

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 การขนส่งและสะสมธาตุเหล็กในส่วนต่าง ๆ ของข้าว

ธาตุเหล็กเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญพบในใบและในส่วนต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อ ธาตุเหล็กมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืช และมีความจำเป็นสำหรับการสร้างคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ธาตุเหล็กถูกลำเลียงเข้าสู่ต้นพืช ผ่านผนังเซลล์บริเวณราก และเข้ามาสู่ระบบท่อลำเลียงน้ำสำหรับส่งผ่านไปยังอวัยวะเจริญทางลำต้น (vegetative organ) หรืออาจจะเก็บรักษาในลำต้นหรือเนื้อเยื่อใบ ในบางกรณีมีการเคลื่อนย้าย (mobilization) ผ่านทางท่อลำเลียงอาหาร และจะสิ้นสุดการเคลื่อนย้ายลงเมื่อนำไปเก็บไว้ในหนึ่งเซลล์หรือหลายเซลล์ที่แบ่งเป็นส่วน ๆ (ภาพที่ 2.1) (Grusak and Dellapenna, 1999)

การเคลื่อนย้ายธาตุเหล็กจากภายนอกเข้าสู่ภายในพืชโดยผ่านทางผนังเซลล์ (cell wall) จากเซลล์หนึ่งแล้วต่อไปยังเซลล์ถัดไป ในเซลล์ราก (apoplast หรือ free space) เป็นการเคลื่อนย้ายแบบ passive process ซึ่งเป็นการเคลื่อนย้ายโดยการแพร่ (diffusion) หรือการไหลเป็นมวลพร้อมกับน้ำ (mass flow) (Marshner, 1995) หลังจากธาตุเหล็กถูกดูดเข้าไปในเซลล์ของเนื้อเยื่อราก จะถูกส่งต่อไปยังท่อน้ำ (xylem vessels) และท่ออาหาร (phloem vessels) เพื่อขนส่งไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืช ธาตุเหล็กถูกเก็บสะสมไว้ในช่องว่างอะโปพลาสติก (apoplatic space) และแวคิวโอล (vacuoles) (Briat and Lobreaux, 1998) ในรูปของมัลติเมอร์ริกโปรตีน (multimeric protein) เรียกว่า เฟอร์ริทิน (ferritin) โดยเฟอร์ริทินที่อยู่ในพลาสติด (plastids) และเฟอร์ริทินในแต่ละส่วนสามารถเก็บสะสมธาตุเหล็กได้ถึง 4,500 อะตอม (Harrison and Arosio, 1996) การเคลื่อนย้ายของธาตุเหล็กผ่านท่อน้ำและท่ออาหาร และการเก็บในส่วนต่าง ๆ ของพืชในรูป Fe protein, Fe chelate หรือ phytoferritin จะถูกควบคุมความสมดุลให้มีการสะสมต่ำที่สุดที่จะทำให้พืชเกิดธาตุเหล็กเป็นพิษ (Grusak and Dellapenna, 1999)

การสะสมธาตุเหล็กในส่วนต่าง ๆ ของพืชระหว่างการเจริญเติบโต และการพัฒนาเป็นกระบวนการที่ไม่คงที่ (dynamic process) ซึ่งเป็นผลมาจากการควบคุมทั้งหมดของยีนที่แปลรหัส (encoding) โปรตีนสำหรับการขนส่ง และการเก็บสะสมธาตุเหล็กขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของพืชและอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม

(Elizabeth et al., 2004) จากการศึกษาของ ทราชคำ (2549) พบว่าในข้าวแต่ละพันธุ์ มีกลไกการเคลื่อนย้ายธาตุเหล็กแตกต่างกัน จึงทำให้มีการสะสมธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้องแตกต่างกัน

ราก

รากพืชชั้นสูงได้รับธาตุเหล็กโดยใช้วิธีการดังต่อไปนี้

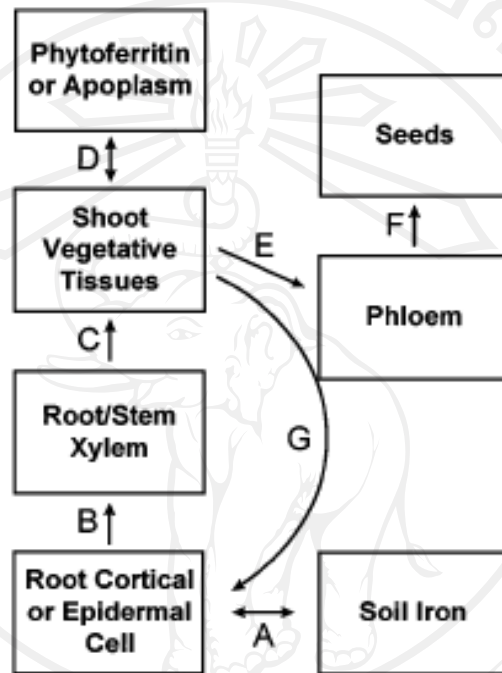
1) Strategy I เป็นวิธีการที่มีการ reduction ของ ferric iron (Fe[III]-compound) ก่อนเพื่อจะเข้าสู่ผนังเซลล์ในรูปของ Fe^{2+} (ferrous) ซึ่งวิธีการนี้จะใช้ในกลุ่มพืชใบเลี้ยงคู่และกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยวที่ไม่ใช่พืชตระกูลหญ้า

