บทที่ 3

วิธีการวิจัย
(Methodology)

พืชที่ใช้ในการศึกษา

1. ข้าวที่มีลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจากข้าว ID24 จำนวน 6 สายพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ ประเทศฟิลิปปินส์ ดังนี้ (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1
ข้าวสายพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ลำดับที่	Cultivars	รหัส
1	IR77271S	B4
2	IR76753S	B5
3	IR76761S	B6
4	IR73834	B7
5	IR75589	B8
6	IR73827	B9

2. ข้าวที่มีลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจากยีน *tms2*

ข้าวสายพันธุ์ 6-4K เป็นข้าวได้รับการถ่ายทอดยีน (*tms2)* ที่ควบคุมลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจากข้าว NorinPL12 โดยใช้พันธุกรรมของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม

3. ข้าวสายพันธุ์ปลูกของไทยที่มีลักษณะเกสรตัวผู้ปกติ

3.1. ข้าวปทุมธานี 1 เป็นข้าวเจ้าที่ไม่ไวแสง สูงประมาณ 104-133 เซนติเมตร มีลักษณะประจำพันธุ์ คือ ทรงกอตั้ง ใบสีเขียวมีขน กาบใบและปล้องสีเขียว มีอายุเก็บเกี่ยวประมาณ 104-126 วัน เมล็ดข้าวเปลือกสีฟาง มีขน มีหางเล็กน้อย คุณภาพข้าวสุก นุ่มเหนียว มีกลิ่นหอมอ่อน ให้ผลผลิตสูง ประมาณ 650-774 กิโลกรัมต่อไร่ คุณภาพเมล็ดคล้ายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ต้านทานโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง และต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยกระโดดหลังขาว

3.2. ข้าวสุพรรณบุรี 1 เป็นข้าวเจ้าที่ไม่ไวแสง สูงประมาณ 125 เซนติเมตร มีลักษณะประจำพันธุ์ คือ ทรงกอตั้ง ต้นแข็งไม่ล้ม ใบสีเขียวเข้ม มีขนกาบใบและปล้อง สีเขียว ใบธงยาว ค่อนข้าง ตั้งตรง คอรวงยาว รวงค่อนข้างแน่น อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 120 วัน ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยกระโดดหลังขาว ต้านทานโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง และต้านทานโรคใบหงิก และโรคใบสีส้ม ตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยดี ให้ผลผลิตสูง ประมาณ 806 กิโลกรัมต่อไร่

3.3. ข้าวพิษณุโลก 2 เป็นข้าวเจ้าที่ไม่ไวแสง สูงประมาณ 114 เซนติเมตร ต้นแข็งแรง ใบธงตั้งตรง อายุเก็บเกี่ยว ประมาณ 105 วัน คุณภาพเมล็ดดี ท้องไข่น้อย รูปร่างเรียวยาว คุณภาพการสีดีมาก ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยกระโดดหลังขาวและเพลี้ยจักจั่นสีเขียว ผลผลิตสูงเฉลี่ย 807 กิโลกรัม/ไร่ มีเสถียรภาพในการให้ผลผลิตดีสม่ำเสมอ คุณภาพการหุงต้มดี

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ตัวอย่างใบอ่อนอายุประมาณ 2-3 สัปดาห์ จากข้าวสายพันธุ์ TGMS และข้าวสายพันธุ์ดีของไทย และประชากร F_2 ที่เป็นหมันด้วยวิธี cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) โดยขั้นตอนการสกัดมีการปรับเปลี่ยนเพื่อให้เหมาะสมกับพืชตัวอย่าง (Lukowitz *et al.*, 2000)

การศึกษาช่วงอุณหภูมิในการเป็นหมัน และติดเมล็ดของข้าวสายพันธุ์ TGMS ที่อุณหภูมิ 24, 26, 28 และ 32°C

