บทที่ 1

บทนำ

ข้าวนับเป็นธัญญพืชสำคัญที่สุด เนื่องจากเป็นอาหารเลี้ยงประชากรมากว่าครึ่งหนึ่งของประชากรโลก ปัญหาในการทำให้ผลผลิตข้าวต่ำมีหลายประการ ที่สำคัญประการหนึ่งคือพื้นที่ปลูกข้าวมีปัญหาเรื่องน้ำหรือพื้นที่แห้งแล้ง ดังนั้นสถาบันที่มีโครงการวิจัยเกี่ยวกับข้าวทั่วโลกจึงสนใจแก้ปัญหานี้ เพื่อให้การปลูกข้าวมีผลผลิตดีขึ้น (Bajaj, 1991)

ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมดประมาณ 64.4 ล้านไร่ ในจำนวนนี้มีประมาณ 72% เป็นการปลูกข้าวโดยอาศัยน้ำฝน จึงเป็นปัญหาเนื่องจากสามารถปลูกได้ปีละฤดูเดียว โดยเฉพาะภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งเป็นแหล่งปลูกข้าวส่วนใหญ่ของประเทศ แต่เป็นเขตที่มีความแห้งแล้งตามธรรมชาติ และมีพื้นที่ชลประทานเพียง 8% เท่านั้น ทำให้การปลูกข้าวและพืชอื่นประสบปัญหา (ศูนย์สถิติการเกษตร, 2534) การแก้ไขปัญหานี้ทำได้หลายวิธี เช่น การขยายระบบชลประทานให้มากขึ้นแต่เป็นวิธีที่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง ส่วนอีกวิธีหนึ่งคือการปรับปรุงพันธุ์พืชให้เหมาะสมกับสภาวะดังกล่าว ในการปรับปรุงพันธุ์พืชทำได้หลายวิธี เช่น การนำเอาพันธุ์ใหม่ๆมาจากต่างประเทศ การผสมและคัดพันธุ์ การชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมด้วยรังสีหรือ สารเคมี ตลอดจนการคัดเลือกพันธุ์ใหม่จาก somaclonal variation ที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (ประพาส วีระแพทย์, 2526 ; อำพล เสนาณรงค์, 2523 ; Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991)

การพัฒนาสายพันธุ์เพื่อให้ได้ลักษณะใหม่ๆซึ่งมีประโยชน์ต่อการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์พืช โดยการเลี้ยงเซลล์เป็นที่รู้จักกันมานานแล้ว เมื่อนำส่วนต่าง ๆของข้าวมาเลี้ยงก็มีโอกาสได้ต้นข้าวที่กลายพันธุ์ไป สำหรับในพืชอื่นที่ใช้การคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่จาก somaclonal variation ก็ประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิด เช่น ข้าวสาลี อ้อย ยาสูบ หรือมะเขือเทศ เป็นต้น ข้อได้เปรียบของการปรับปรุงพันธุ์โดยการคัดเลือกจาก somaclonal variation ที่เกิดจากการเลี้ยงเซลล์หรือเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือในสภาพขวดทดลองการปรับสภาพแวดล้อมทำได้ง่าย การคัดเลือกในระดับเซลล์ แคลลัส หรืออวัยวะ สามารถทำได้ครั้งละมาก ๆโดยใช้พื้นที่และเวลาจำกัด (Vasil, Scowcroft and Frey, 1982)

Vajrabhaya และ Vajrabhaya (1974) ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวาย โดยพบลักษณะใหม่ ๆหลายลักษณะที่ต่างไปจากลักษณะเดิม Krishnamerthi และ Tlaskal

ประสบผลสำเร็จในการคัดเลือกสายพันธุ์อ้อยที่ต้านทานโรค Fiji จากการเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย (อ้างถึงโดย Scowcroft and Larkin, 1982) Oono (1988) ได้กล่าวถึง somatic mutation ที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าว ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ในการปรับปรุงพันธุ์ หน่วยปฏิบัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ ได้รายงานถึง somatic variation จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ตั้งแต่ปี 1972 (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1974) ต่อมาได้คัดเลือกพันธุ์ใหม่ๆ เช่น สายพันธุ์อ้อยที่ต้านทานโรคแส้ดำ (Tanaboriboon, Poopaka and Vajrabhaya, 1987) สายพันธุ์ข้าวทนเค็ม (Vajrabhaya Thanapaisal and Vajrabhaya, 1989 ; Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991)

นอกจากวิธีการที่กล่าวมาแล้ว การปรับปรุงพันธุ์พืชอีกวิธีหนึ่งซึ่งเป็นแนวทางหรือทฤษฎีค่อนข้างใหม่และนักวิทยาศาสตร์สนใจศึกษาคือการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยผ่านกระบวนการ demethylation ซึ่งนักวิทยาศาสตร์เชื่อว่ากระบวนการนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนและได้มีการทดลองสนับสนุนแนวเหตุผลดังกล่าวคือ ในพืชที่ได้รับการถ่ายยีน (transgenic plant) เนื่องจากมีปัญหาประการหนึ่งคือ พืชไม่สามารถแสดงออกของยีนที่ใส่เข้าไปได้ทั้ง ๆ ที่ตรวจสอบแน่ชัดแล้วว่ามียีนนั้นอยู่ และเมื่อใช้สาร 5-azacytidine ทำให้ยีนนั้นแสดงออกได้ เช่น ในยาสูบ (John and Amasino, 1989 ; Klass et al . , 1989)

