การศึกษาการแก้ความเป็นหมันของเรณูระบบ WA-CMS ในข้าวไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

ยุวรัตน์ จันทสุข

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2563

การศึกษาการแก้ความเป็นหมันของเรณูระบบ WA-CMS ในข้าวไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

ยุวรัตน์ จันทสุข

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์
สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การศึกษาการแก้ความเป็นหมันของเรณูระบบ WA-CMS ในข้าวไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

ยุวรัตน์ จันทสุข

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์

พิจารณาเห็นชอบโดย **อาจารย์ที่ปรึกษา**

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ แสงทอง)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤษณะ ลาน้ำเที่ยง)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุพเยาว์ คบพิมาย)
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว .....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)
รองอธิการบดี ปฏิบัติการแทน
อธิการบดี มหาวิทยาลัยแม่โจ้
วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

ชื่อเรื่อง การศึกษาการแก้ความเป็นหมันของเรณูระบบ WA-CMS ในข้าวไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ
ชื่อผู้เขียน นางสาวยุวรัตน์ จันทสุข
ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รองศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต

บทคัดย่อ

การศึกษาความสามารถของยีนแก้ความเป็นหมัน ระบบ Wild Abortive Cytoplasmic male sterility (WA-CMS) ในข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และสุพรรณบุรี 1 ด้วยการจัดกลุ่มด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 ที่มีรายงานเป็นยีนแก้ความเป็นหมันของระบบ WA-CMS พบว่าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นสายพันธุ์รักษาความเป็นหมันของเรณู ส่วนพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เป็นสายพันธุ์แก้ความเป็นหมันของเรณู โดยการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะแก้ความเป็นหมันของเรณู ในประชากร F_2 ระหว่างพันธุ์เรณูเป็นหมัน IR58025A และพันธุ์สุพรรณบุรี 1 พบการกระจายตัวของเรณูปกติต่อเรณูเป็นหมันเป็น 3 ต่อ 1 แสดงว่าลักษณะแก้ความเป็นหมันของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ควบคุมด้วยยีนภายในนิวเคลียส 1 คู่ ซึ่งผลการทดสอบความมีอิทธิพลของยีนแก้หมันกับความมีชีวิตของเรณูด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) พบว่ายีนตำแหน่ง Rf4 คือ ยีน *PPR9* และ/หรือยีน *PPR10* มีอิทธิพลต่อการแก้หมันของเรณู ในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ผลการศึกษานี้ทำให้เห็นว่าข้าวไทยพันธุ์สุพรรณบุรี 1 มียีน *PPR9* และ/หรือ *PPR10* เป็นยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูในระบบ WA-CMS

คำสำคัญ : ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1, ระบบหมัน Wild Abortive Cytoplasmic male sterility (WA-CMS), ยีนแก้หมัน, เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Title RESTORATION MALE STERILITY STUDY OF WA-CMS IN THAI RICE USING DNA MARKERS

Author Miss Yuwarat Chantasuk

Degree Master of Science in Genetics

Advisory Committee Chairperson Associate Professor Dr. Saengtong Pongjaroenkit

ABSTRACT

Genetics of fertility restoration in wild abortive cytoplasmic male sterility (WA-CMS) was studied in Khao Dawk Mali 105 (KDML 105) and Suphan Buri 1 (SPR1) using DNA markers. The classification by Rf3 and Rf4 gene markers which were reported as WA-CMS restorer genes revealed that KDML 105 was maintainer (B-line) and SPR1 was restorer (R-line). The inheritance of fertility restoration study in F_2 population of IR58025AxSPR1 showed a segregation ratio of 3:1 for pollen fertility, indicating one nuclear dominant gene involved in fertility restoration. The analysis of an influence between the restorer genes and pollen fertility by ANOVA and regression revealed that *PPR9* and/or *PPR10* genes at Rf4 locus have influence to pollen fertility. Therefore *PPR9* and/or *PPR10* genes are male sterility restorer gene of WA-CMS in SPR1.

Keywords : Khao Dawk Mali 105, Suphan Buri 1, Wild Abortive Cytoplasmic Male Sterility (WA-CMS), Restorer gene, DNA markers

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นผลงานที่ผู้วิจัยมีความมุ่งมั่น ตั้งใจ ทุ่มเทกำลังกาย และกำลังใจในการทำจนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี วิทยานิพนธ์นี้จะไม่สำเร็จลุล่วงถ้าไม่ได้รับความเมตตา และการดูแลจากอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รองศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต ในการให้คำปรึกษา คำแนะนำการแก้ปัญหาต่าง ๆ ตลอดการทำวิจัยอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ แสงทอง ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษาในการปลูก การดูแลข้าว และให้ข้อมูลเพิ่มเติมอื่น ๆ เกี่ยวกับเรื่องข้าว และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤษณะ ลาน้ำเที่ยง ที่ให้ปรึกษาและคำแนะนำเกี่ยวกับเรื่องของสถิติการเลือกใช้วิธีการวิเคราะห์ โปรแกรมการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างยิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ บิดาและมารดา ที่ให้การเลี้ยงดู การดูแลเอาใจใส่ อบรมสั่งสอนเป็นอย่างดีเยี่ยม คอยสนับสนุน เป็นพลังใจ ให้คำปรึกษาในทุก ๆ เรื่องทั้งในด้านการใช้ชีวิต และการศึกษามาโดยตลอด

นอกจากนี้ขอขอบคุณนางสาวกนกวรรณ จันทร์เพ็ญ พี่สาวคนพิเศษที่คอยสอน ตักเตือน ให้คำปรึกษา ช่วยเหลือและดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดีมาก ในทุกๆ เรื่อง เริ่มตั้งแต่สอนในด้านวิชาการให้รู้จักอุปกรณ์ เทคนิคต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ สอนการใช้ชีวิตการวางตัวให้เป็นผู้ใหญ่มากขึ้น การดูแลผู้ที่อาวุโสกว่า การนึกถึงงานส่วนรวมมากกว่าส่วนตัว และอีกหลายๆ เรื่อง และขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ นักศึกษาในห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์โมเลกุล ที่คอยให้กำลังใจตลอดการทำวิจัยนี้

ยุวรัตน์ จันทสุข

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญรูปภาพ ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ 1

ที่มาและความสำคัญ 1

วัตถุประสงค์ 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ตรวจเอกสาร 4

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว 4

การจำแนกกลุ่มข้าว 6

ลูกผสม 7

การผลิตข้าวลูกผสม 8

ข้าวลูกผสมในประเทศไทย 9

จำแนกสายพันธุ์ข้าวไทย 10

การพัฒนาของเรณู 11

ระบบความเป็นหมัน 12

ปัจจัยที่ควบคุมความเป็นหมันของเรณูและยีนแก้ความเป็นหมัน 13

สาเหตุของความเป็นหมันของเรณูระบบ WA-CMS และการแก้หมัน 16

โปรตีน Pentatricopeptide repeat (PPR) 17
เครื่องหมายดีเอ็นเอในการปรับปรุงพันธุ์พืช 18
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 21
บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีการ 27
สารเคมี 27
อุปกรณ์ 27
เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการวิจัย 28
ตำแหน่งที่ตั้งของเครื่องหมายของยีนควบคุมลักษณะแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf3 30
ตำแหน่งที่ตั้งของเครื่องหมายของยีนควบคุมลักษณะแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf4 30
วิธีการทดลอง 32
สถานที่ทำการทดลอง 40
บทที่ 4 ผลการทดลอง และการอภิปราย 41
1. การจัดจำแนกกลุ่มของข้าวไทยในระบบ WA-CMS 41
2. การศึกษาลักษณะแก้ความเป็นหมันจากข้อมูลความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ด 44
3. การศึกษาจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ 53
4. การศึกษาการทำงานของยีนแก้หมันของเรณูและความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และลักษณะ ฟีโนไทป์ 61
บทที่ 5 สรุปผล และข้อเสนอแนะ 71
บรรณานุกรม 73
ประวัติผู้วิจัย 79

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ความแตกต่างที่สำคัญของข้าว Indica, Japonica และ Javanica 7

ตารางที่ 2 สายพันธุ์ข้าวของระบบความเป็นหมัน ยีน และโปรตีนแก้ความเป็นหมันของระบบ CMS 18

ตารางที่ 3 เครื่องหมายที่เกี่ยวข้องกับยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูตำแหน่ง Rf4 และ Rf3 ที่ใช้ในการศึกษา 29

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของการเตรียมปฏิกิริยาในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ 36

ตารางที่ 5 สภาวะในการทำ PCR 36

ตารางที่ 6 การจัดกลุ่มพันธุ์ข้าวด้วยความมีชีวิตของเรณูและการติดเมล็ด ของต้น F_1 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ข้าวที่ต้องการศึกษากับสายพันธุ์เรณูเป็นหมัน 39

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู และเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดของข้าวพันธุ์ IR58025A, ขาวดอกมะลิ 105, สุพรรณบุรี 1, F_1 (IR58025Axขาวดอกมะลิ 105) และ F_1 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ทั้ง 2 ฤดู (นาปรังปี 61 และนาปรังปี 62) 41

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู, เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด และการใช้เครื่องหมายที่จำเพาะและสัมพันธ์กับยีน *WA352* ตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 ทดสอบกับ IR58025A, ขาวดอกมะลิ105, F_1 และประชากร F_2 46

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู, เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด และการใช้เครื่องหมายที่จำเพาะและสัมพันธ์กับยีน *WA352* ตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 ทดสอบกับ IR58025A, สุพรรณบุรี1, F_1 และประชากร F_2 (นาปรังปี 61) 46

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู, เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด และการใช้เครื่องหมายที่จำเพาะและสัมพันธ์กับยีน *WA352* ตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 ทดสอบกับ IR58025A, สุพรรณบุรี1, F_1 และประชากร F_2 (นาปรังปี 62) 48

ตารางที่ 11 การกระจายตัวของจีโนไทป์ของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ทั้ง 2 ฤดู (นาปรังปี 61 และนาปรังปี 62) 62

ตารางที่ 12 การกระจายตัวของความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ดของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ทั้ง 2 ฤดู (นาปรังปี 61 และนาปรังปี 62) 64

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ ANOVA ของยีนตำแหน่ง Rf3 จากเครื่องหมาย RM3873 กับฟีโนไทป์ ของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ในฤดูนาปรังปี 61 และนาปรังปี 62..... 65

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ ANOVA ของยีนตำแหน่ง Rf4 คือ ยีน *PPR9* และ *PPR10* กับลักษณะ ฟีโนไทป์ ของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ในฤดูนาปรังปี 61 66

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ ANOVA ของยีนตำแหน่ง Rf4 ยีน PPR9 กับ PPR10 กับลักษณะฟีโนไทป์ ของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ในฤดูนาปรังปี 62..... 67

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ ANOVA ของยีนตำแหน่ง Rf4 คือ เฉพาะยีน PPR9 และ เฉพาะยีน PPR10 กับลักษณะฟีโนไทป์ของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ในฤดูนาปรังปี 62 68

ตารางที่ 17 เกณฑ์ความสัมพันธ์จากค่าสหสัมพันธ์ (Correlation; r) 69

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลักษณะของช่อดอก และดอกข้าวของข้าวสายพันธุ์ปกติ และสายพันธุ์ที่มีเรณูเป็นหมัน (male sterile)..... 6

ภาพที่ 2 ขั้นตอนการผลิตข้าวลูกผสมสามทาง..... 9

ภาพที่ 3 การพัฒนาเรณู (Pollen development)..... 12

ภาพที่ 4 การทำงานของยีนหมัน และยีนแก้หมันของระบบ WA-CMS..... 16

ภาพที่ 5 การใช้เครื่องหมาย SNP และเทคนิค ARMS-PCR..... 20

ภาพที่ 6 ตำแหน่งที่ตั้งของเครื่องหมายที่จำเพาะ และเครื่องหมาย SSR ที่สัมพันธ์กับยีนแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf3 บนโครโมโซมแท่งที่ 1 โดยตัวเลขในวงเล็บของเครื่องหมาย RM คือ ระยะห่างจากยีนตำแหน่ง Rf3..... 30

ภาพที่ 7 ตำแหน่งที่ตั้งของเครื่องหมายที่จำเพาะกับยีนแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf4 บนโครโมโซมแท่งที่ 10 โดยตัวเลขในวงเล็บของเครื่องหมาย RM คือ ระยะห่างจากยีน *PPR9*..... 31

ภาพที่ 8 ตำแหน่งที่ตั้งของเครื่องหมาย SSR ที่สัมพันธ์กับยีนแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf4 บนโครโมโซมแท่งที่ 10 โดยตัวเลขในวงเล็บของเครื่องหมาย RM คือ ระยะห่างจากยีน *PPR9*..... 31

ภาพที่ 9 การเรียงลำดับในเพลทที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอ และเพลทเจือจางดีเอ็นเอ..... 34

ภาพที่ 10 รูปแบบ และการเรียงลำดับของตัวอย่างที่ทำการศึกษาในเพลทพีซีอาร์..... 37

ภาพที่ 11 ตัวอย่างรูปแบบ และลำดับในการใส่ตัวอย่างในเจล 1 เจล โดยใช้ปิเปตแบบหลายช่อง..... 38

ภาพที่ 12 ลำดับที่ได้จากการใส่ตัวอย่างในเจลแบบใช้ปิเปตแบบหลายช่อง..... 38

ภาพที่ 13 ผล 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ RMS_PPR9-4..... 43

ภาพที่ 14 ความมีชีวิตของเรณู จากการย้อมด้วยสารละลาย I_2-KI ของข้าวพันธุ์ IR58025A, ขาวดอกมะลิ 105, F_1 (IR58025Axขาวดอกมะลิ 105) และตัวอย่างของประชากร F_2 จำนวน 6 ต้น..... 44

ภาพที่ 15 ความมีชีวิตของเรณู จากการย้อมด้วยสารละลาย I_2-KI ของข้าวพันธุ์ IR58025A, สุพรรณบุรี 1, F_1 และตัวอย่างของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ฤดูนาปรังปี 61 และนาปรังปี 62 จำนวน 12 ต้น 45

ภาพที่ 16 ผล 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ RMS_3_WA352 54

ภาพที่ 17 ผล 4 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ DRRM_RF3_10 54

ภาพที่ 18 ผล 4 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย RM315, RM3148 และ RM294 56

ภาพที่ 19 ผล 4 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ RM3148 57

ภาพที่ 20 ผล 4 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ RM3873 57

ภาพที่ 21 ผล 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วย ไพรเมอร์ RMS_PPR9-1 58

ภาพที่ 22 ผล 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ RMS_PPR9-4 59

ภาพที่ 23 ผล 2 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ PPR10 60

ภาพที่ 24 ผล 4 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ RM258 61

ภาพที่ 25 ความสัมพันธ์จากค่าสหสัมพันธ์ (Correlation; r) ระหว่างความมีชีวิตของเรณู กับการติดเมล็ดของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ฤดูนาปรังปี 61 69

ภาพที่ 26 ความสัมพันธ์จากค่าสหสัมพันธ์ (Correlation; r) ระหว่างความมีชีวิตของเรณู กับการติดเมล็ดของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ฤดูนาปรังปี 62 70

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ที่ประชากรเกือบ 40 เปอร์เซ็นต์ของโลกบริโภคเป็นอาหารหลัก จากหลักฐานทางโบราณคดีที่เกี่ยวกับข้าวในประเทศอินเดีย พบว่าข้าวมีอายุมากกว่า 1,500-1,000 ก่อนคริสตกาล ในการผลิตข้าวมีประเทศผู้ผลิตจำนวน 42 ประเทศ โดยมีประเทศจีนและอินเดีย เป็นประเทศหลักในการผลิตข้าว (Vijay and Roy, 2018) ซึ่งปัจจุบันประชากรมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ทำให้ความต้องการอาหารของโลกเพิ่มขึ้น 40 เปอร์เซ็นต์ แต่ทรัพยากรอาหารกลับมีปริมาณที่ลดลงไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค (Katara et al., 2017) จึงได้มีการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ให้มีผลผลิตดีขึ้น โดยนำเทคโนโลยีข้าวลูกผสมมาใช้เพื่อให้มีผลผลิตมากขึ้น เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค ซึ่งมีรายงานว่าข้าวลูกผสมให้ผลผลิตสูงกว่าข้าวพันธุ์ปลูกทั่วไป 15-20 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นผลทำให้มีการพัฒนาข้าวลูกผสมให้มีประสิทธิภาพและมีคุณภาพดี เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของประชากร (Ahangar, 2014)

การผลิตข้าวลูกผสมโดยใช้ระบบสามสายพันธุ์ (Three-line system) ซึ่งมีการใช้สายพันธุ์เรณูเป็นหมัน (A-line) ที่มีเรณูเป็นหมัน ทำหน้าที่เป็นต้นแม่ในการผลิตลูกผสม สายพันธุ์รักษาความเป็นหมัน (B-line) ที่มีเรณูปกติสามารถผสมตัวเองได้ แต่ไม่มียีนแก้ความเป็นหมัน ทำหน้าที่เป็นต้นพ่อในการผลิตเมล็ดสายพันธุ์เรณูเป็นหมัน และสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน (R-line) ที่มีเรณูที่ปกติและมียีนแก้ความเป็นหมัน มีหน้าที่แก้ความเป็นหมันให้กับสายพันธุ์เรณูเป็นหมัน (Katarae et al., 2017; พชระ, 2555; ดวงพร และคณะ, 2556) ซึ่งความเป็นหมันของเรณู มี 2 แบบ คือ ความเป็นหมันที่ควบคุมด้วยสภาพแวดล้อม (Environment-conditioned genetic male sterility; EGMS) และความเป็นหมันที่ควบคุมด้วยยีนในไซโทพลาซึม (Cytoplasmic male sterility; CMS) (Huang et al., 2014; กนกวรรณ, 2559)

ระบบ CMS เป็นระบบความเป็นหมันของเรณูที่ควบคุมด้วยยีนในไมโทคอนเดรีย ซึ่งอยู่ภายในไซโทพลาซึมและถ่ายทอดลักษณะเรณูเป็นหมันจากแม่ไปสู่ลูก สามารถแก้หมันได้ด้วยยีน restoring fertility *(Rf)* โดยเป็นยีนแก้ความเป็นหมันที่อยู่ในนิวเคลียส ระบบ CMS สามารถแบ่งได้เป็นหลายแบบ ตามพันธุ์ข้าวที่พบการเกิดความเป็นหมัน เช่น ระบบ WA-CMS (Wild abortive cytoplasmic male sterility) ความเป็นหมันได้มาจากข้าวป่า *Oryza rufipogon* (*O. rufipogon*) ระบบ BT-CMS ได้มาจากข้าวพันธุ์ Chinsurah Boro II (*indica*) และระบบ HL-CMS ได้มาจากข้าวป่า Red-awned (*O. rufipogon*) เป็นต้น (Nematzadeh and Kiani 2010; Cai, et al., 2013;

Huang et al., 2014, Seesang et al., 2014; Katara et al., 2017) จากงานวิจัยการผลิตข้าวลูกผสมของประเทศจีนที่ทำการผลิตข้าวลูกผสมเป็นพันธุ์การค้า 90 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ระบบข้าวลูกผสมที่ประเทศจีนใช้ คือ ระบบ WA-CMS และได้มีการศึกษาระบบนี้ในข้าว *indica* เป็นจำนวนมาก (Kiani, 2015)

การจำแนกกลุ่มของข้าวในระบบสามสายพันธุ์ทำได้โดยการสังเกตความสมบูรณ์ของเรณูและเมล็ดของลูกผสมระหว่างพันธุ์ที่ต้องการทดสอบกับพันธุ์เรณูเป็นหมัน จากการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะความเป็นหมันของเรณูระบบ WA-CMS ของประชากรข้าว F_2 จำนวน 10 คู่ผสม ด้วยการย้อมเรณูด้วยสารละลายไอโอดีนโพแทสเซียมไอโอไดด์ (I_2-KI) พบข้าว 6 คู่ผสมมีอัตราส่วนของเรณูปกติต่อเรณูเป็นหมันเป็น 15:1 แสดงว่ามียีนจำนวน 2 คู่ ที่ควบคุมลักษณะการแก้ความเป็นหมัน และพบข้าว 3 คู่ผสม มีอัตราส่วนของเรณูปกติต่อเรณูเป็นหมันเป็น 3:1 แสดงว่ามียีนจำนวน 1 คู่ ที่ควบคุมลักษณะการแก้ความเป็นหมัน จึงสรุปได้ว่า ยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูของระบบ WA-CMS ในแต่ละคู่ผสมที่ศึกษาจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์พ่อแม่ในแต่ละคู่ผสม (ดวงพร และคณะ, 2556)

นอกจากการจำแนกข้าวด้วยวิธีการย้อมเรณูของลูกผสมระหว่างพันธุ์ทดสอบกับพันธุ์เรณูเป็นหมัน ได้มีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจสอบยีนแก้หมันในข้าวแต่ละสายพันธุ์ ทำให้ทราบถึงการแก้ความเป็นหมันระบบ WA-CMS ที่ควบคุมด้วยยีน 2 ตำแหน่ง คือ ยีนตำแหน่ง Rf3 และยีนตำแหน่ง Rf4 โดยมีรายงานว่า เครื่องหมาย DRRM_RF3_10 (Suresh et al., 2012), RM315, RM443, RM1 และ RM3148 สัมพันธ์กับยีนตำแหน่ง Rf3 (Nematzadeh and Kiani, 2010; Kiani, 2015) สำหรับเครื่องหมาย RMS_PPR9-1, RMS_PPR9-4 (Pranathi et al., 2016), PPR10 (Pongjaroenkit, 2017) RM294 (Jing et al., 2001), RM171 (Nematzadeh and Kiani, 2010), RM258, RM6344, RM591, RM3123 (Kiani, 2015) และ RM6100 (Revathi et al., 2013) สัมพันธ์กับยีนตำแหน่ง Rf4

ในงานวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาการทำงานของยีนแก้หมันในระบบ WA-CMS ของข้าวไทยโดยนำข้อมูลจากการตรวจจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีรายงานว่าสัมพันธ์กับยีนแก้หมันตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 เปรียบเทียบกับข้อมูลทางฟีโนไทป์ที่ได้จากการย้อมเรณูและการติดเมล็ดเพื่อใช้ในการจัดจำแนกข้าวไทย ที่ทำการศึกษาว่าเป็นข้าวสายพันธุ์รักษาความเป็นหมัน (B-line) หรือสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน (R-line) เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวลูกผสมในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการทำงานของยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูในข้าวไทย

2. เพื่อจำแนกข้าวไทยว่าเป็นสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน (R-line) หรือสายพันธุ์รักษาความเป็นหมัน (B-line)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ข้อมูลการทำงานของยีนแก้ความเป็นหมันของเรณู และกลุ่มของข้าวไทยที่ศึกษาว่าเป็นสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน (R-line) จะเป็นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไทยพันธุ์ดีให้เป็นข้าวลูกผสมต่อไป

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

ข้าว (*Oryza sativa* L.; *O. sativa* L.) จัดอยู่ในสกุลออไรซา (Genus *Oryza*) ของวงศ์เกรมินี (Family Paoceae หรือ Gramineae) มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด เป็น 24 แท่ง (2n=24) จัดเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของโลก เนื่องจากเป็นแหล่งพลังงาน ข้าวสามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนและเขตอบอุ่น โดยเฉพาะแถบทวีปเอเชีย (บุญหงส์, 2547; ศุภนาถ, 2560)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว

1. ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ (บุญหงส์, 2547)

1.1 ราก (root) เป็นระบบรากฝอย (fibrous root system) ประกอบด้วยราก 2 ชนิด ได้แก่ รากที่งอกมาจากเรดิเคิล (radicle) เป็นรากชั่วคราว มีลักษณะโคนโตและปลายเรียว ทำหน้าที่รองรับส่วนต่างๆ ของต้นข้าวให้ทรงตัว เป็นรากปฐมภูมิ (primary root) เรียกว่ารากแรกเกิด (seminal root) รากอีกชนิดหนึ่งเป็นรากทุติยภูมิ (secondary root) จะงอกออกมาจากส่วนข้อของลำต้นใหม่ เป็นรากที่ทดแทนรากแรกเกิดเมื่อต้นข้าวเจริญเติบโต เรียกว่า รากเสริม (adventitious root)

1.2 ลำต้น (stem) ลำต้นเป็นทรงกลม กลวงบริเวณส่วนกลางและแบ่งเป็นปล้อง (internode) มีจำนวนปล้องประมาณ 20-30 ปล้อง มีข้อ (node) กั้นระหว่างปล้อง ซึ่งบริเวณข้อ จะมีตา (bud) ข้อละ 1 ตา ความสูงของต้นอยู่ระหว่าง 100-200 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวและสภาพแวดล้อม เมื่อต้นข้าวสมบูรณ์จะมีการแตกกอ (tillering) เป็นข้าวต้นใหม่จากบริเวณตา

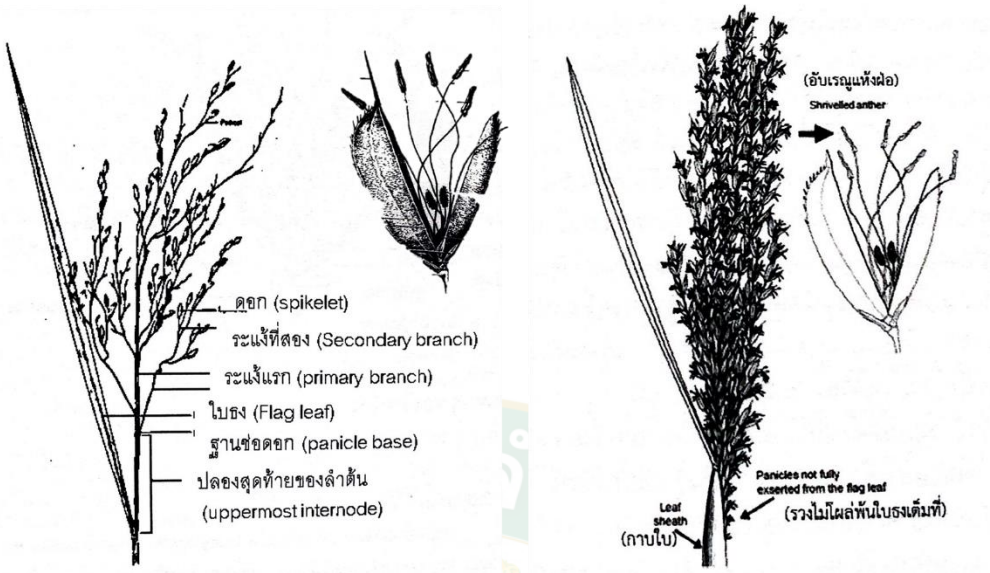
1.3 ใบ (leaf) จัดเป็นใบเดี่ยว (simple leaf) เป็นใบแท้ มีลักษณะเป็นแผ่นแบนบางค่อนข้างยาว ประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ ตัวใบ (leaf blade) ยื่นออกจากลำต้น ทำมุมกว้างหรือแคบขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ เส้นใบของข้าวจะขนานกันตั้งแต่โคนถึงปลายใบ และมีเส้นกลางใบ (midrib) แบ่งใบข้าวออกเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กัน อีกส่วนหนึ่ง คือ กาบใบ (leaf sheath) มีข้อต่อใบ (leaf collar) แบ่งตัวใบและกาบใบให้แยกออกจากกัน กาบใบทำหน้าที่ ลำเลียงน้ำและอาหารจากรากไปยังลำต้นและบริเวณใบ จากนั้นใบทำหน้าที่สังเคราะห์แสงจากใบไปยังส่วนต่างๆ ของต้น

2. ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ ส่วนที่ใช้ในการขยายพันธุ์ คือ เมล็ด เมล็ดนั้นได้จากการผสมระหว่างเรณูและเกสรเพศเมียที่ผสมกันภายในดอก และพัฒนาต่อจนได้เป็นเมล็ด

2.1 ช่อดอกหรือรวงข้าว (inflorescence or panicle) เกิดจากดอกข้าว (spikelets) รวมกันหลายๆ ดอก เกิดเป็นช่อติดอยู่บนแขนง (branches) ที่แตกออกไปจากแกนกลางของช่อดอก เมื่อเกิดการผสมระหว่างเรณูและเกสรเพศเมียภายในดอก จะมีการพัฒนาเป็นเมล็ดภายในดอก เรียกช่อดอกที่พัฒนาไปเป็นเมล็ดว่า รวงข้าว ประกอบด้วย ส่วนล่างสุดของรวงข้าวเรียกว่า ฐานรวง (panicle base or neck) ลักษณะเป็นวงแหวนสีขาวเป็นจุดกำเนิดของแขนงลำดับที่หนึ่ง (primary branch) และมีการแตกแขนงลำดับที่สอง (secondary branch) และแขนงลำดับที่สาม (tertiary branch)

2.2 ดอกข้าว (spikelet) ประกอบด้วย กลีบดอกใหญ่ (lemma) และกลีบดอกเล็ก (palea) สองส่วนนี้จะประสานกัน เฉพาะบริเวณส่วนฐานซึ่งติดอยู่กับก้านสั้นๆ เรียกว่า ขั้วดอก (rachilla) บริเวณปลายของกลีบดอกใหญ่มีลักษณะแหลมยื่นออกมาก เรียกว่า หาง (awn) ซึ่งในข้าวป่าจะมีหางยาว แต่พันธุ์ปลูกจะไม่มีหางหรือหางสั้นมาก ภายในดอกข้าวแต่ละดอก ประกอบด้วยเกสรเพศผู้ (stamen) จำนวน 6 อัน มีลักษณะเป็นกระเปาะสีเหลือง เรียกว่า อับเรณู (anther) ซึ่งบรรจุเรณูขนาดเล็กจำนวนมาก อับเรณูจะติดอยู่บนก้านชูเรณู (filament) เชื่อมติดกับฐานรองดอก ส่วนเกสรเพศเมีย (pistil) ประกอบด้วยยอดเกสรเพศเมีย (stigma) ทำหน้าที่รองรับเรณู มีลักษณะคล้ายขนนก 2 อัน อยู่บนก้านเกสรเพศเมีย (style) เชื่อมติดกับรังไข่ (ovary) ภายในรังไข่ จะมีไข่ (ovule) เมื่อได้รับการผสมจะมีการพัฒนาไปเป็นเมล็ด

ดอกข้าว จัดให้เป็นดอกสมบูรณ์เพศ (perfect flower) ที่มีการผสมตัวเอง (self-pollination) เนื่องจากมีเรณูและเกสรเพศเมียอยู่ในดอกเดียวกัน การผสมตัวเองเกิดในช่วงเช้าก่อนที่กลีบดอกจะบาน โดยการบานของกลีบดอกจะเริ่มบานจากปลายช่อดอกมาสู่โคนช่อดอก จะมีการผสมเกสรภายใน 7 วัน ส่วนดอกที่ได้รับการผสมแล้วใช้เวลาประมาณ 30 วัน ในการพัฒนาเป็นเมล็ด ในแต่ละรวงอาจมีเมล็ดประมาณ 100-200 เมล็ด สำหรับข้าวที่เป็นหมันในระบบไซโทพลาซึมจะมีลักษณะของเรณูจะฝ่อ คอรวงจะสั้นรวงจึงไม่โผล่พ้นใบธง ดังภาพที่ 1



สายพันธุ์ปกติ สายพันธุ์ที่มีเรณูเป็นหมัน

ภาพที่ 1 ลักษณะของช่อดอก และดอกข้าวของข้าวสายพันธุ์ปกติ และสายพันธุ์ที่มีเรณูเป็นหมัน (male sterile)
ที่มา : พิชญสิณี (2558)

2.3 เมล็ด (seed) ประกอบด้วย ส่วนที่เป็นแป้ง และคัพภะ (endosperm) เมล็ดหุ้มด้วยเยื่อหุ้มชั้นนอก (pericarp) เยื่อหุ้มชั้นกลาง (seed coat and nucellus) และเยื่อหุ้มชั้นใน (aleurone layer) ที่พัฒนาขึ้นมาหลังจากเกิดการผสมระหว่างเรณูและเกสรเพศเมีย โดยรังไข่จะกลายเป็นแป้ง และไข่กลายเป็นคัพภะ ทั้งสองส่วนนี้เป็นส่วนของเมล็ดข้าว จะมีเปลือกที่มาจากกลีบดอกหุ้มอยู่ ซึ่งเรียกทั้งเมล็ดนี้ว่า ข้าวเปลือก (paddy)

การจำแนกกลุ่มข้าว

การจำแนกกลุ่มข้าว อาศัยความรู้ด้านอนุกรมวิธาน โดยใช้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว แบ่งกลุ่มข้าว ได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ *O. sativa* L. เป็นข้าวที่ปลูกกันทั่วไปในส่วนต่างๆ ของโลก *O. glaberrima* Strud ปลูกเฉพาะในแอฟริกา และข้าวป่าที่พบตามธรรมชาติ เช่น *O. perenis* และ *O. rufipogon* ข้าวป่าเป็นแหล่งทรัพยากรที่สำคัญ เนื่องจากมีลักษณะต้านทานต่อโรค และแมลง จึงมีการนำข้าวป่ามาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ เช่น การพัฒนาข้าวปลูกที่มีความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยการนำข้าวป่า ผสมกลับไปยังข้าวพันธุ์ปลูก เพื่อทำให้ข้าวพันธุ์ปลูกมีลักษณะที่ต้านต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (บุญหงส์, 2547) นอกจากข้าวป่าจะเป็นแหล่งพันธุกรรมของ

ลักษณะต้านทานโรคและแมลงแล้ว ยังเป็นแหล่งของยีนควบคุมความเป็นหมันของเรณู ที่ใช้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวลูกผสมอีกด้วย (Li et al., 2007)

นอกจากนี้ข้าว *O. sativa* ยังสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ข้าว *Indica*, *Japonica* และ *Javanica* จำแนกโดยการอาศัยลักษณะภายนอกที่สำคัญ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความแตกต่างที่สำคัญของข้าว *Indica*, *Japonica* และ *Javanica*

ลักษณะ	ชนิดของข้าว		
	Indica	*Japonica*	*Javanica*
ใบ	สีเขียวอ่อนและกว้าง	สีเขียวเข้มและแคบ	สีเขียวอ่อน กว้าง และแข็ง
ต้น	ต้นสูงและอ่อน	ต้นเตี้ยและแข็ง	ต้นสูงและแข็ง
การแตกกอ	มาก	ปานกลาง	น้อย
เมล็ด	ยาวและค่อนข้างแบน	สั้นและค่อนข้างกลม	กว้างและหนา
หางของเมล็ด	ส่วนใหญ่ไม่มีหาง	ไม่มีหางจนถึงหางยาว	ไม่มีหางหรือหางยาว
ขนบนเปลือกข้าว	สั้นและน้อย	ยาวและมาก	ยาว
การร่วงของเมล็ด	ร่วงง่าย	ร่วงยาก	ร่วงยาก
ความแข็งของเนื้อเยื่อ	อ่อน	แข็ง	แข็ง
การตอบสนองต่อช่วงแสง	แตกต่างกันในระดับการตอบสนองต่อช่วงแสง	แตกต่างกันในระดับการตอบสนองต่อช่วงแสง	ตอบสนองต่อช่วงแสงเพียงเล็กน้อย

ที่มา: บุญหงส์ (2547)

ลูกผสม

ลูกผสม (hybrid variety) คือ ลูกผสมชั่วแรกที่ได้จากการผสมระหว่างเรณูจากต้นพ่อและเกสรเพศเมียจากต้นแม่ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ซึ่งพ่อแม่อาจเป็นพันธุ์แท้ (inbred line) หรือไม่ใช่พันธุ์แท้ ชนิดของลูกผสมมีดังนี้ (วันชัย, 2542)

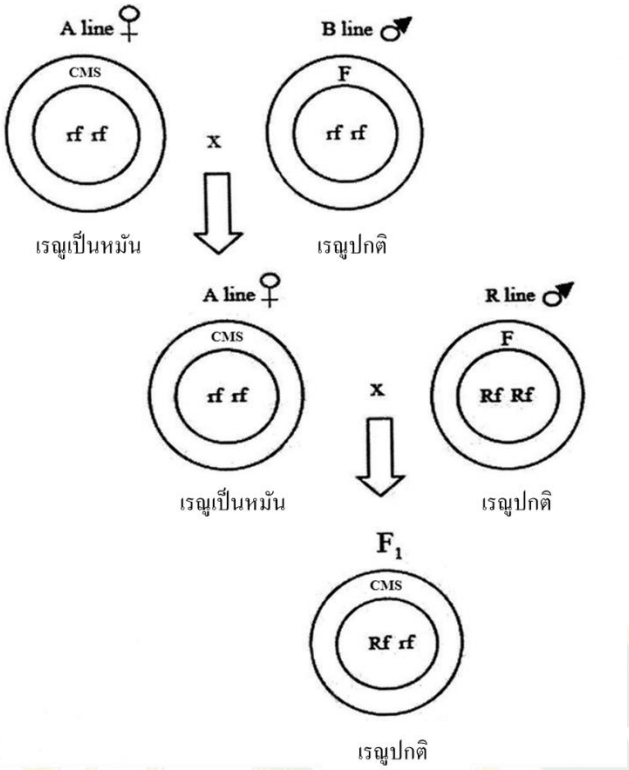
ลูกผสมเดี่ยว (single cross hybrid) เป็นลูกผสมชั่วแรกที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์แท้ (inbred line) 2 สายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม เนื่องจากมีความดีเด่นของลูกผสม (hybrid vigour) สูง มีความสม่ำเสมอของลักษณะต่างๆ แต่มีข้อเสีย คือ ผลผลิตและคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ต่ำกว่าลูกผสมแบบอื่น แต่มีวิธีแก้ไขโดยใช้สายพันธุ์แท้ที่มีความใกล้เคียงกันมาผสมกันเพื่อสร้างสายพันธุ์แม่ (A_1xA_2) ส่วนพันธุ์พ่อซึ่งอาจสร้างจากการผสมสายพันธุ์แท้ที่แตกต่างกันแต่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (B_1xB_2) หรืออาจใช้สายพันธุ์แท้ โดยวิธีนี้ เรียกว่า ลูกผสมเดี่ยวประยุกต์ (modified single-crosses) ทำให้ได้ผลผลิตของเมล็ดลูกผสมมากกว่าวิธีเดิม

ลูกผสมคู่ (double cross) เป็นลูกผสมที่มาจากสายพันธุ์แท้ 4 สายพันธุ์ ลูกผสมชั่วแรกเกิดจากการผสมระหว่างลูกผสมเดี่ยว 2 พันธุ์ ซึ่งผลผลิตของลูกผสมคู่ไม่มีความสม่ำเสมอของลักษณะต่างๆ เท่ากับลูกผสมเดี่ยว

ลูกผสมสามทาง (three-way cross) เป็นลูกผสมที่มาจากการผสมระหว่างลูกผสมเดี่ยว ผสมกับพันธุ์แท้หนึ่งสายพันธุ์ นิยมใช้ต้นแม่ที่เป็นลูกผสมเดี่ยว ลูกผสมสามทางมีข้อดี คือ ผลผลิตของลูกผสมสามทางไม่ด้อยกว่าลูกผสมเดี่ยวมากนัก และยังใช้ต้นทุนในการผลิตน้อยกว่าและผลิตได้ง่ายกว่า

การผลิตข้าวลูกผสม

ข้าวลูกผสม เป็นข้าวที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์แท้ 2 พันธุ์ ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม โดยลูกผสมชั่วที่ 1 ให้ลักษณะทางปริมาณหรือทางคุณภาพที่ดีขึ้นกว่าพ่อแม่ ในการผลิตข้าวลูกผสม จะใช้แรงงานในการกำจัดเรณูในต้นแม่ ทำให้มีต้นทุนในการผลิตสูง ประเทศไทยจึงมีการใช้เทคโนโลยีลูกผสมสามทาง ซึ่งเป็นการใช้ข้าว 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่มีเรณูเป็นหมัน (A-line) ในไซโทพลาซึม และไม่มียีนแก้ความเป็นหมันในนิวเคลียส มีจีโนไทป์เป็น CMS(*rfrf*) สามารถสร้างด้วยการนำพันธุ์แท้ผสมกลับไปหาพันธุ์ที่มีเรณูเป็นหมันจำนวน 6-9 ชั่ว สายพันธุ์ที่รักษาความเป็นหมัน (B-line) เป็นข้าวที่มีลักษณะเหมือนกับสายพันธุ์เรณูเป็นหมัน ยกเว้นไม่มียีนหมันของเรณูในไซโทพลาซึมมีจีโนไทป์เป็น F(*rfrf*) ที่จะนำมาใช้ในการผลิตเมล็ดสายพันธุ์เรณูเป็นหมัน โดยนำสายพันธุ์รักษาความเป็นหมัน มาผสมกับสายพันธุ์เรณูเป็นหมัน และสายพันธุ์ที่แก้ความเป็นหมัน (R-line) เป็นสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน (restorer gene) ในนิวเคลียสมีจีโนไทป์เป็น F(*RfRf*) ดังภาพที่ 2 หรือได้จากการเปลี่ยนพันธุ์แท้ที่ต้องการ โดยการผสมพันธุ์แท้ที่ต้องการเปลี่ยนกับลูกผสมของสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน กับพันธุ์เรณูเป็นหมัน จะได้ลูกที่มีเรณูปกติ และเป็นหมันอย่างละครึ่ง จากนั้นนำพันธุ์ที่ต้องการเปลี่ยน ผสมกลับกับลูกที่มีเรณูปกติ จำนวน 6-9 ชั่ว จนได้สายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์พ่อที่ใช้ในการผลิตข้าวลูกผสม (หยวน, 2533; บุญหงส์, 2547; กรมการข้าว, ม.ป.ป.)



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการผลิตข้าวลูกผสมสามทาง
ที่มา: พชระ (2555)

ข้าวลูกผสมในประเทศไทย

ประเทศไทยเริ่มทำการวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวลูกผสม เมื่อปี พ.ศ. 2511 โดยกรมการข้าว ได้นำข้าวสายพันธุ์เรณูเป็นหมัน และข้าวลูกผสมจากสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ และจากสาธารณรัฐประชาชนจีน เพื่อใช้ในการพัฒนาลูกผสมสามทาง พบว่าสายพันธุ์ข้าวที่นำเข้าจากต่างประเทศไม่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมของประเทศไทย จึงได้ทำการพัฒนาสายพันธุ์ความเป็นหมันในไซโทพลาซึม (CMS) ด้วยการทดสอบและคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความเป็นหมันจากข้าวไทยพันธุ์ดี ให้ผลผลิตสูง โดยเน้นให้ลูกผสมมีคุณภาพเมล็ดดีเหมือนข้าวไทย ในปี พ.ศ. 2537 พบว่า มีข้าวลูกผสม 2-3 สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงกว่าข้าวพันธุ์ดี เช่น คู่ผสม RD21A-23xRD11 ให้ผลผลิตสูงถึง 1,264 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งสูงกว่าพันธุ์ชัยนาท 1 และสุพรรณบุรี 1 แต่เกณฑ์ในการผลิตเมล็ดข้าวลูกผสมอยู่ในระดับต่ำมาก (บริบูรณ์, 2550 อ้างโดย วิบูล, 2555) ทำให้ราคาเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสมมีราคาแพงมากเช่นกัน จึงต้องหาวิธีการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวให้ใช้เมล็ดน้อยลง เพื่อคุ้มกับการลงทุน (นิตยา และคณะ, 2552 อ้างโดย วิบูล, 2555) โดยวัตถุประสงค์ของโครงการผลิตข้าวลูกผสมในประเทศไทย คือ การสร้างสายพันธุ์ข้าวสำหรับการผลิตข้าวลูกผสมให้เหมาะกับประเทศไทย การสร้างสายพันธุ์ข้าวลูกผสม

ให้มีผลผลิตเฉลี่ยสูงกว่า 1,000 กิโลกรัมต่อไร่ และ การศึกษาวิธีผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมให้ได้ 160-200 กิโลกรัมต่อไร่

ในปัจจุบันมีพันธุ์ข้าวลูกผสมที่กรมการข้าวได้รับรองพันธุ์ จำนวน 2 พันธุ์ คือ ข้าวเจ้าลูกผสม พันธุ์ กขผ1 เป็นข้าวเจ้าลูกผสม ผลิตโดยใช้วิธี ลูกผสมสามทาง โดยมีสายพันธุ์แม่ที่ให้ความเป็นหมันของเรณู (A-line) คือ IR79156A ของ IRRI สายพันธุ์รักษาความเป็นหมัน (B-line) คือ IR79156B และสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน (R-line) คือ JN29-PTT-43-1-5-5-1-3-1R เริ่มปลูกทดสอบเพื่อดูความดีเด่นเหนือพ่อแม่ เมื่อปี พ.ศ. 2549 และ พ.ศ. 2554 จึงได้รับรองพันธุ์จากกรมการข้าว โดยข้าวเจ้าลูกผสม กขผ1 เป็นข้าวเจ้าไม่ไวต่อช่วงแสง ให้ผลผลิตเฉลี่ย 1,006 กิโลกรัมต่อไร่ ซึ่งสูงกว่าพันธุ์ปทุมธานี 1 และสุพรรณบุรี 1 ร้อยละ 51 และ 23 ตามลำดับ ส่วนข้าวลูกผสมอีกพันธุ์ คือ ข้าวเจ้าลูกผสม ซีพี 304 เป็นพันธุ์ข้าวลูกผสมที่พัฒนามาจากบริษัท เจริญโภคภัณฑ์เมล็ดพันธุ์ จำกัด เริ่มพัฒนาตั้งแต่ พ.ศ. 2548-2553 ได้รับรองพันธุ์เมื่อปี พ.ศ. 2554 เจ้าลูกผสม ซีพี 304 เป็นข้าวเจ้าไม่ไวต่อช่วงแสง ให้ผลผลิตเฉลี่ย 938 กิโลกรัมต่อไร่ (สำนักวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าว, 2554 อ้างโดยวิบูล, 2555) นอกจากนี้บริษัท เจริญโภคภัณฑ์เมล็ดพันธุ์ จำกัด ได้พัฒนาข้าวลูกผสม ซีพี 388 เหมาะสำหรับพื้นที่ภาคเหนือ และซีพี 357 ที่มีลักษณะพิเศษ คือเมล็ดนุ่มคล้ายข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (มูลนิธิชีววิถี, 2551; ยุพิน, 2553 อ้างโดยวิบูล, 2555)

จำแนกสายพันธุ์ข้าวไทย (พชระ, 2555; ภวพร, 2555; สุวิทย์, 2555 อ้างโดย กนกวรรณ, 2559)

จากข้อมูลข้างต้นในการผลิตข้าวลูกผสม 3 ทาง มีการใช้ข้าว 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์เรณูเป็นหมัน (A-line) สายพันธุ์รักษาความเป็นหมัน (B-line) และสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน (R-line) ซึ่งในประเทศไทยมีข้าวพันธุ์ดีหลากหลายสายพันธุ์ จึงมีการจำแนกสายพันธุ์ของข้าวไทยด้วยวิธีการย้อมเรณูของลูกผสม F_1 ที่ได้มาจากการผสมระหว่างข้าวพันธุ์ A กับข้าวพันธุ์ดีของไทย โดยใช้สารละลาย I_2-KI ซึ่งผลการจำแนกข้าวไทยเป็นกลุ่มรักษาความเป็นหมัน และกลุ่มแก้หมัน เพื่อนำไปเป็นทางเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวลูกผสม ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่า สามารถจำแนกข้าวไทยได้ดังนี้

กลุ่มรักษาความเป็นหมัน (B-line) ได้แก่ ข้าวพันธุ์ กข6, กข15, กข21, กข33, เหลืองประทิว 123, หอมชลสิทธิ์, เจ้าหอมนิล, หอมสุพรรณบุรี, หอมมะลิแดง, มะลิโกเมนสุรินทร์, นางมลเอส-4, ปิ่นแก้ว 56,ดอกพะยอม, ขาวใหญ่, สินเหล็ก, เล็บมือนาง 111, ขาวตาแห้ง 17, แปดริ้ว, สกลนคร, สุพรรณบุรี 3, สุพรรณบุรี 60, สุพรรณบุรี 80 และขาวดอกมะลิ 105

กลุ่มแก้ความเป็นหมัน (R-line) ได้แก่ ข้าวพันธุ์ กข47, ปราจีนบุรี 2, พลายงามปราจีนบุรี, ปทุมธานี 1, ปทุมธานี 80, หรือ กข31, พิษณุโลก 2, พิษณุโลก 60, ชิวแม่จันทร์, เข็มทองพัทลุง, เล็บ

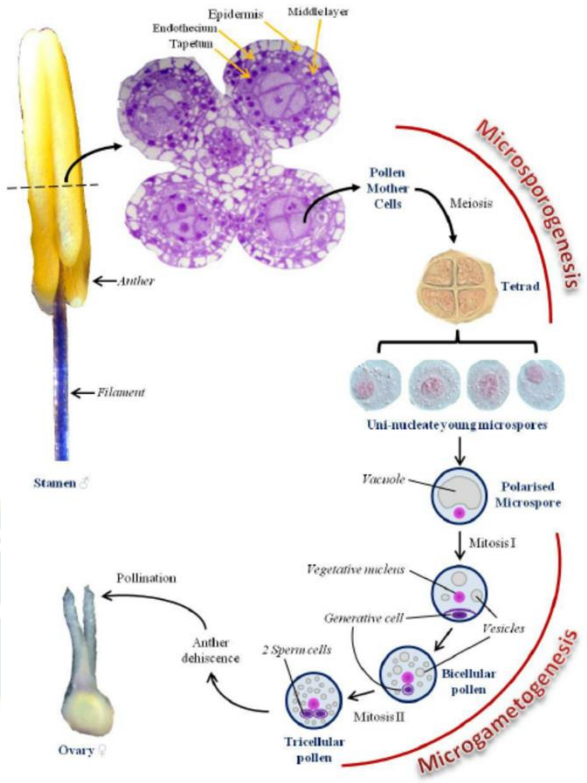
นก,เล็บนกปัตตานี, ลูกแดงปัตตานี, สังข์หยดพัทลุง, ชัยนาท 1, สุพรรณบุรี 1, สุพรรณบุรี 2 และสันป่าตอง 1

การพัฒนาของเรณู

การพัฒนาของเรณู (Pollen development) สร้างขึ้นภายในอับเรณู (anther) ของดอก การพัฒนาของเรณู แบ่งเป็น microsporogenesis และ microgametogenesis ทั้ง 2 ระยะนี้เป็นการสร้าง mature microgametophytes (University of Leicester, no date)

Microsporogenesis เป็นการสร้างไมโครสปอร์ (microspores) เริ่มจาก microsporocyte (pollen mother cell) ซึ่งมีโครโมโซมจำนวน 2 ชุด เข้าสู่การแบ่งเซลล์ไมโอซิส (meiosis) ได้เป็นเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมจำนวน 1 ชุด (haploid) จำนวน 4 เซลล์ แต่ละเซลล์จะพัฒนาไปเป็นไมโครสปอร์

Microgametogenesis เป็นการพัฒนาต่อจาก microsporogenesis เริ่มจากไมโครสปอร์สร้างแวคิวโอล (vacuole) ขนาดใหญ่ขึ้น ได้เป็น polarized microspore หรือ unicellular pollen ที่เข้าสู่การแบ่งเซลล์ไมโทซิส (mitosis) ครั้งที่ 1 ได้เป็น Bicellular pollen ภายในเซลล์ประกอบไปด้วย vegetative nucleus และ generative cell จากนั้นเข้าสู่การแบ่งเซลล์ไมโทซิส ครั้งที่ 2 ได้เป็น tricellular pollen จะมีการแบ่งของ generative cell ได้เป็น sperms cell จำนวน 2 เซลล์ (University of Leicester no date) ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การพัฒนาเรณู (Pollen development)
ที่มา: Franchi et al. (1984)

จากการศึกษางานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า เรณูที่มีความผิดปกติของระบบ WA-CMS เกิดขึ้นในระยะที่มี 1 นิวเคลียส (uninucleate stage) หรือ unicellular pollen ในส่วนของความผิดปกติของเรณูของระบบ HL-CMS เกิดขึ้นในระยะที่มี 2 นิวเคลียส (binucleate stage) หรือ bicellular pollen ส่วนระบบ BT-CMS และ LD-CMS เกิดขึ้นในระยะที่มี 3 นิวเคลียส (trinucleate stage) หรือ tricellular pollen (Li et al., 2007; Hu et al., 2014; พชระ, 2555)

ระบบความเป็นหมัน

ความเป็นหมันของเรณู (male sterile) คือ การที่เรณูไม่สามารถทำงานได้เนื่องจากการพัฒนาของเรณูผิดปกติ สามารถเกิดได้หลายรูปแบบตามธรรมชาติ ซึ่งสาเหตุของการหมันของเรณูอาจเกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรม หรือการผ่าเหล่าของยีนเป็นผลทำให้เกิด การสร้างเรณูที่ผิดปกติ ไม่เกิดการสร้างเรณู หรือสร้างเรณูแต่อับเรณูไม่แตก เป็นผลทำให้เรณูไม่สามารถทำงานได้ (Ivanov and Dymshits, 2007) ซึ่งความเป็นหมันนี้ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตลูกผสม

เพราะสามารถลดแรงงานและเวลาในการกำจัดเรณูของต้นแม่ ทำให้ผลิตลูกผสมได้เป็นจำนวนมาก (พชระ, 2555)

ปัจจัยที่ควบคุมความเป็นหมันของเรณูและยีนแก้ความเป็นหมัน

1. ความเป็นหมันของเรณูที่ควบคุมด้วยสภาพแวดล้อม (Environment-conditioned genetic male sterility; EGMS) ซึ่งความเป็นหมันแบบ EGMS มี 2 ระบบ คือ Photoperiod-sensitive genetic male sterility (PGMS) ความเป็นหมันที่เกิดจากช่วงแสงหรือวันสั้นวันยาว โดยเรณูจะเป็นหมันก็ต่อเมื่อช่วงวันยาว และเรณูจะปกติก็ต่อเมื่อช่วงวันสั้น และ Temperature-sensitive genetic male sterility (TGMS) ความเป็นหมันที่เกิดจากอุณหภูมิ โดยเรณูจะเป็นหมันก็ต่อเมื่อได้รับอุณหภูมิสูง (Huang et al., 2014)

2. ความเป็นหมันของเรณูที่ควบคุมด้วยยีนในไซโทพลาซึม (Cytoplasmic male sterility; CMS) ระบบ CMS มียีนควบคุมความเป็นหมันอยู่ในไซโทพลาซึม แบ่งเป็น 2 แบบ คือ ไซโทพลาซึมปกติ (F) และไซโทพลาซึมที่ทำให้เรณูเป็นหมัน (CMS) มียีนแก้ความเป็นหมัน (restoring gene; Rf) อยู่ในนิวเคลียส แบ่งเป็น 2 แบบ คือ ยีนเด่น (*Rf*) ทำให้เรณูปกติ และยีนด้อย (*rf*) ทำให้เรณูเป็นหมัน หากมียีน *Rf* ไม่ว่าจะอยู่รวมกับยีนในไซโทพลาซึมแบบ CMS หรือ F ทำให้พืชมีเรณูที่ปกติ หากมียีน *rf* อยู่ในนิวเคลียสรวมกับยีนในไซโทพลาซึมแบบ CMS ทำให้พืชมีเรณูเป็นหมัน (พชระ, 2555) ความเป็นหมันของเรณูแบบ CMS มี 2 แบบ (หยวน, 2533)

2.1 Sporophytic system เป็นระบบความสมบูรณ์ของเรณูควบคุมด้วยจีโนไทป์ของ sporophyte หากเรณู มีจีโนไทป์เป็น CMS(rfrf) เรณูจะฝ่อ หากมีจีโนไทป์เป็น CMS(RfRf) หรือ F(RfRf) เรณูจะปกติ โดยมีคุณสมบัติดังนี้

2.1.1 ลูกผสม F_1 ที่ได้จากการผสมกับสายพันธุ์ R เรณูจะเป็นปกติประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ และเกิดการกระจายตัวของเรณูปกติต่อเป็นหมัน เป็น 3:1 ในประชากร F_2

2.1.2 การฝ่อของเรณูในระยะแรก คือ uninucleate ของการพัฒนาไมโครสปอร์

2.1.3 สิ่งแวดล้อมมีผลน้อยต่อความเป็นหมันของเรณู มีพันธุ์ที่สามารถแก้หมันได้มีน้อย เนื่องจากมีขอบเขตของการแก้ความเป็นหมันแคบ แต่มีพันธุ์ที่รักษาความเป็นหมันมาก

2.2 Gametophytic system เป็นระบบความสมบูรณ์ของเรณูควบคุมด้วยจีโนไทป์ของ gametophyte หากมีจีโนไทป์ในนิวเคลียสเป็น Rf เรณูจะปกติ และจีโนไทป์เป็น rf เรณูเป็นหมัน โดยมีคุณสมบัติดังนี้

2.2.1 ลูกผสม F_1 ที่ได้จากการผสมกับสายพันธุ์ R เรณูจะเป็นปกติเพียงครึ่งหนึ่ง แต่ลูกผสม F_1 สามารถผสมตัวเองจนติดเมล็ดได้ และไม่พบเรณูเป็นหมันในประชากร F_2

2.2.2 การฝ่อของเรณูในระยะหลัง คือ binucleate เป็นต้นไป ของการพัฒนาไมโครสปอร์

2.2.3 สายพันธุ์ที่สามารถแก้ความเป็นหมันได้มีหลายสายพันธุ์ เนื่องจากมีขอบเขตของการแก้ความเป็นหมันกว้าง

นอกจากนี้ยังมีการแบ่งระบบความเป็นหมันแบบ CMS เป็นอีก 5 ระบบ ตามชื่อสายพันธุ์ข้าว ดังนี้

1. ระบบความเป็นหมัน BoroII-CMS (BT-CMS) เป็นหมันระบบแรก พบเมื่อปี ค.ศ.1954 ได้ความเป็นหมันของเรณูมาจากข้าวพันธุ์ Chinsurah Boro II (*O. sativa* indica) มีระบบความเป็นหมันแบบ gametophytic มียีนควบคุมความเป็นหมันอยู่ในไมโทคอนเดรีย B-*atp6-orf79* มียีนแก้ความเป็นหมันในนิวเคลียส คือ ยีน *Rf1A* และ *Rf1B* ที่อยู่บนโครโมโซม 10 โดยยีนทั้งสองนี้จะอยู่บนตำแหน่ง *Rf1* ซึ่งเป็นรหัสของโปรตีน PPR (pentatricopeptide repeat) สำหรับยีน *Rf1A* โดยปกติจะแปลรหัสเป็นโปรตีนยาว 266 กรดอะมิโน แต่เมื่อเกิดการกลายพันธุ์แบบ Frameshift ทำให้โปรตีนถูกตัด จึงทำให้อัลลีล *Rf1A* เปลี่ยนเป็น อัลลีล *rf1a* สำหรับยีน *Rf1b* ได้การเปลี่ยนแปลงของเบส1 ตำแหน่ง (SNP) จากเบส A^{1235} ไปเป็นเบส G ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ missense ส่งผลต่อโปรตีนโดยเกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Asn^{412} ไปเป็นเป็น Ser ทำให้อัลลีล *Rf1b* เปลี่ยนเป็น อัลลีล *rf1b* ซึ่งยีนทั้ง 2 นี้ มีหน้าที่ในการยับยั้งยีนหมัน โดยยีน *Rf1A* หน้าที่ในการตัดและยีน *Rf1B* หน้าที่ในการสลาย mRNA ของยีน B-*atp6-orf79* ทำให้แก้หมันได้ (Huang et al., 2014; Wang et al., 2007)

2. ระบบความเป็นหมัน Lead rice-CMS (LD-CMS) ได้ความเป็นหมันของเรณูจากข้าวพันธุ์ Lead rice (*O. sativa* indica) เป็นระบบความเป็นหมันแบบ gametophytic มียีนควบคุมความเป็นหมัน คือ L-*atp6-orf79* มียีนแก้ความเป็นหมัน คือ ยีน *Rf2* อยู่บนโครโมโซมที่ 2 และยีน *Rf1* ที่อยู่บนโครโมโซม 10 ได้มีการวิเคราะห์ลำดับเบสระหว่างข้าวพันธุ์ Kasalath (*Rf2*) กับข้าวพันธุ์ Nipponbare (*rf2*) พบว่า อัลลีล *Rf2* เกิดการแทนที่ของเบส T เป็นเบส C ส่งผลให้กรดอะมิโนตัวที่ 78 เปลี่ยนจาก Isoleucine เป็น Threonine ทำให้ ยีน *Rf2* เปลี่ยนเป็น อัลลีลด้อย *rf2* จึงไม่สามารถทำงานได้ โดยยีน *Rf2* ไม่ใช่รหัสของโปรตีน PPR ซึ่งต่างจาก ยีน *Rf* ส่วนใหญ่ (Huang et al., 2014, Itabashi et al., 2011)

3. ระบบความเป็นหมัน Wild abortive-CMS (WA-CMS) ในปี ค.ศ. 1970 หยวน ลองปิง ได้ความเป็นหมันของเรณูมาจากข้าวป่า (Wild abortive) ในหูหนาน มีระบบความเป็นหมันแบบ sporophytic โดยมียีนควบคุมความเป็นหมัน คือ *WA352* มียีนแก้หมัน คือ ยีน *Rf3* ที่อยู่บนโครโมโซม 1 และยีน *Rf4* ที่อยู่บนโครโมโซม 10 โดยยีน *Rf4* ทำหน้าที่ในการตัด RNA ของยีน *WA352* และ *Rf3* ทำหน้าที่ยับยั้งการแปลรหัสไปเป็นโปรตีนของ WA352 (Huang et al., 2014)

4. ระบบความเป็นหมัน Honglian-CMS (HL-CMS) ได้รับความเป็นหมันของเรณูมาจากการผสมกลับระหว่าง ข้าวป่า ในไหหนาน คือ red-awned (*O. rufipogon*) กับ Lian-Tang-Zao (*O. sativa* indica) มีระบบความเป็นหมันแบบ gametophytic ยีนควบคุมความเป็นหมัน คือ *atp-orfH79* มียีนแก้หมัน คือ ยีน *Rf6* ที่อยู่บนโครโมโซม 8 และยีน *Rf5* ที่อยู่บนโครโมโซม 10 ซึ่งทั้ง 2 ยีนเป็นรหัสของโปรตีน PPR ยีน *Rf5* มีความคล้ายกับยีน *Rf1a* หรือ *Rf1* คือ เป็นรหัสของโปรตีน PPR791 ยีน *Rf5* เปลี่ยนไปเป็น *rf5* เกิดจากการเปลี่ยนแปลงเบส 1 ตำแหน่ง (SNP) จากเบส T^{791} ไปเป็น A ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ nonsense (TAT เป็น TAA) ซึ่ง *Rf5* ทำงานร่วมกันกับโปรตีน GRP162

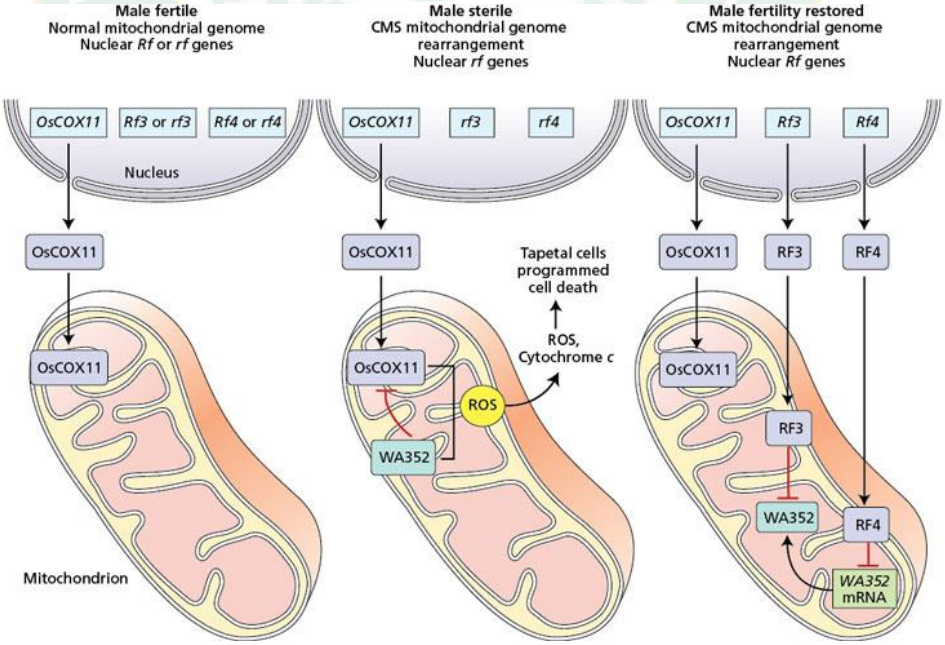
ทำหน้าที่ในการตัด RNA ของยีน *OrfH79* เช่นเดียวกับยีน *Rf6* ในส่วนของยีน *Rf6* มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีนชนิด PPR3, PPR4 และ PPR5 ทำงานร่วมกับโปรตีน OsHXK6 ทำหน้าที่ตัด RNA ของ *OrfH79* หากยีนทำงานเพียง 1 ยีน จะสามารถแก้ความเป็นหมันของลูก F_1 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ แต่หากทั้งสองยีนทำงานจะสามารถแก้ความเป็นของลูก F_1 ได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ (Huang et al., 2014; Huang et al., 2015)

5. ระบบความเป็นหมัน Chinese wild-CMS (CW-CMS) ได้รับความเป็นหมันของเรณูจากข้าวป่า Chinese wild (*O. rufipogon*) มีระบบความเป็นหมันแบบ gametophytic ยังไม่ทราบถึงชื่อยีนควบคุมความเป็นหมัน มียีนแก้หมัน คือ ยีน *Rf17* อยู่บนโครโมโซม 4 พบในข้าวพันธุ์ IR64 ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้ข้าวพันธุ์นี้ในการแก้หมันของระบบความเป็นหมัน CW-CMS โดยพบสนิปส์ (T/A) บริเวณ 2,286 คู่เบส ซึ่งอยู่ในโปรโมเตอร์ของยีน *Rf17* (T) ทำให้เปลี่ยนเป็นอัลลีลด้อย *rf17* (A) จึงไม่สามารถแก้หมันได้ (Huang et al., 2014; Toriyama and Kazama, 2016)

ซึ่งระบบความเป็นหมันของเรณูที่นิยมใช้ในการผลิตลูกผสม คือ ระบบ WA-CMS ซึ่งมียีนควบคุมความเป็นหมันจากข้าวพันธุ์ Zhenshan 97A คือ ยีน *WA352* (Huang et al., 2014) มาจากการเรียงตัวใหม่ของ ยีน *orf352* ภายในไมโทคอนเดรีย (Okazaki et al., 2013) ยีนแก้ความเป็นหมันของระบบความเป็นหมัน WA-CMS คือ ยีนตำแหน่ง Rf3 ประกอบด้วยยีน 4 ยีน คือ *Os01g09560, Os01g09670, Os01g10090* และ *Os01g10800* (Suresh et al., 2012) ยีนตำแหน่ง Rf4 ประกอบด้วยยีน 4 ยีน คือ *PPR7*, *PPR8*, *PPR9* และ *PPR10* (Kazama and Toriyama, 2014) ระบบ WA-CMS สามารถสังเกตความเป็นหมันได้จากเรณู (Kazama and Toriyama, 2014; Singh et al., 2014; Eidi-Kohnaki, 2015) มีการใช้สารละลาย I_2-KI ย้อมเรณู หากติดสีย้อมแสดงถึงเรณูปกติ แต่หากไม่ติดสีย้อมแสดงถึงความเป็นหมันของเรณู รวมไปถึงตรวจสอบการติดเมล็ด โดยการนับเมล็ดดีและเมล็ดฝ่อ เพื่อแสดงการแก้หมัน (Hasan et al., 2011; Eidi-Kohnaki, 2015) ซึ่งเป็นวิธีการที่ง่ายในการตรวจสอบการแก้ความเป็นหมัน จึงเป็นที่นิยมในการใช้ระบบนี้ศึกษาความเป็นหมัน

สาเหตุของความเป็นหมันของเรณูระบบ WA-CMS และการแก้หมัน

โดยความเป็นหมันเกิดจากโปรตีน WA352 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกิดจากการเรียงตัวใหม่ของจีโนมในไมโทคอนเดรีย ในข้าวที่มีเรณูปกติ (male fertile) จะมียีน *OsCOX11* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในนิวเคลียส ซึ่งโปรตีน OsCOX11 เป็นหน่วยย่อยของเอนไซม์ cytochome c oxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญต่อกระบวนการหายใจของพืช เพื่อสร้างพลังงาน ในข้าวที่มีเรณูเป็นหมัน (male sterile) ในเซลล์ของอับเรณู จะมีโปรตีน WA352 ไปยับยั้งการทำงานของโปรตีน OsCOX11 ทำให้เกิดความผิดปกติ พบ reactive oxygen species (ROS) ในระดับสูง และ Cytochrome C ซึ่งหลุดออกมาอยู่ด้านนอกเยื่อหุ้มของไมโทคอนเดรียภายในไซโตซอล นอกจากนี้ โปรตีน WA352 มีผลทำให้เกิด Premature programmed cell death (PCD) ของเซลล์ทาพีตัมในอับเรณู แต่หากในข้าวที่มีเรณูเป็นหมัน แต่มียีนแก้ความเป็นหมัน (Restorer gene : *Rf*) ภายในไมโทคอนเดรียมีโปรตีน WA352 ที่ทำให้เรณูเป็นหมัน แต่เนื่องจากมียีนแก้หมันในนิวเคลียส คือ ยีน *Rf3* และ *Rf4* โดยยีน *Rf4* ถอดรหัสและแปลรหัสได้เป็น โปรตีน Rf4 มีหน้าที่ไปตัด mRNA ของยีน *WA352* ในไมโทคอนเดรีย ทำให้ mRNA ของยีน *WA352* ไม่สามารถแปลรหัสไปเป็นโปรตีน WA352 ได้ แต่หากยังมี mRNA หลงเหลือจนสามารถแปลรหัสไปเป็น โปรตีน WA352 ได้ จะมีโปรตีน Rf3 เข้ามาทำหน้าที่ในการยับยั้งโปรตีน WA352 ไม่ให้ไปยับยั้งการทำงานของโปรตีน OsCOX11 เป็นผลให้โปรตีน OsCOX11 สามารถทำงานได้ตามปกติ ทำให้เรณูไม่เป็นหมัน (Ma, 2013 and Lincoln et al., 2015) ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 การทำงานของยีนหมัน และยีนแก้หมันของระบบ WA-CMS

ที่มา : Lincoln et al. (2015)

โปรตีน Pentatricopeptide repeat (PPR)

ในพืชที่มีความเป็นหมันของเรณูระบบ CMS จะมี *orf* จำนวนมากในจีโนมของไมโทคอนเดรียที่แสดงออกถึงลักษณะความเป็นหมัน ซึ่ง *orf* ในจีโนมของไมโทคอนเดรียมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ โดยทั่วไปแล้วระบบ CMS เกิดมาจากการเรียงตัวใหม่ของจีโนมในไมโทคอนเดรีย (Hu et al., 2014) นอกจากนี้ยังมียีน *Rf* (restorer gene) ที่อยู่ในนิวเคลียส ทำหน้าที่ในการแก้หมันระบบ CMS ซึ่งยีน *Rf* ส่วนใหญ่เป็นรหัสของโปรตีน PPR (Pentatricopeptide repeat) ซึ่งยีน *Rf* จะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์เช่นเดียวกันกับระบบความเป็นหมัน ตารางที่ 2 (Hu et al., 2014; Bohra et al., 2016; Chen et al., 2018)

โปรตีน PPR (Pentatricopeptide repeat) มีลักษณะของกรดอะมิโนที่ซ้ำกัน 35 กรดอะมิโน มีโครงสร้างเป็น helix-turn-helix ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเจริญเติบโตของพืช โดยโปรตีน PPR มีส่วนร่วมในกระบวนการหลังการถอดรหัส คือ การแก้ไขอาร์เอ็นเอ (RNA editing) การตัด RNA (Splicing) ความเสถียร (stability) การตัด (cleavage) การสลาย (degradation) และการแปลรหัส (translation) (Chen et al., 2018) ซึ่งโปรตีน PPR พบมากในไมโทคอนเดรีย จะพบในพืชมากกว่าในสัตว์ เช่น ใน อะราบิดอบซิส และมะเขือเทศ มีโปรตีน PPR จำนวน 441 ชนิดและ 471 ชนิด ตามลำดับ แต่ในคนและแมลงหวี่ กลับมีโปรตีน PPR แค่เพียง 6 ชนิด และ 2 ชนิดเท่านั้น จากตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่าระบบความเป็นหมัน CMS แต่ละระบบจะมียีนแก้ความเป็นหมันที่แตกต่างกัน (Hu et al., 2014; Chen et al., 2018)

ตารางที่ 2 สายพันธุ์ข้าวของระบบความเป็นหมัน ยีน และโปรตีนแก้ความเป็นหมันของระบบ CMS

ระบบความเป็นหมัน	สายพันธุ์ให้ความเป็นหมัน	อ้างอิง	ตำแหน่งแก้ความเป็นหมัน	สายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน	ยีนที่แก้ความเป็นหมัน	โปรตีน	อ้างอิง
BT-CMS	Chinsurah Boro II	Shinjyo and Omura (1966)	Rf-1	BTR	*PPR8-1*	PPR	Kazama and Toriyama (2003)
				IR24	*PPR791*	PPR	Komori et al. (2004)
				MTC-10R	*Rf-1A,Rf-1B*	PPR	Akagi et al. (2004)
LD-CMS	Lead Rice	Watanabe et al. (1968)	Rf1b	C9083	-	PPR	Wang et al. (2006)
			Rf2	Kasalath	*LOC_Os02g17380.1*	Glycien rich	Itabashi et al. (2011)
WA-CMS	*O. sativa* sp. spontaneae	Lin and Yuan (1980)	Rf4	Minghui63	*PPR7-454-M* *PPR9-782-M* *PPR10-454-M*	PPR	Tang et al. (2014)
				IR24	*PPR782a*	PPR	Kazama and Toriyama (2014)
HL-CMS	*O. rufipogon*	see Huang et al. (2014) and reference therein	Rf5	Milyang23	*PPR791*	PPR	Hu et al. (2012)
CW-CMS	*O. rufipogon*	Katsuo and Mizushima (1958)	Rf17	CWR	*ORF11*	-	Fuji and Toryama (2009)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Bohra et al. (2016)

เครื่องหมายดีเอ็นเอในการปรับปรุงพันธุ์พืช

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) คือ การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิต โดยตำแหน่งของดีเอ็นเอสามารถอยู่ได้ทั้งบนโครโมโซมภายในนิวเคลียส (nucleus DNA) หรือออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA หรือ chloroplast DNA) และสามารถถ่ายทอดจากพ่อแม่ไปสู่ลูกได้ ในพืชแต่ละชนิดมีการเรียงตัวของลำดับเบสที่แตกต่างกัน (polymorphisms) ทำให้สามารถแยกความแตกต่าง ของพืชแต่ละชนิดออกจากกัน จึงนำความแตกต่างนี้มาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายได้ ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท (สุรีพร, 2546)

1. Hybridization–based marker เป็นเครื่องหมายที่ใช้หลักการเข้าคู่สมของดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบกับดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) เช่น เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (Restriction fragment length polymorphism; RFLP) เป็นเครื่องหมายที่พัฒนามาจากความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) ความผิดพลาดของเซลล์ หรือสภาพแวดล้อม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส

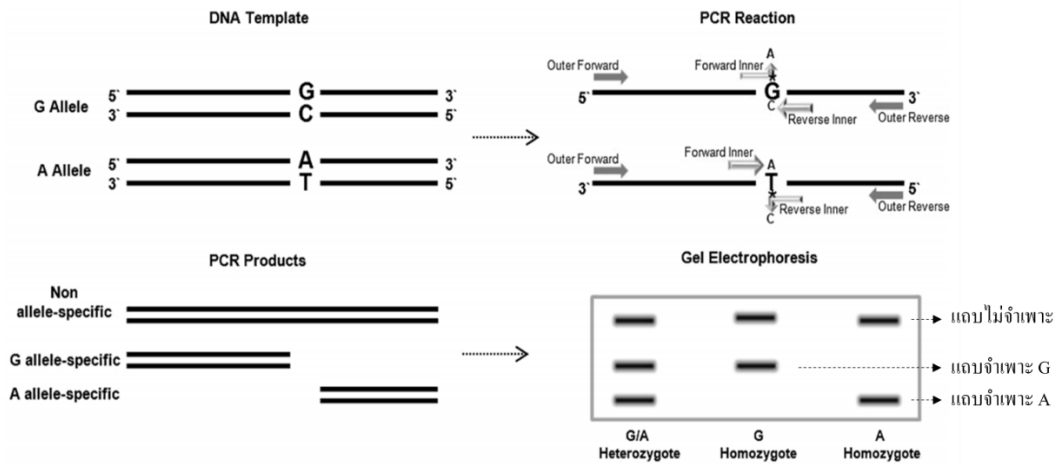
ของสิ่งมีชีวิต ส่งผลให้ตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะเปลี่ยนไป เมื่อนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันจะได้ขนาดและจำนวนชิ้นของดีเอ็นเอต่างกัน จึงมาใช้ในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต

2. PCR-based marker เป็นเครื่องหมายที่ใช้หลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) ซึ่งเครื่องหมายประเภทนี้เป็นที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน เช่น เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) หรือเอสเอสอาร์ (SSR marker) (สุรีพร, 2546, จุฑาพร, 2555) เป็นบริเวณที่มีลักษณะซ้ำเรียงกันอยู่ต่อเนื่อง แต่ละชุดประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 1-6 นิวคลีโอไทด์ โดยบริเวณซ้ำกระจายทั่วทั้งจีโนมไม่สม่ำเสมอบางบริเวณพบมาก บางบริเวณพบน้อยขึ้นอยู่กับสิ่งมีชีวิต การใช้เครื่องหมายชนิดนี้แยกความแตกต่างได้ โดยการใช้สายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่เรียกว่า ไพรเมอร์ (primer) ที่มีลำดับเบสคู่สมกับบริเวณที่อยู่ขนาบข้างกับบริเวณซ้ำแล้วเพิ่มจำนวนบริเวณซ้ำดังกล่าว จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟริซีส เพื่อแยกความแตกต่างของจำนวนซ้ำของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (สุรินทร์, 2552)

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวที่มียีนแก้หมัน และข้าวที่มีความเป็นหมันระบบ CMS โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR จำนวน 16 เครื่องหมาย พบเครื่องหมาย SSR จำนวน 10 เครื่องหมายที่สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างได้ ยังมีเครื่องหมาย InDel และเครื่องหมาย SNPs ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่จำเพาะกับยีน โดยเครื่องหมาย InDel เป็นเครื่องหมายที่ใช้แยกความแตกต่างจากการเพิ่มขึ้น (Insertion) หรือการขาดหาย (Deletion) ไปของลำดับเบสในสิ่งมีชีวิต จากการวิจัยของ Pranathi et al. (2016) ได้พัฒนาเครื่องหมายที่มีความจำเพาะกับยีนแก้หมันตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 เพื่อใช้แยกความแตกต่างของข้าวที่มียีนตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 ออกจากข้าวที่ไม่มียีนแก้หมันได้

ในส่วนของเครื่องหมายสนิปส์ (Single Nucleotide Polymorphism : SNPs) ซึ่งสนิปส์ คือการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันบนสายดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ และไม่ทำให้เกิดความผิดปกติ ในสิ่งมีชีวิตมีการเกิดสนิปส์หลายตำแหน่งจึงทำให้เห็นความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นระหว่างสิ่งมีชีวิต (ธีรพัฒน์, 2555) ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบสนิปส์ เช่น เทคนิค Tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction (ARMS-PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้ไพรเมอร์ 4 เส้น ในการทำ PCR คือ Forward Outer, Reverse Outer, Forward Inner และ Reverse Inner โดยไพรเมอร์ Forward Outer และ Reverse Outer จะเพิ่มจำนวนบริเวณระหว่างสนิปส์ซึ่งไม่สามารถระบุอัลลีลได้อย่างจำเพาะ ในส่วนของ Forward Inner และ Reverse Inner สามารถระบุอัลลีลได้อย่างจำเพาะ เช่น บริเวณสนิปส์ G/A ของเฮเทอโรไซโกตโดยแถบที่จำเพาะทั้ง 2 แถบ เกิดจากการที่ไพรเมอร์ Outer Forward และ Reverse Inner ซึ่งจำเพาะกับอัลลีล G และ Forward Inner และ Outer Reverse ที่จำเพาะกับอัลลีล A ในส่วนของ

ไพรเมอร์ Outer จะอยู่ระหว่างบริเวณ SNP ซึ่งจะปรากฏแถบที่แสดงถึงความไม่จำเพาะ ซึ่งขนาดของแถบที่จำเพาะกับอัลลีล G/A มีขนาดที่แตกต่างกัน จึงสามารถวิเคราะห์ได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยหากสิ่งมีชีวิตแสดงจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัส A/A จะปรากฏแถบ ที่จำเพาะกับอัลลีล A และแถบที่ไม่จำเพาะ หากแสดงจีโนไทป์เป็นโฮโมโซกัส G/G จะปรากฏแถบทีจำเพาะกับอัลลีล G และแถบที่ไม่จำเพาะ หากแสดงจีโนไทป์เป็นเฮทเทอโรไซกัส G/A จะปรากฏแถบที่จำเพาะกับอัลลีล A, อัลลีล G และแถบที่ไม่จำเพาะ (ภาพที่ 5) (Medrano and Oliveira, 2014)



ภาพที่ 5 การใช้เครื่องหมาย SNP และเทคนิค ARMS-PCR
ที่มา : Medrano and Oliveira (2014) ดัดแปลงจาก Ye et al., 2001

ได้มีการนำบริเวณสนิปส์ที่แตกต่างกันมาใช้เป็นเครื่องหมายที่จำเพาะกับยีน จากงานวิจัยของ Pongjaroenkit et al. (2017) ได้พัฒนาเครื่องหมาย SNP โดยใช้เทคนิค ARMS-PCR จากบริเวณ SNP ของยีนตำแหน่ง Rf4 คือ ยีน *PPR10* โดยการโคลนยีนจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 นางมล เอส-4 ปทุมธานี 1 และสุพรรณบุรี 1 ผลจากการหาลำดับเบสของยีน *PPR10* จากข้าวไทยเหล่านี้ พบบริเวณสนิปส์ที่เบสตำแหน่ง 1,392 ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนจากโคดอนปกติเปลี่ยนเป็นรหัสหยุด จึงนำบริเวณนี้มาออกแบบเป็นเครื่องหมายสนิปส์ เพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างข้าวไทยพันธุ์รักษาความเป็นหมัน (B-line) ข้าวสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน (R-line) ในระบบความเป็นหมัน WA-CMS นอกจากนี้ยังใช้ในการตรวจสอบลูกผสม F_1 ได้ หากเป็นอัลลีล G จะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 603 และ 416 คู่เบส และอัลลีล T จะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 603 และ 242 คู่เบส

ในปัจจุบันนิยมใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต ทั้งในการศึกษาลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative traits) หรือลักษณะเชิงคุณภาพ (qualitative traits) เนื่องจาก

เป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตระหว่างชนิดหรือภายในชนิด พันธุ์ ประชากร และสายพันธุ์ โดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอมีข้อดี (จุฑาพร, 2555) คือ

1. เครื่องหมายดีเอ็นเอความแม่นยำสูงกว่าการสังเกตจากฟีโนไทป์

2. เนื่องจากเป็นเครื่องหมายที่มีการพัฒนามาจากดีเอ็นเอโดยตรงทำให้มีเครื่องหมายจำนวนมากให้เลือกใช้

3. ผลจากการตรวจด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอมีความคงที่ สามารถใช้เนื้อเยื่อจากใบ หรือเมล็ดก็ได้ เนื่องจากมีดีเอ็นเอเหมือนกัน

4. ในการตรวจสอบนั้นใช้ชิ้นส่วนจากต้นพืชในปริมาณน้อยทำให้ไม่ต้องทำลายต้นพืช

5. เครื่องหมายสามารถใช้ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะแบบข่มร่วมได้

6. ประหยัดเวลา พื้นที่ปลูก และแรงงาน เนื่องจากในการปรับปรุงพันธุ์พืชต้องใช้เวลานานในการสังเกตฟีโนไทป์ ใช้พื้นที่ปลูกจำนวนมาก และต้องใช้แรงงานในการดูแลพืช การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอทำให้สามารถลดปัจจัยเหล่านี้ได้

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาการทำงานของยีนแก้หมันของระบบ WA-CMS

ดวงพร และคณะ (2556) ศึกษาการถ่ายทอดยีนแก้หมันของเรณูจากประชากร F_2 จำนวน 10 คู่ผสม โดยใช้สายพันธุ์เรณูเป็นหมัน 2 พันธุ์ คือ IR580151A และ CHA ส่วนพันธุ์แก้ความเป็นหมัน 5 พันธุ์ คือ ชัยนาท 1 สุพรรณบุรี 1 กข 31 CH1 และ CH4 ด้วยวิธีการย้อมเรณูด้วยสารละลาย I_2-KI คำนวณเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู และมีการจัดกลุ่มความสามารถแก้ความเป็นหมันออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มหมัน เป็นกลุ่มที่เรณูติดสีน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มหมันบางส่วนซึ่งเรณูติดสี 5.1-50 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มปกติบางส่วนซึ่งเรณูติดสี 50.1-80 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มปกติซึ่งเรณูติดสีมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ พบ 7 คู่ผสม คือ พันธุ์เรณูเป็นหมัน IR580151A กับพันธุ์แก้หมัน คือ ชัยนาท 1 CH1 และ CH4 พันธุ์เรณูเป็นหมัน CHA กับพันธุ์แก้หมัน คือ ชัยนาท 1 สุพรรณบุรี 1 กข 31 และ CH4 มีอัตราส่วนเรณูปกติต่อเรณูเป็นหมัน เป็น 15:1 แสดงให้เห็นว่ายีนควบคุมลักษณะแก้หมันควบคุมด้วยยีนจำนวน 2 คู่ และอีก 3 คู่ผสม คือพันธุ์เรณูเป็นหมัน IR580151A กับพันธุ์แก้หมัน คือ สุพรรณบุรี 1 และ กข31 พันธุ์เรณูเป็นหมัน CHA กับพันธุ์แก้หมัน คือ CH1 มีอัตราส่วนเรณูปกติต่อเรณูเป็นหมัน เป็น 3:1 แสดงให้เห็นว่าลักษณะแก้ความเป็นหมันด้วยยีนจำนวน 1 คู่ จากผลดังกล่าวสรุปได้ว่า ยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูที่ทำการศึกษาขึ้นอยู่กับสายพันธุ์พ่อและแม่ของแต่ละคู่ผสม

พชระ (2555) ทำการศึกษาการพัฒนาสายพันธุ์เรณูเป็นหมันของข้าวด้วยวิธีการผสมกลับและทดสอบสมรรถนะการผสม เพื่อพัฒนาสายพันธุ์พ่อแม่ในข้าวลูกผสมระบบ 3 ทาง โดยทำการพัฒนาสายพันธุ์เรณูเป็นหมันไปพร้อมกับสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน พบว่าข้าวที่ให้ลูกผสมที่ดี มี 2 คู่ผสม ได้แก่ PTT08003AxCK168 และ PTT0800AxRD31 ให้ค่าความดีเด่นเหนือพ่อแม่เป็น 63.84 และ 40.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ กขผ1, ปทุมธานี 1 และพิษณุโลก 2 มีค่า 67.16 ถึง 107.18 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบกับข้าวลูกผสมทางการค้าของประเทศจีน จำนวน 5 สายพันธุ์ พบว่า ข้าวลูกผสม PTT0800AxRD31 ให้ค่าความดีเด่นเหนือกว่าข้าวลูกผสม HSLY-26 ที่ให้ผลผลิตสูงสุด 40.24 เปอร์เซ็นต์

Asadollah et al. (2004) ศึกษาการยีนแก้ความเป็นหมัน ในประชากร F_2 ของคู่ผสม 3 คู่ โดยศึกษาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู พันธุ์ที่ให้ความเป็นหมัน คือ พันธุ์ Neda A ผสมกับพันธุ์ที่มียีนแก้ความเป็นหมัน คือ IR24, IR28 และ IR36 จากข้อมูลเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู ทั้ง 3 คู่ผสม ซึ่งคู่ผสม Neda AxIR24 มีอัตราส่วนเรณูปกติต่อเรณูเป็นหมัน เป็น 15:1 ส่วนอีก 2 คู่ผสม อัตราส่วนเรณูปกติต่อเรณูเป็นหมัน เป็น 3:1 มีการวิเคราะห์ผลเพิ่มเติมในคู่ผสม Neda AxIR24 ได้อัตราส่วนเรณูปกติต่อเรณูปกติบางส่วนต่อเรณูเป็นหมันบางส่วนต่อเรณูเป็นหมัน เป็น 9:3:3:1 แสดงให้เห็นว่าข้าวพันธุ์ IR24 มียีนควบคุมลักษณะแก้หมันจำนวน 2 คู่

Tan et al. (2008) ศึกษายีนแก้ความเป็นหมัน 3 ระบบ คือ WA-CMS, HL-CMS และ BT-CMS โดยทำการผสมระหว่างพันธุ์ที่ให้ความเป็นหมันของแต่ละระบบ กับข้าวที่มียีนแก้ความเป็นหมัน โดยศึกษา จากเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู และเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดลูก F_1 พบว่า ระบบ HL-CMS และ BT-CMS มียีนควบคุมการแก้หมันเป็นยีนเด่น (domimant gene) จำนวน 1 คู่ ในส่วนของ WA-CMS มียีนควบคุมการแก้ความเป็นหมันเป็นยีนเด่น (domimant gene) จำนวน 1 หรือ 2 คู่ และจากการทดลองข้าวพันธุ์ C3 ซึ่งเป็นข้าวไทยมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูในระบบ WA-CMS ระบบ HL-CMS และ ระบบ BT-CMS เป็น 31.7, 45.5 และ 80.5 ตามลำดับ ทำให้เห็นว่าข้าวไทยสายพันธุ์ C3 นี้มียีนแก้ความเป็นหมันของทั้ง 3 ระบบที่มีความสามารถในการแก้ความเป็นหมันในแต่ละระบบไม่เท่ากัน

Bagheri and Babaeian (2011) ศึกษาข้าว *O. sativa* L. ที่มียีนความเป็นหมันอยู่ในไซโทพลาซึมระบบ WA-CMS คือ พันธุ์ IR58025A, IR62829A และ IR68899A โดยทำการผสมกับพันธุ์ที่มียีนแก้หมัน คือ พันธุ์ Amol-2, IR50 และ Poya ทำให้ได้ลูก F_1 ที่มีเรณูและการติดเมล็ดคล้ายกับต้นที่มียีนแก้หมัน แสดงให้เห็นว่าข้าวพันธุ์เหล่านี้มียีนเด่นที่สามารถแก้ความเป็นหมันได้ และจากการศึกษาประชากร F_2 และการผสมกลับ พบว่ายีนแก้ความเป็นหมันในข้าวพันธุ์ Amol-2 และ IR50 ควบคุมโดยยีนหลัก 2 ยีน ส่วนข้าวพันธุ์ Poya ควบคุมด้วยยีนเด่น 1 ยีน นอกจากนี้มีการศึกษายีนแก้ความเป็นหมันโดยศึกษาความมีชีวิตของเรณูของประชากร F_2 จากการผสมระหว่าง IR80151A

กับ CH1 และ IR80151A กับ CH4 พบว่า มีอัตราส่วนเรณูเป็นปกติ:หมัน เป็น 15:1 แสดงข้าว CH1 และ CH4 มียีนแก้ความเป็นหมันจำนวน 2 ยีน

Seesang et al. (2014) ทำการศึกษาการแก้หมัน และการรักษาสายพันธุ์ จากลูกผสม F_1 และศึกษายีนแก้หมันในประชากร F_2 ในข้าวไทยและพันธุ์อื่น เริ่มจากทำการสร้างลูกผสม F_1 จำนวน 34 คู่ผสม จากพันธุ์เรณูเป็นหมัน (ต้นแม่) จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ CHA01 และ IR580151A ผสมกับข้าว (ต้นพ่อ) 17 สายพันธุ์ มีสายพันธุ์ไทย 9 สายพันธุ์ คือ ชัยนาท 1 (CNT1), เจ้าหอมนิล (JHN), กข31 (RD31), สกลนคร 1 (SKN1), สุพรรณบุรี 1 (SPR1), สุพรรณบุรี 2 (SPR2), สุพรรณบุรี 3 (SPR3), สุพรรณบุรี 60 (SPR60) และ สุพรรณบุรี 80 (SPR80) พบว่า จากลูกผสม 12 คู่ มี 2 คู่ผสม ที่ให้ผลผลิต 7,940 และ 6,810 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ เมื่อศึกษาถึงประชากร F_2 ของคู่ผสม IR580151AxCH1 และ IR580151AxCH4 จากการย้อมเรณู และการทดสอบไคกำลังสอง พบการกระจายตัวของเรณูปกติต่อเรณูหมันเป็น 15:1 แสดงให้เห็นว่าการแก้หมันของข้าวพันธุ์ CH1 และ CH4 ควบคุมด้วยยีน 2 ตำแหน่ง นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ R^2 ระหว่าง เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู และเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด พบว่า ทั้ง 2 ประชากร มีค่า R^2 เท่ากับ 0.58 และ 0.62 ในงานวิจัยนี้ไม่ได้ใช้ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดในศึกษาการแก้หมันเนื่องจากลักษณะการติดเมล็ดจะมีอิทธิพลจากสรีรวิทยาและสภาพแวดล้อม มีผลต่อการติดเมล็ด

Hasan et al. (2015) ศึกษายีนแก้ความเป็นหมันโดยใช้สายพันธุ์ Jin23A เป็นพันธุ์เรณูเป็นหมันแบบ WA-CMS ผสมกับพันธุ์ที่มียีนแก้ความเป็นหมัน อีก 10 สายพันธุ์แล้ว ทำการสร้างประชากร F_2 เพื่อศึกษาการถ่ายทอดของยีนแก้ความเป็นหมันจากความมีชีวิตของเรณู ด้วยวิธีการย้อมเรณูด้วยสารละลาย I_2-KI ศึกษาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู รวมถึงจัดกลุ่มความสามารถแก้ความเป็นหมันออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มหมัน ที่เรณูติดสีน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มหมันบางส่วน ที่เรณูติดสี 1-30 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มปกติบางส่วน ที่เรณูติดสี 31-60 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มปกติ ที่เรณูติดสี 61-100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ทำการนับเมล็ดดี ศึกษาเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด และจัดกลุ่มความสามารถแก้ความเป็นหมันเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มหมัน ที่ติดเมล็ดน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มหมันบางส่วน ที่ติดเมล็ด 1-30 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มปกติบางส่วน ที่ติดเมล็ด 31-80 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มปกติที่ติดเมล็ด 61-100 เปอร์เซ็นต์ พบการทำงานร่วมกันของยีนแก้ความเป็นหมัน 3 แบบ คือ อิพิสเตซิสของยีนเด่น (Dominant epistasis) ในประชากร F_2 ของข้าวสายพันธุ์ BR6839-41-5-1R, BR7011-37-1-2R, BR10R, BR11R, BR13R และ BR14R มีอัตราส่วนเรณูปกติต่อหมันบางส่วนต่อหมัน เป็น 12:3:1 อิพิสเตซิสของยีนเด่นแบบไม่สมบูรณ์ (Epistasis incomplete dominance) ในประชากร F_2 ของข้าวสายพันธุ์ BR7013-62-1-1R, BR15R และ BR16R มีอัตราส่วนเรณูปกติต่อหมันบางส่วนต่อหมัน เป็น 9:6:1 และอิพิสเตซิสของยีนด้อย (Recessive epistasis) ในประชากร F_2 ของข้าวพันธุ์ BR12R มีอัตราส่วนเรณูปกติต่อหมันบางส่วนต่อหมัน เป็น 9:3:4

เพ็ญนภา และเบญจวรรณ (2553) ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการติดเมล็ดของข้าวที่มีความเป็นหมันของเรณู ในแปลงเกษตรกร ทำการปลูกข้าวพันธุ์ IR58025A และข้าวพันธุ์สันป่าตอง 1 ในแปลงนา มีการแบ่งปัจจัยในการศึกษา คือ การครอบมุ้ง (ไม่ครอบมุ้ง และครอบมุ้งไนลอน) และช่วงวันออกดอก พบว่าพันธุ์ IR580151A มีการติดเมล็ดสูงสุดเมื่อออกรวงในเวลาเดียวกันกับสันป่าตอง 1 และมีการติดเมล็ดลดลงเมื่อออกดอกช้ากว่าสันป่าตอง 1 จากผลการศึกษาทำให้ทราบว่าปัจจัยการผสมข้ามมีผลต่อการผลผลิตของข้าวลูกผสม

พีรพล และคณะ (2561) ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะการติดเมล็ดในสภาพเครียด ของประชากร F_2 (N22xกข31) ในสภาพอุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส พบว่าการกระจายตัวของการติดเมล็ด มีลักษณะไม่เป็นโค้งปกติ การติดเมล็ดของข้าวพันธุ์ กข31 และ N22 (สายพันธุ์ทนร้อน) เท่ากับ 28.02 และ 73.07 เปอร์เซ็นต์ สำหรับประชากร F_2 การติดเมล็ดอยู่ในช่วง 0-76.63 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 19.66 เปอร์เซ็นต์ เห็นได้ว่าลักษณะการติดเมล็ดเป็นลักษณะเชิงปริมาณ ที่มีอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการติดเมล็ด

การศึกษายีนแก้ความเป็นหมันของระบบ WA-CMS

Jing et al. (2001) ทำการศึกษาการสร้างแผนที่ของยีนแก้ความเป็นหมันระบบ WA-CMS ในข้าว โดยใช้เครื่องหมาย SSLP (Simple sequence length polymorphism) ในประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างข้าวพันธุ์ Zhenshan 97AxIR24 ซึ่งข้าวพันธุ์ IR24 เป็นสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน เพื่อใช้ในการสร้างแผนที่ยีน *Rf4* พบว่า ระยะห่างทางพันธุกรรมของยีน *Rf4* อยู่บริเวณ RM171 (OSR33) และ RM228 เป็นระยะทาง 3.7 และ 3.4 เซนติมอร์แกน (cM) บนแขนด้านยาวของโครโมโซมที่ 10 และพบยีนที่อยู่ในกลุ่มควบคุมการแก้หมัน จำนวน 3 ยีน คือ *Rf1*, *Rf4* และ *Rf5(t)*

Nematzadeh และ Kiani (2010) ทำการศึกษายีนแก้ความเป็นหมันระบบ WA-CMS ในข้าวสายพันธุ์ DN-33-18 และพัฒนาพันธุ์ข้าว 3 สายพันธุ์ คือ DN-33-1, DN-33-18 และ DN-32-6 โดยนำมาผสมข้ามกับ NedaA พบว่าคู่ผสม NedaAxDN-33-18 ให้เรณูปกติมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นศึกษาความเป็นหมันในประชากร F_2 โดยการย้อมเรณูด้วยสารละลาย I_2-KI พบว่า อัตราส่วนเรณูปกติต่อเรณูเป็นหมันเป็น 15:1 แสดงว่าข้าวพันธุ์ DN-33-18 มียีนเด่นจำนวน 2 ยีนที่ควบคุมลักษณะการแก้ความเป็นหมัน และพบเครื่องหมาย SSR จำนวน 4 เครื่องหมาย คือ RM258, RM171, RM591 และ RM3148 ให้ความแตกต่างกันของขนาดแถบดีเอ็นเอ ระหว่าง 2 สายพันธุ์ จากการวิเคราะห์การเชื่อมโยงของประชากร F_2 พบว่าเครื่องหมาย RM258 และ RM171 อยู่บนโครโมโซมที่ 10 มีระยะทาง 3.1 และ 6.3 cM จากบริเวณยีน *Rf4* เมื่อใช้เครื่องหมาย RM1, RM443, RM315 และ RM294 อยู่บนโครโมโซมที่ 1 ไม่พบความแตกต่าง แต่พบในเครื่องหมายใหม่คือ RM3148 ที่มีความเชื่อมโยง ซึ่งมีระยะทาง 19.7 cM จากยีน *Rf3*

Suresh et al. (2012) ทำการศึกษาการทำแผนที่ยีนแก้ความเป็นหมัน *Rf3* และ *Rf4* ของข้าว และตรวจสอบความถูกต้องของเครื่องหมายที่ได้ทำการพัฒนาสำหรับการระบุยีนแก้ความเป็นหมัน จากการศึกษาประชากร F_2 พบว่า มี 2 ยีนที่ควบคุมการแก้ความเป็นหมัน คือ ยีน *Rf3* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 และยีน *Rf4* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 10 โดยการเปรียบเทียบพันธุ์เรณูเป็นหมัน (A-line) กับพันธุ์แก้ความเป็นหมัน (R-line) พบว่ายีน *Rf3* ประกอบไปด้วย ยีน *Os01g09560* เป็นรหัสของโปรตีน mitochomdria-processing peptidase subunit alpha, ยีน *Os01g09670* เป็นรหัสของโปรตีน pollen-specific protein SF21, ยีน *Os01g10090* และยีน *Os01g10800* เป็นรหัสของโปรตีน PPR งานวิจัยนี้ได้พัฒนาเครื่องหมายที่แยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ A กับพันธุ์ R ได้ออกแบบเครื่องหมายทั้งหมด 23 เครื่องหมาย มีเครื่องหมายที่แยกความแตกต่างได้ 4 เครื่องหมาย โดยเครื่องหมาย DRCG-Rf3-2 อยู่ในยีน *Os01g09560* เมื่อเทียบลำดับเบสระหว่างข้าวพันธุ์ A กับพันธุ์ R พบว่า ในข้าวพันธุ์ R เกิดการขาดหายไป 2 คู่เบส (TT) บริเวณเบสที่ 907 และ 908 บริเวณอินทรอน 1 สำหรับเครื่องหมาย DRCG-Rf3-13 อยู่ในยีน *Os01g09670* พบว่าเกิดการขาดหาย 2 บริเวณ คือ ขาดหายไป 2 คู่เบส (GA) บริเวณเบสที่ 29 และ 30 ขาดหายไป 3 คู่เบส (GAG) บริเวณเบสที่ 77 ถึง 79 บริเวณเอกซอนที่ 1 ของข้าวพันธุ์ A ส่วนยีน *Rf4* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 10 โดยการเปรียบเทียบพันธุ์เรณูเป็นหมัน (A-line) กับพันธุ์แก้ความเป็นหมัน (R-line) ยีนบริเวณ *Rf4* พบว่าประกอบไปด้วย 4 ยีน เป็นรหัสของโปรตีน PPR ได้มีการออกแบบเครื่องหมายที่จำเพาะกับยีนจากข้าวพันธุ์ IR24 (*indica*) ได้ 2 เครื่องหมายที่แสดงความแตกต่าง คือ DRCG-Rf4-8 ออกแบบจากยีนบริเวณของ ยีน *PPR683* แสดงการขาดหาย 6 คู่เบส และ 327 คู่เบส ซึ่งคลอบคลุมทั้งบริเวณเอกซอน 1 และอินทรอน 1 ในพันธุ์ R เครื่องหมาย DRCG-Rf4-14 มีการขาดหายไป 106 คู่เบส อยู่ที่บริเวณเอกซอน 1 ในพันธุ์ R

Tang et al. (2014) ได้ทำการศึกษาข้าวพันธุ์ Minghui 63 ที่มียีนแก้ความเป็นหมันตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 พบว่า ตำแหน่ง Rf4 ประกอบด้วยยีนที่เป็นรหัสของโปรตีน peptatricopeptide repeat (PPR) จำนวน 4 ยีน คือ *PPR7*, *PPR8*, *PPR9* และ *PPR10* เมื่อถ่ายยีนเหล่านี้แต่ละยีนเข้าสู่ข้าวพันธุ์ J23A ที่มีความเป็นหมันระบบ WA-CMS จากนั้นสังเกตลักษณะของเรณูด้วยการย้อมด้วยสารละลาย I_2-KI และนำเรณูจากต้นที่ได้รับการถ่ายยีน เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ J23A ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน พบว่า ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *PPR9* มีการติดสีของเรณู 35, 29 และ 36 เปอร์เซ็นต์ ในขณะเดียวกัน Kazama และ Toriyama (2014) ได้ทำศึกษายีน *Rf4* เช่นเดียวกัน แต่ใช้ยีนแก้ความเป็นหมันจากข้าวพันธุ์ IR24 พบว่า ข้าวพันธุ์ WAA ที่เป็นหมัน ต้นที่ได้รับยีน *PPR782a* มีการติดสีของเรณู 48 และ 79 เปอร์เซ็นต์ เหมือนกับงานวิจัยของ Tang et al. (2014) เนื่องจากยีน *PPR458*, *PPR782b*, *PPR782a* และ *PPR454* มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับยีน *PPR7*, *PPR8*, *PPR9* และ *PPR10* ในข้าวพันธุ์ Minghui 63 ตามลำดับ ซึ่งผลการวิจัยดังกล่าวแสดงว่า ยีน *PPR9* เป็นยีนแก้

ความเป็นหมันที่ตำแหน่ง Rf4 แต่ก็ยังไม่สามารถแก้ความเป็นหมันได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จะต้องอาศัยยีน *PPR* อื่น หรือตำแหน่งอื่นช่วยในการแก้ความเป็นหมัน

Pranathi et al. (2016) ศึกษายีนตำแหน่ง Rf4 เพื่อการพัฒนาเครื่องหมายที่จำเพาะกับยีน โดยออกแบบเครื่องหมายที่อยู่ในยีน PPR9-782-M จากข้าวสายพันธุ์หมัน IR58025A และสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน KMR3R จากการวิเคราะห์ลำดับเบส ของสายพันธุ์ที่มียีนหมัน และสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน พบว่า ลำดับเบสของยีน *PPR9* เกิด Indel 3 บริเวณ คือ InDel 42 คู่เบส ในอินทรอนที่ 1, InDel 105 และ InDel 1,476 คู่เบส ในบริเวณเอกซอนที่ 2 และบริเวณที่เกิด InDel อยู่ทางเหนือ (upstream) ของยีน *PPR9-782-M* แล้วที่นำมาออกแบบเครื่องหมาย พบ 3 เครื่องหมายที่อยู่ใกล้ยีนมากที่สุด คือ RMS-PPR9-1 อยู่บริเวณ ที่เกิด InDel 42 คู่เบส และ 2 เครื่องหมาย คือ RMS-PPR9-4 และ RMS-PPR9-5 อยู่บริเวณเหนือของยีน PPR9-782-M ที่แสดงความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ IR58025A กับ KMR3R

Pongjaroenkit et al. (2017) พัฒนาเครื่องหมาย SNP ของยีนตำแหน่ง Rf4 คือ ยีน *PPR10* เพื่อใช้ในการระบุข้าวสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน และพันธุ์ที่รักษาความเป็นหมัน ด้วยการโคลนยีน *PPR10* จากข้าวไทย 4 สายพันธุ์ คือ ขาวดอกมะลิ 105 นางมลเอส-4 ปทุมธานี 1 และสุพรรณบุรี 1 เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสเทียบข้าวพันธุ์แก้หมัน (Minghui63 และ IR24) ข้าวพันธุ์รักษาความเป็นหมัน (93-11) แล้วพบ SNP บริเวณเบสที่ 1,392 (G/T) ซึ่งทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ nonsense จาก GAA เป็น TAA (stop codon) ทำให้เมื่อแปลรหัสเป็นโปรตีนแล้ว มีขนาดที่เล็กลง ออกแบบเครื่องหมาย SNP ที่จำเพาะกับยีน *PPR10* นำเครื่องหมายจำเพาะที่ได้นั้น มาใช้ในการจำแนกข้าวพันธุ์ข้าวสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน และพันธุ์ที่รักษาความเป็นหมันได้

บทที่ 3
อุปกรณ์ และวิธีการ

สารเคมี

1. Cetyl trimethylammonium bromine (CTAB)
2. 2-mercaptoethanol (BDH Biochemical™ , U.S.)
3. คลอโรฟอร์ม (Chloroform ,RCI Labscan, Thailand)
4. เอนไซม์ Ribonuclease A (RNase A)
5. แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (Absolute ethanol)
6. 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล
7. บัฟเฟอร์เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสำเร็จรูป My taq™ HS Red Mix, 2X (BIOLINE, UK)
8. มิเนอรัล ออย (Mineral oil)
9. อะกาโรส เจล (Agarose gel) (Invitrogen, USA)
10. สีย้อมดีเอ็นเอ RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (20,000x) (iNtRON BIOTECHNOLOGY, Korea)
11. ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 100 bp DNA plus DNA ladder (Thermo Scientific, USA)
12. บัฟเฟอร์ Tris borate EDTA (TBE)
13. สารละลายไอโอดีนโพแทสเซียมไอโอไดด์ (I_2-KI)

อุปกรณ์

1. เครื่อง Thermo Cycler T100™ Thermo Cycler และ C1000 Touch™ (Bio-rad, Singapore)
2. อุปกรณ์สำหรับทำ Electrophoresis (i-MyRun.N)
3. เครื่อง UV Transilluminator (Major Science®, Taiwan)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
5. ตู้บ่ม
6. เครื่อง homogenizer ในการตีตัวอย่าง
7. เครื่องเขย่า (vortex)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง Mini plate spinner

9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
10. ตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
11. ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
12. เครื่องวัดความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer (Thermo Scientific™, USA)
13. กล้องจุลทรรศน์
14. กล้องสเตอริโอไมโครสโคป (Stereo microscope)
15. กล้องไมโครสโคปแบบดิจิตอล (Digital Microscope)
16. ไมโครปิเปตแบบ 1 ช่อง (Micropipette: Single Channel Pipette), ไมโครปิเปตแบบหลายช่อง (Multi Channel Pipette) และไมโครปิเปตทิป (Micropipette tip)
17. หลอดไมโครทิวป์ (Microtubes)
18. เพลท 96 หลุม ขนาด 400 ไมโครลิตร (Deep well plate), เพลท 96 หลุม ขนาด 300 ไมโครลิตร (V-Shape microplate) และเพลทพีซีอาร์
19. แผ่นฟิล์มปิดเพลท (eXTReme™ sealing film)
20. กระถาง
21. แท็ก
22. ถุงซิป
23. แผ่นสไลด์ และแผ่นปิดสไลด์

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการวิจัย

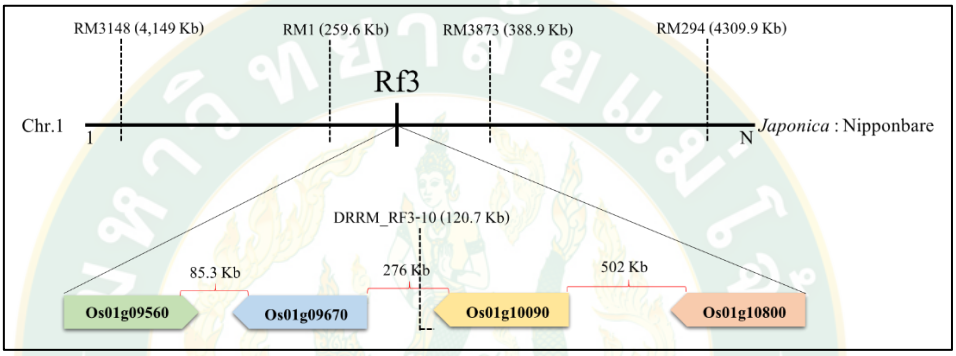
จากการทบทวนเอกสารงานวิจัยพบรายงานเครื่องหมายที่ใช้ในการแยกความแตกต่างของข้าวพันธุ์เรณูเป็นหมัน (A line) พันธุ์รักษาความเป็นหมัน (B line) และพันธุ์แก้หมัน (R line) ซึ่งเกี่ยวข้องกับยีนแก้ความเป็นหมัน ตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 ในระบบความเป็นหมันแบบ WA-CMS มีทั้งเครื่องหมายที่มีความจำเพาะกับยีน (Gene specific markers) และเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีน ซึ่งเครื่องหมายที่ใช้ในการศึกษานี้ จึงเป็นทั้งเครื่องหมายชนิด SSR (Simple Sequence Repeat) ที่มีความสัมพันธ์กับตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 (Nematzadeh and Kiani 2010, Revathi et al., 2013; Kiani, 2015) เครื่องหมายชนิด InDel (Suresh et al., 2012; Pranathi et al. 2016) และเครื่องหมาย SNP (Pongjaroenkit et al., 2017) ที่มีความจำเพาะต่อยีนควบคุมความเป็นหมันและยีนแก้ความเป็นหมันทั้ง 2 ตำแหน่ง (Suresh et al., 2012; Pranathi et al., 2016) ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 เครื่องหมายที่เกี่ยวข้องกับยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูตำแหน่ง Rf4 และ Rf3 ที่ใช้ในการศึกษา

เครื่องหมายดีเอ็นเอ	ลำดับเบส (5' to 3')	ยีน	ตำแหน่งบนโครโมโซม	ขนาด (คู่เบส)		อุณหภูมิ (°c)	อ้างอิง
				แก้หมัน	ไม่แก้หมัน		
เครื่องหมายจำเพาะกับยีน							
RMS_3_WA352	F:TGAGTGCCGCAGGATGATTTAG R:CAATGGAGGAGAACTTTCCTG	*WA352*	mitochondria	227	247	50	Kasama and Toriyama, 2014
DRRM_RF3_10	F:TCACCTCTTCCTGCTTCGAC R:CTCCACCAGTGCAGGTTTT	*Rf3*	1	150	140	55	Suresh *et al.*, 2012
RMS_PPR9-1	F:GAGTTTTGAATAGATTTACGTGTGGA R:AGTGTCCAGATTCGTAGTAATGC	*Rf4*	10	114	159	55	Pranathi *et al.*, 2016
RMS_PPR9-4	F:AACGTTACTATTCACCTC R:AGCTTTGCTAGTCTTCCAG	*Rf4*	10	129	160	50	Pranathi *et al.*, 2016
InDel_PPR9	F:TTCAGCAAAATGAGGCAGCA R:GAAGTGCCTCGTCAGTGAG	*Rf4*	10	730	800	65	Unpublished data
PPR10	F:AGAAGGCTGAGGAGTTAATTTTTG R:CTGGACAGATGCCTTGATCCAACATTTA F:CAAAATGAGGCAGCAAGGAT R:CCGATCGATGCACATATGAC	*Rf4*	10	603/ 242	603/ 416	60	Pongjaroenkit *et al.*, 2017
เครื่องหมาย SSR							
RM315	F:CGGTCAAATCATCACCTGAC R:CAAGGCTTGCAAGGGAAG	*Rf3*	1	133	139	55	Kiani, 2015
RM443	F:GGGAGTTAGGGTTTTGGAGC R:TCCAGTTTCACACTGCTTCG	*Rf3*	1	109	112	55	Kiani, 2015
RM1	F:GCGAAAACACAATGCAAAAA R:GCGTTGGTTGGACCTGAC	*Rf3*	1	110	113	55	Kiani, 2015
RM3148	F:GACTATTGCTCGAACACTTTG R:TTGTCTTGCTTTGGTATTTGC	*Rf3*	1	170	155	58	Kiani, 2015
RM294	F:TTGGCCTAGTGCCTCCAATC R:GAGGGTACAACTTAGGACGCA	*Rf3*	1	140/ 185	165/ 185	55	Jing *et al.*, 2001
RM3873	F:GCTAGCTAGGACCGACATGC R:CCTCCTCCTTATCCTCCCTG	*Rf3*	1	200	140	55	Rice base
RM171	F:AACGCGAGGACACGTACTTAC R:ACGAGATACGTACGCCTTTG	*Rf4*	10	350	340	55	Nematzade and Kiani, 2010
RM258	F:TGCTGTATGTAGCTCGCACC R:TGGCCTTTA AAGCTGTCGC	*Rf4*	10	155	170	55	Kiani, 2015
RM6100	F:TTCCCTGCAAGATTCTAGCTACACC R:TGTTCGTCGACCAAGAACTCAGG	*Rf4*	10	185	175	55	Revathi *et al.*, 2013
RM591	F:CGGTTAATGTCATCTGATTGG R:TTCGAGATCCAAGACTGACC	*Rf4*	10	183	184	55	Kiani, 2015
RM3123	F:ATTTCCCACACATCTCGCTG R:GTGTCGCCGGTCAAGAAC	*Rf4*	10	194	191	55	Kiani, 2015

ตำแหน่งที่ตั้งของเครื่องหมายของยีนควบคุมลักษณะแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf3

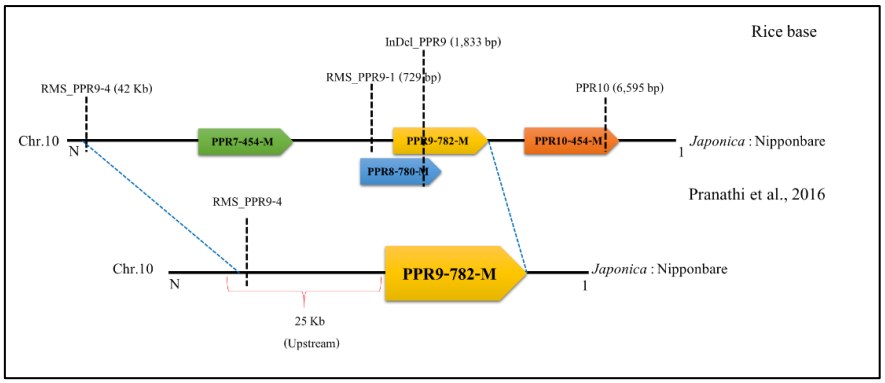
การสืบค้นตำแหน่งบนโครโมโซมของเครื่องหมายที่จำเพาะ และสัมพันธ์กับยีนควบคุมลักษณะแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf3 บนโครโมโซมที่ 1 ประกอบด้วยยีน 4 ยีน คือ *Os01g09560, Os01g09670, Os01g10090* และ *Os01g10800* (Suresh et al., 2012) พบ เครื่องหมายที่จำเพาะกับยีนตำแหน่ง Rf3 คือ DRRM_Rf3_10 ซึ่งอยู่ใกล้กับยีน *Os01g10090* ในส่วนของเครื่องหมาย SSR ที่สัมพันธ์กับยีนตำแหน่ง Rf3 พบเครื่องหมาย RM1, RM3873, RM3148 และ RM294 เป็นเครื่องหมายที่อยู่บริเวณเหนือยีน (upstream) และท้ายยีน (downstream) ตามลำดับ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ตำแหน่งที่ตั้งของเครื่องหมายที่จำเพาะ และเครื่องหมาย SSR ที่สัมพันธ์กับยีนแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf3 บนโครโมโซมแท่งที่ 1 โดยตัวเลขในวงเล็บของเครื่องหมาย RM คือ ระยะห่างจากยีนตำแหน่ง Rf3

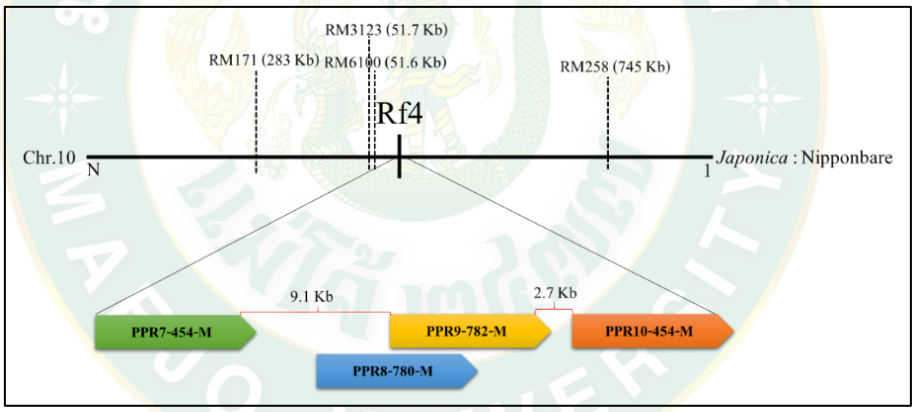
ตำแหน่งที่ตั้งของเครื่องหมายของยีนควบคุมลักษณะแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf4

การสืบค้นตำแหน่งบนโครโมโซมของเครื่องหมายที่จำเพาะ และสัมพันธ์กับยีนควบคุมลักษณะแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf4 บนโครโมโซมที่ 10 ประกอบไปด้วย 4 ยีน คือ *PPR7*, *PPR8*, *PPR9* และ *PPR10* โดยเครื่องหมายที่จำเพาะกับยีนแต่ไม่ได้อยู่ภายในยีน คือ เครื่องหมาย RMS_PPR9-4 ซึ่งอยู่เหนือยีนประมาณ 4.2 กิโลเบส เครื่องหมายที่อยู่ภายในยีน คือ RMS_PPR9_1, InDel_PPR9 และเครื่องหมาย PPR10 ตามลำดับ (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ตำแหน่งที่ตั้งของเครื่องหมายที่จำเพาะกับยีนแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf4 บนโครโมโซมแท่งที่ 10 โดยตัวเลขในวงเล็บของเครื่องหมาย RM คือ ระยะห่างจากยีน *PPR9*

ในส่วนของเครื่องหมาย SSR ที่สัมพันธ์กับยีนตำแหน่ง Rf4 โดยมีเครื่องหมายที่อยู่บริเวณเหนือยีนตำแหน่ง Rf4 คือ RM6100, RM3123 และ RM171 เครื่องหมายที่บริเวณท้าย (downstream) ยีนตำแหน่ง Rf4 คือ RM258 (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ตำแหน่งที่ตั้งของเครื่องหมาย SSR ที่สัมพันธ์กับยีนแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf4 บนโครโมโซมแท่งที่ 10 โดยตัวเลขในวงเล็บของเครื่องหมาย RM คือ ระยะห่างจากยีน *PPR9*

วิธีการทดลอง

1. พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา

1.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดสอบเครื่องหมายมี ดังนี้ สายพันธุ์เรณูเป็นหมัน (A-line) คือ พันธุ์ IR58025A สายพันธุ์รักษาความเป็นหมัน (B-line) คือ พันธุ์ IR58025B ขาวดอกมะลิ 105 หอมนิล นางมล เอส-4 ปิ่นแก้ว 56 กข21 บาสมาติ และหอมมะลิแดง สายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน (R-line) คือ พันธุ์ปทุมธานี 1 สุพรรณบุรี 1 ชัยนาท 1 ปราจีนบุรี 2 ลูกแดงปัตตานี สังข์หยดพัทลุง กข 47 และ กข49

1.2 พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษายีนแก้หมันของเรณู ซึ่งในการศึกษาข้าวลูกผสมมีการใช้ข้าว 3 สายพันธุ์ ดังนี้ สายพันธุ์เรณูเป็นหมัน (A-line) คือ พันธุ์ IR58025A, และพันธุ์ทดสอบ 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และสุพรรณบุรี 1

2. การสร้างลูก F_1 และประชากร F_2 เพื่อใช้ในการศึกษาจีโนไทป์ และศึกษาลักษณะฟีโนไทป์

นาปรัง ปี 59 ผลิตเมล็ด F_1 โดยการผสมระหว่าง พันธุ์ IR58025A กับ สุพรรณบุรี 1

นาปี ปี 59 ผลิตเมล็ด F_1 โดยการผสมระหว่าง พันธุ์ IR58025A กับ ขาวดอกมะลิ 105

นาปี ปี 59 ผลิตเมล็ด F_2 ของ IR58025A x สุพรรณบุรี 1 โดยการปลูกเมล็ด F_1 แล้วปล่อยให้ผสมตัวเอง

นาปี ปี 60 ผลิตเมล็ด F_2 ของ IR58025A x ขาวดอกมะลิ 105 โดยการปลูกเมล็ด F_1 แล้วปล่อยให้ผสมตัวเอง

นาปรัง ปี 61 ปลูกต้น F_2 ได้เป็นประชากร F_2 ของ IR58025A x ขาวดอกมะลิ 105 จากเมล็ดจำนวน 100 เมล็ด สามารถงอกเป็นต้นได้ 9 ต้น และประชากร F_2 ของ IR58025A x สุพรรณบุรี 1 จำนวน 100 เมล็ด สามารถงอกเป็นต้นได้ 53 ต้น

นาปี ปี 62 ผลิตเมล็ด F_2 ของ IR58025A x สุพรรณบุรี 1 เพิ่มเติม โดยการปลูกเมล็ด F_1 แล้วปล่อยให้ผสมตัวเอง

นาปรัง ปี 62 ปลูกต้น F_2 ได้เป็นประชากร F_2 ของ IR58025Axสุพรรณบุรี 1 จากเมล็ดจำนวน 200 เมล็ด สามารถงอกเป็นต้นได้ 181 ต้น

3. การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าว พันธุ์ IR58025A, พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์สุพรรณบุรี 1, F_1 และประชากร F_2 ด้วยวิธี modified Cetyl trimethylammonium bromine (mCTAB) ด้วยวิธีการดังนี้

3.1 ใส่เม็ดบีท และใบสดประมาณ 20 มิลลิกรัม ลงในเพลท 96 หลุม (Deep well plate) เติมสารละลาย mCTAB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตีตัวอย่างด้วยเครื่อง homogenizer ทำการตี 2 รอบ ใช้เวลา 1 นาที 30 วินาที/รอบ แล้วเติมสารละลาย mCTAB ปริมาตร 150 ไมโครลิตร

3.2 บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3.3 เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที

3.4 ย้ายส่วนใสด้านบนประมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่เพลท 96 หลุมใหม่ (Deep well plate) จากนั้นเติมเอนไซม์ RNase ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 1-2 ไมโครลิตร

3.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที

3.6 เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

3.7 ย้ายส่วนใสด้านบนประมาณ 80 ไมโครลิตร ในเพลท 96 หลุม (V-shape microplate) เติมแอลกอฮอล์บริสุทธ์ (เย็น) ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใสที่มีอยู่ในเพลท ประมาณ 160 ไมโครลิตร

3.8 บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (ข้ามคืน)

3.9 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

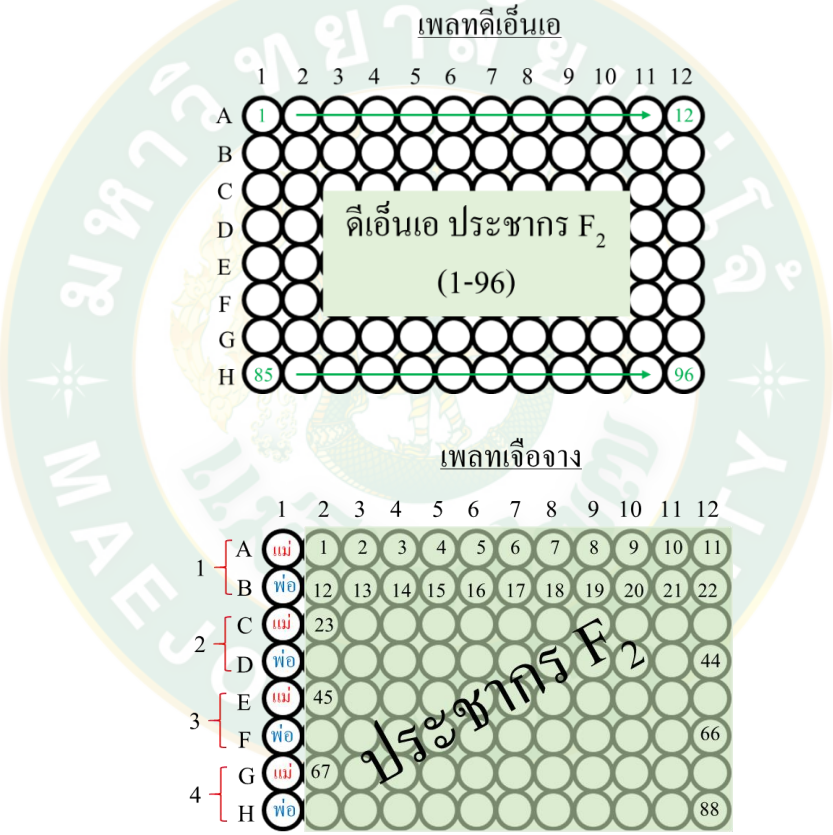
3.10 ตะกอนดีเอ็นเอจะพบที่บริเวณก้นเพลท เทส่วนใสด้านบนทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (ทำซ้ำ 2 รอบ)

3.11 ตากตะกอนดีเอ็นเอ เป็นเวลา 30 นาที สังเกตตะกอนเริ่มเปลี่ยนจากสีขาวขุ่นเป็นสีขาวใส ทำการละลายตะกอนด้วย สารละลาย 10 mM Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 15 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือจนตะกอนละลาย นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง Nanodrop 8000

3.12 ทำการเจือจางดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ให้มีความเข้มข้นประมาณ 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ในขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอ และเจือจางดีเอ็นเอมีการทำในระบบเพลท รวมไปถึงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จึงได้มีการเรียงลำดับในการเจือจางเพื่อให้สะดวก และไม่เกิดความผิดพลาดในขั้นตอนต่อไป รูปแบบในการเจือจางจากเพลทดีเอ็นเอที่สกัดได้ มาเป็นเพลทดีเอ็นเอ (เพลทเจือจาง) ที่มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ซึ่ง

1 เพลท มี 96 หลุม (แนวยาว 1-12, แนว A-H) โดยในเพลทดีเอ็นเอจะมีการเรียงลำดับของตัวอย่างตามปกติ คือ ตัวอย่างที่ 1-96 อยู่หลุม 1A-12H ตามลำดับ เมื่อทำการเจือจางจะมีการนำตัวอย่างต้นแม่ และต้นพ่อมาเจือจางในเพลทด้วย โดยนำดีเอ็นเอต้นแม่เจือจางในหลุม 1A ส่วนดีเอ็นเอต้นพ่อเจือจางในหลุม 1B โดยจะสลับการเจือจางดีเอ็นเอต้นแม่ และต่อไปเรื่อยๆ ในแถวที่ 1 จนกระทั่งถึง 1G และ 1H ใน 1 เพลท จะมีดีเอ็นเอของแม่ และพ่อ 4 ชุด ในส่วนของหลุมที่เหลือ จะเป็นตัวอย่างของดีเอ็นเอประชากร F_2 ต้นที่ 1-88 โดยเริ่มที่ หลุม 2A-12H ทำเช่นนี้จะกระทั่งครบทุกตัวอย่าง ในการเจือจางนั้นจะใช้ไมโครปิเปตแบบหลายช่องในการดูดน้ำกลั่น และดีเอ็นเอตัวอย่าง ใส่ลงในเพลท (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 การเรียงลำดับในเพลทที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอ และเพลทเจือจางดีเอ็นเอ

4. การศึกษาจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

การศึกษาจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอในงานวิจัยนี้ ใช้เครื่องหมายของยีนควบคุมลักษณะความเป็นหมันของเรณูในระบบ WA-CMS ที่มีอยู่ในข้าวสายพันธุ์ที่มีเรณูเป็นหมันในที่นี้คือ ข้าวพันธุ์ IR58025A ที่มียีน *WA352* ที่ควบคุมความเป็นหมันของเรณูอยู่ในไมโทคอนเดรีย และมีการศึกษายีนควบคุมลักษณะแก้หมันของเรณูที่อยู่ในนิวเคลียส คือ ยีนตำแหน่ง Rf4 และ Rf3 ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และสุพรรณบุรี 1

4.1 การตรวจสอบยีน *WA352* ที่ควบคุมลักษณะความเป็นหมันของเรณูในระบบ WA-CMS

การตรวจสอบยีนควบคุมลักษณะความเป็นหมันของเรณู โดยใช้เครื่องหมาย RMS_3_WA352 ดังตารางที่ 3 ที่มีความจำเพาะกับยีน *WA352* ในการตรวจสอบ ข้าวพันธุ์ IR58025A ขาวดอกมะลิ 105 สุพรรณบุรี 1 ลูกผสม F_1 และประชากร F_2 ของข้าวพันธุ์ที่ทำการศึกษา

4.2 การตรวจสอบยีนควบคุมลักษณะแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf4

การตรวจสอบยีนควบคุมลักษณะแก้หมันของเรณู ตำแหน่ง Rf4 บนโครโมโซม ที่ 10 โดยใช้เครื่องหมายที่จำเพาะกับยีนในตำแหน่ง Rf4 จำนวน 4 เครื่องหมาย คือ RMS_PPR9-1, RMS_PPR9-4, InDel_PPR9 และ PPR10 เครื่องหมาย SSR ที่มีรายงานว่าสัมพันธ์กับยีนแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf4 จำนวน 5 เครื่องหมาย คือ RM171, RM258, RM6100, RM591 และ RM3123 โดยใช้เครื่องหมายเหล่านี้ตรวจสอบยีนแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf4 กับข้าวพันธุ์ IR58025A ขาวดอกมะลิ 105 สุพรรณบุรี 1 ลูกผสม F_1 และประชากร F_2 ของข้าวพันธุ์ที่ทำการศึกษา

4.3 การตรวจสอบยีนควบคุมลักษณะแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf3

การตรวจสอบยีนควบคุมลักษณะแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf3 บนโครโมโซมที่ 1 โดยใช้เครื่องหมายที่จำเพาะกับยีนในตำแหน่ง Rf3 จำนวน 1 เครื่องหมาย คือ DRRM_RF3_10 (ตารางที่ 3) เครื่องหมาย SSR ที่มีรายงานว่าสัมพันธ์กับยีนตำแหน่ง Rf3 จำนวน 7 เครื่องหมาย คือ RM315, RM443, RM1, RM3148, RM294, RM3873 และ RM3123 (ตารางที่ 3) โดยใช้เครื่องหมายเหล่านี้ตรวจสอบยีนแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf3 กับข้าวพันธุ์ IR58025A ขาวดอกมะลิ 105 สุพรรณบุรี 1 ลูกผสม F_1 และประชากร F_2 ของข้าวพันธุ์ที่ทำการศึกษา

4.4 การศึกษาจีโนไทป์ด้วยเทคนิค PCR การศึกษาจีโนไทป์จะทำในเพลทพีซีอาร์ 96 หลุม ซึ่งรูปแบบของเพลทพีซีอาร์จะมีรูปแบบเหมือนกันกับเพลทที่เจือจาง โดยมีวิธีการดังนี้

4.4.1 เตรียม ปฏิกิริยาลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร สำหรับ 96 ตัวอย่าง (1 เพลท) ประกอบด้วยบัฟเฟอร์เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอสำเร็จรูป 2X My Taq HS Red Mix, ไพรเมอร์ ทั้ง 2 สาย และน้ำกลั่น จากนั้นผสมให้เข้ากัน ดังตารางที่ 4 (เตรียมปฏิกิริยาบนน้ำแข็ง)

4.4.2 นำปฏิกิริยาในหลอด 1.5 มิลลิลิตรจากข้อที่ 4.4.1 ใส่ลงในเพลทโดยใช้ไมโครปิเปตแบบ 1 ช่องทำการใส่ปฏิกิริยาลงในหลุม จากนั้นใส่ดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร โดยใช้ไมโครปิเปตแบบหลายช่องดูดตัวอย่างดีเอ็นเอจากเพลทเจือจาง (จากขั้นตอนการสกัดก่อนหน้านี้) ใส่ในเพลทพีซีอาร์ โดยปฏิกิริยามีปริมาตรสุดท้ายเป็น 15 ไมโครลิตร

4.4.3 ใส่มิเนอรัล ออย ปริมาตร 10 ไมโครลิตร/หลุม โดยใช้ไมโครปิเปตแบบ 1 ช่อง และติดด้วยฟิล์มปิดเพลทเพื่อป้องกันการระเหยของปฏิกิริยา ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Mini plate spinner เป็นเวลา 5 วินาที

4.4.4 นำเพลทเข้าเครื่อง Thermo Cycler เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ และตั้งสภาวะเพื่อทำการเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอดังตารางที่ 5 เมื่อครบเวลานำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของการเตรียมปฏิกิริยาในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ

องค์ประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย (1 ตัวอย่าง)
2X My Taq HS Red Mix	1X
ไพรเมอร์ที่ 1 (Forward)	0.5 ไมโครโมลาร์
ไพรเมอร์ที่ 2 (Reverse)	0.5 ไมโครโมลาร์
น้ำกลั่น	-
ดีเอ็นเอตัวอย่าง	10 นาโนกรัม

ตารางที่ 5 สภาวะในการทำ PCR

	อุณหภูมิ	**เวลา**	**จำนวนรอบ**
Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	5 นาที	1
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	45
Annealing	X องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	45 วินาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	1

หมายเหตุ : X หมายถึง อุณหภูมิในขั้นตอน Annealing จะขึ้นอยู่กับ Tm (Melting temperature) ของไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ใช้ในการทดสอบ

4.5 วิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยการทำอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ด้วยวิธีการดังนี้

4.5.1 ทำการชั่งเจล และตวงบัพเฟอร์ 0.5XTBE หากเตรียม 1 เปอร์เซ็นต์ ชั่งเจล 1 กรัม ต่อ บัพเฟอร์ 100 มิลลิลิตร

4.5.2 หลอมเจล โดยใช้ไมโครเวฟ จนกระทั่งเจลละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ใส่สีย้อมเจล (1 ไมโครลิตร/ เจล 25 มิลลิลิตร) เทใส่พิมพ์ที่เตรียมไว้ ซึ่งพิมพ์ประกอบไปด้วย ถาดเจล และหวี รอเจลแข็งตัวในที่มืด เนื่องจากมีการใส่สีย้อมลงไปในเจลหากไม่นำไว้ในที่มืดสีจะเสื่อมสภาพ

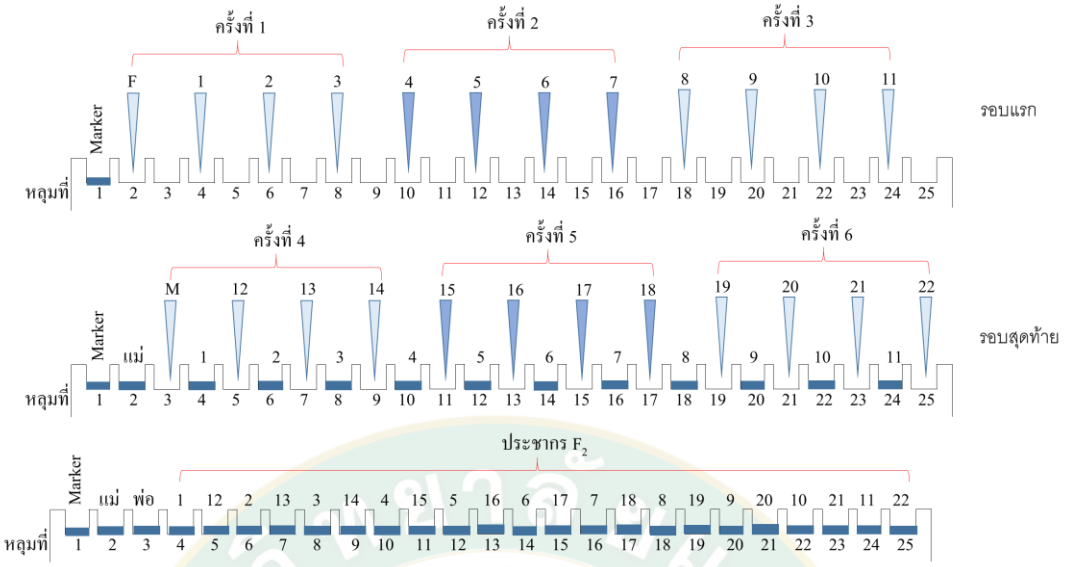
4.5.3 เมื่อเจลแข็งตัวทำการดึงหวีออกจากเจล โดยในเจลขนาดใหญ่ 1 เจลจะมีหลุม 25 หลุม และนำเจลใส่ในชุดอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส เทบัฟเฟอร์ 0.5XTBE ให้ท่วมเจล

4.5.4 ใส่ดีเอ็นเอมาตรฐานไว้หลุมแรก เพื่อเป็นตัวบอกขนาดของตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ

4.5.6 ใส่ตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ (PCR product) ลงในหลุม โดยใช้ไมโครปิเปตแบบหลายช่อง โดย 1 เพลท จะใช้เจลทั้งหมด 4 เจล ใน 1 เจล จะประกอบไปด้วยตัวอย่างของแม่, พ่อ และประชากร F_2 จำนวน 22 ต้น ดังภาพที่ 10

ภาพที่ 10 รูปแบบ และการเรียงลำดับของตัวอย่างที่ทำการศึกษาในเพลทพีซีอาร์

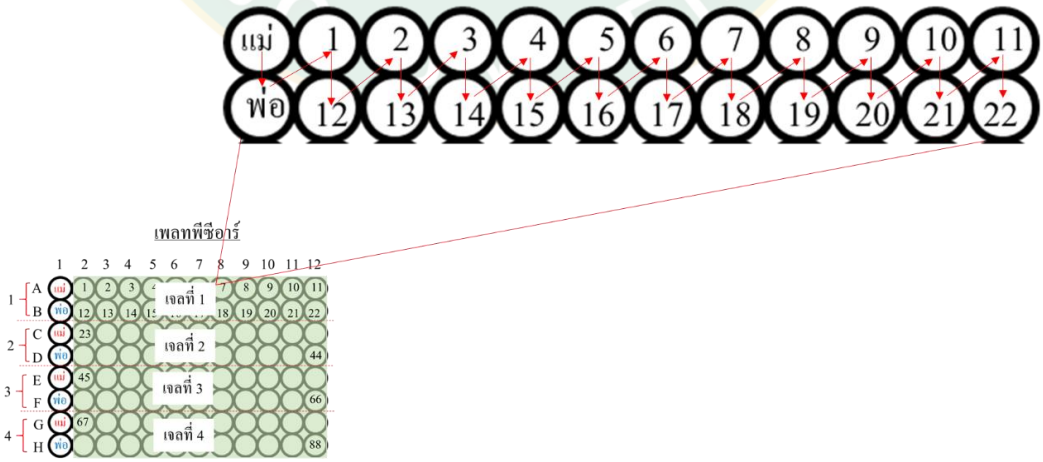
แต่ลำดับในการใส่ตัวอย่างลงในหลุมนั้น ไม่เรียงกัน เนื่องจากการใช้ปิเปตแบบหลายช่อง ทำให้ลำดับในการใส่ตัวอย่างลงในเจลนั้น ไม่เหมือนกับลำดับในเพลทพีซีอาร์ เนื่องจากระยะห่างของช่องปิเปตกับระยะห่างของหลุมในเจลไม่เท่ากัน เป็นผลทำให้ในการใส่ตัวอย่างในเจล 1 ครั้ง ได้ครั้งละ 4 ตัวอย่าง ยกตัวอย่างเช่น เจลที่ 1 การดูดตัวอย่างจากเพลทครั้งที่ 1 จะดูดตัวอย่างของ ต้นแม่ ประชากร F_2 ต้นที่ 1-3 แต่ในการใส่ลงในหลุมนั้น ตัวอย่างทั้ง 4 จะอยู่ในหลุมที่ 2, 4, 6 และ 8 ในการใส่ตัวอย่างครั้งที่ 2 ต้องเว้น 1 หลุม ก่อนที่ใส่ครั้งที่ 2 คือ ตัวอย่างที่ 4-7 เมื่อถึงการใส่ครั้งที่ 4 คือ ตัวอย่าง ต้นพ่อ ประชากร F_2 ต้นที่ 12-14 จะทำการใส่หลุมที่ 3, 5, 7 และ 9 ทำการใส่ตัวอย่างจนครบทุกหลุม ดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 ตัวอย่างรูปแบบ และลำดับในการใส่ตัวอย่างในเจล 1 เจล โดยใช้ปิเปตแบบหลายช่อง

4.5.7 เมื่อใส่ตัวอย่างเสร็จ ทำการให้กระแสไฟฟ้า และตั้งเวลาในขั้นตอนนี้ต้องทำในที่มืด เช่นเดียวกับการเตรียมเจล เพื่อลดการเสียสภาพของสีย้อมเจล

4.5.8 เมื่อครบเวลาทำการถ่ายรูปเจลโดยใช้เครื่อง UV Transilluminator เพื่อทำการวิเคราะห์ผล และจีโนไทป์ของข้าวที่ทำการศึกษา ซึ่งลำดับของตัวอย่างเมื่ออ่านผลจากรูปเจลจะเป็นไปตามลูกศร ดังภาพที่ 12 เป็นการยกตัวอย่างจากผลของการวิเคราะห์ 1 เจล โดยลำดับแรกเริ่มจากต้นแม่ ต้นพ่อ ประชากร F_2 ต้นที่ 1, 12, 2, 13, 3, 14 เป็นต้น ซึ่งผลจากภาพเจลจะมีการเรียงลำดับเช่นนี้ เหมือนกันทุกเจล



ภาพที่ 12 ลำดับที่ได้จากการใส่ตัวอย่างในเจลแบบใช้ปิเปตแบบหลายช่อง

5. การศึกษาลักษณะฟีโนไทป์จากความมีชีวิตเรณู และเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด

การศึกษาความมีชีวิตของเรณู โดยการนำเรณู มาย้อมด้วยสารละลาย I_2-KI (กนกวรรณ, 2559 และทุเรียน, 2560) ส่องภายใต้จุลทรรศน์ และถ่ายภาพด้วยกล้องไมโครสโคปแบบดิจิตอล โดยข้าว 1 ต้นทำการย้อมเรณูทั้งหมด 3 ช่อดอก ช่อดอกละ 3 ซ้ำ ทำการนับเรณูที่มีชีวิต ซึ่งเรณูมีชีวิตจะมีรูปร่างกลม ติดสีเข้ม แต่เรณูที่ไม่มีชีวิตจะมีรูปร่างบิดเบี้ยว ไม่ติดสี และคำนวณเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูโดยใช้สูตร ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู (\%)} = \frac{\text{จำนวนเรณูที่ติดสี}}{\text{จำนวนเรณูทั้งหมด}} \times 100$$

การศึกษาเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดโดยเก็บเมล็ดแก่ สังเกตจากเปลือกหุ้มเมล็ดเริ่มเป็นสีเหลืองชีด ทำการเลือกรวงข้าว 3 รวงจาก 1 ต้นมาทำการนับเมล็ด โดยจะนับเมล็ดดี และเมล็ดฝ่อต่อรวง จากนั้นนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด (\%)} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดดี}}{\text{จำนวนเมล็ดทั้งหมด}} \times 100$$

นอกจากนี้ยังมีการใช้ความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ดดีในการจัดจำแนกกลุ่มข้าวที่ต้องการทดสอบว่าเป็นข้าวพันธุ์รักษาความเป็นหมัน หรือพันธุ์แก้หมัน ด้วยการนำพันธุ์ข้าวที่ต้องการทดสอบผสมกับพันธุ์เรณูเป็นหมัน จากนั้นนำลูก F_1 มาศึกษาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ด โดยสามารถจัดกลุ่มข้าวที่ทดสอบด้วยค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู และเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดของต้น F_1 แบ่งกลุ่มได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มหมัน, กลุ่มหมันบางส่วน, กลุ่มปกติบางส่วน และกลุ่มปกติ ตามเกณฑ์ ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การจัดกลุ่มพันธุ์ข้าวด้วยความมีชีวิตของเรณูและการติดเมล็ด ของต้น F_1 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ข้าวที่ต้องการศึกษากับสายพันธุ์เรณูเป็นหมัน

กลุ่ม	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู	เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด
หมัน (Stertile :S)	น้อยกว่า 5	น้อยกว่า 1
หมันบางส่วน (Partially Stertile : PS)	5.1-50	1-30
ปกติบางส่วน(Partially Fertile : PF)	50.1-80	31-80
ปกติ (Fertile : F)	มากกว่า 80	81-100

ที่มา : ดวงพร และคณะ (2556); Hasan et al. (2015)

6. การศึกษาความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และลักษณะฟีโนไทป์

6.1 ศึกษาการทำงานของยีนที่ควบคุมลักษณะแก้หมันของเรณูจากลักษณะฟีโนไทป์

โดยการนำข้อมูลจากการย้อมเรณู และการนับเมล็ดดีของประชากร F_2 ของพันธุ์ข้าวที่ศึกษา คือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และสุพรรณบุรี 1 มาทดสอบไคกำลังสอง (Chi-square test) จากการตั้งสมมติฐานที่ว่า หากลักษณะแก้หมันของเรณูควบคุมด้วยยีน 1 คู่ จะทำให้อัตราส่วนเรณูปกติต่อเรณูเป็นหมันของประชากร F_2 เป็น 3:1 ตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล

6.2 ศึกษาความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ และลักษณะฟีโนไทป์ในประชากร F_2

โดยนำข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้จากการทดสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอและลักษณะฟีโนไทป์ จากการย้อมเรณูด้วยสารละลาย I_2-KI และนับเมล็ดดี มาทำการวิเคราะห์รวมกัน และหาความสัมพันธ์ของข้อมูลจีโนไทป์ และลักษณะฟีโนไทป์ที่ได้ด้วย ANOVA และวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation : r) โดยโปรแกรม MINITAB

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์โมเลกุล หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

โรงเรือนกระจก สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทที่ 4
ผลการทดลอง และการอภิปราย

1. การจัดจำแนกกลุ่มของข้าวไทยในระบบ WA-CMS

1.1 การจำแนกด้วยเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู

ในระบบ WA-CMS จะต้องใช้ข้าว 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์เรณูเป็นหมัน (A-line) สายพันธุ์รักษาความเป็นหมัน (B-line) และสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน (R-line) โดยที่ข้าวพันธุ์เรณูเป็นหมันนั้นจะเป็นสายพันธุ์ที่พัฒนาด้วยการนำยีนหมันของเรณูมาจากข้าวป่า ในขณะที่ข้าวพันธุ์ดีอื่นๆ นั้นจะนำมาศึกษาความสามารถในการแก้หมันของเรณู หากสามารถแก้ความเป็นหมันของเรณูได้จะจัดเป็นกลุ่มพันธุ์แก้หมัน แต่หากไม่สามารถแก้ความเป็นหมันของเรณูได้จะจัดเป็นกลุ่มพันธุ์รักษาความเป็นหมัน จึงมีการจัดจำแนกกลุ่มด้วยการศึกษาความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ดของลูก F_1 ที่ได้จากการผสมข้าวพันธุ์ที่ต้องการศึกษากับสายพันธุ์เรณูเป็นหมัน

ในการศึกษานี้ต้องการจัดกลุ่มข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และสุพรรณบุรี 1 จากการศึกษาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ดของลูก F_1 ของ IR58025Axขาวดอกมะลิ 105 และ IR58025Axสุพรรณบุรี 1 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู และเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดของข้าวพันธุ์ IR58025A, ขาวดอกมะลิ 105, สุพรรณบุรี 1, F_1 (IR58025Axขาวดอกมะลิ 105) และ F_1 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ทั้ง 2 ฤดู (นาปรังปี 61 และนาปรังปี 62)

ลำดับ	พันธุ์	% ความมีชีวิตของเรณู ($\bar{X}$±S.D.)*	% การติดเมล็ด ($\bar{X}$±S.D.)*
1	IR58025A	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0
2	ขาวดอกมะลิ 105	97.2 ±4.8	84.6 ±2.4
3	F_1 (IR58025Axขาวดอกมะลิ 105)	93.2 ±2.9	13.8 ±7.8
4	สุพรรณบุรี 1	86.8 ±2.2	67.1 ±9.9
5	F_1 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1)	77.0 ±11.2	21.5 ±9.3
6	สุพรรณบุรี 1	95.9 ±1.2	63.8 ±1.6
7	F_1 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1)	91.5 ±5.3	29.4 ±5.4

หมายเหตุ : * = ค่าเฉลี่ย ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

โดยผลการทดลอง พบว่า เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูของต้น F_1 (IR58025Axขาวดอกมะลิ 105) มีค่าเป็น 93.2 ±2.9 ทำให้จัดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อยู่ในกลุ่มแก้หมัน (R-line) ในขณะที่เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดจัดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อยู่ในกลุ่มหมันบางส่วน แต่เนื่องจากขณะที่ปลูกประชากร F_2 จำนวน 100 เมล็ด มีเมล็ดที่สามารถงอกเป็นต้นได้เพียง 9 เมล็ดคิดเป็น 9

เปอร์เซ็นต์ และประชากร F_2 จำนวน 9 ต้น มีเพียง 2 ต้นที่เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูเป็น 65.5 ±5.2 และ 90.4 ±6.1 และมีเพียงต้นเดียวที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด แต่ก็เป็นค่าต่ำ คือ 0.9 ±1.1 แสดงให้เห็นว่าไม่ควรจัดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นกลุ่มแก้หมัน ควรจะเป็นรักษาความเป็นหมัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าขาวดอกมะลิ 105 จะมียีนแก้หมันในระบบอื่น ๆ คล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Tan et al. (2008) ที่ทำการศึกษายีนแก้ความเป็นหมันของระบบความเป็นหมัน 3 ระบบ คือ WA-CMS, HL-CMS และ BT-CMS โดยแต่ละระบบจะมีสายพันธุ์ที่ให้ความเป็นหมันของเรณูแตกต่างกัน จากการสร้างลูกผสม F_1 ของสายพันธุ์แก้ความเป็นหมันจากหลายแหล่ง ทำการศึกษาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู และเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดของลูก F_1 ซึ่งผลการทดลองพบว่าข้าวสายพันธุ์ไทย คือ C3 สามารถทำให้เรณูมีชีวิตในระบบ WA-CMS ได้ 31.7 ±3.1 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ระบบ BT-CMS มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู 80.5 ±2.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าข้าวไทยสายพันธุ์นี้มียีนแก้หมันระบบ WA-CMS และระบบ BT-CMS ด้วยเช่นกัน

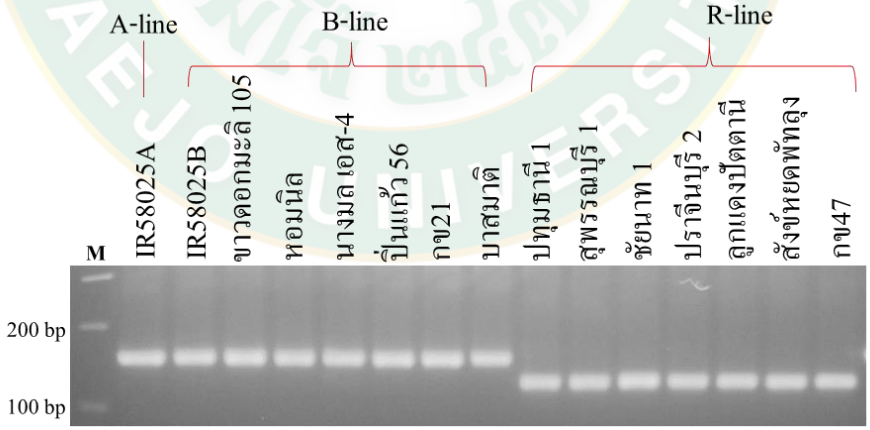
ในส่วนของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูของต้น F_1 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ฤดูนาปรังปี 61 มีค่าเป็น 77.0 ±11.2 จัดให้อยู่ในกลุ่มปกติบางส่วน เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดมีค่า 21.5 ±9.3 จัดอยู่ในกลุ่มของเป็นหมันบางส่วน เมื่อทำการปลูกประชากร F_2 จำนวน 100 เมล็ด สามารถงอกเป็นต้น 53 ต้น (53 เปอร์เซ็นต์) เป็นผลทำให้ต้องสร้างประชากร F_2 จากการปลูกต้น F_1 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ในฤดูนาปี ปี 62 ซึ่งเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู มีค่า 91.5 ±5.3 เปอร์เซ็นต์ จัดให้อยู่ในกลุ่มปกติ หรือแก้หมัน การติดเมล็ด มีค่า 29.4 ±5.4 จัดให้อยู่ในกลุ่มเป็นหมันบางส่วน และทำการปลูกประชากร F_2 เพิ่มอีก 200 เมล็ด สามารถงอกเป็นต้น 181 ต้น ส่วนเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดของประชากร F_2 ฤดูนาปรังปี 61 มีค่าเฉลี่ย 6.3 ±8.2 (0.0 ถึง 29.1 ±6.1) และนาปรังปี 62 มีค่าเฉลี่ย 28.1 ±24.9 (0.0 ถึง 80.7 ±2.1) โดยจะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดนั้นจะมีค่าแปรปรวนมาก ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากสิ่งแวดล้อมเพราะเป็นการปลูกในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งจากข้อมูลความมีชีวิตของเรณูของต้น F_1 และประชากร F_2 แสดงให้เห็นว่าควรจะจัดข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เป็นกลุ่มแก้หมัน หรือ R-line ส่วนการจัดกลุ่มด้วยการติดเมล็ดนั้น อาจไม่เหมาะสม เนื่องจากสิ่งแวดล้อมมีอิทธิพลกับการติดเมล็ด ดังงานวิจัยของ Seesang et al. (2014) ได้นำเสนอในทิศทางเดียวกัน เกี่ยวกับการติดเมล็ดของประชากร F_2 ที่ได้ทำการศึกษาความดีเด่น และการถ่ายทอดลักษณะแก้หมันในประชากร F_2 (IR580151AxCH1) และประชากร F_2 (IR580151AxCH4) โดยใช้ข้อมูลของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูเพียงอย่างเดียวในการศึกษายีนแก้หมัน เนื่องจากข้อมูลการติดเมล็ดมีอิทธิพลของสรีรวิทยา และสภาพแวดล้อมมาเกี่ยวข้องจึงไม่ได้นำข้อมูลในส่วนนี้มาทำการศึกษายีนแก้หมันด้วย อีกทั้งงานวิจัยของพีรพล และคณะ (2561) ทำการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะการติดเมล็ด ในสภาพเครียดจากความร้อนของประชากร F_2 (N22xกข31) พบว่า อุณหภูมิสูง

มีผลต่อลักษณะการติดเมล็ด ซึ่งสภาพอากาศในปัจจุบันมีความแปรปรวนเป็นอย่างมาก อาจเป็นผลทำให้เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดแปรปรวนตามไปด้วย

จากผลการจัดจำแนกจะพบว่า การจัดจำแนกกลุ่มของพันธุ์ข้าวด้วยความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ดของลูก F_1 ตามเกณฑ์ในตารางที่ 6 อาจจะมีความคลาดเคลื่อนที่อาจจะเกิดขึ้นได้จากยีนของระบบแก้หมันอื่น หรือความแปรปรวนทางสภาพแวดล้อม จึงทำให้มีการศึกษาการจัดจำแนกด้วยยีนแก้หมันของเรณูในระบบแก้หมันต่างๆ

1.2 การจัดจำแนกด้วยยีน *PPR9*

ในการศึกษานี้ได้จัดจำแนกกลุ่มของพันธุ์ข้าวด้วยการตรวจสอบยีนแก้หมัน Rf4 โดยนำเครื่องหมายที่มีความจำเพาะกับยีนมาจำแนกกลุ่มสายพันธุ์ข้าว ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และสุพรรณบุรี 1 ซึ่งในการศึกษานี้นำเครื่องหมายที่จำเพาะกับยีนแก้หมันตำแหน่ง Rf4 คือ เครื่องหมาย RMS_PPR9-4 ของยีน *PPR9* ที่มีรายงานว่าเป็นยีนแก้หมันของระบบ WA-CMS (Tang et al., 2014 และ Kazama and Toriyama, 2014) ที่ใช้ในการทดสอบจึงนำผลจากเครื่องหมายเหล่านี้ทำการจำแนกกลุ่ม พบว่า ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มสายพันธุ์ B เนื่องจากแสดงแถบดีเอ็นเอขนาดเดียวกันกับข้าวสายพันธุ์ IR58025A (A-line) (ภาพที่ 13) สำหรับข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มสายพันธุ์ R เนื่องจากแถบดีเอ็นเอมีขนาดต่างกันกับข้าวสายพันธุ์ IR58025A (ภาพที่ 13) เนื่องจากข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เป็นกลุ่มแก้หมันจึงนำลูกผสม F_1 และประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ไปศึกษาการทำงานของยีนแก้หมันระบบ WA-CMS ในการศึกษาต่อไป

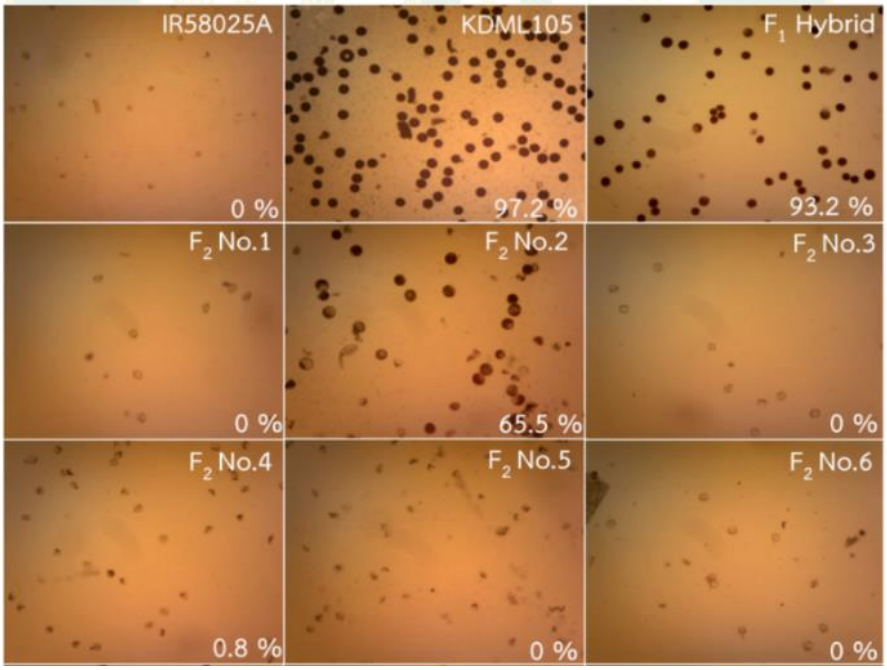


ภาพที่ 13 ผล 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ RMS_PPR9-4

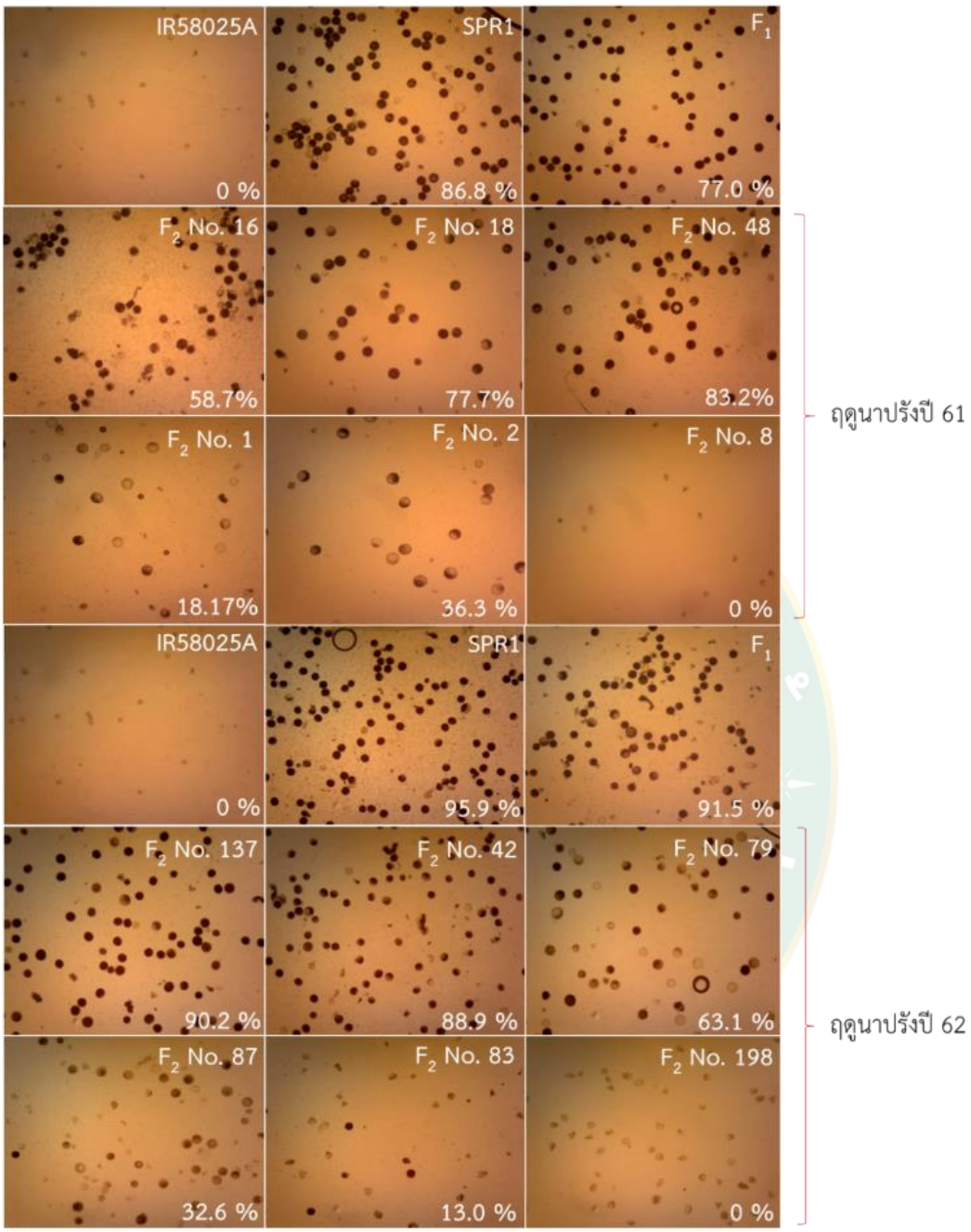
หมายเหตุ : เลน M คือ GeneRuler 100 bp DNA plus DNA ladder (Thermo Scientific, USA)

2. การศึกษาลักษณะแก้ความเป็นหมันจากข้อมูลความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ด

จากการย้อมเรณูด้วยสารละลาย I_2-KI เพื่อศึกษาลักษณะแก้ความเป็นหมันของเรณูในข้าวพันธุ์ IR58025A, ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1, ต้น F_1 และประชากร F_2 ของคู่ผสม IR58025Axขาวดอกมะลิ 105, ต้น F_1 และประชากร F_2 ของ คู่ผสม IR58025Axสุพรรณบุรี 1 ทั้ง 2 ฤดู (ภาพที่ 14 และ 15) โดยข้าวพันธุ์ IR58025A ที่มียีนหมันของเรณู และไม่มียีนแก้หมัน เมื่อทำการย้อมเรณูจะไม่ติดสีย้อม ลักษณะของเรณูเป็นสีเหลืองใส และรูปร่างบิดเบี้ยว ในส่วนของข้าวพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105, สุพรรณบุรี 1 เรณูจะติดสีเข้ม รูปร่างกลม ในส่วนของลูก F_1 พบว่า ลูก F_1 ของ IR58025Axขาวดอกมะลิ 105 และ IR58025Axสุพรรณบุรี 1 เรณูจะมีชีวิตเป็น 93.2 ±2.9 และ 91.5±5.3 ตามลำดับ สำหรับประชากร F_2 ของ IR58025Axขาวดอกมะลิ 105 มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตเป็น 0, 0.84 ±1.4, 65.5 ±5.2 และ 90.4±6.1 ตามลำดับ ในขณะที่ ความมีชีวิตของเรณูของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ในฤดูนาปรังปี 61 มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0 ถึง 99.0 ±1.8 มีค่าเฉลี่ย 67.1 ±35.5 ส่วนนาปรังปี 62 มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0 ถึง 95.7 ±4.7 มีค่าเฉลี่ย 65.7 ±30.8 ตามลำดับ (ตารางที่ 8-10)



ภาพที่ 14 ความมีชีวิตของเรณู จากการย้อมด้วยสารละลาย I_2-KI ของข้าวพันธุ์ IR58025A, ขาวดอกมะลิ 105, F_1 (IR58025Axขาวดอกมะลิ 105) และตัวอย่างของประชากร F_2 จำนวน 6 ต้น



ภาพที่ 15 ความมีชีวิตของเรณู จากการย้อมด้วยสารละลาย I_2-KI ของข้าวพันธุ์ IR58025A, สุพรรณบุรี 1, F_1 และตัวอย่างของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ฤดูนาปรังปี 61 และนาปรังปี 62 จำนวน 12 ต้น

นอกจากนี้ทำการนับเมล็ดดี และเมล็ดฝ่อข้าวพันธุ์ IR58025A, ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1, ต้น F_1 และประชากร F_2 ของ คู่ผสม IR58025Axขาวดอกมะลิ 105, ต้น F_1 และประชากร F_2 ของคู่ผสม IR58025Axสุพรรณบุรี 1 ทั้ง 2 ฤดูปลูก ทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 8-10

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู, เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด และการใช้เครื่องหมายที่จำเพาะและสัมพันธ์กับยีน *WA352* ตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 ทดสอบกับ IR58025A, ขาวดอกมะลิ105, F_1 และประชากร F_2

ลำดับ	พันธุ์	% ความมีชีวิตของเรณู ($\bar{X}$±S.D.)*	% การติดเมล็ด ($\bar{X}$±S.D.)*	WA352	Rf3		Rf4	
				RMS_3_WA352	RM3148	RM315	RM294	RM258
1	IR58025A	0 ±0.0	0 ±0.0	WA	A	A	A	A
2	KDM105	97.2 ±4.8	84.6 ±2.4	N-WA	K	K	K	K
3	F_1 Hybrid	93.2 ±2.9	13.8 ±7.8	WA	H	H	H	H
4	F_2 No.1	0 ±0.0	0 ±0.0	WA	H	H	H	H
5	F_2 No.2	65.5 ±5.2	0 ±0.0	WA	A	A	A	A
6	F_2 No.3	0 ±0.0	0 ±0.0	WA	H	H	H	H
7	F_2 No.4	0.8 ±1.4	0 ±0.0	WA	H	A	A	H
8	F_2 No.5	0 ±0.0	0 ±0.0	WA	A	K	H	A
9	F_2 No.6	0 ±0.0	0 ±0.0	WA	A	H	A	A
10	F_2 No.7	90.4 ±6.1	0.9 ±1.1	WA	K	K	K	H
11	F_2 No.8	0 ±0.0	0 ±0.0	WA	H	K	A	A
12	F_2 No.9	0 ±0.0	0 ±0.0	WA	H	H	H	H

หมายเหตุ : เครื่องหมายที่ศึกษายีนหมัน ให้จีโนไทป์เป็น N-WA = Non-WA352, WA = WA352 เครื่องหมายที่ศึกษายีนแก้ความเป็นหมันของเรณู ให้จีโนไทป์ตามชื่อพันธุ์ข้าว A = IR58025A, H = Heterozygous, K = ขาวดอกมะลิ 105, และ * = ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู, เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด และการใช้เครื่องหมายที่จำเพาะและสัมพันธ์กับยีน *WA352* ตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 ทดสอบกับ IR58025A, สุพรรณบุรี1, F_1 และประชากร F_2 (นาปรังปี 61)

ลำดับ	พันธุ์	% ความมีชีวิตของเรณู ($\bar{X}$±S.D.)*	% การติดเมล็ด ($\bar{X}$±S.D.)*	WA352	Rf3		Rf4	
				RMS_3_WA352	RM3148	RM3873	RMS_PPR9-4	PPR10
1	IR58025A	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	N-WA	A	A	NR	A
2	SPR1	86.8 ±2.2	67.1 ±9.9	WA	S	S	R	S
3	F_1 Hybrid	91.5 ±5.3	21.5 ±9.3	WA	H	H	H	H
4	F2.No32	99.0 ±1.8	3.2 ±0.7	WA	H	H	H	H
5	F2.No20	94.9 ±3.7	11.7 ±9.3	WA	S	H	R	S
6	F2.No6	94.7 ±2.9	17.5 ±7.4	WA	S	S	R	S
7	F2.No45	94.3 ±1.3	26.0 ±16.4	WA	H	H	R	S
8	F2.No26	93.8 ±2.8	18.9 ±9.0	WA	H	A	H	H
9	F2.No9	93.7 ±6.9	0.0 ±0.0	WA	H	A	R	S

ลำดับ	พันธุ์	% ความมีชีวิตของเรณู ($\bar{X}_{\pm S.D.}$)*	% การติดเมล็ด ($\bar{X}_{\pm S.D.}$)*	WA352	Rf3		Rf4	
				RMS_3_WA352	RM3148	RM3873	RMS_PPR9-4	PPR10
10	F2.No35	93.3 ±4.1	0.9 ±0.5	WA	S	S	R	S
11	F2.No2	92.9 ±6.3	0.8 ±1.3	WA	H	A	H	H
12	F2.No10	92.1 ±3.4	9.0 ±7.9	WA	S	S	H	H
13	F2.No30	91.8 ±5.8	29.1 ±6.1	WA	H	S	H	H
14	F2.No46	89.9 ±5.7	19.3 ±14.1	WA	S	H	H	H
15	F2.No14	89.8 ±3.4	0.0 ±0.0	WA	S	H	NR	A
16	F2.No24	89.7 ±4.5	2.6 ±0.5	WA	H	A	H	H
17	F2.No18	89.6 ±6.0	6.5 ±5.6	WA	H	H	H	H
18	F2.No39	89.6 ±1.1	8.4 ±1.5	WA	A	A	H	H
19	F2.No23	88.6 ±3.0	18.0 ±7.4	WA	H	A	H	H
20	F2.No5	88.5 ±6.0	0.0 ±0.0	WA	H	H	R	S
21	F2.No25	87.9 ±7.1	20.8 ±6.6	WA	H	A	R	S
22	F2.No15	87.9 ±5.5	3.6 ±3.0	WA	H	H	H	H
23	F2.No12	87.4 ±4.8	5.9 ±5.1	WA	H	H	H	H
24	F2.No17	87.0 ±5.7	22.0 ±2.4	WA	H	H	H	H
25	F2.No22	86.6 ±6.9	7.9 ±4.6	WA	H	H	H	H
26	F2.No13	86.0 ±2.8	0.0 ±0.0	WA	H	H	H	H
27	F2.No21	85.9 ±7.4	5.1 ±2.2	WA	S	H	H	H
28	F2.No27	85.5 ±0.9	2.3 ±3.7	WA	H	H	NR	A
29	F2.No4	85.4 ±3.9	0.1 ±0.2	WA	H	H	R	S
30	F2.No43	85.4 ±6.6	19.9 ±4.2	WA	H	H	H	H
31	F2.No16	85.1 ±5.5	0.0 ±0.0	WA	H	A	H	H
32	F2.No29	84.3 ±6.4	0.4 ±0.7	WA	H	S	H	H
33	F2.No48	83.2 ±7.6	3.6 ±4.0	WA	H	A	H	H
34	F2.No52	82.7 ±6.6	10.4 ±6.5	WA	H	A	R	S
35	F2.No19	82.6 ±7.7	3.8 ±3.4	WA	H	A	H	H
36	F2.No28	81.6 ±7.6	17.5 ±3.7	WA	S	S	H	H
37	F2.No41	81.5 ±7.9	0.0 ±0.0	WA	H	H	NR	A
38	F2.No36	75.6 ±6.1	10.9 ±7.8	WA	H	A	R	S
39	F2.No49	74.8 ±6.6	0.0 ±0.0	WA	H	A	H	H
40	F2.No7	74.0 ±6.9	2.3 ±1.9	WA	H	S	NR	A
41	F2.No42	72.3 ±4.1	4.3 ±1.7	WA	H	S	NR	A
42	F2.No34	67.9 ±6.8	0.0 ±0.0	WA	H	S	NR	A
43	F2.No53	67.0 ±6.1	3.9 ±6.5	WA	H	S	NR	A
44	F2.No33	57.1 ±5.0	18.2 ±3.5	WA	H	H	H	H
45	F2.No1	51.6 ±9.5	0.2 ±0.3	WA	S	H	H	H
46	F2.No11	2.5 ±4.4	0.0 ±0.0	WA	S	A	NR	A
47	F2.No3	1.4 ±2.4	0.0 ±0.0	WA	H	H	NR	A
48	F2.No31	1.2 ±2.1	0.0 ±0.0	WA	A	N	NR	A

ลำดับ	พันธุ์	% ความมีชีวิตของเรณู ($\bar{X}$±S.D.)*	% การติดเมล็ด ($\bar{X}$±S.D.)*	WA352	Rf3		Rf4	
				RMS_3_WA352	RM3148	RM3873	RMS_PPR9-4	PPR10
49	F2.No50	0.8 ±1.3	0.0 ±0.0	WA	H	H	NR	A
50	F2.No8	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	H	H	NR	A
51	F2.No37	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	H	H	NR	A
52	F2.No38	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	H	A	NR	A
53	F2.No40	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	H	A	NR	A
54	F2.No44	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	H	A	NR	A
55	F2.No47	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	H	A	NR	A
56	F2.No51	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	H	A	NR	A

หมายเหตุ : เครื่องหมายที่ศึกษายีนหมัน ให้จีโนไทป์เป็น N-WA = Non-WA352 และ WA = WA352 เครื่องหมายที่ศึกษายีนแก้ความเป็นหมันของเรณู RMS_PPR9-4 ให้จีโนไทป์เป็น R = Restorer, NR = Non- restorer ในส่วนของเครื่องหมายอื่น ให้จีโนไทป์ตามชื่อพันธุ์ข้าว A = IR58025A, S = สุพรรณบุรี 1, H = Heterozygous และ * = ค่าเฉลี่ย ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู, เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด และการใช้เครื่องหมายที่จำเพาะและสัมพันธ์กับยีน *WA352* ตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 ทดสอบกับ IR58025A, สุพรรณบุรี1, F_1 และประชากร F_2 (นาปรังปี 62)

ลำดับ	พันธุ์	% ความมีชีวิตของเรณู ($\bar{X}$±S.D.)*	% การติดเมล็ด ($\bar{X}$±S.D.)*	WA352	Rf3	Rf4	
				RMS_3_WA352	RM3873	RMS_PPR9-4	PPR10
1	IR58025A	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	A	NR	A
2	SRR1	95.9 ±1.2	63.8 ±1.6	N-WA	S	R	S
3	F_1 Hybrid	91.5 ±5.3	21.5 ±9.3	WA	H	H	H
4	F2 No.145	95.7 ±4.7	40.4 ±10.6	WA	H	R	S
5	F2 No.134	94.8 ±3.0	60.7 ±9.4	WA	A	H	S
6	F2 No.161	93.9 ±4.6	60.6 ±7.1	WA	H	H	H
7	F2 No.37	93.6 ±2.4	59.5 ±4.7	WA	A	H	S
8	F2 No.21	93.5 ±3.5	69.9 ±5.0	WA	A	H	H
9	F2 No.187	93.3 ±2.4	40.3 ±2.6	WA	H	R	S
10	F2 No.195	92.8 ±4.1	0.0 ±0.0	WA	H	H	H
11	F2 No.48	92.8 ±0.7	52.7 ±5.7	WA	A	H	H
12	F2 No.33	92.3 ±4.5	59.5 ±9.4	WA	A	NR	H
13	F2 No.181	91.5 ±2.9	25.3 ±12.7	WA	H	R	S
14	F2 No.89	91.3 ±2.4	43.3 ±12.2	WA	A	R	S
15	F2 No.159	90.5 ±4.7	70.9 ±5.1	WA	H	R	S
16	F2 No.146	90.4 ±4.2	/	WA	H	NR	H
17	F2 No.137	90.2 ±6.6	49.1 ±12.0	WA	H	H	S

ลำดับ	พันธุ์	% ความมีชีวิตของเรณู ($\bar{X}$±S.D.)*	% การติดเมล็ด ($\bar{X}$±S.D.)*	WA352	Rf3	Rf4	
				RMS_3_WA352	RM3873	RMS_PPR9-4	PPR10
18	F2 No.96	90.1 ±4.3	24.9 ±18.9	WA	A	NR	H
19	F2 No.43	89.8 ±3.1	51.5 ±12.4	WA	A	NR	H
20	F2 No.71	89.8 ±9.5	39.7 ±14.4	WA	A	H	H
21	F2 No.129	89.7 ±3.2	60.0 ±5.0	WA	H	R	S
22	F2 No.197	89.6 ±3.1	54.7 ±15.3	WA	A	H	S
23	F2 No.193	89.5 ±1.9	48.0 ±7.7	WA	A	R	S
24	F2 No.65	89.5 ±4.1	41.1 ±3.6	WA	A	H	S
25	F2 No.26	89.3 ±3.4	0.0 ±0.0	WA	H	H	H
26	F2 No.77	89.3 ±4.4	59.7 ±14.1	WA	A	H	A
27	F2 No.152	89.3 ±0.7	72.4 ±5.9	WA	H	H	H
28	F2 No.20	89.2 ±4.8	17.0 ±4.5	WA	A	H	H
29	F2 No.56	89.1 ±4.4	41.1 ±6.5	WA	H	H	H
30	F2 No.141	89.1 ±5.2	42.0 ±6.2	WA	H	H	H
31	F2 No.46	88.9 ±6.6	65.8 ±4.2	WA	A	NR	H
32	F2 No.42	88.9 ±0.4	51.9 ±8.3	WA	A	H	H
33	F2 No.117	88.8 ±3.8	/	WA	H	H	H
34	F2 No.27	88.8 ±8.1	48.2 ±4.8	WA	A	H	S
35	F2 No.18	88.3 ±6.3	66.8 ±5.5	WA	H	H	H
36	F2 No.135	88.2 ±1.6	55.3 ±6.1	WA	A	H	S
37	F2 No.105	88.2 ±4.5	26.2 ±23.4	WA	H	R	H
38	F2 No.49	87.3 ±7.0	43.3 ±8.0	WA	A	R	S
39	F2 No.130	87.3 ±6.4	32.1 ±0.6	WA	A	H	S
40	F2 No.138	87.1 ±4.0	68.9 ±0.9	WA	A	R	S
41	F2 No.169	87.0 ±5.4	47.6 ±8.0	WA	H	R	S
42	F2 No.160	86.9 ±4.2	60.7 ±6.1	WA	H	H	H
43	F2 No.194	86.7 ±6.5	0.0 ±0.0	WA	A	H	H
44	F2 No.143	86.7 ±1.9	49.0 ±6.5	WA	H	H	H
45	F2 No.1	86.7 ±3.6	11.0 ±5.3	WA	H	H	H
46	F2 No.93	86.7 ±7.0	0.0 ±0.0	WA	A	H	S
47	F2 No.38	86.5 ±1.3	62.1 ±9.5	WA	A	R	H
48	F2 No.123	86.3 ±7.1	5.9 ±5.0	WA	A	H	H
49	F2 No.58	86.2 ±2.8	68.7 ±7.2	WA	H	H	H
50	F2 No.64	86.2 ±2.9	13.4 ±9.2	WA	A	R	S
51	F2 No.32	85.8 ±7.5	32.6 ±7.7	WA	A	H	H
52	F2 No.126	85.7 ±0.4	27.2 ±6.5	WA	A	H	S
53	F2 No.188	85.7 ±2.4	63.1 ±5.0	WA	H	R	S
54	F2 No.3	85.5 ±7.1	29.0 ±8.8	WA	A	H	S
55	F2 No.6	85.5 ±2.2	74.8 ±3.6	WA	A	H	H
56	F2 No.7	85.4 ±3.4	60.4 ±1.4	WA	A	NR	H
57	F2 No.19	85.3 ±7.2	53.9 ±3.9	WA	A	R	S

ลำดับ	พันธุ์	% ความมีชีวิตของเรณู ($\bar{X}$±S.D.)*	% การติดเมล็ด ($\bar{X}$±S.D.)*	WA352	Rf3	Rf4	
				RMS_3_WA352	RM3873	RMS_PPR9-4	PPR10
58	F2 No.175	85.1 ±7.8	14.3 ±4.3	WA	A	H	H
59	F2 No.171	84.9 ±5.2	75.8 ±8.8	WA	H	H	H
60	F2 No.62	84.9 ±7.4	37.9 ±9.2	WA	A	H	H
61	F2 No.5	84.6 ±9.0	54.8 ±1.5	WA	A	H	S
62	F2 No.100	84.4 ±0.9	37.3 ±9.3	WA	H	H	S
63	F2 No.78	84.3 ±7.7	24.2 ±11.8	WA	A	R	H
64	F2 No.44	84.0 ±6.8	46.6 ±20.6	WA	H	H	H
65	F2 No.170	83.9 ±5.0	80.7 ±2.1	WA	H	H	H
66	F2 No.17	83.8 ±6.8	59.9 ±9.1	WA	A	NR	H
67	F2 No.50	83.6 ±8.2	13.9 ±12.1	WA	A	R	S
68	F2 No.69	83.6 ±9.0	0.0 ±0.0	WA	A	NR	H
69	F2 No.97	83.5 ±4.4	10.3 ±3.7	WA	A	H	H
70	F2 No.121	83.3 ±4.1	23.5 ±9.7	WA	H	H	H
71	F2 No.190	83.2 ±8.7	0.0 ±0.0	WA	H	H	H
72	F2 No.35	83.1 ±6.1	4.8 ±4.5	WA	A	R	H
73	F2 No.167	82.6 ±2.3	24.0 ±8.1	WA	H	H	H
74	F2 No.22	82.5 ±5.6	18.4 ±6.9	WA	A	H	H
75	F2 No.164	82.5 ±6.3	17.6 ±4.5	WA	A	H	S
76	F2 No.51	82.2 ±5.8	65.5 ±4.7	WA	A	H	S
77	F2 No.34	82.2 ±7.8	64.0 ±10.2	WA	A	NR	H
78	F2 No.128	82.2 ±2.9	32.2 ±9.5	WA	A	H	H
79	F2 No.76	82.0 ±7.8	32.0 ±7.0	WA	A	H	H
80	F2 No.111	82.0 ±9.5	48.3 ±13.4	WA	S	H	H
81	F2 No.136	81.9 ±2.5	68.8 ±6.4	WA	H	H	H
82	F2 No.9	81.5 ±7.9	60.5 ±5.1	WA	A	H	H
83	F2 No.61	81.3 ±7.2	46.9 ±3.3	WA	A	NR	H
84	F2 No.166	81.2 ±5.7	29.3 ±18.1	WA	H	R	S
85	F2 No.41	81.1 ±5.0	1.7 ±0.9	WA	A	H	H
86	F2 No.158	80.9 ±10.0	70.4 ±15.5	WA	H	H	S
87	F2 No.155	80.8 ±3.3	59.4 ±11.0	WA	H	H	H
88	F2 No.151	80.4 ±9.4	25.3 ±9.8	WA	A	R	S
89	F2 No.179	80.3 ±1.6	0.0 ±0.0	WA	H	H	H
90	F2 No.66	80.3 ±7.5	0.0 ±0.0	WA	A	NR	H
91	F2 No.2	80.0 ±5.1	57.9 ±6.5	WA	A	R	S
92	F2 No.120	79.9 ±9.0	31.0 ±3.3	WA	H	H	H
93	F2 No.127	79.6 ±8.2	10.2 ±1.4	WA	A	H	S
94	F2 No.144	79.4 ±9.8	0.0 ±0.0	WA	A	R	S
95	F2 No.184	79.3 ±7.4	1.6 ±1.6	WA	H	H	H
96	F2 No.172	79.1 ±8.5	72.3 ±10.9	WA	H	H	S
97	F2 No.142	79.0 ±6.6	36.6 ±9.9	WA	H	H	H

ลำดับ	พันธุ์	% ความมีชีวิตของเรณู ($\bar{X}$±S.D.)*	% การติดเมล็ด ($\bar{X}$±S.D.)*	WA352	Rf3	Rf4	
				RMS_3_WA352	RM3873	RMS_PPR9-4	PPR10
98	F2 No.182	78.9 ±5.7	70.3 ±5.7	WA	H	H	H
99	F2 No.186	78.8 ±6.0	36.9 ±2.8	WA	H	H	H
100	F2 No.23	78.6 ±9.8	7.9 ±4.3	WA	A	H	H
101	F2 No.115	78.0 ±3.5	38.6 ±11.1	WA	H	R	S
102	F2 No.196	77.7 ±9.1	42.4 ±18.8	WA	H	H	H
103	F2 No.185	77.7 ±3.2	18.8 ±4.1	WA	A	H	H
104	F2 No.101	77.5 ±3.7	29.2 ±13.7	WA	H	H	H
105	F2 No.57	77.1 ±9.7	44.1 ±9.9	WA	A	R	S
106	F2 No.102	76.2 ±5.5	30.2 ±14.3	WA	A	H	H
107	F2 No.178	76.2 ±2.8	/	WA	A	H	H
108	F2 No.47	75.4 ±3.8	40.1 ±11.4	WA	A	H	H
109	F2 No.113	75.3 ±2.7	1.9 ±1.1	WA	H	H	H
110	F2 No.154	74.7 ±5.6	8.0 ±3.2	WA	A	H	H
111	F2 No.176	74.6 ±8.8	0.0 ±0.0	WA	A	N	H
112	F2 No.150	74.3 ±6.3	43.9 ±10.9	WA	A	NR	H
113	F2 No.29	74.3 ±5.4	43.8 ±15.6	WA	A	R	S
114	F2 No.39	73.8 ±0.8	9.6 ±6.5	WA	A	N	H
115	F2 No.63	73.5 ±3.3	48.2 ±9.1	WA	A	H	H
116	F2 No.103	73.2 ±9.5	23.0 ±15.5	WA	A	H	H
117	F2 No.45	72.8 ±7.4	25.3 ±5.2	WA	A	H	A
118	F2 No.4	72.7 ±8.3	40.4 ±18.7	WA	A	NR	S
119	F2 No.189	72.6 ±3.8	14.2 ±5.1	WA	H	H	H
120	F2 No.191	72.2 ±0.9	15.8 ±8.4	WA	H	H	H
121	F2 No.98	71.3 ±0.6	1.2 ±0.8	WA	A	H	H
122	F2 No.85	71.2 ±2.9	21.2 ±16.5	WA	A	H	H
123	F2 No.132	71.2 ±9.6	65.4 ±6.6	WA	H	H	H
124	F2 No.86	70.5 ±3.2	14.3 ±6.4	WA	A	NR	H
125	F2 No.139	70.1 ±9.3	56.7 ±6.6	WA	H	H	H
126	F2 No.168	69.3 ±1.6	3.1 ±2.6	WA	A	H	H
127	F2 No.31	69.3 ±9.4	14.7 ±4.2	WA	H	H	H
128	F2 No.36	68.3 ±7.5	49.7 ±6.7	WA	A	NR	H
129	F2 No.147	66.6 ±2.2	28.6 ±9.9	WA	H	R	S
130	F2 No.153	66.0 ±6.0	6.8 ±5.6	WA	H	H	H
131	F2 No.114	65.2 ±2.8	1.8 ±0.9	WA	A	H	S
132	F2 No.25	64.8 ±5.6	57.5 ±8.6	WA	A	NR	H
133	F2 No.59	63.2 ±7.7	7.1 ±2.4	WA	A	NR	S
134	F2 No.133	63.1 ±4.4	11.4 ±4.9	WA	H	H	S
135	F2 No.79	63.1 ±8.9	0.9 ±0.3	WA	A	NR	H
136	F2 No.30	62.9 ±3.7	38.5 ±3.7	WA	A	H	H
137	F2 No.110	62.3 ±2.5	24.2 ±9.7	WA	H	H	S

ลำดับ	พันธุ์	% ความมีชีวิตของเรณู ($\bar{X}$±S.D.)*	% การติดเมล็ด ($\bar{X}$±S.D.)*	WA352	Rf3	Rf4	
				RMS_3_WA352	RM3873	RMS_PPR9-4	PPR10
138	F2 No.99	61.3 ±5.9	0.0 ±0.0	WA	A	H	H
139	F2 No.55	60.7 ±1.0	4.2 ±0.9	WA	A	NR	H
140	F2 No.125	59.9 ±4.7	47.1 ±5.6	WA	S	H	H
141	F2 No.53	59.3 ±6.4	23.8 ±8.6	WA	A	H	H
142	F2 No.90	59.1 ±7.3	18.3 ±6.5	WA	A	H	H
143	F2 No.122	59.1 ±7.4	47.1 ±5.6	WA	A	H	H
144	F2 No.165	58.5 ±2.7	2.7 ±2.4	WA	H	H	H
145	F2 No.131	56.1 ±6.9	4.1 ±3.2	WA	H	H	H
146	F2 No.74	55.8 ±3.8	38.5 ±13.7	WA	A	NR	S
147	F2 No.107	54.0 ±4.1	0.0 ±0.0	WA	A	H	H
148	F2 No.118	52.1 ±8.3	0.0 ±0.0	WA	A	H	H
149	F2 No.163	44.7 ±4.0	2.1 ±1.1	WA	H	H	H
150	F2 No.108	44.2 ±6.4	0.7 ±1.2	WA	A	H	H
151	F2 No.119	43.4 ±4.8	0.0 ±0.0	WA	H	NR	H
152	F2 No.87	32.6 ±1.8	/	WA	A	H	H
153	F2 No.82	27.5 ±4.3	0.0 ±0.0	WA	A	NR	H
154	F2 No.91	26.6 ±9.0	5.7 ±5.0	WA	A	H	H
155	F2 No.173	18.6 ±7.0	0.0 ±0.0	WA	H	NR	H
156	F2 No.83	13.0 ±6.5	0.0 ±0.0	WA	H	NR	A
157	F2 No.70	12.2 ±8.8	0.0 ±0.0	WA	H	H	H
158	F2 No.124	10.5 ±5.3	0.0 ±0.0	WA	A	H	H
159	F2 No.177	10.3 ±9.3	0.0 ±0.0	WA	H	NR	H
160	F2 No.24	4.0 ±6.9	0.0 ±0.0	WA	A	NR	A
161	F2 No.106	2.7 ±2.3	0.0 ±0.0	WA	H	H	H
162	F2 No.157	1.9 ±3.3	1.0 ±0.9	WA	H	N	H
163	F2 No.8	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	A	N	H
164	F2 No.11	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	A	H	S
165	F2 No.28	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	A	NR	A
166	F2 No.67	0.0 ±0.0	/	WA	A	NR	H
167	F2 No.75	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	A	H	H
168	F2 No.80	0.0 ±0.0	/	WA	A	NR	H
169	F2 No.81	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	A	NR	H
170	F2 No.88	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	A	H	S
171	F2 No.92	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	A	NR	H
172	F2 No.95	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	A	NR	H
173	F2 No.104	0.0 ±0.0	/	WA	A	H	S
174	F2 No.112	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	H	NR	H
175	F2 No.116	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	A	H	A
176	F2 No.140	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	A	NR	H
177	F2 No.148	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	H	H	H

ลำดับ	พันธุ์	% ความมีชีวิตของเรณู ($\bar{X}$±S.D.)*	% การติดเมล็ด ($\bar{X}$±S.D.)*	WA352	Rf3	Rf4	
				RMS_3_WA352	RM3873	RMS_PPR9-4	PPR10
178	F2 No.149	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	A	NR	H
179	F2 No.156	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	H	NR	H
180	F2 No.162	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	A	H	H
181	F2 No.174	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	A	NR	H
182	F2 No.180	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	H	NR	H
183	F2 No.183	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	H	NR	H
184	F2 No.198	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	WA	A	H	H

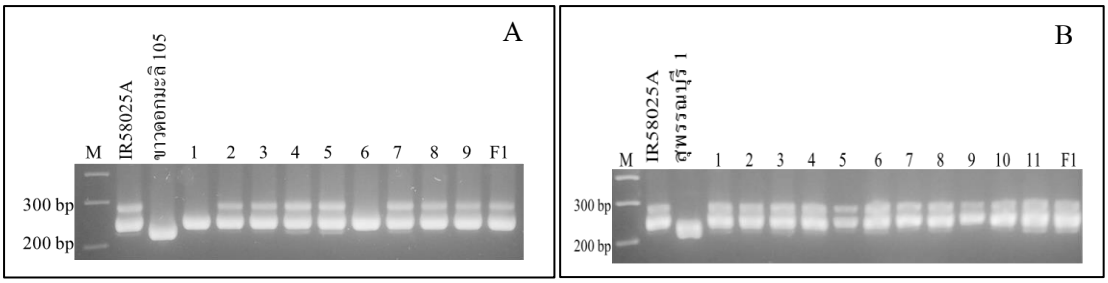
หมายเหตุ : เครื่องหมายที่ศึกษายีนหมัน ให้จีโนไทป์เป็น N-WA = Non-WA352 และ WA = WA352 เครื่องหมายที่ศึกษายีนแก้ความเป็นหมันของเรณู RMS_PPR9-4 ให้จีโนไทป์เป็น R =Restorer, NR = Non-restorer ในส่วนของเครื่องหมายอื่น ให้จีโนไทป์ตามชื่อพันธุ์ข้าว A = IR58025A, S = สุพรรณบุรี 1, H=Heterozygous, / = ไม่มีข้อมูล และ * = ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3. การศึกษาจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

การตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยใช้ดีเอ็นเอที่ทำการสกัดด้วยวิธี mCTAB จากข้าวพันธุ์ IR58025A (ต้นแม่), ขาวดอกมะลิ 105 (ต้นพ่อ), สุพรรณบุรี 1 (ต้นพ่อ), F_1 (IR58025Axขาวดอกมะลิ 105), F_1 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1), ประชากร F_2 ของ IR58025Axขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 9 ต้น, ประชากร F_2 ของ IR58025Axสุพรรณบุรี 1 (2 ฤดูปลูก) จำนวน 53 ต้น และ 181 ต้น ตามลำดับ

3.1 การตรวจสอบยีนควบคุมความเป็นหมันของเรณูในระบบ WA-CMS

การตรวจสอบยีน *WA352* ที่เป็นยีนควบคุมความเป็นหมันของเรณูโดยใช้เครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง ต้นพ่อ และต้นแม่ คือ RMS_3_WA352 (Kazama and Toriyama, 2014) เพื่อตรวจสอบยีนควบคุมความเป็นหมันในไซโทพลาซึมซึ่งอยู่ในไมโทคอนเดรีย พบว่า ข้าวพันธุ์ IR58025A (ต้นแม่) ที่มีลักษณะเรณูเป็นหมันให้แถบดีเอ็นเอขนาด 247 คู่เบส ส่วนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และสุพรรณบุรี 1 (ต้นพ่อ) ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 227 คู่เบส (ภาพที่ 16A) ในส่วนของต้น F_1 (IR58025Axขาวดอกมะลิ 105), ต้นF_1 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1), ประชากร F_2 ของขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 9 ต้น, ประชากร F_2 ของสุพรรณบุรี 1 (2 ฤดูปลูก) จำนวน 53 ต้น และ 181 ต้น แสดงแถบขนาด 247 คู่เบส เหมือนพันธุ์ IR58025A ที่มีลักษณะเรณูเป็นหมัน (ภาพที่ 16B) แสดงให้เห็นว่า ลูก F_1 และประชากร F_2 ที่ใช้ในการศึกษาต่อไปเนื่องจากได้รับยีนควบคุมความเป็นหมันของเรณูจากต้นแม่

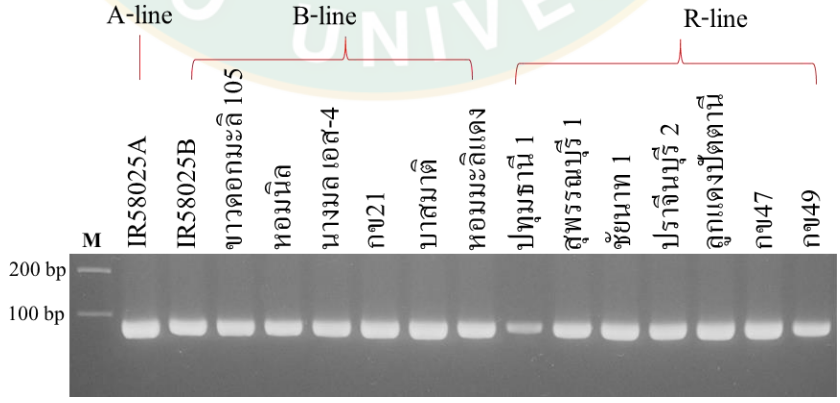


ภาพที่ 16 ผล 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ RMS_3_WA352

หมายเหตุ : เลน M คือ GeneRuler 100 bp DNA plus DNA ladder (Thermo Scientific, USA) A) เลน 1-9 คือ ประชากร F_2 ของคู่ผสม IR58025Axขาวดอกมะลิ 105 ต้นที่ 1-9 ตามลำดับ และเลน F1 คือ F_1 (IR58025Axขาวดอกมะลิ 105) B) เลน 1-11 คือ ประชากร F_2 ของคู่ผสม IR58025Axสุพรรณบุรี 1 ในฤดูนาปรังปี 61 ต้นที่ 43-53 ตามลำดับ และเลน F1 คือ F_1 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1)

3.2 การตรวจสอบยีนควบคุมลักษณะแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf3

