การระบุโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ที่สัมพันธ์กับความเป็นหมันของข้าว โดยอาศัยอุณหภูมิด้วยวิธี bulked segregant analysis

มหาวิทยาลัยแม่โจ้
แม่โจ้ ๒๕๓๗
สำนักหอสมุด

มัลลิกา จินดาซิงห์

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชไร่
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2549

การระบุโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ที่สัมพันธ์กับความเป็นหมันของข้าว โดยอาศัยอุณหภูมิด้วยวิธี bulked segregant analysis

มัลลิกา จินดาซิงห์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชไร่
โครงการบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2549

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

ใบรับรองวิทยานิพนธ์
โครงการบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชไร่

ชื่อเรื่อง

การระบุโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ที่สัมพันธ์กับความเป็นหมันของข้าวโดยอาศัยอุณหภูมิด้วยวิธี bulked segregant analysis

โดย

มัลลิกา จินดาซิงห์

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา ....
(อาจารย์ ดร.วิลาวรรณ ศิริพูนวิวัฒน์)
วันที่ 15 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2549

กรรมการที่ปรึกษา ....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร พงศ์ศุภสมิทธิ์)
วันที่ 15 เดือน พค พ.ศ. 49

กรรมการที่ปรึกษา ....
(อาจารย์ ดร.ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์)
วันที่ 15 เดือน พ.ค. พ.ศ. 2549

ประธานกรรมการประจำหลักสูตร ....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรวิชย์ วินิจเขตคำนวณ)
วันที่ 15 เดือน พ.ค. พ.ศ. 49

โครงการบัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว ....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทรงวุฒิ เพ็ชรประดับ)
รองประธานกรรมการ โครงการบัณฑิตวิทยาลัย
วันที่ 22 เดือน พค พ.ศ. 49

ชื่อเรื่อง การระบุโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ที่สัมพันธ์กับความเป็นหมันของข้าวโดยอาศัยอุณหภูมิด้วยวิธี bulked segregant analysis
ชื่อผู้เขียน นางสาวมัลลิกา จินดาซิงห์
ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชไร่
ประธานกรรมการที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.วิลาวรรณ ศิริพูนวิวัฒน์

บทคัดย่อ

ข้าวลูกผสม (hybrid rice) เป็นข้าวที่ให้ผลผลิตต่อพื้นที่สูงกว่าข้าวธรรมดา 15-20 เปอร์เซ็นต์ สามารถตอบสนองต่อปัจจัยในการผลิตได้ดี มีความทนทานต่อโรคและแมลง แต่ในการพัฒนาสายพันธุ์ข้าว TGMS (thermosensitive genic male sterility) เพื่อการผลิตข้าวลูกผสม จำเป็นต้องอาศัยการคัดเลือกลักษณะความเป็นหมันจากลักษณะภายนอกที่แสดงออก (phenotype) ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยแวดล้อมหลายประการ จึงมีการนำโมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยสืบหายีนที่ควบคุมลักษณะความเป็นหมันของข้าวด้วยวิธี bulked segregant analysis เพื่อช่วยเพิ่มความแม่นยำ และความมีประสิทธิภาพในการคัดเลือกต้นพืชที่เป็นหมัน จากการศึกษาในพันธุ์ข้าว 2 คู่ผสม ได้แก่ $T29^{s}$ × สุพรรณบุรี1 และ สายพันธุ์ $T29^{s}$ × กข 21 ณ โรงเรือนกระจก อาคารเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระเทพ และแปลงทดลองฟาร์มวิจัยพืชไร่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต. หนองหาร อ. สันทราย จ. เชียงใหม่ ระหว่างเดือนธันวาคม 2545 ถึง เดือนธันวาคม 2547 โดยการนำตัวอย่างดีเอ็นเอประชากรข้าวในชั่วที่ 2 แบ่งออกเป็นกลุ่มประชากรที่เป็นหมัน และกลุ่มประชากรที่ไม่เป็นหมันกลุ่มละ 10 ต้น จากนั้นจึงจำแนกความแตกต่างของการปรากฏแถบดีเอ็นเอร่วมกับพันธุ์พ่อแม่ โดยการใช้โมเลกุลเครื่องหมาย RAPD (random amplified polymorphic DNA) จำนวน 65 primers ได้แก่ primer ชุด AC, B, C และ G01-05 (Operon Technology) พบว่าโมเลกุลเครื่องหมายที่สามารถแสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มที่เป็นหมันและกลุ่มไม่เป็นหมันที่สามารถทำซ้ำเพื่อยืนยันความสัมพันธ์กับความเป็นหมันของข้าวโดยอาศัยอุณหภูมิได้มีเพียง 1 primer คือ OPAC-10 และการกระจายตัวของประชากรข้าวในชั่วที่ 2 มีสัดส่วนการกระจายตัวของลักษณะไม่เป็นเป็นหมัน : เป็นหมัน เท่ากับ 3 : 1 ซึ่งเป็นไปตามกฎการกระจายตัวเชิงคุณภาพของเมนเดล โดยยีนที่ควบคุมความเป็นหมันของข้าวนี้ถูกควบคุมด้วยยีน 1 คู่ ที่เป็น homozygous recessive gene

Title Identification of RAPD Markers Linked to Thermosensitive Genic Male Sterility (TGMS) in Rice by Bulked Segregant Analysis
Author Miss Manlika Jindasing
Degree of Master of Science in Agronomy
Advisory Committee Chairperson Dr.Wilawan Siripoonwiwat

ABSTRACT

Hybrid rice has a yield per area advantage of approximately 15 to 20 percent over the best conventionally bred lines. The hybrid rice is tolerant to diseases and insects. To enable the development of TGMS (thermosensitive genic male sterility) lines to produce hybrid rice, there is a need to depend on the selection of sterile character from its phenotypic trait which also depends on environmental conditions. Molecular markers were used therefore, to help in tagging rice genes with thermosensitive genic male sterility by bulked segregant analysis to increase accuracy and efficiency in the selection of male sterile plants. This study using two crosses of T29^{S} x Suphanburi 1 and T29^{S} x RD 21 was conducted in a greenhouse and in experimental plots in Agronomy Experiment Station at Maejo University, Chiang Mai from December 2002 to December 2004. DNA samples of F_2 rice were divided into two populations : sterile and fertile with 10 individual plants per group and which were then isolated together with DNA traits of parental lines using RAPD (random amplified polymorphic DNA) technique, using 65 random primers in AC, B, C and G01-05 (Operon Technology). Results showed that OPAC-10 was the only primer that could be identified as a molecular marker linked to thermosensitive genic male sterility in rice by bulked segregant analysis. The F_2 generation showed segregation ratio for fertile : sterile in the ratio of 3 : 1. Thus, the classical Mendelian segregation can be used to explain that this pair of gene controlled by TGMS was actually a homozygous recessive gene.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. วิลาวรรณ ศิริพูนวิวัฒน์ ซึ่งรับเป็นประธานกรรมการที่ปรึกษา ได้ให้คำแนะนำในการวางแผนดำเนินการทดลอง การสนับสนุนวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินงาน การแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้น จนกระทั่งงานทดลองสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ตลอดจนช่วยตรวจสอบข้อผิดพลาดในเรื่องของการเขียนวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้อง และเหมาะสม

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริพร พงศ์ศุภสมิทธิ์ และ อาจารย์ ดร. ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ ที่ได้ให้คำปรึกษาแนะนำ ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งสำเร็จ

ขอขอบพระคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ได้สนับสนุนงบประมาณในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ซึ่งวิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งในโครงการวิจัย การพัฒนาสายพันธุ์ข้าว TGMS ในข้าวพันธุ์ไทยโดยการใช้โมเลกุลเครื่องหมาย

นอกจากนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มาลา จินดาซิงห์ และมารดา ทิพยรส ขันทโคครัย ที่คอยเป็นกำลังใจตลอดระยะเวลาที่ศึกษา และการสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการศึกษามาโดยตลอด

มัลลิกา จินดาซิงห์
พฤษภาคม 2549

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (2)

Abstract (3)

สารบัญ (5)

สารบัญตาราง (7)

สารบัญภาพ (8)

บทที่ 1 บทนำ 1

- ความสำคัญของปัญหา 1
- วัตถุประสงค์ 2
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
- ขอบเขตของการศึกษา 2

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร 3

- ความเป็นหมันของข้าว 5
- ข้าวลูกผสม 5
- โมเลกุลเครื่องหมาย 9
- โมเลกุลเครื่องหมายในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว 11

บทที่ 3 วิธีการทดลอง 15

- สถานที่ดำเนินการทดลอง 15
- อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ 15
- ระเบียบวิธีการดำเนินการทดลอง 16

บทที่ 4 ผลการทดลอง 19

- ลักษณะทางการเกษตรของพันธุ์พ่อแม่ 19
- ลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 1 21
- ลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 2 22
- การสืบหาโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ที่สัมพันธ์กับความเป็นหมันของข้าวโดยอาศัยอุณหภูมิ ด้วยวิธี bulked segregant analysis 26

หน้า

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง 45

    ลักษณะของสายพันธุ์ข้าวเป็นหมันโดยอุณหภูมิ 45

    ลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 1 46

    ลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 2 47

    การสืบหาโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ที่สัมพันธ์กับความเป็นหมันของข้าวโดยอาศัยอุณหภูมิ ด้วยวิธี bulked segregant analysis 49

บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ 51

    สรุปผลการทดลอง 51

    ข้อเสนอแนะในการปลูกข้าว 52

    ข้อเสนอแนะในการสืบหาโมเลกุลเครื่องหมาย 53

บรรณานุกรม 54

ภาคผนวก 59

    วิธีการสกัดดีเอ็นเอ 60

    ประวัติผู้วิจัย 62

มหาวิทยาลัยแม่โจ้
๒๔๗๗
สำนักหอสมุด

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า
1 ลักษณะทางการเกษตรของพันธุ์พ่อแม่ 19
2 ลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 1 21
3 ลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 2 22
4 รูปแบบลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 2 23
5 ค่าไคสแควร์ (chi-square) ความเป็นหมันของประชากรข้าวชั่วที่ 2 24
6 ค่าไคสแควร์ (chi-square) ลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 2 25
7 ความสัมพันธ์ของลักษณะ phenotype ประชากรข้าวชั่วที่ 2 26
8 การให้ค่าตามการปรากฏของแถบดีเอ็นเอข้าวประชากรชั่วที่ 2 ใช้โมเลกุลเครื่องหมาย OPAC-10 28
9 การปรากฏแถบดีเอ็นเอของ T29^{S} x สุพรรณบุรี 1 โดยใช้ RAPD primer ชุด OPAC 29
10 การปรากฏแถบดีเอ็นเอของ T29^{S} x สุพรรณบุรี 1 โดยใช้ RAPD primer ชุด OPC 30
11 การปรากฏแถบดีเอ็นเอของ T29^{S} x สุพรรณบุรี 1 โดยใช้ RAPD primer ชุด OPB 32
12 การปรากฏแถบดีเอ็นเอของ T29^{S} x สุพรรณบุรี 1 โดยใช้ RAPD primer primer OPG-01 ถึง OPG-05 33
13 การปรากฏแถบดีเอ็นเอของ T29^{S} x กข 21 โดยใช้ RAPD primer ชุด OPAC 34
14 การปรากฏแถบดีเอ็นเอของ T29^{S} x กข 21 โดยใช้ RAPD primer ชุด OPC 35
15 การปรากฏแถบดีเอ็นเอของ T29^{S} x กข 21 โดยใช้ RAPD primer ชุด OPB 36
16 การปรากฏแถบดีเอ็นเอของ T29^{S} x กข 21 โดยใช้ RAPD primer primer OPG-01 ถึง OPG-05 37
17 การปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างทั้งสองคู่ผสมของ RAPD primer ชุด OPAC, OPB, OPC และ OPG-01 ถึง 05 38
18 ผลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ primer OPAC-10 จากการทำซ้ำ 3 ครั้ง 41

สารบัญภาพ

ภาพ หน้า

1 ลักษณะสีโคนต้นและสีเขี้ยวใบของพันธุ์ T29^S 19

2 ลักษณะดอกและรวงของพันธุ์ T29^S 20

3 ลักษณะสีโคนต้นและสีเขี้ยวใบของพันธุ์ กข 21 20

4 ลักษณะสีโคนต้นและสีเขี้ยวใบของประชากรข้าวชั่วที่ 1 22

5 รูปแบบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอข้าวประชากรชั่วที่ 2 จากการใช้โมเลกุลเครื่องหมาย OPAC-10 27

6 รูปแบบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอจากประชากรข้าวชั่วที่ 2 ของคู่ผสม T29^S × สุพรรณบุรี1 และ T29^S × กข 21 หลังจากทำปฏิกิริยา PCR ด้วย primer OPAC-10 39

7 รูปแบบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอจากประชากรข้าวชั่วที่ 2 ของคู่ผสม T29^S × สุพรรณบุรี1 และ T29^S × กข 21 หลังจากทำปฏิกิริยา PCR ด้วย primer OPC-05 40

8 รูปแบบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอจากประชากรข้าวชั่วที่ 2 ของคู่ผสม T29^S × สุพรรณบุรี1 และ T29^S × กข 21 หลังจากทำปฏิกิริยา PCR ด้วย primer OPAC-10 (ทำซ้ำครั้งที่ 3) 42

9 รูปแบบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอจากประชากรข้าวชั่วที่ 2 ของคู่ผสม T29^S × สุพรรณบุรี1 และ T29^S × กข 21 หลังจากทำปฏิกิริยา PCR ด้วย primer OPC-05 (ทำซ้ำครั้งที่ 3) 43

10 รูปแบบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอจากประชากรข้าวชั่วที่ 2 ของคู่ผสม T29^S × สุพรรณบุรี1 และ T29^S × กข 21 หลังจากทำปฏิกิริยา PCR ด้วย primer OPAC-10 โดยไม่ได้รวมกลุ่มดีเอ็นเอ 44

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญของปัญหา

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญต่อประชากรโลกมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ และในแถบเอเชียประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ (Calpe, 2002) มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอันดับหนึ่งของประเทศไทย โดยในปี พ.ศ. 2546 สามารถส่งออกทำรายได้เข้าประเทศเป็นมูลค่า 5,301,105.43 บาท (สภาหอการค้าแห่งประเทศไทย, 2546) แต่จากการที่จำนวนประชากรโลกเพิ่มขึ้น โดยในปี พ.ศ. 2541 มีจำนวน 5,900 ล้านคน และคาดว่าในปี พ.ศ. 2563 จะมีจำนวน 7,500 ล้านคน จึงคาดการณ์ว่าจะส่งผลให้การบริโภคข้าวในเอเชียเพิ่มมากขึ้นประมาณ 410 ล้านตัน เฉลี่ยอัตราการขยายตัวของความต้องการข้าวปี พ.ศ. 2541 ถึง พ.ศ. 2563 เท่ากับ 11 เปอร์เซ็นต์ (บริบูรณ์, 2541) การขยายตัวของประชากรนี้เป็นสาเหตุทำให้พื้นที่ในการเพาะปลูกมีจำกัด การผลิตข้าวในปัจจุบันจึงจำเป็นต้องใช้เทคโนโลยีในการปรับปรุงและคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่มีศักยภาพในการให้ผลผลิตต่อพื้นที่สูง และตอบสนองต่อปัจจัยการผลิตได้ดี จึงนำเทคโนโลยีการผลิตข้าวลูกผสมมาช่วยแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น แต่การผลิตข้าวลูกผสมในประเทศไทยจำเป็นต้องมีการพัฒนาพันธุ์ข้าวไทยที่เป็นหมัน และคัดเลือกพืชที่มีลักษณะตามต้องการ ถือเป็นขั้นตอนสำคัญต่อผลสำเร็จของโครงการปรับปรุงพันธุ์พืช และการนำโมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยคัดเลือกพืชให้มีลักษณะที่ต้องการ นับเป็นการคัดเลือกโดยตรงจากสารพันธุกรรมของพืช เพราะสามารถช่วยให้การคัดเลือกมีความแม่นยำ และมีประสิทธิภาพมากขึ้น

การระบุโมเลกุลเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุม ลักษณะความเป็นหมันของข้าว TGMS ด้วยวิธี bulked segregant analysis จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งของการพัฒนาเครื่องมือเพื่อช่วยในการพัฒนาข้าว TGMS สำหรับการผลิตข้าวลูกผสมของประเทศไทยต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสืบหาโมเลกุลเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมลักษณะความเป็นหมันของข้าวโดยอาศัยอุณหภูมิ ด้วยวิธี bulked segregant analysis
2. เพื่อศึกษาการกระจายตัวของลักษณะความเป็นหมัน สีเขี้ยวใบ สีโคนต้น และลักษณะทรงต้นในประชากรชั่วที่ 2
3. เพื่อศึกษาลักษณะทางการเกษตรของข้าว TGMS

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถระบุโมเลกุลเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมลักษณะความเป็นหมันของข้าวโดยอาศัยอุณหภูมิ ด้วยวิธี bulked segregant analysis
2. สามารถทราบถึงการกระจายตัวของลักษณะความเป็นหมัน สีเขี้ยวใบ สีโคนต้น และลักษณะทรงต้นในประชากรชั่วที่ 2 ของ
3. สามารถทราบลักษณะทางการเกษตรของข้าว TGMS

ขอบเขตของการศึกษา

1. สร้างกลุ่มตัวแทนของประชากรสองกลุ่มที่มีลักษณะความเป็นหมันและไม่เป็นหมัน
2. วิเคราะห์ bulked segregant analysis
3. ระบุโมเลกุลเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมลักษณะความเป็นหมันของข้าว TGMS

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ข้าวเป็นพืชล้มลุกในตระกูล Poaceae ตระกูลย่อย Oryzineae และอยู่ในสกุล *Oryza* มีจำนวนโครโมโซม $2n = 24$ มีขนาดจีโนม 4×10^5 กิโลเบส จากการสำรวจชนิดของข้าวพบว่า มีข้าวทั้งหมด 23 species แบ่งออกเป็นข้าวพันธุ์ป่า 21 species และข้าวพันธุ์ปลูก ซึ่งมี *O. perennis* เป็นบรรพบุรุษ 2 species (Khush, 1996) ได้แก่ *O. glaberrima* เป็นข้าวที่ไม่ค่อยมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีการปลูกเฉพาะในเขตร้อนทางตะวันออกของแอฟริกามาตั้งแต่ 1,500 ปีก่อนคริสตกาล และ *O. sativa* L. เป็นข้าวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก มีการปลูกทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ข้าว species นี้มีแหล่งกำเนิดทางตอนใต้ของทวีปเอเชีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และแถบประเทศจีนมากว่า 10,000 ปีมาแล้ว และพบว่ามีการแพร่กระจายจากอินเดียเข้าสู่อียิปต์ ทวีปยุโรป แอฟริกา ออสเตรเลีย และจากจีนเข้าสู่เกาหลีและญี่ปุ่น ข้าว species นี้แบ่งออกได้เป็น 3 สายพันธุ์ คือ Indica, Japonica และ Javanica (กรมวิชาการเกษตร, 2544)

ข้าวที่นำมาบริโภคในประเทศไทยส่วนมากเป็นข้าว Indica ทั้งหมด โดยพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้ามีหลายพันธุ์ เช่น ข้าวพันธุ์ กข 1, กข 2, กข 3, กข 4, กข 5, กข 7, กข 9, กข 10, กข 11, กข 21, กข 23, กข 25, สุพรรณบุรี 1, สุพรรณบุรี 2, สุพรรณบุรี 60, สุพรรณบุรี 90, หอมสุพรรณบุรี, คลองหลวง 1, ชัยนาท 1, แพร่ 1 และพิษณุโลก 60-2 ซึ่งส่วนมากเป็นข้าวนาชลประทานที่มีการรับรองและแนะนำพันธุ์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2502 จนถึงปัจจุบัน ส่วนข้าวเจ้านาน้ำฝนที่นิยมปลูกเป็นข้าวเจ้าหอม คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ค้นพบโดยชาวบ้านจังหวัดชลบุรีเมื่อ 50 ปีก่อน จึงได้นำมาปลูกและคัดพันธุ์มีพื้นที่ปลูกหลักอยู่ที่แหลมประดู่ อำเภอพนัสนิคม และต่อมาขยายไปที่ท่าทองหลาง อำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา ประมาณช่วงปี พ.ศ. 2493-2494 กองการข้าวได้เก็บรวบรวมพันธุ์ข้าวพื้นบ้านจากพื้นที่ต่างๆ จากเขตอำเภอบางคล้าได้จำนวน 199 รวง เพื่อทำการปลูกคัดพันธุ์บริสุทธิ์ที่สถานีทดลองข้าวโคกสำโรงในปี พ.ศ. 2498 โดยในการปลูกคัดพันธุ์นี้ พบว่า ต้นข้าวแถวที่ 105 มี คุณภาพข้าวดีที่สุด จึงใช้ข้าวแถวที่ 105 เป็นแม่พันธุ์ในการขยายพันธุ์ต่อมา หลังจากนั้นได้มีการนำไปปลูกเปรียบเทียบกับพันธุ์ท้องถิ่นในภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคอีสาน จนคัดได้เป็นสายพันธุ์ 4-2-105 คณะกรรมการจึงได้พิจารณาให้ใช้ขยายพันธุ์ และนำมาส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก ตั้งแต่วันที่ 25 พฤษภาคม พ.ศ. 2502 โดยให้ใช้ชื่อว่า ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (อัมมาร และวิโรจน์, 2533) มีลักษณะพิเศษ คือ มีเมล็ดสีขาวสวยเหมือนดอกมะลิ เมล็ดข้าวสารยาวเรียว มีกลิ่นหอมคล้ายใบเตย รสชาติดี ทนแล้ง ทนดินเปรี้ยว และดินเค็ม มีความสูงประมาณ 140 เซนติเมตร ระยะพักตัวของเมล็ด 8 สัปดาห์

