บทที่ 4

ผลการทดลอง และการวิจารณ์ผล

(Results and discussions)

การศึกษาช่วงอุณหภูมิในการเป็นหมัน และการติดเมล็ดของข้าวสายพันธุ์ TGMS ที่อุณหภูมิ 24, 26, 28 และ 32 องศาเซลเซียส

หลังจากการวิเคราะห์เปอร์เซนต์การติดเมล็ดของข้าวที่มียีน *tgms* จากข้าว ID24 5 สายพันธุ์ที่มีพันธุกรรมต่างกันในห้องควบคุมอุณหภูมิ 24, 26, 28 และ 32 °C ได้ข้อมูลเปอร์เซนต์การติดเมล็ด ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1

ตารางแสดงผลการทดสอบการติดเมล็ดที่อุณหภูมิ 24, 26, 28 และ 32 °C

Average % seed setting				
Temperature / TGMS lines	24 °C	26 °C	28 °C	32 °C
B5	32.56 ± 6.5	30.73 ± 18.96	0 ± 0	0 ± 0
B6	34.13 ± 10.5	67.89 ± 0.02	0 ± 0	0 ± 0
B7	30.51 ± 7.3	49.88 ± 8.17	0 ± 0	0 ± 0
B8	50.15 ± 6.9	74.90 ± 1.31	0 ± 0	0 ± 0
B9	65.50 ± 6.0	67.42 ± 3.94	0 ± 0	0 ± 0

งานวิจัยนี้ได้รับการอนุเคราะห์ข้าวที่มีลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (TGMS) 5 สายพันธุ์ จากสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ ประเทศฟิลิปปินส์ ซึ่งข้าว TGMS ทั้ง 5 สายพันธุ์ นี้มีพันธุกรรมที่ต่างกัน แต่ลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิถูกควบคุมโดยยีน *tgms* เพียงยีนเดียวซึ่งได้มาจากข้าว ID24 จากการทดสอบการติดเมล็ดที่อุณหภูมิ 24, 26, 28 และ 32 °C พบว่า ที่อุณหภูมิ 24 °C ข้าวเหล่านี้มีเปอร์เซนต์การติดเมล็ดอยู่ในช่วง 30.5-65.5

โดยข้าวสายพันธุ์ TGMS line B9 (IR73827) มีเปอร์เซนต์การติดเมล็ดสูงสุดคือ 65.5% และที่อุณหภูมิ 26 °C พบว่าข้าวทั้ง 5 สายพันธุ์ มีเปอร์เซนต์การติดเมล็ดอยู่ในช่วง 30.7-74.9% โดยข้าวสายพันธุ์ TGMS line B8 (IR75589) จะมีการติดเมล็ดสูงสุดถึง 74.9% ซึ่งจากการทดสอบในแต่ละอุณหภูมิ พบว่าข้าวทั้ง 5 สายพันธุ์ที่มียีน *tgms* จากข้าว ID24 มีเปอร์เซนต์การติดเมล็ดที่ต่างกัน แม้จะได้รับอุณหภูมิเดียวกัน (ที่ 24 และ 26 °C) ทั้งนี้น่าจะเป็นผลมาจากการมีพื้นฐานพันธุกรรมที่ต่างกันของข้าวทั้งห้าสายพันธุ์ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ที่รายงานว่า ลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะเกี่ยวข้องกับพันธุกรรมของข้าว TGMS แต่ละสายพันธุ์ด้วย (Virmani *et al*., 2003; Viraktamath and Virmani, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่าข้าวที่ศึกษาทั้งห้าสายพันธุ์ มีแนวโน้มในการติดเมล็ดที่อุณหภูมิ 26 °C ดีกว่าที่อุณหภูมิ 24 °C และในการศึกษาลักษณะการเป็นหมัน/ติดเมล็ดที่อุณหภูมิ 28 และ 32 °C พบว่าเกสรตัวผู้ของข้าวทั้ง 5 สายพันธุ์ นี้เป็นหมันอย่างสมบูรณ์

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

เนื่องจากมีการรายงานว่ายีน *tms2* และยีน *tgms* จากข้าว ID24 เป็น allelic กันด้วยวิธีการศึกษาการกระจายตัวของต้นลูกที่เกิดจากการผสมข้าวที่มียีน *tms2* ในสภาพ heterozygous กับข้าว ID24 ซึ่งพบว่า ลูกที่เกิดจากการผสมดังกล่าวจำนวน 53 ต้นมีการกระจายตัวต้นที่เป็นหมัน 23 ต้น: ต้นที่ติดเมล็ด 30 ต้น ตรงกับอัตราส่วน 1: 1 (χ^2 = 0.92, P = 0.33) (Reddy *et al*., 2000) เพื่อยืนยันผลการทดลองดังกล่าว การศึกษานี้จึงทำการศึกษา allelism ระหว่างยีน *tms2* และยีน *tgms* จากข้าว ID24 โดยศึกษาการกระจายตัวของประชากร F_2 และวิเคราะห์จีโนไทป์ของประชากร F_2 ที่เป็นหมันด้วยเครื่องหมายกำกับยีนที่ลิงค์กับยีน *tms2*

<u>การกระจายตัวของประชากร F_2</u>

ศึกษาการกระจายตัวของยีน *tgms* จากข้าว ID24 และยีน *tms2* โดยศึกษาการกระจายตัวของลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันจากประชากร F_2 ซึ่งเกิดจากคู่ผสมระหว่างข้าวที่มียีน *tgms* จากข้าว ID24 (IR73834) และข้าวที่มียีน *tms2* (6-4K) เมื่อวิเคราะห์ลักษณะความเป็นหมันของประชากร F_2 จำนวน 103 ต้น พบว่า มีข้าวที่ไม่เป็นหมันจำนวน 64 ต้นและเป็นหมันจำนวน 39 ต้น (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2
ตารางแสดงผลการกระจายตัวของยีนทั้งสองในประชากร F_2

จำนวนต้น F_2	ต้นที่ติดเมล็ด	ต้นที่เป็นหมัน	อัตราส่วนคาดหมายของต้นที่ติดเมล็ด : ต้นที่เป็นหมัน	χ^2 value	Probability
103	64	39	9 : 7	1.45	P = 0.23
103	64	39	3 : 1	9.09	P < 0.001

จากการศึกษาอัตราส่วนของต้นที่ติดเมล็ด: ต้นที่เป็นหมัน พบว่า ประชากรดังกล่าวมีอัตราส่วนการกระจายตัวของประชากร F_2 ที่ศึกษาตรงกับอัตราส่วนการกระจายตัวแบบ 9: 7 (χ^2 = 1.45, P = 0.23) ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ของยีนสองตำแหน่งแบบ duplicate recessive epistasis (กิตติ พัฒน์, 2006) โดยอัตราส่วนดังกล่าวไม่สอดคล้องกับอัตราส่วนการกระจายตัวแบบ 3: 1 (χ^2 = 9.09, P < 0.001) ผลที่ได้บ่งชี้ว่า ลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในประชากร F_2 ที่ศึกษาถูกควบคุมด้วยสองยีนที่อยู่ต่างตำแหน่งกัน

<u>การวิเคราะห์จีโนไทป์ประชากร F_2 ที่เป็นหมันด้วยเครื่องหมายกำกับยีนที่ลิงค์กับยีน *tms2*</u>

ข้าวที่มียีน *tms2* เป็นข้าวที่มีลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันเนื่องจากอุณหภูมิที่เกิดจากการฉายรังสี ซึ่งส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการขาดหายไปของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 70 กิโลเบสบนโครโมโซมที่ 7 (Pitnjam *et al.,* 2008) โดยหากยีน *tgms* จากข้าว ID24 เป็น allelic กับยีน *tms2* ต้นข้าวที่เป็นหมันในประชากร F_2 ที่เกิดจากคู่ผสมของข้าวที่มียีน *tgms* จากข้าว ID24 และข้าวที่มียีน *tms2* ทั้งหมดจะมีอัลลีลที่เป็น homozygous recessive ของ *tms2* การศึกษานี้จึงได้ทำการวิเคราะห์จีโนไทป์ของประชากร F_2 ที่เป็นหมันจำนวน 19 ต้น โดยใช้เครื่องหมายกำกับยีนที่ลิงค์กับยีน *tms2* โดยเมื่อทำการวิเคราะห์จีโนไทป์ประชากร F_2 ที่เป็นหมันด้วยเครื่องหมายกำกับยีน *Os07g26740* และยีน *Os07g2940* ที่ลิงค์กับยีน *tms2* (น้อยกว่า 0.2 เซนติมอร์แกน) ได้ผลดังรายละเอียดในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3

ตารางแสดงผลการทดสอบจีโนไทป์ต้น F_2 ที่เป็นหมัน 19 ต้น ด้วยเครื่องหมายกำกับยีนที่ลิงค์กับยีน *tms2* *(Os07g26740* และ *Os07g26940)*

ต้นที่เป็นหมัน	จีโนไทป์ของยีน *tms2* จากเครื่องหมายกำกับยีน	
	Os07g26740	*Os07g26940*
1	*Tms2Tms2*	*Tms2_*
2	*Tms2Tms2*	*Tms2_*
3	*Tms2tms2*	*Tms2_*
4	*Tms2tms2*	*Tms2_*
5	*tms2tms2*	*tms2tms2*
6	*tms2tms2*	*tms2tms2*
7	*Tms2Tms2*	*Tms2_*
8	*Tms2tms2*	*Tms2_*
9	*tms2tms2*	*tms2tms2*
10	*Tms2tms2*	*Tms2_*
11	*Tms2tms2*	*Tms2_*
12	*tms2tms2*	*tms2tms2*
13	*tms2tms2*	*tms2tms2*
14	*Tms2tms2*	*Tms2_*
15	*Tms2tms2*	*Tms2_*
16	*Tms2tms2*	*Tms2_*
17	*tms2tms2*	*tms2tms2*
18	*tms2tms2*	*tms2tms2*
19	*tms2tms2*	*tms2tms2*

จากผลการวิเคราะห์จีโนไทป์ประชากร F_2 ที่เป็นหมัน 19 ต้น โดยใช้เครื่องหมายกำกับยีน *Os07g26740* ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่ลิงค์กับยีน *tms2* และเครื่องหมายกำกับยีน *Os07g26940* (ตำแหน่ง 15.60 เมกะเบส) ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่อยู่ในส่วนที่ขาดหายไปของชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 70 กิโลเบสที่เป็น candidate ของยีน *tms2* พบว่า จากต้นเป็นหมันทั้งหมด 19 ต้น มีต้นที่เป็นหมัน 8 ต้น เท่านั้นที่มีจีโนไทป์ของยีน *tms2* ในรูปแบบด้อย (homozygous recessive) ทำให้คาดว่าต้นที่เป็นหมัน

ที่เหลืออีก 11 ต้น ถูกควบคุมโดยยีนอื่น และเมื่อได้สร้างเครื่องหมายกำกับยีนที่ลิงค์กับยีน *tgms* จากข้าว ID24 จึงจะทำการวิเคราะห์จีโนไทป์ของต้นที่เป็นหมันทั้ง 19 ต้น ด้วยเครื่องหมายกำกับยีนดังกล่าวต่อไป

การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กับยีน *tgms* จากข้าว ID24

<u>การกระจายตัวของประชากร F_2 สำหรับการวิเคราะห์ลิงค์เกจ</u>

จากการศึกษาลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันในประชากร F_2 ทั้งสามประชากร ได้ข้อมูลจำนวนต้นที่ไม่เป็นหมัน และจำนวนต้นที่เป็นหมันดังตารางที่ 4.4 การกระจายตัวของลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันในประชากรทั้งสามกลุ่มที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างข้าวสายพันธุ์ TGMS line B4 กับข้าวปทุมธานี 1, ข้าวสายพันธุ์ TGMS line B4 กับข้าวพิษณุโลก 2 และข้าวสายพันธุ์ TGMS line B8 กับข้าวสุพรรณบุรี 1 พบว่า ประชากร F_2 ทั้งหมดมีอัตราส่วนของต้นที่ไม่เป็นหมัน: ต้นเป็นหมัน ตรงกับอัตราส่วน 3:1 แสดงให้เห็นว่าลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของข้าวที่มียีน *tgms* จากข้าว ID24 ที่ศึกษาเป็นลักษณะด้อยที่ถูกควบคุมด้วยยีนเพียงยีนเดียว

ตารางที่ 4.4

แสดงผลการศึกษาการกระจายตัวของยีน *tgms* จากข้าว ID24 ในประชากร F_2 เพื่อทดสอบความสอดคล้องของการกระจายตัวระหว่างต้นไม่เป็นหมัน และต้นที่เป็นหมันในอัตราส่วน 3:1

ประชากร F_2	สายพันธุ์แม่	สายพันธุ์พ่อ	จำนวนประชากร F_2	จำนวนต้นที่ไม่เป็นหมัน	จำนวนต้นที่เป็นหมัน	χ^2 value	Probability
(1)	TGMS line B4	ปทุมธานี 1	247	185	62	0.00	0.97
(2)	TGMS line B4	พิษณุโลก 2	235	184	51	1.36	P = 0.34
(3)	TGMS line B8	สุพรรณบุรี 1	238	185	53	0.95	P = 0.38

<u>เครื่องหมายกำกับยีน</u>

เพื่อหาตำแหน่งของยีน *tgms* จากข้าว ID24 ในจีโนมข้าวการศึกษานี้จึงได้พัฒนาเครื่องหมายกำกับยีนที่พัฒนาจากส่วนของยีน ซึ่งจากการวิเคราะห์เครื่องหมายกำกับยีนทั้งสิ้น 49 คู่ไพรเมอร์ ด้วยเทคนิค SSCP เพื่อคัดเลือกเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อและสาย

พันธุ์แม่ และวิเคราะห์ลิงค์เกจ พบว่ามีเพียง 6 คู่ไพรเมอร์ (ภาคผนวก ก.) ที่ให้ความแตกต่าง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการคัดเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องหมายนี้ คัดเลือกจากส่วนของดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างแบบ Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) ที่มีในฐานข้อมูล Gramene ซึ่งเป็น SNPs ที่เกิดจากความต่างของข้าว subspecies *japonica* และsubspecies *indica* แต่ข้าวสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่ที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นข้าวที่อยู่ใน subspecies เดียวกัน คือ ssp. *indica* ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้มากที่เครื่องหมายที่สร้างขึ้นนี้จะมีอัตราการเกิด polymorphic ต่ำ และเมื่อทำการวิเคราะห์ bulk segregant analysis และวิเคราะห์ลิงค์เกจด้วยเครื่องหมายกำกับยีนทั้ง 6 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ เครื่องหมายกำกับยีน *Os07g27010* ที่ 15.64 เมกะเบสบนโครโมโซมที่ 7, *Os07g27410* ที่ 15.97 เมกะเบสบนโครโมโซมที่ 7 และ *Os07g27590* ที่ 16.11 เมกะเบสบนโครโมโซมที่ 7 (เครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กับยีน *tms2*) ยีน *Os07g29380* ที่ 17.30 เมกะเบสบนโครโมโซมที่ 7, *Os07g29840* ที่ 17.53 เมกะเบสบนโครโมโซมที่ 7 และยีน *Os07g34980* ที่ 20.95 เมกะเบสบนโครโมโซมที่ 7 พบว่า เครื่องหมายดังกล่าวไม่ลิงค์กับยีน *tgms* จากข้าว ซึ่งผลที่ได้เป็นการพิสูจน์ และบ่งชี้ว่ายีน *tgms* จากข้าว ID24 ไม่อยู่ในตำแหน่งที่ใกล้กับยีน *tms2* บนโครโมโซมที่ 7 ดังนั้น เพื่อสร้างเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กับยีน *tgms* จากข้าว ID24 จึงได้ทำการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุล Simple Sequence Repeat เพิ่มเติม

<u>เครื่องหมายโมเลกุล SSR</u>

งานวิจัยในส่วนนี้ได้รับความเอื้อเฟื้อเครื่องหมาย microsatellite จากศูนย์ค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ซึ่งมีเครื่องหมาย microsatellite อยู่เป็นจำนวนมาก โดยเครื่องหมาย microsatellite จัดเป็นเครื่องหมายโมเลกุลแบบสุ่มที่มีอัตราการเกิดโพลิมอฟิซึมสูง และมีการกระจายตัวถี่ทั่วทั้งจีโนมข้าว และมีความหนาแน่นของเครื่องหมายสูง (High-density marker maps) ดังนั้น เพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใกล้ชิดกับยีน *tgms* จากข้าว ID24 จึงทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย microsatellite จำนวน 129 เครื่องหมาย (ภาคผนวก ข.) ที่มีการกระจายทั่วทั้งจีโนมข้าว ผลการศึกษาพบว่า มีเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์แม่ (TGMS line B4) และข้าวสายพันธุ์ดีของไทยที่ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อ (ปทุมธานี 1) จำนวน 38 คู่ไพรเมอร์ จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค bulk segregant analysis พบว่า เครื่องหมาย RM154 บนโครโมโซมที่ 2 ตำแหน่ง 1.08 เมกะเบส, RM17 บนโครโมโซมที่ 12 ตำแหน่ง 26.9 เมกะเบส และ RM168 บนโครโมโซมที่ 3 ตำแหน่ง 28.05 เมกะเบส แสดง polymorphic ระหว่าง bulk ดีเอ็นเอจากข้าวเป็นหมัน และไม่เป็นหมัน แต่เมื่อวิเคราะห์ลิงค์เกจพบว่ามีเพียงเครื่องหมายโมเลกุล RM154 บนโครโมโซมที่ 2 ที่ตำแหน่ง 1.08 เมกะเบส มีระยะห่างจาก

ยีน *tgms* จากข้าว ID24 ประมาณ 24.57 เซนติมอร์แกน โดยเครื่องหมาย RM17 และ RM154 ไม่ลิงค์กับยีน หลังจากนั้น จึงทำการวิเคราะห์เครื่องหมาย SSR บนโครโมโซมที่ 2 ในบริเวณนี้เพิ่มเติมอีก 9 เครื่องหมาย (ภาคผนวก ค.) พบว่า เครื่องหมาย RM279 (2.9 เมกะเบสบนโครโมโซมที่ 2) และเครื่องหมาย RM424 (11.4 เมกะเบสบนโครโมโซมที่ 2) แสดงความแตกต่างระหว่าง bulk ดีเอ็นเอจากข้าวเป็นหมัน และข้าวที่ไม่เป็นหมัน และเมื่อวิเคราะห์ลิงค์เกจ พบว่า เครื่องหมาย RM279 ลิงค์กับยีนที่ศึกษา 21.77 เซนติมอร์แกน และเครื่องหมาย RM424 (11.39 เมกะเบส) ไม่ลิงค์กับยีน *tgms* จากข้าว ID24 จากผลการศึกษาที่ได้ว่ายีน *tgms* จากข้าว ID24 น่าจะมีตำแหน่งอยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM279 (2.88 เมกะเบส) และ RM424 (11.39 เมกะเบส) บนโครโมโซมที่ 2 ดังนั้น การศึกษาขั้นต่อไปจึงศึกษาตำแหน่งของยีน *tgms* จากข้าว ID24 โดยการพัฒนาเครื่องหมายกำกับยีนเพิ่มเติมในบริเวณนี้

การวิเคราะห์ตำแหน่งของยีน *tgms* จากข้าว ID24 บนโครโมโซมที่ 2

เนื่องจากมีรายงานว่ายีน *tms5* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 2 ในตำแหน่ง 6.40 เมกะเบสใน BAC clone AP004039 (Yang *et al.,* 2007) ซึ่งไม่มีเครื่องหมาย SSR อื่นใดในบริเวณดังกล่าวที่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ TGMS line B4 และปทุมธานี 1 ซึ่งเป็นคู่พ่อแม่ที่ใช้ในการสร้างประชากร F_2 ในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงค์กับยีน *tgms* จากข้าว ID24 จึงทำการพัฒนาเครื่องหมายกำกับยีนในบริเวณใกล้กับยีน *tms5* ขึ้น 7 เครื่องหมายดังรายละเอียดในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5
รายละเอียดของเครื่องหมายกำกับยีนที่มีตำแหน่งในบริเวณใกล้ยีน *tms5*

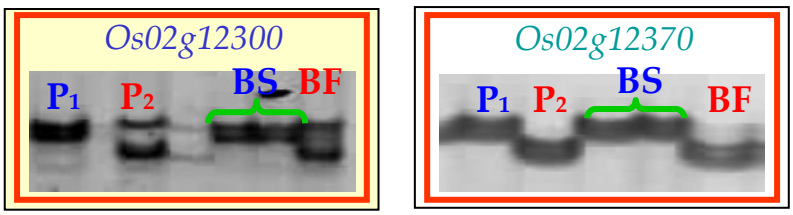
ลำดับ	ยีน	รายละเอียดของยีน	ลำดับเบส	ผลการทดสอบ	ตำแหน่ง(Mb)
1	*Os02g12290*	nuclear ribonuclease Z, putative	F- TCTCTACCTTCGCTGCCGAT	monomorphic	6.39
			R- CGGCCCAAGTCAATGTCTAC		
2	*Os02g12300*	pectate lyase precursor, putative, expressed	F- GGGTTCTTTCATTTTCCCCA	polymorphic	6.40
			R- CTCCCAATGCTCGTCGAACT		
3	*Os02g12310*	NAC domain-containing protein 18, putative, expressed	F- CCTGCCTAAACCACCCTTCA	monomorphic	6.41
			R- CAAATCTCCCGCAAAACCAT		

ลำดับ	ยีน	รายละเอียดของยีน	ลำดับเบส	ผลการทดสอบ	ตำแหน่ง(Mb)
4	*Os02g12350*	histone deacetylase, putative, expressed	F- TCCATCTGCAAATCCATAGCA R- TCTGGTGCATAGCTGCTGGT	monomorphic	6.42
5	*Os02g12370*	expressed protein	F- ACTTATGCGGTGGTCAAGCA R- TTGTTCCTCCACGGCTGATA	polymorphic	6.44
6	*Os02g12400*	receptor-like protein kinase precursor, putative, expressed	F- TCTGCATGTTGGAGTTTCCTG R- GGCTAGCCTAGATGGCAAGG	monomorphic	6.47
7	*Os02g12420*	receptor-like protein kinase precursor, putative, expressed	F- GCTCCATTCCTGCCTCACTT R- GAATCTGGTATGGAGCCTGAAA	monomorphic	6.48

จากการวิเคราะห์เครื่องหมายกำกับยีนที่พัฒนาขึ้นด้วยเทคนิค SSCP พบว่า เครื่องหมายกำกับยีน *Os02g12300* และ *Os02g12370* เป็นเครื่องหมายกำกับยีนที่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ของประชากรที่ใช้ในการวิเคราะห์ลิงค์เกจ และเมื่อทำการวิเคราะห์ bulked segregant analysis พบว่า เครื่องหมายกำกับยีนทั้งสองให้ความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอกลุ่มตัวอย่างรวมที่เป็นหมัน และดีเอ็นเอกลุ่มตัวอย่างรวมที่ไม่เป็นหมันดังภาพที่ 4.1 และในการวิเคราะห์ลิงค์เกจโดยใช้ประชากร F_2 ที่เป็นหมันได้ผลการวิเคราะห์ดังตัวอย่างผลการวิเคราะห์ภาพที่ 4.2 และ 4.3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายกำกับยีน *Os02g12300* และเครื่องหมายกำกับยีน *Os02g12370* เป็นเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอระหว่างตัวอย่างสายพันธุ์พ่อ (ปทุมธานี 1) และสายพันธุ์แม่ (TGMS line B4) โดยเครื่องหมายกำกับยีนทั้งสองเป็น co-dominant markers ซึ่งสามารถระบุสภาพแอลลีลที่เป็น homozygous และ heterozygous ของยีน *tgms* จากข้าว ID24 ได้

ภาพที่ 4.1

ผลการวิเคราะห์ bulked segregant analysis ระหว่างกลุ่มตัวอย่างรวมที่เป็นหมัน: BS และกลุ่มตัวอย่างรวมที่ไม่เป็นหมัน: BF ด้วยเครื่องหมายกำกับยีน จากส่วนของยีน *Os02g12300* และ *Os02g12370*

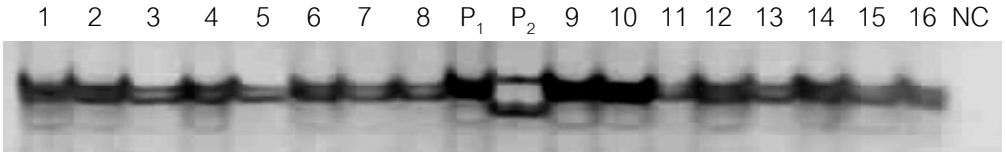


หมายเหตุ : P_1 = TGMS line B4: สายพันธุ์แม่

P_2 = ปทุมธานี 1: สายพันธุ์พ่อ

ภาพที่ 4.2

ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ลิงค์เกจด้วยเครื่องหมายกำกับยีน *Os02g12300*



หมายเหตุ : P_1 = TGMS line B4: สายพันธุ์แม่

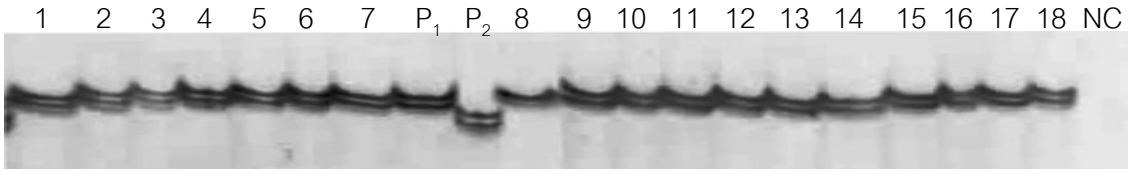
P_2 = ปทุมธานี 1: สายพันธุ์พ่อ

1-16 = ตัวอย่าง F_2 ที่เป็นหมันที่ใช้ในการวิเคราะห์ลิงค์เกจ

NC = Negative control

ภาพที่ 4.3

ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ลิงค์เกจด้วยเครื่องหมายกำกับยีน *Os02g12370*



หมายเหตุ : P_1 = TGMS line B4: สายพันธุ์แม่

P_2 = ปทุมธานี 1: สายพันธุ์พ่อ

1-18 = ตัวอย่าง F_2 ที่เป็นหมันที่ใช้ในการวิเคราะห์ลิงค์เกจ

NC = Negative control

เพื่อเพิ่มความแม่นยำของการวิเคราะห์ลิงเกจของเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับใช้ในการคัดเลือกข้าวที่มียีน *tgms* จากข้าว ID24 ได้เพิ่มจำนวนประชากร F_2 (TGMS line B4 x ปทุมธานี1) จึงมีตัวอย่าง F_2 (TGMS line B4 x ปทุมธานี1) ทั้งหมด 786 ต้น ซึ่งประชากร F_2 ดังกล่าวมีการกระจายตัวของจำนวนต้นที่ไม่เป็นหมัน : ต้นที่เป็นหมัน 572 ต้น : 214 ต้น ตรงกับอัตราส่วน 3 : 1 (χ^2 = 2.08, P = 0.15) และในการวิเคราะห์ลิงเกจโดยใช้ตัวอย่าง F_2 ที่เป็นหมันจำนวน 197 ตัวอย่าง ด้วย

เครื่องหมายกำกับยีน *Os02g12300* และ *Os02g12370* พบว่า เครื่องหมายกำกับยีน *Os02g12300* (6.40 เมกะเบส) และ *Os02g12370* (6.44 เมกะเบส) ลิงค์กับยีน *tgms* จากข้าว ID24 1.3 เซนติมอร์แกน ดังผลการกระจายตัวของรูปแบบแถบดีเอ็นเอในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ลิงค์เกจด้วยเครื่องหมายกำกับยีน *Os02g12300* และ *Os02g12370*

เครื่องหมายกำกับยีน/ตำแหน่ง (Mb.)	จำนวน F_2 sterile ที่ใช้ในการวิเคราะห์	จำนวน homozygous recessive band	จำนวน heterozygous band	จำนวน homozygous dominant band	Recombinant frequency ±S.E.	Relative genetic distance
Os02g12300 /6.40	197	193	3	1	0.0127± 3.29e-6	1.3
Os02g12370 /6.47	196	192	3	1	0.0128± 3.29e-6	1.3

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

การวิเคราะห์ยืนยันความเป็น allelism ระหว่างยีน *tms2* และยีน *tgms* จากข้าว ID24 พบว่า เครื่องหมายกำกับยีน *Os02g12370* เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าวที่มียีน *tgms* จากข้าว ID24 (IR73834) และข้าวที่มียีน *tms2* (6-4K) และลิงค์กับยีน *tgms* จากข้าว ID24 (1.3 cM) จึงทำการวิเคราะห์จีโนไทป์ต้น F_2 ที่เป็นหมัน 19 ต้น ซึ่งเกิดจากคู่ผสมระหว่างข้าวที่มียีน *tgms* จากข้าว ID24 (IR73834) และข้าวที่มียีน *tms2* (6-4K)

ตารางที่ 4.7

ตารางแสดงผลการทดสอบจีโนไทป์ต้น F_2 ที่เป็นหมันทั้ง 19 ต้น ด้วยเครื่องหมายกำกับยีนที่ลิงค์กับยีน *tms2 (Os07g26740* และ *Os07g26940)* และเครื่องหมายกำกับยีนที่ลิงค์กับยีน *tgms* จากข้าว ID24 *(Os02g12370)*

ต้นที่เป็นหมัน	จีโนไทป์ของยีน *tms2* จากเครื่องหมายกำกับยีน		จีโนไทป์ของยีน *tgms* จากเครื่องหมายกำกับยีน
	Os07g26740	*Os07g26940*	*Os02g12370*
1	*Tms2Tms2*	*Tms2_*	*tgms tgms*
2	*Tms2Tms2*	*Tms2_*	*tgms tgms*

ต้นที่เป็นหมัน	จีโนไทป์ของยีน *tms2* จากเครื่องหมายกำกับยีน		จีโนไทป์ของยีน *tgms* จากเครื่องหมายกำกับยีน
	Os07g26740	*Os07g26940*	*Os02g12370*
3	*Tms2tms2*	*Tms2_*	*tgms tgms*
4	*Tms2tms2*	*Tms2_*	*tgms tgms*
5	*tms2tms2*	*tms2tms2*	*Tgms Tgms*
6	*tms2tms2*	*tms2tms2*	*Tgms tgms*
7	*Tms2Tms2*	*Tms2_*	*tgms tgms*
8	*Tms2tms2*	*Tms2_*	*tgms tgms*
9	*tms2tms2*	*tms2tms2*	*Tgms tgms*
10	*Tms2tms2*	*Tms2_*	*tgms tgms*
11	*Tms2tms2*	*Tms2_*	*tgms tgms*
12	*tms2tms2*	*tms2tms2*	*tgms tgms*
13	*tms2tms2*	*tms2tms2*	*tgms tgms*
14	*Tms2tms2*	*Tms2_*	*tgms tgms*
15	*Tms2tms2*	*Tms2_*	*tgms tgms*
16	*Tms2tms2*	*Tms2_*	*tgms tgms*
17	*tms2tms2*	*tms2tms2*	*tgms tgms*
18	*tms2tms2*	*tms2tms2*	*Tgms Tgms*
19	*tms2tms2*	*tms2tms2*	*Tgms tgms*

เมื่อทำการวิเคราะห์จีโนไทป์ของต้นที่เป็นหมันทั้ง 19 ต้น ด้วยเครื่องหมายกำกับยีนที่ลิงค์กับยีน *tgms* จากข้าว ID24 (*Os02g12370* ตำแหน่ง 6.44 เมกะเบส) พบว่า ต้น F_2 ที่เป็นหมันทั้ง 11 ต้นที่เหลือจากต้นที่เป็นหมัน 19 ต้นมีสภาพด้อยของยีน *tgms* จากข้าว ID24 และจากผลการวิเคราะห์จีโนไทป์ต้น F_2 ที่มีลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันทั้ง 19 ต้น ดังกล่าวด้วยเครื่องหมายที่ลิงค์กับยีน *tms2* และเครื่องหมายที่เป็น candidate ของยีน *tms2* พบว่าจากต้นเป็นหมันทั้งหมด 19 ต้น มีเพียง 8 ต้นที่มีอัลลีล *tms2* ในสภาพด้อย ดังนั้น ผลที่ได้ทั้งหมดข้างต้นเป็นการยืนยันว่า ลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของประชากร F_2 ที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างข้าวสายพันธุ์ที่มียีน *tgms* จากข้าว ID24 และข้าวที่มียีน *tms2* เกิดจากการควบคุมของยีน 2 ยีน สอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดสอบ allelism ที่ทำการศึกษาข้างต้น

การถ่ายยีน *tgms* จากข้าว ID24 เข้าสู่ข้าวไทยพันธุ์ดีด้วยวิธีการผสมกลับ

การถ่ายทอดยีน *tgms* จากข้าว ID24 เข้าสู่ข้าวพันธุ์ปลูกของไทยด้วยวิธีการผสมกลับใช้ข้าวสายพันธุ์พิษณุโลก 2 ซึ่งมีลักษณะการให้ผลผลิตสูง ลำต้นแข็งแรงต้านทานโรค และแมลงศัตรูพืชหลายชนิดเป็นสายพันธุ์รับ ในการศึกษานี้ได้เลือกต้น F_2 ที่เป็นหมันจากประชากร F_2 ที่ใช้เกิดจากลูกผสมระหว่างข้าว TGMS line B4 (IR77271S) และพิษณุโลก 2 ผสมกลับยังสายพันธุ์รับ (พิษณุโลก 2) สร้างเมล็ด BC_1F_1 เมื่อได้เมล็ด BC_1F_1 ทำการปลูก และผสมตัวเองสร้างประชากร BC_1F_2 จำนวน 20 ต้น คัดเลือกต้น BC_1F_2 ที่เป็นหมัน (จำนวน 5 ต้น) ผสมกลับไปยังสายพันธุ์รับ (พิษณุโลก 2) ได้เมล็ด BC_2F_1 ซึ่งทำการปลูก และผสมตัวเองสร้างประชากร BC_2F_2 จำนวน 12 ต้น หลังจากนั้นคัดเลือกต้น BC_2F_2 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (จำนวน 3 ต้น) ผสมกลับไปยังสายพันธุ์รับ (พิษณุโลก 2) ได้เมล็ด BC_3F_1 การถ่ายทอดลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจากข้าว ID24 เข้าสู่ข้าวสายพันธุ์ดีของไทยด้วยวิธีการผสมกลับ ในการศึกษานี้เป็นการศึกษาในระยะเริ่มแรกเพื่อการพัฒนาการผลิตข้าวลูกผสมในประเทศไทย