

บทคัดย่อ

การศึกษาและประยุกต์ใช้ระบบการเป็นหมันจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (TGMS) เป็นระบบที่มีศักยภาพในพัฒนาการผลิตลูกผสม โดยระบบ TGMS เป็นวิธีการที่ง่าย ประหยัดค่าใช้จ่าย และสามารถใส่สายพันธุ์พ่อที่หลากหลายในการผลิตลูกผสม โดยในสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติประเทศฟิลิปปินส์ (IRRI) มีการศึกษาและพัฒนาข้าวลูกผสมโดยใช้ข้าวสายพันธุ์ที่มียีน *tgms* จากข้าว ID24 ซึ่งในการศึกษานี้ ได้ทำการศึกษาเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดของข้าวที่มียีน *tgms* จากข้าว ID24 ที่มีพันธุกรรมต่างกัน 5 สายพันธุ์ พบว่า ข้าวทั้งหมดสามารถติดเมล็ดได้เมื่อได้รับอุณหภูมิ 24 และ 26 °C แต่ข้าวที่ศึกษาทั้งห้าสายพันธุ์จะเป็นหมันอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 28 และ 32 °C เนื่องจากมีรายงานที่ระบุว่ายีน *tms2* และยีน *tgms* จากข้าว ID24 เป็นยีนในตำแหน่งเดียวกัน ดังนั้นเพื่อสร้างเครื่องหมายโมเลกุลที่ใกล้ชิดกับยีน *tgms* จากข้าว ID24 จึงทำการทดสอบความเป็น allelism ของยีนทั้งสอง โดยศึกษาการกระจายตัวของประชากร F_2 ที่เกิดจากคู่ผสมของข้าวสายพันธุ์ TGMS ที่มียีน *tgms* จากข้าว ID24 และข้าวที่มียีน *tms2* จากการศึกษาพบว่า อัตราส่วนของต้นที่ติดเมล็ดและต้นที่เป็นหมันตรงกับอัตราส่วน 9:7 และเมื่อทำการวิเคราะห์จีโนไทป์ของต้น F_2 ที่เป็นหมันด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่ใกล้ชิดกับยีน *tms2* จึงยืนยันได้ว่ายีน *tms2* กับยีน *tgms* จากข้าว ID24 เป็นยีนที่อยู่ต่างตำแหน่งกัน และในการศึกษาเพื่อระบุตำแหน่งของยีน *tgms* จากข้าว ID24 ได้ทำการพัฒนาและทดสอบเครื่องหมายกำกับยีน (gene-based markers) และเครื่องหมาย SSR จำนวน 49 และ 129 คู่ไพเมอร์เพื่อคัดเลือกเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าวสายพันธุ์ TGMS line B4 และปทุมธานี 1 (สายพันธุ์พ่อและแม่ของประชากร F_2) จากการวิเคราะห์ bulked segregant analysis และยืนยันผลด้วยการวิเคราะห์ลิงค์เกจ พบว่า เครื่องหมาย RM154 ลิงค์กับยีน 24.6 เซนติเมอร์แกน และเมื่อทำการวิเคราะห์ SSR และเครื่องหมายกำกับยีนอื่นเพิ่มเติม พบว่า เครื่องหมาย RM279 และเครื่องหมายกำกับยีน *Os02g12300* และ *Os02g12370* ที่ตำแหน่ง 2.88 6.40 และ 6.44 เมกะเบสบนโครโมโซมที่ 2 ลิงค์กับยีน *tgms* จากข้าว ID24 ประมาณ 21.8, 1.3 และ 1.3 เซนติเมอร์แกน เครื่องหมายกำกับยีนที่ได้จากการศึกษานี้มีศักยภาพในการใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกข้าวที่มียีน *tgms* จากข้าว ID24 เพื่อการพัฒนาสายพันธุ์แม่ที่ใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวลูกผสมได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

