ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การควบคุมทางพันธุกรรมของปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าว

ผู้เขียน นางสาวเพ็ญนภา จักรสมศักดิ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) พืชไร่

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. ศันสนีย์ จำจด ประธานกรรมการ
ศ.ดร. เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม กรรมการ

บทคัดย่อ

ธาตุเหล็กเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อร่างกายมนุษย์ พบว่าประชากรที่มีภาวะพร่องธาตุเหล็กและโรคโลหิตจางจากการขาดธาตุเหล็กมีอยู่เป็นจำนวนมาก ธาตุเหล็กที่ร่างกายได้รับมาจากการบริโภคธัญพืชเป็นส่วนใหญ่ แต่พบว่าข้าวเป็นธัญพืชที่มีธาตุเหล็กต่ำเมื่อเทียบกับธัญพืชอื่นๆ ดังนั้นนับว่าเป็นปัญหาสำหรับประชากรในทวีปเอเชียที่บริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก เช่นเดียวกับประเทศไทยด้วยที่พบว่าพันธุ์ข้าวที่นิยมบริโภคส่วนใหญ่นั้นมีปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดต่ำ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยเพิ่มปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดให้สูงขึ้น การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษาการควบคุมทางพันธุกรรมของปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าว ทดลองที่ศูนย์วิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร และภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2547 ถึง เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2550

การทดลองที่ 1 ศึกษาการแสดงออกของยีนในลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพ่อแม่พันธุ์เหล็กสูง x เหล็กต่ำ และคู่ผสมสลับพ่อแม่ (reciprocal cross) จำนวน 23 คู่ผสมโดยมีพันธุ์เหล็กสูง คือ IR68144 CMU122 และ Jalmagna พันธุ์เหล็กต่ำ คือ ชัยนาท 1 สุพรรณบุรี 1 ขาวดอกมะลิ 105 กข 6 เหนียวอุบล 2 หอมสุพรรณบุรี บางแตน และก่ำดอยสะเก็ด ปลูกในกระถางพลาสติกบรรจุดิน วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ และปลูก 5 ต้นต่อกระถาง เมื่อระยะสุกแก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เก็บเมล็ดแยกต้น และสุ่มเมล็ดออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำมาวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้องโดยวิธีทางเคมี ส่วนที่สองนำไปวัดลักษณะสัณฐานเมล็ดข้าวกล้อง ได้แก่ ความยาว ความกว้าง และรูปร่าง (ยาว : กว้าง) จากการเปรียบเทียบปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้องของลูกผสมชั่วที่ 1 กับพันธุ์พ่อแม่ พบว่าการแสดงออกของยีนเป็นแบบข่ม (dominant gene action) โดยมีตั้งแต่ข่มไม่สมบูรณ์ (partial dominant) จนถึงแบบข่มสมบูรณ์ (complete dominant) ปริมาณธาตุเหล็กของลูกผสมชั่วที่ 1 มีค่าอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกับพันธุ์พ่อแม่ที่มีเหล็กสูง ไม่พบความแตกต่างระหว่างคู่ผสมสลับพ่อแม่ และจากการวัดลักษณะทางสัณฐานเมล็ด สามารถจัดกลุ่มลักษณะความยาวและรูปร่างเมล็ด ได้ 7 กลุ่ม และพบว่าความยาวและรูปร่างเมล็ดมีความสัมพันธ์กับปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ด

การทดลองที่ 2 ศึกษาจำนวนยีนที่ควบคุมปริมาณธาตุเหล็ก จากการประเมินการกระจายตัวของปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้องของลูกผสมชั่วที่ 2 ได้เลือกคู่ผสมหนึ่งคู่จากการทดลองที่ 1 คือ คู่ผสมระหว่าง IR68144 (เหล็กสูง) x ชัยนาท 1(เหล็กต่ำ) จำนวน 100 ต้น และพันธุ์พ่อแม่ พันธุ์ละ 15 ต้น ปลูกเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 สุ่มเมล็ดเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำเมล็ดมาวัดปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้องโดยวิธีทางเคมี ส่วนที่สองนำมาประเมินปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้องโดยวิธีการย้อมสีเพริ์ล พรัสเซียนบลู (Perls' Prussian Blue; PPB) นำปริมาณธาตุเหล็กของลูกผสมชั่วที่ 2 มาจัดแยกกลุ่มการกระจายตัวเปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อแม่ และทดสอบการกระจายตัวโดยวิธี chi-square test (χ^2 test) พบว่าปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดถูกควบคุมด้วยยีนหลัก 2 ยีน โดยมีสัดส่วนการกระจายตัวเท่ากับ 1 (เหล็กสูง): 14 (เหล็กปานกลาง):1 (เหล็กต่ำ) สำหรับการประเมินปริมาณธาตุเหล็ก โดยวิธีการย้อมสี PPB โดยสังเกตจากความเข้มของการติดสีย้อมบริเวณของ embryo พบว่าการย้อมสี PPB สามารถแยกความแตกต่างในพันธุ์พ่อแม่ที่มีเหล็กสูงและเหล็กต่ำจากระดับการติดสีย้อมที่แตกต่างกัน โดยพันธุ์ IR68144 (เหล็กสูง) ติดสีเข้ม (+++) ทั้งหมด และพันธุ์ชัยนาท 1 (เหล็กต่ำ) ติดสีย้อมทั้ง 3 ระดับ โดยติดสีย้อมปานกลาง (++) มากที่สุด พบความสัมพันธ์ระหว่างการประเมินปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้องโดยการย้อมสี PPB กับการวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้องด้วยวิธีการทางเคมี แต่การย้อมสี PPB ไม่สามารถแยกการกระจายตัวของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ได้ ดังนั้นการวิเคราะห์โดยวิธีทางเคมีจึงเหมาะสำหรับการประเมินการกระจายตัวของปริมาณธาตุเหล็กในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2