2) strategy II ใช้ในกลุ่มพืชตระกูลหญ้า เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด โดยจะอาศัย ferric chelators เรียกว่า phytosiderophores ซึ่งเป็น peptides น้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ได้รับมาจาก methionine ซึ่งวิธีการนี้จะเป็นการสัมพันธ์ของรากและ chelate ferric iron ใน rhizosphere รากจะปลดปล่อย phytosiderophores (PSs) เมื่อมีการดูดใช้โดยบริเวณผิวชั้นนอกของราก หรือ cortical cell ธาตุเหล็กจะถูกขนส่งไปยัง root cortex ทันที สำหรับเข้าไปสู่ xylem pathway ซึ่งคาดว่าอยู่ในรูป Fe (II)-chelating peptide, nicotiamamine (NA) หรือในรูป Fe^{2+} คงที่และร่วมกับตัวมันเองในเส้นทางภายในเซลล์ไปยัง xylem parenchyma ซึ่งธาตุเหล็กที่เคลื่อนที่ภายใน xylem parenchyma จะอยู่ในรูป Fe(III)-citrate (Hell and Stephan, 2003) กระบวนการขนส่งใน xylem pathway นั้นธาตุเหล็กจะถูกส่งไปยังอวัยวะต่างๆ ที่กำลังเกิดขึ้นทั้งหมด การร่วมกันของปฏิกิริยารีดอกซ์ pH equilibrium และกระบวนการขนส่งต่างๆ จะเป็นตัวกำหนดธาตุเหล็กสุดท้ายภายในเนื้อเยื่อ รากมีความเข้มข้นของธาตุเหล็กน้อยกว่าใบ อีกทั้งยังพบเฟอร์ริทินในส่วนพลาสติดที่ไม่มีสีเขียว (non-green plastid) และคาดว่าเฟอร์ริทินในพลาสติดจะอยู่ใน endodermal cell หลังจากที่ดูดซึมเหล็กโดยเอพิเดอร์มิส (epidermis) และคอร์เทก (cortex) (Elizabeth et al., 2004)

ใบ

ใบเป็นอวัยวะหลักในการสะสมธาตุเหล็กในพืช ซึ่งร้อยละ 80% ของธาตุเหล็กถูกเก็บไว้ในส่วนของคลอโรพลาสต์ (chloroplast) ซึ่งเฟอร์ริทิน ส่วนมากจะถูกสะสมในส่วนของพลาสติดที่ไม่มีสีเขียว พบการแลกเปลี่ยนธาตุเหล็กในระยะที่ใบพัฒนาได้ ซึ่งระดับเฟอร์ริทินจะเพิ่มขึ้นในใบที่กำลัง

พัฒนา คลอโรพลาสต์ที่เจริญเติบโตเต็มที่จะพบโปรตีนนี้ในระดับต่ำ การบ่งชี้การสังเคราะห์นี้เป็นตัวควบคุมการพัฒนา นอกจากนี้ เฟอร์ริทินยังเป็นแหล่งของธาตุเหล็กซึ่งธาตุเหล็กที่บรรจุอยู่ภายในใช้สำหรับการสังเคราะห์โปรตีน (iron-containing photosynthetic protein) (Elizabeth *et al.*, 2004)

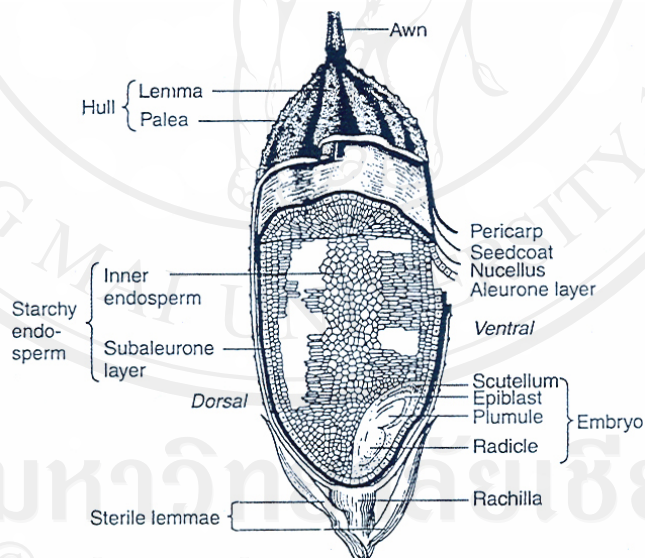


ภาพ 2.1 แผนผังของกระบวนการขนส่ง (transport) และการสะสม (accumulation) ธาตุเหล็กของพืชทั้งต้น การควบคุมที่ทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายธาตุเหล็กจากส่วนหนึ่งไปยังส่วนถัดไปประกอบด้วยดังนี้ (A) ปฏิกิริยาการได้มา/การดูดซึมธาตุเหล็ก ประกอบด้วยรากมีการปลดปล่อยสารประกอบซึ่งก็คือ chelate หรือ solubilize soil Fe (B) การขนส่งภายใน/ระหว่างเซลล์ ประกอบด้วยในส่วนของ เนื้อเยื่อพื้นฐานของท่อลำเลียงน้ำ (C) อัตราการหายใจของเนื้อเยื่อเจริญเติบโตทางลำต้น (D) ปฏิกิริยาการเก็บรักษาและการหมุนเวียน (remobilization) (E) การแสดงออกของ Fe-chelate และความสามารถในการจุสำหรับ phloem Fe loading (F) Phloem transport capacity ของ photoassimilates จากแหล่งที่ส่งมา (G) การประสานงานของธาตุเหล็กในตำแหน่งของเนื้อเยื่อส่วนที่อยู่เหนือผิวดินผ่าน phloem-mobile ส่งสัญญาณโมเลกุลเพื่อควบคุมกระบวนการต่าง ๆ ของราก (Grusak and Dellapenna, 1999)

เมล็ด

ธาตุเหล็กในเมล็ดได้มาจากการหมุนเวียนของธาตุเหล็ก (remobilized) จากอวัยวะต่าง ๆ ที่เจริญเติบโต ธาตุเหล็กในส่วนที่อยู่เหนือผิวดินถูกส่งไปยัง sink โดยผ่าน phloem pathway (Grusak and Dellapenna, 1999) และถูกควบคุมโดยการขนส่งและเคลื่อนย้ายของตำแหน่งของแหล่งที่ส่งมา (ใบ ลำต้น และโครงสร้างที่เจริญเติบโตทางลำต้น) (Zhang *et al.*, 2007) ในธัญพืช เช่น ข้าว พบว่าธาตุเหล็กของส่วนที่อยู่เหนือผิวดินทั้งหมดมีเพียง 4 % ที่ส่งมายังเมล็ด และปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดร้อยละ 20-30 มาจากธาตุเหล็กในใบพืช ในถั่วเหลืองพบว่าร้อยละ 40-60 ของปริมาณธาตุเหล็กมาจากปมราก (Burton *et al.*, 1998) การเก็บรักษาธาตุเหล็กในเมล็ดจะถูกแบ่งไว้ในสองส่วนหลัก คือ endosperm และ embryo โดย endosperm ประกอบด้วย aleurone layer เป็นเซลล์ที่มีชีวิต และ starch endosperm เป็นเซลล์ที่ตายแล้ว ส่วน embryo ประกอบด้วยเซลล์ที่มีชีวิต ตัวอย่างเช่น scutellum, coleoptile, radicle coleorhiza และ epiblast (ภาพที่ 2.3) จากการศึกษาตำแหน่งการสะสมธาตุอาหารในเมล็ดข้าวโดยใช้เทคนิค histochemical พบว่าบริเวณ embryo และ aleurone layer มี phytin granules ที่บรรจุแคลเซียม โฟสเฟตเซียม และธาตุเหล็กจำนวนมาก (Krishnan *et al.*, 2001) สำหรับ endosperm นั้นพบว่าธาตุอาหารถูกส่งเข้าไปโดยผ่านเพียง 1 ท่อของ ovular vascular ที่อยู่ด้านหลังของรังไข่ ซึ่ง ovular vascular เป็นเพียงแหล่งเดียวที่เมล็ด (caryopsis) ใช้เป็นแหล่งของธาตุอาหารสำหรับการพัฒนาเมล็ด (Krishnan and Dayanandan, 2003; Marentes and Grusak, 1998) การสะสมธาตุเหล็กเกิดขึ้นบริเวณคัพภะ (embryo) ซึ่งจากการศึกษา distribution และ mobilization ของธาตุเหล็กในส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดข้าวโพดพบว่าปริมาณธาตุเหล็กจะมีจำนวนมากบริเวณเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) และเนื้อเยื่อคัพภะ (embryo tissue) ในขณะที่บริเวณ endosperm จะมีจำนวนน้อยที่สุด (Bityutskii *et al.*, 2001) จากการศึกษาโดยใช้วิธีการย้อมสีเพิร์ลพรัสเซียนบลู (Perls' Prussian Blue) พบว่าตำแหน่งที่มีการติดสีเข้มมากที่สุดคือส่วนของคัพภะ (embryo) และติดสีอ่อนในส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ด (aleurone layer) ซึ่งเป็นส่วนของ pericarp และไม่พบการติดสีเข้มในส่วน of endosperm และยังพบความแตกต่างในการติดสีเข้มของพันธุ์แต่ละพันธุ์ที่มีปริมาณการสะสมธาตุเหล็กในเมล็ดแตกต่างกัน (Prom-U-Thai, 2003) อีกทั้งจากการวิเคราะห์การสะสมของปริมาณธาตุเหล็กในส่วนต่าง ๆ ของต้นข้าวพบว่าปริมาณธาตุเหล็กที่สะสมในเมล็ดเป็นเพียงส่วนน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณธาตุเหล็กทั้งหมดที่พืชดูดไปสะสมทั้งต้น และพบการสะสมของปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดไม่มีความสัมพันธ์กับการสะสมของปริมาณธาตุเหล็ก ทั้งหมดในเมล็ด (Prom-U-Thai, 2003) และการเพิ่มปริมาณธาตุเหล็กในดินอาจจะไม่เป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดได้ (Grusak *et al.*, 1999) จากการศึกษาของชนากานต์และคณะ (2547) พบว่าสัดส่วนของปริมาณ

ธาตุเหล็กในเมล็ดต่อปริมาณธาตุเหล็กในต้นทั้งหมดของพันธุ์ IR68144 และ ขาวดอกมะลิ105 เท่ากับ 1:42 และ 1:171 ตามลำดับ Graham *et al.* (1999) พบว่าในใบมีธาตุเหล็กสูงกว่าในเมล็ด 20-50 เท่า และธาตุเหล็กในเมล็ดจะถูกใช้ในช่วงการงอกของต้นอ่อน หน่วยย่อยของเฟอรินจะถูกสะสมในเมล็ดในช่วงการสุกแก่จนถึงเมล็ดแห้ง (Lobreau and Briat, 1991) ความยาวรากของต้นอ่อนข้าวโพดมีความสัมพันธ์กับปริมาณของธาตุเหล็กในบริเวณคัพภะ (embryo/ scutellum) (Bityutskii *et al.*, 2001) ซึ่งการเพิ่มปริมาณเหล็กที่เก็บสะสมในเมล็ดข้าวเป็นผลให้ต้นอ่อนแข็งแรง และทำให้ต้นกล้าเจริญเติบโตได้ดีเมื่อปลูกในดินที่มีธาตุเหล็กต่ำ เป็นข้อดีอีกข้อหนึ่งคือทำให้สามารถปรับปรุงผลผลิต เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดที่มีปริมาณธาตุเหล็กที่เก็บสะสมในเมล็ดต่ำเมื่อปลูกในพื้นที่เดียวกัน (Ross *et al.*, 2003) จากการปลูกข้าวสาลีพันธุ์ที่มีปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดสูงและมีประสิทธิภาพในการใช้ธาตุเหล็ก สามารถช่วยลดอาการใบเหลืองที่เกิดจากการขาดธาตุเหล็กได้ โดยเฉพาะเมื่อปลูกในในช่วงต้น ๆ ของฤดูปลูกข้าวสาลี (Shen *et al.*, 2002) ดังนั้นการเพิ่มปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดจึงเป็นผลดีต่อทั้งเกษตรกรและผู้บริโภค (Graham and Gregorio, 2001)



ภาพ 2.3 การผ่าตามยาว (longitudinal section) ของเมล็ดข้าว แสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ในเมล็ดข้าว (Wrigley *et al.*, 2004)

2.2 ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลักษณะปริมาณธาตุอาหารในพืช

ในการปรับปรุงพันธุ์สิ่งที่สำคัญคือการพบความแปรปรวนของลักษณะที่ต้องการปรับปรุง เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรม ตัวอย่างเช่น การคัดเลือกรุ่นสำปะหลังจำนวน 632 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้ง 5500 ตัวอย่างทั่วโลก พบว่ามีความแปรปรวนของปริมาณแคโรทีนตั้งแต่ 0.1-2.4 mg carotenes/100 g (Iglesias *et al.*, 1997) ใน bread wheat พบว่ามีความแปรปรวนของปริมาณธาตุสังกะสี และแมกนีเซียม โดยธาตุสังกะสีมีความแปรปรวนตั้งแต่ 15 – 35 ppm ธาตุแมกนีเซียมมีความแปรปรวน ตั้งแต่ 600 – 1400 ppm (Oury *et al.*, 2006) จากการประเมินตัวอย่างของถั่วแดง (*Phaseolus vulgaris* L.) จำนวน 1000 ตัวอย่างที่ปลูกในพื้นที่เดียวกันและปีเดียวกัน พบว่ามีความแปรปรวนของปริมาณธาตุเหล็กตั้งแต่ 34-89 $\mu\text{g/g}$ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 55 $\mu\text{g/g}$ ส่วนธาตุสังกะสีมีความแปรปรวนตั้งแต่ 21-54 $\mu\text{g/g}$ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 35 $\mu\text{g/g}$ (Beebe *et al.*, 2000) และจากการประเมินปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวสาลีจาก 132 ตัวอย่าง ปลูกในแปลงที่เมือง El Batan ประเทศเม็กซิโก มีความแปรปรวนตั้งแต่ 28.8-56.5 $\mu\text{g/g}$ และตั้งแต่ 25.2-53.3 $\mu\text{g/g}$ สำหรับปริมาณธาตุเหล็ก พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในเชื้อพันธุ์ข้าวสาลี ซึ่งเพียงพอที่จะนำมาเพิ่มปริมาณธาตุเหล็กและสังกะสีในเมล็ดข้าวสาลี (Monasterio and Graham, 2000) ปริมาณธาตุซัลเฟอร์ในเมล็ดข้าวสาลีจำนวน 100 สายพันธุ์ พบความแตกต่างในแต่ละสายพันธุ์ และไม่พบความแตกต่างในสายพันธุ์เดียวกันทั้ง 2 ซ้ำ (Lyons *et al.*, 2005) จากการประเมินปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้องของ 8 ประชากร จากประเทศจีน และบังคลาเทศ พบว่าปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวมีความแปรปรวนทางพันธุกรรม โดยมีค่าเหล็กอยู่ในช่วงระหว่าง 6.3 – 24.4 $\mu\text{g/g}$ ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวที่สูงอยู่ในช่วงระหว่าง 18 - 22 $\mu\text{g/g}$ โดยพบในข้าวที่มีกลิ่นหอม (aromatic rice) ตัวอย่างเช่น Jalmagna, Zuchem และ Xua Bue Nuo (Gregorio *et al.*, 2000) จากการวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวจำนวน 939 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณธาตุเหล็กอยู่ในช่วงระหว่าง 7.5 – 24.4 $\mu\text{g/g}$ มีค่าเฉลี่ย 12.2 $\mu\text{g/g}$ โดยส่วนมากพบพันธุ์ธาตุเหล็กสูงในข้าวพันธุ์พื้นเมือง ส่วนในข้าวพันธุ์ปรับปรุงไม่พบว่ามีปริมาณธาตุเหล็กสูงในการศึกษาครั้งนี้ จากการเปรียบเทียบพบว่าข้าวที่มีกลิ่นหอมมีปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดสูงกว่าข้าวที่ไม่มิกลิ่นหอม (Senadhira *et al.*, 1998) ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวและข้าวสาลีพันธุ์มักให้ความสนใจในการเพิ่มผลผลิต และความต้านทานโรค จึงทำให้ได้พันธุ์สมัยใหม่ที่มีปริมาณธาตุเหล็กและสังกะสีในเมล็ดน้อยกว่าพันธุ์ดั้งเดิม ดังนั้นจึงสามารถใช้พันธุ์ดั้งเดิมหรือพันธุ์ป่ามาเป็นพันธุ์พ่อแม่ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดให้สูงขึ้นได้ (Graham *et al.*, 1999) ตัวอย่างเช่น ข้าวสาลีพันธุ์ป่าที่มีความแปรปรวนที่กว้าง คือมีปริมาณเหล็ก 25 -26 ppm จึงนำมาใช้ผสมพันธุ์ข้าวสาลีระหว่างพันธุ์ป่า

กับพันธุ์ปลูกเพื่อเพิ่มปริมาณธาตุเหล็ก (Monasterio and Graham, 2000; Frossard *et al.*, 2000) ได้มีการรวบรวมเมล็ดพันธุ์ข้าวของไทยมาวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็ก พบว่าข้าวพันธุ์หลักของไทยส่วนมากมีปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดต่ำ โดยเฉพาะในพันธุ์ข้าวหอมที่นิยมปลูกและบริโภคกันอย่างกว้างขวาง เช่น ขาวดอกมะลิ 105 กข 6 และหอมคลองหลวง เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ IR68144 ซึ่งเป็นพันธุ์มาตรฐานและปรับปรุงให้มีผลผลิตและปริมาณธาตุเหล็กสูงจากสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) อย่างไรก็ตามพบว่ามีข้าวพันธุ์พื้นเมืองของไทยบางพันธุ์ที่มีปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดสูงเทียบเท่ากับพันธุ์ IR68144 ตัวอย่างเช่น พันธุ์ CMU122 CMU123 และ CMU124 (Prom-U-Thai, 2003) การพบพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดสูง จะเป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ จากการศึกษาของทรายคำ (2549) พบความแปรปรวนที่เป็นผลมาจากพันธุกรรมในข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ได้รับจากแต่ละเกษตรกร โดยมีความแปรปรวนระหว่างชื่อพันธุ์ ภายในชื่อพันธุ์เดียวกัน และภายในตัวอย่างของแต่ละชื่อพันธุ์

