าสาร HNO_3 จากขวดมีเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นที่มากกว่า 69% สามารถเตรียมได้โดยใช้สูตรการเจือจางสารละลาย $C_1V_1 = C_2V_2$

1.6 การเตรียมสารละลาย 2% HNO_3 ปริมาตร 1 ลิตร

1.6.1 สามารถเตรียมได้โดยใช้สูตรการเจือจางสารละลาย $C_1V_1 = C_2V_2$

$(69\%)V_1 = (2\%)(1000ml)$

$V_1 = 28.98$ มิลลิลิตร

ดังนั้นเติมสาร HNO_3 28.98 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 971.02 มิลลิลิตร

1.7 การเตรียม Standard Aluminum ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10, 15, 20, 25 และ 50 ppm

1.7.1 Standard 1000 ppm เตรียมให้ได้ 50 ppm ใช้ 0.25 ml std + 2%HNO_3 4.75 ml

25 ppm ใช้ 0.125 ml std + 2%HNO_3 4.875 ml

20 ppm ใช้ 0.10 ml std + 2%HNO_3 4.90 ml

15 ppm ใช้ 0.075 ml std + 2%HNO_3 4.925 ml

10 ppm ใช้ 0.05 ml std + 2%HNO_3 4.95 ml

1 ppm ใช้ 1.00 ml std + 2%HNO_3 4.00 ml

0.1 ppm ใช้ 1.00 ml std + 2%HNO_3 4.00 ml

0 ppm ใช้ 2%HNO_3 5.00 ml

การทดลองที่ 2 การศึกษากลไกและการตอบสนองทางสรีรวิทยาของข้าว 3 พันธุ์ภายใต้สภาวะอะลูมิเนียมเป็นพิษที่ความเข้มข้นสูง

2.1 การศึกษาความเป็นพิษของอะลูมิเนียมในรูปของ $Al_2(SO_4)_3$ และ $AlCl_3$ ในสภาวะที่เป็นกรด

2.1.1 การเตรียมสารละลาย

5 mM EDTA เตรียมโดยชั่งสาร EDTA 0.00146 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

20 mM $Al_2(SO_4)_3$ เตรียมโดยชั่งสาร $Al_2(SO_4)_3$ 6.84 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

20 mM $Al_2(SO_4)_3$ + 5 mM EDTA เตรียมโดยชั่งสาร EDTA 0.00146 กรัม และ $Al_2(SO_4)_3$ 6.84 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

1 mM $AlCl_3$ เตรียมโดยชั่งสาร $AlCl_3$ 0.133 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

10 mM $AlCl_3$ เตรียมโดยชั่งสาร $AlCl_3$ 1.33 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

20 mM $AlCl_3$ เตรียมโดยชั่งสาร $AlCl_3$ 2.66 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

20 mM $AlCl_3$ + 5 mM EDTA เตรียมโดยชั่งสาร $AlCl_3$ 2.66 กรัม และสาร EDTA 0.00146 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

หมายเหตุ: สารละลายทุกความเข้มข้นปรับค่า pH ให้ได้ 4.5 โดยปรับด้วย3 M H_2SO_4 และ/หรือ 3 M NaOH

การทดลองที่ 3 การศึกษากลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยา ชีวเคมีและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง ในข้าวพันธุ์ไทยที่ทนต่อสภาวะดินกรดที่มีปริมาณอะลูมิเนียมสูง

3.1 การเตรียม 75% Ethanol

3.2 การเตรียม 5% Clorox

3.3 การเตรียม 25% Clorox

สารเคมีสำหรับเตรียมสูตรอาหาร MS

Stock 1 MS-major salts (50x)

KNO_3	95.00	g L^{-1}
NH_4NO_3	82.50	g L^{-1}
$CaCl_2{\cdot}2H_2O$	22.00	g L^{-1}

Stock 2 MS-minor salts (100x)

H_3BO_3	0.62	g L^{-1}
KH_2PO_4	17.00	g L^{-1}
KI	0.083	g L^{-1}
$Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$	0.025	g L^{-1}
$CoCl_2{\cdot}6H_2O$	0.0025	g L^{-1}

Stock 3 MS-minor salts (100x)

$MgSO_4{\cdot}7H_2O$	37.00	g L^{-1}
$MnSO_4{\cdot}H_2O$	1.69	g L^{-1}
$ZnSO_4{\cdot}7H_2O$	0.86	g L^{-1}
$CuSO_4{\cdot}5H_2O$	0.0025	g L^{-1}

Stock 4 EDTA sodium ferric salts (100x)

EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8{\cdot}2H_2O$) Na_2EDTA	3.725	g L^{-1}
$FeSO_4{\cdot}7H_2O$	2.785	g L^{-1}

Stock 5 MS-vitamins (100x)

Glycine	0.20	g L^{-1}
Nicotinic acid	0.05	g L^{-1}
Thiamine hydrochloride	0.01	g L^{-1}
Pyridoxine hydrochloride	0.05	g L^{-1}
Myo-Inositol	10.00	g