Abstract

The identification and application of Temperature-sensitive Genetic Male-Sterility (TGMS) system provide a great potential for improving hybrid seed production. TGMS system has advantages in much simpler, economic hybrid seed production and boarder choice of male parents for enhancing yield potential. Several TGMS rice lines containing a *tgms* gene derived from ID24 have been used in hybrid breeding program at the International Rice Research Institute (IRRI). In this study, the critical temperatures ranges for sterility/fertility of five TGMS lines containing a *tgms* derived from ID24 were evaluated. The five TGMS lines having different genetic backgrounds were highly fertile at 24 and 26°C, while these lines were completely sterile at 28 and 32°C. Previous studies reported that *tgms* derived from ID24 and *tms2* were allelic. Before identifying closely linked markers to the *tgms*, allelic relationship between the two genes were confirmed by crossing homozygous plants containing *tms2* and *tgms* derived from ID24. The resulting fertile F₁ plant was self pollinated to generate F₂ progenies segregating in accordance with the ratio of 9 fertile: 7sterile. Additionally, genotyping these F₂ plants using gene-specific markers closely linked to *tms2* confirmed that *tgms* derived from ID24 and *tms2* were not allelic. To develop markers closely linked to *tgms* derived from ID24, F₂ population generated from crossing between TGMS line B4 and Phathumthani 1 was used as the mapping population. In order to locate the *tgms* gene, 129 SSR markers, and 49 rice gene-based markers were tested for polymorphisms between the two parents, and between the bulk of DNA from F₂ sterile plants and that from fertile plants. The obtained polymorphic markers were verified for linkage using F₂ mapping population. The linkage analysis revealed that RM154 locating on chromosome 2, was linked to the *tgms* gene derived from ID24 at distances of 24.6 cM. screening polymorphic markers around this chromosome region found that RM279, two gene-based markers, *Os02g12300* and *Os02g12370*, locating on 2.88, 6.40 and 6.44 Mb chromosome 2, respectively, were linked to the *tgms* gene derived from ID24 at distances of 21.8, 1.3 and 1.3 cM, respectively. The closely linked gene-based markers have a potential to use in marker-assisted selection for developing female parents used in rice hybrid seed production.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ดร. อมรทิพย์ เมืองพรหม อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัยร่วม ที่ให้โอกาสในการศึกษา การให้คำปรึกษา คำแนะนำ คำตักเตือน และคำสั่งสอนที่ดีอย่างที่สุดมิได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อตัวข้าพเจ้าแต่เนิ่นไป จนตลอดชีวิต จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ช่วยในการสั่งสมความรู้ ทั้งใน และนอกตำราเรียน รวมไปถึงกำลังใจ และคำแนะนำที่ดีที่อาจารย์มีให้ในยามที่เกิดอุปสรรค และปัญหาต่าง ๆ

ขอขอบคุณสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ผู้สนับสนุนทุนในการศึกษา และวิจัยที่ทำให้งานวิจัยในหัวข้อวิทยานิพนธ์นี้ ดำเนินไปโดยราบรื่นตั้งแต่ต้นจนจบ

ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน ที่ช่วยสั่งสม ความรู้ให้แก่ศิษย์ แม้ว่าจะได้มีเวลาศึกษาในสถานศึกษานี้เพียงไม่นาน แต่ก็มีความรู้สึกรักผูกพัน และรักในสถาบันนี้เป็นอย่างมาก เนื่องจากอาจารย์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำ คำชี้แนะ และคำปรึกษาที่ดีในหลายด้าน

ขอขอบคุณน้อง ๆ ในห้องแล็บปฏิบัติการพันธุศาสตร์พืช ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่คอยให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในด้านการทำงานในห้องปฏิบัติการ

ที่ลืมไม่ได้เลยคือ นายนิพนธ์ และนางสุคนธ์ บุญเจริญ บิดา และมารดาที่คอยเป็นแบบอย่างในด้านความขยันหมั่นเพียรพยายาม และความอดทนอดกลั้น ซึ่งทำให้ลูกคนนี้ ไม่ย่อท้อต่ออุปสรรคที่ผ่านเข้ามาในชีวิต