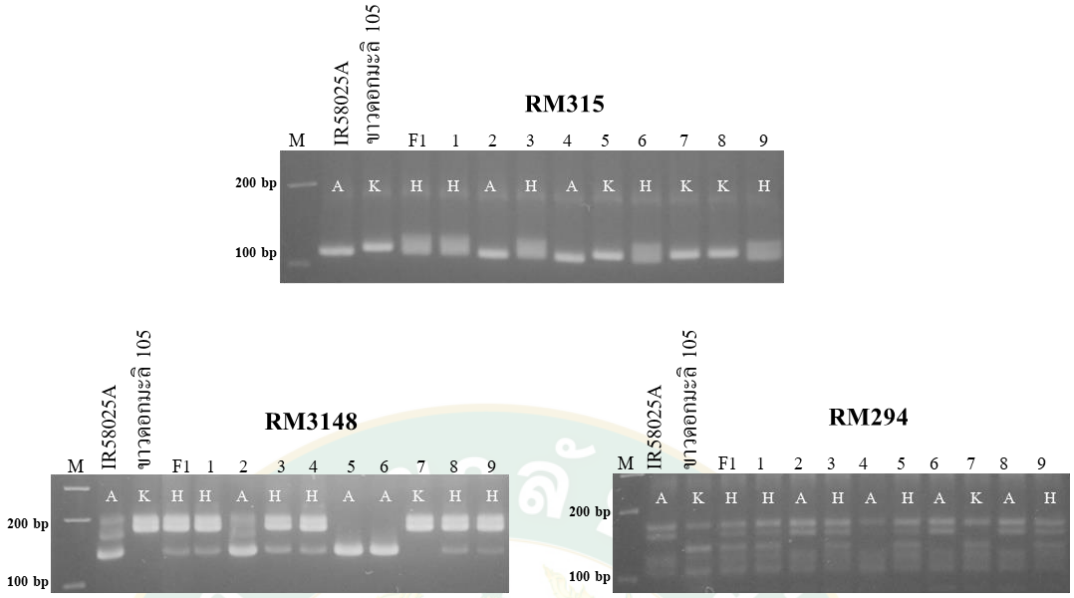
การตรวจสอบยีนควบคุมลักษณะแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf3 โดยใช้เครื่องหมายที่จำเพาะกับยีน คือ DRRM_RF3_10 (Suresh et al., 2012) เมื่อนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์และวิเคราะห์ด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าให้แถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากันจากข้าวทุกสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษา แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมาย DRRM_RF3_10 ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ IR58025A กับ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และสุพรรณบุรี 1 ได้ จึงไม่ได้นำเครื่องหมายนี้ไปตรวจสอบต่อ (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 ผล 4 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ DRRM_RF3_10

หมายเหตุ : เลน M คือ GeneRuler 100 bp DNA plus DNA ladder (Thermo Scientific, USA)

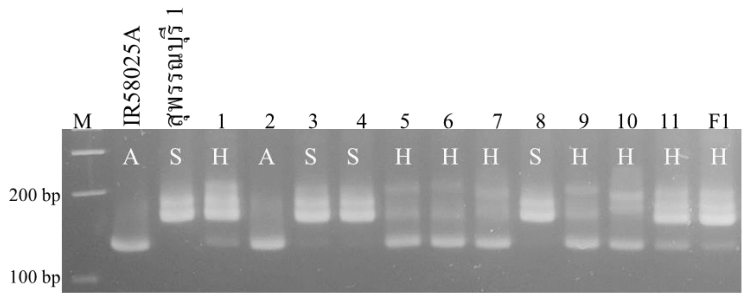
ส่วนเครื่องหมาย SSR ที่มีความสัมพันธ์กับยีนตำแหน่ง Rf3 สำหรับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มี 5 เครื่องหมายที่ทำการทดสอบ คือ RM1, RM3148, RM294, RM315 และ RM443 พบว่า เครื่องหมาย RM1, RM443 ไม่แสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับ ข้าวพันธุ์ IR58025A ส่วนเครื่องหมาย RM315, RM3148 และ RM294 เป็นเครื่องหมายที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวพันธุ์ IR58025A ดังนั้นจึงนำทั้ง 3 เครื่องหมายนี้มาทดสอบกับต้น F_1 (IR58025Axขาวดอกมะลิ 105) โดยเครื่องหมาย RM315 ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 133 คู่เบส ข้าวพันธุ์ IR58025A แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 139 คู่เบส เครื่องหมาย RM3148 ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 170 คู่เบส ข้าวพันธุ์ IR58025A แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 155 คู่เบส และเครื่องหมาย RM294 ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 140 และ 185 คู่เบส ข้าวพันธุ์ IR58025A แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 165 และ 185 คู่เบส (ภาพที่ 18) นำไปทดสอบกับประชากร F_2 พบว่า ประชากร F_2 จำนวน 9 ต้น โดยหากต้น F_2 ต้นใดให้แถบดีเอ็นเอเหมือนต้นแม่ คือ พันธุ์ IR58025A จะให้จีโนไทป์เป็น A หากต้น F_2 ต้นใดให้แถบดีเอ็นเอเหมือนต้นพ่อ คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 หรือพันธุ์สุพรรณบุรี 1 จะให้จีโนไทป์เป็น K หรือ S ตามลำดับ แต่หากต้น F_2 ต้นใดให้แถบดีเอ็นเอเหมือนทั้งต้นแม่และต้นพ่อ ให้จีโนไทป์เป็น H (Heterozygous) โดยเครื่องหมาย RM315 แสดงจีโนไทป์เป็น K จำนวน 3 ต้น H 4 ต้น และ A 2 ต้น เครื่องหมาย RM3148 แสดงจีโนไทป์เป็น K จำนวน 1 ต้น H 5 ต้น และ A 3 ต้น และเครื่องหมาย RM294 แสดงจีโนไทป์เป็น K จำนวน 1 ต้น H 4 ต้น และ A 4 ต้น (ตารางที่ 8)



ภาพที่ 18 ผล 4 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย RM315, RM3148 และ RM294

หมายเหตุ : เลน M คือ GeneRuler 100 bp DNA plus DNA ladder (Thermo Scientific, USA), เลน F1 คือ F_1 (IR58025Axขาวดอกมะลิ 105) เลน 1-9 คือ ประชากร F_2 ของคู่ผสม IR58025Axขาวดอกมะลิ 105 ต้นที่ 1-9 ตามลำดับ

สำหรับข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 พบเครื่องหมาย RM315, RM1, RM3148 และ RM3873 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และ IR58025A ได้ แต่เครื่องหมาย RM443 และ RM294 ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง ส่วนเครื่องหมาย RM1 พบว่าลูก F_1 แสดงแถบเหมือนพ่อ ในขณะที่ลูก F_2 แสดงเฮทเทอโรไซกัส จากเครื่องหมายทั้ง 4 ที่สามารถแยกความแตกต่างได้นั้น นำเครื่องหมาย RM3148 และ RM3873 มาทดสอบกับพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เนื่องจากขนาดของแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายทั้ง 2 เครื่องหมาย สามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน ซึ่งเครื่องหมาย RM3148 ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ที่ แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 170 คู่เบส ข้าวพันธุ์ IR58025A แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 155 คู่เบส เมื่อทดสอบกับต้น F_1 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) แสดงแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 170 คู่เบส และ 155 คู่เบส (ภาพที่ 19) จึงนำไปทดสอบกับประชากร F_2 ฤดูนาปรังปี 61 พบว่าประชากร F_2 จำนวน 53 ต้น แสดงจีโนไทป์เป็น S จำนวน 10 ต้น H 41 ต้น และ A 2 ต้น (ตารางที่ 9)



ภาพที่ 19 ผล 4 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ RM3148

หมายเหตุ : เลน M คือ GeneRuler 100 bp DNA plus DNA ladder (Thermo Scientific, USA), เลน F1 คือ F_1 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) เลน 1-11 คือ ประชากร F_2 ของคู่ผสม IR58025Ax สุพรรณบุรี 1 ในฤดูนาปรังปี 61 ต้นที่ 43-43 ตามลำดับ

ในส่วนประชากร F_2 ฤดูนาปรังปี 62 พบเครื่องหมาย RM3873 ที่อยู่ใกล้ยีนตำแหน่ง Rf3 มากกว่า RM3148 (ภาพที่ 6) จึงได้นำเครื่องหมายนี้ทำการทดสอบกับข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 200 คู่เบส และข้าวพันธุ์ IR58025A แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 140 คู่เบส เมื่อทดสอบกับต้น F_1 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) แสดงแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 200 คู่เบส และ 140 คู่เบส (ภาพที่ 20) จึงนำไปทดสอบกับประชากร F_2 พบว่า ประชากร F_2 ฤดูนาปรังปี 61 จำนวน 53 ต้น แสดงจีโนไทป์เป็น S จำนวน 10 ต้น H 23 ต้น และ A 20 ต้น ประชากร F_2 ฤดูนาปรังปี 62 จำนวน 181 ต้น แสดงจีโนไทป์เป็น S จำนวน 2 ต้น H 68 ต้น และ A 111 ต้น (ตารางที่ 9 และ 10)

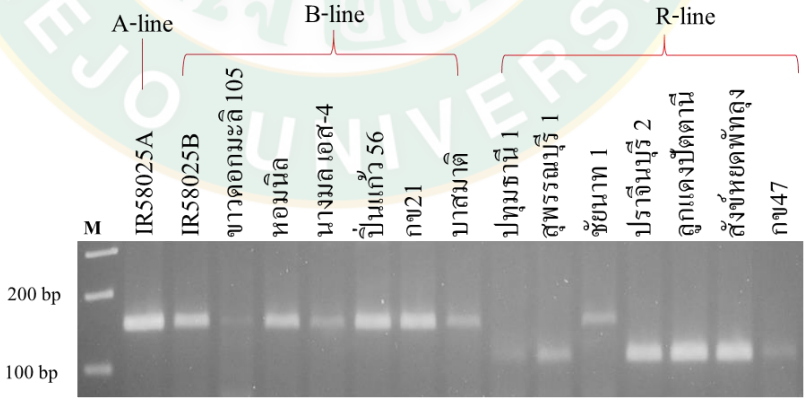
ภาพที่ 20 ผล 4 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ RM3873

หมายเหตุ : เลน M คือ GeneRuler 100 bp DNA plus DNA ladder (Thermo Scientific, USA), เลน F1 คือ F_1 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) เลน 1-8 คือ ประชากร F_2 ของคู่ผสม IR58025Ax สุพรรณบุรี 1 ในฤดูนาปรังปี 62 ต้นที่ 100-108 ตามลำดับ

3.3 การตรวจสอบยีนควบคุมลักษณะแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf4

การศึกษาตำแหน่งของยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูตำแหน่ง Rf4 บนโครโมโซมแท่งที่ 10 ที่มีรายงานว่าประกอบด้วยยีน 3 ยีนในข้าวจาปอนิกา คือ *PPR7*, *PPR9*, *PPR10* ส่วนในข้าวอินดิกาประกอบด้วย 4 ยีน คือ *PPR7*, *PPR8*, *PPR9* และ *PPR10* ซึ่งพบว่ายีน *PPR9* เป็นยีนหลักที่แก้ความเป็นหมันของเรณูในระบบ WA-CMS (Tang et al., 2014 และ Kazama and Toriyama, 2014) ดังนั้นการให้จีโนไทป์ของยีน *PPR9* ที่เหมือนต้นแม่เป็น NR ยีน *PPR9* ที่เหมือนต้นพ่อเป็น R

การตรวจสอบยีนควบคุมลักษณะแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf4 บนโครโมโซมที่ 10 โดยใช้เครื่องหมายที่จำเพาะและสัมพันธ์กับยีน ซึ่งเครื่องหมายที่จำเพาะกับยีน Rf4 มีเครื่องหมาย RMS_PPR9-1, RMS_PPR9-4, InDel_PPR9 และเครื่องหมาย PPR10 โดยทั้ง 4 เครื่องหมายแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่าง ข้าวพันธุ์ IR58025A กับข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ได้ แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ IR58025A กับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ได้ แสดงว่าจีโนไทป์ยีน *PPR9* และ *PPR10* ในตำแหน่ง Rf4 ของข้าวพันธุ์ IR58025A เหมือนกันกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แสดงถึงการไม่มียีนแก้หมันตำแหน่ง Rf4 จึงไม่นำเครื่องหมายเหล่านี้ไปทดสอบกับประชากร F_2 ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเครื่องหมาย RMS_PPR9-1 แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ A, B และ R ได้ น้อยกว่า เมื่อเทียบกับเครื่องหมาย RMS_PPR9-4 (ภาพที่ 13 และ 21) โดยเครื่องหมาย RMS_PPR9-1 ให้แถบดีเอ็นเอที่ตรงกับการจัดกลุ่มของข้าวไทยที่ศึกษามาก่อนหน้านี้ 14 พันธุ์จาก 15 พันธุ์ ในขณะเดียวกัน เครื่องหมาย RMS_PPR9-4 ให้แถบดีเอ็นเอที่ตรงกับการจัดกลุ่มจำนวน 15 พันธุ์จาก 15 พันธุ์



ภาพที่ 21 ผล 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ RMS_PPR9-1

หมายเหตุ : เลน M คือ GeneRuler 100 bp DNA plus DNA ladder (Thermo Scientific, USA)

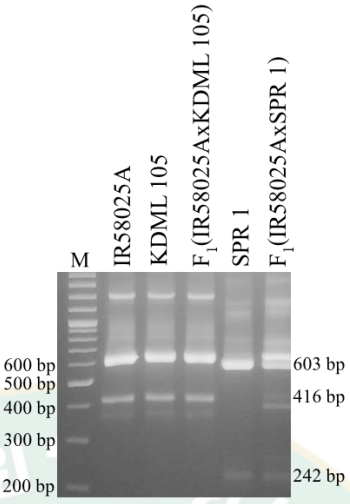
ในส่วนของเครื่องหมาย InDel_PPR9 ซึ่งอยู่ภายในยีน *PPR9* สามารถแยกความแตกต่างได้ แต่เมื่อนำไปศึกษาตำแหน่งของเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 10 จากฐานข้อมูล พบว่าบริเวณที่เครื่องหมายนี้สามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้งยีน *PPR9* และ ยีน *PPR8* (ภาพที่ 7) และมีขนาดแถบดีเอ็นเอเท่ากัน จึงไม่นำ 2 เครื่องหมาย คือ RMS_PPR9-1 และ InDel_PPR9 มาใช้ในการทดสอบกับประชากร F_2 ของ IR58025Axสุพรรณบุรี 1

เครื่องหมาย RMS_PPR9-4 เป็นเครื่องหมายแก้หมันของเรณูที่อยู่ใกล้กับยีน *PPR9* (ภาพที่ 7) ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 129 คู่เบส ให้จีโนไทป์เป็น R ข้าวพันธุ์ IR58025A แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 160 คู่เบส ให้จีโนไทป์เป็น NR เมื่อทดสอบกับ ต้น F_1 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) แสดงแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 129 คู่เบส และ 160 คู่เบส ให้จีโนไทป์เป็น H (ภาพที่ 22) จึงนำไปทดสอบกับประชากร F_2 ทั้ง 2 ฤดูปลูก พบว่า ประชากร F_2 ฤดูนาปรังปี 61 จำนวน 53 ต้น แสดงจีโนไทป์เป็น R จำนวน 10 ต้น H 25 ต้น และ NR 18 ต้น (ตารางที่ 9) ประชากร F_2 ฤดูนาปรังปี 62 จำนวน 181 ต้น แสดงจีโนไทป์เป็น R จำนวน 26 ต้น H 112 ต้น และ NR 43 ต้น (ตารางที่ 10)

ภาพที่ 22 ผล 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ RMS_PPR9-4

หมายเหตุ : เลน M คือ GeneRuler 100 bp DNA plus DNA ladder (Thermo Scientific, USA), เลน 1-11 คือ ประชากร F_2 ของคู่ผสม IR58025Axสุพรรณบุรี 1 ในฤดูนาปรังปี 61 ต้นที่ 43-53 ตามลำดับ และ เลน F1 คือ F_1 จากคู่ผสม IR58025Axสุพรรณบุรี 1

เครื่องหมาย PPR10 เป็นเครื่องหมายอยู่ภายในยีน *PPR10* (ภาพที่ 7) ผลการทดสอบพบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ IR58025A กับ ขาวดอกมะลิ 105 แต่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ IR58025A กับข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ได้ โดยข้าวพันธุ์ IR58025A แสดงแถบขนาด 603 และ 416 คู่เบสให้จีโนไทป์เป็น A ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 แสดงแถบขนาด 603 และ 242 คู่เบส ให้จีโนไทป์เป็น S เมื่อทดสอบกับ ต้น F_1 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) แสดงแถบ 3 ขนาด คือ 603, 416 และ 242 คู่เบส ให้จีโนไทป์เป็น H (Heterozygous) (ภาพที่ 23)



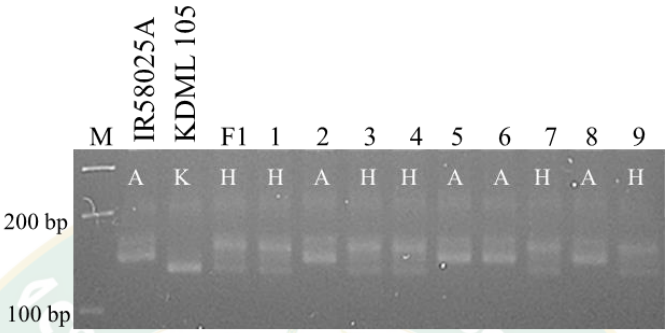
ภาพที่ 23 ผล 2 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ PPR10

หมายเหตุ : เลน M คือ GeneRuler 100 bp DNA plus DNA ladder (Thermo Scientific, USA)

จึงนำไปทดสอบกับประชากร F_2 ของคู่ผสม IR58025Axสุพรรณบุรี 1 ทั้ง 2 ฤดูปลูก พบว่าประชากร F_2 ฤดูนาปรังปี 61 จำนวน 53 ต้น แสดงจีโนไทป์เป็น S จำนวน 10 ต้น H 25 ต้น และ A 18 ต้น (ตารางที่ 9) แต่ในฤดูนี้ ผลจีโนไทป์ของยีน *PPR9* และ *PPR10* ให้ผลเหมือนกัน เนื่องด้วยประชากร F_2 มีเพียง 53 ต้น เป็นผลทำให้ไม่สามารถแยกยีนทั้ง 2 ได้ เนื่องจากระยะห่างระหว่าง 2 ยีน อยู่ห่างกัน 2.7 กิโลเบส (ภาพที่ 8) เป็นผลทำให้ต้องปลูกประชากร F_2 ในฤดูนาปรังปี 62 จำนวน 181 ต้น ที่แสดงจีโนไทป์เป็น S จำนวน 49 ต้น H 126 ต้น และ A 6 ต้น (ตารางที่ 10) ซึ่งฤดูนาปรังปี 62 นี้พบจีโนไทป์ของยีน *PPR9* ที่แตกต่างกับ ยีน *PPR10* แสดงให้เห็นว่าจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้นสามารถแยกยีนที่ตั้งอยู่ใกล้กันออกจากกันได้

นอกจากเครื่องหมายที่จำเพาะกับยีนตำแหน่ง Rf4 ที่ใช้เป็นเครื่องหมายหลักในการศึกษายีนแก้หมันของเรณูแล้ว ยังมีเครื่องหมาย SSR ที่สัมพันธ์กับยีนตำแหน่ง Rf4 อีก 5 เครื่องหมาย คือ RM171, RM258, RM6100, RM591 และ RM3123 (ตารางที่ 3) ที่ใช้ในการศึกษายีนแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf4 เพิ่มเติม ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เนื่องจากไม่มีเครื่องหมายที่จำเพาะกับยีนแก้หมันของเรณูตำแหน่ง Rf4 หรือยีน *PPR9* หรือ *PPR10* จึงต้องใช้เครื่องหมาย SSR ที่สัมพันธ์กับยีนแก้ความเป็นหมันของเรณู โดยพบว่า RM258 เป็นเครื่องหมายเดียวที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่าง ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับ พันธุ์ IR58025A ได้ ในส่วนของเครื่องหมาย RM171, RM6100, RM3123 และ RM591 ไม่แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง จึงไม่ได้นำไปทดสอบต่อ โดยเครื่องหมาย RM258 ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 155 คู่เบส ข้าวพันธุ์

IR58025A ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 170 คู่เบส เมื่อทดสอบกับ ต้น F_1 (IR58025Axขาวดอกมะลิ 105) แสดงแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 155 คู่เบส และ 170 คู่เบส (ภาพที่ 24) จึงนำไปทดสอบกับประชากร F_2 จำนวน 9 ต้น พบว่า แสดงจีโนไทป์เป็น H จำนวน 5 ต้น และ A 4 ต้น แต่ไม่มีจีโนไทป์ที่เป็น K (ตารางที่ 8)



ภาพที่ 24 ผล 4 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ของการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ RM258

หมายเหตุ : เลน M คือ GeneRuler 100 bp DNA plus DNA ladder (Thermo Scientific, USA), เลน F1 คือ F_1 (IR58025Axขาวดอกมะลิ 105) เลน 1-9 คือ ประชากร F_2 ของคู่ผสม IR58025Axขาวดอกมะลิ 105 ต้นที่ 1-9 ตามลำดับ

ในส่วนของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 พบ 2 เครื่องหมาย คือ RM3123 และ RM591 ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ IR58025A กับ ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ได้ ส่วนเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างได้ คือ เครื่องหมาย RM171, RM258 และ RM6100 แต่เนื่องจากข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 มีเครื่องหมายที่จำเพาะกับยีนแก้หมันของเรณู เพื่อใช้ในการตรวจสอบยีนแก้ความเป็นหมันแล้ว จึงไม่นำเครื่องหมาย SSR ที่สัมพันธ์มาใช้ในการตรวจสอบประชากร F_2

4. การศึกษาการทำงานของยีนแก้หมันของเรณูและความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และลักษณะฟีโนไทป์

เนื่องจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จัดอยู่ในกลุ่มรักษาความเป็นหมัน (B-line) ไม่มีความสามารถแก้หมันในระบบ WA-CMS จึงไม่นำมาศึกษาในหัวข้อนี้

4.1. การศึกษาการกระจายตัวของจีโนไทป์ของยีนที่ควบคุมลักษณะแก้หมันของเรณู

การศึกษาจีโนไทป์ คือการศึกษายีนที่ควบคุมลักษณะแก้หมันของเรณู โดยนำข้อมูลที่ได้จากการทดสอบเครื่องหมายที่สัมพันธ์และจำเพาะกับยีนแก้หมันมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยการทดสอบไคกำลังสอง การศึกษาจีโนไทป์ของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ใน 2 ฤดู ฤดูนาปรังปี 61

และฤดูนาปรัง ปี 62 มีประชากร F_2 จำนวน 53 และ 181 ต้น ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบกับเครื่องหมาย ที่สัมพันธ์กับยีน Rf3 (RM3873) และเครื่องหมายที่จำเพาะกับยีนตำแหน่ง Rf4 (RMS_PPR9-4 และ PPR10) ทดสอบกับสมมติฐาน คือ อัตราส่วนของจีโนไทป์ของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) อัตราส่วน AA:Aa:aa เป็น 1:2:1 ตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล ได้ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 การกระจายตัวของจีโนไทป์ของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ทั้ง 2 ฤดู (นาปรังปี 61 และนาปรังปี 62)

ยีน	อัตราส่วนจีโนไทป์ของประชากร F_2 ฤดูนาปรัง 61 (53 ต้น)			χ^2	
	AA	Aa	aa	(AA:Aa:aa)	, p-value
	(1)	(2)	(1)	(1:2:1)	
PPR9					
PPR10	18	25	10	2.585	0.275
Rf3	10	23	20	4.698	0.095
ยีน	อัตราส่วนจีโนไทป์ของประชากร F_2 ฤดูนาปรัง 62 (181 ต้น)			χ^2	
	AA	Aa	aa	(AA:Aa:aa)	, p-value
	(1)	(2)	(1)	(1:2:1)	
PPR9	26	112	43	13.409	0.001
PPR10	49	126	6	48.282	0.000
Rf3	2	68	111	142.470	0.000

หมายเหตุ : $\chi^2_{\text{ตาราง (0.05, 2)}}$ =5.991, p-value >0.05 ยอมรับสมมติฐาน และ p-value <0.05 ปฏิเสธสมมติฐาน

จากผลการคำนวณไคกำลังสองของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ฤดูนาปรัง ปี 61 พบว่าการคำนวณค่าไคกำลังสองของยีน *PPR9* ร่วมกับ *PPR10* มีค่าเท่ากับ 2.585 และยีนตำแหน่ง Rf3 มีค่า 4.698 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า ค่าไคกำลังสองที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ df เท่ากับ 2 ในตาราง คือ 5.991 และค่า p-value >0.05 ทำให้ยอมรับสมมติฐาน คือ อัตราส่วนของจีโนไทป์ของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) อัตราส่วน AA:Aa:aa เป็น 1:2:1 ตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล สำหรับประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ฤดูนาปรัง ปี 62 ได้มีการวิเคราะห์แยกระหว่าง ยีน *PPR9* และ *PPR10* พบว่า ค่าไคกำลังสอง ของยีน *PPR9, PPR10* และยีนตำแหน่ง Rf3 มีค่าเท่ากับ 13.409, 48.282 และ 142.470 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่า ค่าไคกำลังสองที่ระดับ

นัยสำคัญ 0.05 และ df เท่ากับ 2 ในตาราง คือ 5.991 และค่า p-value <0.05 ทำให้ปฏิเสธสมมติฐาน คือ อัตราส่วนของจีโนไทป์ของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) อัตราส่วน AA:Aa:aa เป็น 1:2:1 ตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล แสดงให้เห็นว่า การกระจายตัวของจีโนไทป์ในประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ฤดูนาปรัง ปี 62 ไม่เป็นไปตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล

4.2 การศึกษาการทำงานของยีนที่ควบคุมลักษณะแก้หมันของเรณูจากลักษณะฟีโนไทป์

การศึกษาการทำงานของยีนแก้หมันของเรณู โดยการคำนวณไคกำลังสอง จากข้อมูลความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ด ด้วยโปรแกรม MINITAB ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 จัดอยู่ในกลุ่มแก้หมัน จึงนำข้อมูลของลูก F_2 ของคู่ผสม IR58025Axสุพรรณบุรี 1 ทั้ง 2 ฤดู (นาปรังปี 61 และ 62) โดยฤดูนาปรังปี 61 มีข้อมูลความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ดของประชากร F_2 จำนวน 53 ต้น ส่วนฤดูนาปรังปี 62 มีข้อมูลความมีชีวิตของเรณูของประชากร F_2 จำนวน 181 ต้น ข้อมูลการติดเมล็ดจำนวน 174 ต้น เนื่องจากขณะทำการทดลองในส่วนของการเก็บเมล็ด มีปัญหาหนูทำลายต้นข้าวจึงทำให้ประชากร F_2 จาก 181 ต้น เหลือ 174 ต้น ทำการวิเคราะห์ด้วยไคกำลังสอง เมื่อทดสอบสมมติฐานที่ 1 คือ การกระจายตัวของความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ดในประชากร F_2 มีอัตราส่วนปกติต่อหมัน เป็น 3:1 ตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล แสดงถึงลักษณะแก้หมันของเรณูควบคุมด้วยยีน 1 คู่ โดยผลวิเคราะห์ไคกำลังสองจากความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ด แสดงในตารางที่ 12

สมมติฐานที่ 1 การกระจายตัวของความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ดในประชากร F_2 มีอัตราส่วนปกติต่อหมัน เป็น 3:1

ตารางที่ 12 การกระจายตัวของความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ดของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ทั้ง 2 ฤดู (นาปรังปี 61 และนาปรังปี 62)

ประชากร F_2	เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู*		χ^2	, p-value
	จำนวนประชากร F_2 (ต้น)		(ปกติ : หมัน)	
	ปกติ (≥50.1)	หมัน (≤50)	(3 : 1)	
นาปรังปี 61	42	11	0.509	0.475
นาปรังปี 62	145	36	2.521	0.112
ประชากร F_2	เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด**		χ^2	, p-value
	จำนวนประชากร F_2 (ต้น)		(ปกติ : หมัน)	
	ปกติ (≥31)	หมัน (≤30)	(3 : 1)	
นาปรังปี 61	0	53	159.0	0.000
นาปรังปี 62	78	96	84.483	0.000

หมายเหตุ : $\chi^2_{\text{ตาราง (0.05, 1)}}$ =3.841, p-value >0.05 ยอมรับสมมติฐาน p-value <0.05 ปฏิเสธสมมติฐาน

* = ดวงพร และคณะ (2556) และ ** = Hasan et al. (2015)

จากผลการทดสอบไคกำลังสองของสมมติฐานที่ 1 พบว่า ค่าไคกำลังสองของความมีชีวิตของเรณูของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ทั้ง 2 ฤดูปลูก มีค่า 0.509 และ 2.521 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่าไคกำลังสองที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ df เท่ากับ 1 ในตาราง คือ 3.841 และค่า p-value >0.05 ทำให้ยอมรับสมมติฐานที่ตั้งไว้ คือ การกระจายตัวของความมีชีวิตของเรณูปกติต่อเรณุเป็นหมันในประชากร F_2 มีอัตราส่วนเป็น 3:1 เห็นได้ว่าลักษณะการแก้ความเป็นหมันของเรณูควบคุมด้วยยีน 1 คู่ โดยที่ยีนทำงานแบบข่มสมบูรณ์ ผลการศึกษาเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยของดวงพร และคณะ (2556) ที่ได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมของยีนแก้หมัน โดยทำการสร้างประชากร F_2 จำนวน 10 คู่ผสม ซึ่งคู่ผสม IR580151Axสุพรรณบุรี 1 มีอัตราส่วนของเรณูปกติต่อเรณูเป็นหมันเป็น 3:1 แสดงให้เห็นว่าลักษณะแก้ความเป็นหมันของเรณูของข้าวสุพรรณบุรี 1 ควบคุมด้วยยีน 1 คู่ และงานวิจัยของ Asadollah et al. (2004) ใช้สายพันธุ์ที่ให้ความเป็นหมัน คือ NedaA สายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน คือ IR24, IR28 และ IR36 ซึ่งจากผลการทดลองประชากร F_2 ของทั้ง 3 ประชากร พบว่าประชากร F_2 ของ NedaxIR28 และ NedaAxIR36 มีอัตราส่วนของเรณูปกติต่อเรณูเป็นหมันเป็น 3:1 แสดงให้เห็นว่าลักษณะแก้ความเป็นหมันของข้าว IR28 และ IR36 ควบคุมด้วยยีน 1 คู่ ในส่วนของการติดเมล็ดของประชากร F_2

(IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ทั้ง 2 มีค่า 159.0 และ 84.483 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าค่าไคกำลังสองที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ df เท่ากับ 1 ในตาราง คือ 3.841 และค่า p-value <0.05 ทำให้ปฏิเสธสมมติฐานที่ตั้งไว้ คือ การกระจายตัวของการติดเมล็ดในประชากร F_2 มีอัตราส่วนปกติต่อหมันเป็น 3:1 ซึ่งการติดเมล็ดนั้นอาจมีปัจจัยอื่นมาเกี่ยวข้อง เช่น สรีรวิทยา และการปลูกข้าวในช่วงที่มีอุณหภูมิสูง เป็นต้น จึงทำให้ผลการศึกษาเป็นปฏิเสธสมมติฐาน

4.3 การศึกษาความสัมพันธ์ของจีโนไทป์ กับลักษณะฟีโนไทป์ในประชากร F_2

4.3.1 ยีนตำแหน่ง Rf3

การศึกษาอิทธิพลของยีนตำแหน่ง Rf3 กับลักษณะฟีโนไทป์ในประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ทั้ง 2 ฤดูปลูก โดยใช้การวิเคราะห์ ANOVA ด้วยโปรแกรม MINITAB โดยมีการตั้งสมมติฐานหลัก (H_o) คือ ลักษณะฟีโนไทป์ไม่ขึ้นกับยีนตำแหน่ง Rf3 (ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูและการติดเมล็ด แต่ละจีโนไทป์ของยีนตำแหน่ง Rf3 ไม่แตกต่างกัน) สมมติฐานรอง (H_1) คือ ลักษณะฟีโนไทป์ขึ้นกับยีนตำแหน่ง Rf3 (ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูและการติดเมล็ด มีอย่างน้อย 1 จีโนไทป์ของยีนตำแหน่ง Rf3 แตกต่างจากจีโนไทป์อื่นๆ) ในประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ฤดูนาปรังปี 61 ข้อมูลของยีนในตำแหน่ง Rf3 ที่นำมาวิเคราะห์ คือ ข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้จากการศึกษาด้วยเครื่องหมาย RM3873 ซึ่งเป็นเครื่องหมายเดียวกันกับที่ใช้ในประชากร F_2 ในฤดูนาปรังปี 62

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ ANOVA ของยีนตำแหน่ง Rf3 จากเครื่องหมาย RM3873 กับฟีโนไทป์ของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ในฤดูนาปรังปี 61 และนาปรังปี 62

ฟีโนไทป์	ยีนตำแหน่ง Rf3 (นาปรังปี 61)			ยีนตำแหน่ง Rf3 (นาปรังปี 62)		
	จีโนไทป์	ค่าเฉลี่ย	p-value	จีโนไทป์	ค่าเฉลี่ย	p-value
ความมีชีวิตของเรณู	S	89.1	0.150	S	70.9	0.722
	H	84.7		H	67.9	
	A	36.0		A	64.3	
การติดเมล็ด	S	9.8	0.523	S	47.7	0.284
	H	8.4		H	30.6	
	A	2.1		A	26.2	

หมายเหตุ : ปฏิเสธ H_0 *p*-value < 0.05, ยอมรับ H_0 *p*-value > 0.05

R =Restorer, NR = Non-restorer, A = IR58025A, S = สุพรรณบุรี 1 และ H=Heterozygous

จากผลการวิเคราะห์ ANOVA พบว่า ค่า p-value ของความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ด ในฤดูนาปรังปี 61 มีค่าเท่ากับ 0.150 และ 0.523 ตามลำดับ ในฤดูนาปรังปี 62 มีค่า 0.722 และ 0.284 ตามลำดับ (ตารางที่ 13) ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.05 จึงยอมรับสมมติฐานหลัก (H_o) คือ ความ