2.3 การควบคุมทางพันธุกรรมของลักษณะธาตุอาหาร ในพืช

Graham and Welch (2002) พบว่าการปรับปรุงพันธุ์เป็นวิธีการที่สามารถใช้ประโยชน์สำหรับเพิ่มปริมาณธาตุในเมล็ดได้ดีโดยไม่ลดผลผลิต จากการศึกษาปลูกข้าวในดินที่ขาดธาตุอาหารแล้วใส่ปุ๋ยพบว่าพืชมีปริมาณธาตุอาหารเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับจำนวนธาตุอาหารที่พบในดิน ดังนั้นการใส่ปุ๋ยมีประสิทธิภาน้อยในการเพิ่มปริมาณธาตุอาหารในพืช โดยเฉพาะในเมล็ดที่จะมีการพัฒนาหลังจากใส่ปุ๋ยประมาณหนึ่งเดือน แสดงว่าพันธุกรรมมีอิทธิพลมากกว่าการขาดแคลนธาตุอาหารในดิน ซึ่งในการปรับปรุงพันธุ์นั้นต้องศึกษาถึงการควบคุมทางพันธุกรรมเพื่อใช้ประโยชน์สำหรับการคัดเลือกพันธุ์ให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด จากการทดลองโดยใช้พันธุ์พื้นเมืองจำนวน 4 พันธุ์ ที่มีปริมาณธาตุเหล็กสูง คือ Azucena, Basmati370, Xua Bue Nuo และ Tong Lang Mo Mi ใช้พันธุ์ปรับปรุงอีกจำนวน 3 พันธุ์ คือ IR36, IR64 และ IR72 พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มผสม และพ่อแม่ และเมื่อปลูกทดสอบในลูกผสมชั่วที่ 1 พบว่ามีความแตกต่างของปริมาณธาตุเหล็กในแต่ละกลุ่มผสม พันธุ์พ่อแม่และลูกผสมชั่วที่ 1 แสดงว่าพันธุกรรมมีผลต่อปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ด และจากปริมาณธาตุเหล็กในลูกผสมชั่วที่ 1 พบว่าลักษณะปริมาณธาตุเหล็กถูกควบคุมด้วยยีนแบบบวกสะสม (additive gene) และยีนเด่น (dominant gene) สภาพแวดล้อมมีผลน้อยกว่าพันธุกรรม (Gregorio *et al.*, 2000) และมีกลุ่มยีน 3 กลุ่ม มีความสัมพันธ์กับลักษณะเหล็กสูง และกลุ่มของยีนนี้พบว่าตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 7, 8 และ 9 กลุ่มของยีน 3 กลุ่มนี้มีความจำเพาะสำหรับความมีกลิ่นหอม ซึ่งตั้งอยู่บนโครโมโซม 5, 7 และ 8 นอกจากนี้พบว่ายีน 2 ตัว ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะธาตุเหล็กสูงและความมีกลิ่นหอมบน 2 โครโมโซมนี้ (Gregorio, 2002) ซึ่ง

การจะทราบถึงการควบคุมทางพันธุกรรมต่อปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าว สามารถศึกษาได้จากพฤติกรรม การแสดงออกของยีนที่ควบคุมปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวจากลูกผสมชั่วที่ 1 และพบว่าปริมาณธาตุเหล็ก และสังกะสีมีความสัมพันธ์กัน ดังนั้นในการปรับปรุงพันธุ์ปริมาณธาตุเหล็กอาจสามารถเพิ่มปริมาณสังกะสี ให้เพิ่มขึ้นได้ (Frossard *et al.*, 2000) จากการศึกษา Cichy *et al.*, (2005) โดยการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ ปริมาณธาตุสังกะสีในเมล็ดสูง (Voyager) กับพันธุ์ธาตุสังกะสีต่ำ (Albinon) พบว่าการถ่ายทอดทาง พันธุกรรมของปริมาณสังกะสีในถั่ว navy นั้นถูกควบคุมด้วยยีนหลัก 1 ยีน และลักษณะปริมาณสังกะสีใน เมล็ดสูงถูกควบคุมด้วยยีนข่ม (dominant) และจากการศึกษาอิทธิพลทางพันธุกรรมของธาตุเหล็ก สังกะสี และแมงกานีสในข้าว black pericarp (*indica*) พบว่าถูกควบคุมด้วยยีนในนิวเคลียส การแสดงออกของยีน เป็นแบบบวกสะสม (additive) อีกทั้งยังพบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณธาตุอาหารกับลักษณะของ เมล็ดคือ น้ำหนัก 100 เมล็ด ความยาว ความกว้าง และรูปร่างเมล็ด ดังนั้นการคัดเลือกลักษณะของเมล็ด อาจจะเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยในการคัดเลือกโดยอ้อมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณธาตุเหล็ก สังกะสีและแมงกานีสในเมล็ดข้าวได้ และกล่าววาลักษณะของปริมาณธาตุอาหารเป็นลักษณะทางปริมาณ (Zhang *et al.*, 2004) ซึ่งลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait) ถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนมาก (polygene) ความแปรปรวนของฟีโนไทป์ (phenotype) ไม่ได้เกิดจากจีโนไทป์ (genotype) เพียงอย่าง เดียวแต่มีสภาพแวดล้อมเข้ามามีส่วนร่วมด้วย และมีการกระจายตัวแบบต่อเนื่อง (continuous distribution) (Kearsey and Pooni, 1996) นอกจากนี้การศึกษายีนปริมาณธาตุเหล็กใน ear-leaves พบว่าเป็นลักษณะทาง ปริมาณ ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีนข่ม (dominant) และบวกสะสม (additive) (Chen *et al.*, 2007) จากการศึกษา พันธุ์ของถั่ว chickpea (*Cicer arietinum* L.) พบว่าเมล็ดที่มีน้ำหนักเบาที่มีความสัมพันธ์ (linkage หรือ pleiotropy) ร่วมกับปริมาณแคลเซียมในเมล็ดสูง และลักษณะปริมาณแคลเซียมมีการกระจายตัวอย่างอิสระ ทำให้สามารถปรับปรุงพันธุ์ที่มีปริมาณแคลเซียมสูงและเมล็ดใหญ่ได้ ซึ่งเป็นที่ต้องการอย่างกว้างขวางของ ประชากรในเขตตะวันออกเฉียง (Abbo *et al.*, 2000) ปริมาณ phytic acid ในเมล็ดข้าวฟ่างถูกควบคุมด้วยยีน แบบบวกสะสม (additive gene) และ ไม่บวกสะสม (non-additive gene) ซึ่งในโครงการปรับปรุงพันธุ์นั้น เหมาะสมสำหรับการใช้ recurrent selection ในการปรับปรุงพันธุ์ให้มีปริมาณ phytic acid ต่ำ ซึ่ง phytic acid เป็นตัวบ่งชี้ความเป็นประโยชน์ของธาตุเหล็ก สังกะสี แคลเซียม แมกนีเซียม และโมลิบดีนัมในเมล็ด ธัญพืช (Satija and Thukral., 1985) การศึกษาของ Wang-da *et al.* (2006) พบว่าสามารถลดการสะสม ปริมาณ โลหะหนัก Cd Cr As และ Ni ในเมล็ดข้าวโดยการยีนที่มีปริมาณการสะสมต่ำ Iglesias *et al* (1997) ศึกษาถึงพันธุกรรมของปริมาณแคโรทีนในรากของมันสำปะหลัง และสีของราก พบว่าถูก ควบคุมด้วยยีนหลักจำนวน 2 คู่และมีอิทธิพลของ epistasis ร่วมด้วย และจากการศึกษาการถ่ายทอดทาง

พันธุกรรมของความทนทานต่อการขาดธาตุสังกะสีของข้าวบาร์เลย์โดยใช้การสังเกตอาการขาดมาใช้ในการคัดเลือกลูกผสมชั่วที่ 2 พบว่าถูกควบคุมด้วย 1 ยีน และมีการแสดงออกของยีนเป็นแบบบวกสะสม (Genc *et al.*, 2003) จากการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อทนต่อสภาพดินเค็ม โดยปลูกลูกผสมชั่วที่ 1 และพันธุ์พ่อแม่ในสภาพดินเค็ม พบว่าปริมาณโซเดียมและแคลเซียมมีการแสดงออกของยีนเป็นแบบบวกสะสม และแบบข่ม (Mahmood *et al.*, 2004) ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวโพดนั้นองค์ประกอบทางพันธุกรรมมีอิทธิพลคิดเป็น 12 เปอร์เซ็นต์ ของความแปรปรวนทั้งหมดของปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ด และมี 29 เปอร์เซ็นต์ สำหรับธาตุสังกะสีในเมล็ด สภาพแวดล้อมไม่มีผลทางสถิติต่อปริมาณธาตุเหล็กและสังกะสี แต่พบว่ามีการปฏิกริยาร่วมกันระหว่างจีโนไทป์กับสภาพแวดล้อม (Oikeh *et al.*, 2003) ลักษณะความทนทานต่ออาการใบเหลืองที่เกิดจากการขาดธาตุเหล็กถูกควบคุมด้วยยีนเด่น และถูกควบคุมด้วย nonallelic genes 2 ชุด ซึ่งคือการแสดงออกร่วมกันของยีนต่างตำแหน่ง (Hoan *et al.*, 1992)

2.4 การวิเคราะห์ตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะสำคัญทางเกษตรโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker)

จีโนม คือ จำนวนโครโมโซมหรือปริมาณดีเอ็นเอที่มีในเซลล์หรือในสิ่งมีชีวิตหนึ่ง ซึ่งมีความแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ข้าวเป็นพืชที่มีการพัฒนาในด้านจีโนมเป็นอันดับต้น ๆ เนื่องจากเป็นพืชที่มีจีโนมขนาดเล็ก (Mackill, 2003) มีโครโมโซมจำนวน 12 แท่ง และใช้เป็นพืชต้นแบบใน molecular biology ของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ข้าวมีขนาดจีโนมประมาณ 0.45×10^9 bp (McCouch and Doerge, 1995, McCouch *et al.*, 1997 และ Coffman *et al.*, 2004) โดยมีความสัมพันธ์กับพืชตระกูลหญ้า มีขนาดจีโนมเล็กที่สุดในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่ได้มีการศึกษามาแล้ว โดยมีดีเอ็นเอ 20% ของข้าวโพด และ 3% ของข้าวสาลี (Xu, 2002) และมีขนาดจีโนมใหญ่กว่า *Arabidopsis* ซึ่งเป็นพืชต้นแบบของพืชใบเลี้ยงคู่ 3 เท่า (Motoyuki, *et al.*, 2002)

ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์ พืช ซึ่งก็คือเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านอนุพันธุศาสตร์ (molecular genetics) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) สำหรับศึกษาตำแหน่งยีนลักษณะต่าง ๆ ที่สำคัญ เช่น ปริมาณธาตุอาหารที่สำคัญต่อโภชนาการของมนุษย์ ความทนทานต่อสภาวะเครียดต่าง ๆ เช่น อดุมน้ำเป็นพืช ซึ่งส่วนใหญ่ลักษณะสำคัญทางเกษตรนั้นเป็นลักษณะทางปริมาณ (Quantitative traits) โดยลักษณะปริมาณนี้ถูกควบคุมโดย polygene และสิ่งแวดล้อมมีอิทธิพลร่วมด้วย (Xu, 2001) Microsatellite marker เป็นเครื่องหมาย