น้ำตาลทราย	30.00	g L^{-1}
Phytagel	5.00	g L^{-1}

3.4 วิธีการเตรียมอาหารสูตร MS สำหรับเพาะเมล็ด เตรียมสารละลาย stock 1-5 สำหรับทำสูตรอาหาร MS นำ stock 1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และ stock 2-5 อย่างละ 10 มิลลิลิตร ผสมรวมกันต่อน้ำ 1 ลิตร (ถ้าต้องการเตรียมอาหารMS มากกว่า 1 ลิตร ให้ใช้ปริมาณ stock ที่เพิ่มขึ้นตามอัตราส่วน) จากนั้นใส่น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร เมื่อน้ำตาลละลายเข้ากับสารละลายจึงปรับค่า pH เป็น 4.5 และใส่ phytagel 2.5 กรัมต่อลิตร คนให้เข้ากันและนำไปอุ่นในไมโครเวฟ 25-30 นาที จนได้สารละลายใส และนำมาเทลงในขวด vial ขนาด 8 ออนซ์ ปิดฝาคลายเกลียว (ไม่ปิดแน่น) นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C หลังจากฆ่าเชื้อแล้วจึงปิดฝาขวดให้แน่น รออาหารแข็งตัวและนำมาใช้งานได้

หมายเหตุ : ไม่ควรเตรียมอาหารไว้นาน เพราะอาจทำให้เกิดการปนเปื้อน (contaminate) จึงควรทำก่อนวันทำการทดลอง 1 วัน

3.5 วิธีการเตรียมอาหารสูตร MS เหลว ใช้วิธีการเตรียมเหมือนกับการเตรียมอาหารสูตร MS แตกต่างตรงที่อาหารสูตร MS สูตรนี้ไม่ใส่ phytagel ลงไปทำให้อาหารมีลักษณะเหลว

3.6 การเตรียม vermiculite โดยนำ vermiculite ล้างด้วยน้ำสะอาด 8-10 รอบ จากนั้นนำมาใส่ในถุงผ้าขาวบางและใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 7 วัน เมื่อ vermiculite แห้ง นำออกจากตู้อบและชั่งใส่ขวดกาแฟขวดละ 15 กรัม และเติมอาหารสูตร MS เหลวลงไป 45 มิลลิลิตรต่อขวด นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C หลังจากฆ่าเชื้อเสร็จปิดฝาขวดให้สนิทรอให้อุณหภูมิลดลงจนถึงอุณภูมิห้องและสามารถนำมาใช้งานได้

3.7 การเตรียมสารละลาย 5 M NaCl เตรียมโดยชั่งสาร NaCl 58 กรัม ใส่ลงในน้ำ Deionized ปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร คนให้ละลายซึ่งอาจใช้เวลานาน จากนั้นนำไป autoclave

3.8 การเตรียม 5% TBE buffer เริ่มจากชั่งสาร Tris base 54 กรัม และกรดบอริก 27.5 กรัม นำไปละลายในสารละลาย 0.5 M EDTA 20 มิลลิลิตร เมื่อสารละลายจนหมดให้ปรับ pH ขออง สารละลายเป็น 8.3 จากนั้นเจือจางสารละลายด้วยน้ำ Deionized เพื่อให้ได้สารละลาย 5X ปริมาตร 1 ลิตร

3.9 การเตรียมสารละลาย 0.5% TBE buffer โดยเติมสารละลาย 5% TBE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในน้ำ Deionized 900 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปใช้

3.10 การเตรียม 1.5% agarose gel ชั่ง agarose gel 1.5 กรัม ละลายในน้ำ Deionized 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเวฟด้วยจนเดือดหรือจนได้สารละลายใส จากนั้นรอให้อุณหภูมิ

ของสารละลายลดลง เทสารละลายลงในภาชนะสำหรับเตรียมเจลหรือ tray รอเจลเซ็ตตัวจนแข็งและนำไปใช้งานได้

3.11 การเตรียม 0.01% EtBr (Ethidium bromide) ชั่งสาร 10 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ Deionized ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวสุวรรณา พู่กันแกมแก้ว
วุฒิการศึกษา	26 เมษายน 2540
ผลงานตีพิมพ์	1. Phukunkamkaew, S., Tisarum, R., Pipatsitee, P., Samphumphuang, T., Maksup, S., Cha-um, S. (2021). Morpho-physiological responses of indica rice (Oryza sativa sub. Indica) to aluminum toxicity at seedling stage. Environmental Science and Pollution Research, doi.org/10.1007/s11356-021-12804-1. 2. Phukunkamkaew, S., Tisarum, R., Sotesaritkul, T., Maksup, S., Singh, H.P., Cha-um, S. (2022). Aluminum uptake, translocation, physiological changes, and overall growth inhibition in rice genotypes (Oryza sativa) at vegetative stage. Environmental Geochemistry and Health, doi.org/10.1007/s10653-022-01291-z.
รางวัลที่ได้รับ	ระดับประถมศึกษา โรงเรียนวัดสิทธาราม จังหวัดอ่างทอง ระดับมัธยมศึกษา โรงเรียนสตรีอ่างทอง จังหวัดอ่างทอง ระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

มหาวิทยาลัยศิลปากร