ผลผลิต 363 กิโลกรัมต่อไร่ ข้อดีของข้าวขาวดอกมะลิ 105 คือ เป็นข้าวต้นสูงเก็บเกี่ยวง่าย อายุเบาเก็บเกี่ยวได้เร็ว เมล็ดข้าวสารใส แข็ง คุณภาพการขัดสีดี คุณภาพการหุงต้มดี มีกลิ่นหอมและอ่อนนุ่ม ราคาจำหน่ายดี ข้อเสีย คือ ต้นข้าวอ่อน ล้มง่าย ปลูกได้เฉพาะนาปี เพราะเป็นข้าวไวแสง น้ำหนักเมล็ดเบา ผลผลิตค่อนข้างต่ำ ไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้ง โรคไหม้ โรคใบสีส้มและโรคใบหงิก ไม่ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยจักจั่นสีเขียว และหนอนกอ ทรงกอแผ่ถ้าแก่เกินจะเกี่ยวยาก (จำรัส, 2534)

ข้าวพันธุ์ที่มีการแนะนำและส่งเสริมให้ปลูกทั่วทุกภาค คือ สุพรรณบุรี 1 มาจากสายพันธุ์เดิม คือ SPR85163-5-1-1-2 เป็นข้าวที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างคู่ผสม 3 ทาง ของ IR25393-57-2-3/RD23//IR 27316-96-3-2-2 และ คู่ผสมเดี่ยว ของ SPRLR77205-3-2-1-1/SPRLR 79134-51-2-2 ที่สถานีทดลองข้าวสุพรรณบุรี เมื่อปี พ.ศ. 2528 และ พ.ศ. 2529-2531 ปลูกข้าวพันธุ์ผสมชั่วที่ 1 และ คัดเลือกข้าวแบบสืบตระกูลชั่วที่ 2-5 จนได้สายพันธุ์ SPRLR85163-5-1-1-2 (สงกรานต์ และบริบูรณ์, 2540) พ.ศ. 2531-2532 ปลูกศึกษาพันธุ์ พ.ศ. 2532-2535 ปลูกเปรียบเทียบผลผลิต ศึกษาเสถียรภาพการให้ผลผลิต ทดสอบความต้านทานโรคแมลง และคุณภาพเมล็ด คณะกรรมการวิจัยและพัฒนากรมวิชาการเกษตรมีมติให้เป็นพันธุ์รับรองเมื่อ วันที่ 28 ตุลาคม 2537 และ ให้ชื่อว่า สุพรรณบุรี 1 (ภัคดี, 2539) ซึ่งเป็นข้าวเจ้านาสวนสูงประมาณ 125 เซนติเมตร เป็นพันธุ์ข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง มีอายุการเก็บเกี่ยวเร็วประมาณ 120 วัน เมล็ดมีการพักตัว 3-4 สัปดาห์ ทรงกอตั้ง ต้นแข็งไม่ล้ม ใบสีเขียวเข้ม มีขน กาบใบ และปล้องเป็นสีเขียว ใบธงยาวค่อนข้างตั้งตรง คอรวงยาว รวงค่อนข้างแน่น มีคุณภาพการสุกร่วนแข็ง ให้ผลผลิตประมาณ 806 กิโลกรัมต่อไร่ มีลักษณะเด่น คือ ให้ผลผลิตสูงตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยดี ต้านทานต่อโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง และโรคขอบใบหงิก มีความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และเพลี้ยกระโดดหลังขาว (สุวิตร, 2541)

นอกจากนี้ยังมีข้าวนาชลประทานประเภทข้าว กข ที่ปลูกโดยทั่วไป คือ กข 21 เป็นข้าวที่มาจากสายพันธุ์เดิม คือ SPR7419-86-2-5 ซึ่งมาจากการผสมระหว่าง RD7/IR32//RD11 (สงกรานต์ และบริบูรณ์, 2540) เป็นข้าวเจ้านาสวนสูงประมาณ 100-125 เซนติเมตร เป็นพันธุ์ข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง มีอายุการเก็บเกี่ยวเร็วประมาณ 120-130 วัน เมล็ดมีการพักตัว 5 สัปดาห์ ทรงกอตั้งต้นแข็งไม่ล้ม ใบสีเขียวเข้ม มีขนกาบใบและปล้องสีเขียว ใบธงยาวค่อนข้างตั้งตรง คอรวงยาว ให้ผลผลิตประมาณ 700 กิโลกรัมต่อไร่ (ภัคดี, 2539) มีลักษณะที่สำคัญ คือ ให้ผลผลิตสูง ตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ยดี ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง ไม่ต้านทานโรคไหม้ มีความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล แต่ถ้าใส่ปุ๋ยมากข้าวจะล้ม (สุวิตร, 2541) ข้อดีของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และกข 21 คือ เป็นข้าวนาสวนพันธุ์ดี ปลูกได้ทั้งนาปีและนาปรังในเขตที่มีการ

ชลประทาน หรือควบคุมน้ำเป็นพันธุ์ที่ปลูกได้ทั่วทุกภาค เป็นข้าวพันธุ์ที่ไม่ไวแสง ให้ลูกผสมที่เป็น heterosis สูง มีความต้านทานต่อโรคและแมลง (สงกรานต์ และบริบูรณ์, 2540)

ความเป็นหมันของข้าว

ความเป็นหมันของดอกตัวผู้ (male sterility) เป็นปรากฏการณ์ที่พืชไม่สามารถผลิตละอองเกสรได้หรือผลิตได้น้อยที่สุด เนื่องจากการที่อับเกสรตัวผู้เจริญเติบโตไม่เต็มที่หรือเกิดจากการที่อับเกสรตัวผู้ไม่แตก ทำให้ไม่มีเกสรร่วงหรือปลิวออกมาได้ male sterility แบ่งออกได้ 3 ประเภท ได้แก่ genetic male sterility คือ ลักษณะความเป็นหมันที่ถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนหนึ่งคู่และเป็น recessive gene ดังนั้นพืชจึงแสดงลักษณะ male sterility ได้เมื่อมี genotype ชนิด homozygous recessive ส่วนพืชที่มี genotype ชนิด heterozygous หรือ homozygous dominance แสดงลักษณะ male-fertile ส่วน cytoplasmic male sterility คือ ลักษณะการเป็นหมันที่ขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาของไซโตพลาสซึมในพืชบางชนิด ซึ่งมีปฏิกิริยาก่อให้เกิดลักษณะ male sterility ได้ และ genetic cytoplasmic male sterility คือ ลักษณะการเป็นหมันที่ถูกควบคุมโดยยีนในนิวเคลียส และปฏิกิริยาของไซโตพลาสซึม พืชแสดงลักษณะ male sterility ได้เมื่อทั้งในไซโตพลาสซึมและในนิวเคลียสไม่มี fertile factor และ fertile gene (กฤษฎา, 2544)

ข้าวลูกผสม

ปัจจุบันเกษตรกรประสบกับปัญหาพื้นที่ในการผลิตข้าวลดลง เนื่องจากมีอัตราการเจริญเติบโตของประชากรที่เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการขยายตัวของชุมชน ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ต้องมีการเพิ่มผลผลิตข้าวต่อพื้นที่ให้สูงขึ้น จึงได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีในการเพิ่มผลผลิตข้าวหลายรูปแบบ เช่น การพัฒนารูปแบบต้น (new plant type; NPT) เป็นโครงการวิจัยปรับปรุงลักษณะประจำพันธุ์ข้าว โดยเน้นลักษณะรูปแบบต้นที่มีศักยภาพในการให้ผลผลิตสูงผลผลิตสูงที่กว่าพันธุ์เดิม 20-25 เปอร์เซ็นต์ เช่น ข้าว super rice ส่วนการใช้เทคโนโลยีข้าวลูกผสม (hybrid rice technology) เป็นเทคโนโลยีที่ทำให้ได้ผลผลิตข้าวสูงกว่าการใช้พันธุ์ข้าวทั่วไป โดยให้ผลผลิตเพิ่มมากขึ้น 15-20 เปอร์เซ็นต์ และโครงการข้าวอายุสั้น (short maturity rice) มีเป้าหมายในการพัฒนาพันธุ์ข้าวที่มีอายุการสุกแก่เร็ว ทำให้สามารถปลูกข้าวได้หลายครั้งในเขตที่มีการชลประทาน ซึ่งเป็นการเพิ่มผลผลิตข้าวโดยตรง เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาน้ำท่วม และปัญหาความ แห้งแล้งปลายฤดู (สุชาติ และบังอร, 2545)

ข้าวลูกผสม (hybrid rice) เป็นข้าวชั่วที่ 1 ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวต่างพันธุ์หรือต่างสายพันธุ์ ซึ่งการปลูกข้าวลูกผสมต้องจำเป็นต้องซื้อเมล็ดพันธุ์ข้าวทุกครั้งที่ทำการปลูกข้าว จึงแตกต่างจากการปลูกข้าวโดยทั่วไปที่สามารถใช้เมล็ดพันธุ์แท้ที่ได้จากการเก็บเมล็ดข้าวในแปลงปลูกในฤดูก่อนมาทำพันธุ์ต่อไปได้ หลักการผลิตข้าวลูกผสมเป็นเทคโนโลยีที่นำเอาหลักการความแข็งแรงของลูกผสม (hybrid vigor หรือ heterosis) มาใช้ โดยข้าวลูกผสมจะมีความดีเด่นเหนือกว่าพันธุ์พ่อและแม่ (สุชาติ และบังอร, 2545) การผลิตข้าวลูกผสมนั้นสามารถทำได้ 3 วิธี คือ 1) การใช้ไซโตพลาสซึมเป็นตัวควบคุมความเป็นหมัน (cytoplasmic-genic male sterility; CMS) 2) การใช้สภาพแวดล้อมเป็นตัวควบคุม (environment genic male sterility; EGMS) เช่น สภาพแวดล้อมจากช่วงแสง (photoperiod sensitive genic male sterility; PGMS) ซึ่งต้องการความยาวนานของช่วงแสงที่ช่วงหนึ่งจึงจะทำให้เกิดความเป็นหมัน แต่ส่วนใหญ่ต้องการช่วงแสงที่มากกว่า 13.75 ชั่วโมงต่อวัน และสภาพแวดล้อมจากอุณหภูมิ (thermosensitive genic male sterility; TGMS) มีอิทธิพลต่อความมีชีวิตของดอกเกสรตัวผู้ของข้าว โดยอุณหภูมิวิกฤตที่ทำให้เป็นหมัน เรียกว่า critical sterility induced temperature (CSIT) ซึ่งอุณหภูมิวิกฤตนี้มีความแตกต่างกันตามสายพันธุ์ และวิธีสุดท้ายที่นิยม คือ 3) การใช้สารเคมีเป็นตัวควบคุม (กรมวิชาการเกษตร, 2544)

เทคโนโลยีการผลิตข้าวลูกผสม เป็นเทคโนโลยีที่มีการพัฒนาและนำมาใช้ในช่วงทศวรรษ 1970 หรือเมื่อประมาณ 30 ปีที่ผ่านมา (Virmani, 2002) นับเป็นเทคโนโลยีที่ค่อนข้างใหม่ ซึ่งสาธารณรัฐประชาชนจีนเป็นประเทศแรกที่ค้นพบวิธีเพิ่มผลผลิตข้าวต่อพื้นที่โดยใช้เทคโนโลยีข้าวลูกผสม สามารถปลูกเป็นการค้าและประสบผลสำเร็จตั้งแต่ปี พ.ศ. 2519 เป็นต้นมา เทคโนโลยีข้าวลูกผสมมีความสำคัญในการสร้างความมั่นคงทางอาหารให้แก่สาธารณรัฐประชาชนจีน ทำให้จีนมีผลผลิตข้าวเพิ่มขึ้น 15-20 เปอร์เซ็นต์ (Yuan, 2002) ความสำเร็จของสาธารณรัฐประชาชนจีนเป็นตัวอย่างให้ประเทศต่างๆ ได้นำไปปรับใช้ แต่สายพันธุ์ข้าวลูกผสมของจีนนั้นไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดีภายใต้สภาพนาในเขตร้อนและคุณภาพของเมล็ดยังไม่เป็นที่ยอมรับ ดังนั้นประเทศในเขตเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จึงมีความจำเป็นในการพัฒนาพันธุ์พ่อแม่ที่ใช้ในการผลิตข้าวลูกผสมให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม และความต้องการของแต่ละประเทศ ในปัจจุบันมีการค้นคว้า และวิจัยเกี่ยวกับพันธุกรรมละอองเรณูที่มีการตอบสนองความเป็นหมัน โดยอุณหภูมิ และได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ ตั้งแต่การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจนถึงการใช้โมเลกุลเครื่องหมาย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตข้าวลูกผสม (ธีรยุทธ, 2544)

เทคโนโลยีข้าวลูกผสมแบ่งออกเป็น 2 ระบบคือ ระบบ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์เป็นหมัน ซึ่งพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะความเป็นหมันอยู่ในไซโตพลาสซึม (A line) สายพันธุ์รักษาความเป็นเป็นหมัน (B line) และสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน (R line) และระบบ 2 สายพันธุ์ เป็นการผลิตข้าวลูกผสมที่ประกอบด้วย สายพันธุ์พ่อปกติ และสายพันธุ์แม่ที่มีเรณูเป็นหมัน ซึ่งถูกควบคุมโดยอุณหภูมิ และลักษณะความเป็นหมันที่ถูกควบคุมด้วยช่วงแสง ถูกพบเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2516 โดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Shi Mingsan ใน Hubei และเป็นผู้ที่ได้ทำการพัฒนาสายพันธุ์เรณูเป็นหมัน Nongken 58S ในปี พ.ศ. 2524 (บริบูรณ์, 2541) โดยสายพันธุ์ข้าวนี้มีลักษณะเรณูเป็นหมันได้ทั้ง 2 แบบ เรียกว่า PTGMS (photoperiod sensitive and thermosensitive genic male sterility) ซึ่งความเป็นหมันถูกควบคุมโดยทั้งสภาพความยาวของวันและอุณหภูมิการค้นพบสายพันธุ์ที่มีลักษณะทั้ง 2 แบบนี้ทำให้ได้แนวทางใหม่ในการใช้ประโยชน์จาก heterosis (Yuan, 2002) และมีการรายงานการค้นพบยีน PTGMS โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นชื่อ Ikehashi และคณะในปี พ.ศ. 2527 ทำให้ Prof. Yuan Longping เกิดแนวคิดในการปรับปรุงพันธุ์โดยการใช้ประโยชน์จาก heterosis ด้วยการปรับปรุงจากระบบ 3 สายพันธุ์เป็นระบบ 2 สายพันธุ์ จนถึงระบบสายพันธุ์เดียว (ธีรยุทธ, 2544)

เมื่อไม่นานมานี้ประเทศต่างๆ เริ่มทำการวิจัยและพัฒนาข้าวลูกผสม เช่น บังคลาเทศ บราซิล โคลัมเบีย อิยิปต์ อินเดีย อินโดนีเซีย เกาหลีเหนือ เกาหลีใต้ ญี่ปุ่น มาเลเซีย พม่า ปากีสถาน ฟิลิปปินส์ ศรีลังกา ไทย สหรัฐอเมริกา และเวียดนาม โดยการสนับสนุนจาก FAO และ IRRI พันธุ์ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ พันธุ์ IR8025A และ IR62829A (สงกรานต์ และ บริบูรณ์, 2540) สาเหตุที่ทำให้พันธุ์ข้าวลูกผสมได้รับความสนใจ เพราะมีศักยภาพในการให้ผลผลิตที่สูงกว่าข้าวพันธุ์เดิม มีความต้านทานต่อโรค ศัตรูพืช ตลอดจนสภาพแวดล้อมต่างๆ (Lin and Yuan, 1995) หลายประเทศที่เคยต้องนำเข้าข้าวในขณะนี้ได้กลายเป็นผู้ผลิตข้าวได้เองจนเพียงพอต่อการบริโภคภายในประเทศและบางประเทศผลิตข้าวได้มากขึ้น จนสามารถส่งข้าวออกไปจำหน่ายในต่างประเทศ ในขณะที่ประเทศไทยซึ่งเป็นผู้ส่งข้าวออกมากอันดับหนึ่งของโลกได้พยายามที่จะเพิ่มปริมาณการผลิตพร้อมกับการรักษาตลาดข้าวในต่างประเทศ และหาแนวทางขยายตลาดเพิ่มขึ้น เห็นได้จากปริมาณข้าวส่งออกที่เพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับ แต่ปริมาณผลผลิตข้าวที่เพิ่มขึ้นเป็นไปอย่างช้ามาก สังเกตได้จากผลผลิตข้าวเฉลี่ยต่อพื้นที่ปลูกยังอยู่ในอันดับท้ายๆ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับผลผลิตเฉลี่ยของประเทศผู้ปลูกข้าวอื่นๆ ในโลกทั้งนี้ได้มีสาเหตุหลายประการที่ทำให้ผลผลิตข้าวของไทยต่ำ (บริบูรณ์, 2543) เช่น ปัญหาระบบนิเวศน์ในการปลูกข้าวที่เป็นพื้นที่อาศัยน้ำฝนเป็นส่วนใหญ่ ปัญหาเทคโนโลยีการผลิต ปัญหาโรคแมลง และภัยธรรมชาติ ในพื้นที่นาชลประทานซึ่งจัดว่าเป็นเขตที่มีศักยภาพที่ดีที่สุดในการผลิตข้าวนั้น ผลผลิตเฉลี่ยต่อพื้นที่

ยังอยู่ในระดับคงที่ หรือถึงจุดสูงสุดของความสามารถในการให้ผลผลิตของพันธุ์ข้าวที่เกษตรกรใช้อยู่ในปัจจุบัน ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องหาเทคโนโลยีใหม่ๆ ที่จะนำมาใช้ในการเพิ่มผลผลิตต่อไร่ของข้าวให้สูงมากขึ้น เพื่อให้ประเทศสามารถผลิตข้าวได้ในปริมาณมากที่ขึ้น และมีปริมาณข้าวสำรองสูงสำหรับการส่งออกแข่งขันกับประเทศผู้ปลูกข้าวอื่นๆ และคาดว่าในอนาคตความต้องการข้าวในตลาดโลกจะมีมากขึ้นตามอัตราการเพิ่มของประชากรโลก (ธีรยุทธ, 2544) ทั้งนี้เนื่องจากข้าวไทยมีชื่อเสียงและคุณภาพเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคทั่วโลก โอกาสในการที่จะเพิ่มปริมาณการส่งออกจึงมีสูงกว่าประเทศที่เข้าสู่ตลาดใหม่ หรือประเทศที่ยังผลิตข้าวคุณภาพได้ไม่ดีมากนัก เทคโนโลยีข้าวลูกผสมเป็นเทคโนโลยีที่หลายประเทศได้นำมาใช้ และประสบผลสำเร็จในการเพิ่มผลผลิตข้าว จึงเป็นเทคโนโลยีหนึ่งที่ควรนำมาพิจารณา และปรับใช้ในการพัฒนาผลผลิตข้าวในประเทศไทย (กรมวิชาการเกษตร, 2544)

โครงการผลิตข้าวลูกผสมในไทยเริ่มเมื่อปี พ.ศ. 2522 โดยนำข้าวเอาข้าวลูกผสมจากจีนมาทดสอบผลผลิต ในปี พ.ศ. 2523 จัดตั้งโครงการข้าวลูกผสม และในปี พ.ศ. 2524 ได้ร่วมมือกับ IRRI ทำการวิจัยข้าวลูกผสมแบบ 3 สายพันธุ์ จุดประสงค์ในระยะแรกเพื่อทดสอบความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์ของข้าวลูกผสมจากสาธารณรัฐประชาชนจีน โดยในระยะแรกนั้นพบว่า A หรือ R line และประชากรข้าวชั่วที่ 1 ปรับตัวได้ไม่ดี (บริบูรณ์, 2541) สถาบันวิจัยข้าว จึงให้ความสนใจในการวิจัยปรับปรุงพันธุ์ข้าวลูกผสมแบบ 2 สายพันธุ์ เพื่อหาแนวทางที่จะใช้เทคโนโลยีนี้ในประเทศไทย และทั้งนี้ได้มีการนำสายพันธุ์ TGMS ที่พัฒนาโดยสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติจำนวนหนึ่งเข้ามา เพื่อใช้เป็นเชื้อพันธุ์สำหรับถ่ายทอดลักษณะเรณูเป็นหมัน ที่เกิดจากอิทธิพลของอุณหภูมิ ซึ่งสายพันธุ์ที่มีเรณูเป็นหมันแบบ TGMS ที่มาจากสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ ได้แก่ IR68935-16-6-27, IR68940-8-1-18-45, IR68941-19-2-1-21, IR68945-33-4-14-36, IR68949-5-31-2, IR71018-5-11-4, IR32364-120-1-3-2 และ IR Norin PL12 ส่วนพันธุ์ข้าวไทยที่ใช้ ในการปรับปรุงสายพันธุ์ TGMS ได้แก่ กข 21, กข 23, กข 6, กข 8, กข 10, หอมคลองหลวง 1, หอมสุพรรณบุรี, ชัยนาท 1, สุพรรณบุรี 60, สุพรรณบุรี 1 และแพร่ 1 (กรมวิชาเกษตร, 2544) ส่วนการพัฒนาสายพันธุ์ CMS ได้แก่ สายพันธุ์ RD21A, RD25A, SPRLR76102-26-1-1A, SONALEE A KDML 105A ส่วนสายพันธุ์ทดสอบสายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์ R (สายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน) ได้แก่ RD7-4, RD11, RD21, SPR60,SPR90, IR2729-125-3-3-2 และ ARC11353 (บริบูรณ์, 2541)

โมเลกุลเครื่องหมาย

การศึกษาเครื่องหมาย (marker) เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณและคุณภาพ ซึ่งอาจเป็นการจำแนกความแตกต่างระหว่างประชากร หรือภายในประชากร (กฤษฎา, 2544) เครื่องหมายที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างนี้มี 2 ประเภทคือ 1) เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) เป็นการบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยใช้วิธีเปรียบเทียบลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยาหรือทางสรีรวิทยา (กฤษณพงศ์, 2543) การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยายังมีความจำเป็นต้องทำเป็นอันดับแรก แล้วจึงใช้วิธีอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้น หรือเป็นการแก้ปัญหาในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวได้ และ 2) เครื่องหมายทางโมเลกุล มี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน เป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีนชนิดต่างๆ และระดับดีเอ็นเอ เป็นการตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2545ก)

การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า โมเลกุลเครื่องหมาย (molecular marker) นอกจากใช้เพื่อการศึกษาการจัดเรียงตัวของดีเอ็นเอส่วน ต่างๆ ในจีโนมหรือการทำแผนที่ของยีน ยังสามารถใช้ตรวจสอบความหลากหลายของพันธุ์ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ ตรวจสอบพันธุ์พ่อแม่ และทดสอบลูกผสม ศึกษาการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต หรือโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบหรือบ่งชี้ลักษณะจำเพาะ เช่น ความต้านทานต่อโรค ความทนทานต่อสภาพแวดล้อมบางอย่าง ซึ่งนำไปสู่การโคลนยีนโดยอาศัยแผนที่ (map-base cloning) กฤษณพงศ์ (2543) การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อดีกว่าการตรวจสอบโปรตีน คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่เก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ (สุรินทร์, 2545ข)

ช่วงทศวรรษที่ 1990 ได้เริ่มมีการใช้โมเลกุลเครื่องหมายอย่างแพร่หลาย ไม่ว่าจะใช้ในการตรวจวินิจฉัย หรือในโครงการปรับปรุงพันธุ์ โมเลกุลเครื่องหมายเดิมที่นิยมใช้คือ RFLP (restriction fragment length polymorphism) แต่ด้วยข้อจำกัดของโมเลกุลเครื่องหมายชนิดนี้ คือ มีขั้นตอนการปฏิบัติหลายขั้นตอน ต้องใช้ดีเอ็นเอปริมาณมาก จึงนำไปสู่การพยายามสร้างโมเลกุลเครื่องหมายชนิดใหม่ขึ้น (กฤษณพงศ์, 2543) ได้มีการพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายของกลุ่มนักวิทยาศาสตร์ 2 กลุ่มพร้อมๆ กันคือ กลุ่มของบริษัท Dupont ที่รายงานโดย William และคณะในปี ค.ศ. 1990 ที่เรียกว่า random amplified polymorphic DNA (RAPD) และอีกกลุ่มหนึ่งคือ นักวิจัยจาก The California Institute of Biological Research รายงานโดย Welsh and

Mcclelland ในปี ค.ศ. 1990 เช่นเดียวกัน แต่เรียกว่า Arbitrarily-Primed PCR (AP-PCR) (Macheswaran *et al.*, 1986)

โมเลกุลเครื่องหมาย RAPD สามารถค้นพบยีนในสภาพข่ม (dominance) คือ สามารถจำแนกลักษณะพันธุกรรมที่เป็นการข่มของยีนภายในตำแหน่งเดียวกัน (homozygous recessive) และทำได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของต้นพืช ตั้งแต่ระยะเป็นเมล็ด ต้นอ่อน จนถึงระยะสุกแก่ แต่ช่วงระยะต้นอ่อนและช่วงระยะที่กำลังเจริญเติบโตเป็นระยะเหมาะสมที่จะนำมาศึกษา เนื่องจากมีปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุด โมเลกุลเครื่องหมาย RAPD นี้ใช้ปริมาณชิ้นส่วนพืชหรือใบสำหรับสกัดดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย โดยสามารถจำแนกลักษณะพันธุกรรมของยีนที่สนใจได้อย่างแม่นยำ มีประสิทธิภาพ ทำได้ง่าย และไม่ยุ่งยากซับซ้อน (กฤษณพงศ์, 2543)

การระบุโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD จำเป็นต้องมีการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ โดยอาศัยหลักการของปฏิกิริยา PCR เพราะดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชนั้นมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอ ดังนั้นการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอจึงต้องอาศัยหลักการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบ ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1) denature โดยการใช้อุณหภูมิที่ 94-95 °C เป็นเวลา 15 วินาที - 1 นาที เป็นการทำให้ DNA template แยกเป็นสายเดี่ยว ขั้นตอนที่ 2) annealing ด้วยอุณหภูมิ 35-36 °C เป็นเวลา 15 วินาที-1 นาที ต้องใช้อุณหภูมิค่อนข้างต่ำ เพื่อให้ primer ไปเกาะตรงบริเวณที่เป็นคู่สมกันให้มากที่สุด และเกิดการเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยไม่ต้องคำนึงถึงทิศทางของ primer ที่เกาะกับ DNA template เนื่องจากทิศทางการเกาะของ primer ไม่แน่นอน การที่เอนไซม์จะนำเบสมาต่อกับ primer ให้ได้ดีเอ็นเอเส้นใหม่ เฉพาะในทิศทางบริเวณปลาย 3' ของ primer เท่านั้นใน ขั้นตอนที่ 3) extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที-2 นาที ทำให้เอนไซม์ DNA polymerase นำ nucleotide ที่เป็นคู่สมกับ DNA template มาต่อจาก primer จนเป็นเส้นยาว เกิดเป็นเส้นดีเอ็นเอเส้นใหม่ขึ้นมา ต่อจากนั้นเกิดปฏิกิริยาเหมือนขั้นตอนแรกเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่หลายๆ รอบ จนเกิดการจำลองเส้นดีเอ็นเอเส้นใหม่ขึ้นมาปริมาณมาก (กฤษณพงศ์, 2543) แต่เนื่องจาก primer มีขนาดสั้นๆ จึงสามารถเกาะได้หลายตำแหน่ง จึงเป็นเหตุผลที่ RAPD สามารถสร้างดีเอ็นเอได้หลายชิ้น และพบว่า โอกาสเกิดดีเอ็นเอเส้นสั้นๆ มีโอกาสเป็นไปได้มากกว่าเส้นยาว (สุรินทร์, 2545ก) โดยปกติขนาดของชิ้นดีเอ็นเออยู่ในช่วง 300-1500 เบส โดยทั่วไปปฏิกิริยา PCR มีการเพิ่มขั้นตอนก่อนและหลังการเกิดปฏิกิริยา PCR จริงอีก 1 รอบ โดยเพิ่มขั้นตอน denature ก่อนเริ่มปฏิกิริยาจริงที่อุณหภูมิ 95 °C ประมาณ 2-5 นาที เพื่อให้เกิดการแยกตัวของเส้นดีเอ็นเอมากที่สุด และในขั้นตอนสุดท้ายเริ่มขึ้น เพื่อให้สามารถเห็นผลผลิตที่ได้มากที่สุด ใช้อุณหภูมิที่ 72 °C ประมาณ 5-7 นาที และตรวจสอบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอบน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1-2 % ได้โดยการย้อม ethidium bromide (สุรินทร์, 2545ก) และจำแนกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ ด้วยการให้ค่าตามการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ โดยให้ค่าเป็น 1 สำหรับการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ และให้ค่าเป็น 0 ถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ได้แก่ 1) เส้นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) ดีเอ็นเอที่ใช้ต้องเป็นดีเอ็นเอที่สะอาดพอสมควร ต้องไม่มีสิ่งเจือปนมากนัก และไม่แตกหัก เพราะมีผลต่อการทำซ้ำปฏิกิริยา 2) RAPD primer เป็น primer แบบสุ่มที่ได้จากการออกแบบขึ้นมาเองหรือสั่งซื้อเป็นชุดสำเร็จรูปจากบริษัท เช่น Operon Kit เป็นต้น ความยาวของเส้น primer ใช้ประมาณ 8-10 เบส ซึ่งถ้า primer ยิ่งมีขนาดสั้นมาก โอกาสที่สามารถเกาะกับเส้นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ก็เป็นไปได้มาก (สุรินทร์, 2545ก) และขนาดของ genome มีผลต่อการทำปฏิกิริยา 3) PCR buffer เป็นตัวปรับสภาพสารละลายที่ทำปฏิกิริยาให้เหมาะสมต่อเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้โดยทั่วไปได้รับมาพร้อมกับเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งแตกต่างกันตามบริษัทผู้ผลิต ประกอบด้วย Tris-Cl pH 8.3 ความเข้มข้น 100 mM, KCl 500 mM, gelatin 0.01% ซึ่ง buffer มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของปฏิกิริยาปกติ และ $MgCl_2$ ซึ่งบางชนิดผสมรวมกับ buffer หรืออาจแยกหลอดเพื่อผสมทีหลัง โดยปกติปฏิกิริยา PCR ต้องใช้ $MgCl_2$ ที่มีความเข้มข้นประมาณ 2-2.5 mM ต่อปฏิกิริยา ซึ่งความเข้มข้นของ $MgCl_2$ มีผลต่อการเกาะของ primer บนเส้น template 4) เบสนิวคลีโอไทด์เป็นส่วนที่เอนไซม์ DNA polymerase จะนำไปต่อกับ primer เพื่อสร้างเป็นดีเอ็นเอเส้นใหม่ ซึ่งอยู่ในรูป deoxy-nucleotide tri-phosphate (dNTPs) ซึ่งประกอบด้วยเบส 4 ชนิดคือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ส่วนประกอบทั้ง 4 ผสมรวมกันในหลอดเดียวกันในปริมาณความเข้มข้นเท่ากับ 1 mM ของแต่ละชนิด 5) เอนไซม์ DNA polymerase โดยทั่วไปนั้นประสิทธิภาพของการเกิดปฏิกิริยา PCR ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์เป็นสำคัญ (สุรินทร์, 2545ข)

โมเลกุลเครื่องหมายในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว

การคัดเลือกพันธุ์พืชขึ้นอยู่กับปัจจัยหลัก 3 ประการ คือ

1) พันธุกรรม เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญที่สุด เพราะมีผลต่อการแสดงออกของพืช เช่น ลักษณะการเจริญเติบโต ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตลอดจนลักษณะทั้งทางคุณภาพ (qualitative trait) เป็นลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนน้อยคู่ และยีนแต่ละคู่มีผลต่อการแสดงออกมาก และลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait) เป็นลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนมากคู่ โดยที่ยีนแต่ละคู่มีผลน้อยต่อการแสดงออก

2) สภาพแวดล้อมเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อขบวนการทางชีวเคมีของสิ่งมีชีวิต ทั้งลักษณะทางปริมาณและคุณภาพ

3) อิทธิพลร่วมระหว่างพันธุกรรม และสภาพแวดล้อมเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความแตกต่างต่อการแสดงออกของสิ่งมีชีวิต ซึ่งปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของพืชที่กล่าวมาทั้ง 3 ประการมีผลกระทบโดยตรงต่อการคัดเลือกพันธุ์พืช (กฤษณพงศ์, 2543) การใช้โมเลกุลเครื่องหมายในการคัดเลือกพันธุ์พืชเพื่อติดตามยีนมีข้อดีหลายประการ เช่น มีความเที่ยงตรง และมีความแม่นยำสูง เพราะการคัดเลือกโดยการใช้โมเลกุลเครื่องหมายเป็นการคัดเลือกโดยตรงจากสารพันธุกรรม (genomic DNA) ของพืช (สุรินทร์, 2545ข)

การพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายมีประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว เพราะในการคัดเลือกต้นข้าวเพื่อให้มีลักษณะที่ต้องการ จากเดิมต้องอาศัยจากการสังเกตลักษณะสัณฐานที่แสดงออกมา ซึ่งการแสดงออกของยีนบางตำแหน่งอาจขึ้นอยู่กับการพัฒนาของพืช เช่น ต้องรอให้พืชโตระยะหนึ่ง หรือรอจนกระทั่งพืชให้ผลผลิต จึงสามารถคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้ ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างพันธุ์ข้าวใหม่ๆ ให้ได้ตรงตามความต้องการ เช่น ทนแล้ง ทนน้ำท่วม ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง ต้านทานต่อเพลี้ยจั๊กจั่น เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล แมลงบั่ว หรือการเพิ่มผลผลิต เป็นต้น (บริบูรณ์, 2541) การนำโมเลกุลเครื่องหมายมาใช้เพื่อเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหาและเสริมสร้างศักยภาพการผลิตข้าวของประเทศไทย (กฤษณพงศ์, 2543)

การสืบหาโมเลกุลเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีน (gene tagging) โดยวิธี bulked segregant analysis (Michelmore *et al.*, 1991) เป็นวิธีการค้นหายีนอย่างรวดเร็วที่มีความเกี่ยวพันกับลักษณะทางกายภาพ และทางสรีรวิทยาโดยอาศัยโมเลกุลเครื่องหมาย ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่อาศัยหลักการสร้างกลุ่มตัวแทนของประชากรสองกลุ่มที่มีลักษณะแตกต่างกัน โดยการนำข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ผสมตัวเอง ได้ต้นข้าวประชากรชั่วที่ 2 ที่มีการกระจายตัวของลักษณะทำให้สามารถคัดเลือกความแตกต่างของลักษณะที่ต้องการได้มากขึ้น และให้ข้อมูลที่มากกว่าการผสมกลับ (backcross) BC$_1$ ในจำนวนประชากรที่เท่ากัน หลักการที่สำคัญของ gene tagging คือการสร้างกลุ่มตัวแทนสองกลุ่มที่มีความแตกต่างกันของลักษณะที่ต้องการศึกษาอย่างชัดเจน เป็นการนำดีเอ็นเอของในแต่ละกลุ่มนั้นมารวมกัน โดยจะใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่เท่ากันในการตรวจสอบตัวแทนของประชากรสองกลุ่มนี้ คือ กลุ่มที่มีลักษณะที่ต้องการและกลุ่มที่ไม่มีลักษณะที่ต้องการ โมเลกุลเครื่องหมายใดที่ให้ความแตกต่างระหว่างกลุ่มเป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่มีความเกี่ยวพันกับความแตกต่างของลักษณะทั้งสองกลุ่ม หรือโมเลกุลเครื่องหมายนั้นมีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมลักษณะนั้น ซึ่งสามารถจำแนกความแตกต่างด้วยการให้ค่าตามการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ โดยให้

ค่าเป็น 1 สำหรับการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ และให้ค่าเป็น 0 ถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และสังเกตความสัมพันธ์ของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏระหว่างกลุ่มทั้งสองกลุ่ม (สุรินทร์, 2545ข)

Gene tagging เป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ในการสืบหายีนที่มีความสำคัญต่างๆ ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้อย่างรวดเร็ว เช่น การสืบหาโมเลกุลเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีนควบคุมความสามารถในการฟื้นตัวหลังจากน้ำท่วมขังของข้าวระยะสั้นๆ เป็นประจำในพื้นที่การปลูกข้าวนาปีหลายแห่งของประเทศไทย โดยได้รับความร่วมมือจากโครงการ Rice For Life ของกลุ่มประเทศ ยุโรป ด้วยวิธี bulked segregant analysis พบว่า โมเลกุลเครื่องหมาย RAPD จำนวน 2 primers ที่มีความสัมพันธ์กับยีนควบคุมความสามารถในการฟื้นตัวหลังน้ำท่วมขัง คือ OPA-02 และ OPA-18 โดยที่พันธุ์ CT6241 เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อน้ำท่วม และพันธุ์ IR49830 เป็นพันธุ์ทนทานต่อน้ำท่วม (สุวิตร, 2541) ส่วนการสืบหาโมเลกุลเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับยีนควบคุมความหอมในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจในการพัฒนาพันธุ์ข้าวไทยเป็นอย่างมาก จึงมีการศึกษาหาโมเลกุลเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับความหอมในข้าวขาวดอกมะลิ 105 เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมของประเทศไทยในอนาคต โดยวิธี bulked segregant analysis พบว่า มีโมเลกุลเครื่องหมายเพียงชนิดเดียวให้ความแตกต่างของกลุ่มข้าวหอมและไม่หอมอย่างชัดเจน ซึ่งโมเลกุลเครื่องหมายนี้ถูกนำมาพัฒนาเป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่จำเพาะเรียกว่า Jas 1.5 เพื่อช่วยในการคัดพันธุ์ข้าวหอมในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าว (กรมวิชาการเกษตร, 2544) และการสืบหาโมเลกุลเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ซึ่งเป็นศัตรูที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งของข้าวดอกมะลิ 105 เนื่องจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นแมลงที่สามารถสร้างความเสียหายให้กับข้าวเป็นอย่างมาก เช่น โครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการผสมกลับ โดยใช้พันธุ์ที่ต้านทานแมลง คือ Abhaya ผสมกลับเข้าหาข้าวขาวดอกมะลิ 4 ครั้ง เพื่อรักษาพันธุ์พื้นเมืองของข้าวขาวดอกมะลิไว้ และเพิ่มความต้านทานแมลง จึงได้ทำการพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายจาก AFLP ร่วมกับการใช้ bulked segregant analysis (สงกรานต์ และบริบูรณ์, 2540)

ด้านการวิจัยและปรับปรุงพันธุ์ข้าวลูกผสมโดยเทคโนโลยีชีวภาพนั้น สามารถนำมาใช้ในการสืบหายีน TGMS และ PGMS ใหม่ๆ ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ข้าวป่า การสืบหายีนที่เป็นประโยชน์อื่นๆ เช่น ยีนที่ควบคุมความต้านทานโรค แมลง และสภาพแวดล้อมที่เป็นปัญหา และการสืบหายีนที่เพิ่มระดับ heterosis ในข้าวพื้นเมืองหรือในข้าวป่า เป็นต้น ดังในรายงานของ Maheswaran *et al.* (1986) ได้ศึกษาการระบุโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ที่มีความสัมพันธ์กับยีน *Se-3*(t) ที่ตอบสนองต่อช่วงแสงในข้าว 2 คู่ผสม โดยวิธีการ bulked segregant analysis จาก 2 ประชากรในชั่วที่ 2 จากการใช้โมเลกุลเครื่องหมาย ทั้งหมด 435 primers (Operon Technology)

พบว่า primer OPA-19 สามารถระบุความแตกต่างได้ 9 แถบ มี 2 แถบที่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม โดยมีความสัมพันธ์กับยีน *Se-3*(t) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับยีนที่มีการตอบสนองต่อช่วงแสงในข้าว Sac Nau/Nam Saugi ทั้ง 19 คู่ผสม และการระบุโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมการผสมตัวเองในประชากรชั่วที่ 2 ของ hazelnut (*Corylos avellana*) ด้วยวิธีการ bulked segregant analysis จากการใช้โมเลกุลเครื่องหมายทั้งหมด 250 primers ในการระบุยีนที่ควบคุมการผสมตัวเอง พบว่า โมเลกุลเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสองกลุ่ม คือ OPI-07 และ OPJ-04 (Pomper *et al.*, 1998) และมีรายงานของ Leila *et al.* (2002) ที่กล่าวถึงยีน Pi-ar ที่มีความต้านทานต่อโรค Blast (*Pyricularia grisea*) IB-45 ใน somaclone ที่ได้มาจากข้าว Arguaia โดยการระบุโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ด้วยวิธีการ bulked segregant analysis จากการใช้โมเลกุลเครื่องหมายทั้งหมด 203 primers พบว่า มีเพียง 1 primer ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ต้านทานและกลุ่มที่ไม่ต้านทาน คือ OPG-02 ซึ่งมีความสัมพันธ์กับยีนความต้านทานของ somaclone SC 09

การระบุโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ที่มีความสัมพันธ์กับยีน TGMS ด้วยวิธีการ bulked segregant analysis โดยใช้ดีเอ็นเอสองกลุ่มจากประชากรชั่วที่ 2 ทั้งหมด 64 ต้น โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มที่เป็นหมันและไม่เป็นหมัน กลุ่มละ 10 ต้น จากการใช้โมเลกุลเครื่องหมายทั้งหมด 398 primers พบว่า มีเพียง 5 primers ที่มีความสัมพันธ์กับยีน TGMS และสามารถระบุความแตกต่างของทั้งสองกลุ่มได้ คือ OPF-18, OPB-19, OPAC-01, OPAC-03 และ OPAA-07 (Subudhi *et al.*, 1999) ซึ่งในปี พ.ศ. 2542 ได้มีการพัฒนาพันธุ์ TGMS สำหรับใช้ในการปรับปรุงข้าวสายพันธุ์เรณูเป็นหมัน โดยการถ่ายยีน *tms2* บนโครโมโซม 7 จากพันธุ์ข้าว Norin PL-12 มาให้ข้าวไทย 3 สายพันธุ์ คือ ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมคลองหลวง 1 และ KNA6-13-3-2 (ธีรยุทธ, 2544)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

สถานที่ดำเนินการทดลอง

โรงเรือนกระจก อาคารเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระเทพ และแปลงทดลองฟาร์มวิจัยพืชไร่มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต. หนองหาร อ. สันทราย จ. เชียงใหม่ ระหว่างเดือนธันวาคม 2545 ถึง เดือนธันวาคม 2547 โดยใช้ข้าวในการศึกษาจำนวน 3 พันธุ์ ดังนี้

ข้าวพันธุ์ สุพรรณบุรี 1
ข้าวพันธุ์ กข 21
ข้าว TGMS พันธุ์ T29^{S}

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

1. ชุดอุปกรณ์ถ่ายภาพและบันทึกรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ
2. หลอดทดลองขนาด 0.2 ml และ 1.5 ml
3. ชุดอุปกรณ์แยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง
5. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน
6. เครื่องชั่งวิเคราะห์
7. ชุดโกร่งบด
8. Micropipet
9. Vortex mixer
10. Water bath
11. Hot plate stirrer
12. CTAB (Hexadecyltrimethyl ammonium bromide)
13. EDTA (Ethylene diaminetetra acetic disodium salt)
14. Tris (Hydroxymethyl)
15. 2-mercaptoethanol
16. Chloroform-isoamyl alcohol

17. Isopropanal
18. Ethanol
19. Sodium Chloride
20. Gel star
21. DMSO (Dimethyl sulfoxide)
22. Agarose
23. TBE buffer
24. Ammonium acetate
25. Liquid nitrogen
26. Loading dye
27. Rnase
28. RAPD Primers ชุด OPAC, OPB, OPC และ OPG01-05 (Operon Technology)
29. Molecular weight marker (100+1.5 kb DNA Ladder, Sibenzyme)
30. PCR buffer
31. Taq DNA polymerase (Qiagen)
32. dNTPs
33. Deionized water

ระเบียบวิธีการดำเนินการทดลอง

1. ฤดูปลูกที่ 1 สร้างกลุ่มตัวแทนของประชากรสองกลุ่มที่มีความแตกต่างกัน โดยการผสมข้าวพันธุ์ที่เป็นหมัน (T29^{S}) กับพันธุ์ที่ไม่เป็นหมัน (สุพรรณบุรี 1 และ กข 21)

    1.1 ปลูกพันธุ์แม่ คือ พันธุ์ T29^{S}

    1.2 ปลูกพันธุ์พ่อ 2 พันธุ์ คือ สุพรรณบุรี 1 และ กข 21

    1.3 ผสมข้าวพันธุ์ T29^{S} × สุพรรณบุรี 1 และพันธุ์ T29^{S} × กข 21

2. ฤดูปลูกที่ 2 สร้างประชากร โดยการนำเมล็ดประชากรข้าวชั่วที่ 1 มาปลูกและผสมตัวเอง

3. ฤดูปลูกที่ 3 นำเมล็ดประชากรข้าวชั่วที่ 2 มาปลูก และคัดเลือกลักษณะต้นข้าว ทำการศึกษาลักษณะทางการเกษตร และศึกษาการกระจายตัวของประชากรข้าวชั่วที่ 2 โดยแยกประชากรออกเป็นกลุ่ม คือ กลุ่มที่แสดงลักษณะเป็นหมัน และกลุ่มที่ไม่แสดงลักษณะเป็นหมัน ในคู่ผสมที่ 1 ($T29^S$ × สุพรรณบุรี 1) ประกอบด้วย 2 lines คือ A1 และ A2 จำนวน 98 และ 99 ต้น ส่วนคู่ผสมที่ 2 ($T29^S$ × กข 21) ประกอบด้วย 3 lines คือ B1, B2 และ B3 จำนวน 87, 94 และ 68 ต้น

4. จดบันทึกลักษณะข้อมูลลักษณะทางการเกษตร ได้แก่ ความสูง วันออกดอก จำนวนต้นต่อกอ และการติดเมล็ดของประชากรข้าวชั่วที่ 2 และสังเกตลักษณะการกระจายตัวของลักษณะต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความเป็นหมัน เช่น สีโคนต้น สีเขียวใบ ลักษณะทรงต้น

5. วิเคราะห์ข้อมูลลักษณะทางการเกษตร โดยใช้โปรแกรม excel

6. สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบพืช โดยประยุกต์ใช้วิธีของ Doyle and Doyle (1987) (ภาคผนวก)

6.1 สกัดดีเอ็นเอจากพันธุ์แม่ และพันธุ์พ่อ

6.2 สกัดดีเอ็นเอจากประชากรข้าวชั่วที่ 1

6.3 สกัดดีเอ็นเอจากประชากรข้าวชั่วที่ 2 โดยแยกสกัดดีเอ็นเอ จากต้นข้าวในกลุ่มที่เป็นหมัน และในกลุ่มที่ไม่เป็นหมัน

7. แยกกลุ่มดีเอ็นเอที่เป็นหมัน และกลุ่มไม่เป็นหมัน โดยการนำดีเอ็นเอของประชากรข้าวชั่วที่ 2 ที่สกัดได้มาผสมรวมกันภายในกลุ่ม โดยใช้ดีเอ็นเอจากกลุ่มเป็นหมัน 10 ต้น นำมาผสมรวมกันในอัตราส่วนที่เท่ากัน และดีเอ็นเอจากกลุ่มที่ไม่เป็นหมัน 10 ต้น มาผสมรวมกันในอัตราส่วนที่เท่ากัน

8. เตรียม master mix ในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR

1.	10X PCR buffer	2.50	µl
2.	50 mM $MgCl_2$	1.90	µl
3.	dNTP (100 µm)	0.25	µl
4.	Primer (10 µm)	1.00	µl
5.	Taq DNA polymerase (1 U)	0.15	µl
6.	DNA Template (5 ng)	5.00	µl
7.	Deionized water	14.20	µl
	ปริมาตรรวม	25.00	µl

9. ทำปฏิกิริยา PCR โดยให้สภาวะของปฏิกิริยาเป็นดังนี้

Predenaturation	95°C : 5 นาที	1 รอบ
Denaturation	95°C : 1 นาที	45 รอบ
Annealing	35°C : 1 นาที	45 รอบ
Extension	72°C : 2 นาที	45 รอบ
Post extension	72°C : 7 นาที	1 รอบ

10. นำมาวิเคราะห์ผล โดยเทคนิคอิเลคโตรโฟริซิสบน agarose gel 1.4% ใน 1 X TBE buffer โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 120 โวลต์ 100 แอมป์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และบันทึกภาพ

11. จำแนกความแตกต่างของกลุ่มที่เป็นหมันและไม่เป็นหมัน ด้วยการให้ค่าตามการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ โดยให้ค่าเป็น 1 สำหรับการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ และให้ค่าเป็น 0 ถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และสังเกตความสัมพันธ์ของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นระหว่างพันธุ์แม่กับกลุ่มที่เป็นหมัน และพันธุ์พ่อกับกลุ่มที่ไม่เป็นหมัน

12. ระบุโมเลกุลเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมลักษณะความเป็นหมัน

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ลักษณะทางการเกษตรของพันธุ์พ่อแม่

การศึกษาลักษณะทางการเกษตรของพันธุ์ T29^{S} ในฤดูปลูกที่ 1 พบว่า มีค่าเฉลี่ยความสูงเท่ากับ 103 ± 11.7 เซนติเมตร มีค่าเฉลี่ยอายุการออกดอกเท่ากับ 90 ± 9.8 วัน มีการแตกกอมาก โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 40 ± 6.4 ต้นต่อกอ (ตาราง 1)

ตาราง 1 ลักษณะทางการเกษตรของพันธุ์พ่อแม่

พันธุ์	ค่าเฉลี่ย		
	ความสูง (เซนติเมตร)	อายุการออกดอก (วัน)	จำนวนต้นต่อกอ (ต้นต่อกอ)
T29^{S}	103	90	40
สุพรรณบุรี 1	122	78	18
กข 21	140	93	21

การศึกษาลักษณะโคนต้นและเขี้ยวใบของของพันธุ์ T29^{S} พบว่า โคนต้นและเขี้ยวใบมีสีม่วง และใบมีสีเขียวเข้ม (ภาพ 1)

ก) โคนต้นสีม่วง

ข) เขี้ยวใบสีม่วง

ภาพ 1 ลักษณะสีโคนต้นและสีเขี้ยวใบของพันธุ์ T29^{S}

การศึกษาลักษณะใบธงและคอรวงของพันธุ์ T29^{S} พบว่า ใบธงและคอรวงมีลักษณะสั้น รวงไม่ติดเมล็ด ละอองเรณูของเกสรตัวผู้มีสีขาวซีด เนื่องจากข้าวพันธุ์ T29^{S} นี้มีลักษณะเกสรตัวผู้ที่เป็นหมัน เมื่อได้รับอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิวิกฤต (ภาพ 2)

ก) เกสรตัวผู้เป็นหมัน

ข) รวงเป็นหมัน

ภาพ 2 ลักษณะดอกและรวงของ T29^{S}

การศึกษาลักษณะทางการเกษตรของพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ในฤดูปลูกที่ 1 พบว่า มีค่าเฉลี่ยความสูงเท่ากับ 122 ± 15.2 เซนติเมตร มีค่าเฉลี่ยอายุการออกดอกเท่ากับ 78 ± 7.4 วัน และมีค่าเฉลี่ยจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 18 ± 4.3 ต้นต่อกอ (ตาราง 1) ใบมีสีเขียวเข้ม ขนใบ กาบใบ ปล้อง โคนต้น และเขี้ยวใบมีสีเขียวเหมือนกับพันธุ์พ่อ กข 21 (ภาพ 3) ใบธง และคอรวงยาวค่อนข้างตั้งตรง รวงติดเมล็ดค่อนข้างแน่น ทรงต้นตั้งตรง

ก) โคนต้นสีเขียว

ข) เขี้ยวใบสีเขียว

ภาพ 3 ลักษณะสีโคนต้นและสีเขี้ยวใบของพันธุ์ กข 21

การศึกษาลักษณะทางการเกษตรของพันธุ์พ่อ กข 21 ในฤดูปลูกที่ 1 พบว่า มีค่าเฉลี่ยความสูงเท่ากับ 140 ± 13.5 เซนติเมตร มีค่าเฉลี่ยอายุการออกดอกเท่ากับ 93 ± 8.4 วัน และมีค่าเฉลี่ยจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 21 ± 6.1 ต้นต่อกอ (ตาราง 1) ใบมีสีเขียวเข้ม ขนใบ กาบใบ ปล้อง โคนต้น และเขี้ยวใบมีสีเขียว คล้ายกับพันธุ์สุพรรณบุรี 1 (ภาพ 3) ใบธง และคอรวงยาวค่อนข้างตั้งตรง รวงติดเมล็ดค่อนข้างแน่น ทรงต้นตั้งตรง ต้นแข็งไม่ล้ม

ลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 1

การศึกษาลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 1 ในฤดูปลูกที่ 2 ของคู่ผสมที่ 1 (T29^S × สุพรรณบุรี 1) พบว่า มีค่าเฉลี่ยความสูงเท่ากับ 120 ± 16.7 เซนติเมตร มีค่าเฉลี่ยอายุการออกดอกเท่ากับ 80 ± 8.9 วัน มีค่าเฉลี่ยจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 21 ± 5.4 ต้นต่อกอ และมีค่าเฉลี่ยการติดเมล็ด 60 ± 19.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนคู่ผสมที่ 2 (พันธุ์ T29^S × กข 21) พบว่า มีค่าเฉลี่ยความสูงเท่ากับ 133 ± 17.6 เซนติเมตร มีค่าเฉลี่ยอายุการออกดอกเท่ากับ 86 ± 9.2 วัน มีค่าเฉลี่ยจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 25 ± 8.5 ต้นต่อกอ และมีค่าเฉลี่ยการติดเมล็ด 65 ± 17.7 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 2)

ตาราง 2 ลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 1

คู่ผสม	ค่าเฉลี่ย			
	ความสูง (เซนติเมตร)	อายุการออกดอก (วัน)	จำนวนต้นต่อกอ (ต้นต่อกอ)	การติดเมล็ด (%)
T29^S × สุพรรณบุรี 1	120	80	21	60
T29^S × กข 21	133	86	25	65

การศึกษาความสัมพันธ์ของสีโคนและสีเขี้ยวใบของประชากรข้าวชั่วที่ 1 ในฤดูปลูกที่ 2 พบว่า ลักษณะสีโคนต้นและสีเขี้ยวใบของข้าวทั้งสองคู่ผสมทุกต้นมีโคนต้นและเขี้ยวใบเป็นสีม่วงเหมือนกันทุกต้น (ภาพ 4)

ก) โคนต้นสีม่วง ข) เขี้ยวใบสีม่วง

ภาพ 4 ลักษณะสีโคนต้นและสีเขี้ยวใบของประชากรข้าวชั่วที่ 1

ลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 2

การศึกษาลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 2 ในฤดูปลูกที่ 3 ของคู่ผสมที่ 1 ($T29^S$ × สุพรรณบุรี 1) ประกอบด้วย 2 lines คือ A1 และ A2 ส่วนคู่ผสมที่ 2 ($T29^S$ × กข 21) ประกอบด้วย 3 lines คือ B1, B2 และ B3 พบว่า มีค่าเฉลี่ยความสูงเท่ากับ 115 ± 11.3, 107 ± 17.1, 129 ± 19.5, 124 ± 21.1 และ 144 ± 27.6 เซนติเมตร ตามลำดับ มีค่าเฉลี่ยอายุการออกดอกเท่ากับ 108 ± 9.8, 102 ± 5.5, 112 ± 11.6, 110 ± 16.4 และ 125 ± 25.1 วัน ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 28 ± 4.1, 27 ± 3.2, 30 ± 2.2, 31 ± 5.3 และ 33 ± 6.8 ต้นต่อกอ ตามลำดับ (ตาราง 3)

ตาราง 3 ลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 2

lines	ค่าเฉลี่ย		
	ความสูง (เซนติเมตร)	อายุการออกดอก (วัน)	จำนวนต้นต่อกอ (ต้นต่อกอ)
A1	115	108	28
A2	107	102	27
B1	129	112	30
B2	124	110	31
B3	144	125	33

การศึกษาลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 2 ในฤดูปลูกที่ 3 ของทั้งสองคู่ผสม พบว่า ลักษณะเกสรตัวผู้ สีโคนต้น สีเขี้ยวใบ และลักษณะทรงต้นที่เกิดขึ้นมี 8 รูปแบบ (ตาราง 4) โดยต้นที่มีลักษณะเป็นหมันส่วนมากมีโคนต้นและเขี้ยวใบเป็นสีม่วง และมีทรงต้นตรง ซึ่ง line A1, A2, B1, B2 และ B3 มีจำนวนต้นของรูปแบบที่ 1 เท่ากับ 18, 25, 19, 19 และ 13 ต้น ตามลำดับ ส่วนต้นที่ไม่เป็นหมันมีโคนต้นและเขี้ยวใบเป็นสีม่วง และมีทรงต้นตั้งตรงเหมือนกัน คือ รูปแบบที่ 5 มีจำนวนต้นเท่ากับ 32, 53, 37, 37 และ 34 ต้น ตามลำดับ ลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 2 พบว่า มีเพียงลักษณะเดียวที่ยังมีความสัมพันธ์กันอยู่ คือ ลักษณะของสีโคนต้นและสีเขี้ยวใบ โดยต้นที่มีสีโคนต้นเป็นสีม่วงมีสีเขี้ยวใบเป็นสีม่วง ส่วนต้นที่มีสีโคนต้นเป็นสีเขียวมีสีเขี้ยวใบเป็นสีเขียว แสดงว่า ยีนที่ควบลักษณะสีของโคนต้นและสีเขี้ยวใบมีความสัมพันธ์กัน ดังที่ปรากฏทั้ง 8 รูปแบบ แม้หลังผ่านการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ ซึ่งแตกต่างกับลักษณะความเป็นหมันกับสีโคนต้นและสีเขี้ยวใบ ดังรูปแบบที่ 3 และ 4 โดยต้นที่เป็นหมันมีสีโคนต้นและสีเขียวใบเป็นสีเขียว เช่นเดียวกับ ในต้นที่ไม่เป็นหมันที่มีสีโคนต้นและสีเขี้ยวใบเป็นสีม่วง ดังรูปแบบที่ 5 และ 6

ตาราง 4 รูปแบบลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 2

	ลักษณะทางการเกษตร				จำนวนต้นใน F_2				
รูปแบบที่	เกสรตัวผู้	โคนต้น	เขี้ยวใบ	ทรงต้น	A1	A2	B1	B2	B3
1	หมัน	ม่วง	ม่วง	ตรง	18	25	19	19	13
2	หมัน	ม่วง	ม่วง	แผ่	2	2	2	0	1
3	หมัน	เขียว	เขียว	ตรง	7	3	4	8	5
4	หมัน	เขียว	เขียว	แผ่	2	0	0	0	0
5	ไม่หมัน	ม่วง	ม่วง	ตรง	32	53	37	37	34
6	ไม่หมัน	ม่วง	ม่วง	แผ่	22	9	7	15	5
7	ไม่หมัน	เขียว	เขียว	ตรง	7	5	17	15	9
8	ไม่หมัน	เขียว	เขียว	แผ่	8	2	1	0	1

การศึกษาค่าไคสแควร์ (chi-square) เพื่อตรวจสอบสัดส่วนการกระจายตัวของลักษณะความเป็นหมันของข้าวประชากรชั่วที่ 2 ในคู่ผสมแรกมี 2 lines คือ A1 และ A2 พบว่า มีค่าไคสแควร์เท่ากับ 0.87 และ 1.21 ตามลำดับ ส่วนคู่ผสมที่สองมี 3 lines คือ B1, B2 และ B3 พบว่า มีค่าไคสแควร์เท่ากับ 0.55, 0.51 และ 0.13 ตามลำดับ และพบว่า สัดส่วนการกระจายตัวของลักษณะความเป็นหมันของข้าวประชากรชั่วที่ 2 ของทั้งสองคู่ผสมมีอัตราส่วนกระจายตัวของลักษณะไม่เป็นหมัน : เป็นหมัน มีค่าเท่ากับ 3:1 ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 (ตาราง 5)

ตาราง 5 ค่าไคสแควร์ (chi-square) ความเป็นหมันของประชากรข้าวชั่วที่ 2

lines	ค่าสังเกต		ค่าคาดหมาย		χ^2
	หมัน	ไม่หมัน	หมัน	ไม่หมัน	
A1	29	69	22.50	73.50	0.87
A2	30	69	24.75	74.25	1.21
B1	25	62	28.74	58.26	0.55
B2	27	67	23.50	70.50	0.51
B3	19	49	17.00	51.00	0.13

หมายเหตุ $\chi^2_{0.05,\,1} = 3.84$

การศึกษาค่าไคสแควร์ (chi-square) เพื่อตรวจสอบสัดส่วนการกระจายตัวของสีโคน และสีเขี้ยวใบของประชากรข้าวชั่วที่ 2 ในคู่ผสมแรกมี 2 lines คือ A1 และ A2 พบว่า มีค่าเท่ากับ 0.2330 และ 0.0001 ตามลำดับ และลักษณะทรงต้นมีค่าเท่ากับ 0.3110 และ 0.0002 ตามลำดับ ส่วนคู่ผสมที่สองมี 3 lines คือ B1, B2 และ B3 มีสัดส่วนการกระจายตัวของสีโคน และสีเขี้ยวใบ มีค่าเท่ากับ 0.3340, 0.2590 และ 0.1830 ตามลำดับ และลักษณะทรงต้นมีค่าเท่ากับ 0.0001, 0.0034 และ 0.0005 ตามลำดับ แสดงว่า สัดส่วนการกระจายตัวของลักษณะทางการเกษตรของข้าวประชากรชั่วที่ 2 ได้แก่ สีโคนต้น สีเขี้ยวใบ และลักษณะทรงต้นทั้งสองคู่ผสมมีอัตราส่วนสอดคล้องกับทฤษฎีการกระจายตัวเชิงคุณภาพของเมนเดล ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 (ตาราง 6) คือ โคนต้นสีม่วง :โคนต้นสีเขียว มีสัดส่วนเท่ากับ 3:1, เขี้ยวใบสีม่วง : เขี้ยวใบสีเขียว มีสัดส่วนเท่ากับ 3:1 และลักษณะทรงต้นตั้งตรง : ทรงต้นแผ่ มีสัดส่วนเท่ากับ 3:1 เช่นเดียวกับ ลักษณะความเป็นหมัน

ตาราง 6 ค่าไคสแควร์ (chi-square) ลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 2

lines	χ^2		
	สีโคน	สีเขี้ยวใบ	ทรงต้น
A1	0.2340	0.2340	0.3110
A2	0.0001	0.0001	0.0002
B1	0.3370	0.3370	0.0002
B2	0.2590	0.2590	0.0034
B3	0.1830	0.1830	0.0005

หมายเหตุ $\chi^2_{0.05,\,1} = 3.84$

การศึกษาความสัมพันธ์ของสีโคนต้นและสีเขี้ยวใบของประชากรข้าวชั่วที่ 2 ในฤดูปลูกที่ 3 พบว่า สีโคนต้นและสีเขี้ยวใบมีความสัมพันธ์กัน โดยต้นที่มีโคนต้นเป็นสีม่วงมีเขี้ยวใบเป็นสีม่วง และต้นที่มีโคนต้นเป็นสีเขียวมีเขี้ยวใบเป็นสีเขียว, ส่วนลักษณะความเป็นหมันไม่มีความสัมพันธ์กันในทางสถิติกับสีโคนและสีเขี้ยวใบ โดยต้นที่เป็นหมันอาจมีสีโคนต้นและสีเขี้ยวใบเป็นสีม่วงหรือสีเขียว, ลักษณะทรงต้นมีความสัมพันธ์กับลักษณะความเป็นหมัน โดยต้นที่เป็นหมันมีทรงต้นตรง และลักษณะทรงต้นไม่มีความสัมพันธ์กับสีโคนและสีเขี้ยวใบ ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ($r_{0.05,\,446} = 0.09$) คือ ต้นที่เป็นหมันอาจมีโคนต้นและเขี้ยวใบเป็นสีเขียวหรือสีม่วง (ตาราง 7)

ตาราง 7 ความสัมพันธ์ของลักษณะ phenotype ประชากรข้าวชั่วที่ 2

Phenotype	ความเป็นหมัน	โคนต้น	เขียวใบ	ทรงต้น
ความเป็นหมัน	1			
โคนต้น	-0.034	1		
เขียวใบ	-0.034	1*	1	
ทรงต้น	0.124*	-0.101*	-0.101*	1

หมายเหตุ $r_{0.05, 446}$ = 0.09

* = มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

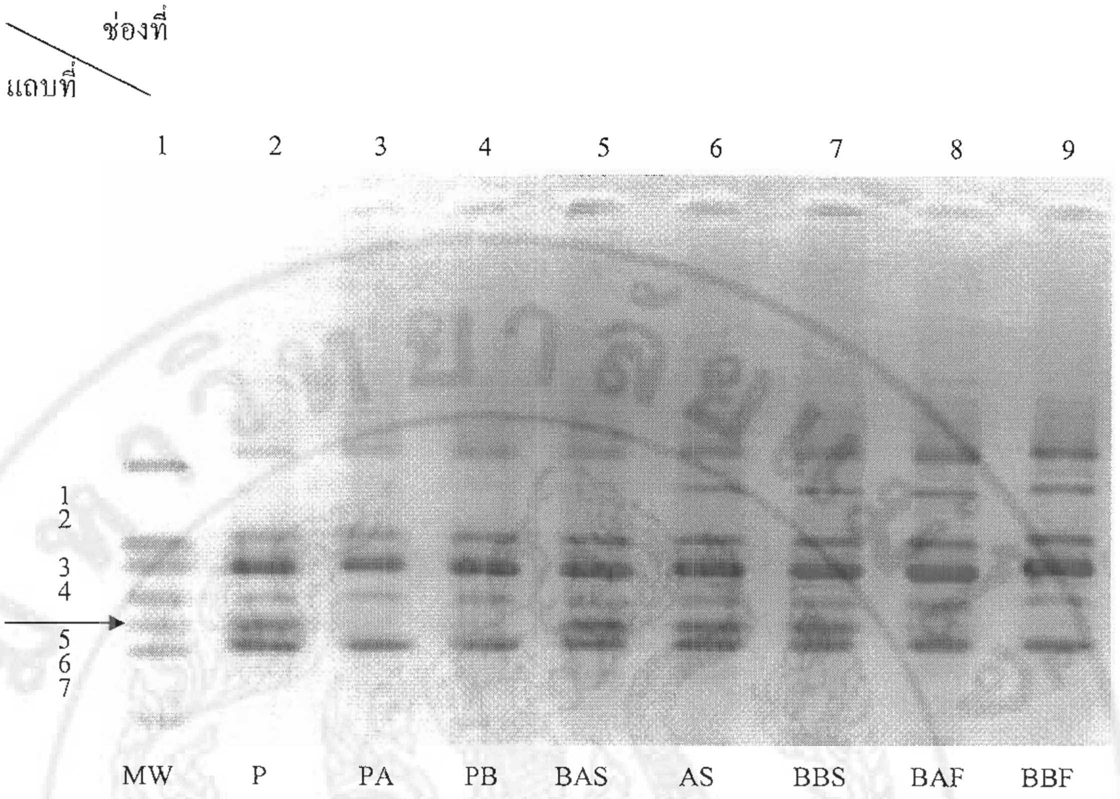
การสืบหาโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ที่สัมพันธ์กับความเป็นหมันของข้าวโดยอาศัยอุณหภูมิด้วยวิธีการ bulked segregant analysis

การศึกษาโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ที่สัมพันธ์กับยีนควบคุมความเป็นหมันของข้าว TGMS ด้วยวิธีการ bulked segregant analysis ดำเนินการโดยพิจารณาจากความแตกต่างของกลุ่มที่เป็นหมันและไม่เป็นหมัน ด้วยการให้ค่าตามการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ โดยให้ค่าเป็น 1 สำหรับการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ และให้ค่าเป็น 0 ถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ดังตัวอย่างการให้คะแนนจากภาพที่บันทึกภายหลังจากทำปฏิกิริยา PCR ด้วย primer OPAC-10 (ภาพ 5) ซึ่งการปรากฏของแถบดีเอ็นเอนั้นแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ ได้แก่

รูปแบบที่ 1 การปรากฏแถบดีเอ็นเอเหมือนกันหมด ไม่มีความแตกต่างกันของรูปแบบที่ปรากฏ ดังที่พบในการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ 1, 3, 4, 5 และ 7

รูปแบบที่ 2 เป็นการปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ไม่เหมือนกันทั้งหมด แต่การปรากฏของแถบดีเอ็นเอนั้นไม่เกิดความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่เป็นหมันและไม่เป็นหมัน ดังที่พบในการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ 2

รูปแบบที่ 3 เป็นการปรากฏของรูปแบบดีเอ็นเอที่ไม่เหมือนกันทั้งหมด และการปรากฏของแถบดีเอ็นเอแต่ละช่องนั้นแสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่เป็นหมันและไม่เป็นหมัน ดังที่พบในการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ 6



ภาพ 5 รูปแบบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอข้าวประชากรชั่วที่ 2 จากการใช้โมเลกุลเครื่องหมาย OPAC-10 ซึ่งประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอตามลำดับดังนี้

ช่องที่ 1 Molecular weight marker 100+1.5 Kb
ช่องที่ 2 พันธุ์ $T29^S$ (P)
ช่องที่ 3 พันธุ์ สุพรรณบุรี 1 (PA)
ช่องที่ 4 พันธุ์ กข 21 (PB)
ช่องที่ 5 กลุ่ม F_2 คู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (BAS)
ช่องที่ 6 ลูก F_2 สุ่มในคู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (AS)
ช่องที่ 7 กลุ่ม F_2 คู่ผสมที่ 2 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (BBS)
ช่องที่ 8 กลุ่ม F_2 คู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะไม่เป็นหมัน (BAF)
ช่องที่ 9 กลุ่ม F_2 คู่ผสมที่ 2 ที่มีลักษณะไม่เป็นหมัน (BBF)

หมายเหตุ ลูกศรแสดงการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน

จากรูปแบบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอดังกล่าว สามารถให้ค่าตัวเลขแทนการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอได้ ดังแสดงในตาราง 8

ตาราง 8 การให้ค่าตามการปรากฏของแถบดีเอ็นเอข้าวประชากรชั่วที่ 2 จากใช้โมเลกุลเครื่องหมาย OPAC-10

แถบที่	ช่องที่							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	P	PA	PB	BAS	AS	BBS	BAF	BBF
1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	0	0	0	0	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	0	0	1	1	1	0	0
7	1	1	1	1	1	1	1	1

การศึกษาโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ที่สัมพันธ์กับยีนควบคุมความเป็นหมันของข้าว TGMS ด้วยวิธีการ bulked segregant analysis จากการศึกษา RAPD ในข้าว 2 คู่ผสม คือ T29^{S} × สุพรรณบุรี 1 และ T29^{S} × กข 21 โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายทั้งหมด 65 primers ได้แก่ primers ชุด AC, B, C และ G01-05 หลังจากการเพิ่มปริมาณโดย polymerase chain reaction พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของการปรากฏแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มที่เป็นหมัน และไม่เป็นหมันของคู่ที่ 1 (T29^{S} × สุพรรณบุรี 1) เท่ากับ 36.9 เปอร์เซ็นต์ โดยมี 24 primers ที่จำแนกความแตกต่างได้ ได้แก่ OPAC-04, OPAC-05, OPAC-07, OPAC-10, OPAC-11, OPAC-12, OPAC-17, OPC-04, OPC-05, OPC-11, OPB-01, OPB-02, OPB-03, OPB-04, OPB-06, OPB-07, OPB-09, OPB-10, OPB-14, OPB-15, OPB-17, OPB-18, OPB-19 และ OPG-02

การปรากฏแถบดีเอ็นเอโดยใช้ RAPD primer ชุด OPACในประชากร T29^{S} ×สุพรรณบุรี 1 ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 177 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทั้งหมด 10 แถบ จาก 7 primers ได้แก่ OPAC-04 , OPAC-05, OPAC-07, OPAC-10, OPAC-11, OPAC-12 และ OPAC-17 โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างจำนวน 2, 2, 1, 1, 1, 1 และ 2 แถบ ตามลำดับ (ตาราง 9) ซึ่งรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างนั้นมี 6 primers ที่มีการปรากฏแถบดีเอ็นเอใน P, BAS, AS, BBS และ BS และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใน PA, PB, BAF, BF, BBF และ BF ได้แก่ OPAC-04 , OPAC-05, OPAC-07, OPAC-10, OPAC-11 และ OPAC-12 ส่วน OPAC-17 มีการปรากฏแถบดีเอ็นเอใน PA, PB, BAF, BF, BBF และ BF และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใน P, BAS, AS, BBS และ BS

ตาราง 9 การปรากฏแถบดีเอ็นเอของ $T29^{S}$ × สุพรรณบุรี 1 โดยใช้ RAPD primer ชุด OPAC

RAPD Primers	จำนวนแถบดีเอ็นเอ ที่ปรากฏ	จำนวนแถบดีเอ็นเอ ที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่ม
OPAC-01	9	0
OPAC-02	7	0
OPAC-03	8	0
OPAC-04	10	2
OPAC-05	11	2
OPAC-06	10	0
OPAC-07	8	1
OPAC-08	6	0
OPAC-09	7	0
OPAC-10	6	1
OPAC-11	9	1
OPAC-12	9	1
OPAC-13	10	0
OPAC-14	8	0
OPAC-15	8	0
OPAC-16	9	0
OPAC-17	15	2
OPAC-18	9	0
OPAC-19	10	0
OPAC-20	8	0
รวม	177	10

การปรากฏแถบดีเอ็นเอโดยใช้ RAPD primer ชุด OPC ในประชากร $T29^{S}$ × สุพรรณบุรี 1 ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 171 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่ม

ทั้งหมด 8 แถบ จาก 3 primers ได้แก่ OPC-04, OPC-05 และ OPC-11 โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างจำนวน 2, 2, และ 4 แถบ ตามลำดับ (ตาราง 10) ซึ่งรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างนั้นปรากฏใน P, BAS, AS, BBS และ BS และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใน PA, PB, BAF, BF, BBF และ BF ทุก primers

ตาราง 10 การปรากฏแถบดีเอ็นเอของ $T29^S$ × สุพรรณบุรี 1 โดยใช้ RAPD primer ชุด OPC

RAPD	จำนวนแถบดีเอ็นเอ	
Primers	ที่ปรากฏ	ที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่ม
OPC-01	8	0
OPC-02	8	0
OPC-03	8	0
OPC-04	5	2
OPC-05	15	2
OPC-06	10	0
OPC-07	9	0
OPC-08	7	0
OPC-09	6	0
OPC-10	8	0
OPC-11	10	4
OPC-12	7	0
OPC-13	11	0
OPC-14	9	0
OPC-15	7	0
OPC-16	9	0
OPC-17	10	0
OPC-18	7	0
OPC-19	7	0
OPC-20	10	0
รวม	171	8

การปรากฏแถบดีเอ็นเอโดยใช้ RAPD primer ชุด OPB ในประชากร $T29^S$ × สุพรรณบุรี 1 ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 167 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทั้งหมด 23 แถบ จาก 12 primers ได้แก่ OPB-01, OPB-02, OPB-03, OPB-04, OPB-06, OPB-09, OPB-10, OPB-14, OPB-15, OPB-17, OPB-18 และ OPB-19 โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างจำนวน 2, 1, 2, 2, 2, 1, 2, 2, 2, 2, 2, 2, และ 1 แถบ ตามลำดับ (ตาราง 11) ซึ่งในรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างนั้น พบว่า มี 8 primers ที่มีการปรากฏแถบดีเอ็นเอใน P, BAS, AS, BBS และ BS และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใน PA, PB, BAF, BF, BBF และ BF ได้แก่ OPB-02 , OPB-03, OPB-04, OPB-06, OPB-10, OPB-14, OPB-17 และ OPB-18 และมี 4 primers ที่มีการปรากฏแถบดีเอ็นเอใน PA, PB, BAF, BF, BBF และ BF และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใน P, BAS, AS, BBS และ BS ได้แก่ OPB-01, OPB-09, OPB-15 และ OPB-19

ตาราง 11 การปรากฏแถบดีเอ็นเอของ T29^S × สุพรรณบุรี 1 โดยใช้ RAPD primer ชุด OPB

RAPD Primers	จำนวนแถบดีเอ็นเอ	
	ที่ปรากฏ	ที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่ม
OPB-01	9	2
OPB-02	4	1
OPB-03	7	2
OPB-04	11	2
OPB-05	10	0
OPB-06	13	2
OPB-07	10	1
OPB-08	11	0
OPB-09	5	2
OPB-10	7	2
OPB-11	8	0
OPB-12	10	0
OPB-13	9	0
OPB-14	6	2
OPB-15	10	2
OPB-16	11	0
OPB-17	6	2
OPB-18	7	2
OPB-19	2	1
OPB-20	11	0
รวม	167	23

การปรากฏของแถบดีเอ็นเอโดยใช้ RAPD primer OPG-01 ถึง OPG-05 ในประชากร T29^{S}× สุพรรณบุรี 1 ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 41 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทั้งหมด 2 แถบ จาก 1 primer คือ OPG-02 (ตาราง 12) ซึ่งรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างนั้นปรากฏใน P, BAS, AS, BBS และ BS และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใน PA, PB, BAF, BF, BBF และ BF

ตาราง 12 การปรากฏแถบดีเอ็นเอของ T29^{S} × สุพรรณบุรี1 โดยใช้ RAPD primer OPG-01 ถึง OPG-05

RAPD Primers	จำนวนแถบดีเอ็นเอ ที่ปรากฏ	จำนวนแถบดีเอ็นเอ ที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่ม
OPG-01	8	0
OPG-02	7	2
OPG-03	10	0
OPG-04	9	0
OPG-05	7	0
รวม	41	2

ส่วนคู่ของ T29^{S} × กข 21 พบว่า มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มที่เป็นหมันและไม่เป็นหมัน มีค่าเท่ากับ 27.7 เปอร์เซ็นต์ มี 18 primers ได้แก่ OPAC-04, OPAC-05, OPAC-07, OPAC-10, OPAC-11, OPAC-12, OPAC-17, OPC-04, OPC-05, OPC-11, OPB-01, OPB-02, OPB-04, OPB-06, OPB-09, OPB-10, OPB-18 และ OPG-02

การปรากฏแถบดีเอ็นเอโดยใช้ RAPD primer ชุด OPAC ในประชากร T29^{S} × กข 21 ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 167 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทั้งหมด 18 แถบ จาก 7 primers ได้แก่ OPAC-04, OPAC-05, OPAC-07, OPAC-10, OPAC-11, OPAC-12 และ OPAC-17 โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างจำนวน 3, 6, 2, 1, 2, 1 และ 3 แถบ ตามลำดับ (ตาราง 13) ซึ่งในรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างนั้นปรากฏใน P, BAS, AS, BBS และ BS และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใน PA, PB, BAF, BF, BBF และ BF ทุก primers

ตาราง 13 การปรากฏแถบดีเอ็นเอของ T29^{S} × กข 21 โดยใช้ RAPD primer ชุด OPAC

RAPD	จำนวนแถบดีเอ็นเอ	
Primers	ที่ปรากฏ	ที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่ม
OPAC-01	7	0
OPAC-02	7	0
OPAC-03	10	0
OPAC-04	10	3
OPAC-05	14	6
OPAC-06	11	0
OPAC-07	8	2
OPAC-08	8	0
OPAC-09	9	0
OPAC-10	7	1
OPAC-11	7	2
OPAC-12	7	1
OPAC-13	9	0
OPAC-14	7	0
OPAC-15	9	0
OPAC-16	10	0
OPAC-17	12	3
OPAC-18	7	0
OPAC-19	9	0
OPAC-20	6	0
รวม	167	18

การปรากฏแถบดีเอ็นเอโดยใช้ RAPD primer ชุด OPC ในประชากร T29^{S} × กข 21 ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 177 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทั้งหมด 5 แถบ จาก 3 primers ได้แก่ OPC-04, OPC-05 และ OPA-11 โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างจำนวน 2, 2, และ 1 แถบ ตามลำดับ (ตาราง 14) ซึ่งในรูปแบบ

ของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างนั้นปรากฏใน P. BAS, AS, BBS และ BS และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใน PA, PB, BAF, BF, BBF และ BF ทุก primers

ตาราง 14 การปรากฏแถบดีเอ็นเอของ T29^{S} × กข 21 โดยใช้ RAPD primer ชุด OPC

RAPD Primers	จำนวนแถบดีเอ็นเอ ที่ปรากฏ	จำนวนแถบดีเอ็นเอ ที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่ม
OPC-01	10	0
OPC-02	9	0
OPC-03	9	0
OPC-04	10	2
OPC-05	9	2
OPC-06	11	0
OPC-07	10	0
OPC-08	9	0
OPC-09	8	0
OPC-10	8	0
OPC-11	7	1
OPC-12	7	0
OPC-13	10	0
OPC-14	7	0
OPC-15	9	0
OPC-16	10	0
OPC-17	11	0
OPC-18	9	0
OPC-19	8	0
OPC-20	6	0
รวม	177	5

การปรากฏแถบดีเอ็นเอโดยใช้ RAPD primer ชุด OPB ในประชากร T29^{S} × กข 21 ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 122 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่ม

ทั้งหมด 15 แถบ จาก 6 primers ได้แก่ OPB-01, OPB-04, OPB-06, OPB-09, OPB-10 และ OPB-18 โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างจำนวน 3, 2, 3, 2, 2 และ 3 แถบ ตามลำดับ (ตาราง 15) ซึ่งในรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างนั้นปรากฏใน P, BAS, AS, BBS และ BS และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใน PA, PB, BAF, BF, BBF และ BF ทุก primers

ตาราง 15 การปรากฏแถบดีเอ็นเอของ $T29^S$ × กข 21 โดยใช้ RAPD primer ชุด OPB

RAPD Primers	จำนวนแถบดีเอ็นเอ	
	ที่ปรากฏ	ที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่ม
OPB-01	12	3
OPB-02	4	0
OPB-03	0	0
OPB-04	8	2
OPB-05	10	0
OPB-06	10	3
OPB-07	0	0
OPB-08	10	0
OPB-09	8	2
OPB-10	7	2
OPB-11	10	0
OPB-12	9	0
OPB-13	7	0
OPB-14	0	0
OPB-15	0	0
OPB-16	10	0
OPB-17	0	0
OPB-18	7	3
OPB-19	0	0
OPB-20	10	0
รวม	122	15

การปรากฏแถบดีเอ็นเอโดยใช้ RAPD primer OPG-01 ถึง OPG-05 ในประชากรของ $T29^{S}$× กข 21 ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 34 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทั้งหมด 5 แถบ จาก 1 primer คือ OPG-02 (ตาราง 16) ซึ่งในรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างนั้นปรากฏใน P, BAS, AS, BBS และ BS และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใน PA, PB, BAF, BF, BBF และ BF

ตาราง 16 การปรากฏแถบดีเอ็นเอของ $T29^{S}$ × กข 21 โดยใช้ RAPD primer ชุด OPG

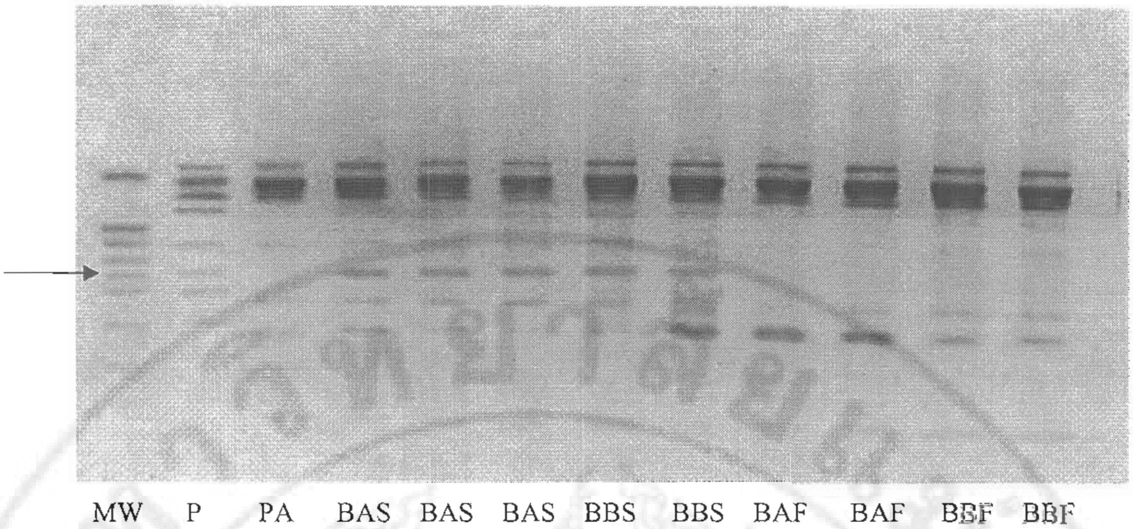
RAPD Primers	จำนวนแถบดีเอ็นเอ	
	ที่ปรากฏ	ที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่ม
OPG-01	8	0
OPG-02	8	5
OPG-03	6	0
OPG-04	8	0
OPG-05	9	0
รวม	34	5

หลังจากนั้นนำผลที่ได้การศึกษาโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ที่สัมพันธ์กับยีนควบคุมความเป็นหมันของข้าว TGMS ด้วยวิธีการ bulked segregant analysis ในข้าวทั้ง 2 คู่ผสม จากผลการใช้โมเลกุลเครื่องหมาย โดยการทำแยกคู่ผสมทั้งหมด 24 primers นำมาหาโมเลกุลเครื่องหมาย ที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมความเป็นหมันในข้าวทั้งสองคู่ผสมพร้อมกัน พบว่าโมเลกุลเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างของการปรากฏแถบดีเอ็นเอ ทั้งสองคู่ผสมมี 12 primers ได้แก่ OPAC-04, OPAC-07, OPAC-10, OPAC-11, OPC-05, OPC-11, OPB-01, OPB-04, OPB-06, OPB-10, OPB-18 และ OPG-02 โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 95 แถบ และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มทั้งหมด 2 แถบ โดยการปรากฏของรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่เป็นหมันและไม่เป็นหมันมี 2 primers คือ OPAC-10 และ OPC-05 (ตาราง 17) ซึ่งในรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างนั้นปรากฏใน P, BAS, AS, BBS และ BS และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใน PA, PB, BAF, BF, BBF และ BF

ตาราง 17 การปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างทั้งสองคู่ผสมของ RAPD primer ชุด OPAC, OPB, OPC และ OPG-01 ถึง OPG-05

RAPD Primers	จำนวนแถบดีเอ็นเอ ที่ปรากฏ	จำนวนแถบดีเอ็นเอ ที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่ม
OPAC-04	6	0
OPAC-07	8	0
OPAC-10	14	1
OPAC-11	12	0
OPC-05	12	1
OPC-11	6	0
OPB-01	7	0
OPB-04	7	0
OPB-06	7	0
OPB-10	4	0
OPB-18	6	0
OPG-02	6	0
รวม	95	2

รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากประชากรข้าวชั่วที่ 2 ของคู่ผสม T29^{S} × สุพรรณบุรี1 และ T29^{S} × กข 21 จากการใช้โมเลกุลเครื่องหมาย OPAC-10 ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 14 แถบ และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่ม 1 แถบ (ภาพ 6) โดยรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างนั้นปรากฏใน P, BAS, AS, BBS และ BS และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใน PA, PB, BAF, BF, BBF และ BF

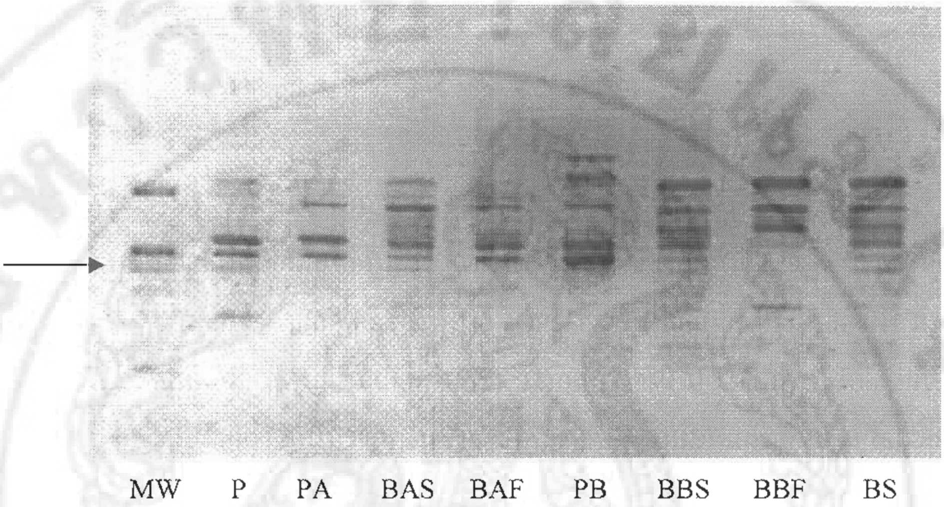


ภาพ 6 รูปแบบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอจากประชากรข้าวชั่วที่ 2 ของคู่ผสม T29^S × สุพรรณบุรี 1 และ T29^S × กข 21 หลังจากทำปฏิกิริยา PCR ด้วย primer OPAC-10 ซึ่งประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอตามลำดับดังนี้

ช่องที่ 1 Molecular weight marker 100+1.5 Kb
ช่องที่ 2 พันธุ์ T29^S (P)
ช่องที่ 3 พันธุ์ สุพรรณบุรี 1 (PA)
ช่องที่ 4 กลุ่ม F$_2$ คู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (BAS) กลุ่มที่ 1
ช่องที่ 5 กลุ่ม F$_2$ คู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (BAS) กลุ่มที่ 2
ช่องที่ 6 กลุ่ม F$_2$ คู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (BAS) กลุ่มที่ 3
ช่องที่ 7 กลุ่ม F$_2$ คู่ผสมที่ 2 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (BBS) กลุ่มที่ 1
ช่องที่ 8 กลุ่ม F$_2$ คู่ผสมที่ 2 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (BBS) กลุ่มที่ 2
ช่องที่ 9 กลุ่ม F$_2$ คู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะไม่เป็นหมัน (BAF) กลุ่มที่ 1
ช่องที่ 10 กลุ่ม F$_2$ คู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะไม่เป็นหมัน (BAF) กลุ่มที่ 2
ช่องที่ 11 กลุ่ม F$_2$ คู่ผสมที่ 2 ที่มีลักษณะไม่เป็นหมัน (BBF) กลุ่มที่ 1
ช่องที่ 12 กลุ่ม F$_2$ คู่ผสมที่ 2 ที่มีลักษณะไม่เป็นหมัน (BBF) กลุ่มที่ 2

หมายเหตุ ลูกศรแสดงการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน

รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากประชากรข้าวชั่วที่ 2 ของคู่ผสม T29^{S} × สุพรรณบุรี 1 และ T29^{S} × กข 21 จากการใช้โมเลกุลเครื่องหมาย OPC-05 ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 12 แถบ และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่ม 1 แถบ (ภาพ 7) โดยรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างนั้นปรากฏใน P, BAS, AS, BBS และ BS และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใน PA, PB, BAF, BF, BBF และ BF



ภาพ 7 รูปแบบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอจากประชากรข้าวชั่วที่ 2 ของคู่ผสม T29^{S} × สุพรรณบุรี 1 และ T29^{S} × กข 21 หลังจากทำปฏิกิริยา PCR ด้วย primer OPC-05 ซึ่งประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอตามลำดับดังนี้

ช่องที่ 1 Molecular weight marker 100+1.5 Kb
ช่องที่ 2 พันธุ์ T29^{S} (P)
ช่องที่ 3 พันธุ์ สุพรรณบุรี 1 (PA)
ช่องที่ 4 กลุ่ม F_2 คู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (BAS)
ช่องที่ 5 กลุ่ม F_2 คู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะไม่เป็นหมัน (BAF)
ช่องที่ 6 พันธุ์ กข 21 (PB)
ช่องที่ 7 กลุ่ม F_2 คู่ผสมที่ 2 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (BBS)
ช่องที่ 8 กลุ่ม F_2 คู่ผสมที่ 2 ที่มีลักษณะไม่เป็นหมัน (BBF)
ช่องที่ 9 ลูก F_2 คู่ผสมที่ 2 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (BS)

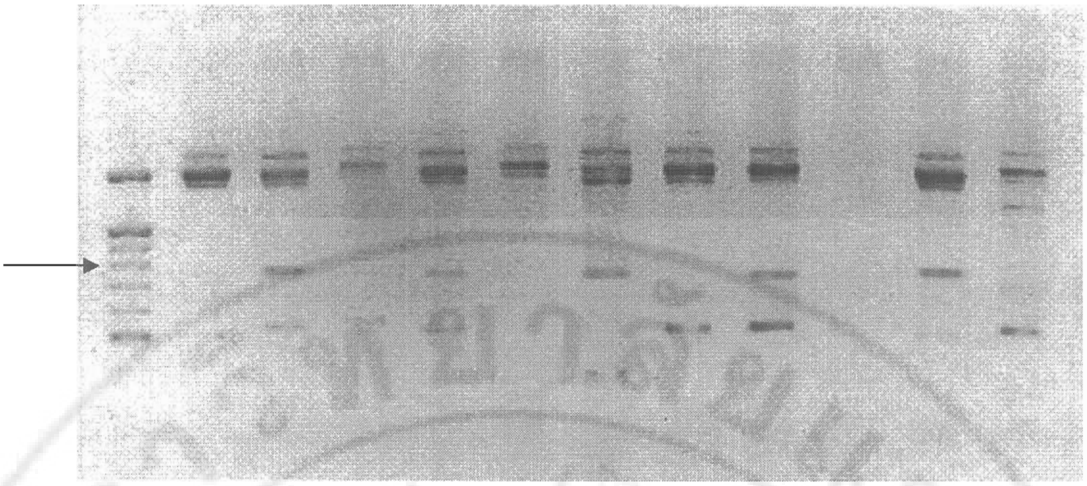
หมายเหตุ ลูกศรแสดงการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน

จากการศึกษาโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ที่สัมพันธ์กับยีนควบคุมความเป็นหมันของข้าว TGMS ด้วยวิธีการ bulked segregant analysis ในข้าว 2 คู่ผสมทั้ง T29^{S} × สุพรรณบุรี 1 และ T29^{S} × กข 21 โดยใช้ primers OPAC-10 และ OPC-05 จากการทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อยืนยันผล พบว่า primers OPAC-10 ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมดมีจำนวน 14, 14 และ 11 แถบ ตามลำดับ และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มหมันและไม่หมัน 1 แถบเหมือนกันทั้ง 3 ครั้ง ส่วน primer OPC-05 ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมดมีจำนวน 12, 14 และ 11 แถบ ตามลำดับ และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มหมันและไม่หมัน 1 แถบเหมือนกันในการทดลองครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 แต่การทดสอบครั้งที่ 3 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มหมันและไม่หมัน (ตาราง 18)

ตาราง 18 ผลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ primer OPAC-10 จากการทำซ้ำ 3 ครั้ง

RAPD	จำนวนแถบดีเอ็นเอ	
Primers	ที่ปรากฏ	ที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่ม
ครั้งที่ 1		
OPAC-10	14	1
OPC-05	12	1
ครั้งที่ 2		
OPAC-10	14	1
OPC-05	14	1
ครั้งที่ 3		
OPAC-10	11	1
OPC-05	11	0

การปรากฏของแถบดีเอ็นเอจากประชากรข้าวชั่วที่ 2 ของคู่ผสม T29^{S} × สุพรรณบุรี 1 และสายพันธุ์ T29^{S} × กข 21 จากการใช้โมเลกุลเครื่องหมาย OPAC-10 ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 11 แถบ และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่ม 1 แถบ (ภาพ 8) โดยรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างนั้นปรากฏใน P, BAS, AS, BBS และ BS และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใน PA, PB, BAF, BF, BBF และ BF

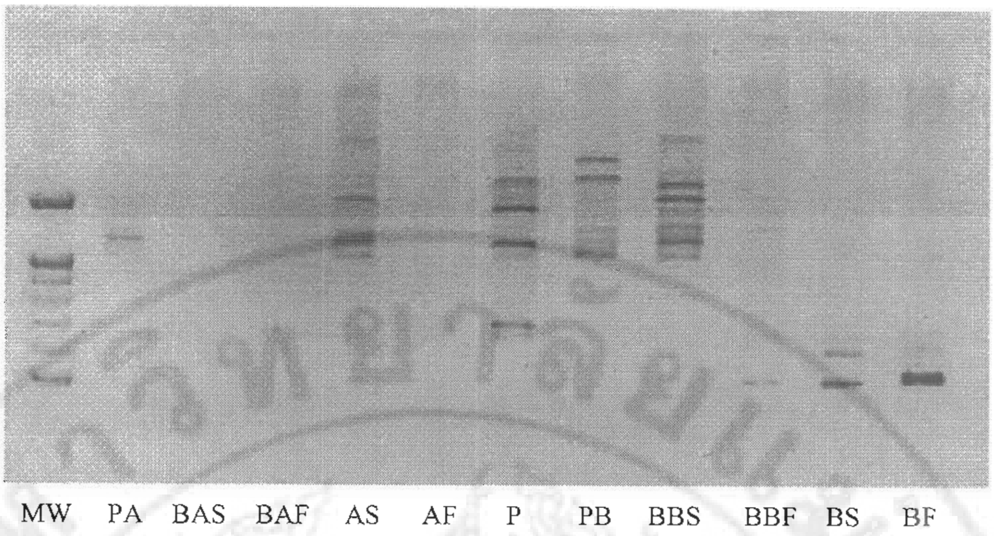


ภาพ 8 รูปแบบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอจากประชากรข้าวชั่วที่ 2 ของคู่ผสม T29^S × สุพรรณบุรี 1 และ T29^S × กข 21 หลังจากทำปฏิกิริยา PCR ด้วย primer OPAC-10 ซึ่งประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอตามลำดับดังนี้ (ทำซ้ำครั้งที่ 3)

ช่องที่ 1 Molecular weight marker 100+1.5 Kb
ช่องที่ 2 พันธุ์สุพรรณบุรี 1 (PA)
ช่องที่ 3 กลุ่ม F_2 คู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (BAS)
ช่องที่ 4 กลุ่ม F_2 คู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะไม่เป็นหมัน (BAF)
ช่องที่ 5 ลูก F_2 สุ่มในคู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (AS)
ช่องที่ 6 ลูก F_2 สุ่มในคู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะไม่เป็นหมัน (AF)
ช่องที่ 7 พันธุ์ T29^S (P)
ช่องที่ 8 พันธุ์ กข 21 (PB)
ช่องที่ 9 กลุ่ม F_2 คู่ผสมที่ 2 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (BBS)
ช่องที่ 10 หลังจากทำปฏิกิริยา PCR แล้วไม่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
ช่องที่ 11 ลูก F_2 สุ่มในคู่ผสมที่ 2 ที่มีลักษณะไม่เป็นหมัน (BF)

หมายเหตุ ลูกศรแสดงการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน

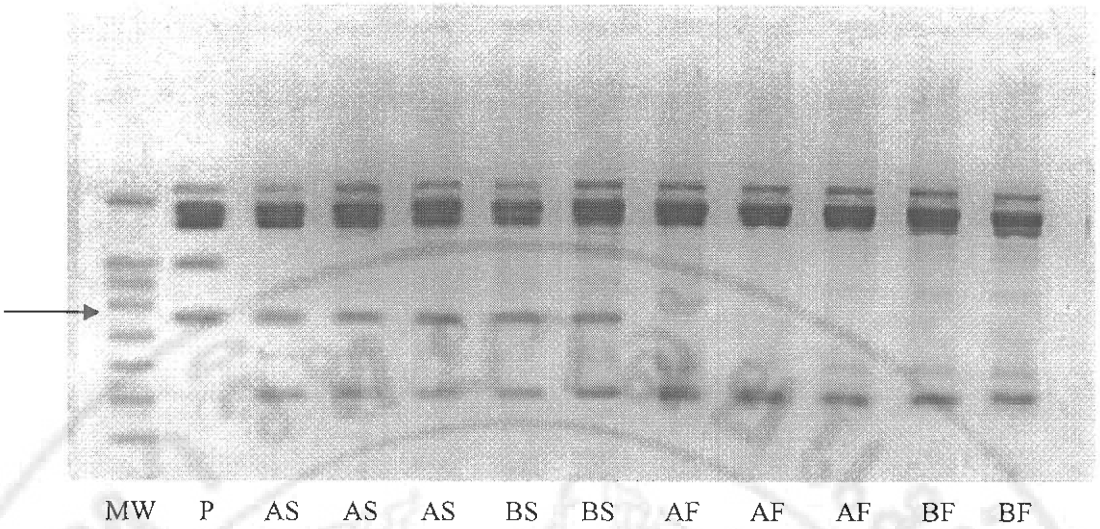
การปรากฏของแถบดีเอ็นเอจากประชากรข้าวชั่วที่ 2 ของคู่ผสม T29^S × สุพรรณบุรี 1 และ T29^S × กข 21 จากการใช้โมเลกุลเครื่องหมาย OPC-05 ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 11 แถบ และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่ม (ภาพ 9)



ภาพ 9 รูปแบบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอจากประชากรข้าวชั่วที่ 2 ของคู่ผสม T29^S × สุพรรณบุรี 1 และ T29^S × กข 21 หลังจากทำปฏิกิริยา PCR ด้วย primer OPC-05 (ทำซ้ำครั้งที่ 3) ซึ่งประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอตามลำดับดังนี้

ช่องที่ 1 Molecular weight marker 100+1.5 Kb
ช่องที่ 2 พันธุ์ สุพรรณบุรี 1 (PA)
ช่องที่ 3 หลังจากทำปฏิกิริยา PCR แล้วไม่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
ช่องที่ 4 หลังจากทำปฏิกิริยา PCR แล้วไม่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
ช่องที่ 5 ลูก F$_2$ สุ่มในคู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (AS)
ช่องที่ 6 หลังจากทำปฏิกิริยา PCR แล้วไม่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
ช่องที่ 7 พันธุ์ T29^S (P)
ช่องที่ 8 พันธุ์ กข 21 (PB)
ช่องที่ 9 กลุ่ม F$_2$ คู่ผสมที่ 2 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (BBS)
ช่องที่ 10 ลูก F$_2$ สุ่มในคู่ผสมที่ 2 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (BS)
ช่องที่ 11 ลูก F$_2$ สุ่มในคู่ผสมที่ 2 ที่มีลักษณะไม่เป็นหมัน (BF)

การปรากฏของแถบดีเอ็นเอจากประชากรข้าวชั่วที่ 2 ของคู่ผสม T29^S × สุพรรณบุรี 1 และ T29^S × กข 21 ภายหลังจากการใช้โมเลกุลเครื่องหมาย OPAC-10 ที่ได้จากแต่ละต้นสุ่มในคู่ผสมที่ 1 ใช้ต้นสุ่มที่เป็นหมัน 3 ต้น และไม่เป็นหมัน 3 ต้น คู่ผสมที่ 2 ใช้ต้นสุ่มที่เป็นหมัน 2 ต้น และไม่เป็นหมัน 2 ต้น ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 11 แถบ และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่ม 1 แถบ เช่นเดียวกับรูปแบบที่พบเมื่อทำรวมกลุ่มดีเอ็นเอทั้ง 3 ซ้ำ (ภาพ 10)



ภาพ 10 รูปแบบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอจากประชากรข้าวชั่วที่ 2 ของคู่ผสม T29^S × สุพรรณบุรี 1 และ T29^S × กข 21 หลังจากทำปฏิกิริยา PCR ด้วย primer OPAC-10 โดยไม่ได้รวมกลุ่มดีเอ็นเอ ประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอตามลำดับดังนี้

ช่องที่ 1 Molecular weight marker 100+1.5 Kb
ช่องที่ 2 พันธุ์ T29^S (P)
ช่องที่ 3 ลูก F$_2$ สุ่มในคู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (AS)
ช่องที่ 4 ลูก F$_2$ สุ่มในคู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (AS)
ช่องที่ 5 ลูก F$_2$ สุ่มในคู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (AS)
ช่องที่ 6 ลูก F$_2$ สุ่มในคู่ผสมที่ 2 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (BS)
ช่องที่ 7 ลูก F$_2$ สุ่มในคู่ผสมที่ 2 ที่มีลักษณะเป็นหมัน (BS)
ช่องที่ 8 ลูก F$_2$ สุ่มในคู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะไม่เป็นหมัน (AF)
ช่องที่ 9 ลูก F$_2$ สุ่มในคู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะไม่เป็นหมัน (AF)
ช่องที่ 10 ลูก F$_2$ สุ่มในคู่ผสมที่ 1 ที่มีลักษณะไม่เป็นหมัน (AF)
ช่องที่ 11 ลูก F$_2$ สุ่มในคู่ผสมที่ 2 ที่มีลักษณะไม่เป็นหมัน (BF)
ช่องที่ 12 ลูก F$_2$ สุ่มในคู่ผสมที่ 2 ที่มีลักษณะไม่เป็นหมัน (BF)

หมายเหตุ ลูกศรแสดงการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

ลักษณะของข้าวสายพันธุ์เป็นหมันโดยอุณหภูมิ

ลักษณะทั่วไปของข้าวสายเป็นหมันโดยอุณหภูมิ T29^{S} มีลักษณะพิเศษที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน คือ ลักษณะสีโคนต้นและสีเขี้ยวใบที่มีสีม่วง ดังที่มีการรายงานโดย IRRI (2002) ที่กล่าวถึง ลักษณะของข้าวสายพันธุ์เป็นหมันโดยอุณหภูมิพันธุ์ TS29 ว่ามีลักษณะสีโคนต้นและสีเขี้ยวใบเป็นสีม่วง และลักษณะที่สังเกตเห็นได้อีก คือ ลักษณะคอรวงและใบธงของพันธุ์ T29^{S} มีลักษณะสั้น และพบว่า ข้าวพันธุ์นี้มีจำนวนต้นต่อกอเฉลี่ย 40 ต้นต่อกอ ซึ่งสอดคล้องกับ Kalailyarasi and Vaidyanathan (2005) ได้รายงานถึง ลักษณะคอรวงและใบธงของข้าวสายพันธุ์เป็นหมันโดยอุณหภูมิในพันธุ์ TS16, TS18 และ TS29 มีลักษณะคอรวงและใบธงสั้นเหมือนกับพันธุ์ T29^{S} และมีจำนวนต้นต่อกอเฉลี่ยใกล้เคียงกัน คือ 45-50 ต้นต่อกอ เช่นเดียวกับในรายงานของ Gangashetti *et al.* (2004) ที่ได้กล่าวถึง จำนวนต้นต่อกอของข้าวสายพันธุ์เป็นหมันโดยอุณหภูมิ จากคู่ผสม IR58025A x IR58025B มีจำนวนต้นต่อกอเฉลี่ยประมาณ 29.52 ± 0.33 ต้นต่อกอ

ข้าวพันธุ์ T29^{S} ที่ใช้ในการศึกษานี้มีลักษณะเกสรตัวผู้ที่เป็นหมัน เมื่อได้รับอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิวิกฤติ ซึ่งสอดคล้องกับในรายงานของ Latha *et al.* (2002) ที่ได้ทำการศึกษาในข้าวพันธุ์ TS6, TS16, TS18, TS29, TS46 และ TS47 ซึ่งพันธุ์ข้าวที่กล่าวมานี้มีลักษณะความเป็นหมันโดยอุณหภูมิเช่นเดียวกันกับพันธุ์ T29^{S} โดยพบว่า มีอุณหภูมิวิกฤติเฉลี่ยที่ 24-26 °C ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ Kirubakaran (2002) ที่รายงานถึง ข้าวพันธุ์ TS29 ว่ามีอุณหภูมิวิกฤติอยู่ที่ 24/29 °C และ Alagarswamy (2004) ได้มีรายงานเหมือนกันถึง การศึกษาลักษณะความ เป็นหมันโดยอุณหภูมิของข้าวพันธุ์ TS6, TS16 และ TS9 มีอุณหภูมิวิกฤติเท่ากันที่ 24/29 °C และลักษณะความเป็นหมันของเกสรตัวผู้พันธุ์ T29^{S} นี้ถูกควบคุมโดยอุณหภูมิ ซึ่งสามารถสังเกตได้จากเวลาที่ดอกข้าวบาน โดยข้าวที่มีลักษณะเป็นหมันละอองเรณูของเกสรตัวผู้มีสีเหลืองซีด ส่วนข้าวที่ไม่เป็นหมัน มีละอองเรณูของเกสรตัวผู้เป็นสีเหลืองสด ซึ่งสามารถสังเกตเห็นลักษณะความเป็นหมันได้ในช่วงเวลาที่ดอกข้าวบานได้ในเวลา 9.00 - 12.00 น. ซึ่งสอดคล้องกับในรายงานของ IRRI (2002) และ Latha *et al.* (2002) ที่รายงานถึงข้าวพันธุ์ TS29 ที่มีลักษณะเป็นหมัน โดยมีละอองเรณูของเกสรตัวผู้สีเหลืองอ่อน ส่วนข้าวที่ไม่เป็นหมันมีละอองเรณูของเกสรตัวผู้มีสีเหลืองสด ซึ่งสามารถสังเกตเห็นลักษณะความเป็นหมันในช่วงเวลา 9.00 - 12.00 น. ซึ่งเป็นเวลาที่

ดอกข้าวบาน อายุการออกดอกข้าวพันธุ์ T29^{S} มีอายุการออกดอกเฉลี่ยประมาณ 90 ± 9.8 วัน อายุการออกดอกของประชากรข้าวชั่วที่ 1 จาก คู่ผสม T29^{S} x สุพรรณบุรี 1 และ T29^{S}x กข 21 มีอายุการออกดอกเฉลี่ยประมาณ 80 และ 86 วัน ส่วนอายุการออกดอกของประชากรข้าวชั่วที่ 2 จาก คู่ผสม T29^{S} x สุพรรณบุรี 1 และ T29^{S} x กข 21 มีอายุการออกดอกอยู่ระหว่าง 102-125 วัน ซึ่งอายุการออกดอกของข้าวที่ได้ทำการศึกษานี้มีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ Latha *et al.* (2002) ที่ได้รายงานถึง ข้าวพันธุ์ TS29 ว่ามีอายุการออกดอกเฉลี่ยประมาณ 122 วัน และได้รายงานถึงแหล่งที่มาของข้าวเป็นหมันโดยอุณหภูมิ TS29 นี้ว่า เกิดจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ โดยมีแหล่งที่มาจาก TNAC (Tamil Nadu Agricultural University)

ลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 1

ลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 1 ของข้าวสายพันธุ์เป็นหมันโดยอุณหภูมิทั้งสองคู่ผสม คือ T29^{S} x สุพรรณบุรี 1 และ T29^{S} x กข 21 มีลักษณะไม่เป็นหมันและติดเมล็ดทุกต้น โดยติดเมล็ดประมาณ 60-65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากการศึกษานี้มีลักษณะที่สอดคล้องกับในรายงานของ Yang *et al.* (1992) ที่ได้ทำการศึกษาในประชากรข้าวชั่วที่ 1 จากคู่ผสม 5460S x 5460 มีลักษณะไม่เป็นหมันเหมือนกันทุกต้น และมีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด 56-58 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับในรายงานของ Han *et al.* (2001) ที่ทำการศึกษาในข้าว จากคู่ผสม Peiai x Nongken 58 มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดต่อรวง 57.5 เปอร์เซ็นต์ และในรายงานของ Kuttar *et al.* (1998) รายงานถึง การติดเมล็ดของข้าวในคู่ผสม PMSTA x Pusa 44-33 มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด 54.75 เปอร์เซ็นต์ และในคู่ผสม PM33A x RP2151-40-1 มีการติดเมล็ด 47.64 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 1 พบว่า ข้าวทุกต้นในประชากรชั่วที่ 1 มีลักษณะไม่เป็นหมัน ซึ่งสอดคล้องกับ Reena *et al.* (2000) ที่กล่าวว่า ข้าว Japonica rice mutant PL-12 ในประชากรข้าวชั่วที่ 1 มีลักษณะไม่เป็นหมันทุกต้นเนื่องจาก ลักษณะความเป็นหมันเป็นลักษณะทางคุณภาพที่ถูกควบคุมด้วยยีน 1 คู่ ที่เป็น homozygous recessive โดยลักษณะความเป็นหมันเป็นลักษณะด้อย (recessive) ซึ่งแสดงออกเมื่อยีนอยู่ในสภาพ homozygous (ss) เท่านั้น ส่วนลักษณะไม่เป็นหมันเป็นลักษณะเด่น (dominant) ซึ่งสามารถแสดงออกได้ไม่ว่ายีนจะอยู่ในสภาพ homozygous (SS) หรือ heterozygous (Ss) เมื่อเกิดการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างพันธุ์เป็นหมันและที่ไม่เป็นหมัน ประชากรข้าวชั่วที่ 1 จึงมีลักษณะยีนเป็น heterozygous ทุกต้น โดยลักษณะการแสดงออกของลักษณะไม่เป็นหมันนี้เป็น allele ที่ข่มการแสดงออกของลักษณะเป็นหมันได้อย่างสมบูรณ์ (complete dominant) ทำให้ genotype (SS) และ (Ss) มี

phenotype อย่างเดียวกัน (Peter *et al.*, 1996) คือ ไม่เป็นหมัน และ Kirubakaran (2002) ได้รายงานถึง ยีนที่ควบคุมลักษณะความเป็นหมันของข้าวโดยอาศัยอุณหภูมิของข้าวพันธุ์ TS29 ถูกควบคุมด้วยยีน single recessive และมีลักษณะความเป็นหมันในนิวเคลียส เช่นเดียวกับรายงานของ Barge *et al.* (2002) ที่ได้รายงานถึง ข้าวเป็นหมันโดยอุณหภูมิสายพันธุ์อื่นๆ เช่น UPRI 95-140, RL 94179, UPRI 95-124, UPRI 95-141, UPRI 95-145, UPRI 95-151, UpRI 95-160, UPRI 95-161 และ UPRI 95-132 ที่มีลักษณะความเป็นหมันที่ถูกควบคุมโดย homozygous recessive gene รายงานของ Li *et al.* (2005) ได้กล่าวถึงยีนที่ ควบคุมความเป็นหมันของ pearl millet ซึ่งถูกควบคุมด้วย single recessive gene เช่นเดียวกันกับข้าว Japonica rice mutant PL-12 (Reene *et al.*, 2002) และ Dong *et al.* (2005) ที่รายงานถึงยีน 1 คู่ที่ควบคุมความเป็นหมันที่เป็น recessive gene ในข้าว Indica 5460S และมีรายงานถึงยีน *tms* 6 ซึ่งเป็นยีน single recessive ที่สามารถควบคุมความเป็นหมันโดยอุณหภูมิ (Hassain *et al.*, 1998) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kinoshita (2000) ได้มีการรายงานถึงยีน *tms* 1, *tms* 2 และ *tms* 3 ที่ควบคุมความเป็นหมันของข้าวโดยอุณหภูมิ โดยเป็น single recessive gene เช่นเดียวกับในข้าวพันธุ์ IR68945-33-4-14 ที่รายงานถึงยีน *tms* 2 สามารถควบคุมความเป็นหมันโดยอุณหภูมิ ที่เป็น single recessive gene และ IRRI (1998) ได้รายงานว่า ข้าวพันธุ์ UPRI 95-141, UPRI 95-165 และ UPRI 95-177 มียีนควบคุมลักษณะความเป็นหมัน 1 คู่ ที่เป็น recessive gene เช่นเดียวกัน

ลักษณะทางการเกษตรของประชากรข้าวชั่วที่ 2

การทดสอบค่าไคสแควร์ของลักษณะความเป็นหมันในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ของสายพันธุ์ข้าวเป็นหมันโดยอุณหภูมิทั้ง 2 คู่ผสม คือ T29^{S} x สุพรรณบุรี 1 และ T29^{S} x กข 21 มีอัตราส่วนการกระจายตัวของลักษณะไม่เป็นหมัน : เป็นหมัน เท่ากับ 3 : 1 ซึ่งการกระจายตัวของประชากรชั่วที่ 2 มีอัตราส่วนตรงตามกฎการกระจายตัวเชิงคุณภาพของเมนเดล ที่ถูกควบคุมด้วยยีน 1 คู่ และเป็น homozygous และพบว่า ในข้าวสายพันธุ์เป็นหมันโดยอุณหภูมิหลายคู่ผสมมีอัตราส่วนการกระจายตัวของลักษณะไม่เป็นหมัน : เป็นหมัน เท่ากับ 3 : 1 เช่น ดังในรายงานของ Kirubakaran (2002) ที่กล่าวเช่นเดียวกันถึง อัตราส่วนการกระจายตัวของลักษณะไม่เป็นหมัน : เป็นหมัน จากคู่ผสม TS29 x ASC16, TS29 x ASC18, TS29 x MUD5, TS29 x ADT43 และ TS29 x TRYR2 ในรายงานของ Reddy *et al.* (2002) มีรายงานถึง อัตราส่วนการกระจายตัวของข้าวสายพันธุ์เป็นหมันโดยอุณหภูมิจาก SA2 x N22 และ ID24 x N22 ที่มีค่าเท่ากันกับในข้าวที่ทำการศึกษาทั้งสองคู่ผสม เช่นเดียวกันกับรายงานของ Han *et al.* (2001) ที่ได้รายงานถึง ข้าว

สายพันธุ์เป็นหมันโดยอุณหภูมิจากคู่ผสม Peiai 64S x Nongken 58 และในคู่ผสม 5460S x 5460 ที่มีการรายงานโดย Yang *et al.* (1992) และ Li and Pandey (2001) ได้รายงานถึง อัตราส่วนการกระจายตัวของข้าวสายพันธุ์เป็นหมันโดยอุณหภูมิ จากคู่ผสม UPRI 95-140 x UPRI 95-141, UPRI 95-140 x UPRI 95-165 และ UPRI 95-140 x UPRI 95-117 ว่ามีอัตราส่วนการกระจายตัวของลักษณะไม่เป็นหมัน : เป็นหมัน ที่เท่ากัน คือ 3 : 1 เช่นเดียวกันกับ Barge *et al.* (2002) และ Reene *et al.* (2002) เนื่องจากปรากฏการณ์ที่ลูกชั่วที่ 1 นี้มีลักษณะเด่น ที่เป็น heterozygous เมื่อปล่อยให้มีการผสมตัวเอง จะเกิดการรวมตัวกันของเซลล์สืบพันธุ์อย่างสุ่ม โดยยีนจะกลับมารวมกันเป็นคู่อีกในประชากรชั่วที่ 2 ทำให้มีอัตราส่วนการกระจายตัวของลักษณะต่างๆ ออกมาโดยมีลักษณะเด่น : ลักษณะด้อย เท่ากับ 3 : 1 (Peter, 1996) อัตราส่วน phenotype ของลูกชั่วที่ 2 จึงมีลักษณะไม่เป็นหมัน (SS) : เป็นหมัน (ss) เท่ากับ 3 : 1 โดยสารพันธุกรรมต่างๆ ถูกควบคุมด้วยยีนอย่างเฉพาะเจาะจง และยีนเหล่านี้จะอยู่กันเป็นคู่ๆ เมื่อมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ยีนดังกล่าวจะแยกออกจากกัน โดยยีนเพียงยีนเดียวจากแต่ละคู่จะไปปรากฏอยู่ในแต่ละเซลล์ สืบพันธุ์ เมื่อมีการปฏิสนธิเกิดขึ้นยีนดังกล่าวจะกลับมาปรากฏอยู่เป็นคู่ดังเดิม ซึ่งสอดคล้องกับการแยกตัวของโครโมโซมในขบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส เพราะยีนดังกล่าว คือ ส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอ (Robert, 1992)

ลักษณะสีเขี้ยวใบและสีโคนต้นของประชากรข้าวชั่วที่ 2 ในข้าวทั้งสองคู่ผสมนั้นยังมีความสัมพันธ์กันอยู่ โดยต้นที่มีโคนต้นเป็นสีม่วงมีเขี้ยวใบเป็นสีม่วง ส่วนต้นที่มีโคนต้นเป็นสีเขียวมีเขี้ยวใบเป็นสีเขียว ซึ่งการกระจายของลักษณะในประชากรชั่วที่ 2 นี้มีเพียงลักษณะสีโคนต้นและสีเขี้ยวใบที่มีความสัมพันธ์กัน แต่ลักษณะความเป็นหมันกับสีโคนต้น และสีเขี้ยวใบ ในประชากรชั่วที่ 2 นั้นไม่ได้มีความสัมพันธ์กัน โดยในต้นที่เป็นหมันของประชากรชั่วที่ 2 นี้มีทั้งต้นที่มีโคนต้นและเขี้ยวใบเป็นสีม่วง และมีต้นที่เป็นหมันแต่ที่มีโคนต้นและเขี้ยวใบเป็นสีเขียว ซึ่งในประชากรชั่วที่ 2 นี้ไม่สามารถที่จะสังเกตลักษณะความเป็นหมันได้จากสีโคนต้นและสีเขี้ยวใบที่มีสีม่วงได้แล้ว เนื่องจาก ประชากรข้าวชั่วที่ 2 ที่มีลักษณะเป็นหมันนี้มีทั้งต้นที่มีโคนต้นและเขี้ยวใบเป็นสีม่วงและสีเขียว จึงจำเป็นที่จะต้องทำการสังเกตลักษณะความเป็นหมันของต้นข้าวในเฉพาะช่วงเวลาที่ดอกบาน

การสืบหาโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ที่สัมพันธ์กับยีนควบคุมความเป็นหมันของข้าวโดยอาศัยอุณหภูมิ ด้วยวิธีการ bulked segregant analysis

การสืบหาโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ที่สัมพันธ์กับยีนควบคุมลักษณะความเป็นหมันของข้าวโดยอาศัยอุณหภูมิ ด้วยวิธีการ bulked segregant analysis ในข้าวทั้ง 2 คู่ผสม คือ $T29^S$ x สุพรรณบุรี 1 และ $T29^S$ x กข 21 เป็นการศึกษายีนที่ควบคุมลักษณะทางคุณภาพ ที่มีการแสดงออกได้อย่างชัดเจน โดยสามารถแยกออกเป็นกลุ่มที่มีลักษณะเป็นหมัน (ss) และในกลุ่มที่มีลักษณะไม่เป็นหมัน (SS) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Arus (2000) รายงานถึงการสืบหาโมเลกุลเครื่องหมาย ด้วยวิธี bulked segregant analysis เป็นวิธีการตรวจสอบยีนที่ต้องการ โดยต้องมีลักษณะการแสดงออกที่แยกได้อย่างชัดเจน และสอดคล้องกับรายงานของ Subudhi *et al.* (1999) ที่ได้รายงานถึงวิธี bulked segregant analysis ว่าเป็นวิธีการค้นหายีนโดยอาศัยหลักการสร้างกลุ่มตัวแทนของประชากรสองกลุ่มที่มีลักษณะแตกต่างกัน คือ กลุ่มที่เป็นหมัน และกลุ่มที่ไม่เป็นหมัน โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอในอัตราส่วนที่เท่ากันมารวมกัน เช่นเดียวกับรายงานของ Michelmore *et al.* (1991) ที่ได้พัฒนาวิธีการสืบหาโมเลกุลเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีนควบคุมลักษณะความต้านทานโรคราน้ำค้างในผักกาดหอม ด้วยวิธี bulked segregant analysis โดยสามารถแยกออกเป็นกลุ่มที่มีความต้านทาน (RR) กลุ่มที่อ่อนแอ (rr) ได้อย่างชัดเจน และในรายงานของ Leila *et al.* (2002) ที่ศึกษาในยีน *Pi-ar* ที่ควบคุมความต้านทานโรค Blast IB-45 ในข้าว Arguaia และจากรายงานของ Maheswaran *et al.* (1986) ศึกษายีน *Se-3* (t) ของข้าวที่ควบคุมลักษณะการตอบสนองต่อช่วงแสง

การปรากฏของแถบดีเอ็นเอภายหลังจากการทำปฏิกิริยา PCR ของข้าวทั้งสองคู่ผสม พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ โดยพบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในกลุ่มที่เป็นหมัน และไม่พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในกลุ่มที่ไม่เป็นหมัน โดยสอดคล้องกับ Subudhi *et al.* (1999) ที่ได้รายงานถึง การปรากฏของแถบดีเอ็นเอกับการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ โดยพบว่า มีการปรากฏแถบดีเอ็นเอในพันธุ์ IR32364TGMS ที่มีลักษณะเป็นหมัน และในกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่มีลักษณะเป็นหมัน แต่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ในพันธุ์ IR68 และกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่ไม่เป็นหมัน การนำโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD มาใช้สืบหายีนที่มีความสัมพันธ์กับยีนควบคุมความเป็นหมันของข้าวโดยอาศัยอุณหภูมิ ด้วยวิธีการ bulked segregant analysis เป็นโมเลกุลเครื่องหมายชนิดข่มสมบูรณ์ (dominant markers) โดยสามารถค้นพบยีนในสภาพข่ม คือ สามารถที่จะจำแนกลักษณะพันธุกรรมที่เป็นการข่มของยีนภายในตำแหน่งเดียวกัน (homozygous) และสามารถนำมาใช้เป็นโมเลกุลเครื่องหมาย ในการจำแนกลักษณะพันธุกรรมของยีนที่สนใจได้

(Mackay *et al.*, 2000) เนื่องจาก ลักษณะความเป็นหมันที่ได้ศึกษานั้นเป็นลักษณะของยีนที่เป็น homozygous recessive การปรากฏของแถบดีเอ็นเอ จึงแสดงได้เพียงลักษณะหมันกับไม่หมัน คือ การปรากฏแถบดีเอ็นเอกับการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ดังที่พบในรายงานของ Subudhi *et al.* (1999) ที่รายงานถึงลักษณะความเป็นหมันของข้าว TGMS ที่ถูกควบคุมด้วยยีน homozygous recessive จึงสามารถนำโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD มาใช้ในการสืบหายีนที่ควบคุมลักษณะความเป็นหมันของข้าวโดยอาศัยอุณหภูมิได้

การปรากฏของแถบดีเอ็นเอทั้งสองคู่ผสมจากกลุ่มดีเอ็นเอที่เป็นหมัน กับการปรากฏของแถบดีเอ็นเอจากต้นสุ่มแต่ละต้นที่เป็นหมันมีความเหมือนกัน คือ มีปรากฏรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม 1 รูปแบบเหมือนกัน โดยให้ค่าเป็น 1 สำหรับการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในกลุ่มที่เป็นหมัน และให้ค่าเป็น 0 สำหรับการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในกลุ่มที่ไม่เป็นหมัน จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า primer OPAC-10 มีความสัมพันธ์กับยีนควบคุมความความเป็นหมันโดยอุณหภูมิทั้งสองคู่ผสม โดยมีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ซึ่งมีการปรากฏแถบดีเอ็นเอในพันธุ์แม่ $T29^S$ กลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่เป็นหมัน และต้นสุ่มชั่วที่ 2 ที่เป็นหมันจากคู่ผสมที่ 1 แต่ละต้นจำนวน 3 ต้น และจากคู่ผสมที่ 2 จำนวน 3 ต้น แต่ไม่มีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในพันธุ์พ่อทั้ง 2 พันธุ์ คือ กข 21 และสุพรรณบุรี 1 กลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่ไม่เป็นหมัน และต้นสุ่มชั่วที่ 2 ที่ไม่เป็นหมันจากคู่ผสมที่ 1 แต่ละต้นจำนวน 2 ต้น และจากคู่ผสมที่ 2 จำนวน 2 ต้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Michelmore *et al.* (1991) ได้มีการรายงานถึงการจำแนกความแตกต่างด้วยการให้ค่าตามการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ จากการใช้ primer OPF-12 เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีนควบคุมความความต้านทานโรคราน้ำค้างในผักกาดหอม เนื่องจากมีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่ม โดยให้ค่าเป็น 1 สำหรับการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ และให้ค่าเป็น 0 ถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการรวมกลุ่มต้นที่ต้านทานโรคราน้ำค้างของผักกาดหอม และจากดีเอ็นเอต้นสุ่มแต่ละต้นที่ต้านทานโรคทั้ง 8 ต้น พบว่า มีการปรากฏรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม 1 รูปแบบที่เหมือนกัน คือ มีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในกลุ่มต้นต้านทานโรคและในแต่ละต้นสุ่มทั้ง 8 ต้น แต่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในกลุ่มที่ไม่ต้านทานโรคราน้ำค้าง

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

การสืบหาโมเลกุลเครื่องหมาย RAPD ที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมลักษณะความเป็นหมันของข้าว TGMS ด้วยวิธีการ bulked segregant analysis โดยการสร้างกลุ่มตัวแทนของประชากร 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีลักษณะเป็นหมันและไม่เป็นหมัน 2 คู่ผสม คือ T29^{S}x สุพรรณบุรี 1 และ T29^{S}x กข 21 จากการใช้โมเลกุลเครื่องหมายทั้งหมด 65 primers ได้แก่ primer ชุด OPAC, OPB, OPC และ OPG01-05 (Operon Technology) หลังจากการเพิ่มปริมาณโดย Polymerase Chain Reaction มีเพียง 1 primer ที่สามารถระบุยีนที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมความเป็นหมันของข้าว TGMS ได้ คือ OPAC-10 เนื่องจากมีการปรากฏแถบของรูปแบบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม โดยการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกันนั้นปรากฏใน P, BAS, AS, BBS และ BS และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใน PA, PB, BAF, BF, BBF และ BF ทุกครั้ง สรุปได้ว่า การปรากฏของรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในช่วงนี้ มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมลักษณะความเป็นหมันของข้าว TGMS จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี bulked segregant analysis ดังนั้นจึงสามารถนำโมเลกุลเครื่องหมาย OPAC-10 มาช่วยสืบหายีนที่มีความสัมพันธ์กับยีนควบคุมความเป็นหมันของข้าว TGMS ในสายพันธุ์ข้าวไทยอย่างแม่นยำ และมีประสิทธิภาพมากขึ้น

การศึกษาการกระจายตัวของลักษณะความเป็นหมัน โคนต้น สีเขี้ยวใบ และลักษณะทรงต้นในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ของข้าว TGMS จากการทดสอบค่าไคสแควร์ทุกลักษณะมีอัตราส่วนการกระจายตัวของ แต่ละลักษณะ มีค่าเท่ากับ 3 : 1 ได้แก่ ไม่เป็นหมัน : เป็นหมัน, โคนต้นสีม่วง : โคนต้นสีเขียว, เขี้ยวใบสีม่วง : เขี้ยวใบสีเขียว และทรงต้นตั้งตรง : ทรงต้นแผ่ ทุกลักษณะที่กล่าวมานี้ มีอัตราส่วนการกระจายตัวของประชากรชั่วที่ 2 สอดคล้องกับทฤษฎีการกระจายตัวเชิงคุณภาพของเมนเดล

การศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะความเป็นหมัน สีโคน สีเขี้ยวใบ และลักษณะทรงต้นในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ลักษณะที่มีความสัมพันธ์กัน คือ ลักษณะสีโคนต้นและสีเขี้ยวใบที่มีสีเดียวกันทุกต้น โดยต้นที่มีโคนต้นสีเขียวมีเขี้ยวใบเป็นสีเขียว และต้นที่มีโคนต้นเป็นสีม่วงมีเขี้ยวใบเป็นสีม่วง

ข้อเสนอแนะในการปลูกข้าว

1. ในการปลูกข้าวเพื่อการผสมพันธุ์ ควรจะทำการปลูกพันธุ์พ่อ สุพรรณบุรี 1 และ พันธุ์ กข 21 ก่อนและหลังการปลูกพันธุ์แม่ $T29^{S}$ เพื่อเป็นการป้องกันอายุการออกดอกที่ไม่พร้อมกันของพันธุ์พ่อแม่ เนื่องจากปัญหาในเรื่องการออกดอกที่ไม่พร้อมกันนี้ จะทำให้มีเกสรตัวผู้เพียงพอต่อการผสมพันธุ์ จึงจำเป็นที่จะต้องปลูกพันธุ์พ่อก่อนและหลังการปลูกพันธุ์แม่ เพื่อให้มีจำนวนต้นพ่อเพียงพอในการผสมพันธุ์

2. การปลูกข้าวในโรงเรือนกระจกต้องมีการควบคุมการเกิดโรคและแมลง เนื่องจากการปลูกพืชในโรงเรือนกระจกเป็นระบบปิด หากเกิดโรคและแมลงระบาด อาจทำให้เกิดความเสียหายแก่พืชปลูกมากกว่าการปลูกพืชที่อยู่ในแปลงปลูกที่เป็นระบบเปิด

3. การปลูกพืชในแปลงทดลอง ควรมีการวางแผนการปลูกที่ดี และควบคุมการป้องกันศัตรูพืช เช่น หอยเชอรี่ หนู และนก เพราะศัตรูพืชเหล่านี้มักทำลายความเสียหายให้แก่พืชเป็นอย่างมาก จึงควรกรองน้ำก่อนเข้าแปลงด้วยตาข่ายขนาดเล็กมากๆ เพื่อป้องกันหอยเชอรี่ที่จะเข้ามากับน้ำ และควรจะมีการเก็บหอยเชอรี่ออกจากแปลง เนื่องจากจะเป็นอันตรายต่อต้นข้าวมากในระยะที่เป็นต้นกล้า และในระยะที่มีการแตกกอ เพราะหอยเชอรี่จะเข้ามากัดกินและทำความเสียหายให้กับต้นข้าวอย่างมาก และควรมีการคลุมตาข่ายในระยะที่ข้าวกำลังออกดอก เพื่อป้องกันนกที่จะมาจิกกินเมล็ดข้าวในระยะแรกที่ติดเมล็ด และในระยะติดเมล็ดแล้วควรที่จะมีการดูแลความสะอาดภายในแปลง และบริเวณรอบแปลงปลูก เพื่อป้องกันหนูที่จะเข้ามากัดทำลายต้นข้าว

4. การเก็บข้อมูลลักษณะทางการเกษตร ควรจะทำการเก็บข้อมูลอย่างละเอียดทุกลักษณะที่สังเกตเห็นเป็นประจำทุกวัน เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานเบื้องต้นที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ร่วมกับการสืบหาโมเลกุลเครื่องหมาย และจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการนำมาใช้ช่วยสรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ข้อเสนอแนะในการสืบหาโมเลกุลเครื่องหมาย

1. การเก็บใบพืชเพื่อที่จะนำมาสกัดดีเอ็นเอ ควรเก็บใบพืชในระยะที่เป็นต้นอ่อน หรือในระยะที่กำลังเจริญเติบโต เนื่องจากในระยะนี้มีดีเอ็นเอปริมาณมาก และใบอ่อน จึงสกัดดีเอ็นเอได้ง่ายกว่าในระยะที่แก่

2. การปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ควรที่จะมีการปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอหลังจากที่สกัดดีเอ็นเอได้ให้มีความเข้มข้นเท่ากันทุกครั้งก่อนการทำปฏิกิริยา PCR เพราะถ้าหากนำดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นไม่เท่ากันจะเกิดปัญหาในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR และการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ

3. การเตรียม master mix เพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ควรมีความระมัดระวังละเอียดและรอบคอบ เนื่องจากในการปรับและดูดสารใช้จาก micropipet นั้นหากดูดไม่เท่ากันจะมีผลต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จึงควรดูดให้มีความสม่ำเสมอและเท่ากันทุกครั้ง และต้องควรระวังผสม master mix ผิด

4. การเตรียม gel ควรเตรียม gel ให้มีความเข้มข้นเท่ากันทุกครั้ง และเท gel ให้มีความหนาเท่ากันทุกครั้ง และควรใช้กระแสไฟฟ้าที่เท่ากันทุกครั้ง เนื่องจากจะมีผลต่อการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ

บรรณานุกรม

กรมวิชาการเกษตร. 2544. การใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวและการวิจัยและการพัฒนาการผลิตข้าวลูกผสม. น. 32-35. ใน **รายงานการประชุมเชิงปฏิบัติการ วันที่ 27-29 กรกฎาคม 2544.** บุรีรัมย์: กรมวิชาการเกษตร.

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2544. **ปรับปรุงพันธุ์พืช: ความหลากหลายของแนวคิด.** กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 272 น.

กฤษณพงศ์ ศรีพงษ์พันธุ์กุล. 2543. การประยุกต์ใช้โมเลกุลเครื่องหมายสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืช. น. 15-22. ใน **รายงานการประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวประจำปี 2543.** นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

จำรัส โปร่งศิริวัฒนา. 2534. **ความรู้เรื่องข้าว.** กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร. 267 น.

ธีรยุทธ ตู้จินดา. 2544. บทบาทเทคโนโลยีในการพัฒนาพันธุ์ข้าวลูกผสม. น. 56-74. ใน **รายงานการประชุมแนวทางการวิจัยและพัฒนาข้าวลูกผสม วันที่ 9 เมษายน 2544.** กรุงเทพฯ: ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.

นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์. 2546. **เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์.** ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 261 น.

บริบูรณ์ สมฤทธิ์. 2541. **ข้าวลูกผสม สถานภาพและแนวทางการวิจัย และการพัฒนาของประเทศไทย.** กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร. 78 น.

____________. 2543. บทบาทของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) กับการพัฒนาและการใช้ประโยชน์ข้าวลูกผสมในเชิงพาณิชย์. น. 1-15. ใน **รายงานการประชุมข้าวลูกผสม วันที่ 26 ธันวาคม 2543.** กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร.

ภัคดี ลุศนันทน์. 2539. การพัฒนาข้าวและการทำนาในประเทศไทย. น. 5-23. ใน **เอกสารที่ระลึกครบรอบ 80 ปีศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี วันที่ 12-14 พฤศจิกายน 2539.** ปทุมธานี: สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สงกรานต์ จิตรากร และ บริบูรณ์ สมฤทธิ์. 2540. **วิทยาศาสตร์เทคโนโลยีกับข้าวไทย.** กรุงเทพฯ: ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 155 น.

สภาหอการค้าแห่งประเทศไทย. 2546. **ปริมาณการส่งออกข้าวของไทย ระหว่างปี 2542-2546 (มกราคม-กันยายน)**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.goa.go.th (12 พฤศจิกายน 2546).

สุชาติ นักปราชญ์ และบังอร สุทธิพงศ์เกียรติ์. 2545. โครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตข้าวลูกผสม. น. 43-52. ใน **รายงานการประชุมวิชาการประจำปี 2545. ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี ศูนย์วิจัยข้าวปราจีนบุรี และศูนย์วิจัยข้าวสุพรรณบุรี**: สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร.

สุวิตร บุษปะเวศ. 2541. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวนาสวนในประเทศไทย. น.10-28. ใน **ความก้าวหน้าการปรับปรุงพันธุ์พืชของกรมวิชาการเกษตร เล่มที่ 8. กรุงเทพฯ**: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545ก. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 282 น.

__________________. 2545ข. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 116 น.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2546. **สถิติการเพาะปลูก ผลผลิต และการส่งออกข้าว**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.oae.go.th (5 มกราคม 2546).

อัมมาร สยามวาลา และวิโรจน์ ณ ระนอง. 2533. **ประมวลความรู้เรื่องข้าว.** กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยเพื่อการพัฒนาประเทศไทย. 463 น.

Arus, P. 2000. Molecular Marker for Ornamental Breeding. **Acta. Hort** 508: 91-98.

Alagarswamy, S., M. Djanaquiraman, M.K. Kalaram and B.R. Chandra. 2004. Changes in activity of enzymes associated with fertility alternation in thermosensitive genic male sterilie (TGMS) rice (*Oryza sativa* L.) genotypes tropical. **Agricultural Research** 16:242-252.

Barge, R.S., S.D. Ugale, G.C. Shinde and S.S. Mehetre. 2002. Study of inheritance pattern of temperature sensitive genic male sterility in pear milet (*Pennisetum glaueum* (L.) R. Br.) **Res. On Crop** 3(2): 437-440.

Calpe, C. 2002. World rice situation and outlook 2001-2002. pp. 1-7. In **International Rice Commisssion Newsletter**. Rome, Italy: IRRI.

Devanand, P.S., M. Rangaswamy and H. Ikehashi. 2000. Identification of hybrid sterility gene loci in two cytoplasmic male sterility lines in rice. **Crop Science** 40(3): 640-646.

Dong, S.L., J.C. Li and S.S. Hak. 2005. Genetic characterization and fine mapping of a novel thermosensitive genic male sterility gene tms3 in rice. (*Oryza sativa* L.) **Heidelberg III** 7: 1271-1277.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin** 19: 11-15.

Gangashetti, M.G., K.K. Jena, V.V. Shehoy and H.F. Wayne. 2004. Inheritance of elongated uppermost internode and identification of RAPD markers linked to *eui* gene in rice. **Current Science** 87(4): 469-475.

Han, L.Z., P.Z. Duan, Y.Z. Zhi, K.Y. Wen, Z. Xin and I.M. Hui. 2001. Studies on the male fertility alternation photopreiod sensitive characters of Paiai 64S chief male genic sterile gene. **Crop Science** 41(1): 556-559.

Hussain, A.J., P. Arti, M.J. Ahmed and N.P. Sanna. 1998. pp. 21-25. Identifying molecular markers for the gene(s) governing thermosensitive genic male sterility in rice. In **International Rice Research Institute**. Manila, Philippins: IRRI.

IRRI. 1998. Annual report for 1998. pp. 11-12. In **International Rice Research Institute (IRRI).** Manila, Philippins: IRRI.

______. 2002. Standard evolution system for rice. pp. 11-12. In **International Rice Research Institute (IRRI).** Manila, Philippins: IRRI.

Kalaiyarasi, R. and P. Vaidyanathan. 2005. Sterility mechanism in different TGMS and CMS lines of rice. **Plant Breeding** 26(1): 11-17.

Khush, G.S. 1996. Rice breeding – status and challenges. pp. 16-29. In **Seminar on the 80th anniversary of Pathumthani rice research center**. Pathumthani, Thailand: IRRI.

Kinoshita, K. 2002. Gene symbols information on male sterility. **Rice Genetics III.** 540-544.

Kirubakaran, S. 2002. Prospect of two lines hybrid rice breeding in Tamil Nadu India. **Ann. Agric. Res.** 17(2): 27-32.

Latha, R., S. Senthilvel and K. Thiyagarajan. 2002. Critical temperature and stages of fertility altenation in thermo-sensitive genic male sterile lines of rice. **Crop Science** 43(1): 440-441.

Leila, G., S. Prabhu and C. Filippi. 2002. Identification of RAPD marker linked to blast resistance gene in a somaclon of rice cultivar agaguaia. **Fitopatol. Bras.** 27(2): 1121-1132.

Li, R. and M.P. Pandey. 2001. Genetic of thermosensitive genic male sterility trait in rice. **Current Science** 80(4): 481-482.

Li, R., M.P. Pandey and S. Pankai. 2005. Inheritance of thermosensitive genic male sterility in rice (*Oryza sativa L.*) **Current Science** 88(11): 1809-1815.

Lin, S.C., and L.P. Yuan. 1995. Hybrid rice breeding in China. pp. 35-51. In **Innovative Approaches in Rice Breeding.** Los Banos, Philippines: IRRI.

Mackay, I.J. and P.D.S. Caligari. 2000. Efficiencies of F2 and backcross generation for bulked segregant analysis using dominant markers. **Crop Breeding** 40: 626-630.

Maheswaran, M., D.J. Mackill, N. Huang, S.R. Screerangasamy and S.R. McCouch. 1986. Identification of RAPD markers linked to Se-3(t), a gene enhancing the level of photoperiod sensitivity in rice. **Crop Science** 29(3): 636-640.

Michelmore, R.W., I. Paran and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease- resistance gene in specific genomic region by using segregant population. **Proc. Natl. Acad.** 88(91): 9828-9832.

Peter, J. 1996. **Genetics.** New York: Collage Publisher. 400 p.

Pomper, K.W., A.N. Azaren, N. Bassil, S.W. Davis and S.A. Mehlenbacher. 1998. Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for self incompatibility alleles in *Corylos avellana* L. **Theor. Appl. Genet.** 98(97): 479-487.

Reena, B. and S.S. Vermani. 2000. Inheritance of a thermosensitive genic male-sterile mutant of Indica rice. pp. 92-95. In **International Rice Research Institute (IRRI).** Manila, Philippins: IRRI.

Reddy, O.U.K., T.A. Siddiq, J. Ali, A.J. Hussain and M.J. Abmed. 1998. Genetics of thermosensitive genic male sterile lines in rice. **Inr. Rice Res.** 23(10): 1142-1150.

Robert, P. 1992. **Genetics.** London: Chapman & Hall. 467 p.

Steve, A.Q., L.J. Vesna, K. Dragan, S. Andy and P. Sofija. 1999. Bulked segregant analysis with molecular marker and its use for improveing drought resistance in mize. **Experimental Botany** 50(337): 1299-1306.

Subudhi, P.K., R.P. Borkakati, S.S. Virmani and N. Hung. 1999. Identification of RAPD markers linked to rice thermosensitive genetic male sterility by bulked segregant analysis. **Plant Breeding** 122(4): 177-182.

Virmani, S.S. 2002. Advances in hybrid rice research and development. pp. 33-37. In **The Tropic 4th International Symposium on Hybrid Rice**. Hanoi: IRRI.

William, J.G., A.R. Kubeilik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitary primer are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Res.** 18: 6531-6535.

Yang, R.C., K. Liand, N. Wang and S. Hen 1992. A recessive gene in Indica rice 5460S for thermosensitive genic male sterility. **Rice Genet Newstetly** 9: 56-59.

Yuan, L.P. 2002. Recent progress in breeding super hybrid rice in China. pp. 14-17. In **Hybrid Rice 2nd FAO/DANIDA Seminar**. Bangkok, Thailand: IRRI.

Yuan, L.P. and X.Q. Fu. 1995. **Technology of Hybrid Rice Production.** Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nation. 84 p.

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยแม่โจ้
แม่โจ้ ๒๔๗๗
สำนักหอสมุด

วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

1. นำใบอ่อนของข้าว 0.2 กรัม ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น

2. นำใบข้าวมาบดละเอียดในโกร่งด้วย liquid nitrogen เทตัวอย่างข้าวลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ประมาณ 2 ใน 3 ของหลอดทดลอง เก็บที่อุณหภูมิ -80 °C

3. บ่ม CTAB buffer 600 μl ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ที่ 65 °C เป็นเวลา 45 นาที ดูด CTAB buffer ที่บ่มแล้วใส่ลงในหลอดทดลองที่มีใบข้าวจากการบดด้วย liquid nitrogen ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C

4. นำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 45 นาที และกลับหลอดเบาๆ ทุก 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5. เติม Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1) 600 μl (ต้องเติมใน fume hood) กลับหลอดไปมาแรงๆ ให้ละลายเข้ากัน และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

6. ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml ใหม่ และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม 7.5 Ammonium Acetate 120 μl และ 80% ethanol 800 μl และกลับหลอดเบาๆ เร็วๆ จะเห็นเป็นเส้นสาย DNA

7. ตกตะกอนดีเอ็นเอทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ -20 °C และนำไปปั่นตกที่ 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูดหรือเทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอ (pellet) ด้วย 70% ethanol โดยปั่นล้างที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทำ 2 รอบ และครั้งสุดท้ายดูด ethanol ออกให้มากที่สุด

8. ผึ่งดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง โดยเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง

9. ละลายดีเอ็นเอโดยเติม TE buffer 100 μl ดีเอ็นเอจะละลายมีลักษณะใส และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

10. ตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

11. ใช้ดีเอ็นเอ 3 μl : gel star 0.3 μl ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที และเติม loading dye 0.3 μl

12. เตรียม gel 1% โดยชั่ง agarose 1 g ผสมกับ 1 X TBE 100 ml นำไปใส่ไมโครเวฟ ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิ 60 °C จึงเทลง block ใส่ comb แล้วทิ้งไว้ให้แข็ง ระวังอย่าให้เกิดฟอง สังเกตว่า ถ้า gel มีสีขาวขุ่น แสดงว่า gel แข็งตัวสามารถใช้ได้ ควรทิ้งไว้อย่างน้อยประมาณ 30 นาที เท 1 X TBE ลงในถาดสักครู่ จึงค่อยๆ ดึง comb ออก

13. หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผสม gel star และ molecular weight marker ลงใน well ให้ครบ แล้วตั้ง set ค่าของเครื่อง electrophoresis โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 120 โวลต์ 100 แอมป์ เป็นเวลา 30 นาที และนำเจลไปส่องภายใต้แสง เพื่อตรวจสอบคุณภาพ และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นเท่ากันที่ 5 ng/µl จึงนำไปทำปฏิกิริยา PCR

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาว มัลลิกา จินดาซิงห์
เกิดเมื่อ	29 มิถุนายน 2524
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2541 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเศรษฐบุตรบำเพ็ญ จังหวัดกรุงเทพฯ พ.ศ. 2543 ประกาศนียบัตรวิชาชีพชั้นสูง พืชศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี พ.ศ. 2545 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ๒๔๗๗ สำนักหอสมุด