ทรงศักดิ์ สำราญสุข (2536) ได้ทดลองให้ 5-azacytidine ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์แก่เมล็ดข้าวพันธุ์ กข.23 เหลืองประทิว และขาวดอกมะลิ 105 เป็นเวลา 20 วัน พบว่าได้ข้าวลักษณะต้นเตี้ย และต้นเตี้ยแตกกอมาก นอกจากนั้นยังให้ 5-azacytidine ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์แก่ต้นอ่อนของข้าว กข.23 สายพันธุ์ทนเค็มอายุ 3 วัน เป็นเวลา 3 วัน พบว่าต้นกล้าข้าวในระยะ 5 ใบมีความสามารถในการทนเค็มเพิ่มขึ้น

งานวิจัยที่ศึกษาในวิทยานิพนธ์นี้เป็นโครงการต่อเนื่องจากโครงการ "การคัดเลือกข้าวทนแล้งจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ" ของ รศ. มนทกานติ วัชราภัย ซึ่งคัดเลือกสายพันธุ์ทนแล้งจาก somaclonal variation ที่เกิดขึ้นเองในขณะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งเมื่อ regenerate แล้วได้สายพันธุ์ทนแล้งทั้งหมดจำนวน 295 สายพันธุ์ และงานวิจัยนี้ทำการคัดเลือกใหม่อีก 3 ชั่วอายุ โดยให้ผ่าน segregation และ recombination ในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยให้ทั้ง 3 ชั่วอายุ เป็น R1, R2, และ R3 รวมทั้งการคัดเลือกบางสายพันธุ์ใน R2 ที่มีอัตราการรอดตาย 20% ขึ้นไป (ในรุ่น R1) มาทำการ demethylation ก่อนแล้วจึงทำการคัดเลือกความทนแล้ง และวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ทนแล้งในโครงการนี้เลือกใช้ polyethylene glycol 6000 เป็นสารชักนำให้เกิดการขาดน้ำ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกข้าวสายพันธุ์ทนแล้ง กข. 23 ที่คัดเลือกมาแล้วในระดับเซลล์ โดยใช้ polyethylene glycol

2. เพื่อศึกษากาแสดงออกของยีนในด้านการทนแล้งหลังจากผ่านกระบวนการ demethylation โดยการใช้ 5-azacytidine

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำรวจเอกสาร

อิทธิพลของความแห้งแล้งที่มีต่อพืช

โดยทั่วไปแล้วความแห้งแล้งหมายถึง สภาพที่ดินขาดน้ำมีผลให้การเจริญเติบโตของพืชลดลงหรืออาจถึงตายได้ อาการขาดน้ำจะรุนแรงเพียงใดขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมทางภูมิอากาศบริเวณนั้น เช่น ความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ อุณหภูมิสูง และความแรงลม จัดว่าเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ และผลผลิตของพืชมากกว่าปัจจัยสภาพแวดล้อมอื่น ๆ (O'Toole, 1982 ; Kramer, 1983)

เมื่อดินขาดน้ำทำให้ค่า water potential ของน้ำในดินลดลงพืชไม่สามารถดูดน้ำไปใช้ได้ ทำให้มีผลกระทบโดยตรงต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของพืช เช่น การสังเคราะห์แสง การปิดของปากใบ การงอกของเมล็ด การเจริญเติบโตของเซลล์ (Kramer, 1983 ; Hale and Orcutt, 1987) หรือทำให้เกิดการสะสมพวก protective metabolite เช่น โพรลีน ซึ่งโพรลีนเป็นกรดอะมิโนที่พบมากกว่าชนิดอื่น และน้ำตาลต่างๆ เพื่อควบคุม osmotic potential ภายในเซลล์ให้มีค่าต่ำมาก ๆ (Bate, Waldren, and Tear, 1973) โดย Patel และ Vora (1985) ได้ทดลองในพืช 4 ชนิด คือ ข้าว สาลี ผักกาดน้ำ (*Plantago ovata*.) ฝิ่น และมัสตาร์ด โดยให้เปอร์เซ็นต์การขาดน้ำต่างๆกัน พบว่าที่ระดับการขาดน้ำต่างกันและพืชต่างชนิดกันมีการสะสมโพรลีนแตกต่างกันด้วย ส่วนพืชอื่นที่มีการศึกษาเช่นเดียวกันได้แก่ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวและฝ้าย (กาญนา สาลีติ๊ด, 2525 ; Bodapati , Donald and Lislile., 1992)

ในข้าวเมื่ออยู่ในสภาพขาดน้ำในขณะที่ต้นกล้ามีอายุ 21 วัน พบว่าข้าวมีความสูง พื้นที่ใบ น้ำหนักแห้งของลำต้น และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของต้นจะลดลง (Yambao and O'Toole, 1984)

Levitt (1973) จำแนกพืชชั้นสูงออกตามความสามารถในการต้านทานต่อสภาพความแห้งแล้งได้ 3 กลุ่มดังนี้

1. Hydrophyte หมายถึง พืชที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อมีความแห้งแล้งระหว่าง -5 บาร์ ถึง -10 บาร์
2. Mesophyte หมายถึง พืชที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อมีความแห้งแล้งมากกว่า -20 บาร์
3. Xerophyte หมายถึง พืชที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อมีความแห้งแล้งมากกว่า -40 บาร์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การปรับตัวของพืชต่อสภาวะการขาดน้ำ

ในสภาวะขาดน้ำพืชมีวิธีการที่จะปรับตัวเพื่อการอยู่รอด 2 วิธี คือ การหลีกเลี่ยงความแล้ง (drought avoidance) และการปรับตัวให้ทนต่อสภาวะแล้ง (drought tolerance) (Kramer, 1983 ; Blum, 1988)

1. Drought avoidance เป็นการหลีกเลี่ยงความแห้งแล้ง โดยการปรับตัวของพืชให้วัฏจักรชีวิตสั้นลง เพื่อให้สามารถดำรงอยู่ในสภาพแวดล้อมได้ โดยมีการงอก เจริญเติบโต ออกดอก และสร้างเมล็ด ภายในเวลา 2-3 สัปดาห์ หลังจากที่ฝนตก จากนั้นต้นเดิมก็จะตาย

