



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การปรับปรุงพันธุ์พืช)

ปริญญา

การปรับปรุงพันธุ์พืช

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การคัดกรองประชากรข้าวกลายพันธุ์ขนาดใหญ่ และพันธุศาสตร์ของปริมาณธาตุเหล็ก
ในเมล็ด

Screening in a Large Mutagenized Rice Population and Genetic of Grain Iron Content

นามผู้วิจัย นางสาวสุภาพร พรหมพันธุ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์อภิชาติ วรรณวิจิตร, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์วรวิทย์ สิริพลวัฒน์, D.Agr.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สืบสิงห์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การคัดกรองประชากรข้าวกลายพันธุ์ขนาดใหญ่ และพันธุศาสตร์ของปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ด

Screening in a Large Mutagenized Rice Population and Genetic of Grain Iron Content

โดย

นางสาวสุภาพร พรหมพันธุ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การปรับปรุงพันธุ์พืช)

พ.ศ. 2553

สุภาพร พรหมพันธุ์ 2553: การคัดกรองประชากรข้าวกลายพันธุ์ขนาดใหญ่ และพันธุ์
ศาสตร์ของปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ด ปริญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (การปรับปรุง
พันธุ์พืช) สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืช โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์อภิชาติ วรรณวิจิตร, Ph.D. 88 หน้า

โรคโลหิตจางเนื่องจากการขาดธาตุเหล็กเป็นปัญหาทั่วโลกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในทวีป
เอเชีย โรคนี้ส่งผลกระทบต่อเด็กก่อนวัยเรียน และหญิงมีครรภ์ ซึ่งสาเหตุมาจากอาหาร
หลักที่ประชากรบริโภคมีธาตุเหล็กไม่เพียงพอ โดยเฉพาะในข้าว และธัญพืช ซึ่งเป็นอาหารหลัก
ของประชากรมากกว่าครึ่งหนึ่งของโลก ข้าวเป็นธัญพืชที่จัดว่ามีปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดต่ำกว่า
ธัญพืชชนิดอื่น ๆ ดังนั้นการเพิ่มความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวน่าจะช่วยแก้ปัญหานี้
โรคนี้ได้ ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรองข้าวที่มีธาตุเหล็กสูง และมีความเป็น
ประโยชน์สูง ร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้ได้มาก จากประชากรข้าวเจ้าหอมชนิดที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย
รังสี fast neutron จำนวน 12,000 สายพันธุ์ ด้วยวิธีการใช้สีย้อม Perls' Prussian blue และหลังจาก
พบสายพันธุ์ที่มีความหนาแน่นของปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดสูง วิเคราะห์ยืนยันผลด้วย การ
วิเคราะห์ Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer (ICP) ที่สถาบันวิจัยโภชนาการ
มหาวิทยาลัยมหิดล และ Atomic Absorption Spectrometer (AAS) และวิเคราะห์หาปริมาณ
ฟอสฟอรัสอินทรีย์ในเมล็ดด้วยวิธี High Inorganic P method (HIP) ผลการทดลองพบข้าวที่มี
ธาตุเหล็กสูงจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ 4643 10599 และ 1255 มีปริมาณธาตุเหล็กใน
เมล็ดสูงกว่าข้าวเจ้าหอมชนิด ที่ความเข้มข้น 29.2 28.71 และ 25.7 mg/kg Fe ตามลำดับ และค้นพบ
สายพันธุ์ที่มีปริมาณฟอสฟอรัสอินทรีย์สูงประมาณ 4.6 – 13.9 mg/L P จำนวน 10 สายพันธุ์ จาก
การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะของการสะสมธาตุเหล็กในเมล็ด โดยการใช้การให้คะแนนจากการ
วิเคราะห์หาความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดด้วยวิธี Perls' Prussian blue ระหว่างพันธุ์ข้าวเจ้า
หอมชนิดกับสายพันธุ์ 4643 พบว่าการให้คะแนนในรุ่น F2 seed Score ++ : Score + มีอัตราส่วน
3:1 จากการคำนวณค่า chi-square ที่ df = 1 ยอมรับสมมติฐานที่ว่าอัตราส่วนฟีโนไทป์เท่ากับ 3:
1 ซึ่งเป็นไปตามกฎการแยกตัวของยีนของเมนเดล

Supaporn Phromphan 2010: Screening in a Large Mutagenized Rice Population and Genetic of Grain Iron Content. Master of Science (Plant Breeding), Major Field: Plant Breeding, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Apichart Vanavichit, Ph.D. 88 pages.

Iron (Fe) deficiency anemia (IDA) is a worldwide problem particularly in Asia. It most affect on the pre-school children and pregnant woman. IDA has been caused from staple food that the people consume. It has not enough nutrients especially in rice and cereal. Rice is the most staple food for people in a half of the world and has the lowest Fe concentration in grain among the cereal. Increased iron in a grain should have done to solve the symptom. The objective of this study was to screen high iron density and bioavailability on rice from 12,000 varieties of Jao Hom Nin mutant that were induced with fast neutron radiation. Four seeds per variety from mutant population was analyzed with Perls' Prussian blue method. High intensity of Prussian blue staining type was selected for Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer (ICP) at for institution of nutrition, Mahidol University and Atomic Absorption Spectrometer (AAS). Furthermore, high iron type were analyzed for free phosphorus with high inorganic P (HIP) method. It was found that 3 mutant types to include 4643, 10599 and 1255 have high iron density than Jao Hom Nin about 29.2, 28.71 and 25.7 mg/kg Fe respectively. Furthermore, we found high inorganic phosphate mutant that have about 4.6 - 13.9 mg/L P 10 types. A study of inheritance of Fe concentration in grain analyzed with Perls' Prussian blue method between Jao Hom Nin 4643 mutant line. Found that all of them were accepted at 3: 1 phenotypic ratio. The chi-square test at $df = 1$ agreeable with Mendel's law of segregation.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. อภิชาติ วรรณวิจิตร ประธานกรรมการที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้คำแนะนำเรื่องการเรียนรู้ การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไข
ข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และกราบขอบพระคุณ
รศ. ดร. อรรถนัย มงคลพร ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย และ ดร. สมพงษ์ ตระกูลรุ่ง ที่ได้ให้ความกรุณา
ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้อันเป็นประโยชน์
อย่างยิ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป และขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้
ประโยชน์ยีนข้าว ที่ศูนย์เฝ้าระวังสถานการณ์ รวมทั้งเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ขอขอบคุณ พี่ศิริพัฒน์
เรื่องพัยค์ซ์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่าง ๆ ตลอดจน พี่ ๆ และเพื่อน ๆ ทุกคนที่คอย
ให้กำลังใจ

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ ที่
ได้อบรมและให้กำลังใจผู้วิจัยมาตลอดในทุกเรื่อง

สุภาพร พรหมพันธุ์

พฤษภาคม 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	26
อุปกรณ์	26
วิธีการ	28
ผลและวิจารณ์	34
ผล	34
วิจารณ์	56
สรุป	58
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	59
ภาคผนวก	64
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	88

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงความต้องการธาตุเหล็กประจำวันของคนต่างอายุและเพศ ของ Recommended Daily Allowance (RDA)	13
2	การเปลี่ยนแปลงของฟอสฟอรัสลำดับส่วนต่าง ๆ ในเมล็ดข้าวเมือก	23
3	ข้าวพันธุ์ตรวจสอบจำนวน 7 พันธุ์ที่ระดับของปริมาณธาตุเหล็กต่าง ๆ	35
4	ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Atomic Absorption Spectrometer (AAS)	39
5	ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometer (ICP)	44
6	เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กในข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ ระหว่างเทคนิค ICP, AAS และ Perls' Prussian blue	46
7	ปริมาณธาตุเหล็กที่บริเวณ pericarp embryo และ endosperm ที่วิเคราะห์ด้วย Laser Ablation Inductively Couple Plasma Mass Spectrometer (LA-ICP-MS)	47
8	ปริมาณฟอสฟอรัสที่วิเคราะห์ด้วยวิธี High Inorganic Phosphats (HIP method) ในข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์	49
9	จำนวนต้นประชากร F2 seed ระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับสายพันธุ์ 4643 ที่ แสดงผลการให้คะแนนที่ Score + และ Score ++	51
10	เปอร์เซ็นต์เมล็ดดีและเมล็ดลีบของข้าวเจ้าหอมนิล ข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ สายพันธุ์ 4643 และ 8097 และกลุ่มผสม 3 คู่	52
11	สายพันธุ์ 8097 พันธุ์พ่อของกลุ่มผสมระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับสายพันธุ์ 8097	53
12	จำนวนต้นประชากร F2 seed ระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับสายพันธุ์ 8097 ที่ แสดงผลการให้คะแนนที่ Score 0 และ Score +	54
13	จำนวนต้นประชากร F2 seed ระหว่างข้าวสายพันธุ์ 4643 กับสายพันธุ์ 8097 ที่ แสดงผลการให้คะแนนที่ Score 0 Score + และ Score ++	55

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
1	จำนวนต้นและช่อของประชากร F2 seed ระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับสายพันธุ์ 4643 ที่แสดงผลการให้คะแนนที่ Score + และ Score ++	65
2	แสดงค่าการดูดกลืนแสงของปริมาณฟอสฟอรัส (mg/L) ในสายพันธุ์ที่มีธาตุเหล็กสูง จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Perls' Prussian blue	75

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนผังการสร้างประชากรข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์	7
2	องค์ประกอบของเมล็ด	15
3	เกลือไฟเตท	20
4	การสะสมสารอนินทรีย์ฟอสเฟต(Pi) และไฟเตทในเมล็ดข้าวในช่วงเวลา 35 วัน หลังจากออกดอก	21
5	ปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดไฟติกจากไมโออิโอซิทอล	22
6	ระดับของการติดสีข้อม Perls' Prussian blue บริเวณ embryo ของเมล็ดข้าว	29
7	Standard Phosphats concentration	32
8	จำนวนสายพันธุ์ของข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่มีความเข้มของการติดสีข้อม Perls' Prussian blue ระดับต่างๆ ซึ่งแสดงถึงความแปรปรวนของการสะสมธาตุเหล็กในเมล็ดของข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์	34
9	ผลการย้อมสีด้วยวิธี Perls' Prussian blue ของข้าวพันธุ์ตรวจสอบจำนวน 7 พันธุ์ ที่ระดับของปริมาณธาตุเหล็กต่าง ๆ	36
10	ตัวอย่างข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่มีระดับการติดสีข้อมด้วยวิธี Perls' Prussian blue Score ++ Score + และ Score 0 เปรียบเทียบกับข้าวเจ้าหอมนิล (Score +)	37
11	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี AAS กับระดับของการติดสีข้อม Perls' Prussian blue	41
12	กราฟแสดงการกระจายตัวของปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Atomic Absorption Spectrometer (AAS)	42
13	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ICP กับระดับของการติดสีข้อม Perls' Prussian blue	45
14	ตัวอย่างแสดงการกระจายตัวของธาตุเหล็กในเมล็ดข้าว (endosperm และ embryo) ที่วิเคราะห์ด้วย Laser Ablation Inductively Couple Plasma Mass Spectrometer (LA-ICP-MS)	48
15	การเปรียบเทียบสีความเข้มข้นของปริมาณฟอสฟอรัสระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์กับสีความเข้มข้นมาตรฐาน	49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	เมล็ดไม่สมบูรณ์ของสายพันธุ์ 8097	52
ภาพผนวกที่		
1	แช่เมล็ดในน้ำยาฟอกขาว (clorox) 10 นาที เพื่อขจัดสีที่ผิวเมล็ด	79
2	นำเมล็ดวางในกระดาษทิชชูที่ขึ้น 12 – 15 ชั่วโมง (ข้ามคืน) เพื่อให้เมล็ดนิ่ม	79
3	ผ่าเมล็ดตามแนวยาว แล้วแช่ staining solution	80
4	เมล็ดที่แช่ staining solution 30 นาทีแล้ว ล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง สังเกตการติดสีที่บริเวณ embryo	80
5	สังเกตการติดสีที่บริเวณ embryo ของข้าวพันธุ์ตรวจสอบ เพื่อเปรียบเทียบกับข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์	81
6	นำเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ ใส่ plate 24 well ตัวอย่างละ 4 เมล็ด	82
7	แช่เมล็ดด้วยน้ำยาฟอกขาว (clorox) 10 นาที เพื่อขจัดสีผิวเมล็ด	82
8	หลังจากแช่น้ำยาฟอกขาว 10 นาที สีของผิวเมล็ดจะเป็นสีขาวหมดทุกเมล็ด	83
9	ล้างเมล็ดด้วยน้ำเปล่า เพื่อล้างน้ำยาฟอกขาวออก และนำเมล็ดวางบนกระดาษทิชชูที่ขึ้น	83
10	วางเมล็ดบนกระดาษทิชชูที่ขึ้น	84
11	ปิดด้วยกระดาษทิชชู แล้วเติมน้ำให้ชุ่มอยู่ตลอดเวลา ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน	84
12	ผ่าเมล็ดตามยาว	85
13	นำเมล็ดที่ผ่าแล้วใส่ plate 24 well	85
14	เตรียม staining solution ผสมกันระหว่าง 2 % hydrochloric acid กับ 2% potassium ferrocyanide	86
15	นำ staining solution ที่เตรียมใหม่ ใส่ในตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง	86
16	สังเกตการติดสีที่บริเวณ embryo เปรียบเทียบกับพันธุ์ตรวจสอบแล้วให้คะแนน	87

การคัดกรองประชากรข้าวกลายพันธุ์ขนาดใหญ่ และพันธุศาสตร์ ของปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ด

Screening in a Large Mutagenized Rice Population and Genetic of Grain Iron Content

คำนำ

ภาวะทุพโภชนาการเป็นปัญหาที่สำคัญยิ่งต่อการพัฒนาประเทศ การขาดธาตุเหล็ก เป็นภาวะทุพโภชนาการหนึ่งที่พบได้ในหลายประเทศทั่วโลก สาเหตุของการขาดธาตุเหล็กมีหลายประการ ได้แก่ (1) การมีธาตุเหล็กปริมาณน้อยในอาหาร (2) ไม่สามารถรับประทานอาหารที่มีธาตุเหล็กที่เพียงพอได้ เนื่องจากธาตุเหล็กมีมากในเนื้อสัตว์ และเครื่องในสัตว์ที่มีราคาสูง (3) การได้รับธาตุเหล็กเพียงพอ แต่ไม่สามารถนำไปใช้ได้ เพราะถูกขัดขวางการดูดซึม

โรคโลหิตจาง เนื่องจากการขาดธาตุเหล็กเป็นปัญหาสำคัญทางด้านโภชนาการ ซึ่งในปัจจุบันพบว่าประชากรของโลกประมาณ 3 พันล้านคน โดยเฉพาะผู้หญิง และเด็กในวัยเจริญเติบโต ธาตุเหล็กเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของการสร้างเม็ดเลือดแดง แหล่งอาหารธาตุเหล็กในประเทศกำลังพัฒนา รวมทั้งประเทศไทยส่วนใหญ่ได้มาจากพืชเป็นหลัก ซึ่งร่างกายสามารถนำไปใช้ได้ น้อย คนเราต้องการธาตุเหล็กในแต่ละวันประมาณ 10-15 มิลลิกรัมต่อวัน ส่วนใหญ่จะได้จากการบริโภคเนื้อสัตว์ ร่างกายสามารถดูดซึมได้ประมาณร้อยละ 20 แต่ธาตุเหล็กที่ได้จากธัญพืช ร่างกายจะได้ซึมไปได้ร้อยละ 3 - 5 เนื่องจากมีสารยับยั้งการดูดซึม เช่น ไฟเตท แทนนิน และ polyphenolic compound ฟอสฟอรัสในเมล็ดพบในรูปของสารประกอบต่าง ๆ ได้แก่ กรดไฟติก (phytic acid) สารประกอบฟอสฟอรัสอินทรีย์ ฟอสโฟลิปิด ฟอสโฟโปรตีน และกรดนิวคลีอิก แต่พบฟอสฟอรัสในรูปของกรดไฟติกมากที่สุดถึงประมาณ 65-85% ของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดพืช พืชสะสมฟอสฟอรัสในรูปกรดไฟติกเป็นส่วนใหญ่ กรดไฟติกสามารถจับกับธาตุเหล็กสังกะสี และโปรตีน เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำ จึงไม่สามารถถูกดูดซึมไปใช้ได้ ผลคือในปัจจุบันนักปรับปรุงพันธุ์พืชจะมีความพยายามในการพัฒนาเทคนิคการวิจัยโดยการเพิ่มคุณค่าทางด้านโภชนาการในอาหารหลักโดยเฉพาะในข้าวให้มีธาตุเหล็กมากยิ่งขึ้น ซึ่งน่าจะเป็นสิ่ง

ที่ช่วยให้ประชากรเหล่านั้นได้รับธาตุเหล็กเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม การเพิ่มปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร

ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีปริมาณธาตุเหล็กสูง จึงน่าจะทำให้ผู้บริโภคได้รับธาตุเหล็กเพิ่มขึ้นรวมทั้งมีโภชนาการที่ดีขึ้น และเป็นวิธีการแก้ปัญหาการขาดสารอาหารในมนุษย์ที่ยั่งยืนอีกด้วย ซึ่งประชากรที่นำมาใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมนี้เป็นข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ โดยการอาบรังสี Fast neutron ที่ความเข้มข้น 33 Gy เป็นพันธุ์ข้าวที่ได้รับการคัดเลือกและพัฒนาจนได้ข้าวที่มีเมล็ดข้าวกล้องเรียวยาว สีม่วงเข้ม ข้าวกล้องเมื่อหุงสุกจะนุ่ม เหนียว หอม ข้าวสารหุงสุกมีสีม่วงอ่อน นุ่ม และมีกลิ่นหอมเช่นกัน คุณสมบัติที่สำคัญของข้าวเจ้าหอมนิลคือ ข้าวกล้องมีโปรตีนสูงถึง 12.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณคาร์โบไฮเดรต 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ amylose 16 เปอร์เซ็นต์ และยังประกอบไปด้วยธาตุเหล็ก สังกะสี ทองแดง แคลเซียม และโพแทสเซียม ซึ่งสูงกว่าข้าวขาวดอกมะลิ และวิธีที่ใช้ในการทดสอบคือวิธี Perls' Prussian blue เป็นวิธีที่สะดวก ประหยัด รวดเร็ว ซึ่งเหมาะกับประชากรที่มีจำนวนมากอย่างยิ่ง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเพิ่มโอกาสในการพัฒนาพันธุ์ข้าวที่มีความหนาแน่นของธาตุเหล็กสูงในประชากรข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ขนาดใหญ่
2. เพื่อคัดกรองข้าวกลายพันธุ์ที่มีธาตุเหล็กสูง จากประชากรข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์
3. เพื่อคัดกรองข้าวกลายพันธุ์ที่มีไฟเตคต่ำ จากประชากรข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่มีความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดสูง
4. เพื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะยีนควบคุมการสะสมธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์

การตรวจเอกสาร

ภาวะทุพโภชนาการ (Malnutrition)

โภชนาการที่ดีมีความสำคัญยิ่งต่อสุขภาพ แต่ในปัจจุบัน การขาดสารอาหารยังคงเป็นปัญหาสำคัญ โดยมีสาเหตุต่างๆ ได้แก่ ปริมาณแคลอรีและโปรตีนไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย ขาดความรู้เรื่องโภชนาการ ทำให้พฤติกรรมมารับประทานอาหารไม่เหมาะสม ขาดธาตุอาหารรองเช่น เหล็กและสังกะสี เป็นต้น

ภาวะโลหิตจางเนื่องจากการขาดธาตุเหล็ก เป็นปัญหาที่มีผลกระทบต่อประชากรของประเทศที่กำลังพัฒนาซึ่งรวมถึงประเทศไทยด้วย ปัจจุบันประชากรโลกกว่าครึ่งหนึ่งของประชากรโลก กำลังขาดธาตุเหล็ก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งส่วนมากเป็นประเทศกำลังพัฒนามีปัญหาการขาดธาตุเหล็กในประชากรมากถึงร้อยละ 60 – 70 สำหรับประเทศไทยมีการสำรวจในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบปัญหาการขาดธาตุเหล็กถึงร้อยละ 18 ในเด็กก่อนวัยเรียน และร้อยละ 40 ในหญิงมีครรภ์ ธาตุเหล็กมีบทบาทและหน้าที่สำคัญในการลำเลียงออกซิเจนไปสู่ส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย เป็นองค์ประกอบของเซลล์เม็ดเลือดแดง และเป็นสารตั้งต้นในการสร้างภูมิคุ้มกันในร่างกาย การขาดธาตุเหล็กมีผลกระทบโดยตรงต่อการพัฒนาการของสมอง ซึ่งอาจเกิดผลกระทบระยะยาวในเด็กที่กำลังเจริญเติบโต

ธาตุเหล็กเป็นสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายและเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเม็ดเลือดแดง มีหน้าที่ขนส่งออกซิเจนไปเลี้ยงเซลล์ทุกเซลล์ เพื่อให้ร่างกายทำงานได้ตามปกติ ธาตุเหล็กจะอยู่ในอาหาร 2 รูปแบบ คือ สารประกอบฮีม (Heme iron) คืออยู่ในรูปฮีมโกลบิน พบมากในเลือด ดับ และเนื้อสัตว์ต่างๆ เช่น วัว หมู ปลา ไก่ ธาตุเหล็กในรูปแบบนี้จะถูกดูดซึมได้โดยตรงที่เยื่อลำไส้เล็ก สารประกอบที่ไม่ใช่ฮีม (Nonheme iron) พบได้ 2 รูปแบบ คือ สารอินทรีย์ พบได้ในอาหาร เช่น ธัญพืช แป้ง ไข่ ผัก ผลไม้ สารอนินทรีย์ เช่น ยา สารอาหารที่มีธาตุเหล็กมาก และร่างกายดูดซึมนำไปใช้ได้ก็คือ ธาตุเหล็กที่อยู่ในรูปสารประกอบฮีม คือ ธาตุเหล็กในเลือด ดับ และเนื้อสัตว์ต่างๆ โดยทั่วไปการขาดธาตุเหล็กมีสาเหตุมาจากการได้รับธาตุเหล็กในอาหารประจำวันไม่เพียงพอ โดยเฉพาะในพื้นที่ชนบท เนื่องจากแหล่งของธาตุเหล็กที่อยู่ในเนื้อสัตว์ ดับ และเลือดซึ่งมีราคาแพง นอกจากนี้ การดูดซึมธาตุเหล็กจะดีขึ้นเมื่ออยู่ในโปรตีนที่มีคุณภาพดี และการดูดซึม

