



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์	พันธุศาสตร์
สาขา	ภาควิชา
เรื่อง	การระบุตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนควบคุมการเป็นหมันของเรณูข้าว (<i>Oryza sativa</i> L.) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ
	Identification of DNA Markers Linked to the Temperature-Sensitive Genic Male Sterility Gene in Rice (<i>Oryza sativa</i> L.)
นามผู้วิจัย	นางสาวชนิษฐา แสงสว่าง
ได้พิจารณาเห็นชอบโดย	
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	(รองศาสตราจารย์สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, Dr.Agr.)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(อาจารย์อ้อมรทิพย์ เมืองพรหม, Ph.D.)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(อาจารย์จริรัตน์ มงคลศิริวัฒนา, ป.ร.ค.)
หัวหน้าภาควิชา	(รองศาสตราจารย์สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช, Dr.Agr.Sci.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การระบุตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนควบคุมการเป็นหมัน
ของเรณูข้าว (*Oryza sativa* L.) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

Identification of DNA Markers Linked to the Temperature-Sensitive Genic
Male Sterility Gene in Rice (*Oryza sativa* L.)

โดย

นางสาวนิษฐา แสงสว่าง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อขอความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

พ.ศ. 2555

ขนิษฐา แสงสว่าง 2555: การระบุตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนควบคุมการเป็น
หมันของเรณูข้าว (*Oryza sativa* L.) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ปริญญาวิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, Dr.Agr. 44 หน้า

ข้าวลูกผสม สามารถให้ผลผลิตสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่มากกว่า 20% การผลิตข้าวลูกผสมแบบ
2 ทาง มีข้อดีคือ สะดวก รวดเร็ว มีพ่อแม่พันธุ์ที่หลากหลาย ใช้ต้นทุนราคาถูกกว่าลูกผสมแบบสามทาง
การเป็นหมันของเรณูที่เกิดจากการแสดงออกของยีนในนิวเคลียสที่ถูกควบคุมโดยอุณหภูมิ (thermo-
sensitive genic male sterility, TGMS) ปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกการทำงานของยีนที่ทำให้เรณูเป็น
หมันอย่างชัดเจน ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการผสมข้าวที่มีเรณูเป็นหมันสายพันธุ์ TGMS B8 (IR75589)
กับข้าวพันธุ์ปกติ Azucena และ B7 (IR73834) กับ B30 (IR14632-2-3) ลักษณะของลูก F₂ พบว่าได้
อัตราส่วนของต้นปกติ : ต้นที่มีเรณูเป็นหมันเท่ากับ 3 : 1 เป็นไปตามกฎของเมนเดล แสดงว่าลักษณะ
ของเรณูเป็นหมันนี้ควบคุมด้วยแอลลีลคู่ของยีน 1 ตำแหน่ง คัดเลือก F₂ เฉพาะต้นที่มีเรณูเป็นหมัน
นำมาหาแผนที่ยีนเรณูเป็นหมัน โดยพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel marker จำนวน 84
เครื่องหมาย นำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง 10 เครื่องหมาย ทดสอบกับประชากร F₂ ทั้ง 2
กลุ่ม วิเคราะห์ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ คาดว่ายีน *tgms* น่าจะอยู่ระหว่างเครื่องหมาย
ดีเอ็นเอ Os02g12050 ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่ง 6.25 Mb และ Os02g12350 ที่ตำแหน่ง 6.45 Mb บนโครโมโซม
คู่ที่ 2 ช่วงระยะห่างระหว่าง 2 เครื่องหมายนี้ประมาณ 200 กิโลเบส การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่
ใกล้กับยีนควบคุมการเป็นหมันของเรณูข้าวนี้ จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งกับการพัฒนาข้าวลูกผสมต่อไป

ลายมือชื่อนิติ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Kanidta Sangsawang 2012: Identification of DNA Markers Linked to the Temperature-Sensitive Genic Male Sterility Gene in Rice (*Oryza sativa* L.). Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Associate Professor Surin Peyachoknagul, Dr.Agr. 44 pages.

Hybrid rice can produce about 20% higher yield than the inbred rice varieties. Main advantages of using two-line system in hybrid rice production are simplicity, cost effectiveness and ability to use a wider range of parent lines than three-line system. Temperature sensitive genic male sterility (TGMS) in maternal line is a result of the expression of genes in the nucleus which are controlled by temperature (thermo-sensitive genic male sterility; TGMS). However, a mechanism and position of *tgms* genes are still unclear. In this study, Two TGMS line were crossed with 2 wild type rice varieties (B8xAzucena and B7xB30) to produce the F₂ populations. The ratios of normal and male sterile F₂ in both crosses were 3 : 1 following Mendelian principles indicated that the TGMS character was inherited by recessive allele of a single gene. The DNA markers linked to *tgms* genes were also identified using Insertion/Deletion (Indel) markers. A total of 84 Indel markers, 10 polymorphic markers were obtained and mapped in selected sterile individuals from two population of F₂ hybrids from TGMS and wild type inbreds. The results suggested that *tgms* gene was mapped to the interval between Os02g12050 and Os02g12350 markers which were located within 200 kb apart on chromosome 2. The linked markers obtained from this study will be further useful for plant breeding.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร์ ปิยะโชคณากุลที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
เป็นอย่างสูง ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา และช่วยแนะนำแนวทางในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ ดร.อมรทิพย์ เมืองพรหม ที่ให้ความรู้และการช่วยเหลือ แนะนำและชี้แนะ
แก้ไขปัญหาข้อบกพร่องต่างๆในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ ให้ความสะดวกและประสบการณ์ต่างๆ ใน
การทำปฏิบัติการที่ห้องวิจัย

ขอขอบพระคุณ ดร.จรีรัตน์ มงคลศิริวัฒนา ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ทั้งทางด้านการเรียน
และการทำงานวิจัย ให้ลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณสมาชิกในห้องปฏิบัติการอนุพันธุศาสตร์พืช ศูนย์พันธุวิศวกรรมและ
เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่คอยช่วยเหลือเป็นอย่างดี

ท้ายที่สุด ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และบรรดาญาติพี่น้องทุกท่าน ที่คอยเป็นกำลังใจ
ให้การสนับสนุนช่วยเหลือทางด้านการศึกษาด้วยดีมาตลอด ผู้วิจัยขอความรู้ที่ได้รับจากทุกท่านไป
ใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

ชนิษฐา แสงสว่าง

พฤษภาคม 2555

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	16
ผลและวิจารณ์	19
สรุป	30
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	31
ภาคผนวก	38
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	44

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	รายงานการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอของข้าว TGMS และ PGMS	14
2	ข้าวพันธุ์แม่ที่ใช้ในงานวิจัย	16
3	ข้าวพันธุ์พ่อที่ใช้ในงานวิจัย	16
4	แสดงอัตราส่วนของประชากร F_2 ระหว่างต้นที่มีเรณูเป็นหมันและต้นที่มีเรณูปกติ	23
5	เครื่องหมายดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 2 ที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าว TGMS และข้าวพันธุ์ปกติ ซึ่งนำมาใช้ในการหาระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ประชากร F_2	24
6	ผลการตรวจสอบประชากร F_2 ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งหมด	26
ตารางผนวกที่		
1	เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าว TGMS และข้าวพันธุ์ปกติที่ใช้ในการหาระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ประชากร F_2	39
2	เครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีน <i>tgms</i> จากข้าว ID24 ที่พัฒนาขึ้นทั้งหมดเพื่อคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าว TGMS และข้าวพันธุ์ปกติ	40

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การเปรียบเทียบลักษณะของข้าว TGMS line B7 (IR73834) (ซ้าย) F ₁ TGMS line B7 (IR73834) x IR14632-2-3 (B30) (กลาง) และ IR14632-2-3 (B30) (ขวา) เมื่อมีอายุได้ 84 วัน	19
2 ลูก F ₁ ของกลุ่มผสม TGMS line B8 (IR75589) x Azucena (ก) และประชากร F ₂ ของกลุ่มผสมระหว่าง TGMS line B8 (IR75589) x Azucena (ข)	20
3 การเปรียบเทียบอับเรณูระหว่างข้าวที่มีลักษณะละอองเรณูปกติ (ก) และลักษณะละอองเรณูเป็นหมัน (ข)	21
4 การเปรียบเทียบละอองเรณูระหว่างลักษณะละอองเรณูปกติ (ก) และลักษณะละอองเรณูเป็นหมัน (ข)	21
5 การเปรียบเทียบขนาดของอับเรณูระหว่างลักษณะอับเรณูปกติ (ขวา) และลักษณะอับเรณูเป็นหมัน (ซ้าย)	22
6 การเปรียบเทียบละอองเรณูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระหว่างลักษณะละอองเรณูปกติและลักษณะละอองเรณูเป็นหมัน	22
7 การวิเคราะห์ประชากร F ₂ (B8xAzucena) ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ 2gAP003974 M = marker, P ₁ = B8, P ₂ = Azucena, 1-25 คือลูก F ₂	25
8 การวิเคราะห์ประชากร F ₂ (B7xB30) ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ os02g12370 M = marker, P ₁ = B7, P ₂ = B30, 1-25 คือลูก F ₂	26
9 แผนที่แสดงตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 10 เครื่องหมายบนโครโมโซมคู่ที่ 2 จากการวิเคราะห์ด้วยประชากร F ₂ (B8xAzucena)	28
10 แผนที่แสดงตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 10 เครื่องหมายบนโครโมโซมคู่ที่ 2 จากการวิเคราะห์ด้วยประชากร F ₂ (B7xB30)	28
11 แสดงช่วงของตำแหน่งยีน <i>tgms</i> จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 2 ด้วยประชากรทั้ง 2 ประชากร	29

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A	=	male sterile line
B	=	maintainer line
bp	=	base pair
CMS	=	cytoplasmic male sterility
CSPT	=	critical sterility point temperature
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
EGMS	=	environment-condition genic male sterility
Indels	=	insertion-deletion
DIPs	=	deletion-insertion polymorphisms
MAS	=	marker assisted selection
MS	=	male sterility
P ₁	=	parental 1
P ₂	=	parental 2
PGMS	=	photoperiod sensitive genic male sterility
PTGMS	=	photoperiod and thermo-sensitive genic male sterility
R	=	restorer line
rPGMS	=	reverse temperature sensitive genic male sterility
rTGMS	=	reverse temperature sensitive genic male sterility
SNP	=	single nucleotide polymorphisms
TGMS	=	thermo-sensitive genic male sterility

การระบุตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนควบคุมการเป็นหมัน
ของเรณูข้าว (*Oryza sativa* L.) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

Identification of DNA Markers Linked to the Temperature-Sensitive Genic
Male Sterility Gene in Rice (*Oryza sativa* L.)

คำนำ

ประชากรโลกมีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการเพิ่มขึ้นของอาหาร ซึ่งเป็นแบบค่อยเป็นค่อยไป ทำให้เกิดความไม่สมดุลและเกิดปัญหาจำนวนประชากรที่มากขึ้นกว่าจำนวนอาหารที่ผลิตได้ ข้าวเป็นอาหารหลักของประชากรส่วนใหญ่ในโลก พบว่าผลผลิตที่ได้ในปัจจุบันยังไม่เพียงพอต่อความต้องการบริโภค การเพิ่มผลผลิตของข้าวจึงเป็นทางเลือกในการแก้ไขปัญหาการขาดแคลนอาหาร จึงได้มีการพัฒนาเทคโนโลยี การผลิตข้าวลูกผสม (hybrid rice) ที่สามารถให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ทั่วไปมากกว่า 20% (Chen *et al.*, 2009) นอกจากนี้ข้อดีทางด้านผลผลิตที่เพิ่มขึ้นแล้ว ลักษณะของระบบรากที่แข็งแรง ความสามารถในการแตกกอ รวงที่มีขนาดใหญ่กว่าและยังมีน้ำหนักเมล็ดมากกว่า ทั้งนี้ยังลดการใช้สารเคมีและปุ๋ย เพราะข้าวลูกผสมมีความต้านทานโรคและแมลงศัตรูด้วย (วรวิทย์, 2533) แต่เนื่องจากข้าวเป็นพืชผสมตัวเอง การสร้างข้าวลูกผสมจึงมีความยุ่งยาก เทคโนโลยีการผลิตข้าวลูกผสมที่นิยมทำกันคือ ข้าวลูกผสมแบบสองทางและข้าวลูกผสมแบบสามทาง ระบบการผลิตข้าวลูกผสมแบบสามทาง (three-line breeding system) เป็นระบบที่ใช้ต้นทุนสูง ซับซ้อน และมีข้อจำกัดของพันธุ์ maintainer และ restorer ทางเลือกที่จะใช้แก้ปัญหาข้อจำกัดของข้าวลูกผสมแบบสามทาง คือการใช้พันธุ์ข้าวที่เป็น photoperiod-sensitive genic male sterility (PGMS) และ thermo-sensitive genic male sterility (TGMS) ในการผลิตข้าวลูกผสมแบบสองทาง (two-line breeding system) ซึ่งเป็นระบบการผลิตข้าวที่ให้ผลผลิตสูง ใช้ต้นทุนต่ำ สะดวกและรวดเร็วกว่าการผลิตข้าวลูกผสมแบบสามทาง ในปัจจุบันมีการใช้สายพันธุ์ PGMS และ TGMS อย่างกว้างขวาง (Peng *et al.*, 2009a) โดยทำให้เรณูเป็นหมัน ภายใต้อุณหภูมิวันยาว หรืออุณหภูมิสูง โดยเรณูจะไม่เป็นหมันสามารถติดเมล็ดได้ในสภาพวันสั้นหรืออุณหภูมิต่ำ ตามลำดับ

การปรับปรุงพันธุ์ในอดีตต้องใช้เวลานาน ตัวช่วยที่จะทำให้การปรับปรุงพันธุ์สะดวกและรวดเร็ว คือ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ลักษณะต่างๆ มีความจำเพาะ

เจาะจง สามารถตรวจสอบความแตกต่างในระดับของยีนที่มีความถูกต้องแม่นยำสูง ปัจจุบันมีการ
หาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมการเป็นหมันของเรณูอันเนื่องมาจากอุณหภูมิหลายยีน จากงานวิจัยที่
ผ่านมาได้มีการศึกษายีน *tgms* ในข้าว ID 24 พบเครื่องหมายดีเอ็นเอห่างจากยีน 1.3 เซนติเมอร์แกน
(จีนจิตร, 2551) แต่ยังไม่รู้ทิศทางที่แน่นอน จึงมีความจำเป็นต้องหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่ง
ใกล้กับยีนมากขึ้นเพื่อความถูกต้องแม่นยำในการปรับปรุงพันธุ์ ในการพัฒนาข้าวลูกผสมใน
ประเทศไทยต่อไป



วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้กับยีน *tgms* ในข้าว ID24 สำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว



การตรวจเอกสาร

การปรับปรุงพันธุ์พืช

การปรับปรุงพันธุ์พืชมีวัตถุประสงค์สำคัญ 2 ประการ คือ 1) เพื่อเพิ่มผลผลิต (yield) และองค์ประกอบของผลผลิต เช่น การเพิ่มจำนวนรวงต่อกอ และ 2) เพื่อปรับปรุงคุณภาพ (quality) เช่นความต้านทานต่อโรคและแมลง (คำเนิน, 2545)

ในสภาพธรรมชาติ ประชากรพืชผสมตัวเองประกอบด้วยสายพันธุ์แท้ที่หลากหลาย ความแปรปรวนทางพันธุกรรมอาจเกิดขึ้นได้บ้าง เนื่องจากการผสมข้ามและการกลายพันธุ์ของยีน แต่สภาพแตกต่างทางพันธุกรรมของสายพันธุ์เหล่านี้ จะกลับเข้าสู่สภาพคงตัวทางพันธุกรรมในที่สุดเนื่องจากการผสมตัวเอง การปรับปรุงพันธุ์พืชผสมตัวเองนั้น จะเน้นไปที่การปรับปรุงสายพันธุ์แท้เพื่อนำไปใช้โดยตรงหรือผลิตพันธุ์ลูกผสม ถ้าหากพืชนั้นๆสามารถทำให้มีการผสมข้ามที่เหมาะสม และคุ้มค่าในเชิงเศรษฐกิจ ลูกผสมที่ดีควรต้องมีความสม่ำเสมอสูง ลูกผสมดังกล่าวจำเป็นต้องมาจากสายพันธุ์พ่อแม่ที่มีความสม่ำเสมอทางพันธุกรรมสูง วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์แท้ของพืชผสมตัวเอง ได้นำมาประยุกต์ใช้กับพืชผสมข้ามอย่างกว้างขวาง จะต่างกันก็เพียงเล็กน้อย เพื่อให้เหมาะกับการใช้กับพืชแต่ละชนิด ดังนั้นวิธีปรับปรุงสายพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน จึงสามารถประยุกต์ใช้ได้ทั้งในพืชผสมตัวเองและพืชผสมข้าม เพียงแต่ในพืชผสมข้ามแต่ละชนิดต้องมีเทคนิคในการผสมตัวเองที่เหมาะสม (กฤษฎา, 2551) การคัดเลือกพันธุ์เป็นพื้นฐานของการปรับปรุงพันธุ์ที่สำคัญ เนื่องจากพืชทั่วไปจะมีลักษณะดีและไม่ดีปะปนกันอยู่ การปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถทำได้โดยวิธีผสมพันธุ์ แล้วจึงคัดเลือกลูกผสมด้วยวิธีต่างๆ คือ

1. การคัดเลือกสายพันธุ์บริสุทธิ์ (pure line selection) pure line คือ พันธุ์ที่เป็นพันธุ์แท้ การคัดเลือกลูกจากฮอโมไซกัสเดี่ยว (single homozygous) ซึ่งสามารถสร้างขึ้นได้โดยเพิ่มจำนวนลูกที่ได้จากการผสมตัวเอง พันธุกรรมของพืชจะมีความสม่ำเสมอมากกว่าการคัดเลือกแบบ mass selection (วิทยา, 2527)

2. การคัดเลือกรวม (mass selection) การปรับปรุงพันธุ์พืชผสมตัวเอง โดยวิธีการคัดเลือกรวมนั้นมีขอบเขตจำกัด โดยพิจารณาจากลักษณะใดลักษณะหนึ่งจะทำให้ได้พืชสายพันธุ์บริสุทธิ์ภายในระยะเวลาอันสั้น โดยเริ่มจากปลูกพืชในแปลงใหญ่แล้วคัดทั้งต้นพืชที่ไม่ต้องการ แล้วเก็บเกี่ยวเฉพาะต้นที่คัดเลือก พันธุ์ที่ได้จะกลายเป็นพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงแล้ว หากทำซ้ำก็จะได้

พันธุ์ที่ดีขึ้น โดยจะขึ้นอยู่กับความแปรปรวนในสายพันธุ์ ความสามารถของนักปรับปรุงพันธุ์ และวิธีการนำพืชที่ได้รับการคัดเลือกมารวมกันเป็นพันธุ์ที่ดี (สุทัศน์, 2552)

3. การคัดเลือกโดยบันทึกพันธุประวัติ (pedigree method) เป็นการบันทึกข้อมูลของสายพันธุ์ และลูกหลานในชั่วรุ่นต่อไป โดยนำแต่ละพันธุ์ในชั่วรุ่นที่ 1 ไปปลูก และดูแลแยกกันในช่วงลูกหลาน และบันทึกข้อมูลที่เป็นไว้ เช่น ความแข็งแรง ความสูง วันออกดอก ความต้านทานโรคและแมลง หรือลักษณะอื่นที่อาจเป็นประโยชน์ (สุทัศน์, 2552)

4. การคัดพันธุ์เก็บรวม (bulk method) เป็นวิธีเก็บรวม โดยเก็บเกี่ยวพืชในชั่วรุ่นที่ 2 มารวมกัน และปลูกในปริมาณที่มากพอที่จะเป็นตัวแทนของประชากรทั้งหมด (กฤษฎา, 2519) เพื่อคัดเลือกลักษณะที่ต้องการนำไปปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

การผสมกลับ (backcross method) เป็นวิธีปรับปรุงพันธุ์อีกแบบหนึ่ง ทำได้โดยการนำเอาลูกผสมที่ได้รับ ผสมกลับไปหาพ่อหรือแม่ เพื่อต้องการเพิ่มลักษณะใดลักษณะหนึ่ง เข้าไปในพันธุ์ที่เห็นว่ายดีอยู่แล้ว (กฤษฎา, 2519) เป็นวิธีปรับปรุงพันธุ์พืชเพียงวิธีเดียว ที่สามารถคาดคะเนผลที่จะได้รับ และสามารถดำเนินการผสมกลับซ้ำหลายๆครั้งได้ เป็นวิธีที่นิยมใช้ทั้งในพืชที่พวกผสมตัวเอง และพวกผสมข้ามมักใช้ในกรณีที่มีพันธุ์ดีอยู่แล้ว แต่พันธุ์นั้นยังขาดลักษณะใดลักษณะหนึ่งอยู่ แต่ลักษณะที่ขาดควรเป็นลักษณะเชิงคุณภาพที่ควบคุมด้วยยีนน้อยคู่ ถ้าพันธุ์ A เป็นพันธุ์ดี ให้ผลผลิตสูง แต่ไม่ต้านทานโรคนิดหนึ่ง ส่วนพันธุ์ B มีลักษณะต้านทานโรคนั้น แต่ลักษณะอื่นไม่ดีนัก การปรับปรุงพันธุ์ A ให้ต้านทานโรคทำได้โดยวิธีผสมกลับ โดยผสมพันธุ์ A กับพันธุ์ B ลูกผสมที่ได้ผสมกลับไปยังพันธุ์ A หลายๆ ครั้ง การผสมกลับแต่ละครั้ง จะเลือกเอาต้นที่แสดงลักษณะต้านทานโรคเท่านั้น ในที่สุดจะได้พันธุ์ที่มีลักษณะต่างๆ เหมือนพันธุ์ A และมีลักษณะต้านทานโรคจากพันธุ์ B ด้วย ซึ่งเรียกพันธุ์ B ว่าพันธุ์ให้ (donor parent) และ พันธุ์ A เป็นพันธุ์รับ (recurrent parent) (สุทัศน์, 2552)

พืชผสมตัวเอง (self pollinated crop)

พืชจำพวกนี้ถึงแม้จะเรียกว่าพืชผสมตัวเอง ก็ผสมระหว่างจีโนไทป์ (genotype) ที่เหมือนกัน แต่ก็อาจมีการผสมข้ามเกิดขึ้นในธรรมชาติ 4-5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนมากพบในพืชที่มีดอกแบบสมบูรณ์เพศ หรือดอกไม้สมบูรณ์เพศของพืชกลุ่มที่มีดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่บนต้นเดียวกัน สาเหตุที่ทำให้พืชผสมตัวเองได้แก่

1. ไม่มีการบานของกลีบดอกหรือส่วนอื่นที่ทำหน้าที่ห่อหุ้มเกสรทั้ง 2 เพศ หรือเกสรเพศเมีย พร้อมรับการผสมเมื่อเกสรเพศผู้แก่และฟุ้งกระจายในขณะที่กลีบดอกยังปิดอยู่ (cleistogamy) เช่น ข้าว สาลี และหญ้าไร่

2. กลีบดอกบานเมื่อเกสรทั้ง 2 เพศ พร้อมจะผสมพันธุ์ (receptive) แล้วยังปิดอยู่ เช่น ถั่วต่างๆ และข้าว

3. โครงสร้างของดอกไม้เอื้ออำนวยให้ผสมข้าม เช่น เกสรทั้ง 2 เพศ ถูกปกคลุมด้วย ส่วนประกอบของดอกในขณะที่ยังปิดบาน ยอดเกสรเพศเมียอยู่ต่ำและอับเรณูเพศผู้เบียดกันแน่น กัน ละอองเกสรจากดอกอื่นที่จะตกลงมายังยอดเกสรเพศเมีย (นพพร, 2543)

การปรับปรุงพันธุ์พืชผสมตัวเอง

พืชผสมตัวเองพันธุ์พื้นเมือง (landraces or native varieties) หรือพันธุ์ป่า (wild types) นั้นมี ขอบเขตและข้อจำกัดในการให้ผลผลิต ทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพ ความต้านทานโรค แมลง ศัตรูพืช ที่สำคัญบางชนิด (economic disease and insect pest resistance) ตลอดจนความทนทานต่อ สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมบางอย่าง (stress condition tolerance) ดังนั้นข้อจำกัดดังกล่าวนี้ จึงเป็น สาเหตุสำคัญในการชักนำเข้าสู่วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืช

โดยทั่วไปหลักการที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชทั้งในพืชผสมตัวเอง (self pollinated crop) และ พืชผสมข้าม (cross pollinated crop) นั้นเหมือนกัน แต่แตกต่างในวิธีการผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ หลักการที่ใช้ได้แก่

1. การนำพันธุ์พืชจากแหล่งอื่นเข้ามาปลูก (introduction)
2. การคัดเลือกพันธุ์พืชจากประชากรที่มีอยู่แล้ว (selection)
3. การผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์จากลูกผสม (hybridization and secection)
4. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induced mutation)
5. การใช้เทคโนโลยีชีวภาพและพันธุวิศวกรรม (biotechnology and genetic engineering approach) (บุญหงษ์, 2548)

การผลิตลูกผสม

ลูกผสม (hybrid) ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์แท้ สามารถแบ่งได้ดังนี้คือ

1. ลูกผสมเดี่ยว (single cross) คือลูกผสม F_1 ที่ได้จากการผสมระหว่าง 2 สายพันธุ์จะมีลักษณะและคุณสมบัติต่างๆ สม่าเสมอกันดีมาก (วิทยา, 2527)
2. ลูกผสมคู่ (double cross) คือลูกผสมที่เกิดจากการผสมของลูกผสมเดี่ยว 2 คู่ จึงได้มาจากสายพันธุ์แท้ 4 สายพันธุ์ (ธงไชย, 2536)
3. ลูกผสมสามทาง (three way cross) เป็นการผสมระหว่างลูกผสมเดี่ยวกับสายพันธุ์แท้ อีก 1 สายพันธุ์ มีความสม่ำเสมอน้อยกว่าลูกผสมเดี่ยว (ศิริพร, 2547)
4. ลูกผสมหลายสายพันธุ์ (multiple cross) ลูกผสมที่เกิดจากสายพันธุ์แท้มากกว่า 4 สายพันธุ์ ไม่ค่อยนิยมในเชิงการค้า เพราะผลผลิตที่ได้ไม่คุ้มกับต้นทุน (สุทัศน์, 2552)

ในประเทศไทยมีพืชลูกผสม เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ไม้ดอกไม้ประดับ ทานตะวัน กำลังได้รับความสนใจจากเกษตรกรมาก จะเห็นได้จากปริมาณการผลิต และการจำหน่ายเมล็ดพันธุ์ลูกผสมของบริษัทเมล็ดพันธุ์ต่างๆ เพิ่มขึ้นทุกปี แต่ข้อเสียของลูกผสม คือ ไม่สามารถเก็บเมล็ดลูกผสมใช้ทำพันธุ์ต่อไปได้ เมื่อนำไปปลูกผลผลิตจะลดต่ำลงมาก (สุทัศน์, 2552)

ข้าวลูกผสม คือประชากรชั่วที่ 1 ที่ได้จากการผสมระหว่างพ่อแม่ 2 พันธุ์ ที่มีพันธุกรรมไม่เหมือนกัน จะแสดงความแข็งแรงในการเจริญเติบโต ระบบรากที่แข็งแรง ความสามารถในการแตกกอ ความสามารถในการให้ผลผลิต ความต้านทานต่อสภาพแวดล้อม คุณภาพของเมล็ด ความเข้มข้นในการสังเคราะห์แสงสูงและลักษณะอื่นๆ ที่ดีกว่าพ่อแม่ทั้งสอง ซึ่งเกิดจากปรากฏการณ์ heterosis โดยทั่วไปจะแสดงออกเกี่ยวกับลักษณะปริมาณ (quantitative character) เช่น ผลผลิตของเมล็ด น้ำหนักของเมล็ด ความสูงของต้น จำนวนรวงต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อรวง เป็นต้น (วรวิทย์, 2533)

ข้อได้เปรียบในการใช้ประโยชน์ของข้าวลูกผสม

1. ในการผสมชั่วที่ 1 ลักษณะรูปร่างของลูกผสมมักจะดีขึ้น เป็นผลมาจากการรวมกันของลักษณะที่ดีส่งเสริมในทางสรีรวิทยา จากการผสมพันธุ์พ่อแม่ 2 พันธุ์ จะมีลักษณะที่ส่งเสริมกัน และมีพันธุกรรมที่ประกอบขึ้นไม่เหมือนกัน ดังนั้น จึงค่อนข้างง่าย ที่จะพัฒนาคู่ผสม (combination) ให้ผลผลิตสูง

2. ความต้านทานโรคและแมลงของข้าว ส่วนใหญ่จะถ่ายทอดในลักษณะข่มหรือข่มไม่สมบูรณ์ เมื่อพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ พันธุ์ใดพันธุ์หนึ่งมีความต้านทานโรคหรือแมลงบางอย่าง ลูกผสมชั่วที่ 1 จะมีความต้านทานโรคหรือแมลงนี้ในขอบเขตหนึ่งด้วย ดังนั้นความสามารถในการให้ผลผลิตสูง อาจทำได้ง่าย ๆ โดยการรวมความต้านทานหลายๆ อย่างเข้าด้วยกัน

3. การเปรียบเทียบสายพันธุ์บริสุทธิ์ ลูกผสมชั่วที่ 1 จะมีพื้นฐานทางพันธุกรรมที่กว้างขวางกว่า ปรับตัวเองเข้ากับสิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้ดีกว่า และมีความต้านทานสภาพแวดล้อมที่แปรผันได้ดีกว่า ดังนั้น คู่ผสมของลูกผสมที่ดีเยี่ยมสามารถนำไปใช้ได้กว้างขวางมากกว่าและแพร่ขยายไปได้มาก เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์พื้นเมืองที่ดีเยี่ยม (วรวิทย์, 2533)

การผสมพันธุ์ข้าว ข้าวเป็นพืชผสมตัวเองตามธรรมชาติ มีการผสมข้ามน้อยกว่า 1% ดอกข้าวเป็นดอกสมบูรณ์เพศ (perfect flower) คือ มีเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียอยู่ภายในดอก เดียวกัน การเลือกสายพันธุ์แม่นั้น เลือกที่ดอกยังไม่บาน กำจัดเรณู (emasculation) ของพันธุ์ที่จะใช้เป็นต้นแม่ โดยใช้กรรไกรตัดส่วนของปลายกลีบดอกออกยาวหนึ่งในสามถึงครึ่งหนึ่ง แล้วใช้ปากคีบดึงเรณูออก เป็นการทำลายเรณูในช่อ เริ่มจากดอกที่ยังอ่อน สังเกตได้จากเรณูยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของดอกแสดงว่ายังอ่อน ตัดเรณูของดอกนั้นทิ้ง เมื่อเตรียมดอกตัวเมียเสร็จแล้ว จึงคลุมด้วยถุงกระดาษไข ในวันรุ่งขึ้นหลังจากตัดเรณูของสายพันธุ์แม่แล้ว จึงตัดช่อดอกที่กำลังบานของพันธุ์ที่ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อมาใส่ในดอกที่ถูกตัดเรณูออกแล้ว (เจริญศักดิ์ และ พิรศักดิ์, 2539) ซึ่งการผสมพันธุ์แบบนี้มีหลายขั้นตอน วิธีที่สามารถทำได้โดยง่าย คือทำให้เรณูของสายพันธุ์แม่เป็นหมันจะทำให้ไม่ต้องเสียแรงงานและเวลาในการกำจัดเรณูของสายพันธุ์แม่ โดยเฉพาะในพืชที่มีขนาดของดอกเล็ก เช่น ข้าว ข้าวสาลี และหอมหัวใหญ่ เป็นต้น (ธงไชย, 2536)

ลักษณะเรณูเป็นหมัน (male sterility)

ลักษณะเรณูเป็นหมัน เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้พืชผสมตัวเองไม่ติดเมล็ดเช่นเดียวกับลักษณะ incompatibility แต่ incompatibility มีลักษณะที่แตกต่างไป กล่าวคือ ทั้งละอองเรณูและรังนั้นก็มีลักษณะปกติ การผสมไม่ติดเกิดจากลักษณะทางสรีระที่ทำให้ละอองเรณูไม่สามารถงอกลงไปผสมกับไข่ได้ ส่วนลักษณะเรณูเป็นหมัน (male sterility) นั้นเกิดจากเซลล์สืบพันธุ์ผิดปกติ ซึ่งอาจเกิดจากความผิดปกติของโครโมโซม (chromosome aberration) ปฏิกริยาของยีนหรือไซโทพลาซึม ทำให้ส่วนของเรณู หรือเกสรเพศผู้ผิดปกติไป หรือทำให้ละอองเรณูและเอ็มบริโอไม่พัฒนาตามปกติ ในการปรับปรุงพันธุ์พืชลักษณะเรณูเป็นหมันนับว่ามีความสำคัญ และมีประโยชน์มาก ลักษณะเรณูเป็นหมัน เกิดขึ้นเป็นครั้งคราวตามธรรมชาติในประชากรของพืชผสมตัวเองและพืชผสมข้าม ต่างจากลักษณะ incompatibility ซึ่งเป็นลักษณะประจำพันธุ์ของพืชบางชนิด ลักษณะเรณูเป็นหมันนี้ อาจเกิดจากการกลายของยีน ที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งในกลุ่มของยีนที่ควบคุมการพัฒนาละอองเรณูของพืชทำให้เรณูเป็นหมัน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการผสมพันธุ์พืชเพราะไม่ต้องตัดเรณูของกลุ่มผสมที่ใช้เป็นพันธุ์แม่ออก ทำให้สะดวกในการผลิตพืชลูกผสม และเป็นการลดต้นทุนการผลิตด้วย (สุทัศน์, 2552)

สภาพความเป็นหมันของละอองเรณูนี้อาจเกิดเองตามธรรมชาติในพวกพันธุ์ป่า ทำให้พืชนั้นเป็นพืชผสมข้ามต้น และเป็น dioecious plant ซึ่งจะเกิดมากกับพืชดอก สภาพความเป็นหมันแต่ละชนิด พบว่าระยะที่เรณูผิดปกติแตกต่างกันออกไป และมีอิทธิพลจากความยาวของวัน อุณหภูมิ และสภาพแวดล้อมอื่นๆ ในพืชที่เรณูปกติจะมีการสร้าง microspore mother cell ระหว่างขั้นตอนที่ microspore mother cell แบ่งตัวแบบไมโอซิสได้ 4 เซลล์ ซึ่งเรียกว่า tetrad เป็นส่วนใหญ่ อาจพบความผิดปกติ ก่อน หลัง หรือระหว่าง การเกิดไมโอซิส การที่ละอองเรณูฝ่อเชื่อว่าเกิดจากสาเหตุต่างกัน คือ tapetum ซึ่งเป็นผนังชั้นในของอับเรณูเจริญม้วนเข้าไปด้านใน ทำให้ติดกับ microspore หรือ tapetum อาจปล่อยสารที่ช่วยในการเจริญของ microspore ออกมาคลาเคลื่อนจากเวลาที่ควรในพวกหญ้าอาจเกิดจากการขาดกรดอะมิโน หรือเกิดความแตกต่างของไมโทคอนเดรียขึ้นทำให้ละอองเรณูฝ่อไป (นพพร, 2543)

ลักษณะละอองเรณูเป็นหมันแบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ 1) ระบบที่ควบคุมโดยยีนในนิวเคลียส เรียกว่า genetic male sterility 2) ระบบที่ควบคุมยีนในไซโทพลาซึม เรียกว่า cytoplasmic male sterility และ 3) ระบบที่ควบคุมโดยยีนในนิวเคลียส และในไซโทพลาซึมรวมกัน เรียกว่า cytoplasmic-genetic male sterility (สุทัศน์, 2552)

1. genetic male sterility ลักษณะเรณูเป็นหมันในพืชหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ ถั่วบางชนิด และข้าวบาร์เลย์ เป็นต้น ควบคุมโดยยีนค้อยเพียงคู่เดียว และเป็น recessive gene (วิทยา, 2547) ถ้าใช้สัญลักษณ์ *ms* แทนยีนเรณูเป็นหมันหรือ male sterility พืชที่มีจีโนไทป์ เป็น *MsMs* หรือ *Msms* จะมีละอองเรณูปกติ แต่ *msms* จะมีละอองเรณูเป็นหมัน ในการรักษาลักษณะเป็นหมันไว้กระทำได้โดยผสมระหว่างต้นแม่ที่เรณูเป็นหมันกับต้นพ่อเรณูปกติ ซึ่งมียีนควบคุมลักษณะที่ต้องการเหมือนกัน โดยเหตุที่พ่อปกติอาจมีจีโนไทป์ 2 แบบ คือ *MsMs* และ *Msms* หากต้นพ่อที่นำมาใช้เป็น *MsMs* ลูกที่ได้ก็จะเป็นปกติทั้งหมดซึ่งไม่ตรงกับความต้องการ จะต้องใช้พ่อที่เป็น *Msms* จึงจะได้ลูกที่มีลักษณะเรณูเป็นหมันตามที่ต้องการครึ่งหนึ่ง และมีลักษณะเรณูปกติอีกครึ่งหนึ่ง

2. cytoplasmic male sterility ลักษณะเรณูเป็นหมันควบคุมโดยยีนในไซโทพลาซึมโดยจะมีละอองเรณูเป็นหมัน ถ้าได้รับการผสมจากละอองเรณูปกติก็สามารถติดเมล็ดได้ แต่เมล็ดเหล่านี้เมื่อนำไปปลูกจะเป็นพืชที่มีเรณูเป็นหมันทั้งหมด ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์สืบพันธุ์จากต้นแม่ทุกเซลล์จะมีไซโทพลาซึมซึ่งมีพันธุกรรมเรณูเป็นหมันติดไปด้วย การรักษาสายพันธุ์ที่เป็นหมันอาจทำได้โดยการผสมระหว่างต้นแม่ที่มีเรณูเป็นหมันกับต้นพ่อที่มีเรณูปกติ

3. cytoplasmic-genetic male sterility เป็นลักษณะเรณูเป็นหมันซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของยีนในนิวเคลียส กับไซโทพลาซึม ยีนในนิวเคลียสหรือยีนในไซโทพลาซึม เพียงอย่างเดียวไม่สามารถทำให้เรณูเป็นหมันได้ ลักษณะดังกล่าวนี้ถูกนำมาใช้ในการผลิตข้าวหอมลูกผสม พบว่าพันธุ์ crystal wax มีลักษณะที่ควบคุมเรณูเป็นหมันอยู่ในไซโทพลาซึม ต่อมาพบว่าบางพันธุ์ที่ใช้เป็นต้นพ่อในการผสมพันธุ์ที่มีเรณูเป็นหมัน ทำให้ลูกผสม F_1 กลับมีเรณูปกติอีกครั้งหนึ่ง พืชต้นพ่อดังกล่าวพบว่ามียีนแก้การเป็นหมัน (fertility restorer gene) อยู่ ถ้าอักษร *Rf* แทน restorer gene *F* แทน fertile cytoplasm และ *S* แทน sterile cytoplasm สามารถเขียนสัญลักษณ์จีโนไทป์ ต่างๆ ดังนี้:

1. พืชที่มีเรณูปกติได้แก่ พืชที่มีจีโนไทป์ *R/Rf* และ *R/rf* ร่วมกับไซโทพลาซึม ทั้งชนิด *F* และ *S* รวมทั้งจีโนไทป์ทุกชนิดที่มีไซโทพลาซึม *F*

2. พืชที่มีเรณูเป็นหมัน ได้แก่พืชที่มีจีโนไทป์ *rf/rf* ร่วมกับไซโทพลาซึม *S*

การผลิตข้าวลูกผสมโดยใช้ระบบการเป็นหมันของเรณูที่ควบคุมด้วยยีนในไซโทพลาซึมและนิวเคลียสนี้ เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ระบบการผลิตข้าวลูกผสมแบบสามทาง (three line system)

เนื่องจากการผลิตข้าวลูกผสมในระบบนี้ต้องใช้ข้าวจำนวนสามพันธุ์ คือ A line หรือ male sterile line มียีนเป็นหมันในไซโทพลาซึม แต่ไม่มียีนแก้ความเป็นหมันในนิวเคลียสมิจีโนไทป์ *rfrf* ร่วมกับไซโทพลาซึม S ส่วน B line หรือ maintainer line เป็นสายพันธุ์ที่สามารถรักษาความเป็นหมันให้ A line ซึ่งสายพันธุ์นี้จะมีลักษณะเหมือน A line ทุกประการ แต่จะไม่มียีนเป็นหมันในไซโทพลาซึม ถ้าต้องการเพิ่มหรือขยายจำนวนเมล็ด A line สามารถทำได้โดยนำ B line มาผสมกับ A line ด้วยวิธีปกติ และพันธุ์ที่สามคือ R line หรือ fertility restorer line สายพันธุ์นี้จะมียีนแก้ความเป็นหมันในนิวเคลียส ส่วนในไซโทพลาซึมเป็นยีนแบบใดก็ได้ มีจีโนไทป์ *Rfrf* ร่วมกับไซโทพลาซึมทั้งชนิด F และ S เมื่อนำ R line มาผสมกับ A line ก็จะได้ข้าวลูกผสม (บุญหงษ์, 2548)

ระบบเรณูเป็นหมันนอกจากพบในข้าวแล้ว ยังพบในข้าวโพด ข้าวฟ่าง บีท แครอต และแฟลกซ์ การรักษาสายพันธุ์ที่มีเรณูเป็นหมันทำได้โดยการผสมกับสายพันธุ์ maintainer ที่มีเกสรเพศผู้ปกติที่ดี ซึ่งมีจีโนไทป์ *rfrf* ร่วมกับไซโทพลาซึม F (สุทัศน์, 2552) ซึ่งระบบนี้เป็นระบบที่ใช้ต้นทุนสูง ซับซ้อน และมีข้อจำกัดของพันธุ์ maintainer และ restorer แต่พบว่าระบบ photoperiod-sensitive genic male sterility (PGMS) และ thermo-sensitive genic male sterility (TGMS) ใช้ได้ดีในการผลิตข้าวที่ให้ผลผลิตสูง คือ การผลิตข้าวลูกผสมแบบสองทาง (two-line breeding system) ในปัจจุบันมีการใช้สายพันธุ์ PGMS และ TGMS กันมากขึ้น (Peng *et al.*, 2009a) โดยทำให้เกสรเพศผู้เป็นหมัน ภายใต้อุณหภูมิวันยาวและให้อุณหภูมิสูง แต่เกสรเพศผู้จะไม่เป็นหมันและติดเมล็ดได้ในสภาพวันสั้นและอุณหภูมิต่ำ ตามลำดับ

ในการผลิตข้าวลูกผสมโดยใช้สายพันธุ์ PGMS และ TGMS ปัจจัยที่สำคัญ คือ แสงและอุณหภูมิ ถ้าสองปัจจัยนี้ไม่คงที่หรือแปรปรวน เรณูที่เป็นหมันอาจทำงานเป็นปกติ สามารถเกิดเป็นพันธุ์แท้ได้ เนื่องจากการผสมตัวเอง คือ เมล็ดพันธุ์ที่ได้ก็จะไม่ใช่ลูกผสม แต่เมล็ดนั้นจะเป็นเมล็ดของสายพันธุ์แม่ ถ้าต้องการลดความเสี่ยงในการเกิดเมล็ดของสายพันธุ์แม่ ที่ปนเปื้อนมากับการผลิตข้าวลูกผสม ต้องควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ Yuan (1992) ได้เสนอว่า การใช้สายพันธุ์ PGMS และ TGMS จะต้องควบคุมอุณหภูมิวิกฤต critical sterility point temperature (CSPT) ให้เหมาะสมโดยข้าวสายพันธุ์ TGMS แต่ละสายพันธุ์จะมีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดต่างกัน แม้ว่าจะอยู่ในอุณหภูมิเดียวกัน (ชื่นจิตร, 2551) โดยทั่วไปเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส ในช่วงระหว่างที่มีการเริ่มพัฒนาของช่อดอกและเกสรเพศผู้จะมีเรณูเป็นหมัน ทั้งนี้สามารถกลับมาติดเมล็ดได้เมื่ออยู่ในสภาพที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส (Alcochete, 2005) และการให้ข้าวอยู่ในสภาพอุณหภูมิต่ำเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณเมล็ดของข้าวสายพันธุ์ TGMS อีกด้วย ในข้าวสายพันธุ์ PGMS ก็เช่นเดียวกันเพียงแต่ต้องควบคุมช่วงแสงให้เหมาะสม

การเป็นหมันของละอองเรณูในข้าว เกิดจากความผิดปกติของเรณู สามารถแบ่งได้เป็น 5 ประเภทคือ 1) non-pollen 2) typical abortion 3) spherical abortion 4) stainable abortion และ 5) nuclear proliferous type (Li, 2000) ข้าวสายพันธุ์ PGMS และTGMS ที่ละอองเรณูเป็นหมัน เมื่อเรณูแก่ เมล็ดข้าวก็จะลีบ และไม่สะสมแป้ง ลักษณะเรณูเป็นหมันแบบที่ไม่มีละอองเรณู (non-pollen) จะดีกว่าชนิดที่เรณูไม่สมบูรณ์ (typical abortion) มีการศึกษาชิ้นและสารเคมีภายในเซลล์ของเรณูเปรียบเทียบระหว่าง non-pollen และ typical abortion ระหว่างที่ละอองเรณูพัฒนาในสายพันธุ์เรณูเป็นหมัน พบว่า non-pollen จะเกิดการผสมตัวเองได้ยากกว่า typical abortion ทำให้มีการปนเปื้อนของสายพันธุ์แม่น้อยมากหรืออาจจะไม่มีเลย การควบคุมอุณหภูมิวิกฤตก็เช่นเดียวกัน เรณูเป็นหมันแบบ non-pollen จะเสถียรกว่าแบบ typical abortion ดังนั้นสายพันธุ์ PGMS และTGMS จาก non-pollen จะมีประสิทธิภาพดีกว่า typical abortion (Peng *et al.*, 2009b)

การเป็นหมันของเรณูเนื่องจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม (environmentally sensitive genic male sterility; EGMS) มีหลายแบบคือ

1. TGMS (temperature-sensitive genic male sterility) ลักษณะการเป็นหมันถูกควบคุมด้วยอุณหภูมิ ถ้าอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิวิกฤต (critical sterility point temperature) ข้าวจะแสดงลักษณะเรณูเป็นหมัน
2. PGMS (photoperiod sensitive genic male sterility) ลักษณะการเป็นหมันถูกควบคุมด้วยช่วงแสง ถ้าอยู่ในสภาพวันยาว ข้าวจะแสดงลักษณะเรณูเป็นหมัน
3. PTGMS (photothermosensitive genic male sterility) ลักษณะการเป็นหมันถูกควบคุมด้วยอุณหภูมิและช่วงแสงร่วมกัน โดยข้าวจะแสดงลักษณะเรณูเป็นหมันเมื่ออยู่ในสภาพวันยาว และอุณหภูมิสูง
4. rPGMS (reverse photoperiod sensitive genic male sterility) ลักษณะการเป็นหมันถูกควบคุมด้วยช่วงแสง แต่การแสดงลักษณะฟีโนไทป์ตรงข้ามกับระบบ PGMS คือถ้าอยู่ในสภาพวันสั้น ข้าวจะแสดงลักษณะเรณูเป็นหมัน

5. rTGMS (reverse temperature sensitive genic male sterility) ลักษณะการเป็นหมันถูกควบคุมด้วยอุณหภูมิ แต่การแสดงลักษณะฟีโนไทป์ตรงข้ามกับระบบ TGMS คือถ้าอยู่ในสภาพอุณหภูมิต่ำ ข้าวจะแสดงลักษณะเรณูเป็นหมัน (Virmani *et al.*, 2003)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมาย หรือ marker เป็นเครื่องบ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทั้งคุณภาพและปริมาณ สามารถบ่งบอกความเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวได้ สามารถแบ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอได้เป็น 2 ประเภทคือ

1. เครื่องหมายทางสัณฐาน (morphological marker)

การบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต เป็นการเปรียบเทียบลักษณะภายนอกคือ สัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา ซึ่งมักขึ้นกับสภาพแวดล้อม จึงจำเป็นต้องมีความเชี่ยวชาญพิเศษเฉพาะด้าน เพราะอาจทำให้เกิดความผิดพลาดได้ แต่ก็เป็นขั้นตอนพื้นฐานในการทำงานวิจัย

2. เครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker)

แบ่งได้เป็น 2 ระดับคือ ระดับโปรตีน (protein marker) และระดับดีเอ็นเอ (DNA marker) ซึ่งข้อดีของการตรวจสอบโดยโปรตีนสามารถตรวจสอบได้หลายตำแหน่ง และเป็น codominance คือสามารถแยกแยะโปรตีนแบบโฮโมไซกัส และ เฮเทอโรไซกัสได้ ข้อจำกัดของการตรวจสอบโปรตีนคือ จำนวนยีนที่ตรวจสอบได้มีไม่มากและไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม และจำเป็นต้องมีการแสดงออกของยีนที่จะศึกษา อีกทั้งยังมีการเสียสภาพได้ง่าย ไม่สามารถเก็บไว้ได้นาน ในขณะที่เครื่องหมายดีเอ็นเอมีความเสถียรสามารถเก็บได้นาน ข้อดีคือสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนและไม่ใช่นั่นก็ได้ กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม (สุรินทร์, 2552)

Indels (insertion-deletion) หรือ DIPs (deletion-insertion polymorphisms) เป็นความแตกต่างที่เพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของลำดับเบส ซึ่งมีความยาวประมาณ 1-50 bp (Shen, 2004) ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาประยุกต์ใช้กันอย่างกว้างขวาง ในทางการเกษตรมักจะนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์กับการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อศึกษาพันธุกรรมของพืชพันธุ์ เช่น การตรวจสอบสายพันธุ์ การทำแผนที่ยีน การเลือกใช้เทคนิคที่เหมาะสมซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการปรับปรุงพันธุ์

ปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ สำหรับข้าวที่มีลักษณะเรณูเป็นหมันเพื่อทำแผนที่ และระบุยีนที่ควบคุมลักษณะ PGMS และ TGMS ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายงานการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอของข้าว TGMS และ PGMS

ลำดับ	ชื่อยีน	สายพันธุ์ ชนิดย่อย (subspecies)	โครโมโซม	เอกสารอ้างอิง
1	<i>tms1</i>	5460 (<i>indica</i>)	8	Wang <i>et al.</i> , 1995
2	<i>tms2</i>	Norin-PL12 (<i>japonica</i>)	7	Yamaguchi <i>et al.</i> , 1997; Lopez <i>et al.</i> , 2003 และ Pitnjam <i>et al.</i> , 2008
3	<i>tms3</i>	IR32364 (<i>indica</i>)	6	Subudhi <i>et al.</i> , 1997
4	<i>tms4</i>	TGMS-VN1(<i>indica</i>)	2	Dong <i>et al.</i> , 2000
5	<i>tms4</i>	SA2 (<i>indica</i>)	9	Reddy <i>et al.</i> , 2000
6	<i>tms5</i>	AnnongS-1 (<i>indica</i>)	2	Wang <i>et al.</i> , 2003 และ Yang <i>et al.</i> , 2007
7	<i>tms6</i>	0A15-1(<i>indica</i>)	3	Wang <i>et al.</i> , 2004
8	<i>tms6</i>	Sokcho-MS (<i>indica</i>)	5	Lee <i>et al.</i> , 2005
9	<i>tms6 (t)</i>	UPRI 95-140TGMS (<i>indica</i>)	3	Li <i>et al.</i> , 2005
10	<i>tms7(t)</i>	UPRI 95-140TGMS (<i>indica</i>)	7	Li <i>et al.</i> , 2005
11	<i>tms8</i>	F61 (<i>indica</i>)	11	Appibhai <i>et al.</i> , 2012
12	<i>ms-h(t)</i>	Hwacheong ms-h (<i>japonica</i>)	9	Koh <i>et al.</i> , 1995; Koh <i>et al.</i> , 1997 และ Woo <i>et al.</i> , 2008
13	<i>pms1</i>	Nongken 58S (<i>japonica</i>)	7	Zhang <i>et al.</i> , 1994; Liu <i>et al.</i> , 2001 และ Yu <i>et al.</i> , 2007
14	<i>pms2</i>	Nongken 58S (<i>japonica</i>)	3	Zhang <i>et al.</i> , 1994
15	<i>pms3</i>	Nongken 58S (<i>japonica</i>)	12	Mei <i>et al.</i> , 1999; Mei <i>et al.</i> , 1999 และ Lu <i>et al.</i> , 2005

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อยีน	สายพันธุ์ ชนิดย่อย (subspecies)	โครโม โซม	เอกสารอ้างอิง
16	<i>pms4</i>	Main 9S (<i>indica</i>)	4	Ting-you <i>et al.</i> , 2008
17	<i>ptgms2-1</i>	Guangzhan63S (<i>indica/japonica</i>)	2	Xu <i>et al.</i> , 2011
18	<i>rpms1</i>	YiD1S (<i>indica/japonica</i>)	8	Peng <i>et al.</i> , 2008c
19	<i>rpms2</i>	YiD1S (<i>indica/japonica</i>)	9	Peng <i>et al.</i> , 2008c
20	<i>rpms3(t)</i>	D52S (<i>indica/japonica</i>)	10	Joseph <i>et al.</i> , 2011
21	<i>rtm1</i>	J207S (<i>indica</i>)	10	Jia <i>et al.</i> , 2001

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พันธุ์ข้าวที่ใช้และการสร้างประชากรสำหรับตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

พันธุ์ข้าวที่มีลักษณะเรณูเป็นหมันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจากข้าว ID 24 จำนวน 2 พันธุ์ ซึ่งเป็นข้าวที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์มาแล้ว ได้รับความอนุเคราะห์จาก สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) ประเทศฟิลิปปินส์ (ตารางที่ 2 และ 3)

ตารางที่ 2 ข้าวพันธุ์แม่ที่ใช้ในงานวิจัย

สายพันธุ์	ชื่อพันธุ์	รหัสพันธุ์
TGMS	B7	IR73834
TGMS	B8	IR75589

ตารางที่ 3 ข้าวพันธุ์พ่อที่ใช้ในงานวิจัย

สายพันธุ์	ชื่อพันธุ์	รหัสพันธุ์
Wild type	B30	IR14632-2-3
Wild type	Azucena	IR1721-11-6-8

พันธุ์แม่ คือ TGMS line B7 (IR73834) และ TGMS line B8 (IR75589) เป็นข้าว *indica*

ผสมกับข้าว *japonica* ที่มีลักษณะเรณูปกติ เป็นพันธุ์พ่อ คือ Azucena และ IR14632-2-3 (B30)

โดยการผสม 2 คู่ผสม คือ TGMS line B7 (IR73834) x IR14632-2-3 (B30) และ TGMS line B8 (IR75589) x Azucena เมื่อได้ประชากร F₁ ปลอຍให้ผสมตัวเองจนได้ประชากร F₂ แล้วจึงปลูกข้าวในแปลงทดสอบเพื่อใช้ในการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอและตรวจสอบฟีโนไทป์ โดยปลูกในช่วงฤดูร้อนที่มีอุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 28 องศาเซลเซียส เพราะข้าวจะเป็นหมันเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 28 องศาเซลเซียส เมื่อดอกข้าวเริ่มบาน ตรวจสอบฟีโนไทป์ แยกต้นที่เป็นหมันและไม่เป็นหมันออกจากกันโดยดูลักษณะของเรณู ตรวจสอบฟีโนไทป์ของข้าวทั้ง

ประชากร จากนั้นเก็บตัวอย่างใบข้าวในประชากร F₂ เฉพาะต้นที่มีเรณูเป็นหมันเพื่อทำการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอต่อไป

2. การเตรียมดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวสายพันธุ์พ่อแม่ และประชากร F₂ เฉพาะต้นที่มีเรณูเป็นหมัน โดยวิธี CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) (Lukowitz *et al.*, 2000)

3. การศึกษาเรณูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ศึกษาเรณูของข้าวพันธุ์พ่อแม่และลูก F₂ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำเรณูที่สมบูรณ์ของ B8 (IR75589) และ Azucena โดยเลือกดอกย่อยของข้าวที่พร้อมจะปฏิสนธิ ถ้าเรณูยาวนานน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของดอกแสดงว่ายังอ่อน เลือกที่เรณูยาวสามในสี่ของดอกย่อยแล้วตัดเฉพาะส่วนของอับเรณูวางบนสไลด์ หยดสารละลาย 0.7% I₂-KI ให้ท่วมทั้งอับเรณู แช่ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที ค่อยๆ ปิดด้วย cover slip แล้วนำตัวอย่างที่ได้มาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีน *tgms* จากข้าว ID24

เนื่องจากมีรายงานการหาตำแหน่งของยีน *tgms* จากข้าว ID24 พบว่าเครื่องหมาย Os02g12300 (6.40 Mb) และ Os02g12370 (6.44 Mb) ลิงก์กับยีน *tgms* ในข้าว ID24 โดยมีตำแหน่งอยู่ห่างจากยีน 1.3 เซนติเมอร์แกน (จีนจิตร, 2551) จึงพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยอาศัยข้อมูลจากงานวิจัยที่ผ่านมา โดยออกแบบไพรเมอร์ในบริเวณดังกล่าวเพื่อให้มีตำแหน่งใกล้กับยีนมากขึ้น เป็นการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิดที่เกิดจากการแทรกเพิ่ม (insertion) และการขาดหาย (deletion) ของลำดับเบสจากงานวิจัยของ Ying *et al.*, 2004 ให้มีขนาดประมาณ 400-600 คู่เบส โดยให้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้ครอบคลุมตำแหน่งของยีน จึงได้ออกแบบไพรเมอร์ทุกๆ 100 กิโลเบส โดยใช้ฐานข้อมูลลำดับเบสบนจีโนมของข้าว (<http://www.gramene.org>) ที่มีความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอ (Indel) ระหว่างข้าว *Oryza sativa* L. ssp. *Japonica* และ *Oryza sativa* L. ssp. *Indica* อย่างน้อย 30 คู่เบส ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Primer 3 (<http://workbench.sdsc.edu>) แล้วนำไพรเมอร์ที่ได้มาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ ที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีลักษณะเรณูเป็นหมันกับข้าวที่มีลักษณะเรณูปกติ และนำไปใช้ตรวจสอบใน

ประชากร F_2 ที่ระบุเป็นหมัน

5. การตรวจสอบโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจาง แล้วนำไปเพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) จากไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้น โดยใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตรในการทำปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที, ต่อด้วย 95 องศาเซลเซียส 45 วินาที, อุณหภูมิที่เหมาะสม 53-60 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที แล้วนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ตรวจสอบโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน เจลอะกาโรส 3 เปอร์เซ็นต์ คัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง ระหว่างข้าวที่มีลักษณะระบุเป็นหมันกับข้าวที่มีลักษณะระบุปกติ เพื่อวิเคราะห์ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ

6. การคำนวณระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอและวิเคราะห์ข้อมูล

เมื่อได้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างแล้ว นำมาวิเคราะห์กับประชากร F_2 เพื่อหาระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถอ่านรูปแบบแถบดีเอ็นเอได้ 3 แบบใช้ในการคำนวณระยะห่างระหว่างเครื่องหมายได้จากสูตร

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

เมื่อ	N_1	คือ	จำนวนตัวอย่างที่มีรูปแบบแถบดีเอ็นเอแบบฮอโมไซกัสเหมือนพ่อ
	N_2	คือ	จำนวนตัวอย่างที่มีรูปแบบแถบดีเอ็นเอแบบเฮเทอโรไซกัส
	N	คือ	จำนวนตัวอย่าง F_2 ที่เป็นหมันทั้งหมด (Peng <i>et al.</i> , 2010)

ผลและวิจารณ์

1. การสร้างประชากรลูกผสมสำหรับทำแผนที่

จากการผสมข้าว TGMS line B7 (IR73834) x IR14632-2-3 (B30) ซึ่งปลูกไว้ที่
โรงเรียนเพาะชำในศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) อุทยาน
วิทยาศาสตร์ประเทศไทย พบว่าข้าวลูกผสมมีลักษณะเด่นกว่าพันธุ์พ่อแม่ (ภาพที่ 1) ปลอຍให้ลูก F_1
ผสมตัวเองจนได้ประชากร F_2 เพื่อใช้ในการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ



ภาพที่ 1 การเปรียบเทียบลักษณะของข้าว TGMS line B7 (IR73834) (ซ้าย) F_1 TGMS line B7
(IR73834) x IR14632-2-3 (B30)(กลาง) และ IR14632-2-3 (B30) (ขวา) เมื่อมีอายุได้
84 วัน

คู่ผสมอีกคู่หนึ่งคือ TGMS line B8 (IR75589) x Azucena ลูก F_1 (ภาพที่ 2 ก) มีลักษณะเป็น
heterosis มีลักษณะอื่นๆ ที่ดีกว่าพ่อและแม่เช่นเดียวกับลูก F_1 ของคู่ผสม TGMS line B7 (IR73834)
x IR14632-2-3 (B30) จากนั้นปลอຍให้ลูก F_1 ผสมตัวเองจนได้ประชากร F_2 แล้วจึงปลูกข้าวใน
แปลงทดสอบ (ภาพที่ 2 ข) โดยจะพบลักษณะของฟีโนไทป์แบ่งได้เป็น 3 ลักษณะคือ ต้นที่เป็น
หม่นโดยสมบูรณ์ ต้นที่ติดเมล็ดโดยสมบูรณ์ และต้นที่มีลักษณะเป็นหม่นบางส่วนและสามารถติด

เมล็ดได้ หลังจากทำการตรวจสอบฟีโนไทป์ทั้งประชากรแล้วคัดเลือกเฉพาะต้นที่เป็นหมัน โดยสมบูรณ์
ไปตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ



ก.

ข.

ภาพที่ 2 ลูก F_1 ของคู่ผสม TGMS line B8 (IR75589) x Azucena (ก) และประชากร F_2 ของคู่ผสม
ระหว่าง TGMS line B8 (IR75589) x Azucena (ข)

2. การเปรียบเทียบลักษณะของเรณู

ในการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับยีนที่มีอิทธิพลต่อการเป็นหมันของเรณูข้าว
ได้รับความอนุเคราะห์พันธุ์ข้าวจากสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (International Rice Research
Institute ,IRRI) ประเทศฟิลิปปินส์ คือสายพันธุ์ TGMS B8 (IR75589) และ B7 (IR73834) ซึ่งเป็น
หมันภายใต้อุณหภูมิสูง สามารถติดเมล็ดได้ในสภาวะอุณหภูมิต่ำ เมื่อนำดอกย่อยของข้าวที่มี
ลักษณะละอองเรณูปกติและลักษณะละอองเรณูเป็นหมันมาเปรียบเทียบกัน พบว่าอับเรณูของข้าวที่
ปกติจะมีสีเหลืองเข้ม เนื่องจากละอองเรณูภายในอับเรณูมีสีเหลืองทำให้ทั้งอับเรณูเป็นสีเหลืองเข้ม
ในขณะที่ข้าวที่มีละอองเรณูเป็นหมันมีลักษณะสีขาวใส (ภาพที่ 3 และ 4) และขนาดของอับเรณูทั้ง
2 ประเภทนี้ก็แตกต่างกันด้วย คืออับเรณูปกติจะมีขนาดใหญ่กว่าอับเรณูที่เป็นหมัน (ภาพที่ 5)

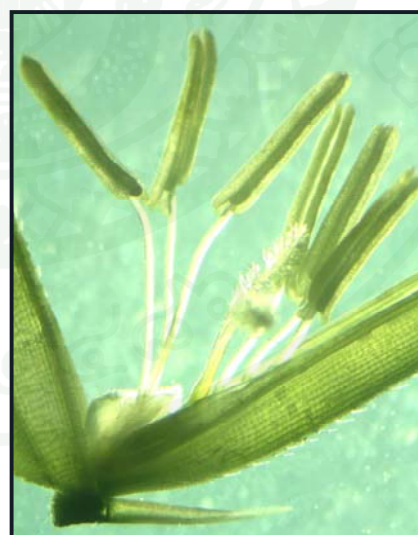


ก.

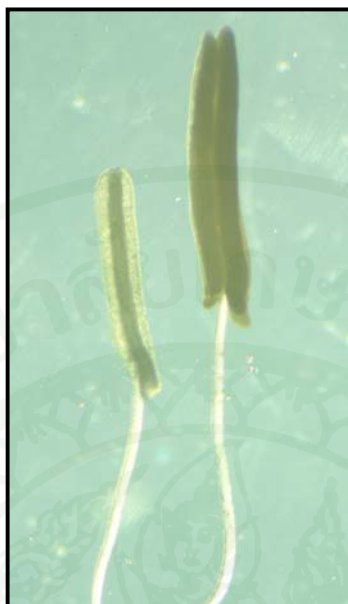


ข.

ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบอับเรณูระหว่างข้าวที่มีลักษณะละอองเรณูปกติ (ก) และลักษณะละอองเรณูเป็นหมัน (ข)



ภาพที่ 4 การเปรียบเทียบละอองเรณูระหว่างลักษณะละอองเรณูปกติ (ก) และลักษณะละอองเรณูเป็นหมัน (ข)



ภาพที่ 5 การเปรียบเทียบขนาดของอับเรณูระหว่างลักษณะอับเรณูปกติ (ขวา) และลักษณะอับเรณูเป็นหมัน (ซ้าย)

เมื่อนำอับเรณูของข้าวสายพันธุ์ปกติมาเชื่อมด้วยไอโอดีน-โพแทสเซียมไอโอไดด์ จะพบว่า คิคสิดำเข้มทั้งอับเรณู ในขณะที่อับเรณูของข้าว TGMS ข้อมไม่คิคสิ (ภาพที่ 6) เนื่องจากไม่มีการสะสมของแป้ง (Wang *et al.*, 2010)

Fertile



Sterile



ภาพที่ 6 การเปรียบเทียบละอองเรณูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระหว่างลักษณะละอองเรณูปกติและลักษณะละอองเรณูเป็นหมัน

3. การถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมของลักษณะเรณูเป็นหมันเนื่องจากอุณหภูมิ

การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับยีนที่มีอิทธิพลต่อการเป็นหมันของเรณูข้าวได้ทำการผสมข้าว TGMS กับสายพันธุ์ปกติ ได้ลูก F_1 ปลอຍให้ผสมตัวเองจนได้ประชากร F_2 ลูกประชากร F_2 ในปี 2554 ในจังหวัดปทุมธานี โดยประชากรที่ใช้ในการศึกษามี 2 ประชากร คือ ลูกผสมระหว่าง B8 กับ Azucena มีต้นที่เป็นหมันจำนวน 121 ต้น และ B7 กับ B30 มีต้นที่เป็นหมันจำนวน 133 ต้น จากการคำนวณค่าไคสแควส์ของอัตราส่วนของลูก F_2 ทั้ง 2 ประชากร พบว่าอัตราส่วนต้นปกติต่อต้นที่เป็นหมันคือ 3:1 ($\chi^2 = 1.1695$, $\chi^2 = 0.6425 < \chi^2_{0.05} = 3.84$) ดังตารางที่ 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีนที่มีอิทธิพลต่อการเป็นหมันของเรณูข้าว TGMS ถูกควบคุมด้วยแอลลีลเดี่ยวของยีน 1 ตำแหน่ง (single recessive gene) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ของ Reddy ในปี 2000

ตารางที่ 4 แสดงอัตราส่วนของประชากร F_2 ระหว่างต้นที่มีเรณูเป็นหมันและต้นที่มีเรณูปกติ

ประชากร	รวม (ต้น)	ต้นที่มีเรณูปกติ (ต้น)	ต้นที่มีเรณูเป็นหมัน (ต้น)	ต้นที่มีเรณูปกติ/ต้นที่มีเรณูเป็นหมัน	ค่าไคสแควร์ $P=0.05$ (3:1) = 3.84
F_2 (B8xAzucena)	527	406	121	3.36	$\chi^2 = 1.1695$
F_2 (B7xB30)	565	432	133	3.25	$\chi^2 = 0.6425$

4. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีน *tgms* จากข้าว ID24

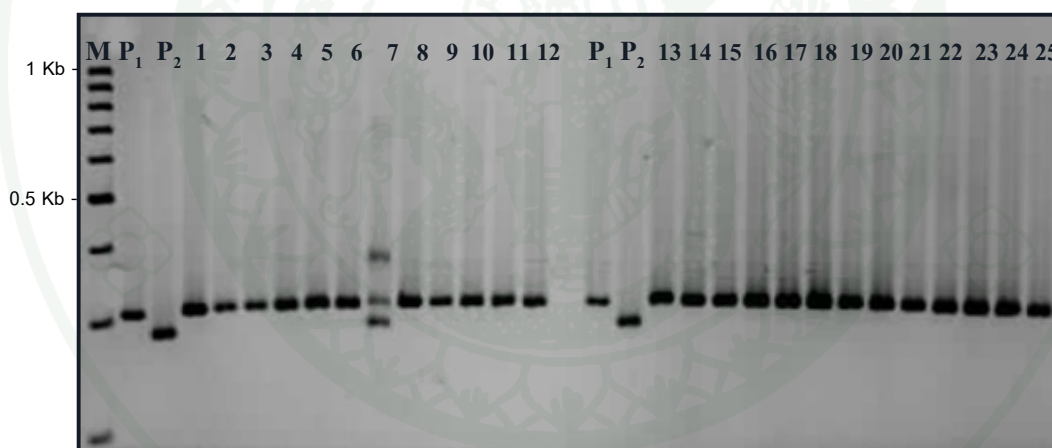
เนื่องจากมีรายงานการหาตำแหน่งของยีน *tgms* จากข้าว ID24 พบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับยีน *tgms* ในข้าว ID24 มากที่สุดมีตำแหน่งอยู่ห่างจากยีน 1.3 cM (ชินจิตร, 2551) ในการวิจัยครั้งนี้จึงได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยออกแบบไพรเมอร์ในบริเวณดังกล่าวเพื่อให้มีตำแหน่งใกล้กับยีนมากขึ้น เป็นการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดที่เกิดจากการแทรกเพิ่มหรือขาดหาย (Indel marker) จำนวน 84 เครื่องหมาย หาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่ามีเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีลักษณะละอองเรณูเป็นหมันกับข้าวที่มีลักษณะละอองเรณูปกติจำนวน 15 เครื่องหมาย จึงคัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถอ่านได้ง่ายและมีตำแหน่งใกล้กับยีน *tgms* จำนวน 10 เครื่องหมายดังตารางที่ 5 เพื่อนำไปตรวจสอบกับประชากร F_2

เฉพาะต้นที่เป็นหมันทั้ง 2 ประชากร

ตารางที่ 5 เครื่องหมายดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 2 ที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าว TGMS และข้าวพันธุ์ปกติ ซึ่งนำมาใช้ในการหาระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ประชากร F_2

ลำดับ ที่	เครื่องหมาย ดีเอ็นเอ	ตำแหน่งบนโครโมโซม (เมกะเบส)	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5' -3')
1	2gAP005058	5.8 Mb	F: CAAACAACCACTTTTGTTCAGCA R: ATATATGCTGTGGGCAGGATCAA
2	2gAP003974	5.9 Mb	F: CAATTCGGAGATTACATTTCGGTC R: ACTATAGACGCAGCTTGTGTGCC
3	Os02g12050	6.25 Mb	F: TGGCAACTAATAGGCATCGTCG R: TCTTGTAGCTGCAACATCCCCC
4	2gAP004085	6.25 Mb	F: GAGGGTGCCGACTTGACACG R: CACAGCTTTCGTATTGGGGCA
5	2gAP004086	6.27 Mb	F: TCAAGCAATCACAACCCCTTCC R: GGCTACCCAAACCATGCATCA
6	Os02g12370	6.44 Mb	F: ACTTATGCGGTGGTCAAGCA R: TTGTTCCCTCCACGGCTGATA
7	Os02g12350	6.45 Mb	F: TCCATCTGCAAATCCATAGCA R: TCTGGTGCATAGCTGCTGGT
8	2gAP005394	7.17 Mb	F: TGCAAACAGTTGGATTAGCTTGA R: TGACAGTGCGCTTATCTTCCATA
9	2gAP005756	7.26 Mb	F: AATTCATTGGACGCACACACAT R: TGCATTGGGAAATTGAAAAGATT
10	2gAP004070	7.4 Mb	F: ATGGTGCCGATAACGTATTACA R: GGCTTGCGGTAAGAATATAGGAGA

การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้ชิดกับยีน *tgms* ในข้าว ID24 จากประชากร F_2 (B8xAzucena) เฉพาะต้นที่เป็นหมัน จากการตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมาย 2gAP003974 พบต้นที่แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอเหมือนต้นแม่มีรูปแบบแถบดีเอ็นเอแบบฮอโมไซกัสรีเซสซีฟ (homozygous recessive) คือตัวอย่างที่ 1-6 และ 8-25 โดยมีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 300 คู่เบส และตัวอย่างที่ 7 เป็น เฮเทอโรไซกัส คือมีทั้งแถบดีเอ็นเอที่ได้มาจากพ่อและแถบดีเอ็นเอที่ได้จากแม่ เกิดจากเซลล์สืบพันธุ์หนึ่งเกิด recombination ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้กับยีน ส่วนต้นพ่อมีรูปแบบแถบดีเอ็นเอแบบฮอโมไซกัส โดมิแนนต์ (homozygous dominant) มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 280 คู่เบส แสดงว่าที่ตำแหน่งนี้มีการเกิด Indel ขึ้นประมาณ 20 เบส (ภาพที่ 7) และภาพที่ 8 คือผลการวิเคราะห์ประชากร F_2 (B7xB30) ด้วยเครื่องหมาย os02g12370 พบต้นที่แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอที่เหมือนต้นแม่คือมีรูปแบบแถบดีเอ็นเอแบบฮอโมไซกัสรีเซสซีฟ ทั้งหมด คือ มีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 300 คู่เบส ผลการตรวจสอบกับลูก F_2 ทั้ง 2 ประชากร โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 10 เครื่องหมาย ได้ผลดังตารางที่ 6

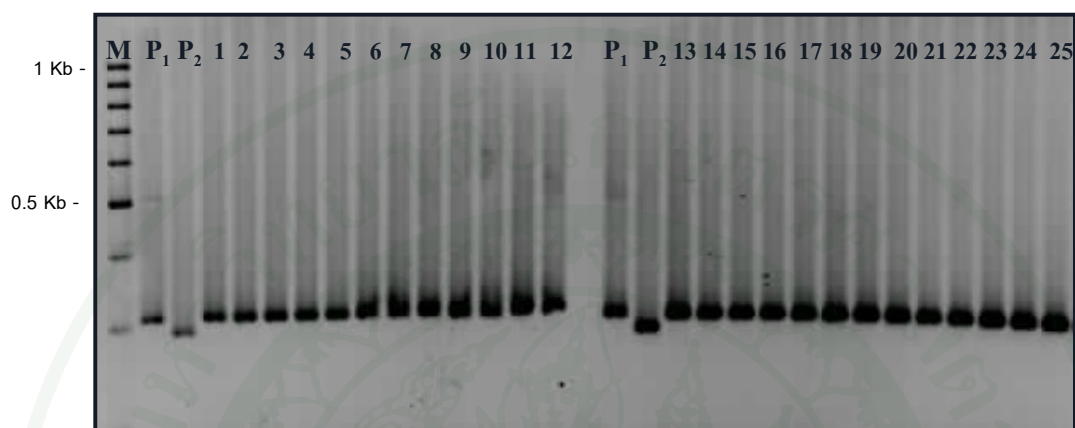


ภาพที่ 7 การวิเคราะห์ประชากร F_2 (B8xAzucena) ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ 2gAP003974

M = marker, P_1 = B8, P_2 = Azucena, 1-25 คือลูก F_2

จะพบว่าต้น F_2 ที่มีระบุเป็นหมันทั้งหมด หรือเกือบทั้งหมดมีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือนต้นแม่ แสดงว่าไม่เกิดรีคอมบิเนชัน ระหว่างตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้กับยีน *tgms* และพบต้น F_2 ที่มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือน F_1 คือเป็นเฮเทอโรไซกัส ซึ่งเกิดจากมีรีคอมบิเนชัน ระหว่างตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอกับยีน *tgms* ในเซลล์สืบพันธุ์หนึ่งจำนวนเล็กน้อย ส่วนต้น F_2 ที่มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือนต้นพ่อที่มีระบุปกตินั้น ไม่มีเลย เนื่องจาก

โอกาสจะเกิดรีคอมบิเนชันระหว่างตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอกับยีน *tgms* ในเซลล์สืบพันธุ์ ทั้ง 2 เซลล์ เป็นไปได้ยาก เพราะเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้อยู่ใกล้กับยีนมาก เช่นเดียวกับงานของชินจิตร (2551)



ภาพที่ 8 การวิเคราะห์ประชากร F_2 (B7xB30) ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ os02g12370 M = marker, P_1 = B7, P_2 = B30, 1-25 คือลูก F_2

ตารางที่ 6 ผลการตรวจสอบประชากร F_2 ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งหมด

เครื่องหมาย	จำนวนประชากร F_2 (B8xAzucena) ที่พบแถบดีเอ็นเอเหมือน			จำนวนประชากร F_2 (B7xB30) ที่พบแถบดีเอ็นเอเหมือน		
	แม่	พ่อ	F_1	แม่	พ่อ	F_1
1. 2gAP005058	118	0	3	127	0	6
2. 2gAP003974	120	0	1	129	0	4
3. Os02g12050	121	0	0	133	0	0
4. 2gAP004085	121	0	0	133	0	0
5. 2gAP004086	121	0	0	133	0	0
6. Os02g12370	121	0	0	133	0	0

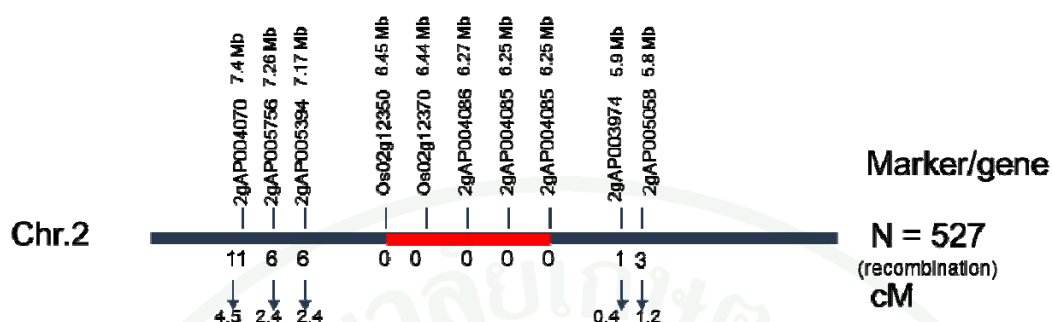
ตารางที่ 6 (ต่อ)

เครื่องหมาย	จำนวนประชากร F_2 (B8xAzucena) ที่พบแถบดีเอ็นเอเหมือน			จำนวนประชากร F_2 (B7xB30) ที่พบแถบดีเอ็นเอเหมือน		
	แม่	พ่อ	F_1	แม่	พ่อ	F_1
7. Os02g12350	121	0	0	133	0	0
8. 2gAP005394	115	0	6	129	0	4
9. 2gAP005756	115	0	6	129	0	4
10. 2gAP004070	110	0	11	128	0	5

5. การหาระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ

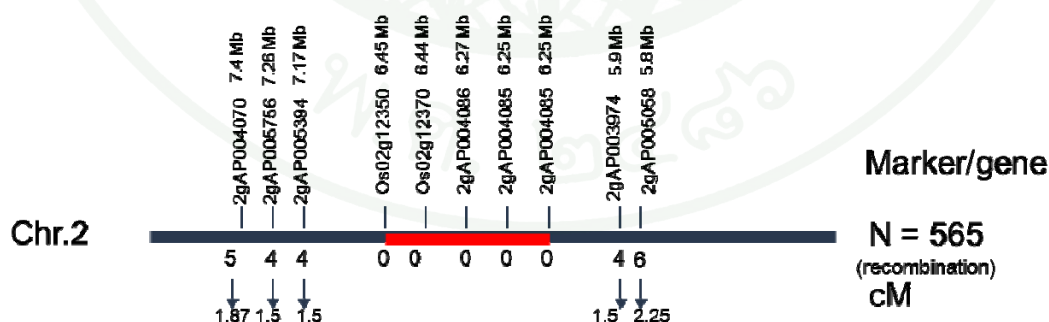
เมื่อนำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างทั้ง 10 เครื่องหมาย มาทดสอบกับประชากร F_2 ทั้ง 2 ประชากร คือ F_2 ของ B8xAzucena จำนวนต้นที่เป็นหมัน 121 ต้น และ F_2 ของ B7xB30 ต้นที่เป็นหมัน 133 ต้น เพื่อวิเคราะห์ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ พบว่ายีน *tgms* อยู่ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ Os02g12050 6.25 Mb และ Os02g12350 6.45 Mb (ดังภาพที่ 9 และ 10) ไม่พบการเกิด รีคอมบินันชัน (recombination) ระหว่าง 2 เครื่องหมายนี้

ผลการวิเคราะห์ด้วยประชากร F_2 (B8xAzucena) พบว่ามี 5 เครื่องหมายที่เกิด รีคอมบินันชัน คือ 2gAP004070 ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่ง 7.4 Mb บนโครโมโซมคู่ที่ 2, 2gAP005756 อยู่ที่ตำแหน่ง 7.26 Mb, 2gAP005394 อยู่ที่ตำแหน่ง 7.17 Mb, 2gAP003974 อยู่ที่ตำแหน่ง 5.9 Mb และ 2gAP005058 อยู่ที่ตำแหน่ง 5.8 Mb มีจำนวนต้นที่เกิด รีคอมบินันชัน 11, 6, 6, 1 และ 3 ต้นตามลำดับ และมีระยะระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับยีน *tgms* 4.5, 2.4, 2.4, 0.4 และ 1.2 cM ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ไม่เกิด รีคอมบินันชัน 5 เครื่องหมาย ได้แก่ Os02g12050 ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่ง 6.25 Mb บนโครโมโซมคู่ที่ 2, 2gAP004085 อยู่ที่ตำแหน่ง 6.25 Mb, 2gAP004086 อยู่ที่ตำแหน่ง 6.27 Mb, Os02g12370 อยู่ที่ตำแหน่ง 6.44 Mb และ Os02g12350 อยู่ที่ตำแหน่ง 6.45 Mb (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 แผนที่แสดงตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 10 เครื่องหมายบนโครโมโซมคู่ที่ 2 จากการวิเคราะห์ด้วยประชากร F_2 (B8xAzucena)

ผลการวิเคราะห์ด้วยประชากร F_2 (B7xB30) พบว่ามี 5 เครื่องหมายที่เกิด รีคอมบินันชัน คือ 2gAP004070 ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่ง 7.4 Mb บนโครโมโซมคู่ที่ 2, 2gAP005756 อยู่ที่ตำแหน่ง 7.26 Mb, 2gAP005394 อยู่ที่ตำแหน่ง 7.17 Mb, 2gAP003974 อยู่ที่ตำแหน่ง 5.9 Mb และ 2gAP005058 อยู่ที่ตำแหน่ง 5.8 Mb มีจำนวนต้นที่เกิด รีคอมบินันชัน 5, 4, 4, 4 และ 6 ต้นตามลำดับ และมีระยะระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับยีน *tgms* 1.87, 1.5, 1.5, 1.5 และ 2.25 cM ตามลำดับ และพบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ไม่เกิดรีคอมบินันชันเลย 5 เครื่องหมาย ได้แก่ Os02g12050 ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่ง 6.25 Mb บนโครโมโซมคู่ที่ 2, 2gAP004085 อยู่ที่ตำแหน่ง 6.25 Mb, 2gAP004086 อยู่ที่ตำแหน่ง 6.27 Mb, Os02g12370 อยู่ที่ตำแหน่ง 6.44 Mb และ Os02g12350 อยู่ที่ตำแหน่ง 6.45 Mb ซึ่งให้ผลตรงกันในทุก 2 ประชากร (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 แผนที่แสดงตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 10 เครื่องหมายบนโครโมโซมคู่ที่ 2 จากการวิเคราะห์ด้วยประชากร F_2 (B7xB30)

ระยะห่างของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Os02g12050 ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่ง 6.25 Mb และ Os02g12350 อยู่ที่ตำแหน่ง 6.45 Mb บนโครโมโซมคู่ที่ 2 คือประมาณ 200 กิโลเบส จากฐานข้อมูล (<http://www.gramene.org>) (ภาพที่ 11) ให้ผลตรงกันในทุก 2 ประชากร แสดงว่ายีนที่มีอิทธิพลต่อการเป็นหมันของเรณูข้าว TGMS น่าจะอยู่ในบริเวณนี้หรือบริเวณข้างเคียง ดังนั้นจึงสามารถนำเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 5 เครื่องหมายนี้ไปใช้ช่วยคัดเลือก (marker assisted selection) ลักษณะ TGMS ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ หรืออาจค้นหายีน *tgms* จาก candidate gene เพื่อศึกษากลไกควบคุมการเกิดลักษณะเรณูเป็นหมันได้เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Xu *et al.*, 2011



ภาพที่ 11 แสดงช่วงของตำแหน่งยีน *tgms* จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 2 ด้วยประชากรทั้ง 2 ประชากร

จากงานวิจัยของ Peng *et al.*, 2009a ได้ระบุเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับยีน *tmsx* ในข้าว XianS ซึ่งเกิดจากการเป็นหมันโดยธรรมชาติ พบว่าอยู่ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล RMX14 ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่ง 6.39 Mb อยู่ห่างจากยีน 0.15 cM และ RMX21 ที่ตำแหน่ง 6.40 Mb อยู่ห่างจากยีน 0.07 cM และในบริเวณดังกล่าวนี้มีการรายงาน candidate ของยีน *tms5* อยู่ในบริเวณ 19 กิโลเบสระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล 4039-1 และ 4039-2 บน BAC clone AP004039 ซึ่งพบ family ของ *NAC* gene ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของดอกและการเจริญเติบโต (Yang *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังพบ candidate ของยีน *ptgms2-1* ในข้าว Guanzhan63 เกิด SNP ขึ้นในยีน Loc_os02g12290 (Xu *et al.*, 2011) จึงเป็นที่น่าสนใจว่ายีน *tgms* ในข้าวที่นำเข้ามาจากสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) ประเทศฟิลิปปินส์นี้อาจเป็นยีน *tms5* หรืออาจเป็นยีน *tms* ตัวใหม่ที่ยังมีไม่รายงานมาก่อน เนื่องจากในตำแหน่งนี้มีการรายงานหลายงานวิจัยแต่ก็ยังไม่มีการระบุประเภทของยีน *tgms* อย่างชัดเจน

สรุป

การศึกษาตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนควบคุมการเป็นหมันของเรณูข้าว เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ทำการเปรียบเทียบเรณูของข้าวสายพันธุ์ปกติและข้าวที่มีลักษณะละอองเรณูเป็นหมันด้วยการข้ามไอโอดีน-โพแทสเซียมไอโอไดด์ พบว่าข้าวสายพันธุ์ปกติอับเรณูติดสีดำเข้มทั้งอับเรณู ในขณะที่ ข้าว TGMS ข้อมไม่ติดสี เนื่องจากไม่มีการสะสมของแป้ง

การศึกษากการกระจายตัวของประชากรที่ใช้ในการวิเคราะห์ตำแหน่งยีน *tgms* ที่มีอิทธิพลต่อการเป็นหมันของละอองเรณูข้าว จากการคำนวณค่าไคสแควส์ของอัตราส่วนประชากร F_2 ทั้ง 2 ประชากร พบว่าอัตราส่วนของต้นปกติต่อต้นที่เป็นหมันคือ 3:1 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีนที่มีอิทธิพลต่อการเป็นหมันของละอองเรณูข้าว TGMS ถูกควบคุมด้วยแอลลีลเดี่ยวของยีน 1 ตำแหน่ง

การหาแผนที่ยีนควบคุมลักษณะละอองเรณูเป็นหมันโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เกิดจากการแทรกเพิ่มหรือขาดหาย Indel marker จากการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 84 เครื่องหมาย นำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าว TGMS ที่เป็น *indica* และข้าวสายพันธุ์ปกติ *japonica* จำนวน 10 เครื่องหมาย มาใช้ในการหาระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์ด้วยประชากร F_2 (B8xAzucena) และ F_2 (B7xB30) เฉพาะต้นที่เรณูเป็นหมัน 121 ต้น และ 133 ต้น ตามลำดับ นำไปวิเคราะห์ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ พบว่ายีน *tgms* น่าจะอยู่ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ Os02g12050 ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่ง 6.25 Mb อยู่ห่างจากยีน 0 cM และ Os02g12350 ที่ตำแหน่ง 6.45 Mb มีระยะห่างจากยีน 0 cM คือไม่พบการที่เกิดรีคอมบิเนชัน ช่วงระยะห่างระหว่าง 2 เครื่องหมายนี้ประมาณ 200 กิโลเบส นอกจากนี้มีเครื่องหมายอีก 3 เครื่องหมายอยู่ภายในบริเวณดังกล่าวคือ 2gAP004085 ที่ตำแหน่ง 6.25 Mb, 2gAP004086 ที่ตำแหน่ง 6.27 Mb และ Os02g12370 ที่ตำแหน่ง 6.44 Mb ในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางอยู่ใกล้กับยีนควบคุมการเป็นหมันของละอองเรณูข้าวนี้ จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการพัฒนาข้าวลูกผสมแบบ 2 ทาง เพื่อเพิ่มผลผลิตในทางการเกษตรต่อไปในอนาคต

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กฤษฎา สัมพันธ์รักษ์. 2519. **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์ และ พิรศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2539. **การปรับปรุงพันธุ์พืชเศรษฐกิจของประเทศไทย**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กลุ่มหนังสือเกษตร, กรุงเทพฯ.

ชื่นจิตร บุญเจริญ. 2551. **การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่ลิงก์กับยีนควบคุมเกสรตัวผู้เป็นหมันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในข้าว**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

ดำเนิน กาละดี. 2545. **เทคโนโลยีการปรับปรุงพันธุ์พืช plant improvement technology**. โรงพิมพ์เมือง, เชียงใหม่.

ธงไชย ทองอุทัยศรี. 2536. **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช**. สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้, เชียงใหม่.

นพพร สายัมพล. 2543. **เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

บุญหงษ์ จงคิด. 2548. **หลักและเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วรวิทย์ พานิชพัฒน์. 2533. **ข้าวลูกผสม**. สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

วิทยา บัวเจริญ. 2527. **หลักการผสมและการปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพมหานคร, กรุงเทพฯ.

ศิริพร พงศ์ศุภสมิทธิ. 2547. **การปรับปรุงพันธุ์พืช**. นพบุรีการพิมพ์, เชียงใหม่.

สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2552. การปรับปรุงพันธุ์พืช. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Alcochete A.A.N, P. H. N. Rangel and M. E. Ferreira. 2005. Mapping of quantitative trait loci for thermosensitive genic male sterility in *indica* rice. **Pesq. Agropec. Bras.** 40: 1179-1188.

Appibhai J. H., J. Ali, E.A. Siddiq, V.S. Gupta, U.K. Reddy and P. K. Ranjekar. 2012. Mapping of *tms8* gene for temperature-sensitive genic male sterility (TGMS) in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Breed.** 131: 42-47.

Biology Workbench Organization. 1999. **Next Generation Biology Workbench**. Available Source: <http://www.gramene.org/about/>, September 27, 2010.

Chen, L., Z. Zhao, X. Liu, L. Liu, L. Jiang, S. Liu, W. Zhang, Y. Wang, Y. Liu and J. Wan. 2009. Marker-assisted breeding of a photoperiod-sensitive male sterile japonica rice with high cross-compatibility with indica. **Mol Breed** 1: 247-258.

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 thermosensitive genic male sterility using AFLP, RFLP and SSR techniques. **Theor. Appl. Genet.** 100: 727-734.

Gramene Organization. 2000. **A Resource for Comparative Grass Genomics**. Available Source: <http://www.gramene.org/about/>, September 25, 2010.

Jia J.H., D.S. Zhang, C.Y. Li, X.P. Qu, S. W. Wang, V. Chamarek, H. T. Nguyen and B. Wang. 2001. Molecular mapping of the reverse thermo-sensitive genic male-sterile gene (*rtms1*) in rice. **Theor. Appl. Genet.** 103: 607-612.

Jiang, H., L.B. Guo and Q. Qian. 2008. Recent progress on rice genetics in China.

J. Integr. Plant Biol. 49: 776-790.

Joseph C.A., Z. Chen, D. Ma and H. Zeng. 2011. Analysis of short photo-periodic sensitive genic male sterility and molecular mapping of *rpms3(t)* gene in rice (*Oryza sativa* L.) using SSR markers. **Genes Genomics** 33: 513-519.

Koh H.J and M.H. Heu. 1995. Agronomic characteristics of a mutant for genic male sterility-chalky endosperm and its utilization on F1 hybrid breeding system in rice. **Korean J. Crop Sci.** 40: 684-696.

Koh H.J., Y.H. Son, M.H. Heu, H.S. Lee and S.R. McCouch. 1999. Molecular mapping of a new genic male-sterility gene causing chalky endosperm in rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica** 106: 57-62.

Lee D.S., L.J Chen. and H.S. Suh. 2005. Genetic characterization and fine mapping of a novel thermo-sensitive genic male-sterile gene *tms6* in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.** 111: 1271-1277.

Li, R.Q. 2000. Cell biology of male sterility in rice, pp. 160-170. In Zhu YG (ed) **Biology of Male Sterility in Rice**. Wuhan University Press. Hubei.

Li R., M. P. Pandey, and P. Sharma. 2005. Inheritance of thermosensitive genic male sterility in rice (*Oryza sativa* L.) **Curr. Sci.** 88: 11-10.

Liu N., Y. Shan, F.P. Wang, C.G. Xu , K.M. Peng , X.H. Li and Q. Zhang. 2001. Identification of an 85-kb DNA fragment containing *pms1*, a locus for photoperiod-sensitive genic male sterility in rice. **Mol. Genet. Genomics** 266: 271-275.

- Lopez, M.T., T. Toojinda, A. Vanavichit and S. Tragoonrung. 2003. Microsatellite markers flanking the *tms2* gene facilitated tropical TGMS rice line development. **Crop Sci.** 43: 2267-2271.
- Lu Q., X.H. Li, D. Guo, C.G. Xu and Q. Zhang. 2005. Localization of *pms3*, a gene for photoperiod sensitive genic male sterility, to a 28.4-kb DNA fragment. **Mol. Genet. Genomics.** 273: 507-511.
- Lukuwitz, W., C.S. Grillmor and W.R. Scheible. 2000. Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genomic initiative working for you. **Plant Physiol.** 123: 795-806.
- Mei M.H., L. Chen, Z.H. Zhang, Z. Li, C. Xu and Q. Zhang. 1999. *Pms3* is the locus causing the original photoperiod-sensitive genic male sterility mutation of Nongken 58S. **Sci. China Ser. C-Life Sci.** 42: 316-322.
- Mei M.H., X.K. Dai, C.G. Xu and Q. Zhang. 1999. Mapping and genetic analysis of the genes for photoperiod-sensitive genic male sterility in rice using the original mutant Nongken 58S. **Crop Sci.** 39: 1711-1715.
- 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. 2009a. Fine mapping of a gene for non-pollen type thermosensitive genic male
- Peng, H.F., B.H. Wan, G.Q. Zhang, Y.P. Lu, G.Q. Zhou and X.H. Chen. 2009b. Microstructure observation of pollenless abortion in thermo and photoperiod-sensitive genic male sterile line N28S in rice (*Oryza sativa* L.). **Acta Bot. Yunnanica** 31: 15-20.
- Peng, H.F., Z.F. Zhang, B. Wu, X.H. Chen, G.Q. Zhang, Z.M. Zhang, B.H. Wan and Y.P. Lu. 2008c. Molecular mapping of two reverse photoperiod-sensitive genic male sterility gene (*rms1* and *rms2*) in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.** 118: 77-83. sterility in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.** 120: 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: 813-822.

Reddy, O.U.K., E.A. Siddiq, N.P. Sarma, J. Ali, A.J. Hussain, P. Nimmakayala, P. Ramasamy, S. Pammi and A.S. Reddy. 2000. Genetic analysis of temperature-sensitive male sterility in rice **Theor. Appl. Genet.** 100: 794-801.

Shen, Y.J., H. Jiang, J.P. Jin, Z.B. Zhang, B. Xi, Y.Y. He, G. Wang, C. Wang, L. Qian, X. Li, Q.B. Yu, H.J. Liu, D.H. Chen, J.H. Gao, H. Huang, T.L. Shi and Y. Zhong-Nan. 2004. Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. **Plant Physiol.** 135: 1198–1205.

Subudhi, P.K., R.K. Borkakati, S.S. Virmani and N. Huang. 1997. Molecular mapping of a thermosensitive genetic male-sterility gene in rice using bulked segregant analysis. **Genome** 40: 188-194.

Ting-you, H., W. Zhi, H. Yun-gao, S. Shou-pei, P. Tao, C. Xu-dong, S. Jun, X. Zu-fen and L. Ding-you. 2008. Genetic analysis and primary mapping of *pms4*, a photoperiod-sensitive genic male sterility gene in rice (*Oryza sativa*). **Rice Sci.** 15: 153-156.

Virmani, S.S., Z.X. Sun, T.M. Mou, A. Jauhar Ali and C.X. Mao. 2003. **Two-Line Hybrid Rice Breeding Manual**. International Rice Research Institute, P.O. Box 933, Manila.

36

Wang, Y.G., Q.H. Xing, Q.Y. Deng, F. S. Liang, L. P. Yuan, M. L. Weng and B. Wang. 2003. Fine mapping of the rice thermo-sensitive genic male-sterile gene *tms5*. **Theor. Appl. Genet.** 107: 917-921.

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 with molecular markers. **Theor. Appl. Genet.** 91: 1111-1114.

- Wang, C.H., P. Zhang, Z. R. Ma, Z. M. Zhang, G. Sun and D. Ling. 2004. Development of a genetic marker linked to a new thermo-sensitive male sterile gene in rice (*Oryza sativa* L.). **Euphytica** 140: 217-222.
- Woo M.O., T.H. Ham, H.S. Ji, M.S. Choi, W. Jiang, S.H. Chu, R. Piao, J.H. Chin, J.A. Kim, B.S. Park, H.S. Seo, N.S. Jwa, S. McCouch and H.J. Koh. 2008. Inactivation of the *UGPase1* gene causes genic male sterility and endosperm chalkiness in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant J.** 54: 190-204.
- 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.). **Theor. Appl. Genet.** 122: 365-372.
- Yamaguchi Y., R. Ikeda, H. Hirasawa, M. Mineo and U. Akio. 1997. Linkage analysis of the thermo-sensitive genic male sterility gene *Tms2* in rice (*Oryza sativa* L.). **Breed. Sci.** 47: 371-377.
- Yang, Q.K., C.Y. Liang, W. Zhuang, J. Li, H.B. Deng, Q.Y. Deng and B. Wang. 2007. Characterization and identification of the candidate gene of rice thermo-sensitive genic male sterile gene *tms5* by mapping. **Planta** 225: 321-330.
- Yu J.S., Y.R. Fan, N. Liu, Yan Shan, X. Li and Q. Zhang. 2007. Rapid genome evolution in *Pms1* region of rice revealed by comparative sequence analysis. **Chinese Sci. Bull.** 52: 912-921.
- Yuan, L.P. 1992. Technical strategy for breeding of PGMS and TGMS line. **Hybrid Rice** 1: 1-4.
- Yuan, L.p., X. Wu, F. Liao, G. Ma and Q. Xu. 2003. **Hybrid Rice Technology**. China Agriculture Press, Beijing,

Zhang Q.F., B.Z. Shen, X.K. Dai, M.H. Mei, M.A. Saghai Maroof, and Z.B. Li. 1994. Using bulked extremes and recessive class to map genes for photoperiod-sensitive genic male sterility in rice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 91: 8675-8679.





ตารางผนวกที่ 1 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าว TGMS และข้าวพันธุ์
ปกติที่ใช้ในการหาระยะห่างระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์
ประชากร F_2

ลำดับที่	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	โครโมโซม	ตำแหน่งบน	ผลการวิเคราะห์
			โครโมโซม (เมกะเบส)	
1	2gAP005058	2	5.8 Mb	polymorphic
2	2gAP003974	2	5.9 Mb	polymorphic
3	Os02g12050	2	6.25 Mb	polymorphic
4	2gAP004085	2	6.25 Mb	polymorphic
5	2gAP004086	2	6.27 Mb	polymorphic
6	Os02g12370	2	6.44 Mb	polymorphic
7	Os02g12350	2	6.45 Mb	polymorphic
8	2gAP005394	2	7.17 Mb	polymorphic
9	2gAP005756	2	7.26 Mb	polymorphic
10	2gAP004070	2	7.4 Mb	polymorphic

ตารางผนวกที่ 2 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีน *tgms* จากข้าว ID24 ที่พัฒนาขึ้นทั้งหมด เพื่อคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าว TGMS และ ข้าวพันธุ์ปกติ

ลำดับที่	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	โครโมโซม	ตำแหน่งบน	ผลการวิเคราะห์
			โครโมโซม (เมกะเบส)	
1	Os02g02400	2	0.82 Mb	polymorphic
2	Os02g02410	2	0.83 Mb	polymorphic
3	Os02g10290	2	5.40 Mb	monomorphic
4	Os02g10340	2	5.43 Mb	monomorphic
5	2gAP004869	2	5.67 Mb	polymorphic
6	Os02g10770-A	2	5.69 Mb	monomorphic
7	Os02g10770-B	2	5.69 Mb	monomorphic
8	2gAP004045	2	5.76 Mb	monomorphic
9	Os02g10870	2	5.76 Mb	monomorphic
10	2gAP005058	2	5.80 Mb	polymorphic
11	2gAP005008	2	5.86 Mb	monomorphic
12	2gAP003974-A	2	5.90 Mb	polymorphic
13	2gAP003974-B	2	6.15 Mb	monomorphic
14	2gAP004085-A	2	6.24 Mb	monomorphic
15	2gAP004085-B	2	6.25 Mb	polymorphic
16	Os02g12050	2	6.25 Mb	polymorphic
17	2gAP004086	2	6.27 Mb	polymorphic
18	Os02g12290-A	2	6.39 Mb	monomorphic
19	Os02g12290-B	2	6.39 Mb	monomorphic
20	Os02g12290-C	2	6.39 Mb	monomorphic
21	Os02g12290-D	2	6.39 Mb	monomorphic
22	Os02g12290-E	2	6.39 Mb	monomorphic

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	โครโมโซม	ตำแหน่งบน	ผลการวิเคราะห์
			โครโมโซม (เมกะเบส)	
23	Os02g12290-F	2	6.39 Mb	monomorphic
24	Os02g12300-A	2	6.39 Mb	monomorphic
25	Os02g12300-B	2	6.39 Mb	monomorphic
26	Os02g12300-C	2	6.39 Mb	monomorphic
27	Os02g12300-D	2	6.39 Mb	monomorphic
28	Os02g12300-E	2	6.39 Mb	monomorphic
28	Os02g12300-F	2	6.39 Mb	monomorphic
30	Os02g12300-G	2	6.39 Mb	monomorphic
31	Os02g12300-H	2	6.39 Mb	monomorphic
32	Os02g12300-I	2	6.39 Mb	monomorphic
33	Os02g12300-J	2	6.39 Mb	monomorphic
34	Os02g12300-K	2	6.39 Mb	monomorphic
35	Os02g12300-L	2	6.39 Mb	monomorphic
36	Os02g12300-M	2	6.39 Mb	monomorphic
37	Os02g12300-N	2	6.39 Mb	monomorphic
38	Os02g12300-O	2	6.39 Mb	monomorphic
39	Os02g12300-Q	2	6.40 Mb	monomorphic
40	2gAP004039-A	2	6.39 Mb	monomorphic
41	2gAP004039-B	2	6.39 Mb	monomorphic
42	2gAP004039-C	2	6.39 Mb	monomorphic
43	2gAP004039-D	2	6.39 Mb	monomorphic
44	2gAP004039-E	2	6.39 Mb	monomorphic
45	2gAP004039-F	2	6.39 Mb	monomorphic
46	2gAP004039-G	2	6.40 Mb	monomorphic

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	โครโมโซม	ตำแหน่งบน	ผลการวิเคราะห์
			โครโมโซม (เมกะเบส)	
47	2gAP004039-H	2	6.40 Mb	monomorphic
48	2gAP004039-I	2	6.40 Mb	monomorphic
49	Os02g12310-A	2	6.40 Mb	monomorphic
50	Os02g12310-B	2	6.40 Mb	monomorphic
51	Os02g12310-C	2	6.40 Mb	monomorphic
52	Os02g12310-D	2	6.40 Mb	monomorphic
53	Os02g12310-E	2	6.40 Mb	monomorphic
54	Os02g12310-F	2	6.40 Mb	monomorphic
55	Os02g12310	2	6.40 Mb	monomorphic
56	Os02g12320	2	6.40 Mb	monomorphic
57	Os02g12330	2	6.41 Mb	monomorphic
58	Os02g12340	2	6.42 Mb	monomorphic
59	Os02g12350	2	6.45 Mb	polymorphic
60	Os02g12370	2	6.44 Mb	polymorphic
61	Os02g12400	2	6.47 Mb	polymorphic
62	Os02g12420	2	6.47 Mb	monomorphic
63	Os02g12630	2	6.59 Mb	monomorphic
64	Os02g12700	2	6.64 Mb	monomorphic
65	Os02g12780	2	6.69 Mb	monomorphic
66	Os02g12910	2	6.81 Mb	monomorphic
67	Os02g12939	2	6.83 Mb	monomorphic
68	2gAP005826	2	6.87 Mb	monomorphic
69	2gAP004779-A	2	6.97 Mb	monomorphic

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	โครโมโซม	ตำแหน่งบน	ผลการวิเคราะห์
			โครโมโซม (เมกะเบส)	
70	2gAP004779-B	2	6.99 Mb	monomorphic
71	Os02g13170	2	7.01 Mb	monomorphic
72	Os02g13220	2	7.04 Mb	monomorphic
73	Os02g13360	2	7.12 Mb	monomorphic
74	Os02g13420-A	2	7.16 Mb	monomorphic
75	Os02g13420-B	2	7.16 Mb	monomorphic
76	Os02g13430	2	7.17 Mb	monomorphic
77	2gAP005394	2	7.17 Mb	polymorphic
78	2gAP005756	2	7.26 Mb	polymorphic
79	Os02g13640	2	7.31 Mb	monomorphic
80	2gAP004070	2	7.44 Mb	polymorphic
81	Os02g13890	2	7.54 Mb	monomorphic
82	Os02g34810	2	20.86 Mb	polymorphic
83	Os02g44870	2	27.15 Mb	monomorphic
84	Os02g56850	2	34.83 Mb	monomorphic

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวชนิษฐา แสงสว่าง
เกิดวันที่	26 เดือนมกราคม พ.ศ. 2531
สถานที่เกิด	อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)
ทุนการศึกษา	ทุนนักศึกษาปริญญาโทของศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)