2. Drought tolerance พืชสามารถทนต่อสภาวะความแห้งแล้งได้ โดยการปรับตัวให้ทนต่อสภาพดังกล่าว แบ่งเป็น 2 กลุ่มดังนี้

2.1 Dehydration postponement พืชกลุ่มนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือสรีรวิทยาที่ช่วยลดการคายน้ำ หรือเพื่อเพิ่มการดูดน้ำ เช่น การเพิ่มความหนาของคิวติเคิล การปิดเปิดของปากใบ การม้วนของใบ และการเพิ่มความลึกของระบบราก

2.2 Dehydration tolerance พืชกลุ่มนี้เป็นพืชที่ทนต่อความแห้งแล้ง เมื่ออยู่ในช่วงเวลาแห้งแล้งยาวนาน จะมีการปรับ osmotic ภายในเซลล์ให้ต่ำเพื่อให้สามารถดูดน้ำมาใช้ได้ ซึ่งพืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการปรับตัวและทนต่อการสูญเสียน้ำที่แตกต่างกัน

พืชสามารถหลีกเลี่ยงสภาวะขาดน้ำด้วยวิธีการต่างๆ เช่น ลดการคายน้ำโดยสร้างคิวติเคิลซึ่งเป็นผลมาจากค่า EW ของใบ (Leaf epicuticular wax) ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งมีการศึกษาในพืชต่างๆกัน เช่น ข้าว ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี และข้าวโพด (Haque, Mackill, and Ingram, 1991)

สำหรับอัลฟัลฟ่า (*Medicaco sativa* .L) เมื่ออยู่ในสภาพขาดน้ำ พบว่า มีใบ น้ำหนักแห้งของลำต้น มวลชีวภาพของทั้งต้นยกเว้นราก water potential ในใบ stomatal conductance และ osmotic potential ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับพวกที่ไม่ขาดน้ำ (Pennypacker et al., 1990)

อำพล เสนาณรงค์ (2523) ได้รายงานถึง ปัจจัยที่ทำให้พืชต้านทานต่อความแห้งแล้ง

1. การดูดซึม ได้แก่ ปัจจัยที่เกี่ยวกับดิน เช่น ความเข้มข้นของแร่ธาตุอาหารพืช สารพิษ อุณหภูมิ และการถ่ายเทอากาศ ปัจจัยการเจริญของระบบราก เช่น การแผ่กระจาย ความลึกของราก และจำนวนรากชนิดต่าง ๆ

2. การคายน้ำ ได้แก่ ปัจจัยเกี่ยวกับอากาศ เช่น ความชื้นสัมพัทธ์ อุณหภูมิ เป็นต้น

ปัจจัยเกี่ยวกับลักษณะทางกายภาพของพืช ได้แก่ อัตราส่วนระหว่างใบกับราก ขนาดของใบ การม้วนหรือห่อใบเมื่อกระทบแล้ง หรือความหนาของใบจะช่วยให้พืชทนแล้งได้ดี การผลัดใบ มีวัตถุกันน้ำเคลือบผิวใบ มีขนที่ใบ ปากใบที่ฝังลึกมีจำนวนน้อยและขนาดเล็ก จะช่วยให้ระเหยน้ำได้ช้าและทนแล้งดี

การปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้ง

ในระยะแรกส่วนใหญ่เป็นการคัดเลือกในแปลงทดลอง เช่น ข้าวโพด (Fishcher, Johnson, and Edmeades, 1982) ข้าวฟ่าง (Garrity, Sullivan, and Ross, 1982) ข้าวฟ่างไข่มุก (Seetharama et al., 1982) และข้าวสาลี (Richard, 1982)

ที่สถาบันข้าว IRRI (International Rice Reseach Institute) เมื่อปี ค.ศ. 1975-1980 ได้คัดเลือกข้าวทนแล้งโดยนำสายพันธุ์มาจาก GEU (Genetic Evaluation and Utilization Program) และคัดเลือกในช่วงเดือนมกราคมถึงกุมภาพันธ์ พบว่าข้าวสายพันธุ์ Salumpikit ทนต่อความแห้งแล้งได้ดีที่สุด ส่วนพันธุ์ IR 20 ไม่ทนต่อความแห้งแล้งและความร้อน ปากใบปิดช้า และความสูงลดลงสูงสุด (De Datta and Seshu, 1982)

Chaudhary และ Rao (1982) รายงานว่า ข้าวที่ทนต่อสภาพแห้งแล้งมีลักษณะดังนี้คือ ระบบรากลึก ยาว และหนา มีใบหนา ยาวปานกลาง และตั้งตรง มีการยืดขยายของเซลล์ดี ใบแก่ช้า water potential ของใบ ความต้านทานของปากใบ และความต้านทานของ cuticle สูง ต้นสูงปานกลาง มีอัตราส่วนของรากต่อต้นสูง รวงมีน้ำหนักดี เกสรตัวผู้เป็นหมันต่ำ และต้านทานต่อโรคและแมลง

การคัดเลือกพืชทนแล้งในแปลงทดลองนั้นยังมีปัญหาซึ่งทำให้การคัดเลือกยังอยู่ในขอบเขตที่แคบ เนื่องจากมีความแตกต่างของลักษณะดินแต่ละสถานที่ ปริมาณน้ำฝน ความเข้มแสง ส่วนการปรับปรุงด้วยวิธีการผสมพันธุ์ก็มีปัญหาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของดิน โรคและแมลง ที่สำคัญเป็นการยากที่จะทราบถึงความชื้นในดินหรือสภาพความแห้งแล้งในแปลงทดลอง (Chaudhary and Rao, 1982) เมื่อวิทยาศาสตร์เจริญก้าวหน้าขึ้นนักวิทยาศาสตร์ตลอดจนนักปรับปรุงพันธุ์จึงสนใจที่ทำการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยวิธีการทางด้านอื่นๆ ซึ่งอยู่ในห้องปฏิบัติการหรือเรือนทดลอง เนื่องจากสามารถที่จะควบคุมสภาพแวดล้อมต่าง ๆได้สะดวกกว่าการคัดเลือกในแปลง

Somaclonal variation และการปรับปรุงพันธุ์

Somaclonal variation คือความผันแปรของเซลล์ร่างกายที่เกิดขึ้นในขณะเลี้ยงเซลล์ หรือโปรโตพลาส หรือเนื้อเยื่อพืช และพบความผันแปรได้ชัดเจนเมื่อเป็นต้นสมบูรณ์ (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1974, 1991 ; Larkin and Scowcroft, 1981 ; Oono, 1988 ; Lal and Lal, 1990)

Vajrabhaya และ Vajrabhaya (1974) ได้รายงานการผันแปรของกล้วยไม้สกุลหวาย ซึ่ง regenerate มาจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ โดยได้ทดลองใน *Dendrobium* Pompadour .

'Phra Tabha' และ *Dendrobium* May Neal 'Sri Sobhon' พบความผันแปรขนาดของดอกได้แก่ ส่วนของกลีบดอก ปาก และ mid-lobe ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่กลีบเลี้ยงและปากทั้งอันมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งผลในการเปลี่ยนแปลงของกลีบดอกมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของดอกทั้งดอก ความผันแปรในด้านของสีดอกก็พบเช่นกันโดยพบทั้งความเข้มที่เปลี่ยนไปและลักษณะดอกด่าง และเมื่อศึกษาถึงความผันแปรของโครโมโซมก็พบว่าแตกต่างไปจากต้นเดิม การเปลี่ยนแปลงในส่วนโครโมโซมนี้ไม่ว่าจะเป็นจำนวนหรือเพียงบางส่วนของโครโมโซมก็มีผลต่อลักษณะที่แสดงออกมา เมื่อนำต้นที่กลายไปนี้มาปลูกต่ออีกหลาย ๆปี พบว่าลักษณะที่กลายไปคงที่ แสดงว่าเกิดจาก mutation ที่ยีนควบคุมลักษณะนั้น ๆ

สำหรับความผันแปรของเซลล์ร่างกาย นักวิทยาศาสตร์รายงานว่าเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม (ประสาทพร สมิตะมาน, 2530 ; Larkin and Scowcroft, 1981 ; Zakri, 1985 ; Lynch et al., 1991 ; Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991) ซึ่งมีการศึกษาเป็นเวลานานมาแล้ว โดยเฉพาะในพืชกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าวสาลี พบลักษณะความผันแปร ความสูงที่เพิ่มขึ้น ลักษณะช่อดอก รูปร่างเมล็ด จำนวนเมล็ดต่อรวง และน้ำหนักเมล็ดที่เพิ่มขึ้น ((Johnson and Nguyen , 1984 ; Mohmand and Nabors, 1990)

เกี่ยวกับความผันแปรของเซลล์ร่างกายในข้าวนั้น Nishi และ คณะ (1968) รายงานครั้งแรกจากการเลี้ยงแคลลัสข้าว ซึ่งพบลักษณะต้นเตี้ย และลักษณะต้นที่บิดเป็นเกลียว ต่อมาได้มีรายงานความผันแปรของเซลล์ร่างกายในข้าวมากขึ้นโดยพบลักษณะต้นเตี้ย ลักษณะขาวเผือก ความสูงลดลง จำนวนหน่อที่ให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น การออกดอกช้า (46.7%) หรือเร็ว (9.3%) กว่าปกติ ความสมบูรณ์ของเมล็ดลดลง จำนวนรวงต่อกอ จำนวนเมล็ดต่อรวง น้ำหนักเมล็ดลดลง และลักษณะหางเมล็ดที่เปลี่ยนไป (Oono, 1984, 1985 ; Oono et al., 1986 ; Zhao et al, 1984 ; Jun, Rush and Nabors, 1987)

ความผันแปรของเซลล์ร่างกายที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นมีโอกาสเกิดขึ้นได้มาก ซึ่งพบว่าความถี่ในการเกิดการกลายพันธุ์สูงกว่าในธรรมชาติ (Lal and Lal, 1990 ; Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991) ลักษณะที่กลายไปนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกลักษณะที่ดีเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ หรือคงลักษณะพันธุ์เดิมแต่เพิ่มคุณสมบัติในการต้านทานต่อสภาพแวดล้อมต่างๆที่ไม่เหมาะสม เช่น ลักษณะดินเค็ม หรือดินเปรี้ยว ทนต่อความแห้งแล้ง ทนต่อโรคและแมลง เป็นต้น (Vajrabhaya et al., 1984 ; Evans et al., 1986 ; Widholm, 1988)

การคัดเลือกพืชที่มีความต้านทานต่อสภาวะไม่เหมาะสมทำได้โดย การเติมสารชักนำให้เกิดสภาวะดังกล่าวในสารอาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือต้นพืช เช่น การคัดเลือกเซลล์ทนเค็มโดยใช้โซเดียมคลอไรด์ การคัดเลือกเซลล์ทนแล้งโดยใช้ PEG (polyethylene glycol) การคัดเลือก

เซลล์ที่ทนต่อดินเปรี้ยวโดยเลี้ยงในสารอาหารที่มีสภาพเป็นกรด และคัดเลือกเซลล์ที่ทนร้อนโดยเลี้ยงในที่อุณหภูมิสูงเป็นต้น (Dykes and Nabors, 1985 ; Sun, Sun, and Shu, 1991 ; Vajrabhaya et al . , 1989 ; Vajrabhaya and Vajrabhaya , 1991)