ชินจิตร บุญเจริญ

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

พ.ศ. 2551

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	(1)
กิตติกรรมประกาศ.....	(3)
สารบัญตาราง.....	(7)
สารบัญภาพประกอบ.....	(8)
บทที่	
1. บทนำ.....	1
ที่มา และความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย.....	4
2. ผลงานวิจัยและงานอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง.....	5
ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับข้าว.....	5
สัณฐานวิทยาของข้าว.....	5
อนุกรมวิธานข้าว.....	5
ลักษณะทางพันธุศาสตร์.....	6
การผลิตข้าวลูกผสม.....	6
ระบบการเป็นหมันของเกสรตัวผู้จากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ	8
เทคนิค Single Strand Conformation Polymorphism	9
การสร้างเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับข้าวสายพันธุ์ TGMS	9
ข้าว ID24.....	10
การถ่ายทอดลักษณะที่ต้องการด้วยวิธีการผสมกลับ.....	11

3.	วิธีการวิจัย.....	13
	พืชที่ใช้ในการศึกษา.....	13
	การสกัดดีเอ็นเอ.....	14
	การศึกษาช่วงอุณหภูมิในการเป็นหมัน และติดเมล็ดของข้าวสายพันธุ์ TGMS ที่อุณหภูมิ 24, 26, 28 และ 32 องศาเซลเซียส.....	15
	การทดสอบความเป็น allelism ระหว่างยีน <i>tgms</i> ที่ได้จากข้าว ID24 กับยีน <i>tms2</i> ...	15
	การกระจายตัวของประชากร F_2	15
	การวิเคราะห์จีโนไทป์ประชากร F_2 ที่เป็นหมันด้วยเครื่องหมาย กำกับยีนที่ลิงค์กับยีน <i>tms2</i>	16
	การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กับยีน <i>tgms</i> จากข้าว ID24	16
	ประชากรสำหรับการวิเคราะห์ลิงค์เกจ	16
	การพัฒนาเครื่องหมายกำกับยีน	17
	เครื่องหมายโมเลกุล Simple Sequence Repeat	17
	การวิเคราะห์ตำแหน่งของยีน <i>tgms</i> จากข้าว ID24 บนโครโมโซมที่ 2	18
	การวิเคราะห์ polymorphic markers และการวิเคราะห์ bulk segregant analysis.....	18
	การวิเคราะห์ลิงค์เกจ.....	18
	การวิเคราะห์ยืนยันความเป็น allelism ระหว่างยีน <i>tms2</i> และยีน <i>tgms</i> จากข้าว ID24	19
	การถ่ายยีน <i>tgms</i> จากข้าวสายพันธุ์ ID24 เข้าสู่ข้าวไทยพันธุ์ดี ด้วยวิธีการผสมกลับ.....	19
4.	ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง.....	21
	การศึกษาช่วงอุณหภูมิในการเป็นหมัน และติดเมล็ดของข้าวสายพันธุ์ TGMS ที่อุณหภูมิ 24, 26, 28 และ 32 องศาเซลเซียส	21
	การทดสอบความเป็น allelism ระหว่างยีน <i>tgms</i> ที่ได้จากข้าว ID24 กับยีน <i>tms2</i> ...	22
	การกระจายตัวของประชากร F_2	22
	การวิเคราะห์จีโนไทป์ประชากร F_2 ที่เป็นหมันด้วยเครื่องหมาย	

กำกับยีนที่ลิงค์กับยีน <i>tms2</i>	23
การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กับยีน <i>tgms</i> จากข้าว ID24	25
การกระจายตัวของประชากร F_2 สำหรับการวิเคราะห์ลิงค์เกจ	25
เครื่องหมายกำกับยีน.....	25
เครื่องหมายโมเลกุล SSR	26
การวิเคราะห์ตำแหน่งของยีน <i>tgms</i> จากข้าว ID24 บนโครโมโซมที่ 2	27
การวิเคราะห์ยืนยันความเป็น allelism ระหว่างยีน <i>tms2</i> และยีน	
<i>tgms</i> จากข้าว ID24	30
การถ่ายยีน <i>tgms</i> จากข้าวสายพันธุ์ ID24 เข้าสู่ข้าวไทยพันธุ์ดีด้วยวิธีการผสมกลับ...	32
5. สรุป	33
ภาคผนวก	
ก. ตารางแสดงรายละเอียดของเครื่องหมายกำกับยีน 6 เครื่องหมายที่ให้ความ	
แตกต่างระหว่างข้าวสายพันธุ์ TGMS และข้าวสายพันธุ์ปลูกของไทยด้วย	
การวิเคราะห์ SSCP จากเครื่องหมายกำกับยีนทั้งหมดที่พัฒนา	
จำนวน 49 เครื่องหมาย	35
ข. ตารางแสดงรายละเอียดของเครื่องหมาย microsatellite 129 เครื่องหมาย	
ที่ใช้ในการศึกษาสำหรับคัดเลือก polymorphic markers ในประชากร F_2	
ที่เกิดจากผสมระหว่าง TGMS line B4 และปทุมธานี 1	36
ค. ตารางแสดงรายละเอียดของเครื่องหมาย microsatellite ที่ใช้ในการศึกษา	
เพิ่มเติมบนโครโมโซมที่ 2.....	41
บรรณานุกรม.....	42
ประวัติการศึกษา.....	47

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1	ผลผลิต การใช้ การค้า และสต็อกข้าวโลก..... 1
1.2	ปริมาณผลผลิต และผลผลิตเฉลี่ยต่อพื้นที่ ของประเทศผู้ส่งออกข้าวที่สำคัญ..... 2
2.1	ข้าว TGMS ที่มีการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุล..... 10
3.1	ข้าวสายพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัย 13
3.2	ประชากร F ₂ ที่ใช้ในการศึกษา..... 16
4.1	ตารางแสดงผลการทดสอบเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดที่อุณหภูมิ 24, 26, 28 และ 32 °C..... 21
4.2	ตารางแสดงผลการกระจายตัวของยีนทั้งสองในประชากร F ₂ 23
4.3	ตารางแสดงผลการทดสอบจีโนไทป์ต้น F ₂ ที่เป็นหมัน 19 ต้น ด้วยเครื่องหมาย กำกับยีนที่ลิงค์กับยีน <i>tms2</i> (<i>Os07g26740</i> และ <i>Os07g26940</i>) 24
4.4	แสดงผลการศึกษาการกระจายตัวของยีน <i>tgms</i> จากข้าว ID24 ในประชากร F ₂ เพื่อทดสอบความสอดคล้องของการกระจายตัวระหว่างต้นไม่เป็นหมัน และต้นที่เป็นหมันในอัตราส่วน 3:1 25
4.5	รายละเอียดของเครื่องหมายกำกับยีนที่มีตำแหน่งในบริเวณใกล้ยีน <i>tms5</i> 27
4.6	ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ลิ้งค์เกจด้วยเครื่องหมายกำกับยีน <i>Os02g12300</i> และ <i>Os02g12370</i> 30
4.7	ตารางแสดงผลการทดสอบจีโนไทป์ต้น F ₂ ที่เป็นหมันทั้ง 19 ต้น ด้วยเครื่องหมาย กำกับยีนที่ลิงค์กับยีน <i>tms2</i> (<i>Os07g26740</i> และ <i>Os07g26940</i>) และเครื่องหมาย กำกับยีนที่ลิงค์กับยีน <i>tgms</i> จากข้าว ID24 (<i>Os02g12370</i>) 30

สารบัญภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
2.1	ขั้นตอนการพัฒนาข้าว EGMS ด้วยวิธีการผสมกลับ.....	12
4.1	ผลการวิเคราะห์ bulked segregant analysis ระหว่างกลุ่มตัวอย่างรวมที่เป็นหมัน: BS และ กลุ่มตัวอย่างรวมที่ไม่เป็นหมัน: BF ด้วย เครื่องหมายกำกับยีน Os02g12300 และ Os02g12370.....	28
4.2	ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ลิงค์เกจด้วยเครื่องหมายกำกับยีน Os02g12300	29
4.3	ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ลิงค์เกจด้วยเครื่องหมายกำกับยีน Os02g12370.....	29