ไม่ถูกขัดขวางโดยสารบางชนิด เช่น กรดไฟติก ที่สามารถจับกับเหล็ก และ โปรตีน (Oberleas and Prasad, 1969) เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำจึงไม่สามารถถูกดูดซึมไปใช้ได้ การควบคุมป้องกันปัญหาการขาดธาตุเหล็ก โดยทั่วไปทำได้ 4 วิธี คือ

1. ทำอาหารเสริมป้องกันปัญหาการขาดธาตุเหล็กโดยอาจทำในรูปยาเม็ด
2. การเติมธาตุเหล็กในอาหาร
3. ปรับปรุงพันธุ์พืชสำคัญ เช่น ข้าว ให้มีธาตุเหล็ก และความเป็นประโยชน์สูง
4. ป้องกันการขัดขวางการดูดซึมธาตุเหล็ก โดยลดปริมาณกรดไฟติกให้เหลือปริมาณที่เหมาะสมในอาหารพวกธัญพืชต่าง ๆ

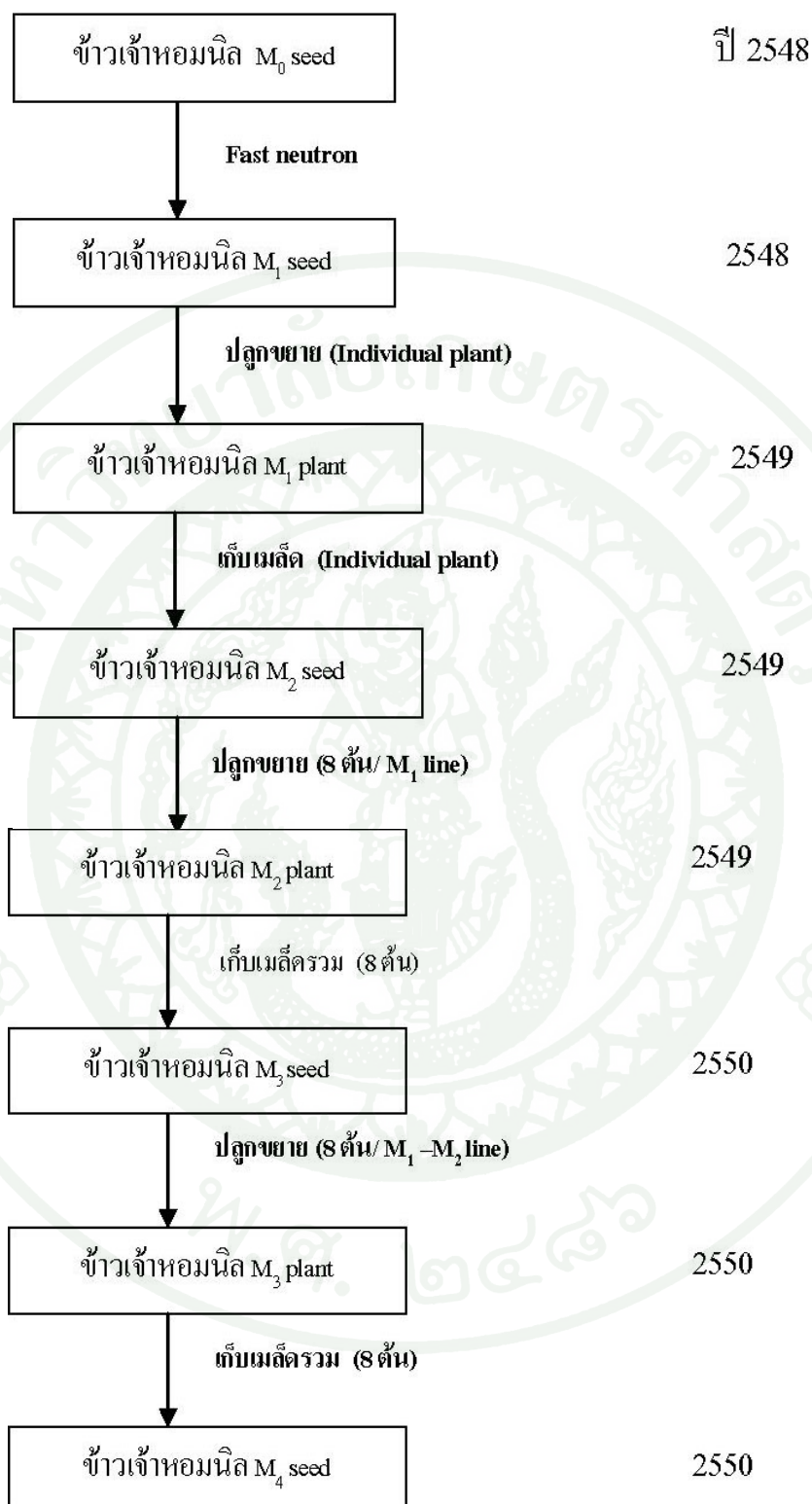
ข้าวกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ (Mutagenesis) เป็นการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมเซลล์ โดยการเปลี่ยนแปลงนั้นเกิดหลายแบบไม่ว่าจะเป็นการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง การเพิ่มขึ้นหรือสูญหายไปของสารพันธุกรรม การเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ทำได้หลายวิธี หลังจากที่เซลล์ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์แล้วจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมขึ้น ในรูปลักษณะของ heterozygous genotype หรือลักษณะของ homozygous recessive genotype ซึ่งสามารถที่จะหาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม โดยใช้วิธี PCR-base ซึ่งมีการใช้ฐานข้อมูลต่าง ๆ มาช่วยในการเปลี่ยนแปลง หรืออาจดูการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางกายภาพ (phenotype) แล้วจึงดูความแตกต่างในระดับสารพันธุกรรมเพื่อใช้เป็นข้อมูลทาง genotype

การพัฒนาการใช้สารกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ (Chemical mutagenesis) หรือการอาบรังสี gamma หรือ fast neutron วิธีดังกล่าวสามารถทำได้กับพืชทุกชนิด และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดีที่สุด แต่เนื่องจากในสมัยก่อนไม่มีการค้นหาตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์ได้ ระบบการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์จึงไม่ได้นำมาใช้ในการโคลนนิ่งโดยตรง ปัจจุบันได้มีการค้นพบลำดับเบสของยีนทุกตัวในข้าวแล้ว ดังนั้นการติดตามการกลายพันธุ์จึงอาจทำได้ง่ายขึ้น ระบบดังกล่าวเรียกว่า TILLING (Targeting Induced Local Lesion in Genomes) อาศัยข้อมูลลำดับเบสของยีนทุกตัว ทำให้สามารถเลือก mutant เฉพาะตำแหน่งยีนที่เราสนใจได้ เพื่อติดตามคุณลักษณะที่จะเปลี่ยนแปลงไป ประโยชน์ที่จะได้รับจาก TILLING คือการค้นพบ mutant ของลักษณะใหม่ ๆ ที่ไม่เคยพบมาก่อน ทำให้เราสามารถเพิ่มลักษณะใหม่ ๆ เข้าไปในข้าวได้

การสร้างประชากรข้าวกลายพันธุ์

การก่อการกลายพันธุ์โดยการอาบรังสี Fast neutron ที่ความเข้มข้น 33 Gy ซึ่งได้รับความร่วมมือจากสำนักงานปรมาณูแห่งชาติเพื่อสันติ โดยนำเมล็ดพันธุ์ข้าวเจ้าหอมนิลไปฉายรังสีเป็นจำนวน 400,000 เมล็ด และได้ปลูกขยายเมล็ดพันธุ์ในรุ่น M1 ซึ่งได้จัดเตรียมเมล็ดพันธุ์ได้จำนวน M1 ที่ปลูกได้รวม 1,250 plate คิดเป็นจำนวนต้นทั้งหมด 119,820 ต้น *Gnomic DNA collection*: ในการทำ DNA Pooling นั้นเป็นการรวบรวม DNA Sample จากต้นหลาย ๆ ต้น โดยอาจจะมีต้นที่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเข้ามาด้วย ซึ่งในการตรวจสอบหาต้นกลายพันธุ์ดังกล่าวนี้ทำได้ยากในกรณีที่มีสารพันธุกรรมของต้นที่กลายพันธุ์อยู่น้อย แต่เนื่องจากตัวอย่างพันธุ์ข้าวได้รับการอาบรังสีมีปริมาณมาก จึงได้มีการจัดระบบการตรวจหาต้นข้าวที่ก่อการกลายพันธุ์ในรุ่น M1 ปลูกแล้วเก็บขยายในรุ่น M2 M3 M4 ต่อไป เพื่อนำเมล็ดในรุ่น M4 ไปตรวจสอบหาการกลายพันธุ์และทำการทดลองในงานวิจัยครั้งนี้จำนวน 12,000 สายพันธุ์



ภาพที่ 1 แผนผังการสร้างประชากรข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์

ที่มา: อภิชาติ (2547)

ธาตุเหล็กในร่างกาย

ธาตุเหล็กเป็นแร่ธาตุหนึ่งที่มีความจำเป็นในการสร้างเม็ดเลือดแดง คนที่ขาดเหล็กจึงเกิดภาวะซีดได้ เหล็กมีความจำเป็นกับคนทุกวัย โดยเฉพาะวัยที่มีการเจริญเติบโตสูง เช่น ทารก เด็กวัยรุ่น หญิงตั้งครรภ์ เป็นต้น ในหญิงวัยเจริญพันธุ์มีการสูญเสียเหล็กไปกับประจำเดือน ถึงแม้เป็นปริมาณไม่มากแต่ควรได้รับมากกว่าผู้ชายในวัยเดียวกัน คนปกติมีเหล็กประมาณ 3-5 กรัม ร้อยละ 70 ของเหล็กอยู่ในเม็ดเลือดแดงหรือฮีโมโกลบิน ที่เหลืออยู่ในตับ ม้าม ไชกระดู และใน กล้ามเนื้อ (Myoglobin) เลือด 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร มีเหล็กประมาณ 40-50 มิลลิกรัม ในน้ำเลือดเหล็กมักรวมอยู่กับโปรตีนโกลบูลิน หรือ อยู่ในเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการใช้ออกซิเจน เช่น Cytochrome, Peroxidase และ Catalase แหล่งที่พบเหล็ก ได้แก่ ดับทุกชนิด เครื่องในสัตว์ เนื้อสัตว์ ไข่แดง ผักใบเขียว ถั่วเมล็ดแห้ง ฯลฯ น้ำตาลมะพร้าว และน้ำตาลทรายแดง มีเหล็กมากกว่าน้ำตาลทรายขาว อาหารที่หุงต้มด้วยกระทะเหล็กจะมีเหล็กสูงขึ้น แต่เหล็กที่ได้นั้นจะใช้ประโยชน์ได้นำน้อยไม่มีผู้ใดทราบ การทำให้เนื้อหรือผักเป็นชิ้นเล็กแล้วนำไปล้างน้ำ จะทำให้เสียเหล็กมาก

ธาตุเหล็กมีความสำคัญในปฏิกิริยาเคมีในร่างกายหลายชนิด เหล็กในร่างกายอยู่ในเม็ดเลือดแดงโดยเป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) และเป็นส่วนประกอบของ Enzyme ต่าง ๆ โดยที่เหล็กจะรวมอยู่ในสารประกอบที่สำคัญคือ Porphyrin และ Heme ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญหลาย ๆ ชนิด รวมถึงฮีโมโกลบิน ในเลือด ไมโอโกลบิน (Myoglobin) ในกล้ามเนื้อ และ Enzyme Cytochrome p - 450 เหล็กยังเป็นส่วนประกอบของ Enzyme อื่น ๆ อีก เช่น Catalase peroxidase ซึ่งทำหน้าที่ขจัดหรือแลกเปลี่ยนออกซิเจนในร่างกาย ทำให้มีชีวิตอยู่ได้ ธาตุเหล็กในรูปแบบที่เป็นอนินทรีย์สารจะเป็นพิษต่อร่างกาย ดังนั้นร่างกายจึงมีขบวนการพิเศษในการดูดซึม ขนถ่าย และเก็บสะสมเหล็กเอาไว้ใช้ในร่างกาย ในสภาวะปกติ ร่างกายจะรักษาภาวะสมดุลของธาตุเหล็กเอาไว้อย่างมั่นคง แต่ในบางกรณีอาจจะมีปัจจัยต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดภาวะพร่องหรือเกิน ปริมาณเหล็กอยู่ในคนนั้นแตกต่างกัน 3-5 กรัม ขึ้นอยู่กับ อายุ เพศ ขนาด ภาวะการโภชนาการ สุขภาพ ประมาณร้อยละ 70 ของเหล็กทั้งหมด อยู่ในเลือดคือในเม็ดเลือดแดง โดยเป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบิน ซึ่งทำหน้าที่พาออกซิเจนไปใช้ในการหายใจในเซลล์ ในน้ำเลือดคือ พลาสมา ก็จะมีธาตุเหล็กอยู่เล็กน้อยคือ ประมาณ 3 มิลลิกรัม เหล็กร้อยละ 26 จะเก็บในรูปแบบของ เฟอร์ริทิน (Ferritin) หรือ เฮโมซิเดอริน โดย ตับ ม้ามและ ไชกระดู เพื่อไว้สำหรับสร้างฮีโมโกลบินของเม็ดเลือดแดงในยามต้องการใช้ เหล็กร้อยละ 3 อยู่ในกล้ามเนื้อเหล็กจะเป็นองค์ประกอบของสารที่เรียกว่า ไมโอโกลบิน (Myoglobin) ส่วนที่เหลืออยู่ในน้ำย่อยหลายชนิดที่มีอยู่ในเซลล์ เหล็กที่พบ

ในเลือดเป็นเหล็กในสภาพขนส่ง ที่เรียกว่า ทรานส์เฟอร์ริน (Transferrin) ที่จะส่งเหล็กจากเนื้อเยื่อหนึ่งไปยังอีกเนื้อเยื่อหนึ่ง

ประโยชน์ต่อร่างกาย

- หน้าที่หลักรวมกับโปรตีนและทองแดง เพื่อสร้างเฮโมโกลบินซึ่งเป็นสารที่ให้สีของเม็ดเลือดแดงจะเป็นตัวส่งออกซิเจนในเลือดจากปอดไปยังอวัยวะต่าง ๆ ดังนั้นเหล็กจึงเป็นตัวสร้างคุณภาพของเลือด
- ส่วนประกอบของโปรตีนและน้ำย่อย โปรตีนที่มีเหล็ก เช่น เฮโมโกลบิน น้ำย่อยที่มีเหล็ก เช่น คีโมเลส มีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตและกระบวนการหายใจของเซลล์
- เหล็กมีความจำเป็นในการผลิตฮีโมโกลบิน ซึ่งจะพบเฉพาะในกล้ามเนื้อเท่านั้น
- ช่วยกำจัดสารแคดเมียมออกจากร่างกาย
- มีหน้าที่สำคัญในการนำวิตามินบีทุกชนิดไปใช้ให้ถูกต้อง
- รักษาและป้องกัน โลหิตจางที่เกิดจากการขาดธาตุเหล็ก ช่วยให้มีกำลัง กระฉับกระเฉงว่องไว เพิ่มภูมิคุ้มกันโรค

แหล่งที่พบ

- ปริมาณเหล็กในอาหารที่ได้จากพืชเป็นชนิดที่ไม่อยู่ในรูปของฮีมซึ่งดูดซึมได้ยากกว่าเหล็กในรูปของฮีม โดยจะอยู่ในรูปของเหล็กเฟอร์ริก
- ไขอาหาร อาหารที่มีไขอาหารมาก จะมีปริมาณเหล็กที่ถูกดูดซึมได้น้อยกว่าอาหารที่มีไขอาหารน้อยและชนิดของไขอาหารที่ต่างกันก็มีผลด้วย
- แตนนิน มีมากในใบเมี่ยง ใบชะพลู ใบชา จะลดการดูดซึมธาตุเหล็กในอาหาร ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงการดื่มชา

- ไฟเตท มีมากในธัญพืช พืชตระกูลถั่ว และพืชผักทั่วไป เกลือไฟเตทจะไม่สูญเสียไปในการหมักหรือต้มให้สุก

ผลของการขาดธาตุเหล็ก

- จะแสดงอาการออกช้า ๆ ที่ละเล็กละน้อย อาการที่เกิดขึ้นจะเป็นอาการของเลือดจางเรื้อรัง โดยจะมีอาการเหนื่อย อ่อนเพลียง่าย ปวดศีรษะ เบื่ออาหาร จุกเสียดยอดอก ใจสั่น หายใจอึดอัดลำบาก เยื่อบุในช่องปากซีดขาว เล็บซีด ลิ้นซีด บวมตามข้อ เท้าและมือชา รู้สึกเสียวตามมือตามเท้า

- หากขาดธาตุเหล็กไปมาก ๆ เลือดจางมากขึ้น อาการก็จะมีมากขึ้น เล็บแบนและงอขึ้น มีอาการซีดมากขึ้น เม็ดเลือดแดงมีสีซีดกว่าปกติ

สาเหตุของการขาดธาตุเหล็ก

- การสูญเสียเลือดเป็นระยะเวลานาน
- การดูดซึมเหล็กเข้าไปไม่เพียงพอ
- การที่ร่างกายไม่สามารถนำเหล็กที่ถูกดูดซึมแล้วไปใช้ได้
- ภาวะที่ร่างกายต้องการเหล็กมากขึ้น
- การสะสมเหล็กมีน้อยแต่กำเนิด
- ได้รับอาหารที่มีเหล็กไม่เพียงพอ
- หลังผ่าตัดกระเพาะอาหาร ทำให้การดูดซึมไม่ดี

ผลเสียของการที่ร่างกายขาดธาตุเหล็ก

- ในหญิงตั้งครรภ์ พบว่า อัตราการตายของแม่และลูกในครรภ์เพิ่มขึ้นในการคลอด
- ประสิทธิภาพการทำงานด้อยลง
- มีความต้านทานต่ออากาศหนาวน้อยลง
- ประสิทธิภาพการเรียนรู้ต่ำกว่าปกติในเด็กที่ขาดเหล็ก นอกจากนี้มีอาการซึมไม่

กระตือรือร้น

- ภูมิคุ้มกันของร่างกายต่ำลง คนที่ขาดเหล็กจะมีการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจส่วนต้น

- กล้ามเนื้อทำงานไม่ได้ตามปกติ เนื่องจากเหล็กเป็นส่วนประกอบของน้ำย่อย อัลฟาไกลิเซอรอลฟอสเฟตดีฮัยโดรจีเนส

ผลของการได้รับธาตุเหล็กมากเกินไป

ถ้าร่างกายมีการสะสมเหล็กมาก ๆ เนื่องจากความผิดปกติบางอย่าง เหล็กจะถูกสะสมไว้ในรูปเฮโมซิเดอริน เป็นผลึกที่ละลายได้ยาก ภาวะที่ร่างกายเก็บเหล็กไว้ในสภาพเฮโมซิเดอรินในปริมาณมากเรียก เฮโมซิเดอโรซิส อาการคือทำให้มีการเกาะของเหล็กแต่ละแห่งมาก โดยเฉพาะในตับและม้าม อาการตามมากคือ ตับแข็ง

การดูดซึมธาตุเหล็ก

ร่างกายสามารถใช้เหล็กในรูปของ เหล็กเฟอร์ริก (Ferric iron) หรือ เหล็กเฟอร์รัส (Ferrous iron) ได้แต่เท่าที่ปรากฏพบว่าตามธรรมชาติ เหล็กในรูปของเหล็กเฟอร์รัส (Ferrous iron) จะถูกใช้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าและเหล็กส่วนมากก่อนที่จะถูกดูดซึมจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเหล็กเฟอร์รัส การดูดซึมจะเกิดขึ้นบริเวณส่วนต้นของลำไส้เล็กหลังจากบริโภคแล้วภายใน 4 ชม.

ปัจจัยที่ส่งเสริมการดูดซึมธาตุเหล็ก

- ความต้องการเหล็กของร่างกาย ในภาวะที่ร่างกายต้องการเหล็กเพิ่ม
- สภาพที่เป็นอยู่ในลำไส้ ในสภาพที่เป็นกรดในกระเพาะและลำไส้เล็กตอนบน เหล็กเฟอร์ริกจะถูกเปลี่ยนเป็นเหล็กเฟอร์รัส ซึ่งเป็นรูปที่ละลายได้ง่าย
- ส่วนผสมของอาหารที่บริโภค เหล็กมีอยู่ในอาหารจากสัตว์ดูดซึมได้ดีกว่าเหล็กที่มีอยู่ในพืช

ปัจจัยที่ขัดขวางการดูดซึมธาตุเหล็ก

- แกลสโตรเฟอริน เป็นโปรตีนที่จับกับเหล็กในน้ำย่อยของกระเพาะอาหาร เมื่อจับกับเหล็กแล้วจะทำให้เหล็กไม่ถูกดูดซึม

- ฟอสเฟตและไฟเตทจะไปรวมกับเหล็กทำให้เหล็กไม่ละลาย

- ความเป็นด่างภายในลำไส้ ถ้าความเป็นกรดเป็นด่างสูง เหล็กจะละลายได้ยากขึ้น

อาหารหรือสารเสริมการดูดซึม

- วิตามินบี 12 ทำหน้าที่ช่วยการปฏิบัติหน้าที่ของเหล็ก

- กรดโฟลิก ช่วยให้เหล็กเคลื่อนย้ายฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงได้ดีขึ้น

- วิตามิน ซี ช่วยการดูดซึมของเหล็ก

- โคบอลต์ เป็นสิ่งจำเป็นต่อการดูดซึมเหล็กเข้าร่างกาย ดังนั้นเพื่อจะได้เหล็กเพียงพอจะต้องมีเกลือแร่ดังกล่าวเพียงพอด้วย

- แมงกานีส ทองแดง ฟอสฟอรัส

- กรดไฮโดรคลอริก ช่วยในการใช้เหล็กให้เป็นประโยชน์อย่างเต็มที่

อาหารหรือสารด้านการดูดซึม

- ขาลดกรด ยาแอสไพริน ลดไข่ และแก้ปวด วิตามิน อี (นิรนาม, 2552)

ตารางที่ 1 แสดงความต้องการธาตุเหล็กประจำวันของคนต่างอายุและเพศ ของ Recommended Daily Allowance (RDA)

เพศ/ อายุ	ธาตุเหล็ก (mg)
ทารก 1- 6 เดือน	6
เด็ก 1- 10 ปี	10
ผู้ชาย	
- 11 - 18	12
- 19 – 24	10
- 25 – 50	10
- 50+	10
ผู้หญิง	
- 11 – 18	15
- 19 – 24	15
- 25 – 50	15
- 50+	10
สตรีมีครรภ์	30
สตรีในระยะให้นมบุตร	15

บทบาทและหน้าที่ของธาตุเหล็กในพืช

ธาตุเหล็กมีบทบาทที่สำคัญเป็นอย่างมากในพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการสร้างพลังงานของพืช และในกระบวนการรีดอกซ์หลาย ๆ กระบวนการ โดยที่เหล็กจะเป็นองค์ประกอบของโปรตีน ในส่วนของไซโตโครม *c* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในระบบรีดอกซ์ของคลอโรพลาสต์ในการเริ่มต้นขบวนการสังเคราะห์แสง ซึ่งมีบทบาทในการเคลื่อนที่อิเล็กตรอนของระบบแสง II (photosystem II) เป็นตัวส่ง-รับอิเล็กตรอนโดยการเปลี่ยนรูปไปมาระหว่างเฟอร์รัสไอออนกับเฟอริกไอออน และการสังเคราะห์ ATP ซึ่งอยู่ในไมโทคอนเดรีย และเป็นตัวกลางสำคัญในกระบวนการหายใจของพืช โดยธาตุเหล็กจะมีบทบาทในพืชทั้งในรูปของฮีม(Heme) และนอห์นฮีม(Non-heme) โดยพบว่าร้อยละ 9 ของธาตุที่สะสมอยู่ในใบพืชนั้นอยู่ในรูปนอห์นฮีม(Hewitt,1983) ส่วนเหล็กในรูป

ของฮีมจะพบประมาณร้อยละ 19 โดยจะพบในส่วนของเฟอรिटอกซิน ไทด์ลาตอย และไมโตรคอนเดรีย ส่วนปริมาณที่เหลือของธาตุเหล็กในพืชจะสะสมอยู่ในรูปของเฟอริติน(Hewitt, 1983) โดยธาตุเหล็กในรูปนี้โดยส่วนมากจะสะสมอยู่ในส่วนของคลอโรพลาสต์ ซึ่งธาตุเหล่านี้อาจมีบทบาทสำคัญมากในกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชโดยเฉพาะธาตุเหล็กที่มีอยู่ในรูปของไอออนซัลเฟอร์โปรตีน (Marschner, 1995) เมื่อพืชได้รับธาตุเหล็กไม่เพียงพอจะทำให้เกิดสภาวะพร่องคลอโรฟิลล์ของใบพืชปรากฏเรียกว่า chlorosis เนื่องจากเหล็กเป็นธาตุที่เคลื่อนที่ได้ยากในพืชจึงเกิดที่ใบอ่อนก่อน บทบาทหน้าที่ที่สำคัญที่สุดของธาตุเหล็กในพืชชั้นสูงทุกชนิดคือ เป็นส่วนประกอบของกระบวนการทางชีวเคมีในกระบวนการรีดอกซ์ ยกตัวอย่างเช่น กระบวนการการถ่ายเทอิเล็กตรอนทั้งในกระบวนการสังเคราะห์แสงและกระบวนการหายใจ (Halliwell and Gutteridge, 1986) การกระตุ้นเอนไซม์ (Marschner, 1995) การถ่ายนำพาออกซิเจนเข้าไปสู่กระบวนการตรึงไนโตรเจนของแบคทีเรียชนิดหนึ่งในรากถั่ว (Werner *et al.*, 1981)

ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าว

ข้าวเป็นธัญพืชที่มีการสะสมของปริมาณธาตุเหล็กน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับธัญพืชชนิดอื่น ๆ (Senadhira *et al.*, 1998) ซึ่งมีสาเหตุมาจากข้อจำกัดหลาย ๆ ประการในการลำเลียงขนส่งธาตุเหล็กในส่วนของลำต้นมาสู่ส่วนเมล็ดข้าว อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณการสะสมธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวนั้นควบคุมด้วยกลไกทางพันธุกรรมมากกว่าอิทธิพลของปัจจัยทางสภาวะแวดล้อม (Prom-u-thai and Rerkasem, 2001; Senadhira *et al.*, 1998) ดังนั้นแหล่งของพันธุกรรมข้าวที่มีธาตุเหล็ก จึงได้มีการสำรวจเพื่อหาพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณธาตุเหล็กสูงเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ และเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค(Welch and Graham, 2002) จากการสำรวจพันธุ์ข้าวประมาณ 939 พันธุ์ที่ศูนย์วิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) ประเทศฟิลิปปินส์ พบว่ามีปริมาณความแปรปรวนของธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวอยู่ระหว่าง 7.5-24.4 mgFe/kg (Senadhira *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังได้มีการสำรวจพันธุ์ข้าวไทยจำนวน 38 พันธุ์ พบว่ามีค่าความแปรปรวนของปริมาณธาตุเหล็กอยู่ระหว่าง 7-22 mgFe/kg (Prom-u-thai and Rerkasem, 2001)

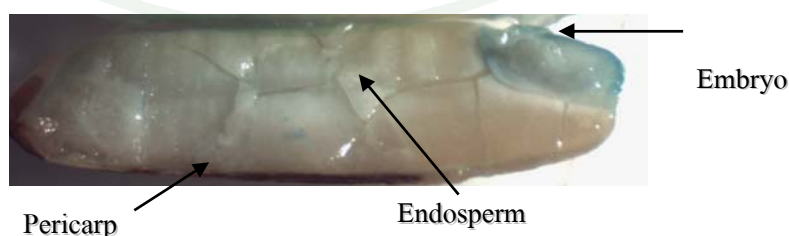
ในการปรับปรุงพันธุ์ของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) จำนวน 939 ตัวอย่างพบว่าปริมาณธาตุเหล็กมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 7.5 – 24.4 mgFe/kg (Senadhira *et al.*, 1998) โดยข้าวพันธุ์ Jalmagna Zuchem และ Xua Bue Nuo ซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมืองของประเทศจีนและอินเดีย มีปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดสูงเช่นกัน (Gregorio *et al.*, 2000) ในกลุ่มของข้าวเก่า (Meng

et al., 2005) และข้าวที่มีกลิ่นหอม (Gregorio *et al.*, 2000) ยังพบว่าปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดสูงเช่นกัน ในพันธุ์ข้าวปรับปรุงที่นิยมปลูกกันโดยทั่วไปและนิยมบริโภคกันอย่างกว้างขวาง เช่น ข้าวขาวดอกมะลิ 105 กข6 และหอมคลองหลวง พบว่ามีปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดต่ำ (ชนากานต์ และคณะ 2547) เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ IR68144 ซึ่งเป็นพันธุ์มาตรฐานและปรับปรุงให้มีผลผลิตและปริมาณธาตุเหล็กสูงจากศูนย์วิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) (Prom-u-thai, 2003) ในภาคเหนือของประเทศไทยซึ่งเป็นศูนย์กลางของความหลากหลายของข้าว (*Oryza sativa*) (Chang, 1976) พบว่ามีค่าระหว่าง 7 – 22 mgFe/kg (Prom-u-thai and Rerkaasem, 2001)

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็ก

การวิเคราะห์ความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดด้วยวิธี Perls' Prussian blue

วิธีการตรวจสอบปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดโดยวิธีการย้อมสี Perls' Prussian blue โดยหลักการของ Perl iron stain นี้เป็นวิธีการพื้นฐานสำหรับประเมินความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวเบื้องต้น ใช้วิธีการตัดเมล็ดตามยาว (longitudinal) แล้วแช่ในกรด hydrochloric เจือจาง ส่งผลให้ ferric ion ที่จับอยู่กับโปรตีนถูกปลดปล่อยออกมา ซึ่งเหล็กเหล่านี้จะทำปฏิกิริยากับ Potassium ferrocyanide แล้วผลิต insoluble blue compound (Prussians blue reaction) ออกมา ซึ่งพบว่าสามารถตรวจสอบได้อย่างแม่นยำ ในข้าวที่ละ 1 เมล็ด อีกทั้งยังสะดวก รวดเร็ว และประหยัดงบประมาณอีกด้วย (Prom-u-thai *et al.*, 2003) เหมาะสำหรับการตรวจหาปริมาณธาตุเหล็กที่มีข้อจำกัดในเรื่องของปริมาณตัวอย่างเมล็ดข้าว ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้เทคนิคนี้ในการคัดเลือกข้าวกลายพันธุ์ที่มีธาตุเหล็กสูงด้วย The Perls' Prussian blue reaction



ภาพที่ 2 องค์ประกอบของเมล็ด

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กด้วยวิธี Atomic Absorption Spectrometer (AAS)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุที่รู้จักและนิยามกันอย่างแพร่หลายมาเป็นระยะเวลากว่า 50 ปี เทคนิค AAS ใช้หลักการวัดการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นเฉพาะตัวของอะตอมของธาตุที่ต้องการวิเคราะห์ ทำให้เทคนิคนี้มีความเฉพาะเจาะจงต่อธาตุที่ต้องการวิเคราะห์สูง โดยเครื่องมือจะมีชุดผลิตอะตอม (Atomizer) ซึ่งมีหน้าที่ทำให้สารละลายตัวอย่างแตกตัวกลายเป็นอะตอม เทคนิค AAS สามารถแบ่งออกเป็นเทคนิคย่อย ๆ ได้ 3 เทคนิคตามชนิดของ Atomizer ที่แตกต่างกัน ได้แก่ Flame AAS, Graphite Furnace AAS และ Hydride Generation/Cold Vapor AAS

เทคนิคย่อยของ AAS สามารถสรุปรายละเอียด

Flame AAS

ใช้เปลวไฟในการเผาสารตัวอย่างที่ผ่านการสเปรย์ให้เป็นละอองฝอย ทำให้ธาตุในตัวอย่างแตกตัวกลายเป็นอะตอม เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่ค่อนข้างรวดเร็ว (ประมาณ 20 วินาที – 1 นาที ต่อตัวอย่าง) ใช้ปริมาณตัวอย่างปานกลาง (ประมาณ 3-7 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง) แต่มีข้อจำกัดในด้านความสามารถในการวิเคราะห์ได้ในระดับ ppm หรือต่ำกว่าเล็กน้อย (Detection Limit ไม่ต่ำมากนัก)

Graphite Furnace AAS

ใช้ความร้อนจากการใช้ไฟฟ้าทำให้หลอดขนาดเล็กที่ทำด้วยกราไฟต์ร้อน ซึ่งธาตุในตัวอย่างที่อยู่ภายในหลอดระเหยและแตกตัวกลายเป็นอะตอม เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่สามารถวิเคราะห์ได้ในระดับ ppb (Detection Limit ต่ำมาก) และใช้ปริมาณตัวอย่างน้อย (ประมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง) แต่มีข้อจำกัดในด้านความรวดเร็ว (ประมาณ 6-8 นาที ต่อตัวอย่าง)

Hydride Generation/Cold Vapor AAS

ใช้ปฏิกิริยาทางเคมีของสารที่ทำให้เกิดสารประกอบไฮไดรด์ของธาตุหรือเกิดปฏิกิริยารีดักชันของธาตุ ทำให้ธาตุในตัวอย่างระเหยกลายเป็นไอและแตกตัวกลายเป็นอะตอมในหลอดแก้วควอทซ์ (Quartz Cell) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่สามารถวิเคราะห์ได้ในระดับ ppb (Detection Limit ต่ำมาก) ใช้ปริมาณตัวอย่างปานกลาง (ประมาณ 10-15 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง) แต่มีข้อจำกัดในด้านความยุ่งยากในการเตรียมสารเคมี และวิเคราะห์ธาตุได้จำกัด (As, Se, Sn, Sb, Bi, Te และ Hg)

อย่างไรก็ตามเทคนิค AAS เป็นเทคนิคที่มีช่วงความเข้มข้นของการสร้าง Calibration curve ก่อนข้างแคบ (Linear Dynamic range ต่ำ) และทุกเทคนิคย่อยของ AAS จะวิเคราะห์ได้ครั้งละ 1 ธาตุเท่านั้น (Single Element Analysis) ซึ่งเหมาะกับงานที่มีจำนวนธาตุและจำนวนตัวอย่างไม่มากนัก (2-3 ธาตุต่อตัวอย่าง) หรือมีงบประมาณจำกัด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเลือกเทคนิคย่อยให้เหมาะสมกับชนิดของงานซึ่งมีปัจจัยที่ต้องพิจารณาอยู่หลายปัจจัยเช่น ความเข้มข้นต่ำสุดที่ต้องการ (Detection Limit) จำนวนธาตุและจำนวนตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ปริมาณตัวอย่างที่มี เป็นต้น (Perkinelmer, 2010)

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กด้วยวิธี Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer (ICP)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุในระดับต่ำที่รู้จักมาเป็นระยะเวลากว่า 20 ปี เทคนิค ICP-MS ใช้หลักการวัดมวลสารที่แตกต่างกันของธาตุที่ต้องการวิเคราะห์ โดยใช้พลาสมาในการผลิตไอออนของธาตุ เครื่องมือจะมีแหล่งกำเนิดพลาสมาซึ่งเป็นเปลวความร้อนสูง (6000 – 10000 K) เกิดจากชนกันของอนุภาคอาร์กอนที่แตกตัวโดยการเร่งพลังงานด้วยสนามแม่เหล็กและขดลวดทองแดง (Inductive Coupling) ทำหน้าที่เป็นแหล่งกำเนิดพลังงานที่ทำให้ธาตุในตัวอย่างที่ผ่านการสเปรย์ให้เป็นละอองฝอยถูกเผาให้แตกตัวกลายเป็นไอออนประจุ +1 และส่งผ่านไปเพื่อทำการแยกตามน้ำหนักมวลสารในแต่ละธาตุและตรวจวัดหาปริมาณด้วยการเปลี่ยนเป็นสัญญาณไฟฟ้า

เทคนิค ICP-MS เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ในระดับต่ำมาก (Ultra trace Analysis) ที่รวดเร็ว ลักษณะของเทคนิคสามารถวิเคราะห์ธาตุในตัวอย่างได้มากกว่า 1 ธาตุในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง (Multi-Element Analysis) สามารถควบคุมสิ่งรบกวนที่เกิดขึ้นได้โดยใช้เทคโนโลยีต่าง ๆ มีช่วงความเข้มข้นของการสร้าง Calibration curve ก่อนข้างกว้าง ทำให้ ICP-MS ได้รับความนิยมเพิ่มขึ้น

อย่างมากในช่วงหลัง สามารถนำไปใช้งานได้หลากหลายสาขางานเช่น งานทางสิ่งแวดล้อม เกษตรและอาหาร การแพทย์และเภสัชกรรม ธรณีวิทยา งานศึกษาวิจัย และอุตสาหกรรมต่าง ๆ อาทิ เช่น อุตสาหกรรมเซมิคอนดักเตอร์ งานวิทยาศาสตร์ที่ต้องการความบริสุทธิ์สูง เป็นต้น

อย่างไรก็ตามเครื่องมือที่ใช้เทคนิค ICP-MS มีราคาสูงมากและมีค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ค่อนข้างสูง อีกทั้งยังต้องควบคุมสภาพแวดล้อมในการวิเคราะห์เป็นอย่างดี จำเป็นต้องดูแลรักษา มากกว่าเครื่องมือในเทคนิคอื่น ๆ และเป็นเทคนิคที่มีสิ่งรบกวนจากการวิเคราะห์ค่อนข้างมาก ซึ่งจำเป็นต้องเลือกใช้เทคโนโลยีในการกำจัดสิ่งรบกวนให้เหมาะกับงาน ปัจจุบันกล่าวข้างต้นจึงต้องนำมาพิจารณาในการเลือกซื้อเพื่อให้เหมาะสมกับความต้องการ

โดยทั่วไปเทคโนโลยีในการกำจัดสิ่งรบกวนอาศัยหลักการการชนกันหรือการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีของแก๊สบางชนิดกับโมเลกุลของสิ่งรบกวน ทำให้สิ่งรบกวนถูกกำจัดออกไปได้ เครื่อง ICP-MS ของเพอร์กินเอลเมอร์จะใช้หลักการของการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีของแก๊สที่มีความว่องไวต่อปฏิกิริยาสูงเช่น Methane, Oxygen, Ammonia เป็นต้น เพื่อกำจัด หรือลดสิ่งรบกวน โดยใช้ชื่อว่า Dynamic Reaction Cell (DRC) ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงและได้รับการยอมรับทั่วโลกในหลากหลายสาขางาน

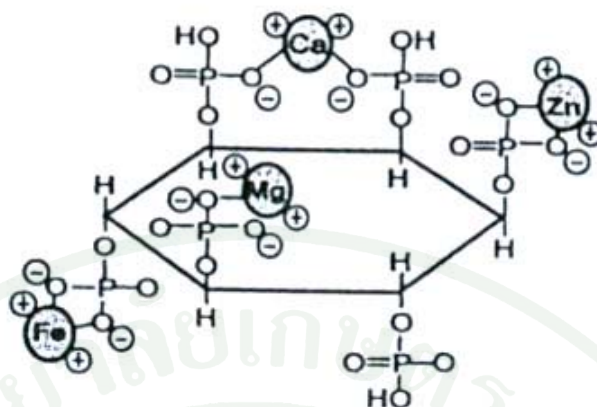
การวิเคราะห์ปริมาณและหาตำแหน่งการกระจายตัวของธาตุเหล็กด้วยวิธี Laser Ablation Inductively Couple Plasma Mass Spectrometer (LA-ICP-MS)

เครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณธาตุและการกระจายตัวของธาตุในตัวอย่าง ซึ่งทำได้ทั้งในรูปของแข็ง ของเหลว และก๊าซ ซึ่งแยกออกเป็น 2 ส่วนหลัก คือ Laser Ablation Unit และ ICP-MS โดยในส่วนของ Laser Ablation Unit ก็คือส่วนที่จะแยกธาตุต่างๆ ออกจากโมเลกุลที่เป็นได้ทั้งของแข็ง ของเหลว และก๊าซ และผ่านก๊าซอาร์กอน เข้าไปดึงเอาธาตุเหล่านั้นไปส่งต่อให้ ส่วนที่ 2 คือส่วน ICP-MS ซึ่งในส่วนที่ 2 นี้ก็จะทำการกระตุ้นให้ธาตุเหล่านั้นด้วยรังสี Plasma ที่อุณหภูมิสูงมากเพื่อให้ธาตุต่างๆ แสดงพลังงานออกมาตามโครงสร้างของอะตอม พลังงานที่ถูกกระตุ้นออกมาจะถูกบันทึกโดย Sensor แล้วแต่ประเภท ในกรณีนี้ Sensor จะสามารถตรวจจับพลังงานจาก Isotope ของธาตุต่างๆ ได้ด้วย แล้วแต่คุณภาพและเทคนิคของผู้ทำการทดลอง ใช้งานได้ดีสำหรับการวิเคราะห์เพื่อหาส่วนประกอบของสารที่เป็นธาตุรองและธาตุหายาก (เอกคนัย, 2549)

กรดไฟติก

เมล็ดพืชประกอบด้วยสารชีวโมเลกุลและแร่ธาตุชนิดต่าง ๆ ในปริมาณที่ต่างกัน ขึ้นกับชนิดของพืช ได้แก่ โปรตีน ไขมัน แป้ง น้ำตาล วิตามิน โพแทสเซียม และฟอสฟอรัส เป็นต้น สารแต่ละชนิดต่างก็มีความสำคัญต่อกระบวนการต่าง ๆ ของพืช ฟอสฟอรัสเป็นหนึ่งในธาตุอาหารหลักของพืช นอกเหนือจากไนโตรเจนและโพแทสเซียม ฟอสฟอรัสช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโต พัฒนาการของราก การออกดอกและการสุกแก่ของผลผลิตของพืช (Anon., 2004) ฟอสฟอรัสในเมล็ดพบในรูปของสารประกอบต่าง ๆ ได้แก่ กรดไฟติก (phytic acid) สารประกอบฟอสฟอรัสอนินทรีย์ (inorganic phosphorus) ฟอสโฟลิปิด ฟอสโฟโปรตีน และกรดนิวคลีอิก (Reddy *et al.*, 1978) แต่พบฟอสฟอรัสในรูปของกรดไฟติกมากที่สุดถึงประมาณ 65-85% ของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดในเมล็ดพืช (Coelho *et al.*, 2002; Latta and Eskin, 1980; Lott *et al.*, 2000; Raboy and Dickinson, 1993) กรดไฟติก หรือไฟเตท มีชื่อทางเคมีว่า myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate (InP6) (Dorsch *et al.*, 2003) กรดไฟติกมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_6H_{18}O_{24}P_6$ เกิดจากปฏิกิริยาฟอสฟอริเลชัน (phosphorylation) ของโมเลกุล myo-inositol

โมเลกุลของกรดไฟติกมีสภาพขั้วสูงจึงสามารถละลายน้ำได้ มีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อน สามารถแตกตัวให้ไฮโดรเจนอะตอมหลุดออกมาจากหมู่ฟอสเฟตได้ 12 อะตอม (จากหมู่ฟอสเฟต 6 หมู่ ที่มีไฮโดรเจนหมู่ละ 2 อะตอม) ทำให้เกิดประจุลบในโมเลกุล จึงจับกับประจุบวกได้ดี เช่น โพแทสเซียมไอออน (K^+) แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) แมงกานีสไอออน (Mn^{2+}) สังกะสีไอออน (Zn^{2+}) และ เหล็กไอออน (Fe^{2+} และ Fe^{3+}) เป็นต้น โดยเฉพาะประจุบวกที่มีสภาพไอออนหลายค่า (polyvalent) จะถูกกรดไฟติกจับได้ดีกว่าประจุบวกที่มีสภาพไอออนค่าเดียว (monovalent) (Lott *et al.*, 2000) จึงทำให้กรดไฟติกเป็นตัวจับประจุบวก (chelator) ที่ดี (Talamond *et al.*, 2000) ดังภาพที่ 3 ได้เกลือไฟเตทที่ไม่ละลายน้ำที่ pH เป็นกลางและเป็นเบส ดังเช่นในลำไส้คนและย่อยสลายได้ยาก ทำให้ร่างกายไม่สามารถดูดซึมทั้งกรดไฟติกและธาตุที่ถูกกรดไฟติกจับไว้ไปใช้ประโยชน์ได้ (Makower, 1970)



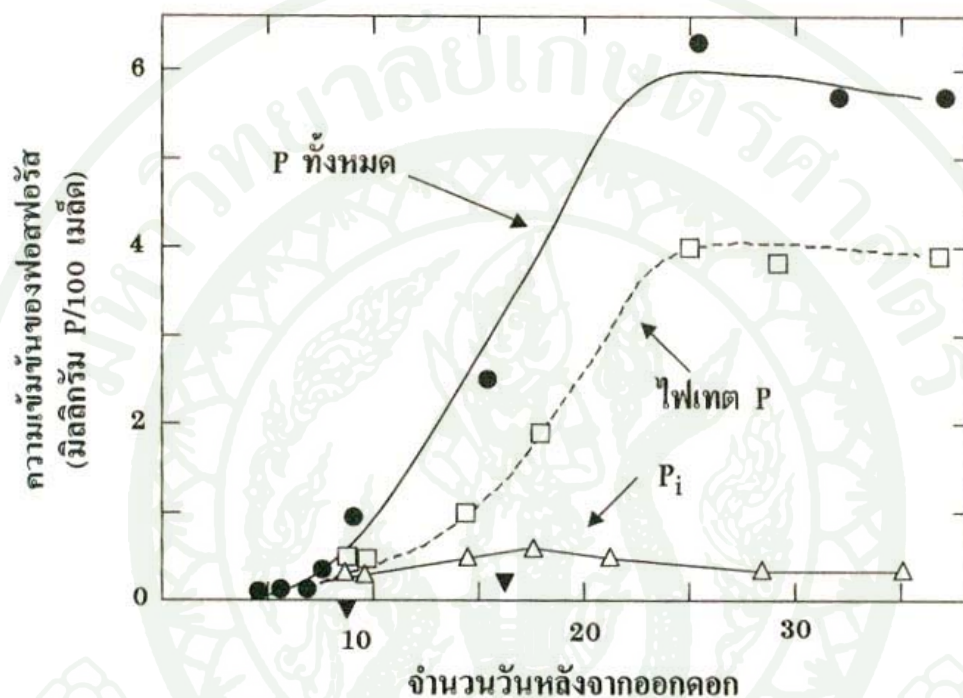
ภาพที่ 3 เกลือไฟเตท

ที่มา: Kley (2006)

การควบคุมการสังเคราะห์กรดไฟติกในพืชเกิดได้ 2 ทาง คือทางแรก เมื่อเกิด photoassimilates มาก ๆ จะทำให้เกิดฟอสฟอรัสเคลื่อนย้าย(translocate) ไปยังเมล็ด และสะสมในรูปกรดไฟติก และทางที่สอง คือ เกิด partition ของสารตั้งต้นของการสังเคราะห์กรดไฟติกในเมล็ดที่กำลังพัฒนา ทำให้สร้างกรดไฟติกขึ้น (Coelho *et al.*, 2002) กรดไฟติกจะสะสมในรูปของไฟติน (phytin) ซึ่งเป็นเกลือของ K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} และ Zn^{2+} โดยสะสมในรูปของ globoid ซึ่งเป็นกลุ่มของโมเลกุลที่มีความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสูง รวมตัวกันเป็นอนุภาคกลม ๆ (electron dense sphere) กระจายอยู่ใน proteinaceous matrix ของ protein bodies ลักษณะเป็นถุงที่มีเยื่อหุ้มชั้นเดียว (microvacuoles) ที่มีโครงสร้างประกอบด้วย H^+ - pyrophosphatase ขนาดและประมาณของ globoid จะสัมพันธ์กับอัตราส่วนของแมกนีเซียมและแคลเซียมต่อโพแทสเซียมในเมล็ด จึงเชื่อว่า ประจุบวกเหล่านี้จะเกิดเป็น multivalent cation ที่จับกับประจุลบบนหมู่ฟอสเฟตบนโมเลกุลกรดไฟติก จึงเกิดเป็น globoid ที่เสถียรอยู่ได้ อย่างไรก็ตาม globoid ไม่ได้เป็นโครงสร้างเดียวที่ใช้สะสมกรดไฟติก (static storage structure) เพราะเมื่อประจุภายใน globoid เปลี่ยนแปลง จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบภายใน globoid ในระหว่างการสร้างเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้าได้ ในระยะนี้ globoid ใน cotyledon cell จะเจริญเป็น 4 เท่าของเดิมในเมล็ดโดยวัดจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (Lott *et al.*, 2000)

ในเมล็ดพืชมีสารอนินทรีย์ฟอสเฟตต่ำมาก และฟอสฟอรัสส่วนใหญ่อยู่ในรูปไฟเตท (phytate) ดังนั้นการใส่ปุ๋ยฟอสเฟตแก่พืชจึงมีผลให้ไฟเตทในเมล็ดเพิ่มขึ้น สำหรับเมล็ดข้าวนั้นเมื่อเริ่มพัฒนาใหม่มีไฟเตตต่ำมาก แต่จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงที่เมล็ดสะสมแป้ง ส่วนปริมาณ Pi

ในช่วงเวลาดังกล่าวจะต่ำแม้ว่าการสะสมไฟเตทจะมีมากก็ตาม (Ogawa *et al.* 1979) ดังภาพที่ 4 หากให้ปุ๋ยฟอสเฟตหลังจากที่พืชออกดอกแล้ว ส่วนของฟอสฟอรัสที่เพิ่มขึ้นในเมล็ดมีไฟเตทเพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 4 การสะสมสารอนินทรีย์ฟอสเฟต(Pi) และไฟเตทในเมล็ดข้าวในช่วงเวลา 35 วันหลังจากออกดอก

ที่มา: Ogawa *et al.* (1979)

ไฟเตทคือเกลือไฟติก (phytic acid) หรือเฮกซาอินโนซิทอลฟอสฟอริก (hexainositol phosphoric acid) กรดไฟติกสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของไมโออินโนซิทอล (myoinositol) เปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่ฟอสฟอริล ดังภาพที่ 5 โดยธรรมชาติกรดไฟติกจะมีความสามารถในการจับกับสังกะสีและธาตุเหล็กสูง กรดไฟติก(phytic acid) จัดว่าเป็นตัวขัดขวางภาวะทางโภชนาการ (anti-nutrients) โดยมีผลทำให้การดูดซึมและการใช้ประโยชน์ (bioavailability) จากธาตุอาหารลดลง เนื่องจากกรดไฟติกหรือ myo-inositol hexakisphosphate(InsP6) เป็นสารประกอบฟอสฟอรัสที่สะสมมากในเมล็ดที่เจริญเต็มที่

ตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของฟอสฟอรัสลำดับส่วนต่าง ๆ ในเมล็ดข้าวเมื่อกออก

เวลาในการงอก (ชม.)	ลำดับส่วนต่าง ๆ ของฟอสฟอรัส (มก.P/กรัมน้ำหนักแห้ง)				
	ไฟเตท	ลิพิด	อนินทรีย์ P	เอสเทอร์	RNA+DNA
0	2.67	0.43	0.24	0.078	0.058
24	1.48	1.19	0.64	0.102	0.048
48	1.06	1.54	0.89	0.110	0.077
72	0.80	1.71	0.86	0.124	0.116

ที่มา: Mukherji *et al.* (1971)

ภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากเพาะเมล็ด ไฟเตทเริ่มสลายตัวปลดปล่อยฟอสเฟตออกมาสร้างฟอสโฟลิพิด แสดงว่ามีการสังเคราะห์เชื้อซึ่งจำเป็นต้องใช้ในการแบ่งเซลล์และจัดสัดส่วนภายในเซลล์ เพื่อควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึมในเซลล์นั้น การเพิ่มขึ้นของ Pi และฟอสเฟตเอสเทอร์ แสดงว่าเริ่มมีอัตราการหายใจ ฟอสฟอริเลชันและกระบวนการอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องสูงขึ้น การสลายของไฟเตทยังเกิดต่อเนื่องตลอดเวลาและในช่วงท้ายจะพบฟอสฟอรัสอยู่ใน DNA และ RNA มากขึ้น แสดงว่ามีการแบ่งเซลล์และสังเคราะห์โปรตีนรวดเร็วขึ้นด้วย สำหรับอัตราการสลายของไฟเตทถูกควบคุมโดย Pi กล่าวคือหากมี Pi ออกมามากการสังเคราะห์เอนไซม์ไฟเตสจะลดลง ทั้งนี้เพื่อให้อัตราการสลายของไฟเตทสอดคล้องกับความต้องการใช้ฟอสฟอรัส โฟแทสเคมี และแมกนีเซียมในเมแทบอลิซึมส่วนอื่น ๆ ของกระบวนการงอก (ขงยุทธ, 2546)

นอกจากกรดไฟติกจะเห็นโมเลกุลที่ใช้สะสมฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ต่อพืชแล้ว ยังมีประโยชน์ในระดับเซลล์ได้แก่

1. เป็นสารที่เก็บสะสมพลังงาน เช่นเดียวกับ ATP (Talamond *et al.*, 2000)
2. เป็นสารกระตุ้นให้เมล็ดพักตัว(Reddy *et al.*, 1978)
3. อนุพันธ์ของกรดไฟติกช่วยใน signal transduction ของฮอร์โมน growth factor neurotransmitters(Xizhang, 2006)
4. ควบคุม Ca²⁺ ion channel ในเซลล์กลุ่มที่ปากใบ (Xu *et al.*, 2005)

5. inositol pyrophosphate เช่น InsP6, InsP7 และ InsP8 พบทั่วไปในเซลล์ยูคาริโอต ทำหน้าที่เป็นผู้ให้ฟอสฟอรัสเพื่อสร้าง ATP จาก ADP (Raboy, 2001)

6. มีหน้าที่ใน DNA double-strand break repair (Raboy, 2001)

7. มีหน้าที่ช่วยขนส่ง mRNA ออกจากนิวเคลียส (Raboy, 2001)

แต่เนื่องจากไม่พบเอนไซม์ไฟเตสในมนุษย์และสัตว์กระเพาะเดี่ยว ดังนั้น เมื่อกรดไฟติกเข้าสู่ร่างกายจึงไม่สลายให้ฟอสฟอรัส แต่จะจับกับแร่ธาตุพวก สังกะสี แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และโปรตีน ที่บริเวณลำไส้เล็ก เกิดเป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้ง่ายแก่การดูดซึมได้ จึงเป็นปัญหาทุพโภชนาการในปัจจุบัน นอกจากนี้ เมื่อสัตว์จับถ่ายสารประกอบเชิงซ้อนนี้ออกมา จะทำให้เกิดมลภาวะทางน้ำ ดังเช่นในยุโรปและอเมริกา (Raboy, 2002 and Ertl *et al.*, 1998) โดยพบว่า ในแหล่งน้ำธรรมชาติ หากมีการปนเปื้อนของฟอสฟอรัสในปริมาณสูง จะเป็นปัจจัยสำคัญในการจำกัดการเจริญเติบโตของแพลงตอนกและสาหร่าย ทั้งยังทำให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำต่ำลง เกิดน้ำเน่าเสียได้ (Sugiura *et al.*, 1999)

ดังนั้น กรดไฟติกจึงเป็นสารที่ให้ประโยชน์และโทษ ทำให้มีการศึกษาการลดปริมาณกรดไฟติกให้เหลือในปริมาณที่เหมาะสมให้อาหารพวกธัญพืชต่าง ๆ ได้แก่ ถั่วเหลือง ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาเลย์ ข้าว และถั่วเขียว โดยให้ฟอสฟอรัสสะสมในรูปอื่นแทน เพื่อแก้ไขปัญหาดูพโภชนาการดังที่กล่าวไว้ข้างต้น (อุทุมพร, 2549)

การตรวจหาข้าวกลายพันธุ์ที่ให้ระดับ phytic acid ต่ำ ด้วยวิธีตรวจหา high inorganic P (HIP)

ในการค้นหาข้าวกลายพันธุ์ที่ให้กรดไฟติกต่ำจากประชากรข้าวที่ถูกฉายด้วยรังสี fast neutron สามารถค้นหาได้โดยการตรวจสอบด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ ด้วยวิธีตรวจหา high inorganic P (HIP) ซึ่งเป็นวิธีตรวจสอบโดยทางอ้อมโดยสุ่มเมล็ดจากข้าวที่ปลูกแต่ละกลุ่มและวิเคราะห์ single seed ดู high inorganic P ซึ่งถ้ามี inorganic P สูงจะเกิดปฏิกิริยา complex กับ molybdate ทำให้เกิดน้ำเงินเข้ม ถ้าพบว่ากลุ่มข้าวที่มีเมล็ดที่ให้ inorganic P สูง คาดว่าข้าวในกลุ่มนี้จะเป็นข้าวที่มีกรดไฟติกต่ำ (Larson *et al.*, 2000)

การควบคุมพันธุกรรมของลักษณะธาตุอาหารในพืช

Welch and Graham (2002) พบว่าการปรับปรุงพันธุ์เป็นวิธีการที่สามารถใช้ประโยชน์สำหรับเพิ่มปริมาณธาตุในเมล็ดได้ดีโดยไม่ลดผลผลิต จากการศึกษาปลูกข้าวในดินที่ขาดธาตุอาหารและใส่ปุ๋ย พบว่าพืชที่ปริมาณธาตุอาหารเพิ่มเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับจำนวนธาตุอาหารที่พบในดิน ดังนั้นการใส่ปุ๋ยมีประสิทธิภาพน้อยในการเพิ่มปริมาณธาตุอาหารในพืช โดยเฉพาะในเมล็ดที่จะมีการพัฒนาหลังจากใส่ปุ๋ยประมาณ 1 เดือน แสดงว่าพันธุกรรมมีอิทธิพลมากกว่าการขาดแคลนธาตุอาหารในดิน ซึ่งในการปรับปรุงพันธุ์นั้นต้องศึกษาถึงการควบคุมทางพันธุกรรมเพื่อใช้ประโยชน์สำหรับการคัดเลือกพันธุ์ให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด จากการทดลองโดยใช้พันธุ์พื้นเมือง 4 พันธุ์ ที่มีปริมาณธาตุเหล็กสูงคือ 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 การจะทราบถึงการควบคุมทางพันธุกรรมต่อปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าว สามารถศึกษาได้จากพฤติกรรมการแสดงออกของยีนที่ควบคุมปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 และพบว่าปริมาณธาตุเหล็กและสังกะสีมีความสัมพันธ์กัน ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ปริมาณธาตุเหล็กอาจสามารถเพิ่มปริมาณสังกะสีให้เพิ่มขึ้นได้ (Frossard *et al.*, 2000) จารการศึกษา Cithy *et al.*, (2005) โดยการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ปริมาณธาตุสังกะสีในเมล็ดสูง (Voyager) กับพันธุ์ธาตุสังกะสีต่ำ (Ablinon) พบว่าการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของปริมาณสังกะสีในถั่ว navy นั้นถูกควบคุมด้วยยีนหลัก 1 ยีน และลักษณะปริมาณธาตุสังกะสีในเมล็ดสูงถูกควบคุมด้วยยีนข่ม (dominant) และจากการศึกษาอิทธิพลทางพันธุกรรมของธาตุเหล็ก สังกะสี และแมงกานีสในข้าว black pericarp (indica) พบว่าถูกควบคุมด้วยยีนในนิวเคลียส การแสดงออกของยีนเป็นแบบบวกสะสม (additive)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

พันธุ์ข้าว

- ข้าวพันธุ์ตรวจสอบ(Check) จำนวน 7 พันธุ์

ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์ข้าวหอม ที่ได้จากการนำข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากนาเกษตรกร อำเภอบางคล้า จังหวัด ฉะเชิงเทรา จำนวน 199 รวง มาปลูกเพื่อศึกษาพันธุ์ และได้ข้าวของที่ 105 ที่มีลักษณะพิเศษ คือ มีกลิ่นหอม และเมล็ดอ่อนนุ่ม เมื่อนำมาหุงต้ม

IR68144 เป็นพันธุ์มาตรฐานและปรับปรุงให้มีผลผลิตและปริมาณธาตุเหล็กสูงจากสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI)

KDC 31-9-11-1-0 ได้มาจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองของภาคเหนือกับข้าวหอมพม่า เป็นพันธุ์ที่มีปริมาณธาตุเหล็กสูง

ข้าวเจ้าหอมนิล เป็นข้าวที่ได้รับการคัดเลือกและพัฒนาจนได้ข้าวที่มีเมล็ดข้าวกลี้ยงเรียวยาว สีม่วงเข้ม ข้าวกล้องเมื่อหุงสุกจะนุ่ม เหนียว หอม ข้าวสารหุงสุกมีสีม่วงอ่อน นุ่ม และมีกลิ่นหอมเช่นกัน คุณสมบัติที่สำคัญของข้าวเจ้าหอมนิลคือ ข้าวกล้องมีโปรตีนสูงถึง 12.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณคาร์โบไฮเดรต 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ amylose 16 เปอร์เซ็นต์ และยังประกอบไปด้วยธาตุเหล็ก สังกะสี ทองแดง แคลเซียม และโพแทสเซียม

ข้าวปิ่นเกษตร เป็นลูกผสมระหว่างข้าวขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวทนแล้ง เป็นข้าวขาว มีกลิ่นหอม นุ่มเหนียว ข้าวกล้องมีความนุ่มนวล มีเมล็ดยาวกว่า 8 มม. และใสมาก มี % คั้นข้าวสูงเมื่อขัดสี ข้าวกล้องมีความเป็นประโยชน์ของธาตุเหล็กดี เมื่อนำมาหุงสุกรวมกับข้าวพันธุ์อื่น จะช่วยให้ความเป็นประโยชน์ของธาตุเหล็กสูงขึ้นซึ่ง ให้ผลสอดคล้องกันทั้งการทดสอบในระดับเซลล์และในมนุษย์ด้วยคุณสมบัตินี้ข้าวปิ่นเกษตรจึงได้รับรางวัลชนะเลิศอันดับ 3 จากการประกวดข้าวโลก (2nd World Rice Competition) เมื่อ พ.ศ. 2547

ข้าวสินเหล็กได้จากผสมข้ามพันธุ์ระหว่างข้าวเจ้าหอมนิล กับ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวสีขาวยาวที่มีกลิ่นหอม รูปร่างเมล็ดเรียวยาว ไร่ต่อช่วงแสง ปลูกได้ตลอดทั้งปี มีความต้านทานต่อโรคไหม้ข้าวสินเหล็กในฐานะเป็นข้าวหอมนุ่มที่มีดัชนีน้ำตาลต่ำ-ปานกลาง เมื่อนำมาทดลองบริโภคในกลุ่มผู้ป่วยเบาหวาน พบว่าการบริโภคข้าวกล้องสินเหล็ก ช่วยแก้ปัญหาเบาหวานได้ ทำให้สภาวะคีโตออสโมลาร์ลดลงและการทำงานของตับอ่อนดีขึ้น รวมทั้งทำให้ค่าเฉลี่ยของ triglyceride ลดลง นอกจากนี้ข้าวสินเหล็กยังมีธาตุเหล็กในเมล็ดสูง ข้าวพันธุ์นี้ได้ผ่านการประเมินคุณสมบัติความเป็นประโยชน์ของธาตุเหล็ก ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในมนุษย์ โดยพบว่าการส่งเสริมการบริโภคข้าวสินเหล็กในเด็กนักเรียนที่มีภาวะพร่องธาตุเหล็ก ทำให้ระดับ hemoglobin มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

ข้าวไรซ์เบอร์รี่ได้มาจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างข้าวเจ้าหอมนิล กับ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เช่นเดียวกับพันธุ์สินเหล็ก ปลูกได้ทั้งปี รูปร่างเมล็ดเรียวยาว ต้านทานโรคไหม้ดีมาก ทนทานต่อสภาพธาตุเหล็กเป็นพิษในดิน Acid sulfate soil #2 ข้าวเจ้าสีม่วงเข้มมากและมีกลิ่นหอม มะลิ นอกจากนี้ยังมีสารต้านอนุมูลอิสระในเมล็ดสูงมาก โดยเฉพาะสารประกอบโพลีฟีนอล

- ข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ โดยการอาบรังสี Fast neutron ที่ความเข้มข้น 33 Gy จำนวน 400,000 เมล็ด และได้ปลูกขยายเมล็ดพันธุ์ในรุ่น M1 ซึ่งได้จัดเตรียมเมล็ดพันธุ์ได้จำนวน M1 ที่จำนวนต้นทั้งหมด 119,820 ต้น ปลูกแล้วเก็บขยายในรุ่น M2 M3 M4 และนำเมล็ดรุ่น M4 นำไปตรวจสอบหาการกลายพันธุ์ โดยสุ่มเมล็ดจากทั้งหมด 24,000 สายพันธุ์ นำมาทดสอบเพียง 12,000 สายพันธุ์

วิธีการ

การทดลองตอนที่ 1 การคัดกรองประชากรข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ธาตุเหล็กสูง

การวิเคราะห์หาความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดด้วยวิธี Perls' Prussian blue

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กด้วยวิธี Atomic Absorption Spectrometer (AAS)

การวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กด้วยวิธี Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer (ICP)

การวิเคราะห์ปริมาณและหาตำแหน่งการกระจายตัวของธาตุเหล็กด้วยวิธี Laser Ablation Inductively Couple Plasma Mass Spectrometer (LA-ICP-MS)

1. การวิเคราะห์หาความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดด้วยวิธี Perls' Prussian blue (Prom-u-thai, *et al*, 2003)

ข้าวพันธุ์ตรวจสอบ(Check) จำนวน 7 พันธุ์

ข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ จำนวน 12,000 สายพันธุ์ โดยการสุ่มเมล็ดข้าวรุ่น M4 จากจำนวนทั้งหมด 24,000 สายพันธุ์

วิธีการทดลอง

สุ่มตัวอย่างเมล็ดข้าวรุ่น M4 จากประชากรที่ทำการทดสอบจำนวน 12,000 สายพันธุ์ และแกะเปลือกหุ้มเมล็ดด้วยมือ จำนวน 5 เมล็ด/ สายพันธุ์ แช่สารฟอกขาว 10 นาที เพื่อขจัดสีที่ผิวเมล็ด ขั้นตอนนี้มีเพิ่มขึ้นมาเฉพาะสำหรับการทดสอบกับตัวอย่างที่เป็นข้าวกล้องซึ่งเมล็ดมีสีเข้ม เช่น สีดำ เนื่องจากการใช้เทคนิค Perls' Prussian blue พื้นฐานมีปัญหาการย้อมไม่ติดสีน้ำเงิน ซึ่งอาจเกิดจากสารประกอบบางตัว บริเวณ pericarp ของข้าวสีดำมีผลยับยั้งปฏิกิริยา Prussian blue ซึ่งแตกต่างจากการทดสอบในข้าวสีขาว วางเมล็ดบนกระดาษทิชชูที่ขึ้น 15–20 ชั่วโมง ฝ่าเมล็ดตามยาว มีดที่ใช้ผ่าเป็น stainless เพื่อให้บริเวณที่สัมผัสไม่มีธาตุเหล็กเจือปน แช่ใน Staining solution (2% Potassium ferrocyanide+ 2% Hydrochloric acid) ที่เตรียมใหม่ 30 นาที ล้างด้วย distilled water 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที สังเกตการติดสีน้ำเงิน บริเวณ embryo เนื่องมาจาก Ferric Fe ที่ถูกปลดปล่อยออกมาทำ