Vajrabhaya และคณะ (1989) ได้คัดเลือกสายพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) กลุ่ม indica ที่ทนเค็ม ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และเหลืองประทิว 123 โดยนำเอา embryogenic callus มาเลี้ยงในอาหารที่เติม NaCl 2% เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นจึงย้ายมาเลี้ยงต่อในอาหารธรรมดา พบว่าอัตราการ regenerate ของแคลลัสเหล่านี้ลดลงไปมาก เหลือรอดเพียง 0.076% ในขณะที่อัตราการ regenerate ของแคลลัสปกติ 8.3-30% นำต้นอ่อนที่คัดเลือกมาแล้วมาปลูกในสภาพปกติ เพื่อเก็บเมล็ด และคัดเลือกต่อในระยะต้นกล้าระยะ 5 ใบ พบว่าสายพันธุ์ที่ได้ผลดีที่สุดคือเหลืองประทิว 123 ซึ่งในชั่วอายุที่ 3 ยังมีการรอดอยู่ถึง 94.3% ในขณะที่ต้นยังไม่ได้คัดเลือกมีอัตราการรอดเพียง 2% เท่านั้น ซึ่งคณะผู้วิจัยได้คัดเลือกต่อไปเรื่อย ๆของข้าวสายพันธุ์นี้ จนถึงปัจจุบัน (1995) พบว่าอัตราการรอดของสายพันธุ์นี้อยู่ระหว่าง 93-98% แสดงว่ายีนที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ในระหว่างการเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งเป็นยีนทนเค็มมีลักษณะคงที่ ซึ่งน่าจะเป็นยีนที่เกิดจาก somatic mutation

Vajrabhaya และ Vajrabhaya (1991) ให้ข้อเสนอแนะว่า การคัดเลือกสายพันธุ์ทนเค็มในข้าวนั้น เมื่อคัดเลือกในระดับเซลล์แล้วควรคัดเลือกในระดับต้นด้วย และการคัดเลือกนี้ควรกระทำต่อเนื่องกัน 3 ชั่วอายุ เพื่อให้แน่ว่าลักษณะที่ได้นั้นเป็นลักษณะที่เสถียร และการคัดเลือกในรุ่นลูกอีก 2-3 ชั่วอายุ หลังจากที่คัดเลือกจากเซลล์หรือ regenerate plants แล้วยังเป็นการให้โอกาสยีนเกิด recombination ทุกครั้งที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

การคัดเลือกข้าวทนแล้งด้วย PEG 6000

การคัดเลือกข้าวทนแล้งสามารถทำได้โดยการใช้ PEG ซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า carbowaxes มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 300-20,000 มีสูตรทางเคมีคือ $HOCH_2(OCH_2CH_2)_xOH$ และเป็นพิษต่อคนน้อยมาก (Jackson, 1962) เป็นสารออสโมติคัมที่สามารถควบคุมการเกิดออสโมซีสระหว่างน้ำกับพืชได้

ทางด้านสรีรวิทยาของพืช นักสรีรวิทยาได้นำ PEG มาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างน้ำกับพืชมานานแล้ว เช่น Kaufmann and Eckard (1971) จากการศึกษาความสัมพันธ์ของน้ำกับต้นพริก (*Capsicum frutescens* L.) ภายใต้สภาพ guttation โดยใช้ PEG 6000 ในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland's ครึ่งส่วน เพื่อทำให้เกิดสภาพการขาดน้ำและทำให้ water potential ในสารละลายหมือนกับ water potential ในดิน โดยเฉพาะ pressure potential ของท่อลำเลียงน้ำในรากและใบ จะเป็นลบมาก เมื่ออยู่ในช่วงเวลาที่ชักนำให้เกิดการขาดน้ำ 24 ชม. ในขณะที่ osmotic

potential ของท่อลำเลียงน้ำในรากคงที่ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ PEG 400 พบว่า การใช้ PEG 400 ทำให้ osmotic potential ในท่อลำเลียงน้ำของรากไม่คงที่ และทำให้เกิด guttation ที่ -4.8 บาร์ และ pressure potential ของท่อลำเลียงน้ำในราก และใบ จะติดลบเมื่อ osmotic potential ในสารละลายต่ำกว่า -4.8 บาร์ นอกจากนั้นยัง พบว่า PEG 400 จะทำให้เพิ่มการสะสม K^+, Na^+, Ca^+และ Mg^+ ในท่อลำเลียงน้ำของราก ซึ่งการทดลองนี้จะแสดงว่า PEG ที่มีโมเลกุลใหญ่เช่น PEG 6000 จะทำให้เกิดสภาพการขาดน้ำ เช่นเดียวกับในดินได้ดีกว่า PEG ที่มีโมเลกุลเล็ก เช่น PEG 400

Yambao และ O'Toole (1984) ได้ศึกษาผลของไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโต การดูดไนโตรเจนและ osmotic potential ของกล้าข้าวอายุ 21 วัน (*Oryza sativa* L. CV. IR36) ในระหว่างการขาดน้ำโดยศึกษาที่มีระดับไนโตรเจนสูง 28.6 $x10^{-4}$ M และระดับไนโตรเจนต่ำ 7.14 $x10^{-4}$ M และชักนำให้เกิดสภาพการขาดน้ำด้วยการใช้ PEG 6000 เพื่อลด osmotic potential ในสารละลายธาตุอาหาร และ water potential ในสารละลายธาตุอาหาร -0.6 x 10^5 Pa , -1 x 10^5, -2 x 10^5, -4 x 10^5 และ -6 x 10^5 ตามลำดับ ซึ่งพบว่า ที่ระดับไนโตรเจนทั้งสองระดับกล้าข้าวมีความสูง พื้นที่ใบ และน้ำหนักแห้งของต้นลดลงเมื่อ osmotic potential อยู่ในระดับต่ำ และที่ระดับไนโตรเจนสูงกล้าข้าวมีการเจริญของต้นลดลงมากกว่าที่ไนโตรเจนระดับต่ำ แต่ที่ไนโตรเจนระดับต่ำกล้าข้าวมีน้ำหนักแห้งของรากมากกว่าทั้งที่อยู่ในสภาพการขาดน้ำและไม่ขาดน้ำ แต่การนำไนโตรเจนไปใช้ยากเมื่ออยู่ในสภาพการขาดน้ำเนื่องจาก water potential ในใบจะสูงกว่าที่พืชอยู่ในสภาพการขาดน้ำของระดับไนโตรเจนสูง

สำหรับการนำ PEG มาใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้มีรายงานโดย Heyser และ Nabors (1979) ซึ่งเป็นกลุ่มแรกที่คัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสภาวะไม่เหมาะสมโดยใช้ PEG (อ้างถึงใน Evans et al., 1983) ต่อมา Handa และคณะ (1983) ได้ทดลองใช้ PEG เป็นสารชักนำให้เกิดการขาดน้ำในการคัดเลือกมะเขือเทศที่ทนต่อสภาพความแห้งแล้งจาก somaclonal variation พบว่าการใช้ PEG 6000 ความเข้มข้น 25% เป็นสารคัดเลือกเซลล์ทนแล้งในระดับเซลล์ได้ผลดี

Kavi Kishor และ Reddy (1986) รายงานถึงการทดสอบแคลลัสที่เกิดจากการเลี้ยงเอมบริโอของข้าวพันธุ์ Tellahamsa และย้ายแคลลัสเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1% และ PEG ความเข้มข้น 2.5% พบว่าแคลลัสสามารถที่เจริญเป็นต้นได้ 20-25% และ 35-38% ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Siddeswar และ Kavi Kishor (1986) ได้เลี้ยงแคลลัสข้าวพันธุ์ Tellahamsa และ Sureka ในสารอาหารที่เติม PEG ความเข้มข้น 10, 20, 30, และ 50 กรัมต่อลิตร จากนั้นทดสอบความสามารถในการเจริญเป็นต้นในสารอาหารสังเคราะห์ที่เติม PEG ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร พบว่าแคลลัสจากการเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่เติม PEG ความ

เข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร สามารถเจริญเป็นต้นใหม่ได้ดีที่สุด ในขณะที่แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ที่ไม่เติม PEG ไม่สามารถเจริญเป็นต้นได้

กิตติ โพธิปัทมะ (2531) ได้ศึกษา embryogenic callus ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว ขาวดอกมะลิ และ พันธุ์กข. 23 ที่เลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีออสโมติคัม 3 ชนิด ได้แก่ manitol, sorbitol และ PEG 6000 ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ามีการเจริญของแคลลัสแตกต่างกัน คือ PEG 6000 ความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตรช่วยให้แคลลัสข้าวพันธุ์เหลืองประทิวและขาวดอกมะลิมีดัชนีการเจริญสูง นอกจากนี้ยังพบว่าแคลลัสข้าวเหลืองประทิวตอบสนองต่อออสโมติคัมดีกว่าแคลลัสข้าวอีก 2 พันธุ์ ภายหลังการย้ายแคลลัสดังกล่าวมาเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิด greenspot และหน่อใหม่ พบว่าเปอร์เซนต์ของแคลลัสข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่เกิด greenspot ซึ่งเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีออสโมติคัมมาก่อนก็เจริญไม่ดีกว่าแคลลัสที่อยู่บนอาหารสูตรที่ไม่มีออสโมติคัมตั้งแต่แรก และเปอร์เซนต์ของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่เกิด greenspot มีค่ามากที่สุดในสัปดาห์ที่ 2 เมื่อศึกษา greenspot ที่พัฒนาเป็นหน่อใหม่แล้ว พบว่าแคลลัสข้าวเหลืองประทิวและขาวดอกมะลิที่ผ่านการเจริญบนอาหารสูตรที่มี PEG 6000 ความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร เกิดหน่อใหม่จากแคลลัสทั้งหมด คิดเป็น 25% ส่วนข้าวพันธุ์ กข. 23 มีการเจริญหน่อใหม่ต่อจำนวนแคลลัสทั้งหมด 18.75% ซึ่งไม่แตกต่างจากแคลลัสที่ผ่านการเจริญบนอาหารสูตรที่ไม่มีออสโมติคัม

นอกจาก PEG แล้วสารอื่นที่มีคุณสมบัติเหมือนกันได้แก่ manitol, sorbitol, glucose, sucrose และ NaCl แต่ว่า PEG และ manitol มีการใช้มากกว่าเพราะเป็นสารที่ inert ไม่เป็นพิษ แต่ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 6,000-20,000 ถูกนำมาใช้มากกว่าสาร manitol เนื่องจากบางครั้งพบว่า manitol สามารถซึมเข้าในเมล็ดขณะกำลังงอกได้ นอกจากนั้นเมื่อเปรียบเทียบ water potential ของ PEG 20,000 ที่เตรียมขึ้นใหม่ ๆ กับที่เตรียมไว้ 28 วัน พบว่ามีค่าเท่ากัน ซึ่งแสดงว่ามี osmotic stability สูง และจากการทดสอบความงอกของ winter wheat ในสารละลาย PEG 20,000 และ manitol พบว่าเปอร์เซนต์การงอกใน PEG 20,000 และเปอร์เซนต์การงอกในดินที่มีความชื้นต่างๆมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรง แต่เปอร์เซนต์การงอกในสารละลาย manitol กับในดินที่ความชื้นต่าง ๆไม่มีความสัมพันธ์กัน (Ounruen , Maneepong and Ratanadilok , 1981) เช่นเดียวกับ Handas (1977) ได้รายงานผลการทดสอบความงอกของเมล็ดข้าวฟ่าง ถั่วลันเตา ถั่วหัวช้าง และ vech (*Vicia sativa* L.) เมื่อเพาะในสารละลาย PEG 6000 โดยควบคุม water potential และเมื่อเพาะในแปลงทดลองที่ควบคุม water potential ระดับต่าง ๆ พบว่าการงอกเมื่อเพาะในสารละลาย PEG และเมื่อเพาะในแปลงทดลองมีความสัมพันธ์กัน ดังนั้นเราสามารถที่จะทดสอบความงอกโดยเพาะในสารละลาย PEG ที่ควบคุม water potential แทนการทดสอบในไร่นาได้ และควรจะได้ผลดีกว่าการทดสอบในไร่นาโดยตรง เพราะในไร่นาเราควบคุมปัจจัยเกี่ยวกับ

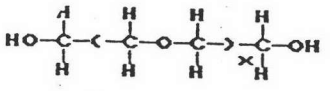
ความชื้นในดินยากกว่าการทดสอบในห้องปฏิบัติการ ดังนั้น PEG จึงมีการใช้กันมากในการคัดเลือกพืชหลายชนิด

Singh และ Singh (1983) ได้ทำการศึกษาเพื่อคัดเลือกข้าวทนแล้งของข้าวพันธุ์ IR-28 ,T-23 และ IR 8 โดยใช้สารละลาย PEG เพื่อชักนำให้เกิดสภาวะการขาดน้ำในระหว่างการงอกของเมล็ด พบว่าเปอร์เซนต์การงอกของเมล็ด และการดูดน้ำของเมล็ดที่กำลังงอกจะลดลงเมื่อลดค่า water potential ของน้ำภายนอก เช่นเดียวกับ สมเดช อิ่มมาก (2532) ได้ศึกษาการเจริญของกล้าข้าว 8 พันธุ์ ซึ่งปลูกในกล่องปลูก ที่ถูกควบคุมสภาวะการขาดน้ำในดินโดยใช้สารละลาย PEG 6000 พบว่า กล้าข้าวทั้ง 8 พันธุ์ แสดงลักษณะการเจริญของราก ความสูงที่เพิ่มขึ้น พื้นที่ใบ และน้ำหนักแห้งของลำต้น มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และในขณะเดียวกันพบว่า การห่อของใบ ความต้านทานแล้ง และการฟื้นตัวจากความแห้งแล้งมีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับลักษณะการเจริญของกล้าข้าวที่ถูกควบคุมสภาวะความเครียดด้วย PEG 6000

Ounruen และคณะ (1981) ได้ศึกษาถึงอิทธิพลของความแห้งแล้งที่มีต่อพืช 4 ชนิด คือ มิลเล็ต ข้าวฟ่าง ข้าวไร่ และถั่วเขียว โดยใช้ PEG 6000 เป็นตัวควบคุมระดับความแห้งแล้ง 3 ระดับคือ 0, -5 และ -10 บาร์ พบว่าถั่วเขียว มีความต้านทานต่อระดับความแห้งแล้งต่ำที่สุด โดยไม่สามารถงอกได้อย่างปกติที่ระดับความแห้งแล้ง -5 และ -10 บาร์ ระดับความแห้งแล้งที่จะใช้ทดสอบพันธุ์เพื่อคัดเลือกพันธุ์ต้านทานควรจะต่ำกว่า -5 บาร์ ข้าวไร่ได้รับผลกระทบของระดับความแห้งแล้งที่ -10 บาร์ สูงกว่าที่ระดับ -5 บาร์มาก ดังนั้นระดับความแห้งแล้งที่จะใช้ทดสอบพันธุ์เพื่อคัดพันธุ์ต้านทานควรจะอยู่ระหว่าง -5 ถึง -10 บาร์ ข้าวฟ่างได้รับผลกระทบที่ -5 และ-10 บาร์ใกล้เคียงกันและมีผลกระทบต่ำ ระดับที่ใช้ทดสอบพันธุ์ควรสูงกว่า -10 บาร์ ส่วนมิลเล็ต มีผลกระทบของระดับความแห้งแล้งทั้ง 3 ระดับใกล้เคียงกันและมีผลกระทบสูง ระดับความแห้งที่จะใช้ทดสอบควรจะต่ำกว่า -10 บาร์

แนวทางการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีดีเมทธิลเลชัน

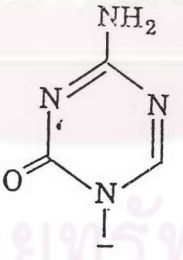
DNA ของสิ่งมีชีวิตชนิดยูคาริโอตทุกชนิดเกิดกระบวนการ methylation โดยการเติมหมู่ methyl ที่ตำแหน่งที่ 5 ของเบสชนิด cytosine กระตุ้นโดยเอนไซม์ methylase (ภาพที่ 3) พบว่าในยีนที่แอกทีฟมี DNA methylation ต่ำกว่ายีนที่ไม่แอกทีฟ โดยสังเกตุจากการเกิดกระบวน transcription



Polyethylene Glycol 6000
(x = 135-169)

ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้าง polyethylene glycol 6000

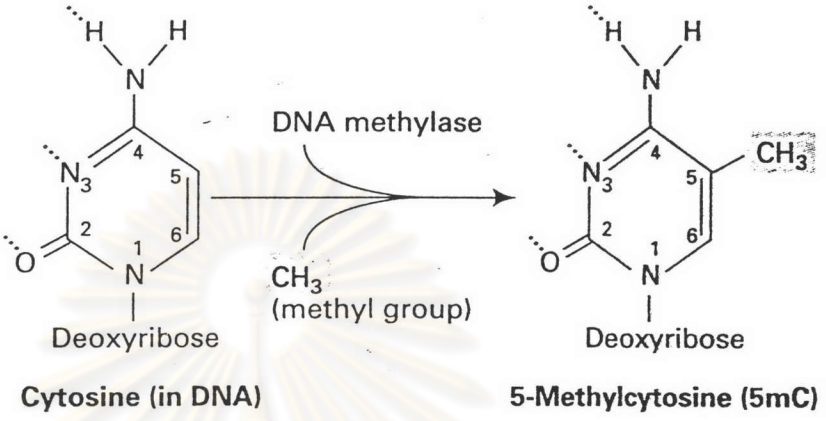
X = 135 - 169



5-Azacytosine
(5-azaC)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 2 โครงสร้างของ 5-azacytidine (Voet , 1990)