โมเลกุลชนิดหนึ่งที่น่ามาศึกษาตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะที่ศึกษานั้น ๆ โดยศึกษาจากความสัมพันธ์ระหว่าง Microsatellite maker และลักษณะที่ศึกษา เมื่อทราบถึงตำแหน่งยีนที่แน่นอนสามารถนำมาใช้ประโยชน์เพื่อช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection, MAS) ซึ่งทำให้สามารถคัดเลือกได้ในชั่วแรก ๆ ของโครงการปรับปรุงพันธุ์ ให้มีความแม่นยำสูงในการคัดเลือก เนื่องจากเป็นการคัดเลือกจากจีโนมใหญ่ (Masojc, 2002, Francia *et al.*, 2005)

Microsatellite หรือ Simple Sequence Repeat (SSR) เป็นกลุ่มดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำ (repetitive DNA) ความผันแปรของจำนวนเบสซ้ำในจีโนมของสิ่งมีชีวิตสามารถประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดี โดยที่โพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลเนื่องมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของ microsatellite ในโลคัส (locus) หนึ่ง ๆ (Powell *et al.*, 1996) microsatellite ประกอบด้วยเบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeat) ซึ่งมีตั้งแต่ 1-6 เบส โดยเบสซ้ำ 1 เบสเรียกว่า mono-nucleotide repeat เช่น $(A)_n$ ซ้ำสองเบสเรียกว่า di-nucleotide repeat เช่น $(CA)_n$ ซ้ำสามเบสเรียกว่า tri-nucleotide repeat เช่น $(TAA)_n$ และซ้ำสี่เบสเรียกว่า tetra-nucleotide repeat เช่น $(GATA)_n$ โดยที่ n เป็นจำนวนซ้ำ (สุรินทร์ 2546) และเบสซ้ำเหล่านี้มักมีลำดับเบสที่จำเพาะ (unique sequences) อยู่บริเวณรอบ ๆ เบสซ้ำต่อเนื่องจากลักษณะเฉพาะ สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถเข้ากับเบสจำเพาะ (unique sequences) ซึ่งไพรเมอร์จะเป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่เป็นเบสซ้ำต่อเนื่องที่อยู่ระหว่างเบสจำเพาะ ความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ซึ่งเกิดจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำที่ไม่เท่ากันนี้ใช้บอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ (Powell *et al.*, 1996) จากการคัดเลือกเพื่อทำห้องสมุดจีโนมของข้าว พบว่าในข้าวมีประมาณ 5,700-10,000 microsatellites (McCouch *et al.*, 1997) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ให้ข้อมูลความแตกต่างระหว่างพันธุ์สูง มี high copy number กระจายอยู่ทั่วจีโนมข้าว และมีการพบ primer เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคที่มีการถ่ายทอดเหมือนกับกฎของเมนเดล คือ codominant marker ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของพันธุกรรมระหว่าง homozygous และ heterozygous ได้ (Liu and Cordes, 2004) โดย microsatellite markers สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ทั้งระหว่าง species และ subspecies อีกทั้งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ง่ายโดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) (Akagi *et al.*, 1996) และ มีการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ทำให้การวิเคราะห์จีโนมเป็นไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลสามารถศึกษาได้ โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ไม่ขึ้นกับระยะของการเจริญเติบโตและอวัยวะใด (Xu, 2001, Francia *et al.*, 2005 สุรินทร์, 2545)

และการศึกษาดำเน่งยีนในช่วง 10-15 ปีที่ผ่านมา มักขึ้นอยู่กับ QTL mapping ซึ่งเป็นการศึกษาดำเน่งยีนโดยใช้สัมพันธ์ของ molecular marker กับลักษณะทางปริมาณ จึงเรียกว่า quantitative trait locus (QTL) ศึกษาในประชากรที่มีการกระจายตัวเช่น ลูกผสมชั่วที่ 2 back-crosses recombinant inbred lines (RILs) double haploid (DH) lines หรือประชากรในธรรมชาติ ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถเป็นไปได้ โดยเป็นการบ่งชี้ความแตกต่างของพันธุ์ (polymorphism) ที่ระดับดีเอ็นเอ (Kearsey, 2001) ได้มีการพัฒนา linkage map และข้อมูลของ microsatellite makers ในข้าวเป็นอย่างมาก (1 microsatellite marker มีระยะห่างประมาณ 15-20 cM) ซึ่งทำให้มีความเป็นไปได้อย่างมากในการค้นหาความสัมพันธ์ระหว่าง marker และลักษณะได้ทั่วทั้งขนาดจีโนม (McCouch et al., 1997, Xu, 2002) ซึ่งสามารถนำมาช่วยในงานปรับปรุงพันธุ์ และได้มีการพัฒนาวิธีที่ช่วยให้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง molecular marker กับลักษณะเพื่อบ่งชี้ตำแหน่งยีนของลักษณะนั้น ๆ ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นเรียกว่า bulk segregant analysis (BSA) (Milchermore et al., 1991) โดยเทคนิค BSA ประกอบด้วยการรวมดีเอ็นเอจากแต่ละตัวอย่างของประชากรที่มีการกระจายตัวโดยแบ่งเป็นกลุ่มที่มีแสดงค่าสูงสุด และกลุ่มที่แสดงค่าต่ำสุด เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มของ bulked DNA ซึ่งจะเป็นการบ่งชี้เฉพาะบริเวณของ locus เป้าหมาย ซึ่ง marker ใด ๆ ทำให้ 2 bulked นี้เกิดความแตกต่างกันสามารถสันนิษฐานได้ว่า marker นั้น ๆ มีความสัมพันธ์กับยีนของลักษณะที่ศึกษา (Cakir and Karakousis, 2000) สำหรับวิธีการทางสถิติที่ทำให้การวิเคราะห์ QTL เพื่อความเที่ยงตรงมี 2 วิธี คือ interval analysis และ regression analysis (Zeng, 1993) โดย interval analysis เป็นวิธีที่พิจารณาถึง marker ที่อยู่ข้างของ QTL เรียกว่า flanking markers ระยะห่างของ flanking markers ประมาณ 15 - 35 cM และจะใช้ค่า maximum LOD (likelihood) ที่บ่งชี้ถึงความเป็นไปได้ของตำแหน่ง QTL สำหรับวิธี regression analysis นั้นเป็นการวิเคราะห์ถึงความสัมพันธ์ของทุก ๆ marker ที่แสดงข้อมูลกับ QTL โดยทุก marker เป็นอิสระต่อกันและใช้คำนวณความแปรปรวน locus หรือ loci ของ QTL ลักษณะที่สนใจ ซึ่งทั้งสองวิธีนี้สามารถทำได้ด้วยการคำนวณเองหรือใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ในการวิเคราะห์ เช่น โปรแกรม MAP Manager QTXb20 (Cakir and Karakousis, 2000)