ปฏิกิริยากับสารละลาย Potassium ferrocyanide เกิดเป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble compound, ferric ferro cyanide; Prussian blue)

การให้คะแนนตามความเข้มของการติดสีน้ำเงิน บริเวณ Embryo (ภาพที่ 6)

Score 0 = ไม่ติดสีเลยของบริเวณEmbryo

Score + = ติดสีบ้างเล็กน้อย 10-25 % ของบริเวณEmbryo

Score ++ = ติดสีปานกลางประมาณ 25-50 % ของบริเวณEmbryo

Score +++ = ติดสีเข้มมากของบริเวณEmbryo



Score +++



Score +



Score ++



Score 0

ภาพที่ 6 ระดับของการติดสีข้อม Perls' Prussian blue บริเวณ embryo ของเมล็ดข้าว

2. การวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กด้วยวิธี Atomic Absorption Spectrometer (AAS) โดยนำเอาเมล็ดใหม่ของสายพันธุ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Perls' Prussian blue ที่ระดับของการติดสียอม Score 0 Score + และ Score ++

วิธีการทดลอง

ชั่งตัวอย่าง 0.2 g เติม Mix a 10 ml (อัตราส่วนกรดไนตริก (HNO_3) ต่อ กรดเปอร์คลอริก (HClO_4) 5 : 2) นำตัวอย่างใส่ในเครื่องย่อยสลายตัวอย่าง (Block Digester) ที่อุณหภูมิ 150–180 °C เป็นเวลา 2–2.5 ชั่วโมง จนสารละลายตัวอย่างใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วปรับปริมาตร 50 ml นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ วัดด้วยเครื่อง AAS

ดำเนินการทดลองที่ หน่วยวิเคราะห์วิจัยดิน พืช และวัสดุเกษตร งานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเกษตร ฝ่ายปฏิบัติการวิจัย และเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนา กำแพงแสน

3. การวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กด้วยวิธี Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer (ICP) ที่สถาบันวิจัยโภชนาการ โดยนำเอาเมล็ดใหม่ของสายพันธุ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Perls' Prussian blue ที่ระดับของการติดสียอม Score 0 Score + และ Score ++ เพื่อยืนยันผล

ใช้หลักการวัดมวลสารที่แตกต่างกันของธาตุที่ต้องการวิเคราะห์ โดยใช้พลาสมาในการผลิตไอออนของธาตุ เครื่องมือจะมีแหล่งกำเนิดพลาสมาซึ่งเป็นเปลวความร้อนสูง (6000 – 10000 K) เกิดจากชนกันของอนุภาคอาร์กอนที่แตกตัวโดยการเร่งพลังงานด้วยสนามแม่เหล็กและขดลวดทองแดงทำให้ธาตุในตัวอย่างที่ผ่านการสเปรย์ให้เป็นละอองฝอยถูกเผาให้แตกตัวกลายเป็นไอออนประจุ +1 และส่งผ่านไปเพื่อทำการแยกตามน้ำหนักมวลสารในแต่ละธาตุและตรวจวัดหาปริมาณด้วยการเปลี่ยนเป็นสัญญาณไฟฟ้า

4. การวิเคราะห์ Laser Ablation Inductively Couple Plasma Mass Spectrometer (LA-ICP-MS) ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อหาตำแหน่งการกระจายตัวของธาตุเหล็กบริเวณต่าง ๆ เพื่อยืนยันว่าวิธีวิเคราะห์หาความหนาแน่นของธาตุเหล็กเป็นวิธีที่น่าเชื่อถือจริง

LA-ICP-MS คือเครื่องมือสำหรับทำการวิเคราะห์หาธาตุต่างๆ ซึ่งทำได้ทั้งในรูปของแข็งของเหลว และก๊าซ ซึ่งแยกออกเป็น 2 ส่วนหลัก คือ Laser Ablation Unit และ ICP-MS โดยในส่วนของ Laser Ablation Unit ก็คือส่วนที่จะแยกธาตุต่างๆ ออกจากโมเลกุลที่เป็นได้ทั้งของแข็งของเหลว และก๊าซ และผ่านก๊าซอาร์กอน เข้าไปดึงเอาธาตุเหล่านั้นไปส่งต่อให้ ส่วนที่ 2 คือส่วน ICP-MS ซึ่งในส่วนที่ 2 นี้ก็จะทำการกระตุ้นให้ธาตุเหล่านั้นด้วยรังสี Plasma ที่อุณหภูมิสูงมากเพื่อให้ธาตุต่างๆ แสดงพลังงานออกมาตามโครงสร้างของอะตอม พลังงานที่ถูกกระตุ้นออกมาก็จะถูกบันทึกโดย Sensor แล้วแต่ประเภท ในกรณีนี้ Sensor จะสามารถตรวจจับพลังงานจาก Isotope ของธาตุต่างๆ ได้ด้วย แล้วแต่คุณภาพและเทคนิคของผู้ทำการทดลอง ใช้งานได้ดีสำหรับการวิเคราะห์เพื่อหาส่วนประกอบของสารที่เป็นธาตุรองและธาตุหายาก

การทดลองตอนที่ 2 การคัดกรองประชากรข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ไฟเตตต่ำ

การวิเคราะห์ข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่ให้ระดับไฟเตตต่ำ (Larson *et al*, 2000) เพื่อคัดกรองข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่มีความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดสูงจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Perls' Prussian blue และมีปริมาณฟอสฟอรัสสะสมในเมล็ดสูงหรือ ไฟเตตต่ำ

วิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้าวกลายพันธุ์ที่ให้ระดับไฟเตตต่ำ โดยวิธี High Inorganic Phosphates method (HIP) เป็นวิธีแบบ indirect method ในการตรวจหาข้าวที่ให้ระดับไฟเตตต่ำเบื้องต้น โดยสามารถตรวจได้รวดเร็ว และสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีจำนวนมากได้ บันทึกผลโดยวัดความเข้มสีของตัวอย่างที่ทดสอบด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 820 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ standard phosphates ที่ระดับความเข้มข้นดังนี้ 0, 1.5, 4.6, 9.3, 13.9 mg/L P ถ้าพบว่าให้ความยาวคลื่นแสงที่เท่ากับหรือสูงกว่า 4.6 mg/L ของ standard P ถือว่าเป็น HIP ซึ่งคาดว่าจะมีระดับของไฟเตตต่ำ

วิธีการทดลอง

ซังเมล็ด และบันทึกน้ำหนัก เติมน้ำ 0.4 M HCl 10 เท่าของน้ำหนักเมล็ด (10 μ l ต่อ น้ำหนัก mg ของเมล็ด) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3 ชั่วโมง บดเมล็ดบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C overnight นำตัวอย่างสกัดวางทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อให้ suspension ใส่ขึ้น กรณีที่สารสกัดเป็นข้าวมีสีเดิม 3% H₂O₂ ลงไป 1 μ l และตั้งทิ้งไว้จนสารละลายไม่มีสี ดูดสารสกัด 20 μ l ใส่ใน micro titer plate

เติมน้ำกลั่นลงไป 79 μl เติม colorimetric reagent ปริมาตร 100 μl ประกอบด้วย อัตราส่วน สารละลาย คือ 3 M H_2SO_4 20 μl , 2.5% (w/v) Ammonium molybdate 20 μl , 10% (w/v) Ascorbic acid 20 μl และ Distilled water 40 μl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30 นาที วัดความเข้มของสี ด้วยเครื่อง Micro plate reader ที่ความยาวคลื่น 820 นาโนเมตร หาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับมาตรฐานของ standard P ที่ 0 1.5 4.6 9.3 และ 13.9 mg/L P สูงกว่า 4.6 mg/L P จัดเป็น HIP

Standard P concentration



0 1.5 4.6 9.3 13.9 (mg/L P)

ภาพที่ 7 Standard P concentration

การวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r)

ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี AAS กับ ระดับของการติดสีข้อม Perls' Prussian blue จำนวน 63 ตัวอย่าง

ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ICP กับ ระดับของการติดสีข้อม Perls' Prussian blue จำนวน 22 ตัวอย่าง

ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี AAS กับ ระดับของการติดสีข้อม Perls' Prussian blue จำนวน 21 ตัวอย่าง

ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ICP กับ ระดับของการติดสีข้อม Perls' Prussian blue จำนวน 21 ตัวอย่าง

ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี AAS กับ ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ICP จำนวน 21 ตัวอย่าง

การทดลองตอนที่ 3 การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะยีนควบคุมการสะสมธาตุเหล็กในเมล็ดของข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์

ผสมพันธุ์ข้าวเจ้าหอมนิลกับสายพันธุ์ ที่ได้จากการคัดกรองความหนาแน่นธาตุเหล็กในเมล็ดด้วยวิธี Perls' Prussian blue

สายพันธุ์ 4643 ได้จากการคัดกรองความหนาแน่นธาตุเหล็กในเมล็ดด้วยวิธี Perls' Prussian blue ให้คะแนน Score ++ ซึ่งมีปริมาณธาตุเหล็กเท่ากับ 29.2 mg/kg จากการวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กด้วยวิธี ICP

สายพันธุ์ 8097 ได้จากการคัดกรองความหนาแน่นธาตุเหล็กในเมล็ดด้วยวิธี Perls' Prussian blue ให้คะแนน Score 0 ซึ่งมีปริมาณธาตุเหล็กเท่ากับ 7.3 mg/kg จากการวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กด้วยวิธี ICP

ผสมพันธุ์พ่อและแม่ โดยมีคู่ผสมดังนี้

ข้าวเจ้าหอมนิล X ข้าวสายพันธุ์ 4643

ข้าวเจ้าหอมนิล X ข้าวสายพันธุ์ 8097

ข้าวสายพันธุ์ 4643 X ข้าวสายพันธุ์ 8097

ปลูกข้าวประชากรรุ่น F1 ผสมตัวเอง และเก็บเมล็ด F2

วิเคราะห์ผลประชากรเมล็ด F2 ทางสถิติด้วยวิธี chi-square เพื่อยืนยันสมมติฐานของผลการทดลองว่าเป็นไปตามกฎการแยกตัวของยีนของเมนเดล โดยประชากรรุ่น F2 มีอัตราส่วนที่แสดงออกเป็นลักษณะยีนเด่นต่อลักษณะยีนด้อยเป็น 3 : 1

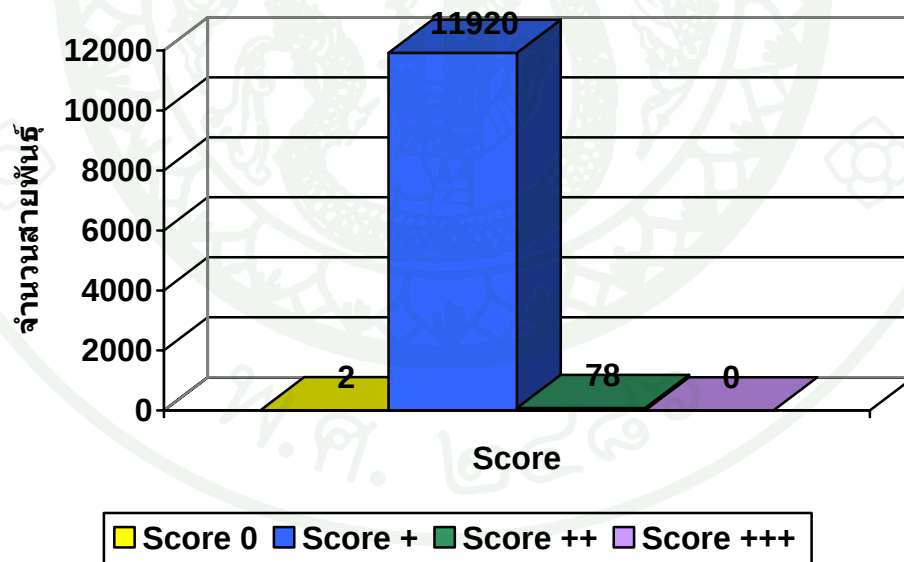
ผลและวิจารณ์

ผล

การทดลองตอนที่ 1 การคัดกรองประชากรข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ธาตุเหล็กสูง

1. การวิเคราะห์หาความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดด้วยวิธี Perls' Prussian blue (Prom-u-thai, *et al*, 2003)

การวิเคราะห์ความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดด้วยวิธี Perls' Prussian blue ข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ จำนวน 12,000 สายพันธุ์ ผลการทดสอบได้จำนวนการให้คะแนนดังนี้ Score 0 จำนวน 2 สายพันธุ์ Score + จำนวน 11,920 สายพันธุ์ Score ++ จำนวน 78 สายพันธุ์ และ Score +++ จำนวน 0 สายพันธุ์



ภาพที่ 8 จำนวนสายพันธุ์ของข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่มีความเข้มของการติดสีของ Perls' Prussian blue ระดับต่างๆ ซึ่งแสดงถึงความแปรปรวนของการสะสมธาตุเหล็กในเมล็ดของข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์

ผลการวิเคราะห์ความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดด้วยวิธี Perls' Prussian blue จำนวนที่ทำการทดสอบ 12,000 สายพันธุ์ พบสายพันธุ์ที่มีการติดสีของ Perls' Prussian blue ที่เข้มที่สุดที่ Score ++ จำนวน 78 สายพันธุ์ ซึ่งได้เปรียบเทียบกับพันธุ์ตรวจสอบจำนวน 7 พันธุ์ดังตารางที่ 3 และดังภาพที่ 9-10

ตารางที่ 3 ข้าวพันธุ์ตรวจสอบจำนวน 7 พันธุ์ที่ระดับของปริมาณธาตุเหล็กต่าง ๆ

Rice Varieties	Perl Prussian blue	ICP (mg/kg)
	Score	
ปิ่นเกษตร	+	11
ขาวดอกมะลิ 105	+	10.6
IR68144	+++	17
สินเหล็ก	++	21
KDC 31-9-11-1-0	+++	28
ไรซ์เบอร์รี่	++	18
เจ้าหอมนิล(BT)	+	13

เจ้าหอมนิล(BT)

Score +



IR68144

Score ++



KDC 31-9-11-1-0-

Score +++



ปิ่นเกษตร

Score ++



สินเหล็ก

Score ++



ไรซ์เบอร์รี่

Score ++



ขาวดอกมะลิ 105

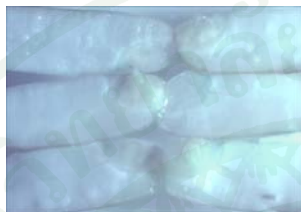
Score +

ภาพที่ 9 ผลการย้อมสีด้วยวิธี Perls' Prussian blue ของข้าวพันธุ์ตรวจสอบจำนวน 7 พันธุ์ที่ระดับของปริมาณธาตุเหล็กต่าง ๆ

เจ้าหอนิล (BT)



Score 0



8097



8419

Score ++



4814



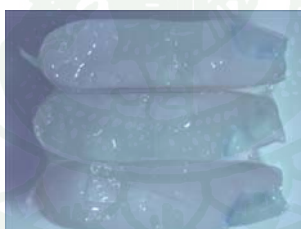
4906



5678



4643



10595



11716

Score +



3012



6654

ภาพที่ 10 ตัวอย่างข้าวเจ้าหอนิลกลายพันธุ์ที่มีระดับการติดสีเข้มด้วยวิธี Perls' Prussian blue

Score ++ Score + และ Score 0 เปรียบเทียบกับ ข้าวเจ้าหอนิล (Score +)

2. การวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กด้วยวิธี Atomic Absorption Spectrometer (AAS) โดยนำเอาเมล็ดใหม่ของสายพันธุ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Perls' Prussian blue ที่ระดับของการติดสีย้อม Score 0 Score + และ Score ++

ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Atomic Absorption Spectrometer (AAS) จำนวน 56 สายพันธุ์ ที่ได้จากการวิเคราะห์หาความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดด้วยวิธี Perls' Prussian blue ในผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 4 โดยมีสายพันธุ์ที่มีธาตุเหล็กสูง มีปริมาณธาตุเหล็กมากกว่า 25 mg/kg จำนวน 4 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ 1255, 4643, 9396 และ 10599 และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ระหว่างปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี AAS กับระดับของการติดสีย้อม Perls' Prussian blue เท่า 0.726 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 %

ตารางที่ 4 ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Atomic Absorption Spectrometer (AAS)

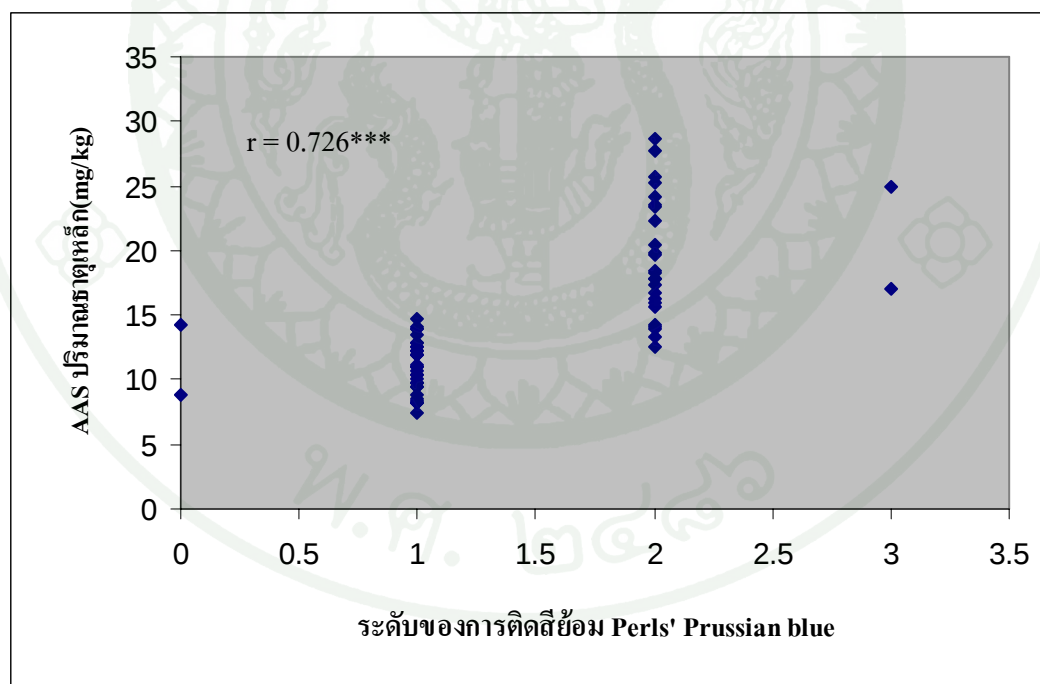
พันธุ์/สายพันธุ์	ปริมาณธาตุเหล็ก (mg/kg)	Perls' Prussian blue Score
1255	25.70	++
1452	16.29	++
2550	19.74	++
3012	12.85	+
3130	24.13	++
3239	10.34	+
3862	14.10	+
4052	23.50	++
4053	20.37	++
4347	12.53	+
4539	17.86	++
4643	25.26	++
4814	22.25	++
4821	13.47	+
4840	14.73	+
4906	17.86	++
4932	9.71	+
4943	8.46	+
4951	18.49	++
4978	8.3	+
5385	8.15	+
5483	10.03	+
5547	8.15	+
5614	8.77	+
5678	14.10	++
5724	7.50	+
6138	12.50	++

ตารางที่ 4 (ต่อ)

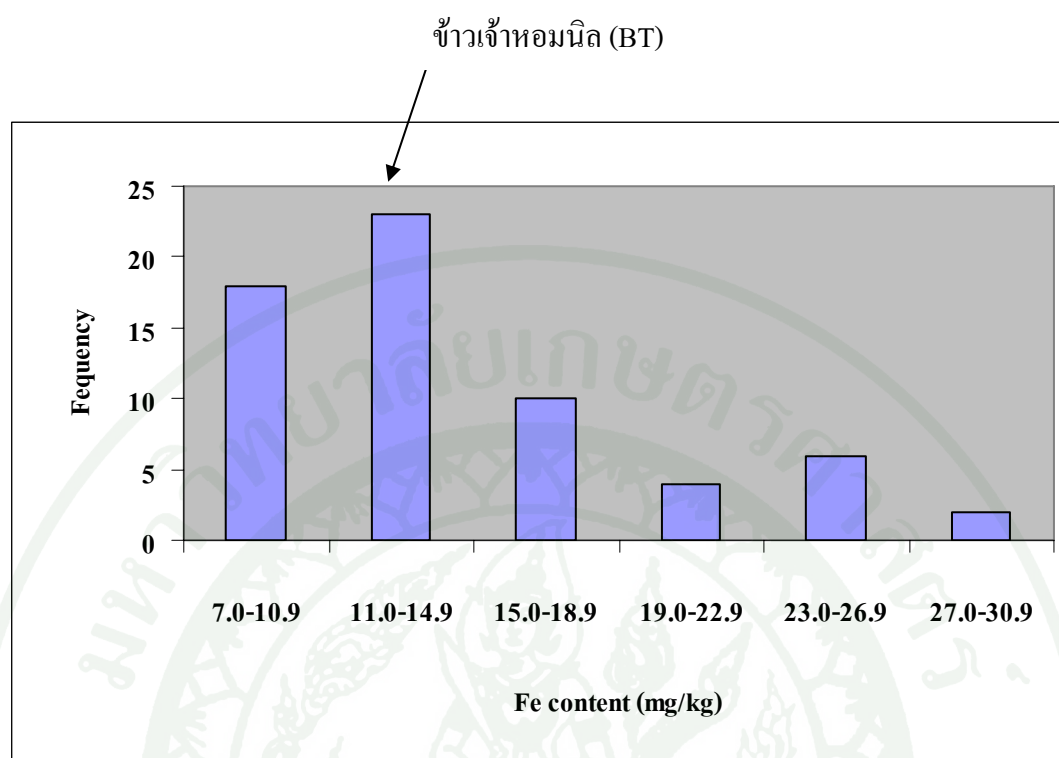
พันธุ์/สายพันธุ์	ปริมาณธาตุเหล็ก (mg/kg)	Perls' Prussian blue Score
5727	8.15	+
5863	9.40	+
6192	11.91	+
6654	11.99	+
6679	13.88	++
6693	16.72	++
6712	13.88	+
8097	8.83	0
8419	14.19	0
8714	18.30	++
8754	23.34	++
8756	14.19	++
9002	11.04	+
9096	10.41	+
9396	27.76	++
10595	19.87	++
10599	28.71	++
10699	12.30	+
10965	13.88	+
10997	11.04	+
11152	12.62	+
11183	11.99	+
11219	9.46	+
11563	10.72	+
11582	9.78	+
11716	13.25	++
11930	17.35	++