ภาพที่ 3 การเกิด 5-methylcytosine จาก cytosine ในสาย DNA กระตุ้นโดยเอนไซม์ DNA methylase (Russell , 1992)

จึงเชื่อว่ายีนบางยีนที่ไม่แสดงออกหรือไม่แอกทีฟอาจเนื่องจากมีระดับของกระบวนการ DNA methylation สูง (John and Amasino , 1989) จากหลักการนี้มีนักวิจัยจำนวนมากที่ได้ศึกษาการใช้สารบางอย่างที่เป็น base analog ของ cytosine และสามารถป้องกันการเกิด methylation โดยใช้ 5-azacytidine ซึ่งเป็น nucleoside ที่มีเบสเป็น 5- azacytosine และเป็น analog ของ cytosine ต่างกันที่ตำแหน่งที่ 5 ของ pyrimidine ring โดยเป็น carbon ใน cytosine และเป็น nitrogen ใน 5-azacytidine เมื่อ analog นี้เข้าไปรวมเป็นส่วนหนึ่งของ DNA แทน cytidine มันจะไม่สามารถถูกเติมหมู่ methyl เป็น 5-methylcytidine ทำให้เซลล์ที่ได้รับ 5-azacytidine มีระดับการเติมหมู่ methyl ที่ DNA ลดลงเรียกว่า demethylation หรือ undermethylation หรือ hypomethylation (Santi et al., 1983 ; Jones, 1985 ; Sano et al., 1989, 1990)

ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบลูกผสม *Nicotiana glauca* x *N. langsdorffii.* ที่ผ่านการฉายรังสี x-rays ทำให้ไม่ให้สร้าง tumor พบว่าการใช้ 5-azacytidine ในสารอาหารสังเคราะห์ ยาสูบลูกผสม

สามารถที่จะกลับมาสร้าง tumor ได้ การใช้ 5-azacytidine ทำให้เกิด demethylation ซึ่งเป็นผลให้ยีนบางยีนที่ไม่แสดงสามารถแสดงออกมาได้ (Durante et al., 1989)

Sano และคณะ (1989) ได้ให้สาร 5-azacytidine ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ แก่ข้าวโพดอายุ 3 วัน เป็นเวลา 16 ช.ม. พบว่าต้นข้าวโพดมีลักษณะความสูงลดลง 28% เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับ 5-azacytidine

Sano และคณะ (1990) ได้ให้ 5-azacytidine แก่ข้าว (*Oryza sativa.* L.) พันธุ์ Ginbusu ซึ่งเป็นข้าว Japonica โดยใช้ 5-azacytidine ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ แก่ข้าวอายุ 3 วัน เป็นเวลา 3 วัน เมื่อปลูกจนโตเต็มที่ พบว่าข้าวมีลักษณะปกติยกเว้นความสูงลดต่ำกว่าปกติ 15% รุ่นลูก M_1 ที่ได้จากการผสมตัวเองของต้นเตี้ยที่ถูกชักนำด้วย 5-azacytidine มีการกระจายของต้นเตี้ย 35% และต้นสูง 65% ส่วนลูก M_2 ที่ได้จากการผสมตัวเองของต้นเตี้ย M_1 จะมีลักษณะต้นเตี้ยหมด และรุ่นลูก M_2 ได้จากการผสมตัวเองของต้นสูงจะมีลักษณะสูงหมด และ ลักษณะต้นเตี้ยสามารถถ่ายทอดได้ จากการทดลองนี้กระบวนการ demethylation น่าจะมีผลต่อยีนที่ควบคุมความสูงของพืชด้วย

ทรงศักดิ์ สำราญสุข (2536) ได้ให้สารลดการเติมหมู่ methyl ที่เบส cytosine ของ DNA คือ 5-azacytidine ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ แก่เมล็ดข้าว (*Oryza sativa*. Linn.) พันธุ์ กข. 23 เหลืองประทิว และ ขาวดอกมะลิ 105 ในหลอดแก้วเป็นเวลา 20 วัน พบว่าได้ข้าวลักษณะต้นเตี้ย และต้นเตี้ยแตกกอเร็ว เมื่อข้าวเจริญเต็มที่ พบลักษณะต้นเตี้ยและต้นเตี้ยแตกกอมาก ลูกที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวพันธุ์ กข.23 ลักษณะต้นเตี้ยและแตกกอมาก มีการกระจายของลักษณะเป็นต้นสูงปกติแตกกอปกติ ต้นสูงปกติแตกกอมากและต้นเตี้ยแตกกอมาก นอกจากนั้นยังให้ 5-azacytidine ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ แก่ต้นอ่อนของข้าว กข. 23 สายพันธุ์ทนเค็มอายุ 3 วัน เป็นเวลา 3 วัน พบว่า ต้นกล้าข้าวในระยะ 5 ใบ มีความสามารถในการทนเค็มเพิ่มขึ้น

จากผลงานทดลองแสดงให้เห็นว่าแนวทางปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการชักนำให้เกิด demethylation เพื่อให้ยีนมีโอกาสแสดงออกมา น่าจะเป็นวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบวิธีการคัดเลือกข้าวทนแล้ง
2. มีโอกาสได้ข้าวทนแล้งสายพันธุ์ กข.23 พันธุ์ใหม่