การทดลองเพื่อศึกษาช่วงอุณหภูมิในการเป็นหมันและติดเมล็ดของข้าวสายพันธุ์ TGMS จากข้าว ID24 ทำการศึกษาโดยใช้ข้าวสายพันธุ์ TGMS ที่มีพันธุกรรมต่างกัน 6 สายพันธุ์ โดยปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 นิ้ว กระถางละ 1 ต้น สายพันธุ์ละ 3-5 ต้น และเมื่อข้าวสายพันธุ์ TGMS ทั้ง 6 สายพันธุ์ เจริญเติบโตถึงระยะการเริ่มพัฒนาช่อดอก (อายุประมาณ 2 เดือน) ทำการย้ายเข้าห้องควบคุมอุณภูมิ 24, 26, 28 และ 32 °C โดยแต่ละวันให้แสง 9 ชั่วโมง และมืด 15 ชั่วโมง และตรวจสอบการติดเมล็ดโดยการสุ่มคลุมช่อดอกของแต่ละสายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 3-5 ช่อต่อต้น ในช่วงที่ดอกเริ่มบาน และคำนวณเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดจากจำนวนเมล็ดที่ติดต่อช่อดอก เพื่อเก็บข้อมูลจำนวนเมล็ดที่ติดเช่นเดียวกับการทดลองของ Latha *et al*. (2004) และ Reddy *et al*. (2000) โดยในระหว่างการปลูกเพื่อศึกษาเปอร์เซนต์การติดเมล็ดพบว่าข้าวสายพันธุ์ IR77271S (TGMS line B4) เป็นข้าวที่ตอบสนองต่อแสงจึงไม่ใช้ในการศึกษานี้

การทดสอบความเป็น allelism ระหว่างยีน *tgms* ที่ได้จากข้าว ID24 กับยีน *tms2*

<u>การกระจายตัวของประชากร F_2</u>

เนื่องจากมีการรายงานเกี่ยวกับความเป็น allelic กันระหว่างยีน *tms2* และยีน *tgms* จากข้าว ID24 ดังนั้น เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใกล้กับยีน *tgms* ที่ได้จากข้าว ID24 จึงทำการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างยีนทั้งสองด้วยวิธีการวิเคราะห์การกระจายตัวของประชากร F_2 ที่เกิดจากการผสมตัวเองของลูกผสมระหว่างข้าวที่มียีน *tgms* จากข้าว ID24 และข้าวที่มียีน *tms2* โดยผสมข้าวสายพันธุ์ TGMS จากข้าว ID24 ที่มียีน *tgms* กับข้าวสายพันธุ์ที่มียีน *tms2* เมื่อได้ต้น F_1 ใช้ต้น F_1 ผสมตัวเองเพื่อสร้างเมล็ด F_2 ปลูกต้น F_2 จำนวน 50 ต้น และทำการศึกษาลักษณะการกระจายตัวของประชากร F_2 ในช่วงฤดูร้อน (เมษายน – มิถุนายน) บันทึกจำนวนต้นที่เกสรตัวผู้เป็นหมัน และต้นที่เกสรตัวผู้เป็นปกติเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *tgms* จากข้าว ID24 และยีน *tms2* จากอัตราส่วนของการกระจายตัวของยีนทั้งสองในการเป็นหมันและติดเมล็ดของประชากร F_2 ทดสอบการยอมรับสมมติฐานในการกระจายตัวของประชากร F_2 ด้วยค่าทางสถิติ chi-square test ($P > 0.05$)

การวิเคราะห์จีโนไทป์ประชากร F_2 ที่เป็นหมันด้วยเครื่องหมายกำกับยีนที่ลิงค์กับยีน *tms2*

เพื่อทดสอบความเป็น allelism ระหว่างยีน *tgms* ที่ได้จากข้าว ID24 กับยีน *tms2* ในการศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์จีโนไทป์ของประชากร F_2 ที่เป็นหมันโดยใช้เครื่องหมายกำกับยีน *Os07g26740* ที่ตำแหน่ง 15.87 เมกะเบส และเครื่องหมายกำกับยีน *Os07g26940* ที่ตำแหน่ง 16.0 เมกะเบส ซึ่งเครื่องหมายดังกล่าวลิงค์กับยีน *tms2* น้อยกว่า 0.2 เซนติมอร์แกน (Pitnjam *et al.,* 2008)

การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กับยีน *tgms* จากข้าว ID24

ประชากรสำหรับการวิเคราะห์ลิงค์เกจ

ในการทดลองนี้จะทำการปลูกประชากร F_2 จำนวน 3 ประชากร จากสายพันธุ์แม่ TGMS ที่มีพันธุกรรมต่างกัน 2 lines และข้าวสายพันธุ์ดีของไทยดังตารางที่ 3.2 โดยปลูกประชากร F_2 ในกระถางพลาสติกก้นตันขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้วกระถางละ 1 ต้น ประชากรละ 230-250 ต้น และใช้ประชากร F_2 ที่เกิดจากข้าวสายพันธุ์ที่มีลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (TGMS line B4) และข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 1 เป็นประชากรในการศึกษาตำแหน่งของยีน (Mapping population)

ตารางที่ 3.2
ประชากร F_2 ที่ใช้ในการศึกษา

ประชากร F_2	สายพันธุ์แม่	สายพันธุ์พ่อ
1	TGMS line B4 (IR77271S)	ปทุมธานี 1
2	TGMS line B4 (IR77271S)	พิษณุโลก 2
3	TGMS line B8 (IR75589)	สุพรรณบุรี 1

ทำศึกษาการกระจายตัวของยีน บันทึกจำนวนต้น F_2 ที่มีลักษณะเป็นหมัน และไม่เป็นหมันของ F_2 mapping population ในสภาวะที่อุณหภูมิสูง หากจำนวนต้น F_2 ที่มีลักษณะเกสรตัวผู้เป็นปกติต่อจำนวนต้น F_2 ที่มีลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันเป็นไปตามอัตราส่วน 3:1 (ยอมรับสมมติฐานจากการทดสอบทางสถิติไคสแควร์ (chi-square test) ที่ค่าความน่าจะเป็น (Probability) มากกว่าหรือ

การพัฒนาเครื่องหมายกำกับยีน

เครื่องหมายกำกับยีน หมายถึง เครื่องหมายโมเลกุลซึ่งสร้างจากส่วนของยีนที่มีตำแหน่งจำเพาะในจีโนมข้าว ซึ่งในการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กับยีน *tgms* จากข้าว ID24 ได้ทำการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจากส่วนของยีนข้าวให้กระจายทั่วทั้งจีโนมข้าว ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวจะออกแบบให้อยู่ในส่วน exon ของยีนขนาดประมาณ 200 -360 เบส จากฐานข้อมูลลำดับเบสจีโนมข้าว *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* (http://www.rgp.dna.affrc.go.jp) และฐานข้อมูล GRAMENE (http://www.gramene.org) มีความแตกต่างแบบ single nucleotide polymorphism (SNPs) ระหว่างข้าว *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* และ *Oryza sativa* L. ssp. *indica* อย่างน้อย 5 ตำแหน่ง และออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Primer3 (http://biowb.sdsc.edu/CGI/BW.cgi) โดยตรวจสอบเพื่อวิเคราะห์ SNPs ด้วยเทคนิค SSCP-PCR (Single-Strand Conformation Polymorphism analysis) ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์ความแตกต่างของโครงสร้างทุติยภูมิของเส้นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ในการบ่งชี้ความแตกต่างของลำดับเบสแบบ SNPs ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สะดวก ว่องไว และมีค่าใช้จ่ายที่ต่ำในการวิเคราะห์ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ SNPs (Orti *et al.,* 1997) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในวงการการแพทย์ เพื่อช่วยในการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ภายในยีนที่สำคัญ เกี่ยวข้องกับโรค รวมไปถึงใช้หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการอย่างใกล้ชิดของสิ่งมีชีวิตได้อีกด้วย โดยในการศึกษาวิจัยนี้ทำการวิเคราะห์ SSCP-PCR ตามเทคนิควิธีของ Small and Gosling, 2000; Hamzeiy *et al.,* 2002 ในการวิเคราะห์ผลการทดสอบด้วยเครื่องหมายกำกับยีนนี้ นำจีโนมมิกดีเอ็นเอตัวอย่างที่จะใช้ในการวิเคราะห์มาทำการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีการ PCR จำนวน 35 รอบ โดย denature ที่ 94°C 45 วินาที annealing 53-60°C 45 วินาที และ extension 72°C 60 วินาที ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส ที่ค่ากำลังไฟฟ้าคงที่ 3.0 วัตต์