มีการนำเทคนิค Microsatellite เพื่อบ่งชี้ถึงยีนที่ควบคุม foliar trigonelline (TRG) content โดยใช้ Microsatellite marker ทั้งหมด 20 linkage groups ที่ถูกเลือกที่ระยะห่าง 25 cM จากแผนที่พันธุกรรมของถั่วเหลืองพบว่า มี 6 molecular linkage groups ได้แก่ B₂, C₂, D₂, G, J และ K ที่ถูกบ่งชี้ว่ามี ความสัมพันธ์กับ foliar TRG accumulation และมีโครโมโซม 2 ตำแหน่งที่ถูกบ่งชี้ใน linkage group J และ C₂ ของแผนที่ยีนของถั่วเหลืองที่มีความสัมพันธ์กับ foliar TRG accumulation ซึ่งในตำแหน่งของโครโมโซมมีความสัมพันธ์กับ 4 minor loci บน linkage groups ที่แตกต่างกัน ซึ่งอธิบายได้ว่า foliar

TRG accumulation ถูกควบคุมด้วยหลาย ๆ ยีนที่แตกต่างกัน (Youngkoo *et al.*, 2002) และจากการสร้างประชากร double haploid คู่ผสมระหว่าง IR68144 x Azucena เพื่อศึกษาตำแหน่งยีนของปริมาณไฟเตท (phytate) และธาตุอาหารอื่น ๆ ในเมล็ดข้าว โดยใช้ 437 microsatellite markers (SSRs) พบว่ามี 2 quantitative trait loci (QTLs) โดยตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 5 และ 12 ที่ควบคุมลักษณะนี้ ปริมาณธาตุเหล็กมี 3 QTL บนโครโมโซมแท่งที่ 2 8 และ 12 (James *et al.*, 2007) จากการศึกษา QTLs ของปริมาณน้ำมันของเมล็ดข้าวโพด พบว่าตำแหน่งของ loci และจำนวนของ QTL ที่ควบคุมปริมาณน้ำมันของเมล็ดข้าวโพดนั้นอาจจะมีความแตกต่างกันได้ เมื่อใช้พันธุ์ข้าวโพด ชนิดและระยะห่างของ marker และการวิเคราะห์ทางสถิติ ที่แตกต่างกัน (Mangolin *et al.*, 2004) และจากการใช้ความสัมพันธ์ระหว่าง Microsatellite marker และความต้านทานต่อโรคโคนเน่า (stem rot resistance) ในข้าวพบว่า 2 loci บนโครโมโซมแท่งที่ 2 และโครโมโซมแท่งที่ 3 ที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคโคนเน่าในข้าว ซึ่งจากการบ่งชี้ของ molecular markers ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานต่อโรคโคนเน่า ทำให้การคัดเลือกในรุ่นแรก ๆ ของการปรับปรุงพันธุ์มีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น (Ni *et al.*, 2001) Diers *et al.* (1992) ใช้ genetic marker (RFLP) เพื่อการควบคุมทางพันธุกรรมของปริมาณโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลือง พบว่ามี 2 QTL หลักที่ควบคุมปริมาณโปรตีน ในประชากรระหว่าง PI468916 (high protein) ผสมกับ A81-356022 (low protein) ซึ่งพบว่าต้นที่แสดง allele homozygous ของ PI468916 มีความสัมพันธ์สูงกับปริมาณโปรตีนสูง และต้นที่แสดง allele homozygous ของ A81-356022 มีความสัมพันธ์สูงกับปริมาณโปรตีนต่ำ จากการศึกษาปริมาณของน้ำมันในเมล็ด Arabidopsis ในประชากร recombinant inbred โดยใช้ AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) marker พบว่าถูกควบคุมโดย 2 major QTL และ 2 minor QTL คิดเป็น 43 % ของความแปรปรวนของปริมาณน้ำมันในประชากร (Hobbs *et al.*, 2004) และจากการศึกษา Quantitative trait loci สำหรับลักษณะทนต่ออุณหภูมิเป็นพิษ โดยใช้ simple sequence repeats (SSRs) จำนวน 1028 SSR primers วิเคราะห์ linkage analysis โดยใช้โปรแกรม JoinMap 3.0 และวิเคราะห์ QTL analysis ด้วยวิธี interval mapping พบ 2 QTL โดยยีนหลัก (major gene) ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่ง 4D และยีนรอง (minor gene) บนโครโมโซมแท่งที่ 3BL ซึ่ง SSR marker ที่แสดงความสัมพันธ์แบบ close linked กับ QTLs แสดงว่ามีประสิทธิภาพที่จะนำมาใช้สำหรับช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection, MAS) เพื่อปรับปรุงข้าวสาลีพันธุ์ทนต่ออุณหภูมิเป็นพิษในโครงการปรับปรุงพันธุ์ (Zhou *et al.*, 2007)