ตารางที่ 4 (ต่อ)

พันธุ์/สายพันธุ์	ปริมาณธาตุเหล็ก (mg/kg)	Perls' Prussian blue Score
11940	12.3	+
11945	9.78	+
เจ้าหอมนิล	12.93	+
IR68144	17	+++
KDC31	25	+++
ปิ่นเกษตร	11.2	+
ไรซ์เบอร์รี่	16	++
สินเหล็ก	15.6	++
KDML105	7.2	+



ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี AAS กับระดับของการติดสีข้อม Perls' Prussian blue
 *** มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.001$



ภาพที่ 12 กราฟแสดงการกระจายตัวของปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Atomic Absorption Spectrometer (AAS)

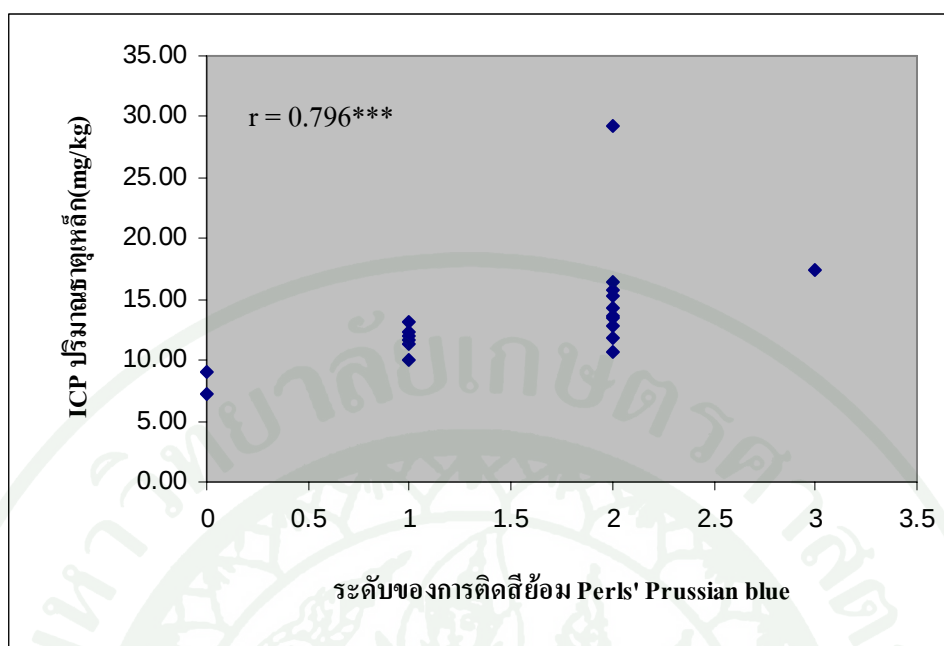
3. การวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กด้วยวิธี Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer (ICP) ที่สถาบันวิจัยโภชนาการ โดยนำเอาเมล็ดใหม่ของสายพันธุ์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Perls' Prussian blue ที่ระดับของการติดสียอม Score 0 Score + และ Score ++ เพื่อเป็นการยืนยันผล

ผลการวิเคราะห์ที่สถาบันวิจัยโภชนาการเพื่อยืนยันผลด้วยวิธี Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer (ICP) ของข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่ให้การติดสียอม Perls' Prussian blue ที่score ++ จำนวน 15 สายพันธุ์ ให้ผลดังตารางที่ 5 ซึ่งมีพันธุ์ที่มีปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดสูงถึง 29.2 mg/kg Fe คือสายพันธุ์ 4643 และสายพันธุ์ที่ไม่ติดสียอม Perls' Prussian blue หรือ score 0 เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี ICP พบปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดเพียง 7.4 mg/kg มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ระหว่างปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ICP กับระดับของการติดสียอม Perls' Prussian blue เท่า 0.796 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ระหว่างปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี AAS กับระดับของการติดสียอม Perls' Prussian blue ระหว่างปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ICP กับระดับของการติดสียอม Perls' Prussian blue และ ระหว่างปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี AAS กับปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ICP มีค่าเท่ากับ 0.8644 0.795 และ 0.7438 ตามลำดับ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % ดังตารางที่ 6 ซึ่งสายพันธุ์ที่ใช้ในการเปรียบเทียบต่างจากตารางที่ 4

ตารางที่ 5 ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer (ICP)

Line/Plant	ICP (mg/kg)	Perls' Prussian blue Score
4906	12.8	++
4932	13.4	++
4951	11.6	+
5727	13.2	++
2550	11.8	+
3103	12.0	+
4643	29.2	++
11183	11.4	+
11563	11.0	+
10595	15.8	++
11930	13.7	++
11716	16.5	++
8419	14.3	0
8097	7.3	0
6654	10.1	++
ปิ่นเกษตร	11	+
ขาวดอกมะลิ 105	10.6	+
IR68144	17	+++
สินเหล็ก	21	++
KDC 31-9-11-1-0	28	+++
ไรซ์เบอร์รี่	18	++
เจ้าหอมนิล (BT)	12.3	+



ภาพที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ICP กับระดับของการติดสีย้อม Perls' Prussian blue

*** มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.001$

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุเหล็กในข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ระหว่าง
เทคนิค ICP, AAS และ Perls' Prussian blue

พันธุ์/สายพันธุ์	ICP (mg/kg)	AAS (mg/kg)	Perls' Prussian blue Score
2550	11.80	19.74	++
4643	29.20	25.26	++
4906	12.80	17.86	++
4932	13.40	9.71	+
4951	11.60	18.49	++
5727	13.20	8.15	+
6654	10.10	11.99	+
8097	7.30	8.83	0
8419	14.30	14.19	0
10595	15.80	19.87	++
11183	11.40	11.99	+
11563	11	10.72	+
11716	16.50	13.25	++
11930	13.70	17.35	++
เจ้าหอมนิล	12.30	12.93	+
IR68144	17	17	+++
KDC 31	28	25	+++
สินเหล็ก	21	15.6	++
ไรซ์เบอร์รี่	18.00	16	++
ปิ่นเกษตร	11.00	11.2	+
KDML 105	10.60	7.2	+

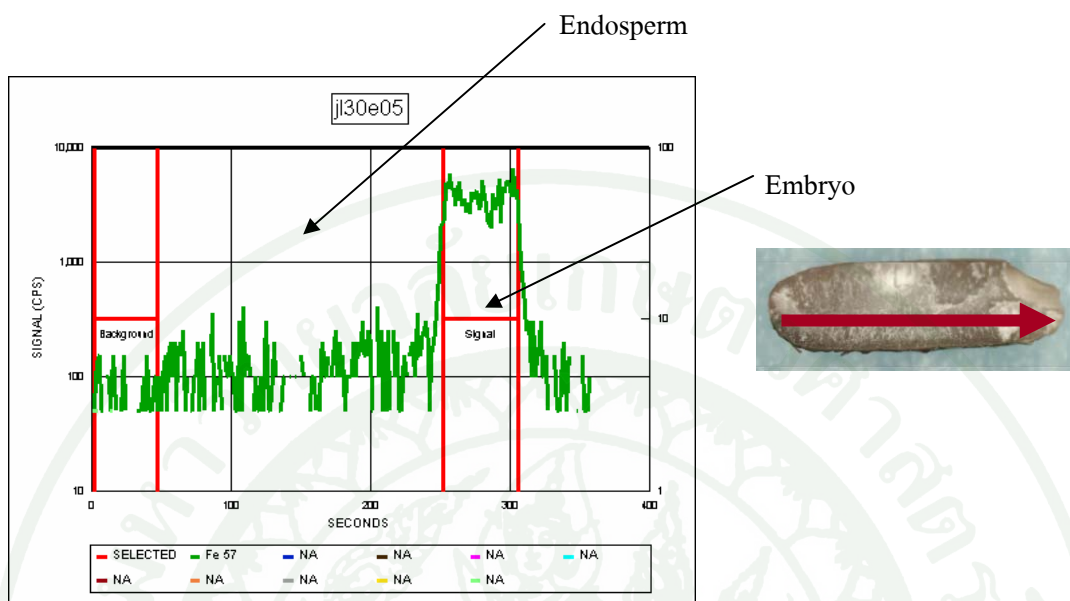
	AAS – Perl	ICP – Perl	AAS - ICP
Correlation	0.8644	0.795	0.7438
P-Value	0.0000**	0.0000**	0.0001**

4. การวิเคราะห์ Laser Ablation Inductively Couple Plasma Mass Spectrometer (LA-ICP-MS) ของภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เพื่อหาตำแหน่งการกระจายตัวของธาตุเหล็กบริเวณต่าง ๆ เพื่อยืนยันว่าวิธีวิเคราะห์หาความหนาแน่นของธาตุเหล็กเป็นวิธีที่น่าเชื่อถือจริง

ผลการวิเคราะห์ Laser Ablation Inductively Couple Plasma Mass Spectrometer (LA-ICP-MS) เพื่อหาตำแหน่งการกระจายตัวของปริมาณธาตุเหล็กภายในเมล็ด ทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 10 เมล็ด ($N=10$) ผลการวิเคราะห์ LA-ICP-MS สามารถบอกระดับตำแหน่งธาตุเหล็กสะสมบริเวณ embryo และ pericarp ซึ่งจะพบปริมาณธาตุเหล็กที่บริเวณ pericarp และบริเวณ embryo มากกว่าส่วน endosperm ดังตารางที่ 7 ซึ่งสอดคล้องกับวิธีการย้อมสีด้วย Perls' Prussian blue ที่สามารถทดสอบความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดบริเวณ embryo และบางพันธุ์ก็ติดสีที่ pericarp เนื่องจากพันธุ์นั้นมี pericarp ที่หนา

ตารางที่ 7 ปริมาณธาตุเหล็กที่บริเวณ pericarp embryo และ endosperm ที่วิเคราะห์ด้วย Laser Ablation Inductively Couple Plasma Mass Spectrometer (LA-ICP-MS)

Local	Fe concentration (mg/kg)					
	JHN	4814	4906	5678	8097	8419
	+	++	++	++	0	0
pericarp	32	38	35	24	29	30
embryo	14	19	27	20	16	17
endosperm	0.5	0.6	0.5	0.4	0.5	0.5



ภาพที่ 14 ตัวอย่างแสดงการกระจายตัวของธาตุเหล็กในเมล็ดข้าว (endosperm และ embryo) ที่วิเคราะห์ด้วย Laser Ablation Inductively Couple Plasma Mass Spectrometer (LA-ICP-MS)

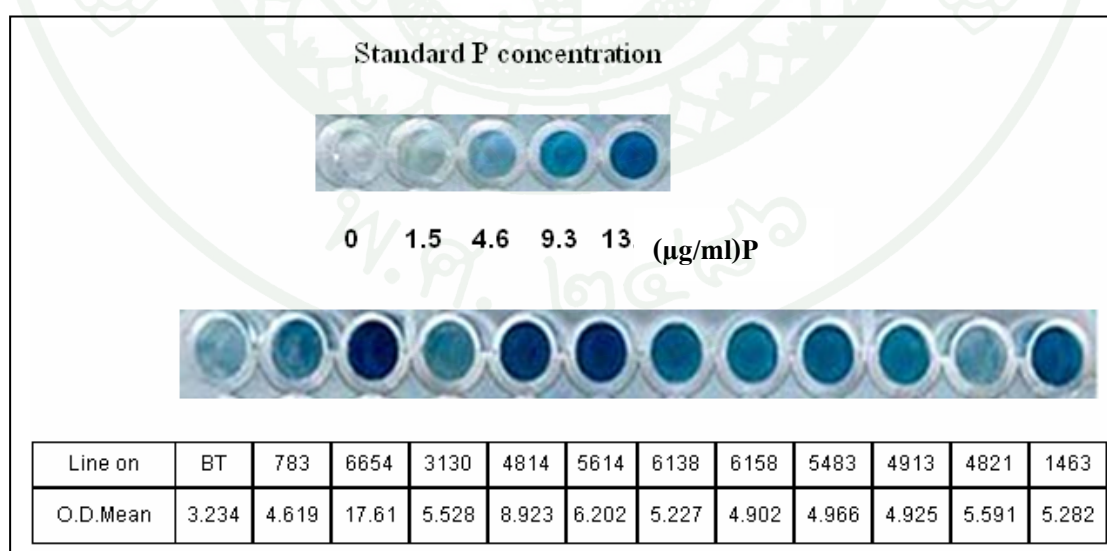
การทดลองตอนที่ 2 การคัดกรองประชากรข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ไฟเตตต่ำ

การวิเคราะห์ข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่ให้ระดับไฟเตตต่ำ (Larson *et al*, 2000) เพื่อคัดกรองข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่มีความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดสูงจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Perls' Prussian blue และมีปริมาณฟอสฟอรัสสะสมในเมล็ดสูงหรือ ไฟเตตต่ำ

ผลการวิเคราะห์ข้าวกลายพันธุ์ที่ให้ระดับไฟเตตต่ำ โดยวิธี HIP (High Inorganic P) method ในข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่มีธาตุเหล็กสูงจากการวิเคราะห์ Perls' Prussian blue จำนวน 94 สายพันธุ์ ดังตารางผนวกที่ 2 เมื่อนำมาวิเคราะห์ ปริมาณฟอสฟอรัสด้วยวิธี HIP method ทำให้ได้สายพันธุ์ที่มีปริมาณฟอสฟอรัสสูงกว่าปริมาณฟอสฟอรัสมาตรฐาน หรือมากกว่า 4.6 mg/L P จำนวน 10 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ปริมาณฟอสฟอรัสที่วิเคราะห์ด้วยวิธี High Inorganic Phosphats (HIP method) ในข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์

Plant	ปริมาณฟอสฟอรัส (mg/L)
BT	3.23
783	4.62
3130	5.53
1463	5.28
4814	8.92
4821	5.59
4913	4.93
5483	4.97
5614	6.20
6138	5.23
6158	4.90
6654	17.61



ภาพที่ 15 การเปรียบเทียบสีความเข้มข้นของปริมาณฟอสฟอรัสระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ กับสีความเข้มข้นมาตรฐาน

การทดลองตอนที่ 3 การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะยีนควบคุมการสะสมธาตุเหล็กในเมล็ดของข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์

จากการวิเคราะห์หาความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดด้วยวิธี Perls' Prussian blue ได้สายพันธุ์ที่มีการติดสีเข้มมากที่สุด และยืนยันผลด้วยวิธี AAS และ ICP ได้สายพันธุ์ที่มีปริมาณธาตุเหล็กสะสมสูงสุดคือสายพันธุ์ 4643 และสายพันธุ์ที่มีการสะสมธาตุเหล็กน้อยที่สุดคือสายพันธุ์ 8097 โดยมีปริมาณธาตุเหล็กเท่ากับ 29.2 mg/kg และ 7.3 mg/kg จึงนำมาศึกษาการถ่ายทอดลักษณะยีนควบคุมการสะสมธาตุเหล็กในเมล็ด โดยนำทั้ง 2 สายพันธุ์ผสมกับ ข้าวเจ้าหอมนิล (wild type) กลุ่มที่ 1 คือ ข้าวเจ้าหอมนิลผสมกับสายพันธุ์ 4643 ได้เมล็ด F1 และปลูกต้น F1 ผสมตัวเอง ทั้งหมด 19 ต้น ได้เมล็ด F2 นำมาวิเคราะห์หาความหนาแน่นของธาตุเหล็กด้วยวิธี Perls' Prussian blue ของแต่ละข้อในทุต้นของเมล็ด F2 และนำผลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี chi-square พบว่าการกระจายตัวระหว่าง score ++ และ score + มีอัตราส่วนฟีโนไทป์เท่ากับ 3: 1 ตามกฎของเมนเดล โดยการเปิดตาราง ค่า chi-square ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 ระดับขั้นความเสรี (degree of freedom) เท่ากับ 1 ได้ค่า chi-square เท่ากับ 3.441 เปรียบเทียบกับการคำนวณค่า chi-square ของแต่ละข้อ ผลที่ได้คือ ค่า chi-square ของแต่ละข้อมีค่าน้อยกว่า 3.441 และค่า P-value มีค่ามากกว่า 0.05 จึงเป็นการยอมรับสมมติฐานที่ว่า ลักษณะของการสะสมธาตุเหล็กในเมล็ดควบคุมด้วยยีน 1 คู่ ยีนควบคุมธาตุเหล็กเป็นยีนเด่น และการถ่ายทอดลักษณะเป็นแบบข้ามสมบูรณ ดังตารางที่ 9 และตารางผนวกที่ 1

สำหรับกลุ่มที่ 2 และ 3 คือ กลุ่มผสมระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับสายพันธุ์ 8097 และกลุ่มผสมระหว่างสายพันธุ์ 4643 กับสายพันธุ์ 8097 เมื่อนำมาวิเคราะห์หาความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดด้วยวิธี Perls' Prussian blue และนำผลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี chi-square ผลการวิเคราะห์ไม่เป็นไปในทิศทางใดเลยตามตารางที่ 11 – 13 ซึ่งอาจเกิดจากข้าวสายพันธุ์ 8097 ให้ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Perls' Prussian blue ให้คะแนน Score 0 ไม่ 100 % ลักษณะของ Score 0 ที่พบอาจเกิดจากเมล็ดของสายพันธุ์นั้นไม่สมบูรณ์ ตามตารางที่ 10 การย้อมติดสีของ Perls' Prussian blue จึงทำให้เกิดปัญหาการ score คะแนน จึงมีผลต่อกลุ่มที่ 2 ดังภาพที่ 16

ตารางที่ 9 จำนวนต้นประชากร F2 seed ระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับสายพันธุ์ 4643 ที่แสดงผลการให้คะแนนที่ Score + และ Score ++

ต้นที่	จำนวนเมล็ด	Score +	Score ++	Chi-square	P-value
1	53	12	41	0.157	0.692
2	245	58	187	0.229	0.913
3	136	36	100	0.157	0.692
4	223	50	173	0.791	0.374
5	132	29	103	0.646	0.422
6	88	22	66	0	0
7	240	57	183	0.2	0.655
8	308	66	242	2.095	0.148
9	185	43	142	0.305	0.581
10	160	34	126	1.2	0.273
11	150	44	106	1.502	0.220
12	123	28	95	0.328	0.567
13	128	24	104	2.667	0.102
14	300	72	228	0.16	0.689
15	154	36	118	0.216	0.642
16	181	45	136	0.002	0.964
17	125	30	95	0.067	0.796
18	63	14	49	0.259	0.611
19	86	20	66	0.14	0.708

chi-square probabilities at 0.05 = 3.441 at df=1

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P < 0.05$ ที่มา <http://www.danielsoper.com/statcalc/calc11.aspx>

ตารางที่ 10 เปอร์เซนต์เมล็ดดีและเมล็ดลีบของข้าวเจ้าหอมนิล ข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์สายพันธุ์ 4643 และสายพันธุ์ 8097 และกลุ่มผสม 3 คู่

พันธุ์/สายพันธุ์	จำนวนเมล็ดทั้งหมด	% เมล็ดดี	% เมล็ดลีบ
หอมนิล	100	98	2
4643	100	99	1
8097	100	71	29
F2 4643 x 8097	543	93	7
F2 หอมนิล x 4643	417	99.5	0.5
F2 หอมนิล x 8097	495	91.3	8.7



ภาพที่ 16 เมล็ดไม่สมบูรณ์ของสายพันธุ์ 8097

ตารางที่ 11 สายพันธุ์ 8097 พันธุ์พ่อของกลุ่มสมระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับสายพันธุ์ 8097

ต้นที่	Score 0	Score +	จำนวนเมล็ด
1	13	304	317
2	18	127	145
3	9	332	341
4	5	215	220
5	21	296	317
6	20	411	431
7	12	266	278
8	5	249	254
9	5	275	280
10	6	252	258
Total	114	2727	2841

ตารางที่ 12 จำนวนต้นประชากร F2 seed ระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับสายพันธุ์ 8097 ที่แสดงผลการให้คะแนนที่ Score 0 และ Score +

ต้นที่	Score 0	Score +	จำนวนเมล็ด
1	3	286	289
2	18	226	244
3	14	231	245
4	19	212	231
5	15	257	272
6	3	262	265
7	1	325	326
8	1	89	90
9	25	313	338
10	7	127	134
11	2	204	206
12	9	135	144
13	16	78	94
14	0	145	145
15	25	204	229
16	2	229	231
Total	160	3323	3483

ตารางที่ 13 จำนวนต้นประชากร F2 seed ระหว่างข้าวสายพันธุ์ 4643 กับสายพันธุ์ 8097 ที่แสดงผล
การให้คะแนนที่ Score 0 Score + และ Score ++

ต้นที่	Score 0	Score +	Score ++	จำนวนเมล็ด
1	14	94	48	156
2	15	147	68	230
3	44	131	78	253
4	26	273	104	403
5	12	207	76	295
6	22	152	10	184
7	8	152	22	182
8	14	184	23	221
9	6	87	7	100
10	10	177	16	203
11	3	49	4	56
12	27	262	16	305
13	5	119	2	126
14	15	311	11	337
15	17	217	16	250
16	16	165	7	188
17	18	116	9	143
Total	272	2843	517	3632

วิจารณ์

การวิเคราะห์หาความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดด้วยวิธี Perls' Prussian blue เหมาะสำหรับเมล็ดข้าวสีขาวยังไม่เหมาะสมกับเมล็ดข้าวสีดำ แต่ในการวิเคราะห์ของงานวิจัยนี้ได้มีการปรับเปลี่ยนวิธีการวิเคราะห์ คือนำเมล็ดข้าวที่มีสีดำย้อมกับ Pericarp ออกด้วย น้ำยาฟอกขาว (Clorox) เพื่อขจัดสีดำของเมล็ดออกก่อนการวิเคราะห์ การแช่น้ำยาฟอกขาวเพื่อขจัดสีผิวของเมล็ดควรแช่ทั้งเมล็ดข้าวสีขาว และเมล็ดข้าวสีดำ เพื่อตัดปัจจัยของน้ำยาฟอกขาวออกไประหว่างเมล็ดสีขาวและดำ ทำให้งานวิจัยสามารถวิเคราะห์เจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่มีเมล็ดสีดำได้ และวิธีนี้เหมาะกับการวิเคราะห์หาธาตุเหล็กในเมล็ดเบื้องต้นได้เท่านั้น สามารถบอกได้ว่ามีธาตุเหล็กสะสมอยู่ในเมล็ดมากหรือน้อยเท่านั้น และสามารถวิเคราะห์กับตัวอย่างที่มีจำนวนมาก เพราะทำได้ง่ายและรวดเร็ว ในการให้คะแนนของการย้อมสี Perls' Prussian blue ผู้วิจัยจะต้องเป็นผู้ให้คะแนนแต่เพียงผู้เดียว เพราะการมองจะได้เป็นมาตรฐานเดียวกันและดูภายใต้กล้อง