เครื่องหมายโมเลกุล Simple Sequence Repeat

คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุล Simple Sequence Repeat (SSR markers) จำนวน 129 คู่ ที่กระจายทั่ว 12 โครโมโซม ในจีโนมของข้าวทุกระยะห่าง 15-25 cM โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก

การวิเคราะห์ตำแหน่งของยีน *tgms* จากข้าว ID24 บนโครโมโซมที่ 2

การวิเคราะห์ polymorphic markers และการวิเคราะห์ bulk segregant analysis

คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจากยีน *tgms* ของข้าว ID24 กับข้าวสายพันธุ์ดีของไทย นำเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าว มาทำการวิเคราะห์ Bulked segregation analysis โดยทำการวิเคราะห์แบบรวมของสองกลุ่มตัวอย่าง คือ กลุ่มตัวอย่างต้น F_2 จำนวน 10- 15 ตัวอย่างที่มีลักษณะเป็นหมัน (Bulk sterile) และกลุ่มตัวอย่างต้น F_2 ที่ไม่เป็นหมัน (Bulk fertile) จากหลักการการวิเคราะห์ด้วยวิธี Bulked Segregation Analysis โดยเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างระหว่าง bulk sterile และ bulk fertile ได้นำไปใช้ในการวิเคราะห์ลิงค์เกจต่อไป

การวิเคราะห์ลิงค์เกจ

ภายหลังจากการวิเคราะห์โดยวิธี Bulked segregation analysis นำเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างกันระหว่างตัวอย่างรวม F_2 ที่เป็นหมัน และตัวอย่าง F_2 ที่ไม่เป็นหมัน มาใช้เพื่อทำการวิเคราะห์ genotype ของต้น F_2 ที่เป็นหมัน สำหรับวิเคราะห์ลิงค์เกจระหว่างยีนกับเครื่องหมายโมเลกุลโดยคำนวณระยะห่างสัมพัทธ์ทางพันธุศาสตร์ระหว่างยีน *tgms* จากข้าว ID24 ที่ศึกษา และเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จะอ่านรูปแบบแถบดีเอ็นเอเป็น 3 แบบ คือ homozygous dominant, homozygous recessive และ heterozygous โดยที่ระยะห่างทางพันธุกรรมสามารถคำนวณได้จากสูตรการวิเคราะห์ค่า recombinant frequency (Allard, 1956; Liu *et al.,* 2001) ที่ระบุโอกาสในการเกิด crossing over ระหว่างตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลกับตำแหน่งของยีน โดยใช้ตัวอย่าง F_2 ที่มีลักษณะเป็นหมัน ดังนี้

$$\text{Recombinant frequency} = (N_1 + N_2/2) / N$$

เมื่อ N_1 คือ จำนวนตัวอย่างที่มีรูปแบบแถบดีเอ็นเอแบบ homozygous dominant

N_2 คือ จำนวนตัวอย่างที่มีรูปแบบแถบดีเอ็นเอแบบ heterozygous

N คือ จำนวนตัวอย่าง F_2 ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์จีโนไทป์

ในการศึกษานี้จะคำนวณระยะห่างระหว่างตำแหน่งของยีนและเครื่องหมายโมเลกุลเป็นหน่วยเซนติมอร์แกนจากสูตร

$$\text{Genetic distance (cM)} = ((N_1 + N_2/2) / N) \times 100$$

เมื่อ N_1 คือ จำนวนตัวอย่างที่มีรูปแบบแถบดีเอ็นเอแบบ homozygous dominant

N_2 คือ จำนวนตัวอย่างที่มีรูปแบบแถบดีเอ็นเอแบบ heterozygous

N คือ จำนวนตัวอย่าง F_2 ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์จีโนไทป์

<u>การวิเคราะห์ยืนยันความเป็น allelism ระหว่างยีน *tms2* และยีน *tgms* จากข้าว ID24</u>

เมื่อได้เครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าวที่มียีน *tgms* จากข้าว ID24 (IR73834) และข้าวที่มียีน *tms2* (6-4K) และลิงค์กับยีน *tgms* จากข้าว ID24 จึงใช้เครื่องหมายดังกล่าวในการวิเคราะห์จีโนไทป์ต้น F_2 ที่เป็นหมันของประชากร F_2 ที่เกิดจากการผสมตัวเองของลูกผสมระหว่างข้าวที่มียีน *tgms* จากข้าว ID24 และข้าวที่มียีน *tms2* เพื่อเป็นข้อมูลเพิ่มเติมในการวิเคราะห์ยืนยันความเป็น allelism ของยีนทั้งสองในการควบคุมลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ

การถ่ายยีน *tgms* จากข้าวสายพันธุ์ ID24 เข้าสู่ข้าวไทยพันธุ์ดีด้วยวิธีการผสมกลับ

ในการศึกษานี้ทำการถ่ายยีน *tgms* จากข้าว ID24 เข้าสู่ข้าวไทยพันธุ์ดีด้วยวิธีการผสมกลับเพื่อสร้างสายพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันที่มีลักษณะที่ดีของสายพันธุ์ไทย สำหรับใช้เป็นสายพันธุ์พื้นฐานสำหรับการสร้างลูกผสม หรือปรับปรุงพันธุ์ในประเทศได้ต่อไป ทั้งนี้ในการถ่ายยีนเพื่อสร้างข้าวสายพันธุ์ TGMS ใหม่ที่มีพันธุกรรมของข้าวไทย จะช่วยในเรื่องความสามารถในการปรับตัว (adaptability) และลักษณะเชิงปริมาณที่ดีอื่น ๆ จากข้าวสายพันธุ์ปลูกของไทย ซึ่งการถ่ายยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการโดยวิธีผสมกลับเป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการถ่ายทอดยีน

การถ่ายยีน *tgms* จากข้าว ID24 เข้าสู่ข้าวไทยพันธุ์ดี โดยใช้ข้าวสายพันธุ์พิษณุโลก 2 ซึ่งมีลักษณะการให้ผลผลิตสูง ลำต้นแข็งแรงต้านทานโรคแมลงหลายชนิด ในการศึกษาส่วนนี้จะเลือกต้น F_2 ที่เป็นหมันจากประชากร F_2 ที่เกิดจากลูกผสมระหว่างข้าว TGMS line B4 (IR77271S) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มียีนควบคุมลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (ยีน *tgms* จากข้าว ID24) และพิษณุโลก 2 ผสมกลับยังสายพันธุ์รับ (พิษณุโลก 2) สร้างเมล็ด BC_1F_1 ผสมตัวเองสร้างประชากร BC_1F_2 จำนวน 12-20 ต้น คัดเลือกต้น BC_1F_2 ที่มีลักษณะที่เป็นหมันผสมกลับไปยังสายพันธุ์รับ (พิษณุโลก 2) ได้ BC_2F_1 ที่จะปลูกและผสมตัวเองสร้างประชากร BC_2F_2 คัดเลือกต้น BC_2F_2 ที่มีลักษณะเป็นหมัน และผสมกลับไปยังสายพันธุ์รับ (พิษณุโลก 2) เพื่อสร้างเมล็ด BC_3F_1 ที่มีพันธุกรรมของข้าวไทย และมีลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจากข้าว ID24