มีชีวิตของเรณูและการติดเมล็ดไม่ขึ้นกับยีนตำแหน่ง Rf3 แสดงให้เห็นว่ายีนตำแหน่ง Rf3 นั้น ไม่มีอิทธิพลกับความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ดของประชากร F_2 ทั้ง 2 ฤดูปลูก จะเห็นได้ว่ายีน Rf3 ของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ไม่มีผลต่อการแก้หมันในระบบ WA-CMS ซึ่งเหมือนกับงานวิจัยของ Katara et al. (2017) ที่ศึกษายีนแก้หมัน Rf3 กับระบบความเป็นหมัน 2 ระบบ คือ WA-CMS และ Kalinga-CMS โดยมีสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน 570 สายพันธุ์ ด้วยการศึกษาจากข้อมูลเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดในลูกผสม F_1 พบว่า ยีนตำแหน่ง Rf3 ไม่มีผลต่อการแก้หมันทั้งในระบบความเป็นหมัน WA-CMS และ Kalinga-CMS

4.3.2 ยีนตำแหน่ง Rf4

การศึกษาอิทธิพลของยีนตำแหน่ง Rf4 โดยใช้ข้อมูลของยีน *PPR9* กับ *PPR10* และลักษณะฟีโนไทป์ในประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ทั้ง 2 ฤดูปลูก โดยใช้การวิเคราะห์ ANOVA ด้วยโปรแกรม MINITAB โดยมีการตั้งสมมติฐานหลัก (H_o) คือ ลักษณะฟีโนไทป์ไม่ขึ้นกับยีนตำแหน่ง Rf4 (ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูและการติดเมล็ด แต่ละจีโนไทป์ของยีนตำแหน่ง Rf4 ไม่แตกต่างกัน) สมมติฐานรอง (H_1) คือ ลักษณะฟีโนไทป์ขึ้นกับยีนตำแหน่ง Rf4 (ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูและการติดเมล็ด แต่ละจีโนไทป์ของยีนตำแหน่ง Rf4 แตกต่างกัน)

ประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ในฤดูนาปรังปี 61 ข้อมูลของยีนในตำแหน่ง Rf4 คือ *PPR9* และ *PPR10* ให้ผลเหมือนกัน เนื่องจากประชากรมีขนาดเล็ก ไม่พบต้นที่แยกยีนทั้งสองออกจากกันได้ จากข้อมูลข้างต้นทำให้การวิเคราะห์ ANOVA ของยีนตำแหน่ง Rf4 จึงวิเคราะห์แต่เพียงยีนตำแหน่ง Rf4 คือ ยีน *PPR9* และ *PPR10* เพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ ANOVA ของยีนตำแหน่ง Rf4 คือ ยีน *PPR9* และ *PPR10* กับลักษณะฟีโนไทป์ ของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ในฤดูนาปรังปี 61

ฟีโนไทป์	ยีน *PPR9* กับ *PPR10*		
	จีโนไทป์	ค่าเฉลี่ย	p-value
ความมีชีวิตของเรณู	R	89.1	0.000
	H	84.9	
	NR	30.2	
การติดเมล็ด	R	9.8	0.000
	H	8.4	
	NR	0.7	

หมายเหตุ : ปฏิเสธ H_0 p-value < 0.05, ยอมรับ H_0 p-value > 0.05

R =Restorer, NR = Non-restorer, และ H=Heterozygous

จากผลการวิเคราะห์ ANOVA พบว่า ค่า p-value ของความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ด มีค่าเท่ากับ 0.000 (ตารางที่ 14) ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธสมมติฐานหลัก (H_o) คือ ความมีชีวิตของเรณูและการติดเมล็ดไม่ขึ้นกับยีนตำแหน่ง Rf4 และยอมรับสมมติฐานรอง (H_1) คือ ความมีชีวิตของเรณูและการติดเมล็ดขึ้นกับยีนตำแหน่ง Rf4 แสดงให้เห็นว่ายีน *PPR9* และ *PPR10* ของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 มีอิทธิพลต่อความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ด ในประชากรF_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ฤดูนาปรังปี 61

ส่วนประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ในฤดูนาปรังปี 62 สามารถแยกยีน *PPR9* ออกจาก *PPR10* ได้ ทำให้มีข้อมูลของยีนในตำแหน่ง Rf4 คือยีน *PPR9* และ *PPR10* ที่แตกต่างกัน เนื่องจากมีจำนวนประชากรที่มากขึ้น ทำให้มีการวิเคราะห์ ANOVA 3 รูปแบบ คือ ยีน *PPR9* กับ *PPR10* เฉพาะยีน *PPR9* และ เฉพาะยีน *PPR10* กับข้อมูลความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ด เพื่อทดสอบสมมติฐานการมีอิทธิพลของยีนกับลักษณะฟีโนไทป์

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ ANOVA ของยีนตำแหน่ง Rf4 ยีน PPR9 กับ PPR10 กับลักษณะฟีโนไทป์ของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ในฤดูนาปรังปี 62

ฟีโนไทป์	ยีน *PPR9* กับ *PPR10*		
	จีโนไทป์	ค่าเฉลี่ย	p-value
ความมีชีวิตของเรณู	R/S	84.6	0.000
	R/H	85.5	
	R/A	0.0	
	H/S	72.7	
	H/H	70.3	
	H/A	54.0	
	NR/S	63.0	
	NR/H	43.3	
	NR/A	5.7	
การติดเมล็ด	R/S	40.9	0.013
	R/H	29.3	
	R/A	0.0	
	H/S	35.8	
	H/H	27.6	
	H/A	28.4	
	NR/S	28.7	
	NR/H	18.1	
	NR/A	0.0	

หมายเหตุ : ปฏิเสธ H_0 *p*-value < 0.05, ยอมรับ H_0 *p*-value > 0.05

R =Restorer, NR = Non-restorer, A = IR58025A, S = สุพรรณบุรี 1 และ H=Heterozygous

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ ANOVA ของยีนตำแหน่ง Rf4 คือ เฉพาะยีน PPR9 และ เฉพาะยีน PPR10 กับลักษณะฟีโนไทป์ของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ในฤดูนาปรังปี 62

ฟีโนไทป์	ยีน *PPR9*			ยีน *PPR10*		
	จีโนไทป์	ค่าเฉลี่ย	p-value	จีโนไทป์	ค่าเฉลี่ย	p-value
ความมีชีวิตของเรณู	R	84.7	0.000	S	77.5	0.000
	H	70.4		H	62.9	
	NR	42.1		A	29.9	
การติดเมล็ด	R	39.1	0.002	S	37.7	0.004
	H	29.4		H	25.0	
	NR	17.5		A	14.2	

หมายเหตุ : ปฏิเสธ H_0 *p*-value < 0.05, ยอมรับ H_0 *p*-value > 0.05

R =Restorer, NR = Non-restorer, A = IR58025A, S = สุพรรณบุรี 1 และ H=Heterozygous

จากผลการวิเคราะห์ ANOVA โดยทำการวิเคราะห์ยีน *PPR9* ร่วมกับ *PPR10* หรือ เฉพาะยีน *PPR9* หรือเฉพาะยีน *PPR10* กับความมีชีวิตของเรณู พบว่า ความมีชีวิตของเรณูมีค่า p-value เท่ากับ 0.000 (ตารางที่ 15 และ 16) ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธสมมติฐานหลัก (H_o) คือ ความมีชีวิตของเรณูไม่ขึ้นกับยีน *PPR9* และ *PPR10* หรือ เฉพาะยีน *PPR9* หรือเฉพาะยีน *PPR10* ยอมรับสมมติฐานรอง (H_1) คือ ความมีชีวิตของเรณูขึ้นกับยีน *PPR9* และ *PPR10* หรือ เฉพาะยีน *PPR9* หรือเฉพาะยีน *PPR10*

ส่วนการติดเมล็ดให้ผลไปเช่นเดียวกันคือ มีค่า p-value เท่ากับ 0.013, 0.002 และ 0.004 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 จึงปฏิเสธสมมติฐานหลัก (H_o) คือ ความมีชีวิตของเรณูไม่ขึ้นกับยีน *PPR9* และ *PPR10* หรือ เฉพาะยีน PPR9 หรือเฉพาะยีน *PPR10* ยอมรับสมมติฐานรอง (H_1) คือ การติดเมล็ดขึ้นกับยีน *PPR9* และ *PPR10* หรือ เฉพาะยีน *PPR9* หรือเฉพาะยีน *PPR10*

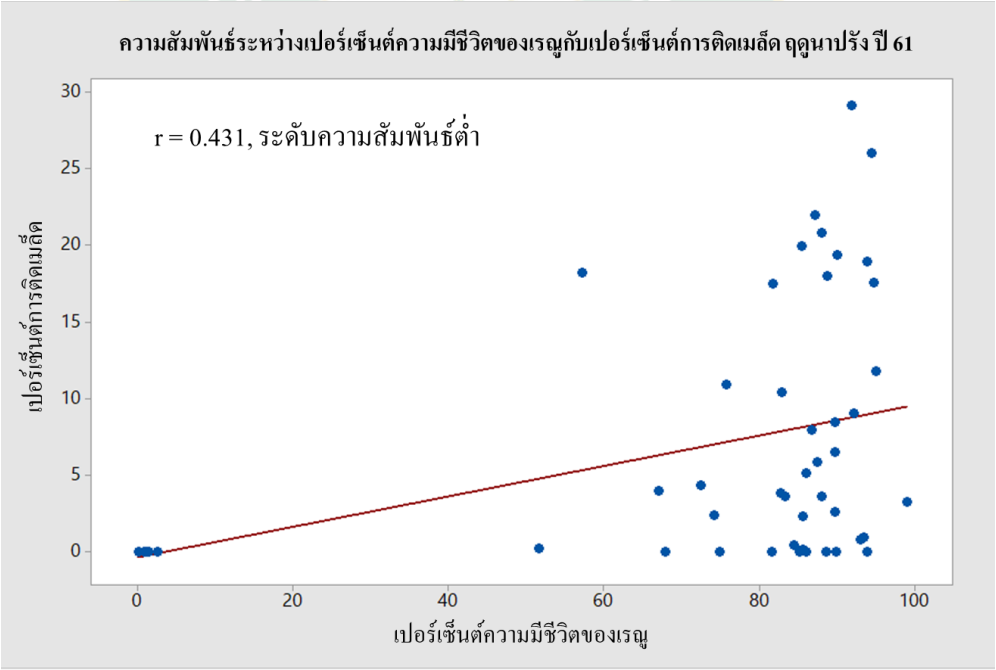
ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ายีน *PPR9* และ/หรือ ยีน *PPR10* ของข้าวสุพรรณบุรี 1 มีอิทธิพลกับความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ด คล้ายกับงานวิจัยของ Katara et al. (2017) ทำการศึกษายีนแก้ความเป็นหมันตำแหน่ง Rf4 กับลูกผสม F_1 ของระบบความเป็นหมัน WA-CMS และ Kalinga-CMS โดยผลการศึกษาพบว่า ยีนตำแหน่ง Rf4 มีผลต่อการแก้หมัน แต่อย่างไรก็ตามหากมียีน Rf3 ทำงานร่วมกันก็จะช่วยให้แก้หมันได้ดียิ่งขึ้น

หลังจากได้วิเคราะห์ ANOVA เพื่อหาความความสัมพันธ์ระหว่าง ยีนตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 กับความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ด ของประชากร F_2 ของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ทั้ง 2 ฤดู ได้ทำการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ (Correlation ; r) โดยใช้เกณฑ์ดังตารางที่ 17 เพื่อดูระดับความสัมพันธ์ของความมีชีวิตของเรณู กับการติดเมล็ด

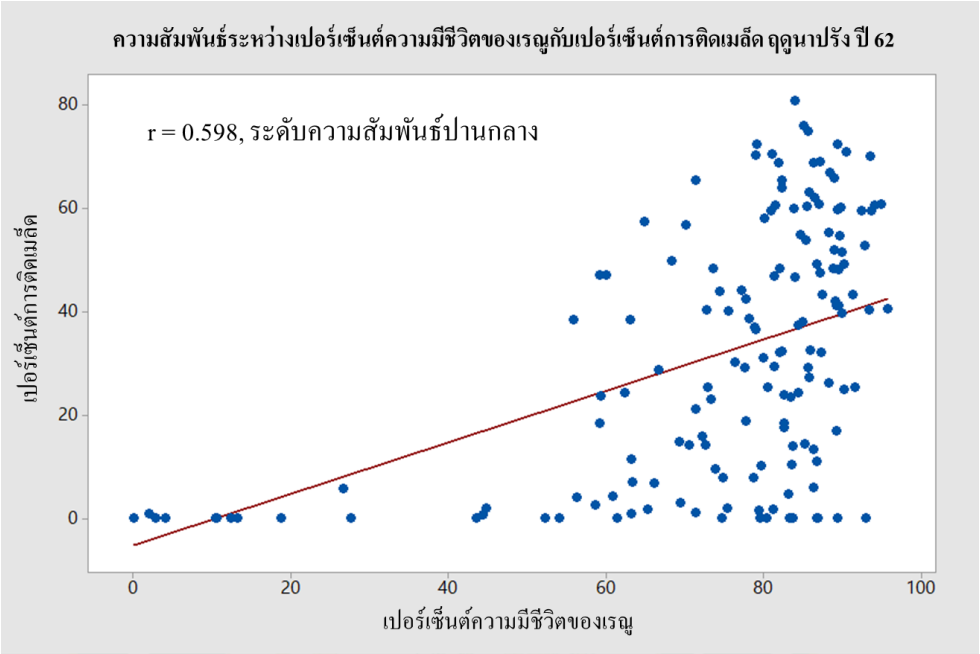
ตารางที่ 17 เกณฑ์ความสัมพันธ์จากค่าสหสัมพันธ์ (Correlation; r)

ค่าสหสัมพันธ์ (r)	ระดับของความสัมพันธ์
.90 - 1.00	มีความสัมพันธ์กันสูงมาก
.70 - .90	มีความสัมพันธ์กันในระดับสูง
.50 - .70	มีความสัมพันธ์กันในระดับปานกลาง
.30 - .50	มีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำ
.00 - .30	มีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำมาก

ที่มา : Hinkle et al. (1998)



ภาพที่ 25 ความสัมพันธ์จากค่าสหสัมพันธ์ (Correlation; r) ระหว่างความมีชีวิตของเรณู กับการติดเมล็ดของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ฤดูนาปรังปี 61



ภาพที่ 26 ความสัมพันธ์จากค่าสหสัมพันธ์ (Correlation; r) ระหว่างความมีชีวิตของเรณู กับการติดเมล็ดของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ฤดูนาปรังปี 62

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความมีชีวิตของเรณู กับการติดเมล็ดของประชากร F_2 (IR58025Axสุพรรณบุรี 1) ทั้ง 2 ฤดู พบว่า ฤดูปลูกที่ 1 มีค่า r เท่ากับ 0.431 (ภาพที่ 25) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความมีชีวิตของเรณู กับการติดเมล็ดอยู่ในระดับต่ำ ในส่วนของฤดูที่ 2 มีค่า r เท่ากับ 0.598 ซึ่งมีความสัมพันธ์ระหว่างความมีชีวิตของเรณู กับการติดเมล็ดอยู่ในระดับปานกลาง (ภาพที่ 26) แสดงให้เห็นว่าความมีชีวิตของเรณูมีความสัมพันธ์กับการติดเมล็ด ซึ่งฤดูที่ 2 มีความสัมพันธ์มากกว่าฤดูที่ 1 อาจเป็นเพราะสภาพแวดล้อมในการปลูกของทั้ง 2 ประชากรนี้ แตกต่างกัน ในขณะที่งานวิจัยของ Asadollah et al. (2004) ได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง ความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ด ของประชากร F_2 (NedaAxIR24) พบว่ามีค่า r เท่ากับ 85.7 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 0.85 ซึ่งมีความสัมพันธ์กันในระดับสูงระหว่าง 2 ลักษณะ และมีความสามารถในการถ่ายทอดทางพันธุกรรมสูง

บทที่ 5
สรุปผล และข้อเสนอแนะ

1. การจัดจำแนกกลุ่มของข้าวไทยระบบ WA-CMS จากข้อมูลเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูในลูกผสม F_1 ของคู่ IR58025Axขาวดอกมะลิ 105 และ IR58025Axสุพรรณบุรี 1 ทั้งสองฤดู มีค่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู เท่ากับ 93.2 ±2.9, 77.0 ±11.2 และ 91.5 ±5.3 จัดอยู่ในกลุ่มแก้ความเป็นหมัน กลุ่มปกติบางส่วน และกลุ่มแก้ความเป็นหมัน ในขณะที่การจัดกลุ่มด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *PPR9* พบว่าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อยู่ในกลุ่มรักษาความเป็นหมัน ส่วนพันธุ์สุพรรณบุรี 1 อยู่ในกลุ่มแก้ความเป็นหมัน ซึ่งผลการจัดกลุ่มด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอถูกต้องมากกว่า เนื่องจากประชากร F_2 ของ IR58025Axขาวดอกมะลิ 105 มีอัตราการงอกเพียง 9 เปอร์เซ็นต์ และประชากร F_2 มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู จำนวน 2 ต้น มีค่า 65.5 ±5.2 และ 90.4 ±6.1 และมีเพียง 1 ต้นที่ติดเมล็ด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ติดเมล็ดได้ 0.9 ±1.1 โดยที่ข้าวขาวดอกมะลิ 105 อาจมียีนแก้หมันในระบบอื่น ดังนั้นควรที่จะทำการศึกษายีนแก้หมันในระบบอื่นเพิ่มเติม ในส่วนของค่าการติดเมล็ดของลูก F_1นั้น ไม่ได้นำมาใช้ในการจัดกลุ่มเนื่องจากสภาพแวดล้อมมีผลต่อการติดเมล็ด

2. การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอ สำหรับยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 ที่แตกต่างระหว่าง ข้าวพันธุ์ IR58025A กับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และสุพรรณบุรี 1 ได้ เพื่อนำมาทดสอบกับลูก F_1 และประชากร F_2 โดยยีนตำแหน่ง Rf3 ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ใช้เครื่องหมายที่สัมพันธ์กับยีน คือ RM3148, RM315 และ RM294 ยีนตำแหน่ง Rf4 ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ใช้เครื่องหมายที่สัมพันธ์กับยีน คือ RM258 ในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ใช้เครื่องหมายที่จำเพาะกับยีนตำแหน่ง Rf4 คือ RMS_PPR9-4 และเครื่องหมาย PPR10 ยีนตำแหน่ง Rf3 ใช้เครื่องหมาย RM3873

3. การศึกษาการทำงานของยีนแก้หมันของเรณู จะศึกษาจากประชากร F_2 ของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เนื่องจากได้จำแนกข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี เป็น R-line ซึ่งแสดงถึงการมียีนแก้หมันของเรณู นำข้อมูลฟีโนไทป์ มาศึกษาการทำงานของยีนแก้หมัน คือ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ด มาทดสอบไคกำลังสอง พบว่าข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 มียีนควบคุมลักษณะแก้ความเป็นหมันของเรณู 1 คู่ ตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล โดยยีนทำงานแบบข่มสมบูรณ์

4. ผลจากหาความสัมพันธ์ของจีโนไทป์และลักษณะฟีโนไทป์ โดยการวิเคราะห์ ANOVA เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง เครื่องหมายหรือจีโนไทป์กับข้อมูลฟีโนไทป์ คือ ความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ด พบว่า ยีนตำแหน่ง Rf3 ไม่มีอิทธิพลกับความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ดในข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 สำหรับยีนตำแหน่ง Rf4 จะแยกวิเคราะห์ เป็น ยีน *PPR9* กับ ยีน *PPR10* เนื่องจาก

ประชากร F_2 ฤดูนาปรัง ปี 61 มีจำนวนน้อยจึงไม่สามารถแยกยีน *PPR9* ออกจากยีน *PPR10* ได้ และผลการวิเคราะห์ของยีนตำแหน่ง Rf4 พบว่า ยีน *PPR9* และ/หรือ ยีน *PPR10* มีอิทธิพลกับความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ดในข้าวสุพรรณบุรี 1 คล้ายกับงานวิจัยของ Katara et al. (2017) ทำการศึกษายีนแก้ความเป็นหมันตำแหน่ง Rf4 กับลูกผสม F_1 ของระบบความเป็นหมัน WA-CMS และ Kalinga-CMS โดยผลการศึกษาพบว่า ยีนตำแหน่ง Rf4 มีผลต่อการแก้หมัน แต่อย่างไรก็ตาม หากมียีน Rf3 ทำงานร่วมกันก็จะช่วยให้แก้หมันได้ดียิ่งขึ้นมีอิทธิพลต่อความมีชีวิตของเรณู และการติดเมล็ด

บรรณานุกรม

กนกวรรณ จันทร์เพ็ญ. 2559. **การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในข้าวไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ม.ป.ป. **ข้าวลูกผสม**. [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา http://www.ricethailand.go.th/rkb3/fs_hybrid.pdf. (29 สิงหาคม 2561)

จุฑาพร แสงประจักษ. 2555. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ข้าว. **แก่นเกษตร** (40), 299-308.

ดวงพร จันทร์ประภา, ประภา ศรีพิจิตร และธานี ศรีวงศ์ชัย. 2556. **การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของยีนแก้ความเป็นหมันของละอองละอองเรณูของการผลิตข้าวลูกผสมระบบสามสายพันธุ์**. น. 427-477. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51 5-7 กุมภาพันธ์ 2556. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตร.

ทุเรียน ทาเจริญ, กนกวรรณ จันทร์เพ็ญ, ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์, วราภรณ์ แสงทอง และแสงทอง พงษ์เจริญกิต. 2560. **การจัดกลุ่มข้าวไทยด้วยยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูในระบบข้าวลูกผสมสามสายพันธุ์**. น. 291-298. ใน รายงานการประชุมวิชาการภาคโปสเตอร์ 7-8 ธันวาคม 2560. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ธีรพัฒน์ เวชชประสิทธิ์. 2555. **Single nucleotide polymorphism (SNP)**. [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา http://biology.ipst.ac.th/?p=953/. (10 กันยายน 2563)

บุญหงส์ จงคิด. 2547. **ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

ปิยวดี นาสารีย์. 2544. **การประเมินและคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่เพื่อศึกษาลักษณะความดีเด่นของข้าวลูกผสมระบบสองสายพันธุ์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พิชญสิณี อริยธนะกตวงศ์. 2558. **ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ทริปเพิ้ล เอ็ค ดูเคชั่น.

พชระ แสงสวงค์. 2555. **การพัฒนาสายพันธุ์เพศผู้เป็นหมันของข้าวโดยวิธีการผสมกลับและทดสอบสมรรถนะการผสม**. คณะเทคโนโลยีการเกษตรมหาวิทยาลัย เทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

เพ็ญนภา จักรสมศักดิ์ และเบญจวรรณ ฤกษ์เกษม. 2553. ปัจจัยที่มีผลต่อการติดเมล็ดของข้าวเกสรเพศผู้เป็นหมันในแปลงข้าวของเกษตรกร. **วารสารเกษตร**, 26(ฉบับพิเศษ), 37-42.

พีรพล ม่วงงาม, นายศิวเรศ อารีกิจ, สุไลมาน เจ๊ะอาบู, วราภรณ์ แสงทอง และชเนษฎ์ ม้าลำพอง. 2561. **การถ่ายทอดลักษณะการติดเมล็ดและลักษณะอื่น ๆ ในสภาพเครียดจากความร้อนในระยะเจริญพันธุ์ของประชากรที่กระจายตัวในชั่วที่ 2**. น. 36 ใน การประชุมวิชาการข้าวแห่งชาติ ครั้งที่ 5 23-24 พฤษภาคม 2561. กรุงเทพมหานคร : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศุภนาถ เห็นสว่าง. 2560. ข้าวความสำคัญคุณค่าทางอาหารและการปนเปื้อน. **ENVIRONMENTAL JOURNAL**, 21(1), 15-17.

วิบูล เป็นสุข. 2555. ข้าวลูกผสม : ความสำเร็จของการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อมวลมนุษย์. **วารสาร**

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี. 1(1), 137-155.

วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2542. **เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์พืชไร่**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ:จากพื้นฐานสู่การประยุกต์**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. **JOURNAL OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY** 5(2), 37-59.

หยวน ลองปิง. 2533. **ข้าวลูกผสม (Hybird Rice)**. สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร.

Ahangar, M. A. 2014. Identification of Effective Restorers and Maintainers of Wild Abortive (WA) Cytoplasmic Male Sterile Lines in Rice (Oryza sativa L.): A Review. **Journal of Plant and Pest Science**, 1(1), 54-59.

Asadollah, A., Viktor, S., & Genady, K. 2004. The study of inheritance of rice fertility restoration in CMS-WA system. **Proceedings of The Fourth International Iran & Russia Conference**.

Bagheri, N. & Babaeian-Jelodar, N. 2011. Genetics and combining ability of fertility restoration of wild abortive cytoplasmic male sterility in rice. **African Journal of Biotechnology**, 10(46), 9314-9321.

Bohra, A., Jha, U. C., Adhimoolam, P., Bisht, D., & Singh, N. P. 2016. Cytoplasmic male sterility (CMS) in hybrid breeding in field crops. **Plant Cell Reports,** 35(5), 967-993.

Cai, J., Liao, Q., Dai, Z., Zhu, H., Zeng, R., Zhang, Z. & Zhang, G.-Q. 2013. Allelic differentiations and effects of the Rf3 and Rf4 genes on fertility restoration in rice with wild abortive cytoplasmic male sterility. **Biologia plantarum**, 57(2), 274-280.

Chen, G., Zou, Y., Hu, J., & Ding, Y. 2018. Genome-wide analysis of the rice PPR gene family and their expression profiles under different stress treatments. **BMC genomics**, 19(1), 720.

Eidi-Kohnaki M., G. K. a. G. A. N. 2015. Selection of Restorer Lines in Segregating Populations of Rice. **Jordan Journal of Agricultural Sciences**, 11(4), 1127-1134.

Franchi, G. G., Pacini, E. & Rottoli, P. 1984. Pollen grain viability in Parietaria judaica L. during the long blooming period and correlation with meteorological conditions and allergic diseases. **Plant Biosystem**, 118(3-4), 163-178.

Hasan, M., Kulsum, M., Ansari, A., Paul, A. & Biswas, P. 2015. Inheritance of fertility restoration involving wild abortive cytoplasmic male sterility system in rice (Oryza sativa L.). **Bangladesh Journal of Plant Breeding and Genetics**, 24(1), 33-40.

Hinkle, D.E, William, W. and Stephen G. J. 1998. Applied Statistics for the Behavior Sciences. 4thed. **New York,** : Houghton Mifflin

Hu, J., Huang, W., Huang, Q., Qin, X., Yu, C., Wang, L., Li, S., Zhu, R. & Zhu, Y. 2014. Mitochondria and cytoplasmic male sterility in plants. **Mitochondrion**, 19, 282-288.

Huang, J.-Z., Zhi-Guo, E., Zhang, H.-L. & Shu, Q.-Y. 2014. Workable male sterility systems for hybrid rice: Genetics, biochemistry, molecular biology, and utilization. **Rice,** 7(1), 13.

Huang, W., Yu, C., Hu, J., Wang, L., Dan, Z., Zhou, W., ... & Zhang, Z. 2015. Pentatricopeptide-repeat family protein RF6 functions with hexokinase 6 to rescue rice cytoplasmic male sterility. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** 112(48), 14984-14989.

Itabashi, E., Iwata, N., Fujii, S., Kazama, T., & Toriyama, K. 2011. The fertility restorer gene, Rf2, for Lead Rice-type cytoplasmic male sterility of rice encodes a mitochondrial glycine-rich protein. **The plant journal,** 65(3), 359-367.

Ivanov, M. & Dymshits, G. 2007. Cytoplasmic male sterility and restoration of pollen fertility in higher plants. **Russian Journal of Genetics,** 43(4), 354-368.

Jing, R., Li, X., Yi, P. & Zhu, Y. 2001. Mapping fertility-restoring genes of rice WA cytoplasmic male sterility using SSLP markers. **Botanical Bulletin of Academia Sinica,** 42.

Katara, J. L., Verma, R. L., Nayak, D., Ngangkham, U., Ray, S., Subudhi, H., Behera, L., Samantaray, S., Rao, R. N. & Singh, O. N. 2017. Frequency and fertility restoration efficiency of Rf3 and Rf4 genes in Indian rice. **Plant Breeding,** 136(1), 74-82.

Kazama, T. & Toriyama, K. 2014. A fertility restorer gene, Rf4, widely used for hybrid rice breeding encodes a pentatricopeptide repeat protein. **Rice,** 7(1), 28.

Kiani, G. 2015. Validation of SSR markers linked to restoring fertility (Rf) genes and genotyping of rice lines at Rf loci. **Journal of Agricultural Science and Technology**, 17, 1931-1938.

Li, S., Yang, D. & Zhu, Y. 2007. Characterization and use of male sterility in hybrid rice breeding. **Journal of Integrative Plant Biology,** 49(6), 791-804.

Ma, H. 2013. A battle between genomes in plant male fertility. **Nature Genetics,** 45(5), 472-473.

Medrano, R. F. V., & de Oliveira, C. A. 2014. Guidelines for the tetra-primer ARMS–PCR technique development. **Molecular biotechnology,** 56(7), 599-608.

Nematzadeh, G. A. & Kiani, G. 2010. Genetic analysis of fertility restoration genes for

WAtype cytoplasmic male sterility in Iranian restorer rice line DN-33-18. **African Journal of Biotechnology,** 9(38), 6273-6277.

Okazaki, M., Kazama, T., Murata, H., Motomura, K. & Toriyama, K. 2013. Whole mitochondrial genome sequencing and transcriptional analysis to uncover an RT102-type cytoplasmic male sterility-associated candidate gene derived from Oryza rufipogon. **Plant and cell physiology,** 54(9), 1560-1568.

Pongjaroenkit, S. 2017. Development of allele-specific SNP markers for PPR10 gene at Rf4 locus of Fertility Restorer Gene for Identification of Maintainer and Restorer lines. **Genomics and Genetics,** 10(1&2), 38-45.

Pranathi, K., Viraktamath, B., Neeraja, C., Balachandran, S., Rao, P. K., Revathi, P., Senguttuvel, P., Hajira, S., Balachiranjeevi, C. & Naik, S. B. 2016. Development and validation of candidate gene-specific markers for the major fertility restorer genes, Rf4 and Rf3 in rice. **Molecular breeding,** 36(10), 145.

Revathi, P., Medoju, P., Singh, A. K., Sundaram, R., Raju, S., Senguttuvel, P., Kemparaju, K., Hariprasad, A., Ramesha, M. & Neeraja, C. 2013. Efficiency of molecular markers in identifying fertility restoration trait of WA-CMS system in rice. **Indian J. Genet,** 73(1), 89-93.

Seesang, J., Sripichitt, P. & Sreewongchai, T. 2014. Heterosis and inheritance of fertility-restorer genes in rice. **hybrid rice,** 7(10).

Singh, A. K., Revathi, P., Pavani, M., Sundaram, R., Senguttuvel, P., Kemparaju, K., Prasad, A. H., Neeraja, C., Raju, N. S. & Rao, P. K. 2014. Molecular screening for fertility restorer genes Rf3 and Rf4 of WA-CMS and evaluation of F1 hybrids in rice (O. sativa L.). **Journal of Rice Research,** 7(1), 25.

Suresh, P. B., Srikanth, B., Kishore, V. H., Rao, I. S., Vemireddy, L., Dharika, N., Sundaram, R., Ramesha, M., Rao, K. S. & Viraktamath, B. 2012. Fine mapping of Rf3 and Rf4 fertility restorer loci of WA-CMS of rice (Oryza sativa L.) and validation of the developed marker system for identification of restorer lines. **Euphytica,** 187(3), 421-435.

Tan, Y. P., Li, S. Q., Wang, L., Liu, G., Hu, J. Z. Y. G., & Zhu, Y. G. 2008. Genetic analysis of fertility-restorer genes in rice. **Biologia plantarum,** 52(3), 469-474.

Tang, H., Luo, D., Zhou, D., Zhang, Q., Tian, D., Zheng, X., Chen, L. & Liu, Y.-G. 2014. The rice restorer Rf4 for wild-abortive cytoplasmic male sterility encodes a mitochondrial-localized PPR protein that functions in reduction of WA352 transcripts. **Molecular plant,** 7(9), 1497-1500.

Toriyama, K., & Kazama, T. 2016. development of cytoplasmic male sterile IR24 and IR64 using CW-CMS/Rf17 system. **Rice,** 9(1), 22.

Lincoln, T., Eduardo, Z., Ian M. M., & Angus, M. 2015. **The Molecular Mechanism of Cytoplasmic Sterility in Rice**. [Online]. Available http://6e.plantphys.net/topic21.04.html . (10 September 2020)

University of Leicester. no date. **Pollen Development**. [Online]. Available https://www2.le.ac.uk/departments/genetics/people/twell/lab/pollenis/development. (29 August 2018)

Vijay, D., & Roy, B. Chapter-4 **Rice (Oryza sativa L.)**.

Veeresha, B., Hanamaratti, N., Salimath, P. & Chetti, M. 2013. Identification of restorers and maintainers for development of rice hybrids. **IOINFOLET-A Quarterly Journal of Life Sciences,** 10, 2, 602-606.

Wang, Z., Zou, Y., Li, X., Zhang, Q., Chen, L., Wu, H., ... & Long, Y. 2006. Cytoplasmic male sterility of rice with boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. **The Plant Cell,** 18(3), 676-687.

Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A. R., & Day, I. N. 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nucleic acids research,** 29(17), e88-e88.

มหาวิทยาลัยแม่โจ้
MAEJO UNIVERSITY

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	ยุวรัตน์ จันทสุข	
เกิดเมื่อ	15 มีนาคม 2538	
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2550	มัธยมโรงเรียนสตรีประเสริฐศิลป์ จังหวัดตราด
	พ.ศ. 2556	มหาวิยาลัยแม่โจ้ สาขาพืชผัก จังหวัดเชียงใหม่ สาขาพืชผัก
ประวัติการทำงาน	พ.ศ. 2559	ฝึกงานโครงการหลวงห้วยลึก
	พ.ศ. 2560	ฝึกงานแผนก Molecular genetic LAB บริษัท Hortigenetic Reseach (S.E.Asia) Ltd