ซึ่งผลส่วนใหญ่สอดคล้องกับ Prom-u-thai et al (2003) และ ทราศคำ(2549) ที่วิเคราะห์ข้าวพื้นเมืองด้วยวิธีการย้อมสี Perls' Prussian blue กับการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีพบว่ามีความแปรปรวนของธาตุเหล็ก ในเมล็ดข้าวอยู่ระหว่าง 7.5-24.4 mg/kg Fe (Senahira *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังได้มีการสำรวจพันธุ์ข้าวไทยจำนวน 38 พันธุ์ พบว่ามีความแปรปรวนของปริมาณธาตุเหล็กอยู่ระหว่าง 7-22 mg/kg Fe (Prom-u-thai and Rerkasem, 2001)

การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส (HIP method) สารละลาย 10% (w/v) ascorbic acid ควรเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4°C การเตรียมหนึ่งครั้ง สามารถเก็บไว้ใช้ได้แค่ 2 สัปดาห์ ปัญหาของเมล็ด low phytate คือ มีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำมาก ยังมีปริมาณฟอสฟอรัสมาก เปอร์เซ็นต์การงอกก็จะยิ่งต่ำ ไฟเตทมีบทบาทสำคัญในการงอกของเมล็ดอย่างมาก กล่าวคือเมื่อเริ่มงอกเอ็มบริโอต้องใช้ธาตุอาหารมาก เช่น แมกนีเซียม (ในกระบวนการฟอสฟอริเลชันและการสังเคราะห์โปรตีน) โพแทสเซียม(ในกระบวนการขยายขนาดเซลล์) และฟอสฟอรัส (เพื่อสังเคราะห์ลิพิดในเยื่อและกรดนิวคลีอิก) ด้วยเหตุนี้จึงพบว่าเมื่อเมล็ดเริ่มงอกจะมีการสลายอนุภาคไฟเตทซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยแผ่นโปรตีนภายในใบเลี้ยงก่อนเอนไซม์ที่กระตุ้นการสลายคือไฟเตท(phytate) จึงทำให้ปริมาณไฟเตทในเมล็ดลดลง (Mukherji *et al.* 1971)

การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะยีนควบคุมการสะสมธาตุเหล็กในเมล็ดของข้าวเจ้าหอมนิล กลายพันธุ์ ของคู่ผสมระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ สายพันธุ์ 4643 มีการแสดงออกของยีนแบบข่มสมบูรณ Zhang *et al.* (2004) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุม ปริมาณธาตุเหล็กในเมล็ดข้าว พบว่าถูกควบคุมด้วยยีนข่ม ในขณะที่ Gregorio (2002) พบการ แสดงออกของยีนเป็นแบบบวกสะสม (additive gene) และแบบข่ม (dominant gene) ขึ้นอยู่กับการ รวมตัวของแต่ละคู่ผสม



สรุป

1. วิธีการหาความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดด้วยการย้อมสี Perls' Prussian blue สามารถคัดกรองข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ 12,000 สายพันธุ์ได้รวดเร็วและประหยัดงบประมาณ และทำให้ค้นพบข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่มีธาตุเหล็กสูงถึง 29.2 mg/kg Fe คือ สายพันธุ์ 4643 และสายพันธุ์ที่มีธาตุเหล็กสะสมในเมล็ดต่ำคือ สายพันธุ์ 8097 ซึ่งมีปริมาณธาตุเหล็กเท่ากับ 7.3 mg/kg Fe ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป
2. การวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัส (HIP method) ในข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ที่มีธาตุเหล็กสูงจากการวิเคราะห์ Perls' Prussian blue ได้สายพันธุ์ที่มีปริมาณฟอสฟอรัสสูง หรือ low phytate จำนวน 10 สายพันธุ์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์มากในด้านโภชนาการ คือได้ข้าวธาตุเหล็กสูงและ low phytate จะทำให้มนุษย์สามารถดูดซึมธาตุเหล็กไปใช้ได้มีประสิทธิภาพ ไม่มีตัวขัดขวางการดูดซึม
3. เมื่อทำการผสมระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับสายพันธุ์ 4643 ที่ให้การ Score ++ ในการหาความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดด้วยวิธี Perls' Prussian blue พบการกระจายตัวในรุ่น F2 seed มีอัตราส่วนฟีโนไทป์ของจำนวน Score ++ : Score + เท่ากับ 3: 1 ซึ่งเป็นไปตามกฎการแยกตัวของยีนของเมนเดล เนื่องจากการข้ามของยีนเด่นที่ข้ามสมบูรณ์ต่อยีนด้อย

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ชนากานต์ พรหมอุทัย, ศันสนีย์ จำจด และ เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม. 2547. ธาตุเหล็กในเมล็ดข้าวไทย. หนังสือพิมพ์กสิกร ปีที่ 77 ฉบับที่ 6 พฤศจิกายน-ธันวาคม 2547 หน้า 105-110.

ทรายคำ ปินตาเสน. 2549. ความแปรปรวนในปริมาณและการสะสมธาตุเหล็กของเมล็ดในข้าวพันธุ์ไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นิรนาม. 2552. **Iron**. แหล่งที่มา: <http://www.geocities.com/vitandmin/IRON.htm>, 30 มีนาคม 2552.

ขงยุทธ โอสดสภา. 2546. ธาตุอาหารพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อภิชาติ วรรณวิจิตร. 2547. รายงานการวิจัยโครงการบูรณาการเทคโนโลยีชีวภาพในการสร้างพันธุ์ข้าวเพื่อเพิ่มมูลค่าและคุณค่าสูง. นครปฐม. 155 หน้า

อุทุมพร สมพงษ์. 2549. การศึกษาพันธุกรรมการถ่ายทอดลักษณะปริมาณกรดไฟติกในเมล็ดข้าวเจียว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกดนัย กอกิมพงษ์. 2549. **ICP**เครื่องมือวิเคราะห์ธาตุโดยพลาสมา. LAB.TODAY 3(36):19-24

Anon. 2004. **Phosphorous**. Available Source: http://www.ikisan.com/links/ap_chilliMajorandMicroNutrients.html, April 17, 2004.

Chang, T.T. 1976. The origin, evolution, dissemination and diversification of Asian and African rices. **Euphytica** 25: 425-441.

Cichy, K. A., Forster, S., Grafton, K. F., and Hosfield, G. L. 2005. Inheritance of seed Zinc accumulation in navy bean. **Crop Science**. 45: 864-870.

- Coelho, C.M.M., J.C.P. Santos, S.M Tsai and V.A. Vitorello. 2002. Seed phytate content and phosphorous uptake and distribution in dry bean genotypes. **Braz. J. Plant Physiol.** 14(1): 677-682
- Dorsch, J.A., A. Cook, K.A. Young, J.M. Anderson, A.T. Bauman, C.J. Volkmann, P.P.N. Murthy and V. Raboy. 2003. Seed phosphorus and inositol phosphosphate phenotype of barley *low phytic acid* genotypes. **Phytochem.** 62: 691-706.
- Ertl, D.S., K.A. Young, and V. Raboy. 1998. Plant genetic approaches to phosphorus management in agricultural production. **J. Environ. Qual.** 27: 299-304.
- Frossard, E., Bucher, M., Marchler, F., Mozafar, A., and Hurrell, R. 2000. Potential for increasing the content and bioavailability of fe, zn and ca in plants for human nutrition. **Science of food and Agriculture.** 80: 861-879.
- Gregorio, G.B., Senadhira, D., Htut, T., and graham, R.D. 2000. Breeding for trace mineral density in rice. **Food Nutr. BULL.** 21:382-386.
- Gregorio, G. B., 2002. Progrogress in Breeding for Trace Minerals in staple Crops. **Nutrition.** 132, 500-502
- Halliwell, B., and J.M.C. Gutteridge. 1986. Iron and free redical reactions two aspects of antioxidant protection. **Trends Biochem** 11: 372-375.
- Hewitt, E.J. 1983. A Perspective on mineral nutrition: essential and functional metals in plants, pp.277-323. In Robb D.A., Pierpoint W.S, eds. **Metals and micro-nutrients uptake and utili zation by plants.** Acad. Press, NewYork.
- Kleyn, R. 2006. **Phytate and layer.** Available Source: <http://www.spesfeed.co.za/winter99.htm>, September 17, 2006.

- Larson, S.R., Rutger, J.N., Young, K.A. and Raboy, V. 2000. Isolation and genetic mapping of a non-lethal rice (*Oryza sativa* L.) low phytic acid 1 Mutation. **Crop Sci.** 40:1397-1405.
- Latta, M. and M. Eakin. 1980. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **J. Agric. Food Chem.** 28: 1313-1315.
- Lott, J.N.A. and M.S. Buttrose. 1978. Globoids in protein bodies of legume seed cotyledons. **Aust. J. Plant Physiol.** 5:89-111.
- Lott, J.N.A., I. Ockenden, V. Raboy and G.D. Batten. 2000. A global estimate of phytic acid and phosphorous in crop grains. **Seed Sci. Res.** 10: 11-33.
- Makower, R.U. 1970. Extraction and determination of phytic acid in beans (*Phaseolus vulgaris*). **Cereal Chem.** 47: 288-295.
- Marschner, H. 1995. **Mineral nutrition of Higher Plants**. 2nd ed. Academic Press, London.
- Mukherji, S., B. Dey, A.K. Paul and S.M. Sircar. 1971. Changing in phosphorus fractions and phytase activity of rice seeds during germination. **Physiol. Plant.** 25:94-97.
- Oberleas, D. and A.S. Prasad. 1969. Growth as affected by zinc and protein nutrition. **Am. J. Clin. Nutr.** 22(10): 1304-1314.
- Ogawa, M., K. Tanaka and Z. Kasai. 1979. Energy-dispersive X-ray analysis of phytin globoids in aleurone particles of developing rice grains. **Soil Sci. Plant Nutr.**(Tokyo) 25:437-448.
- Perkinelmer. 2010. **Atomic Absorption Spectroscopy**. Available Source: http://las.perkinelmer.com/local/Thailand/AS_AAS.htm, April 29, 2010.

- Prom-u-thai, C. 2003. **Iron(Fe) in Rice Grain**. Ph.D.Thesis, Chiang Mai University.
- Prom-u-thai, C., and B. Rerkasem. 2001. Iron concentration in Thai rice germplasm. **Plant nutrition – Food security and sustainability of agro-ecosystems**. 350-351.
- Prom-u-thai C., B. Dell , G. Thomson and B. Rerkasem. 2003. Easy and Rapid detection of iron in rice seed. **ScienceAsia**. 29, 314-317.
- Raboy, V. 2001. Seeds for a better future: 'low phytate' grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. **Trends in plant Sci**. 6(10): 458-462.
- _____. 2002. Progress in breeding low phytate crops. **J.Nutr**. 132(3): 503-505.
- _____ And D.B. Dickinson. 1993. Phytic acid levels in seeds of *Glycine max* and *G. soja* as influenced by phosphorus status. **Crop Sci**. 33: 1300-1305.
- Reddy, N.R., C.V. Balakrishnan and D.K. Salunkhe. 1978. Phytate phosphorus and mineral changes during germination and cooking of black gram (*Phaseolus mungo*) seeds. **Food Sci**. 43: 540-543.
- Senadhira D., G.B. Gregorio and R.D. Graham. 1998. **Breeding Iron and Zinc Dense Rice**. Paper presented at the International Workshop on Micronutrient Enhancement of Rice for Developing Countries, Rice Research and Extension Center, Stuttgart. 22.
- Sugiura, S.H., V. Raboy, K.A. Young, F.M. Dong and R.W. Hardy. 1999. Availability of phosphorus and trace elements in low-phytate varieties of barley and corn for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**. 170: 285-296.
- Talamond, P., S. Doulbeau, I. Rochette, J.P. Guyot and S. Treche. 2000. Anion-exchange high performance liquid chromatography with conductivity detection for the analysis of

phytic acid in food. **J. Chromatogr. A.** 871: 7-12.

Welch, R.M., and R.D. Graham. 2002. Breeding crops for enhanced micronutrient content. **Plant and Soil.** 245: 205-214.

Werner, D., J. Wilcockson, R. Tript, E. Morschel, and H. Papen. 1981. Limitations of symbiosis and associated nitrogen fixation by development stages in the system *Rhizobium japonicum* with *Glycine max* and *Azospirillum brasilense* with grasses, e.g. *Triticum aestivum*. In H. Bothe and A. Trebst, eds. **Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur** 299-308.

Xizhang, S. 2006. **Metabolism of inositol phosphates in *Chlamydomonas reinhardtii*.**
Available Source: <http://proquest.umi.com/qpdwebdid=765930011>, Mar 14, 2006.

Xu, Y., X.H. Liu, and G.D. Prestwich. 2005. Synthesis of phosphatase-resistant analogues of phytic acid (InsP6). **Tetrahedron Lett.** 46: 8311-8314.

Zhang, M. WW., Guo, B. J., and Peng, Z. M. 2004. Genetic effects on Fe, Zn, Mn and P content in indica black pericarp rice and their genetic correlations with grain characteristics. **Euphytica.** 135: 315-323.



ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 จำนวนต้นและช่อของประชากร F2 seed ระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับสายพันธุ์ 4643 ที่แสดงผลการให้คะแนนที่ Score + และ Score ++

ต้น-ช่อ	Score +	Score ++	Chi-square	P-Value
1-1	3	17	1.067	0.302
1-2	2	6	0	0
1-3	2	9	0.273	0.601
1-4	1	4	0.067	0.796
1-5	2	3	0.600	0.439
1-6	2	2	1.333	0.248
Total	12	41	0.157	0.692
2-1	4	16	0.267	0.605
2-2	4	17	0.397	0.529
2-3	4	11	0.022	0.882
2-4	5	10	0.556	0.456
2-5	4	16	0.267	0.605
2-6	4	12	0	0
2-7	3	16	0.860	0.354
2-8	2	7	0.037	0.847
2-9	2	20	2.970	0.085
2-10	6	13	0.439	0.508
2-11	3	12	0.200	0.655
2-12	5	15	0	0
2-13	6	11	0.961	0.327
2-14	6	11	0.961	0.327

chi-square probabilities at 0.05 = 3.441 at df=1

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P < 0.05$ ที่มา <http://www.danielsoper.com/statcalc/calc11.aspx>

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ต้น-ข้อ	Score +	Score ++	Chi-square	P-Value
Total	28	82	0.012	0.913
3-1	2	8	0.133	0.715
3-2	2	10	0.444	0.505
3-3	7	11	1.852	0.174
3-4	2	5	0.048	0.827
3-5	3	9	0	0
3-6	2	13	1.089	0.297
3-7	4	13	0.020	0.888
3-8	2	5	0.048	0.827
3-9	7	14	0.778	0.378
3-10	2	7	0.037	0.847
3-11	3	5	0.667	0.414
Total	36	100	0.157	0.692
4-1	5	12	0.176	0.675
4-2	3	12	0.200	0.655
4-3	4	14	0.074	0.786
4-4	2	16	1.852	0.174
4-5	7	10	2.373	0.123
4-6	8	10	3.630	0.057
4-7	1	13	2.381	0.123
4-8	2	6	0	0
4-9	4	16	0.267	0.605

chi-square probabilities at 0.05 = 3.441 at df=1

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P < 0.05$ ที่มา <http://www.danielsoper.com/statcalc/calc11.aspx>

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ต้น-ข้อ	Score +	Score ++	Chi-square	P-Value
4-10	1	14	2.689	0.101
4-11	3	14	0.490	0.484
4-12	2	8	0.133	0.715
4-13	4	12	0	0
4-14	4	16	0.267	0.605
Total	50	173	0.791	0.374
5-1	3	8	0.030	0.862
5-2	1	4	0.067	0.796
5-3	2	6	0	0
5-4	3	6	0.333	0.564
5-5	2	10	0.444	0.505
5-6	2	6	0	0
5-7	1	12	2.077	0.150
5-8	2	11	0.641	0.423
5-9	3	12	0.200	0.655
5-10	5	9	0.857	0.355
5-11	3	12	0.200	0.655
5-12	2	7	0.037	0.847
Total	6	18	0.646	0.422
6-1	4	13	0.020	0.888
6-2	5	14	0.018	0.893
6-3	1	3	0	0

chi-square probabilities at 0.05 = 3.441 at df=1

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P < 0.05$ ที่มา <http://www.danielsoper.com/statcalc/calc11.aspx>

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ต้น-ข้อ	Score +	Score ++	Chi-square	P-Value
6-4	3	16	0.860	0.354
6-5	4	4	2.667	0.102
6-6	5	16	0.016	0.899
Total	13	39	0	0
7-1	6	12	0.667	0.414
7-2	5	14	0.018	0.893
7-3	2	15	1.588	0.208
7-4	4	16	0.267	0.605
7-5	7	14	0.778	0.378
7-6	4	15	0.158	0.691
7-7	4	13	0.020	0.888
7-8	6	12	0.667	0.414
7-9	3	12	0.200	0.655
7-10	7	13	1.067	0.302
7-11	3	18	1.286	0.257
7-12	3	16	0.860	0.354
7-13	3	13	0.333	0.564
Total	41	123	0.200	0.655
8-1	3	14	0.490	0.484
8-2	5	15	0	0
8-3	4	15	0.158	0.691
8-4	4	15	0.158	0.691

chi-square probabilities at 0.05 = 3.441 at df=1

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P < 0.05$ ที่มา <http://www.danielsoper.com/statcalc/calc11.aspx>

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ต้น-ข้อ	Score +	Score ++	Chi-square	P-Value
8-5	4	15	0.158	0.691
8-6	6	14	0.267	0.605
8-7	5	15	0	0
8-8	3	17	1.067	0.302
8-9	3	11	0.095	0.758
8-10	4	16	0.267	0.605
8-11	4	16	0.267	0.605
8-12	2	10	0.444	0.505
8-13	4	14	0.074	0.786
8-14	3	16	0.860	0.354
8-15	3	12	0.200	0.655
8-16	5	15	0	0
8-17	4	12	0	0
Total	58	213	2.095	0.148
9-1	3	16	0.860	0.354
9-2	4	18	0.545	0.460
9-3	4	16	0.267	0.605
9-4	4	14	0.074	0.786
9-5	4	14	0.074	0.786
9-6	6	11	0.961	0.327
9-7	6	16	0.061	0.805
9-8	4	14	0.074	0.786

chi-square probabilities at 0.05 = 3.441 at df=1

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P < 0.05$ ที่มา <http://www.danielsoper.com/statcalc/calc11.aspx>

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ต้น-ข้อ	Score +	Score ++	Chi-square	P-Value
9-9	5	13	0.074	0.786
9-10	3	10	0.026	0.872
Total	43	142	0.305	0.581
10-1	4	10	0.095	0.758
10-2	4	14	0.074	0.786
10-3	3	14	0.490	0.484
10-4	4	14	0.074	0.786
10-5	3	15	0.667	0.414
10-6	3	18	1.286	0.257
10-7	4	16	0.267	0.605
10-8	5	13	0.074	0.786
10-9	4	12	0	0
Total	34	126	1.200	0.273
11-1	2	4	0.222	0.638
11-2	6	14	0.267	0.605
11-3	1	3	0	0
11-4	6	12	0.667	0.414
11-5	3	9	0	0
11-6	7	16	0.362	0.547
11-7	5	14	0.018	0.893
11-8	5	17	0.061	0.805
11-9	3	4	1.190	0.275

chi-square probabilities at 0.05 = 3.441 at df=1

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P < 0.05$ ที่มา <http://www.danielsoper.com/statcalc/calc11.aspx>

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ต้น-ข้อ	Score +	Score ++	Chi-square	P-Value
11-10	6	13	0.439	0.508
Toatl	44	106	1.502	0.220
12-1	4	11	0.022	0.882
12-2	3	17	1.067	0.302
12-3	6	15	0.143	0.705
12-4	5	16	0.016	0.899
12-5	4	16	0.267	0.605
12-6	1	4	0.067	0.796
12-7	5	16	0.016	0.899
Total	28	95	0.328	0.567
13-1	3	5	0.667	0.414
13-2	3	15	0.667	0.414
13-3	3	10	0.026	0.872
13-4	3	16	0.860	0.354
13-5	3	14	0.490	0.484
13-6	3	18	1.286	0.257
13-7	3	14	0.490	0.484
13-8	3	12	0.200	0.655
Total	24	104	2.667	0.102
14-1	5	16	0.016	0.899
14-2	3	16	0.860	0.354
14-3	5	10	0.556	0.456

chi-square probabilities at 0.05 = 3.441 at df=1

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P < 0.05$ ที่มา <http://www.danielsoper.com/statcalc/calc11.aspx>

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ต้น-ข้อ	Score +	Score ++	Chi-square	P-Value
14-4	6	12	0.667	0.414
14-5	5	13	0.074	0.786
14-6	4	14	0.074	0.786
14-7	5	12	0.176	0.675
14-8	4	15	0.158	0.691
14-9	3	14	0.490	0.484
14-10	4	17	0.397	0.529
14-11	3	16	0.860	0.354
14-12	5	14	0.018	0.893
14-13	6	14	0.267	0.605
14-14	5	15	0	0
14-15	4	16	0.267	0.605
14-16	5	14	0.018	0.893
Total	72	228	0.160	0.689
15-1	3	8	0.030	0.862
15-2	2	7	0.037	0.847
15-3	5	12	0.176	0.675
15-4	3	12	0.200	0.655
15-5	4	14	0.074	0.786
15-6	4	8	0.444	0.505
15-7	3	14	0.490	0.484
15-8	4	12	0	0

chi-square probabilities at 0.05 = 3.441 at df=1

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P < 0.05$ ที่มา <http://www.danielsoper.com/statcalc/calc11.aspx>

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ต้น-ข้อ	Score +	Score ++	Chi-square	P-Value
15-9	3	11	0.095	0.758
15-10	3	12	0.200	0.655
15-11	2	8	0.133	0.715
Total	36	118	0.216	0.642
16-1	3	11	0.095	0.758
16-2	5	14	0.018	0.893
16-3	4	16	0.267	0.605
16-4	6	13	0.439	0.483
16-5	5	15	0	0
16-6	5	14	0.018	0.893
16-7	4	14	0.074	0.786
16-8	5	12	0.176	0.675
16-9	4	13	0.020	0.888
Total	45	136	0.002	0.964
17-1	4	15	0.158	0.691
17-2	5	15	0	0
17-3	4	13	0.020	0.888
17-4	5	16	0.016	0.899
17-5	3	14	0.490	0.484
17-6	5	12	0.176	0.675
17-7	4	10	0.095	0.758
Total	30	95	0.067	0.796

chi-square probabilities at 0.05 = 3.441 at df=1

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P < 0.05$ ที่มา <http://www.danielsoper.com/statcalc/calc11.aspx>

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ต้น-ข้อ	Score +	Score ++	Chi-square	P-Value
18-1	3	14	0.490	0.484
18-2	5	18	0.130	0.718
18-3	3	11	0.095	0.758
18-4	3	6	0.333	0.564
Total	14	49	0.259	0.611
19-1	5	18	0.130	0.718
19-2	2	6	0	0
19-3	4	15	0.158	0.691
19-4	3	12	0.200	0.655
19-5	6	15	0.143	0.705
Total	20	66	0.140	0.708

chi-square probabilities at 0.05 = 3.441 at df=1

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P < 0.05$ ที่มา <http://www.danielsoper.com/statcalc/calc11.aspx>

ตารางผนวกที่ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของปริมาณฟอสฟอรัส (mg/L) ในสายพันธุ์ที่มีธาตุเหล็กสูง จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Perls' Prussian blue

No.	Plant	Rep I	Rep II	Rep III	Rep IV	Mean
1	BT	4.217	2.914	3.121	2.682	3.234
2	783	6.549	2.481	1.831	7.616	4.619
3	KDC31	3.585	3.438	3.979	4.064	3.767
4	IR68144	2.322	2.325	3.164	1.593	2.351
5	KDML105	2.890	5.677	3.866	2.453	3.722
6	2403	4.912	4.609	3.319	1.726	3.642
7	2409	3.428	3.578	5.799	1.600	3.601
8	2445	5.660	4.428	3.940	3.212	4.310
9	2474	3.305	3.788	2.654	2.233	2.995
10	2544	4.018	4.926	5.190	2.724	4.215
11	2549	3.483	4.331	4.278	2.520	3.653
12	2569	3.689	2.630	4.978	2.311	3.402
13	2570	3.830	2.586	3.816	1.769	3.000
14	3130	6.823	4.449	4.032	6.808	5.528
15	3133	3.992	3.652	4.442	3.870	3.989
16	4643	3.373	4.145	3.754	2.147	3.355
17	1255	3.066	4.202	5.048	2.758	3.769
18	1309	3.659	3.142	3.526	2.879	3.302
19	1318	3.356	3.440	3.206	2.356	3.090
20	1370	3.342	3.433	3.366	2.614	3.189
21	1439	3.030	2.980	3.457	3.295	3.191
22	1452	4.689	4.653	4.966	1.889	4.049
23	1463	2.938	6.691	3.325	8.174	5.282
24	2550	3.280	3.165	3.160	2.205	2.953

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

No.	Plant	Rep I	Rep II	Rep III	Rep IV	Mean
25	2775	2.437	3.713	3.319	1.672	2.785
26	3012	3.426	3.082	4.749	3.292	3.637
27	3239	3.235	4.060	4.380	3.376	3.763
28	3862	6.074	3.376	3.109	2.613	3.793
29	4052	3.206	3.644	4.658	3.024	3.633
30	4053	2.944	3.519	3.556	2.558	3.144
31	4347	3.276	4.209	3.951	2.807	3.561
32	4539	3.331	3.177	2.921	2.095	2.881
33	4643	3.782	4.077	3.656	2.514	3.507
34	4656	3.267	3.219	3.485	2.942	3.228
35	4814	6.779	17.656	6.028	5.229	8.923
36	4821	6.272	5.493	5.757	4.843	5.591
37	4840	3.608	3.767	3.935	3.725	3.759
38	4893	4.142	5.577	3.740	2.830	4.072
39	4906	2.450	3.224	2.899	2.194	2.692
40	4913	5.068	5.233	5.169	4.230	4.925
41	4932	4.417	4.339	3.463	4.133	4.088
42	4943	3.408	3.055	3.379	4.095	3.484
43	4951	3.819	4.905	2.960	2.542	3.557
44	4978	3.093	2.962	3.757	2.621	3.108
45	5385	3.831	4.027	5.515	2.781	4.039
46	5483	4.038	3.316	9.222	3.286	4.966
47	5547	3.304	4.651	4.211	2.563	3.682
48	5614	5.522	7.970	6.555	4.761	6.202
49	5678	2.602	4.471	3.762	3.946	3.695

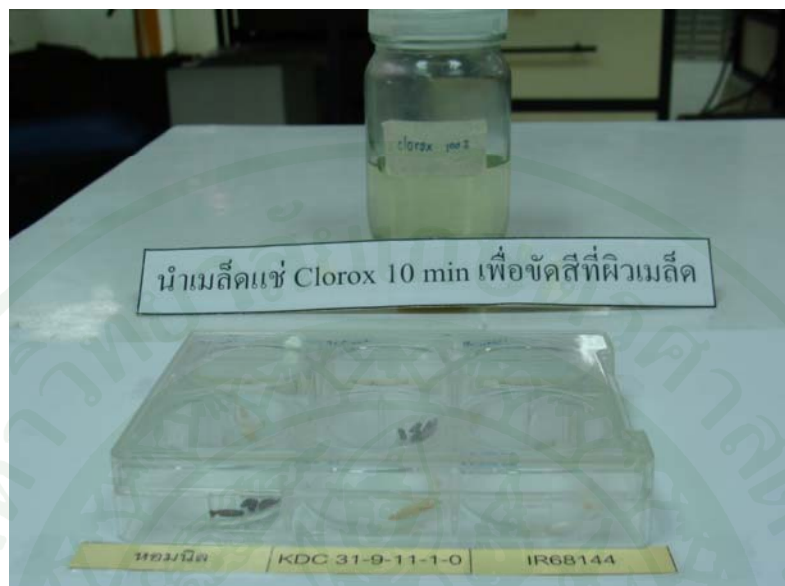
ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

No.	Plant	Rep I	Rep II	Rep III	Rep IV	Mean
50	5724	4.463	3.384	3.801	4.059	3.927
51	5727	3.624	3.374	4.386	3.461	3.711
52	5863	3.881	4.211	5.289	4.639	4.505
53	6138	6.375	5.112	5.841	3.580	5.227
54	6158	6.779	4.428	4.301	4.098	4.902
55	6162	3.294	3.312	4.243	4.232	3.770
56	6192	3.926	3.964	4.199	3.028	3.779
57	6198	4.154	4.126	4.977	3.650	4.227
58	6229	3.375	2.865	4.584	2.783	3.402
59	6285	3.447	3.703	3.954	4.425	3.882
60	6654	21.009	18.521	24.281	6.630	17.610
61	6679	4.031	4.523	4.163	3.707	4.106
62	6690	3.274	3.299	3.665	3.446	3.421
63	6693	4.793	4.467	5.626	5.723	5.152
64	6712	3.311	3.373	3.884	3.399	3.492
65	8684	2.841	2.405	1.972	2.058	2.319
66	8714	2.448	2.406	2.062	2.586	2.376
67	8754	2.485	2.570	3.198	2.310	2.641
68	8756	2.718	2.298	4.251	2.346	2.903
69	9002	2.864	4.069	2.889	1.575	2.849
70	9096	2.472	3.222	1.688	2.378	2.440
71	9396	3.287	2.243	2.092	1.712	2.334
72	9628	5.697	3.371	2.657	3.502	3.807
73	8097	4.907	5.631	4.001	2.610	4.287
74	8419	2.665	3.897	2.662	2.226	2.863

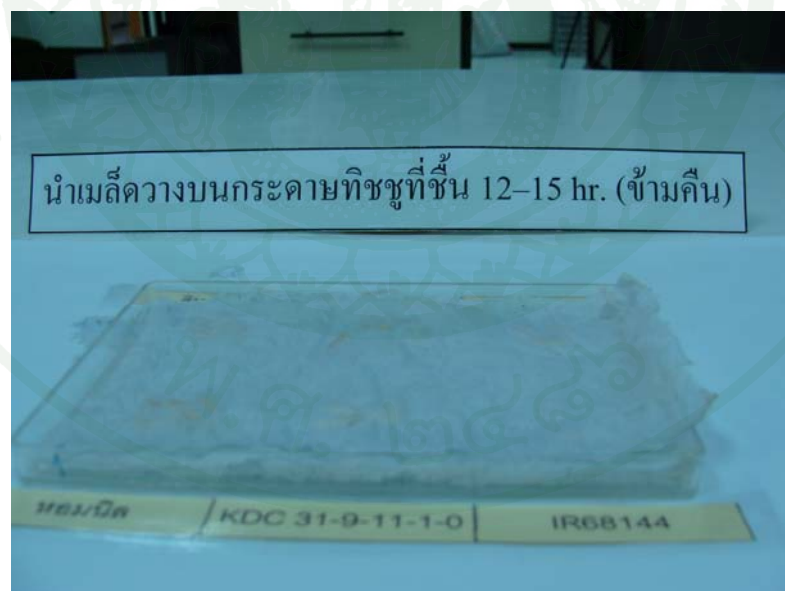
ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

No.	Plant	Rep I	Rep II	Rep III	Rep IV	Mean
75	10595	2.694	1.970	2.011	1.906	2.145
76	10599	2.904	2.513	2.414	2.415	2.562
77	10699	2.918	2.558	2.977	2.213	2.667
78	10796	2.661	2.350	2.246	2.789	2.512
79	10965	3.239	3.631	2.989	3.060	3.230
80	10997	2.801	2.343	2.131	2.227	2.376
81	11140	3.256	2.828	2.085	2.434	2.651
82	11152	3.159	2.743	2.215	2.153	2.568
83	11183	2.770	2.356	2.677	2.291	2.524
84	11205	2.774	3.028	2.876	3.288	2.992
85	11206	2.674	2.855	2.814	2.727	2.768
86	11219	2.768	3.413	2.918	2.172	2.818
87	11243	2.695	2.537	2.095	1.983	2.328
88	11356	2.407	2.572	2.114	2.576	2.417
89	11563	1.506	3.483	2.200	2.602	2.448
90	11582	2.342	3.118	2.287	2.215	2.491
91	11716	3.507	3.412	2.582	2.503	3.001
92	11925	4.089	3.312	2.718	2.336	3.114
93	11939	2.647	2.595	2.682	2.268	2.548
94	11940	2.903	2.253	2.433	1.888	2.369
95	11945	1.660	2.068	1.563	1.544	1.709
96	11965	2.268	2.510	3.222	1.892	2.473
97	11967	2.191	2.777	2.285	1.934	2.297

ขั้นตอนการวิเคราะห์หาความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดพันธุ์ควบคุม



ภาพผนวกที่ 1 แช่เมล็ดในน้ำยาฟอกขาว(clorox) 10 นาที เพื่อขจัดสีที่ผิวเมล็ด



ภาพผนวกที่ 2 นำเมล็ดวางในกระดาษทิชชูที่ชื้น 12 – 15 ชั่วโมง (ข้ามคืน) เพื่อให้เมล็ดนุ่ม



ภาพผนวกที่ 3 ผ่าเมล็ดตามแนวยาว แล้วแช่ staining solution

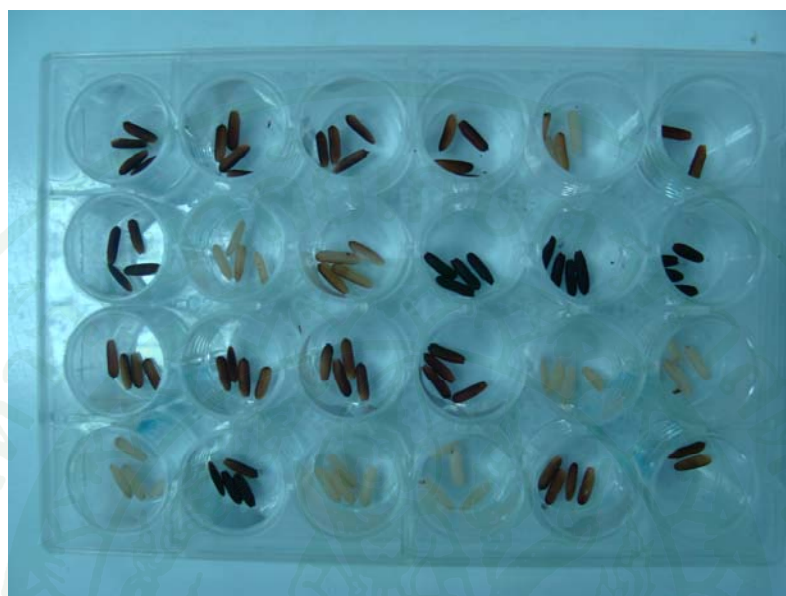


ภาพผนวกที่ 4 เมล็ดที่แช่ staining solution 30 นาทีแล้วล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง สังเกตการติดสีที่บริเวณ embryo



ภาพผนวกที่ 5 สังเกตการติดสีที่บริเวณ embryo ของข้าวพันธุ์ตรวจสอบ เพื่อเปรียบเทียบกับข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์

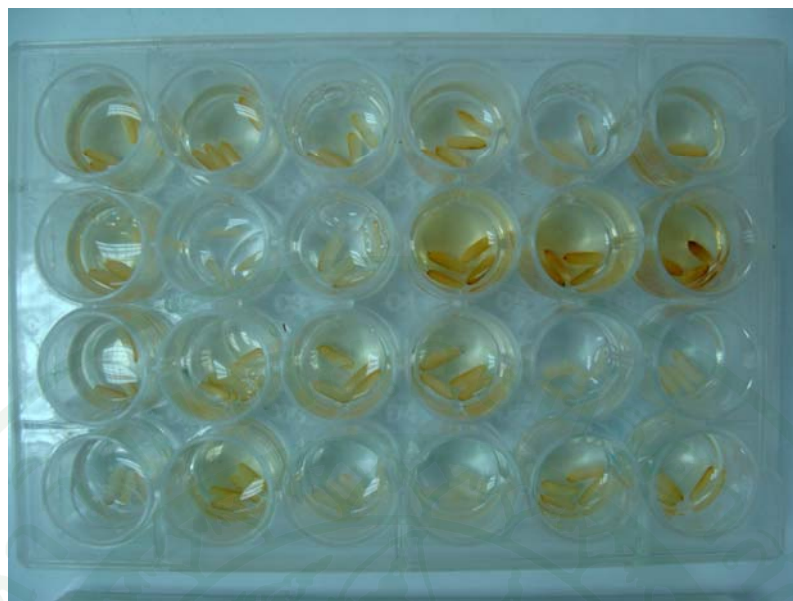
ขั้นตอนการวิเคราะห์หาความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ดพันธุ์ข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์
จำนวน 12,000 สายพันธุ์



ภาพผนวกที่ 6 นำเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิลกลายพันธุ์ ใส่ plate 24 well ตัวอย่างละ 4 เมล็ด



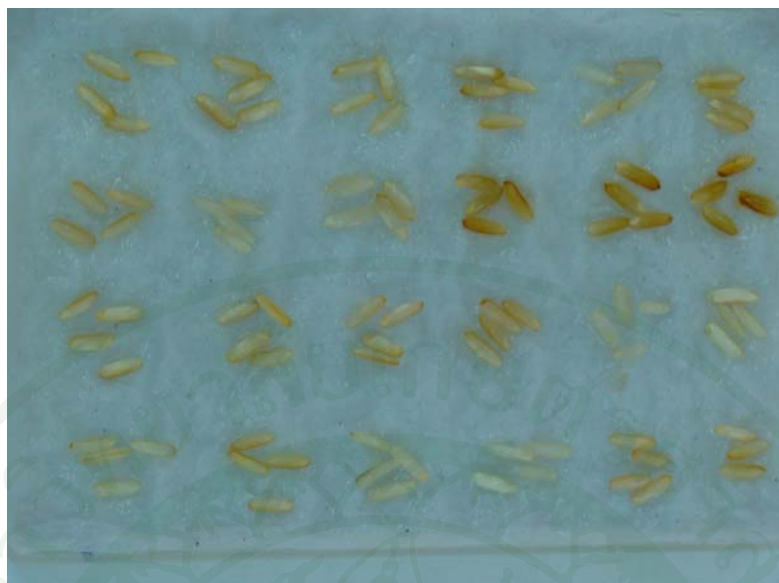
ภาพผนวกที่ 7 แช่เมล็ดด้วยน้ำยาฟอกขาว (Clorox) 10 นาที เพื่อขจัดสีผิวเมล็ด



ภาพผนวกที่ 8 หลังจากแช่น้ำยาฟอกขาว 10 นาที สีของผิวเมล็ดจะเป็นสีขาวหมดทุกเมล็ด



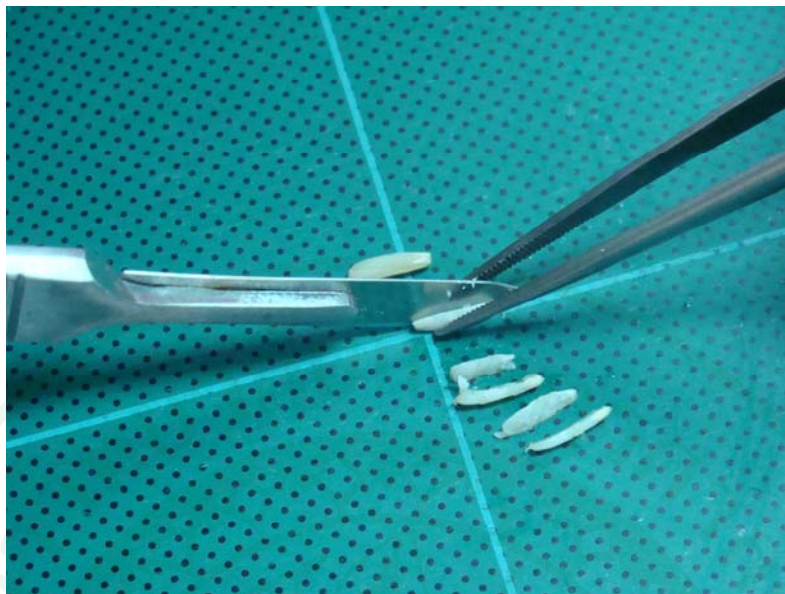
ภาพผนวกที่ 9 ล้างเมล็ดด้วยน้ำเปล่าเพื่อล้างน้ำยาฟอกขาวออก และนำเมล็ดวางบนกระดาษทิชชูที่ชื้น



ภาพผนวกที่ 10 วางเมล็ดบนกระดาษทิชชูที่ขึ้น



ภาพผนวกที่ 11 ปิดด้วยกระดาษทิชชู แล้วเติมน้ำให้ชุ่มอยู่ตลอดเวลา ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน



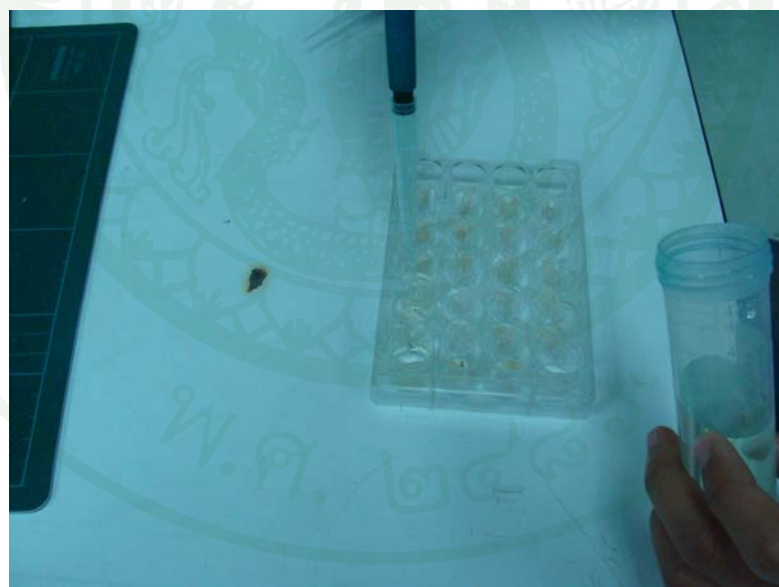
ภาพผนวกที่ 12 ผ่าเมล็ดตามยาว



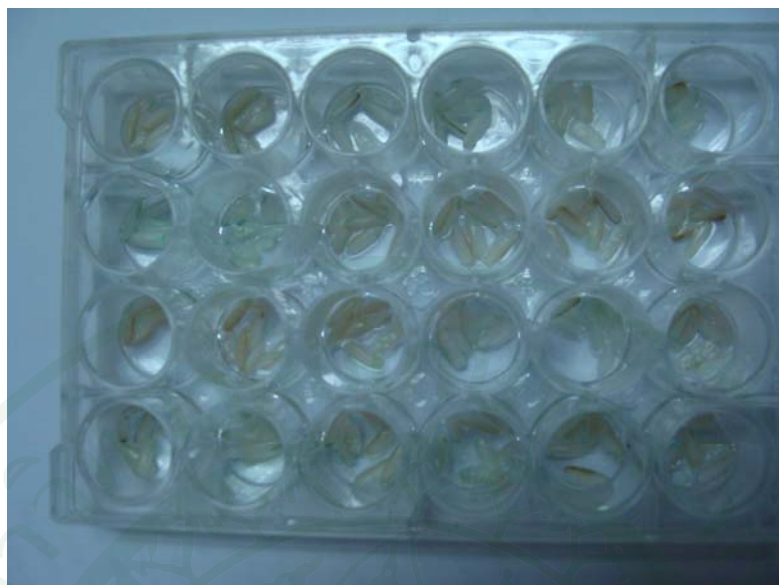
ภาพผนวกที่ 13 นำเมล็ดที่ผ่าแล้วใส่ plate 24 well



ภาพผนวกที่ 14 เตรียม staining solution ผสมกันระหว่าง 2 % hydrochloric acid กับ 2% potassium ferrocyanide



ภาพผนวกที่ 15 นำ staining solution ที่เตรียมใหม่ ใส่ในตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง



ภาพผนวกที่ 16 สังเกตการติดสีที่บริเวณ embryo เปรียบเทียบกับพันธุ์ตรวจสอบแล้วให้คะแนน

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวสุภาพร พรหมพันธุ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	30 กรกฎาคม พ.ศ. 2526
สถานที่เกิด	จังหวัดสุพรรณบุรี
ประวัติการศึกษา	จบปริญญาตรีจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	ผู้ช่วยนักวิจัย
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ข้าว (Cluster and Program Management Office : CPMO) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัด นครปฐม