

การหาตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนควบคุมการเป็นหมันของเรณูข้าว
IR68301S (*Oryza sativa* L.) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ
Identification of DNA Markers Linked to *thermo-sensitive genic male sterile*
(*tms*) in Rice IR68301S (*Oryza sativa* L.)

ศุภธนา คล้ายมงคล^{1/, 2/} ศรีประไพพร ชาซอนแก่น^{3/} เกศินี พิศงาม^{3/} น้ำเพชร แสงอาวุธ^{3/} ณัฐจรรย์ ปัญญาอาวุธ^{3/}
ทิวาวรรณ วาสินานนท์^{3/} จรีรัตน์ มงคลศิริวัฒนา^{4/} จุลภาค คุ่นวงศ์^{1, 2, 5/} อมรทิพย์ เมืองพรหม^{1, 3/}
Sudthana Khlaimongkhon^{1/, 2/} Sriprapai Chakhonkaen^{3/} Keasinee Pitngam^{3/} Numphet Sangarwut^{3/}
Natjaree Panyawut^{3/} Thiwawan Wasinanon^{3/} Chareerat Mongkolsirawatana^{4/} Julapark Chunwongse^{1/, 2/, 5/}
Amorntip Muangprom^{1, 3/}

Received 12 Jun 2018/Revised 04 Sep 2019/Accepted 25 Mar 2019

ABSTRACT

Hybrid rice can increase yield of rice (*Oryza sativa* L.) which is the most important food crop in Thailand. Thermo-sensitive genic male sterility (TGMS) facilitates hybrid rice seed production. In this study, genetic analysis was conducted using F₂ populations derived from crosses between IR68301S, an *indica* TGMS rice line and IR 14632 a *japonica* rice line. The ratio between normal pollen and sterile pollen of F₂ plants was 3:1 indicating that TGMS trait was controlled by a single recessive gene. To identify markers linked to the *tms* gene, Bulked Segregant Analysis (BSA), simple sequence repeat (SSR) markers and insertion-deletion (InDel) markers were used. We found 12 SSR markers and 10 InDel markers closely associated with male sterile F₂ population. The results showed that the *tms* locus was located on chromosome 2 between SSR marker RM12676 and InDel marker 2gAP003974. The genetic distance from the *tms* gene to these two anking markers were 1.10 and 1.37 cM, respectively. The position of *tms* locus in IR68301S is not the same as that of *tms* locus in IR75589. These tightly linked markers will provide useful tools for marker assisted selection of this gene in rice breeding programs. Furthermore, the approximate position of this *tms* gene will be useful for further studying on molecular mechanism controlling pollen sterility.

Key words: Hybrid rice, TGMS, InDel, SSR, IR68301S

^{1/} Center of Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140 Thailand

^{2/} Center for Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE) Thailand

^{3/} National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Pathum Thani 12120 Thailand

^{4/} Division of Genetics, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand

^{5/} Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand

* Corresponding author, e-mail: Amorntip.mua@biotec.or.th

บทคัดย่อ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชอาหารหลักที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก ข้าวเรณูเป็นหมันเนื่องจากอุณหภูมิ (Thermo-sensitive Genic Male Sterility, TGMS) ได้นำมาใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสม ซึ่งสามารถทำได้ง่ายและมีประสิทธิภาพสูง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาตำแหน่งของยีน *tms* ในข้าว IR68301S เพื่อนำมาพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ สำหรับใช้คัดเลือกยีน *tms* โดยศึกษาพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะ TGMS ของประชากรรุ่น F_2 ของข้าวคูผสมระหว่างข้าวสายพันธุ์ IR68301S ซึ่งเป็นข้าว *indica* สายพันธุ์ TGMS และข้าวสายพันธุ์ปกติ IR 14632 เป็นข้าว *japonica* อัตราส่วนของประชากร F_2 ระหว่างต้นที่มีเรณูปกติและต้นที่มีเรณูเป็นหมัน คือ 3:1 แสดงให้เห็นว่าลักษณะ TGMS ถูกควบคุมด้วยแอลลีลด้อยของยีน 1 ตำแหน่ง (single recessive gene) การระบุตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมการเป็นหมันของเรณูข้าว (*tms*) นี้ ศึกษาโดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR และเครื่องหมายดีเอ็นเอ InDel ร่วมกับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี Bulked Segregant Analysis (BSA) ผลการศึกษาพบเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR จำนวน 12 เครื่องหมาย และเครื่องหมายดีเอ็นเอ InDel จำนวน 10 เครื่องหมายที่สามารถระบุตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมความเป็นหมันของเรณูข้าว IR68301S และพบว่า ตำแหน่งยีน *tms* อยู่บนโครโมโซมที่ 2 ระหว่างเครื่องหมาย SSR12676 (5.74 Mb) และเครื่องหมาย InDel2gAP003974 (6.00 Mb) โดยมีระยะระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับยีน *tms* คือ 1.10 และ 1.37 cM ตามลำดับ และยีน *tms* ในข้าว IR68301S เป็นยีนคนละตำแหน่งกับยีน *tms* ในข้าว IR75589 การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมการเป็นหมันของเรณูข้าว

สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกยีน *tms* ที่ควบคุมความเป็นหมันในข้าวสายพันธุ์นี้

คำสำคัญ: ข้าวลูกผสม เรณูเป็นหมันเนื่องจากอุณหภูมิ Indel, SSR, IR8301S

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นหนึ่งในพืชอาหารหลักที่ประชากรโลกนิยมบริโภค โดยเฉพาะประเทศไทย ข้าวถือเป็นอาหารหลักและเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญ แต่ผลผลิตข้าวต่อพื้นที่ปลูกของไทย ยังคงต่ำกว่าของประเทศเพื่อนบ้าน เช่น อินโดนีเซีย เวียดนาม มาเลเซีย ลาว และฟิลิปปินส์ (USDA, 2016) แนวโน้มการพัฒนาพันธุ์ข้าวเพื่อเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่เพาะปลูกข้าวมีทั้งในเชิงพาณิชย์และเชิงวิจัย จากภาครัฐและบริษัทเอกชน เทคโนโลยีข้าวลูกผสมเป็นหนึ่งในวิธีการเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่เพาะปลูก สามารถเพิ่มผลผลิตได้ถึง 20-30% ภายใต้ระบบชลประทานปกติ (Virmani, 2003) เมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสมที่ผลิตในเชิงพาณิชย์เปิดตัวออกสู่ท้องตลาดในประเทศจีนตั้งแต่ปี พ.ศ. 2519 (Cao and Zhan, 2014). ปัจจุบันมีหลายประเทศที่ใช้เทคโนโลยีข้าวลูกผสม ทำให้สามารถเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่ปลูกข้าวได้สูงขึ้น (Xie, 2011)

การผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสม สามารถทำได้หลายระบบ ที่สำคัญ ได้แก่ ลักษณะเรณูเป็นหมันซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของยีนในนิวเคลียสกับไซโทพลาซึม (cytoplasmic genetic male sterility; CMS) หรือการผลิตข้าวลูกผสมระบบสามทาง และลักษณะเรณูเป็นหมันซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของยีนในนิวเคลียส หรือระบบสองทาง ซึ่งระบบนี้การเป็นหมันของเรณู เกิดเนื่องจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (environmentally sensitive genic male sterility; EGMS) ที่สำคัญ ได้แก่ ลักษณะการเป็นหมันถูกควบคุมด้วยอุณหภูมิ

(temperature-sensitive genic malesterility; TGMS) และลักษณะการเป็นหมันถูกควบคุมด้วยช่วงแสง (photoperiod sensitive genic male sterility; PGMS) ที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิวิกฤต (critical sterility point temperature) ข้าว TGMS จะแสดงลักษณะเรณูเป็นหมันที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิวิกฤต ข้าว TGMS จะติดเมล็ดได้ดี ส่วนข้าว PGMS นั้นถ้าอยู่ในสภาพวันยาว ข้าว PGMS จะแสดงลักษณะเรณูเป็นหมันและกลับมาติดเมล็ดได้ดีในช่วงวันสั้น การค้นพบ PGMS และ TGMS ได้นำไปสู่การพัฒนาาระบบข้าวลูกผสมระบบสองทองที่สามารถทำได้ง่ายและมีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสม นอกจากนี้ได้มีการศึกษาตำแหน่งที่ตั้งบนโครโมโซมของข้าวของยีน EGMS หลายยีน ได้แก่ *tms1* (Wang *et al.*, 1995), *tms2* (Pitnjam *et al.*, 2008), *tms3* (Lang *et al.*, 1999), *tms4* (Dong *et al.*, 2000), *tms5* (Zhou *et al.*, 2014), *tms9* (Sheng *et al.*, 2013), *pms1* (Zhou *et al.*, 2011), *pms2* (Zhang *et al.*, 1994), and *pms3* (Ding *et al.*, 2012).

ข้าว IR68301S เป็นข้าว TGMS ที่มีลักษณะทางกายภาพคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ไทย และสามารถเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมของไทย และไม่ไวต่อช่วงแสง สามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี ดังนั้น จึงสามารถใช้เป็นสายพันธุ์แม่ในการผลิตเมล็ดข้าวลูกผสมได้ในอนาคต การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาตำแหน่งของยีน *tms* ในข้าว IR68301S เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ สำหรับใช้คัดเลือกยีนนี้ โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับใช้ช่วยคัดเลือก (marker assisted selection) ลักษณะ TGMS ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พันธุ์ข้าว

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา คือ ข้าว *indica* TGMS IR68301S (B2) เป็นข้าวพันธุ์แม่ ซึ่งเป็นข้าวสายพันธุ์เรณูเป็นหมัน ที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) สาธารณรัฐฟิลิปปินส์ โดยข้าวสายพันธุ์นี้จะเป็นหมันเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ($\geq 28^{\circ}\text{C}$) แต่จะติดเมล็ดได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ ($22-26^{\circ}\text{C}$) และ ข้าว *japonica* IR 14632 (B30) เป็นข้าวพันธุ์พ่อซึ่งเป็นข้าวเรณูปกติ

2. เครื่องหมายดีเอ็นเอ

2.1 เครื่องหมาย InDel ออกแบบไพรเมอร์ชนิดที่เกิดจากการแทรกเพิ่ม (insertion) หรือการขาดหาย (deletion) ของลำดับเบส (InDel) โดยใช้ฐานข้อมูลลำดับเบสบนจีโนมของข้าว GRAMENE (<http://www.gramene.org>) และคัดเลือกจากลำดับเบสที่อยู่บนโครโมโซมที่ 2 ในตำแหน่ง ที่มี insertion หรือ deletion มากกว่า 5 คู่เบสขึ้นไป ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Primer 3 (<http://workbench.sdsc.edu>) และใช้เครื่องหมาย InDel ที่มีการออกแบบไว้แล้วในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งหมดเป็นจำนวน 242 คู่ไพรเมอร์

2.2 เครื่องหมาย SSR คัดเลือกมาจาก McCouch *et al.* (2002) โดยคัดเลือกเครื่องหมายจากทุกโครโมโซม ในตำแหน่ง short arm ของโครโมโซมลงมา ทำการคัดเลือกมาทั้งหมด 119 คู่ไพรเมอร์

3. พันธุ์ข้าวที่ใช้สร้างประชากร F_2 และการศึกษาเรณูข้าวภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.1 การผสมข้าวเพื่อสร้างประชากร

ข้าวประชากร F₂ ที่นำมาใช้ศึกษาดำแหน่งที่ตั้งของยีน *tms* สร้างมาจาก ข้าวพันธุ์แม่ คือ TGMS IR68301S (B2) เป็นข้าว *indica* ผสมกับข้าวพันธุ์พ่อ คือ IR 14632 (B30) เป็นข้าว *japonica* ที่มีลักษณะเรณูปกติ เมื่อได้ประชากร F₁ ได้ปล่อยให้ผสมตัวเองจนได้ประชากร F₂ แล้วจึงนำประชากร F₂ นี้ มาปลูกในแปลงทดสอบเพื่อใช้ในการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอ และตรวจสอบพีโนไทป์ โดยปลูกในช่วงเดือนมกราคม ถึง มีนาคม พ.ศ. 2554

3.2 การศึกษาเรณูข้าวภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เมื่อดอกข้าวเริ่มบาน ตรวจสอบเรณูข้าว โดยแยกต้นข้าวที่เป็นหมันและไม่เป็นหมันออกจากกัน โดยดูลักษณะของเรณูด้วยตาเปล่า และนำมาตรวจสอบอย่างละเอียดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยทำการย้อมสีเรณูด้วยไอโอดีน-โพแทสเซียมไอโอไดด์ จากนั้นเก็บตัวอย่างใบข้าวในประชากร F₂ เฉพาะต้นที่มีเรณูเป็นหมันทำการวิเคราะห์หาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้กับยีน

4. ศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีนที่ควบคุมความเป็นหมันของเรณู ในข้าว IR68301S

จึงใช้วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติ ไค-สแควร์ (chi-square) ระหว่างต้นที่เรณูเป็นหมัน และเรณูปกติ ในประชากร F₂ เพื่อให้ทราบว่ายีนที่ควบคุมความเป็นหมันของเรณู ในข้าว IR68301S มีการข่มในลักษณะใด โดยคำนวณจากสูตรดังนี้ (สุรินทร์, 2539)

$$\chi^2 = \sum (O - E)^2 / E$$

เมื่อ O = จำนวนต้นที่เรณูทั้งที่เป็นหมันและไม่เป็นหมันจากประชากร F₂

E = ค่าที่คาดหวัง หรือค่าที่ควรจะเป็นของต้นที่เรณูเป็นหมัน และไม่เป็นหมันจากประชากร F₂

\sum = ผลรวมของจำนวนต้นที่เรณูเป็นหมัน และไม่เป็นหมันในประชากร F₂

ค่า χ^2 ที่คำนวณได้ นำไปเทียบกับค่าในตาราง ตาม degree of freedom (df) ถ้าค่า χ^2 ที่คำนวณได้น้อยกว่าค่า χ^2 ในตาราง ที่ p = 0.05 แสดงว่ายีนที่ควบคุมเรณูเป็นหมัน เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ แต่ถ้าค่าของ χ^2 ที่คำนวณได้เท่ากับหรือสูงกว่าค่า χ^2 ในตารางที่ p = 0.05 ถือว่า ยีนที่ควบคุมเรณูเป็นหมัน ไม่เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้

5. การค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีน *tms* ในข้าว IR68301S

5.1 สกัดดีเอ็นเอจากใบของข้าวที่เรณูเป็นหมันในประชากร F₂ แต่ละต้นด้วยวิธี CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) (Murray and Thomson, 1980) ทำการคัดเลือกหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ ที่อยู่ใกล้กับยีน *tms* ด้วยวิธีการ Bulked Segregant Analysis (BSA) โดยการทดสอบหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ และดีเอ็นเอรวมจากต้นที่เรณูเป็นหมัน 20 ต้น และต้นที่เรณูปกติ จำนวน 20 ต้น เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ และดีเอ็นเอรวมจากต้นเรณูเป็นหมันและต้นเรณูปกติ ได้นำจีโนมไทป์ต้นเป็นหมันแต่ละต้นมาใช้

5.2 นำไพรเมอร์ SSR และ InDel ไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) ทดสอบกับดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ ดีเอ็นเอรวมจากต้นเรณูเป็นหมัน และดีเอ็นเอรวมจากต้นเรณูปกติ โดยใช้ไพรเมอร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ทำตามวิธีของ Pitnjam *et al.* (2008) นำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์มาตรวจสอบโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis)

ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 3% และในเจลอะคริลลาไมด์ (acrylamide) 6% ผลที่ได้ใช้คัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ และดีเอ็นเอรวมจากต้นเรณูเป็นหมัน และต้นเรณูปกติเพื่อนำมาใช้เป็นจีโนไทป์ต้นเป็นหมันแต่ละต้น เพื่อวิเคราะห์ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ และยีน *tms*

5.3 การคำนวณระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอและตำแหน่งของยีน *tms* โดยการจีโนไทป์ต้นเป็นหมันจากประชากร F_2 แต่ละต้น ผลที่ได้นำมาใช้หาระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับยีน *tms* โดยคำนวณระยะห่าง จากสูตร (Peng et al., 2010)

$$C = (N1+N2/2)/N$$

เมื่อ: C คือ ความถี่ในการเกิดรีคอมบิเนชัน

N คือ จำนวนตัวอย่าง F_2 ที่เป็นเรณูหมันทั้งหมด

N1 คือ จำนวนต้นเรณูเป็นหมันที่มีรูปแบบแถบดีเอ็นเอแบบฮอโมไซกัสเหมือนพ่อ

N2 คือ จำนวนตัวอย่างที่มีรูปแบบแถบดีเอ็นเอแบบเฮเทอโรไซกัส

ความถี่ในการเกิดรีคอมบิเนชัน จะคำนวณกลับเป็นเซนติมอร์แกน (centimorgan, cM)

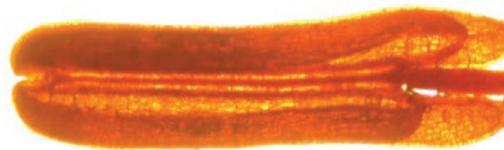
6. การศึกษาตำแหน่งยีน *tms* ในข้าว IR68301S เปรียบเทียบกับตำแหน่งยีน *tms* ในข้าว IR75589

นำเครื่องหมายดีเอ็นเอ 2gAP003974 2gAP005756 และ 2gAP004070 ที่ใกล้กับยีน *tms* ในข้าว IR75589 (ชนิษฐาและคณะ, 2012) มาวิเคราะห์ในกลุ่มประชากร F_2 ($B2 \times B30$) โดยนำมาใช้จีโนไทป์ต้นเป็นหมันแต่ละต้น และวิเคราะห์ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวกับยีน *tms* ในข้าว IR68301S การคำนวณระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอและตำแหน่งของยีน *tms* ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.3

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเปรียบเทียบเรณูข้าวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระหว่างลักษณะเรณูปกติและเรณูเป็นหมัน

จากการศึกษาเรณูของข้าวสายพันธุ์ TGMS ที่ปลูกในห้องควบคุมอุณหภูมิ ภายใต้สภาวะที่เรณูปกติ (อุณหภูมิ $24 \pm 2^\circ\text{C}$) และเรณูเป็นหมัน (อุณหภูมิ $32 \pm 2^\circ\text{C}$) โดยการสังเกตด้วยสายตา พบว่า เรณูเป็นหมันจะมีลักษณะสีขาว มีขนาดเล็ก เนื่องจากไม่มีละอองเรณูภายใน ขณะที่เรณูปกติจะมีสีเหลือง เนื่องจากมีละอองเรณูภายในที่มีสีเหลือง และขนาดใหญ่กว่าเรณูหมัน เมื่อนำอับเรณูของข้าวสายพันธุ์ TGMS มาย้อมด้วยไอโอดีน-โพแทสเซียมไอโอดेट์ และส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เรณูที่เกิดจากต้นที่ปลูกภายใต้ อุณหภูมิ $24 \pm 2^\circ\text{C}$. ติดสีดำเข้มทั้งอับเรณู ในขณะที่อับเรณูของข้าว TGMS ที่เกิดจากต้นที่ปลูกภายใต้ อุณหภูมิ $32 \pm 2^\circ\text{C}$. จะย้อมไม่ติดสีและไม่มีละอองเรณู (Figure 1) แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นมีอิทธิพลต่อการทำให้ข้าว TGMS กลายเป็นหมัน



TGMS mutant grown under high temperature ($32 \pm 2^\circ\text{C}$)



TGMS mutant grown under lower temperature ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$)

Figure 1 Pollen staining of the TGMS mutant plants. Bars=500 m

2. การถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมของเรณูเป็นหมันเนื่องจากอุณหภูมิ (TGMS)

จากการศึกษาที่มีอิทธิพลต่อการเป็นหมันของเรณูข้าว โดยปลูกประชากร F_2 ที่เป็นลูกผสมระหว่าง B2 กับ B30 ในแปลงทดลองภายใต้อุณหภูมิที่ส่งเสริมให้เกิดความเป็นหมันของเรณูข้าว พบว่า อัตราส่วนต้นปกติ (700) ต่อต้นที่เป็นหมัน (217) คือ 3:1 จากการคำนวณค่า Chi-square ของอัตราส่วนประชากร F_2 โดยมีค่า χ^2 ที่คำนวณได้ (0.91) น้อยกว่าค่า χ^2 ในตาราง ที่ $p = 0.05$ (3.84) (Table 1) แสดงให้เห็นว่ายีนที่มีอิทธิพลต่อการเป็นหมันของเรณูข้าว TGMS IR68301S (B2) ถูกควบคุมด้วยแอลลีลด้อย 1 ตำแหน่ง (single recessive gene) สอดคล้องกับกฎของเมนเดล และรายงานก่อนหน้านี้ (Borkakati and Virmani 1996; Dong et al. 2000; Sheng et al., 2013)

Table 1 Segregation patterns for fertility and sterility of the F_2 populations

F_2 populations	Total	Fertile individuals	Sterile individuals	Fertile/sterile (ratio)	χ^2
B2 x B30	917	700	217	3.22/1	0.91

$$\chi^2_{0.05} = 3.84$$

3. การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมการเป็นหมันของเรณูข้าว TGMS IR68301S

จากการทดสอบเครื่องหมาย SSR จำนวน 119 เครื่องหมาย และเครื่องหมายดีเอ็นเอ InDel จำนวนทั้งสิ้น 242 เครื่องหมาย โดยวิธี BSA เพื่อหาเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างระหว่างพ่อแม่และดีเอ็นเอรวมจากต้น F_2 (B2 x B30) เรณูเป็นหมันและเรณูปกติ (Figure 2)

โดยต้นที่แสดงลักษณะเรณูปกติ จะปรากฏแถบดีเอ็นเอได้สองรูปแบบ คือแบบ heterozygous (lane1) และ homozygous dominant (lane 2) ส่วนต้นที่แสดงลักษณะเรณูเป็นหมัน จะปรากฏแถบดีเอ็นเอได้รูปแบบเดียว คือ homozygous recessive (lane 3, 4) เนื่องจากการกระจายตัวตามกฎเมนเดลของประชากร F_2 จากการศึกษาพบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 53 เครื่องหมายให้ความแตกต่างระหว่างพ่อแม่ และดีเอ็นเอรวม

จากต้น F₂ เรณูเป็นหมันและเรณูปกติ เมื่อนำทั้ง 53 เครื่องหมาย มาทดสอบกับประชากร F₂ ต้นที่มีเรณูเป็นหมัน พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 22 เครื่องหมายลิงค์ (linkage) กับลักษณะเป็นหมันของเรณูข้าว (Table 2) การใช้ข้อมูลจากฐานข้อมูล GRAMENE พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 22 เครื่องหมายนี้อยู่บนโครโมโซมที่ 2 ที่ตำแหน่ง 4.19 Mb ถึง 7.44 Mb. โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 22 เครื่องหมายนี้ประกอบด้วย เครื่องหมาย SSR จำนวน 12 เครื่องหมาย พบที่ตำแหน่ง 4.19 ถึง 5.74 Mb ได้แก่ RM12557, RM4355, RM12593, RM12601, RM7638, RM12632, RM12649, RM12655, RM5664,

RM6378, RM12674 และ RM12676 และ เครื่องหมายดีเอ็นเอ InDel จำนวนทั้งสิ้น 10 เครื่องหมาย พบที่ตำแหน่ง 5.67 ถึง 7.44 Mb ได้แก่ 2gAP004869, 2gAP003974, 2gAP004085, 2gAP004086, Os02g12300, Os02g12350, Os02g12370, 2gAP005394, 2gAP005756 และ 2gAP004070 ซึ่งมาร์คเกอร์ InDel ที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ มีลักษณะเฉพาะเจาะจงกับยีนหรือตำแหน่งที่แน่นอนเพียง 1 ตำแหน่งบนโครโมโซม แตกต่างจากมาร์คเกอร์ SSR ซึ่งอาจมีได้หลายตำแหน่ง ดังนั้น มาร์คเกอร์ InDel เหล่านี้ จะให้ผลที่แม่นยำ และเมื่อทำซ้ำ จะให้ผลที่แน่นอนดีกว่า

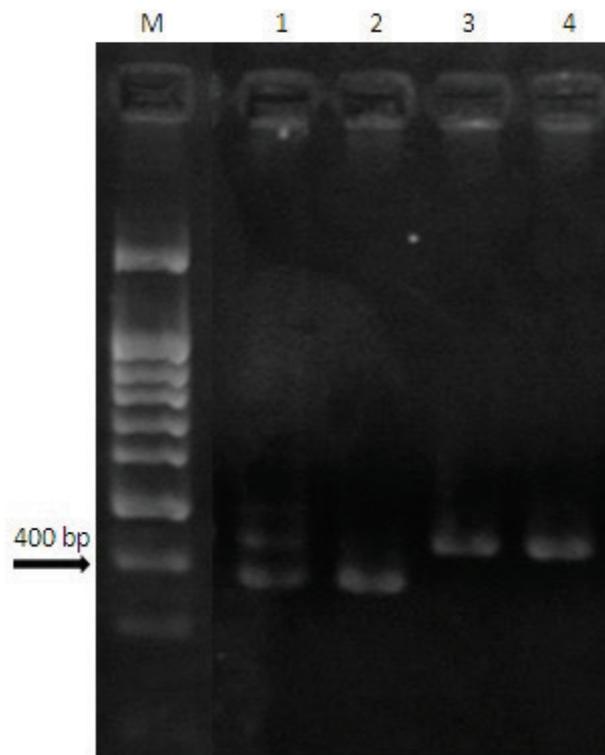


Figure 2 The result of sample of bulk segregation analysis by linkage marker 2gAP004085. The linked marker showed heterozygous (lane 1) and dominant homozygous (lane 2) bands on fertile plant and showed recessive homozygous band (lane 3, 4) on sterile plant. M = 100 bp DNA ladder. Lane 1; Bulk fertile 20 plants. Lane 2;The male parent B30. Lane 3; The female parent B2. Lane 4; Bulk sterile 20 plants

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า มียีนที่ถูกควบคุมด้วยสภาพแวดล้อม หรือยีน EGMS หลายยีนของข้าว *indica* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 2 ได้แก่ *tms4* (Dong *et al.*, 2000), *tms5* (Zhou *et al.*, 2014), *tmsX* (Peng *et al.*, 2010), *tms9* (Sheng *et al.*, 2013) และ *ptgms 2-1* (Xu *et al.*, 2011). จะเห็นได้ว่ามี *tms* ยีนหลากหลายที่ควบคุมการเป็นหมันของเรณูข้าว

สายพันธุ์ต่าง ๆ ยีน *tms* ในข้าว IR68301S นี้ ยังไม่เคยมีรายงาน แม้ว่าตำแหน่งที่พบจะอยู่ในบริเวณใกล้เคียงกับยีนอื่น ๆ แต่ก็แตกต่างจากที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ ดังนั้น ยีนที่ควบคุมความเป็นหมันของเรณูในข้าว IR68301S อาจเป็นหนึ่งในยีนเหล่านี้ หรือเป็นยีนใหม่ที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน จึงควรทำการวิจัยเพื่อหาตำแหน่งที่แคบลงของยีนนี้ต่อไป

Table 2 Markers on chromosome 2 linked to the *tms* gene using F₂ male sterile plants from B2×B30

Marker	Forward primers (5–3)	Reverse primers (5–3)	Position (Mb)
RM12557	AGCACCACCTCCTCGAACTCC	CAACCCTACCTTGCTTCTTCTTGC	4.19
RM4355	GGGATGAGAGTAGAAGGCACAAGG	GCTTAATGCCTTTGATCGTTGC	4.26
RM12593	ACAATACGCTGTGCCAATCTGC	TATTGGCCGTGATGATGAAGTGC	4.57
RM12601	GCGAACTCGACGACTACTCAACC	CACAACGTCGTCTCCAAGTGC	4.69
RM7638	GGCTGTCCGTCTTGTAGTGAGAAGC	TCCTTGCAACTTCCGGAGACC	4.86
RM12632	GGCTTTATTTGTTCTGGCCTTGTGG	CCAAATCAAATGGGTCTTTGTGC	5.08
RM12649	TTGAGGTAGGGCACGAGGTCTGG	AATCCGAATGGGACCGAATCACC	5.25
RM12655	AGGACCAATCCAAAGCGTTTAGC	CCTGCAGTAGATTGCATTGAACC	5.34
RM5664	GTTCCGGCTCCACCTAAACCAAGC	GGCATTCTGTCTCGTCTTTGAGG	5.37
RM6378	CTGATCATCTCATGCCTCCTACG	TCCATCTCCCAATATGACCAACC	5.47
2gAP004869	AGCTTAAACATATTGGCTGCACG	TAGCCAAGCACGTATACACTCCC	5.67
RM12674	TAAATGCCAACCAACTCCAAGC	AACTGCGTTTGGGAATATCTCG	5.68
RM12676	ACTGACGATTGGGCACATTATTCC	CTGCAAATTGGTGGGTGATTGC	5.74
2gAP003974	CAATTCGGAGATTACATTCGGTC	ACTATAGACGCAGCTTGTGTGCC	6.0
2gAP004085	TGGCAACTAATAGGCATCGTCG	TCTTGTAGCTGCAACATCCCCC	6.26
2gAP004086	TCAAGCAATCACAACCCCTTCC	GGCTACCCAAACCATGCATCA	6.28
Os02g12300	TCCCATTTAATTTGGTTCATCG	GCTAACGTGCGTGGATTGAG	6.40
Os02g12350	TCCATCTGCAAATCCATAGCA	TCTGGTGCATAGCTGCTGGT	6.42
Os02g12370	ACTTATGCGGTGGTCAAGCA	TTGTTCTCCACGGCTGATA	6.44
2gAP005394	TGCAAACAGTTGGATTAGCTTGA	TGACAGTGCCTTATCTTCCATA	7.17
2gAP005756	AATTCATTGGACGCACACACAT	TGCATTGGGAAATTGAAAAGATT	7.26
2gAP004070	ATGGTGCCGGATAACGTATTACA	GGCTTGCGGTAAGAATATAGGAGA	7.44

4. ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับยีน *tms* ในข้าว IR68301S

การวิเคราะห์หาระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับ ยีน *tms* ได้นำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างทั้ง 22 เครื่องหมายมาทดสอบกับประชากร F₂ (B2×B30) ต้นที่เป็นหมันจำนวน 217 ต้น พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR RM4355 ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่ง 4.26 Mb เป็นตัวแทนแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายนี้ยังมีระยะที่ห่างจากยีน *tms* (Figure 3) เนื่องจากยังเกิดรีคอมบิเนชัน เครื่องหมายนี้แสดงรูปแบบดีเอ็นเอ 3 รูปแบบ ได้แก่ แบบ 1) wild type (lane 11) แบบ 2) mutant (lane 2-10, 12-16) และ แบบ

3) heterozygous (lane 17-18) ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ ที่เข้าใกล้ยีน *tms* มากยิ่งขึ้นจะให้ผลจำนวนต้นที่เกิดรีคอมบิเนชันลดลง ซึ่งทุกต้นเป็นหมันที่ทดสอบ จะแสดงลักษณะดีเอ็นเอเป็นแบบ mutant เมื่อคำนวณระยะห่างของยีน *tms* จากการเกิดรีคอมบิเนชัน พบว่า ยีน *tms* อยู่ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR RM12676 และ เครื่องหมายดีเอ็นเอ InDel 2gAP003974 ที่ตำแหน่ง 5.74 Mb และ 6.0 Mb บนโครโมโซมที่ 2 โดยมีระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับยีน *tms* เท่ากับ 1.10 และ 1.37 เซนติมอร์แกน (cM) ตามลำดับ

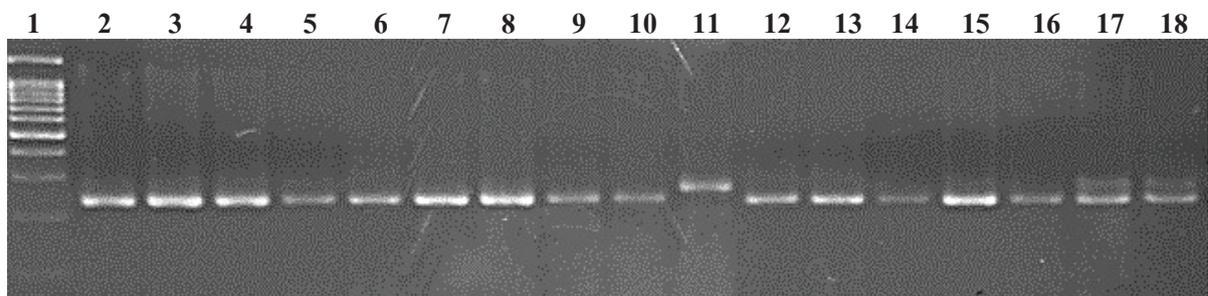


Figure 3 Samples of genotyping F₂ male sterile plants using RM4355 marker. Lane 1: Marker, Lane 2-9, 12-18: the F₂ male sterile individuals of B2×B30 (*indica* × *japonica* population), Lane 10;The female parent (B2). Lane 11; The male parent (B30); Wild type DNA band showed in lane 11; mutant DNA band showed in lane 2-10 and 12-16; heterozygous DNA band showed in lane 17-18

5. เปรียบเทียบตำแหน่งยีน *tms* ในข้าว IR68301S กับยีน *tms* ในข้าว IR75589

การทดสอบว่ายีน *tms* ในข้าว IR68301S เป็นยีนตำแหน่งเดียวกันหรือไม่กับยีน *tms* ในข้าว IR75589 พบว่า *tms* ในข้าว IR75589 เครื่องหมายดีเอ็นเอ 2gAP003974 มีระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับยีน *tms* ในข้าว IR68301S เท่ากับ 1.37 cM เครื่องหมายดีเอ็นเอ

2gAP005756 ห่างยีน *tms* เท่ากับ 3.57 cM. และ เครื่องหมายดีเอ็นเอ 2gAP004070 ห่างยีน *tms* เท่ากับ 5.21 cM (Figure 4) ขณะที่ ชนิษฐา และคณะ (2012) ได้รายงานไว้ว่า ยีน *tms* ในข้าว IR75589 ห่างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ 2gAP003974 2gAP005756 และเครื่องหมาย 2gAP004070 เท่ากับ 0.4 2.4 และ 4.5 cM ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเป็นยีนคนละตำแหน่งกัน

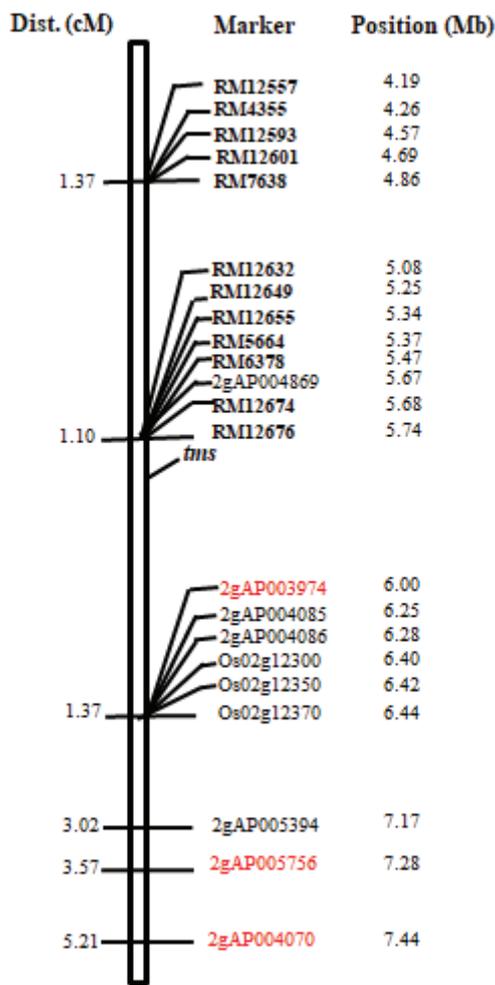


Figure 4 Genetic linkage map of the thermo-sensitive genic male sterility gene, TGMS in IR68301S(*tms*), based on male sterile F₂ populations generated from B2×B30. SSR markers are showed in bold font and InDel markers are showed in regular font. The linked markers of *tms* gene in IR75589 showed in red color

ยีน EGMS อื่น ๆ ในข้าว *indica* ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 2 ได้แก่ *tms4*, *tms5*, *tmsX*, *tms9*, และ *ptgms2-1* โดยตำแหน่งของยีน *tms4* รายงานระบุว่าอยู่บน short arm ของโครโมโซม

ที่ 2 (Dong *et al.*, 2000) ส่วนยีน *tms5* (Zhou *et al.*, 2014), *tmsX* (Peng *et al.*, 2010) , *tms9* (Sheng *et al.*, 2013) และ *ptgms2-1* (Xu *et al.*, 2011) ตั้งอยู่ระหว่าง 6.23 Mb ถึง 6.59 Mb ซึ่งต่างจากตำแหน่งของยีน *tms-B2* ในข้าวใน IR68301S ที่ตั้งอยู่ระหว่างตำแหน่ง 5.74-6.0 Mb เครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้ สามารถใช้ประโยชน์ในการคัดเลือก ลักษณะ TGMS (marker assisted selection) ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าว

สรุปผลการทดลอง

การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของเรณูเป็นหมันเนื่องจากอุณหภูมิของข้าว TGMS สายพันธุ์ IR68301S พบว่า อัตราส่วนประชากร F₂ ที่ได้จากการผสมระหว่าง ข้าวพันธุ์แม่ คือ TGMS IR68301S (B2) เป็นข้าว *indica* ผสมกับข้าวพันธุ์พ่อ คือ IR 14632 (B30) เป็นข้าว *japonica* มีอัตราส่วน 3:1 แสดงให้เห็นว่ายีนที่มีอิทธิพลต่อการเป็นหมันของละอองเรณูข้าว TGMS ถูกควบคุมด้วยแอลลีลด้อยของยีน 1 ตำแหน่ง และ พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าว TGMS และข้าวสายพันธุ์ปกติมีจำนวน 22 เครื่องหมาย โดยแบ่งเป็นเครื่องหมาย SSR จำนวน 12 เครื่องหมาย และเครื่องหมาย InDel จำนวน 10 เครื่องหมาย และเมื่อนำมาใช้ในการหาระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับยีน *tms* จากการวิเคราะห์ด้วยประชากร F₂ (B2 x B30) เฉพาะต้นที่เรณูเป็นหมัน พบว่า ยีน *tms* อยู่บนโครโมโซมที่ 2 และอยู่ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM12676 ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่ง 5.74 Mb อยู่ห่างจากยีน *tms* 1.1cM และ 2gAP003974 ที่ตำแหน่ง 6.0 Mb มีระยะห่างจากยีน 1.37 cM นอกจากนี้ ยังพบว่าตำแหน่งของ ยีน *tms* ในข้าว IR68301 S เป็นยีนคนละ

ตำแหน่งกับยีน *tms* ในข้าว IR75589 เครื่องหมายเหล่านี้ จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาข้าวลูกผสมแบบ 2 ทาง เพื่อเพิ่มผลผลิตข้าวในอนาคตและองค์ความรู้ที่ได้อาจใช้ประโยชน์ในการหายีนที่ควบคุมลักษณะTGMS ต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์ ขอบขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ได้ให้การสนับสนุนและช่วยเหลืองาน ในห้องปฏิบัติการ เพื่อทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ชนิษฐา แสงสว่าง สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล จีร์รัตน์ มงคลศิริวัฒนา และอมรทิพย์ เมืองพรหม. 2012. การหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับยีนที่มีอิทธิพลต่อการเป็นหมันของเรณูเนื่องจากอุณหภูมิสูงในข้าว (*Oryza sativa* L.). *Thai J. Genet* 5(1) : 50-56.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2539. *พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น*. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 272หน้า.

Borkakati R.P. and S.S. Virmani.1996. Genetics of thermosensitive genic male sterility in rice. *Euphytica*. 88: 1-7.

Cao L. and X. Zhan. 2014. *Chinese experiences in breeding three-line,*

two-line and super hybrid rice, Rice - Germplasm, Genetics and Improvement.

- Ding J.; Q. Lu; Y. Ouyang; H. Mao; P. Zhang; J. Yao; C. Xu; X. Li; J. Xiao; and Q. Zhang. 2012. A long noncoding RNA regulates photoperiod-sensitive male sterility, an essential component of hybrid rice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109(7): 2654-2659.
- Dong N.V.; P.K. Subudhi; P.N. Luong; V.D. Quang; T.D. Quy; H.G. Zheng; B. Wang; and H.T. Nguyen. 2000. Molecular mapping of a rice gene conditioning thermo-sensitive genic male sterility using AFLP, RFLP and SSR techniques. *Theor Appl Genet*.100(5): 727-734.
- Lang N.T.; P.K. Subudhi.; S.S. Virmani; D.S. Brar; G.S. Khush; Z. Li; and N. Huang. 1999. Development of PCR-based markers for thermosensitive genetic male sterility gene *tms3(t)* in rice (*Oryza sativa* L.). *Hereditas*. 131(2): 121-127.
- McCouch S.R.; L. Teytelman; Y. Xu; K.B. Lobos.; K. Clare; M. Walton; B. Fu; R. Maghirang; Z. Li; Y. Xing; Q. Zhang; I. Kono; M. Yano; R. Fjellstrom; G. Declerck; D. Schneider ; S. Cartinhour; D. Ware; and L. Stein. 2002 Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res*. 9(6): 199-207.
- Murray M.G.; and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Res*. 8(19):4321-4325.

- Peng H.F.; X.H. Chen; Y.P. Lu.; Y.F. Peng; B.H. Wan; N.D. Chen; B. Wu; S.P. Xin; and G.Q. Zhang. 2010. Fine mapping of a gene for non-pollen type thermosensitive genic male sterility in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet.* 120(5):1013-1020.
- Pitnjam K., S. Chakhonkaen; T. Toojinda; and A. Muangprom. 2008. Identification of a deletion in *tms2* and development of gene-based markers for selection. *Planta.* 228(5):813–822
- Sheng Z., X. Wei; G. Shao; M. Chen; J. Song; S. Tang; J. Luo; Y. Hu; P. Hu; and L. Chen. 2013. Genetic analysis and ne mapping of *tms9*, a novel thermosensitive genic male-sterile gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Breeding.* 132(2):159–164.
- USDA. 2016. World Agricultural Production. Available at: <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/fas/worldag-production//2010s/2016/worldag-production-11-09-2016.pdf>. Accessed: November 16, 2016.
- Virmani S.S. 2003. Advances in hybrid rice research and development in the tropics. pp 7–20. In: Virmani SS, Mao CX, Hardy B (eds) Hybrid rice for food security, poverty alleviation, and environmental protection. *Proceedings of the 4th International Symposium on Hybrid Rice, 14-17 May 2002*, Hanoi, Vietnam. Los Baos (Philippines): International Rice Research Institute.
- Wang B., W.W. Xu; J.Z. Wang; W. Wu; H.G. Zheng; Z.Y. Yang; J.D. Ray; and H.T. Nguyen. 1995. Tagging and mapping the thermo-sensitive genic male-sterile gene in rice (*Oryza sativa*) with molecular markers. *Theor Appl Genet.* 91(6-7):1111–1114.
- Xie F. 2011. *Hybrid rice R&D program at IRRI*. IRRI Dec 12–13. Sanya, China.
- Xu J., B. Wang; Y. Wu; P. Du; J. Wang; M. Wang; C. Yi; M. Gu; and G. Liang. 2011. Fine mapping and candidate gene analysis of *ptgms2-1*, the photoperiod-thermo-sensitive genic male sterile gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Ther Appl Genet.* 122(2):365–372.
- Zhang Q.; B.Z. Shen; X.K. Dai; M.H. Mei; M.A. Saghai and Z.B. Li. 1994. Using bulked extremes and recessive classes to map genes for photoperiod-sensitive genic male sterility in rice. *Proc Natl Sci.* 91(18):8675-8679.
- Zhou Y.F.; X.Y. Zhang; and Q.Z. Xue. 2011. Fine mapping and candidate gene prediction of the photoperiod and thermo-sensitive genic male sterile gene *pms1(t)* in rice. *J Zhejiang Univ-Sci B.* 12:436–447.
- Zhou H.; M. Zhou; Y. Yang; J. Li; L. Zhu; D. Jiang; J. Dong; Q. Liu; L. Gu; L. Zhou; M. Feng; P. Qin; X. Hu; C. Song; J. Shi; X. Song; E. Ni; X. Wu; Q. Deng; Z. Liu; M. Chen; Y. Liu; X. Cao; and C. Zhuang. 2014. RNase Z^{S1} processes UbL40 mRNAs and controls thermosensitive genic male sterility in rice. *Nat Commun.* 5: 4884. doi:10.1038/ncomms5884