สำหรับการหาตำแหน่งยีนโดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่าง molecular marker กับลักษณะปริมาณธาตุเหล็ก โดยเก็บตัวอย่างใบข้าวแยกต้น เมื่อต้นข้าวมีอายุประมาณ 30 วัน แล้วนำไปวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้วิธี SSR markers จากจำนวน markers 77 ตัว พบว่ามี 28 ตัว ที่แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แม่ได้ จากนั้นนำมาศึกษาในลูกผสมชั่วที่ 2 โดยวิธีการ Bulk Segregant Analysis พบว่ามี markers ที่แสดงความสัมพันธ์ร่วมกับลักษณะปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้องอยู่ 2 ตัว คือ RM20 และ RM332 อยู่บริเวณด้านแขนสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 11 และพบว่ามี QTL หนึ่งตัวที่อยู่ระหว่าง markers 2 ตัวนี้ ซึ่งมีอิทธิพล 14 เปอร์เซ็นต์ของความแปรปรวนทั้งหมดของลักษณะปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้อง และมีค่า degree of dominance เท่ากับ - 1.2

จากการศึกษาพบลักษณะปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ โดยมีการแสดงออกของยีนแบบข่มไม่สมบูรณ์ จนถึงข่มสมบูรณ์ โดยมีลักษณะเหล็กสูงเป็นลักษณะเด่น ถูกควบคุมด้วยยีนหลัก 2 ยีน จากความรู้นี้จะช่วยในการคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้มีปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดสูง จากการศึกษาระดับดีเอ็นเอ ทำให้พบตำแหน่ง SSR marker ที่อยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมปริมาณธาตุเหล็ก ซึ่งจะสามารถช่วยให้การคัดเลือกพันธุ์มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Genetic Control of Iron Content in Rice Grain	
Author	Ms. Pennapa Jaksomsak	
Degree	Master of Science (Agriculture) Agronomy	
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Sansanee Jamjod	Chairperson
	Prof. Dr. Benjavan Rerkasem	Member

Abstract

Iron (Fe) is one of essential nutrients for human. Many people are suffered from iron deficiency anemia worldwide. Iron intake mainly comes from cereals, particularly rice, which is the staple food for most people in Asia. Rice is commonly low Fe in grain as compared with other cereals. In Thailand, popular Thai rice varieties are also low in grain Fe. Therefore, breeding for high Fe in grain has been proposed to improve Fe in rice grain. This study was conducted to determine genetic control of Fe content in rice grain, at Department of Agronomy and the Multiple Cropping Center, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University on June 2004 to May 2007.

In the first experiment, gene action for grain Fe in brown rice was determined from 23 crosses between high Fe x low Fe parents and reciprocal crosses. High Fe varieties were IR68144 CMU122 and Jalmagna. Low Fe varieties were Chainat 1, Suphan Buri 1, KDML105, RD 6, Niaw Ubon 2, Hawm Suphan Buri, Bang Taen and Kam Doisaked. Five plants of F_1 and parents were grown in plastic pots arranged in complete randomized design (CRD) with three replicates. At maturity, seed from each plant was separately collected and determined for Fe content by chemical

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

analysis and grain morphology characteristic (length, width and shape). Grain Fe in brown rice of F1 hybrids was close to high Fe parents and no significantly difference in reciprocal crosses was found. These suggest dominant gene action, varied from partially dominance to complete dominance. In addition, grain morphology (length and shape) were correlated with grain Fe content. Seven groups of grain morphology were identified from this study.

In the second experiment, major genes for grain Fe were identified from the evaluation of F_2 population of IR68144 (high Fe) x Chinat 1 (low Fe). One-hundred F2 plants and 15 plants each of parents were sown in pot. At maturity plants were harvested individually. Grain Fe in brown rice were analyzed by chemical analysis and evaluated by Perls' Prussian Blue technique (PPB). Chi-square test was used for testing F_2 segregation ratio. It was found that genetic variation for grain Fe could be accounted by two genes and ratio of segregation was 1 (high Fe):14 (intermediate Fe): 1 (low Fe). Perls' Prussian Blue technique, method for detecting localization of Fe in grain, could be used to separate the parents. IR68144 was high staining (+++) whereas Chinat 1 was varied from low to high and concentrated in medium staining (++). Although there was correlation of grain Fe between PPB staining and chemical analysis, population of F_2 could not be classified by PPB.

Location of gene controlling grain Fe was determined by molecular markers. After 30 days after sowing, leaf samples of parents and F_2 plants were collected for DNA analysis. Seventy-seven SSR markers were used in this study, only 28 markers (36%) were polymorphic. After that, bulk segregation analysis of F_2 was performed, two markers, RM20 and RM332, were correlated with grain Fe content. One QTL for grain Fe was located between these markers on short arm of chromosome 11, explaining 14% of the total phenotypic variation. Degree of dominance was - 1.2.

In conclusion, grain Fe is simply inherited. The gene action was ranged from partially dominance to complete dominance. The grain Fe was controlled by two genes. Microsatellite markers linked to QTL for grain Fe content were located. These findings will be useful in breeding and selection to increase Fe content in rice.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved