บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์พ่อแม่ที่มีค่าเหล็กในเมล็ดแตกต่างกัน ลูกผสมชั่วที่ 1 และชั่วที่ 2 พบว่าปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้องถูกควบคุมด้วยยีนหลัก 2 ยีน มีการแสดงออกของยีนเป็นแบบข่ม (dominant gene action) โดยแสดงออกตั้งแต่ข่มไม่สมบูรณ์ (partially dominance) ไปจนถึงแบบข่มสมบูรณ์ (completely dominance) ขึ้นอยู่กับการรวมตัวของคู่ผสม เมื่อหาตำแหน่งยีนโดยใช้ SSR markers กับลักษณะปริมาณธาตุเหล็ก พบความสัมพันธ์ของยีนหนึ่งตัวตั้งอยู่ระหว่าง marker RM20 และ RM332 บนด้านแขนสั้น (short arm) ของโครโมโซมแท่งที่ 11

ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้องของลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์เหล็กสูง x เหล็กต่ำ และคู่ผสมสลับพ่อแม่ พบว่ามีค่าอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงพ่อหรือแม่ที่มีเหล็กสูงคือ พันธุ์ IR68144 CMU122 และ Jalmagna มีการแสดงออกของยีนแบบข่มไม่สมบูรณ์จนถึงแบบข่มสมบูรณ์ เช่น คู่ผสมระหว่างเหนียวอุบล 2 x IR68144 มีการแสดงออกของยีนแบบข่มไม่สมบูรณ์ ส่วนคู่ผสมระหว่าง CMU122 x ชัยนาท 1 มีการแสดงออกของยีนเป็นแบบข่มสมบูรณ์ (ตาราง 4.1.1) Zhang *et al.* (2004) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าว พบว่าถูกควบคุมด้วยยีนข่ม ในขณะที่ Gregorio (2002) พบการแสดงของยีนเป็นแบบบวกสะสม (additive gene) และแบบข่ม (dominant gene) ขึ้นอยู่กับการรวมตัวของแต่ละคู่ผสม จากการศึกษาลักษณะปริมาณธาตุอาหารในพืชชนิดอื่น ๆ เช่น ปริมาณธาตุสังกะสีใน navy bean ปริมาณธาตุแคลเซียมใน chickpea ปริมาณ phytic acid ในเมล็ดข้าวฟ่าง และปริมาณแคโรทีนในรากมันสำปะหลัง พบว่าถูกควบคุมด้วยยีนข่มเช่นกัน (Shi *et al*., 1999 Iglesias *et al*., 1997 Abbo *et al*., 2000 และ Satija and Thukral 1985) และในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างระหว่างคู่ผสมสลับพ่อแม่ (reciprocal cross) แสดงว่ายีนที่ควบคุมปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดอยู่ภายในนิวเคลียส ลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนข่มนั้นแยก homozygote กับ heterozygote ได้ยาก เนื่องจาก genotype ทั้งสองชนิดแสดงลักษณะธาตุเหล็กสูงเหมือนกัน ดังนั้นจึงต้องมีการปลูกเพื่อทดสอบรุ่นลูกจึงจะแยก homozygote ออกจาก heterozygote ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในลูกผสมชั่วที่ 2 ระหว่างพันธุ์เหล็กสูง (IR68144) x เหล็กต่ำ (ชัยนาท 1) มีสัดส่วนการกระจายตัวของปริมาณธาตุเหล็กเท่ากับ 1 (เหล็กสูง): 14 (เหล็กปานกลาง): 1 (เหล็กต่ำ) แสดงว่าลักษณะนี้ถูกควบคุมด้วยยีนหลัก 2 ยีน ได้มีรายงานของการถูกควบคุมด้วยยีนหลักในลักษณะการตอบสนองต่อธาตุอาหารพืชหลายตัว เช่น Iglesias *et al.* (1997) พบว่าลักษณะปริมาณแคโรทีนในรากมันสำปะหลังถูกควบคุมด้วยยีนหลัก 2 ยีน Jamjod *et al.* (2004) พบว่าประสิทธิภาพการใช้โบรอนของข้าวสาลี โดยศึกษาจากดัชนีการติดเมล็ด (grain set index, GSI) ที่ระดับโบรอนที่แตกต่างกัน ถูกควบคุมด้วยยีนหลัก 2 ยีนที่เป็นอิสระต่อกัน การทราบถึงจำนวนยีนที่ควบคุมเป็นประโยชน์สำหรับการกำหนดชั่วในการคัดเลือก โดยลักษณะที่ควบคุมด้วยจำนวนยีนน้อยคู่ จะสามารถคัดเลือกได้ในชั่วต้น ๆ และสามารถใช้วิธีการผสมกลับ (backcross) ในการปรับปรุงพันธุ์ได้

การใช้วิธีการย้อมสีเพริ์ล พรัสเซียนบลู (PPB) เพื่อประเมินปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้อง โดยประเมินจากความเข้มของการติดสีย้อมบริเวณของ embryo พบว่าสามารถแยกความแตกต่างในพันธุ์พ่อแม่ระหว่างพันธุ์เหล็กสูงและเหล็กต่ำจากระดับการติดสีย้อมที่แตกต่างกันได้ โดยพันธุ์ IR68144 (เหล็กสูง) ติดสีเข้ม (+++) ทั้งหมด ส่วนพันธุ์ชัยนาท 1 (เหล็กต่ำ) ติดสีย้อมทั้ง 3 ระดับ โดยติดสีย้อมปานกลาง (++) มากที่สุด เช่นเดียวกับ ทรายคำ (2549) Prom-u-thai *et al.* (2003) และChoi *et al.* (2007) ที่ใช้เทคนิคการย้อมสี PPB ศึกษาความแตกต่างระหว่างพันธุ์ของลักษณะปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้อง และพบว่าในเมล็ดนั้นมีตำแหน่งการสะสมของปริมาณธาตุเหล็กที่แตกต่างกันโดยบริเวณ embryo มีการติดสีย้อมเข้มที่สุด aleurone layer มีการติดสีเล็กน้อย ส่วนบริเวณ endosperm นั้นไม่พบการติดสีย้อม Ozturk *et al.* (2006) ได้ใช้การย้อมสี DTZ (diphenyl thiocarbazone) ในการตรวจสอบตำแหน่งของธาตุสังกะสีในเมล็ดข้าวสาลี พบว่าบริเวณ embryo และ aleurone ของเมล็ดมีการติดสีเข้ม จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการประเมินธาตุเหล็กในเมล็ดกล้องโดยการย้อมสี PPB มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางบวกกับการวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้องด้วยวิธีการทางเคมี ($r = 0.715^{***}$) แต่การย้อมสี PPB ไม่สามารถแยกการกระจายตัวของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ได้ เมื่อพิจารณาที่ค่าเหล็กหนึ่งค่า พบว่ามีค่าเฉลี่ยการติดสีในเมล็ดที่ระดับการติดสีต่าง ๆ หลายค่า ตัวอย่างเช่น ลูกผสมชั่วที่ 2 ที่มีปริมาณธาตุเหล็ก 13 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยการติดสีในเมล็ดที่ระดับการติดสีต่าง ๆ ตั้งแต่ 1.6-3 (ภาพ 4.2.3) อาจเนื่องจากว่าการย้อมสี PPB นั้นเป็นการประเมินธาตุเหล็กเฉพาะตำแหน่งที่มีการสะสมธาตุเหล็กมากที่สุด คือบริเวณ embryo ไม่ได้เป็นการประเมินธาตุเหล็กจากทั้งเมล็ด จึงไม่สามารถบอกปริมาณของธาตุเหล็กในเมล็ดเป็นตัวเลขที่แน่นอนจากบริเวณที่ติดสีย้อม นอกจากนั้นยังไม่ได้พิจารณาถึงขนาดเมล็ดร่วมด้วย และจากข้อมูลลักษณะสัณฐานของเมล็ด พบว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พันธุ์ IR68144 มีเมล็ดยาวปานกลาง-รูปร่างปานกลาง พันธุ์ชัยนาท1 มีเมล็ดยาวมาก-รูปร่างเรียว (ตาราง 4.1.7) และพบว่าความยาวเมล็ดและรูปร่างเมล็ดข้าวกล้องกับปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้อง มีความสัมพันธ์กันในทิศทางลบ (r = - 0.601*** และ r = - 0.452*** ตามลำดับ) อาจจะเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้การย้อมสี PPB แยกการกระจายตัวของปริมาณธาตุเหล็กในต้นเดี่ยวๆ ของลูกผสมชั่วที่ 2 ไม่ได้ เนื่องจากลักษณะเมล็ดของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 มีการกระจายตัวด้วย ดังนั้นการย้อมสี PPB เป็นเทคนิคที่เหมาะสำหรับคัดเลือกเบื้องต้นในการแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ และการคัดเลือกในรุ่นหลังๆ เนื่องจากพืชจะเริ่มเป็นพันธุ์แท้ (homozygote genotype)

เนื่องจากพันธุ์ที่นำมาศึกษานอกจากจะแตกต่างในปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวกล้องแล้ว ยังพบว่าแตกต่างในรูปร่างเมล็ดข้าวกล้องด้วย สำหรับลักษณะรูปร่างสัณฐานเมล็ดนั้น Prom-u-thai *et al.* (2007) กล่าวว่าความยาวและรูปร่างเมล็ดมีความสัมพันธ์กับ degree of milling (DOM) ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงการขจัดส่วนของ embryo และ aleurone ออกในระหว่างขั้นตอนการสีข้าว ซึ่งมีผลต่อการสูญเสียปริมาณธาตุเหล็กในข้าวขาว เนื่องจากบริเวณ embryo และ aleurone มีการสะสมของธาตุเหล็กในสัดส่วนที่สูงกว่าส่วนของ endosperm โดยเมล็ดที่มีลักษณะ สั้น-หนา มีค่า DOM น้อยที่สุด สำหรับพันธุ์พ่อแม่ที่มีลักษณะเมล็ดแตกต่างกัน เช่น คู่ผสมระหว่าง สั้น-หนา x ยาว-เรียว พบว่าลูกผสมชั่วแรกมีลักษณะเมล็ดยาว-ปานกลาง (ตาราง 4.1.7) และมีการกระจายตัวเป็นหลายแบบในชั่วถัดไป ดังนั้นการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของปริมาณธาตุเหล็กอาจจะต้องคำนึงถึงลักษณะเมล็ดร่วมด้วย เพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่ยังคงมีปริมาณธาตุเหล็กสูงในข้าวขาวเมื่อผ่านกระบวนการขัดขาวแล้ว

ผลการศึกษาหาตำแหน่งยีนระหว่าง SSR markers กับลักษณะปริมาณธาตุเหล็ก ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 คู่ผสมระหว่าง IR68144 x ชัยนาท 1 โดยใช้วิธีการ Bulk Segregant Analysis พบว่ามี marker ที่อยู่บริเวณแขนด้านสั้น บนโครโมโซมแท่งที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ร่วมกับปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ด คือ RM20 และ RM332 เมื่อนำลูกผสมชั่วที่ 2 ทั้งหมดมาตรวจสอบพบว่ามี QTL หนึ่งตัวที่อยู่ระหว่าง marker ทั้งสองตัวนี้ โดยมีระยะห่างระหว่าง RM20 และ RM332 เท่ากับ 34 และ 30.7 cM ตามลำดับ ผลที่เกิดจาก QTL ตัวนี้มีค่าเท่ากับ 14 เปอร์เซ็นต์ ของความแปรปรวนทั้งหมดของลักษณะปริมาณธาตุเหล็ก มีการแสดงออกเป็นแบบข่ม มีค่า degree of dominant (dominant/additive)เท่ากับ -1.2 James *et al.* (2007) ศึกษาในประชากร doubled-haploid lines จากระหว่าง indica variety คือ IR64 กับ japonica variety คือ Azucena ใช้ SSR marker จำนวน 437 ตัว พบว่าปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดนั้นถูกควบคุมโดย QTLs 3 ตัว ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 2 8 และ 12 แต่ละตัวมีผล 17 18 และ 14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ของความแปรปรวนทั้งหมดของลักษณะปริมาณธาตุเหล็ก Gregorio and Tint

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(2003) ใช้ประชากร doubled-haploid lines คู่ผสมระหว่าง IR64 x Azucena เช่นกัน แต่ใช้ marker ชนิด RFLP (Restriction fragment length polymorphism) พบ QTL 3 ตัวเช่นกันที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะปริมาณธาตุเหล็ก อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 7, 8 และ 9 ความแตกต่างของ QTL แต่ละงานทดลองอาจเกิดจากความแตกต่างของพันธุกรรม ประชากรที่ใช้ในการศึกษา ชนิดของ molecular marker หรือระยะห่างระหว่าง marker ที่กว้างอาจจะลดจำนวนของ QTL ลงได้ (Paterson *et al*., 1991)

ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดถูกควบคุมด้วยยีนหลักจำนวน 2 ยีน และลักษณะธาตุเหล็กสูงถูกควบคุมด้วยยีนแบบข่ม ดังนั้นสามารถใช้วิธีการผสมกลับ (backcross) สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ธาตุเหล็ก โดยใช้พันธุ์เหล็กสูงเป็น donor parent ส่วนพันธุ์เหล็กต่ำแต่มีคุณสมบัติอื่นๆ ที่ดี เช่น ทนทานต่อโรคและแมลง มีคุณภาพการหุงต้ม ซึ่งปันข้าวพันธุ์หลักของไทย และเป็นที่นิยมปลูกและบริโภคกันอย่างกว้างขวางเป็น recurrent parent โดยใช้พันธุ์ใดเป็นพ่อแม่ก็ได้ และการวัดปริมาณธาตุเหล็กด้วยวิธีวิเคราะห์เคมีเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการประเมินลักษณะปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดในประชากรที่มีการกระจายตัว การพบตำแหน่ง SSR marker ที่อยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมปริมาณธาตุเหล็ก สามารถใช้เป็นเครื่องมือสำหรับช่วยคัดเลือก (marker-assisted selection, MAS) ในโครงการปรับปรุง พันธุ์เพื่อเพิ่มคุณภาพเมล็ดต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved