สำนักหอสมุด
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
แม่โจ้ ๒๕๓๗
MAEJO UNIVERSITY

รายงานผลการวิจัย

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับยีนแก้ความเป็นหมันของเรณู ในข้าวไทยเพื่อใช้ในการผลิตข้าวลูกผสม

Development of DNA Marker Specific to Cytoplasmic Male Sterility Restorer Gene in Thai Rice for Hybrid Rice Production

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย: ประจำปี 2560

จำนวนเงิน 347,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นางสาวแสงทอง พงษ์เจริญกิต

ผู้ร่วมโครงการ นางสาววราภรณ์ แสงทอง และนางสาวช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

30 มิถุนายน 2561

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
ABSTRACT	2
กิตติกรรมประกาศ	3
คำนำ	4
สถานการณ์	4
ข้าวลูกผสม	4
การศึกษาในข้าวไทยที่ผ่านมา	5
เครื่องหมายดีเอ็นเอ	6
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	7
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
การตรวจเอกสาร	9
ความก้าวหน้าของการพัฒนาและผลิตข้าวลูกผสม	9
เทคโนโลยีข้าวลูกผสมแบบสามทาง	10
ระบบพันธุกรรม	10
ระบบ WA-CMS	12
ยีนแก้ความเป็นหมันที่ตำแหน่ง Rf4	15
ยีนแก้ความเป็นหมันที่ตำแหน่ง Rf3	16
เครื่องหมายจาเพาะกับยีนแก้วความเป็นหมันตำแหน่ง Rf3 และ Rf4	16
การจัดกลุ่มข้าวไทยด้วยการย้อมเรณูด้วยสารละลาย I_2–KI	17
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย	19
พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาทดลอง	19
วิธีการดำเนินการวิจัย	20
ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	40
สรุป	92
เอกสารอ้างอิง	93

5

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ยีนแก้ความเป็นหมัน *Rf* ของข้าวและการแปลรหัสเป็นโปรตีน ที่มีรายงานในฐานข้อมูล	14
ตารางที่ 2 ผลการจัดกลุ่มพันธุ์ B หรือพันธุ์ R ของพันธุ์ข้าว	18
ตารางที่ 3 พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาทดลอง	19
ตารางที่ 4 ลำดับเบสของเครื่องหมาย SSR	22
ตารางที่ 5 ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับเบสในฐานข้อมูลสาหรับยีนที่ตำแหน่ง Rf4	23
ตารางที่ 6 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจานวนยีนที่ตำแหน่ง Rf4 และขนาดที่ได้	25
ตารางที่ 7 ไพรเมอร์สำหรับยีนที่ตำแหน่ง Rf3	28
ตารางที่ 8 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนที่ตำแหน่ง Rf3 และขนาดที่ได้	30
ตารางที่ 9 พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดสอบความเป็นหมัน	33
ตารางที่ 10 ไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อใช้แยกความแตกต่างของยีน *PPR9*	35
ตารางที่ 11 ไพรเมอร์ Tetra-primer ARMS-PCR ที่ใช้แยกความแตกต่างของยีน *PPR10*	38
ตารางที่ 12 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมาย SSR ต่างๆ ที่ตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ	43
ตารางที่ 13 สรุปผลการเปรียบเทียบลาดับเบสของยีน 7 ยีน ที่ตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 จากข้าวที่นามาศึกษา	75
ตารางที่ 14 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายจำเพาะกับยีน *PPR9* และ *PPR10* จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ	90

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แผนภูมิการผลิตลูกผสมระบบ CMS/Rf ที่จะต้องใช้พันธุ์ข้าว 3 พันธุ์ ในการผลิตข้าวลูกผสม F_1	11
ภาพที่ 2 แผนที่ของยีนแก้ความเป็นหมัน *Rf* ที่ตำแหน่ง Rf4 บนโครโมโซมแท่งที่ 10	16
ภาพที่ 3 ผลการย้อมเรณูด้วยสารละลาย I_2–KI	17
ภาพที่ 4 ตำแหน่งของไพรเมอร์ Rf4 และจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณของแต่ละยีน	26
ภาพที่ 5 ตำแหน่งของไพรเมอร์ Rf3 และจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณ	31
ภาพที่ 6 บริเวณที่ออกแบบไพรเมอร์สำหรับแยกความแตกต่างของยีน *PPR9*	35
ภาพที่ 7 บริเวณที่ออกแบบไพรเมอร์สำหรับแยกความแตกต่างของยีน *PPR10*	37
ภาพที่ 8 ผลการเพิ่มจำนวนจาก Tetra-primer ARMS-PCR ของยีน *PPR10*	38
ภาพที่ 9 ผลการทำ 1% agarose gel electrophoresis ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ	40
ภาพที่ 10 ผลการทำ 4% agarose gel electrophoresis ของเครื่องหมาย SSR จำนวน 12 เครื่องหมาย	42
ภาพที่ 11 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *PPR7*	46
ภาพที่ 12 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *PPR9*	49
ภาพที่ 13 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *PPR10*	52
ภาพที่ 14 ผลการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ กข47 จากยีนแก้ความเป็นหมัน ตำแหน่ง Rf3	56
ภาพที่ 15 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอของยีน *Os01g09560* (Mitochondrial-processing peptidase subunit α)	57
ภาพที่ 16 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสยีน *Os01g09670* (pollen-specific protein)	64
ภาพที่ 17 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Os01g10090* (PPR protein)	67
ภาพที่ 18 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Os01g10800* (PPR protein)	70
ภาพที่ 19 ลักษณะดอกข้าวสายพันธุ์ A ที่ใช้ในการศึกษา	78
ภาพที่ 20 ลักษณะดอกข้าวลูกผสมรุ่นที่ 1 ที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์ A และสายพันธุ์ B ที่ใช้ในการศึกษา	79

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 21 ลักษณะดอกข้าวลูกผสมรุ่นที่ 1 ที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์ A และ สายพันธุ์ R ที่ใช้ในการศึกษา 80

ภาพที่ 22 ผลการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Indel_PPR9 82

ภาพที่ 23 ผลการเปรียบเทียบลาดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยใช้ไพรเมอร์ Indel_PPR9 84

ภาพที่ 24 ผลการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SNP_PPR10 86

ภาพที่ 25 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ SNP_PPR10 88

ภาพที่ 26 ผลการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ด้วยเครื่องหมาย RMS_PPR9_1 และ RMS_PPR9_4 89

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับยีนแก้ความเป็นหมันของเรณู ในข้าวไทยเพื่อใช้ในการผลิตข้าวลูกผสม

Development of DNA Marker Specific to Cytoplasmic Male Sterility Restorer Gene in Thai Rice for Hybrid Rice Production

แสงทอง พงษ์เจริญกิต วราภรณ์ แสงทอง ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์

Saengtong Pongjaroenkit, Varaporn Sangtong, Chotipa Sakulsingharoj

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

ระบบแก้ความเป็นหมันของเรณูโดยยีนในไซโทพลาซึม (wild abortive/ WA cytoplasmic male sterility or WA-CMS) ควบคุมด้วยยีนแก้ความเป็นหมันของเรณู (pollen fertility-restoring gene: *Rf*) ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความต่างของยีนเครื่องหมายแก้ความเป็นหมันตำแหน่ง Rf4 และ Rf3 ที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 10 และ 1 ตามลำดับ ในข้าวบางพันธุ์โดยสามารถแยกยีนเครื่องหมายที่ตำแหน่ง Rf4 3 ยีน และตำแหน่ง Rf3 4 ยีน จากข้าวไทย จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนเครื่องหมายทั้ง 7 ยีน ดังกล่าว พบบริเวณที่ต่างกัน เพื่อนำมาจำแนกกลุ่มพันธุ์ข้าวที่สามารถแก้ความเป็นหมัน 2 บริเวณ คือ บริเวณลำดับเบสเพิ่มขึ้นหรือลดลง 105 คู่เบส ในยีนเครื่องหมายโมเลกุล *PPR9* (pentatricopeptide_repeat) และบริเวณเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเพียง 1 เบส (SNP) ที่เบส 1,392 ในยีนเครื่องหมาย *PPR10* ซึ่งเป็นยีนเครื่องหมายที่ตำแหน่ง Rf4 จึงได้ออกแบบเป็นเครื่องหมาย InDel_PPR9 และ SNP_PPR10 เมื่อทดสอบยีนเครื่องหมายจำเพาะกับยีน *PPR9* 3 เครื่องหมาย คือ InDel_PPR9, RMS_PPR9_1 และ RMS_PPR9_4 พบว่าแต่ละเครื่องหมายมีความถูกต้องในการจำแนกตามกลุ่มของพันธุ์ข้าวที่สามารถแก้ความเป็นหมัน 81, 88 และ 94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมาย SNP_PPR10 มีความถูกต้องในการจำแนกพันธุ์ตามกลุ่มของข้าวที่มีความสามารถในการแก้ความเป็นหมันเรณู 87 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบยีนเครื่องหมาย RM3148 มีความถูกต้องในการจำแนกพันธุ์ตามกลุ่มของข้าวที่มีความสามารถในการแก้ความเป็นหมันเรณูตำแหน่ง Rf3 สูงที่สุด คือ 75 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นยีนเครื่องหมายที่เป็นประโยชน์ในการศึกษาการแก้ความเป็นหมันเรณูโดยยีนในไซโทพลาซึมของข้าวไทยและในการปรับปรุงข้าว

ไทยพันธุ์ดีให้มีความสามารถในการแก้ความเป็นหมันเรณูในยีนทั้ง 2 ตำแหน่ง คือ ยีนเครื่องหมายจำเพาะกับยีน RMS_PPR9_4 และ เครื่องหมาย RM3148

คำสำคัญ: ข้าวไทย, ยีนแก้ความเป็นหมันของเรณู, ยีนเครื่องหมายพีพีอาร์ (pentatricopeptide repeat or PPR gene), เครื่องหมายดีเอ็นเอ (ยีนเครื่องหมาย)

ABSTRACT

Pollen fertility restoration in wild abortive cytoplasmic male sterility (WA-CMS) system in rice is involved by two major pollen fertility-restorer loci, Rf4 and Rf3 which are on chromosomes 10 and 1, respectively. In this study, three DNA marker genes at Rf4 locus and four genes at Rf3 locus or position were isolated from some Thai rice varieties. The DNA or nucleotide sequence comparison of these 7 marker genes revealed or indicated 2 regions, which can classify or identify the studied rice varieties into pollen fertility restorer and nonrestorer, are 105 bp InDel region in *PPR9* marker gene and SNP at base 1,392 in *PPR10* marker gene. These 2 regions were designed as gene specific DNA marker for Rf4 locus which are InDel_PPR9 and SNP_PPR10 respectively. The efficiency in identification of pollen fertility restorers and maintainers of gene specific markers was investigated. Three *PPR9* specific gene markers, InDel_PPR9, RMS_PPR9_1 and RMS_PPR9_4, displayed or gave 81, 88 and 94% selection or identification efficiency, respectively. The SNP_PPR10 showed or gave selection or identification efficiency of 87%. Moreover, RM3148, which was SSR maker at Rf3 locus, showed highest selection efficiency of 75%. Therefore, RMS_PPR9_4 and RM3148 gene markers could be helpful or useful in accurate identification of pollen fertility restorer lines or varieties as well as in transfer of these two pollen fertility restorer genes into other good Thai rice varieties through marker-assisted breeding.

Keywords: Thai rice, pollen fertility-restoring gene, pentatricopeptide repeat (PPR) marker gene, DNA marker

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูในข้าวไทย เพื่อใช้ในการผลิตข้าวลูกผสม (Development of DNA Marker Specific to Cytoplasmic Male Sterility Restorer Gene in Thai Rice for Hybrid Rice Production) ซึ่งได้ดำเนินการสำเร็จลุล่วง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2559-2560

ขอขอบคุณนางสาวกนกวรรณ จันทร์เพ็ญ ที่มีส่วนร่วมในการดำเนินการวิจัยของโครงการนี้

ผู้วิจัย

คำนำ

สถานการณ์

ข้าวเป็นพืชอาหารที่สำคัญของประเทศในทวีปเอเชีย จากแนวโน้มของประชากรเพิ่มขึ้น ทำให้ความต้องการบริโภคข้าวเพิ่มขึ้น ในขณะที่พื้นที่เพาะปลูก ปริมาณน้ำ และแรงงานในการผลิตข้าวลดลง ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงของภูมิอากาศทำให้ปริมาณผลผลิตของข้าวลดลง จำเป็นต้องหาวิธีการเพิ่มผลผลิตให้เหมาะสมซึ่งการเพิ่มผลผลิตของข้าวทำได้หลายวิธี เช่น การเพิ่มพื้นที่เพาะปลูก ที่ทำได้ยากในทางปฏิบัติ เนื่องจากพื้นที่เพาะปลูกพืชทางการเกษตรลดลง ทำให้มีความต้องการพันธุ์ข้าวที่ให้ผลผลิตต่อพื้นที่เพิ่มขึ้น โดยจากการพัฒนาพันธุ์ข้าว พบว่า การใช้เทคโนโลยีข้าวลูกผสมเป็นวิธีที่ให้ผลผลิตสูงขึ้นกว่าข้าวพันธุ์พ่อแม่ที่เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ (pure line) ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ (สำนักวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าว กรมการข้าว, 2555)

ปัจจุบัน ประเทศไทยมีผลผลิตข้าวต่อไร่ที่ 430 กิโลกรัม ในขณะที่ประเทศผู้ผลิตข้าวที่เป็นคู่แข่งทางการค้าของไทย มีผลผลิตข้าวต่อไร่มากกว่าไทย โดยประเทศดังกล่าวได้ใช้เทคโนโลยีข้าวลูกผสม เมื่อพิจารณาแล้ว จะเห็นว่า ผลผลิตข้าวต่อไร่ของประเทศไทยต่ำกว่าประเทศผู้ผลิตข้าวอื่น ๆ (ทันข่าว CP., 2554) ใน

ขณะที่ประเทศไทยมีพันธุ์ข้าว ซึ่งเป็นพันธุ์แท้ที่มีคุณลักษณะทางเกษตรที่ดีจำนวนมาก แต่พันธุ์ดังกล่าวให้ผลผลิตต่อไร่ต่ำกว่าพันธุ์ลูกผสม ดังนั้น ประเทศไทยจึงควรพัฒนาสายพันธุ์เพื่อผลิตข้าวลูกผสมจากฐานพันธุกรรมของข้าวไทยพันธุ์ดีที่มีอยู่ เพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวไทยที่มีทั้งลักษณะทางการเกษตรดีและให้ผลผลิตสูง

ข้าวลูกผสม

ข้าวลูกผสม (hybrid rice) หมายถึง ต้นข้าวที่เกิดจากเมล็ดพันธุ์ที่เป็นลูกผสมรุ่นที่ 1 (F_1)ที่ได้จากการถ่ายละอองเรณูหรือผสมข้ามพันธุ์ (cross pollination) ระหว่างข้าว 2 พันธุ์หรือสายพันธุ์ ที่มีลักษณะดีและมีฐานทางพันธุกรรมที่ต่างกัน โดยลูกผสมที่ได้จะมีจีโนไทป์ในสภาพเฮทเทอโรไซกัส (heterozygous) ซึ่งเป็นเมล็ดลูกผสมรุ่นที่ 1 (F_1 seed) เมื่อนำไปปลูกแล้วจะ แสดงความ

แข็งแรงและให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ อันเนื่องมาจากความดีเด่นของลูกผสม (heterosis or hybrid vigor)

เทคโนโลยีข้าวลูกผสมที่น่าสนใจใช้ระบบ 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์เรณู (pollen) หรือเกสรเพศผู้ (stamen) เป็นหมันด้วยปัจจัยหรือยีนในไซโทพลาสซึม (cytoplasmic male sterite/cms or A line) พันธุ์รักษาพันธุ์เรณูเป็นหมัน (B line; pollen fertile line or maintainer) และพันธุ์แก้ความเป็นหมันของเรณู (genic pollen fertility restorer or R line) โดยที่ลักษณะเรณูเป็นหมันควบคุมโดยยีนที่อยู่ในไซโทพลาซึม (cytoplasmic male or pollen sterility; cms) ทำให้เรียกสายพันธุ์ A (A line) เป็น cms line ส่วนสายพันธุ์ B (B line) เป็นสายพันธุ์คู่แฝดหรือเหมือน (isogenic line) ของสายพันธุ์ A แต่เรณูไม่เป็นหมัน จึงใช้เป็นสายพันธุ์พ่อในการรักษาหรือผลิตเมล็ดพันธุ์ จึงเรียกว่าเป็น maintainer line ส่วนสายพันธุ์ R (R line) นั้น จะมียีนเกี่ยวกับแก้ความเป็นหมัน (pollen fertility restorer gene; *Rf/rf*) อยู่ในนิวเคลียส จึงใช้เป็นสายพันธุ์พ่อ (สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าว. 2557) เป็นระบบที่เกี่ยวข้องกับทั้งยีนในนิวเคลียสและในไซโทพลาซึม (genic-cytoplasmic male or pollen sterility) ซึ่งจีโนไทป์ของสายพันธุ์ A, B และ R คือ cms (*rfrf*), F (*rfrf*) และ F (*RfRf*) or cms (*RfRf*) ตามลำดับ โดยภายในวงเล็บ คือ จีโนไทป์ของยีนภายในนิวเคลียส *Rf* เป็นสภาพเด่น *rf* เป็นสภาพด้อย ส่วนนอกวงเล็บเป็นยีนหรือปัจจัยควบคุมความเป็นหมันของเรณู (pollen sterility) ที่อยู่ในไซโทพลาซึม โดย cms (cytoplasmic male หรือ pollen sterile) คือ เรณูเป็นหมัน และ F (fertile) คือ เรณูไม่เป็นหมันหรือปกติ

การศึกษาในข้าวไทยที่ผ่านมา

พันธุ์ข้าวไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมและมีลักษณะที่ดีทางการเกษตร ที่น่าจะสามารถนำมาใช้ในการผลิตข้าวลูกผสม โดยนำหลักการของความแข็งแรงหรือความดีเด่นของลูกผสมมาใช้ประโยชน์ ทำให้การตรวจสอบความสามารถในการแก้ความเป็นหมันของเรณู (แก้เรณูเป็นหมัน) ของพันธุ์ข้าวไทยเป็นปัจจัยที่สำคัญในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวไทย เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ R หรือสายพันธุ์ B ในการผลิตลูกผสม ซึ่งวิธีการตรวจสอบที่ใช้ทั่วไปในปัจจุบันคือ การนำพันธุ์ที่ต้องการทดสอบผสมข้ามกับข้าวสายพันธุ์ A ได้เป็นลูกรุ่นที่ 1 จากนั้น นำเรณู (anther) ของลูกรุ่นที่ 1 ไปย้อมด้วยสารละลายไอโอดีนโพแทสเซียมไอโอไดด์ (I_2 – KI) เพื่อตรวจสอบความเป็นหมัน

ของละอองเกสรหรือละอองเรณู (pollen grain) หากละอองเรณูของลูกรุ่นที่ 1 เป็นหมันแสดงว่าพันธุ์ทดสอบไม่มียีนแก้ความเป็นหมันของเรณูในนิวเคลียส จะใช้เป็นสายพันธุ์ B ที่จะนำไปพัฒนาต่อไปเป็นสายพันธุ์ A ด้วยการผสมข้ามกับสายพันธุ์ที่มีลักษณะเรณูหรือเกสรเพศผู้เป็นหมันเนื่องจากปัจจัยหรือยีนในไซโทพลาซึม (cytoplasmic male หรือ pollen sterile หรือ cms) หากเรณูของลูกรุ่นที่ 1 ไม่เป็นหมัน แสดงว่า พันธุ์ทดสอบมียีนแก้ความเป็นหมันของเรณูในนิวเคลียส จะสามารถใช้เป็นสายพันธุ์ R (Seesang *et al.*, .2014) ซึ่งวิธีนี้จะต้องอาศัยการผสมข้ามที่ใช้เวลา และความเชี่ยวชาญของผู้ทดสอบและตรวจสอบความเป็นหมันของละอองเรณู ดังนั้นหากนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการแก้ความเป็นหมันของเรณูของข้าวไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลหรือดีเอ็นเอ (DNA marker) เพื่อใช้พันธุ์ข้าวไทยเป็นสายพันธุ์ B หรือสายพันธุ์ R จะทำให้การคัดเลือกรวดเร็วและถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

เครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับยีนนั้นเป็นเครื่องหมาย ที่ให้ผลการคัดเลือกแม่นยำ จากการตรวจข้อมูลจากเอกสาร พบยีนหลักที่เกี่ยวข้องกับการแก้ความเป็นหมันของเรณู ในข้าวลูกผสมระบบที่ยีนหรือปัจจัยควบคุมเรณูเป็นหมันเนื่องจากไซโทพลาซึม (cytoplasmic male หรือ stamen/pollem sterile) ส่วนยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูอยู่ในนิวเคลียสเป็นระบบที่นิยมใช้ (wild abortive cytoplasmic male sterility หรือ cms WA) คือ ยีน *Rf3/rf3* และยีน *Rf4/rf4* โดยยีนอยู่ในสภาพเด่น (*Rf3_Rf4_*) จะสามารถแก้ความเป็นหมันของเรณูที่อยู่ในไซโทพลาซึมของสายพันธุ์ A ได้ หากยีนอยู่ในสภาพด้อย (*rf3rf3rf4rf4*) จะไม่สามารถแก้ความเป็นหมันของเรณูได้ (Chen and Liu, 2014) ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้ จะพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเฉพาะกับยีนแก้ความเป็นหมันของเรณู ที่สามารถใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวไทยพันธุ์ที่มีจีโนไทป์ *Rf3Rf3* หรือ *Rf4Rf4* (R line) และข้าวไทยพันธุ์ที่มีจีโนไทป์ *rf3rf3* หรือ *rf4rf4* (B line) เพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบและคัดเลือกพันธุ์ข้าวไทย เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ R หรือสายพันธุ์ B ในการพัฒนาและผลิตข้าวไทยให้เป็นข้าวลูกผสมต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- เพื่อค้นหาตำแหน่งยีนที่คาดว่าจะเป็นยีน *Rf3/rf3* หรือยีน *Rf4/rf4*
- เพื่อศึกษาความหลากหลายของยีนเครื่องหมายเกี่ยวกับ *Rf3/rf3* หรือยีน *Rf4/rf4* ของข้าวไทย
- เพื่อพัฒนายีนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับยีนแก้ความเป็นหมันของเรณู
- เพื่อจัดกลุ่มข้าวไทยด้วยลักษณะการแก้ความเป็นหมันของเรณูที่ควบคุมด้วยยีน *Rf3/rf3* หรือยีน *Rf4/rf4* ที่เป็นยีนในนิวเคลียส

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เนื่องจากโครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยต่อเนื่อง 2 ปี ตั้งแต่ปี 2559-2560 โดยส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยใช้เป็นวิทยานิพนธ์ของนักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ในหัวข้อวิทยานิพนธ์ "การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในข้าวไทย" และได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2558 ประเภทบัณฑิตศึกษา ให้กับนางสาวกนกวรรณ จันทร์เพ็ญ

ผลงานจากโครงการวิจัยนี้ได้ตีพิมพ์บทความ 3 บทความ ได้แก่

กนกวรรณ จันทร์เพ็ญ วราภรณ์ แสงทอง ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ และแสงทอง พงษ์เจริญกิต (2558) ความผันแปรของลำดับเบสบางส่วนของยีนแก้ความเป็นหมัน (*Rf4*) ของเกสรตัวผู้จากข้าวไทย. ใน การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 19 "พันธุศาสตร์และจีโนมิกส์; จากการศึกษาระดับโมเลกุลสู่การประยุกต์". (หน้า 295-302). จัดโดยสมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย.

Saengtong Ponjaroenkit, Kanokwan Janpen, Chotipa Sakulsingharoj and Varaporn Sangtong. (2017). Development of allele-specific SNP markers for *PPR10* gene at *Rf4* locus of Fertility Restorer Gene for Identification of Maintainer and Restorer lines. Genomics and Genetics. 10(1&2): 38-45.

ทุเรียน ทาเจริญ กนกวรรณ จันทร์เพ็ญ ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ วราภรณ์ แสงทอง และแสงทอง พงษ์เจริญกิต. (2560). การจัดกลุ่มข้าวไทยด้วยยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูในระบบข้าวลูกผสมสามสายพันธุ์. รายงานการประชุมทางวิชาการประจำปี 2560. 7-8 ธันวาคม 2560 ณ ศูนย์การศึกษาและฝึกอบรมนานาชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. หน้า 291-298.

การตรวจเอกสาร

ความก้าวหน้าของการพัฒนาและผลิตข้าวลูกผสม

ประเทศจีนเป็นประเทศแรกที่พัฒนาข้าวลูกผสมเป็นผลสำเร็จ โดยศาสตราจารย์ หยวน หลงผิง (Prof. Yuan Longping) ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาข้าวลูกผสมแห่งชาติจีน (China National Hybrid Rice Research and Development Center) นอกจากนี้ องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization–FAO) สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (International Rice Research Institute-IRRI) สำนักงานโครงการพัฒนาแห่งสหประชาชาติ (United Nation Development Programme–UNDP) ธนาคารเพื่อการพัฒนาเอเชีย (Asian Development Bank-ADB) ยังสนับสนุนการปรับปรุงพันธุ์และพัฒนาพันธุ์และเผยแพร่ข้าวลูกผสมแก่ประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกกว่า 17 ประเทศ ทำให้ปัจจุบัน มีมากกว่า 40 ประเทศ ที่ปลูกข้าวลูกผสม (ทันข่าว CP, 2554)

สามารถแบ่งข้าวลูกผสมเป็น 2 ประเภท คือ ระบบลูกผสมแบบสามทาง ใช้พันธุ์แม่ที่มีเรณูเป็นหมัน ซึ่งควบคุมโดยยีนในไซโทพลาซึม (cytoplasmic male sterility; cms) และระบบลูกผสมแบบสองทาง ใช้พันธุ์แม่มีเรณูเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีนในนิวเคลียส (genic male sterility; gms) ซึ่งอาจเป็น photoperiod sensitive genic male sterility (PGMS) หรือ thermo-sensitive genic male sterility (TGMS) ที่เรณูจะเป็นหมัน ภายใต้สภาพวันหรือช่วงกลางวันหรือแสงยาว หรืออุณหภูมิสูง โดยระบบลูกผสมแบบสามทางที่เรณูเป็นหมัน เนื่องจากยีนในไซโทพลาซึม (cms) เป็นเทคโนโลยีที่มีการพัฒนาอย่างกว้างขวางและนิยมใช้ ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมมากกว่าลูกผสมแบบสองทาง ที่เรณูเป็นหมันเนื่องจากยีนในนิวเคลียส (gms) เนื่องจากการเป็นหมันของเรณูจะขึ้นกับสภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้ยาก โดยที่ใน cms ของพืชอาหาร 13 ชนิด พบว่า เกิดจากความผิดปกติของยีนภายในไมโทคอนเดรียในไซโทพลาซึม ซึ่งความผิดปกตินั้น มักเกิดจากการจัดเรียงตัวใหม่ (rearrangement) ของสารพันธุกรรมหรือยีนในไมโทคอนเดรีย ซึ่งยีนที่มักจะผิดปกติเป็นยีนในกลุ่ม mitochondrial electron transfer chain pathway ทำให้การสร้างพลังงานบกพร่อง จนในที่สุดทำให้เรณูเป็นหมัน (Chen and Liu, 2014)

เทคโนโลยีข้าวลูกผสมแบบสามทาง

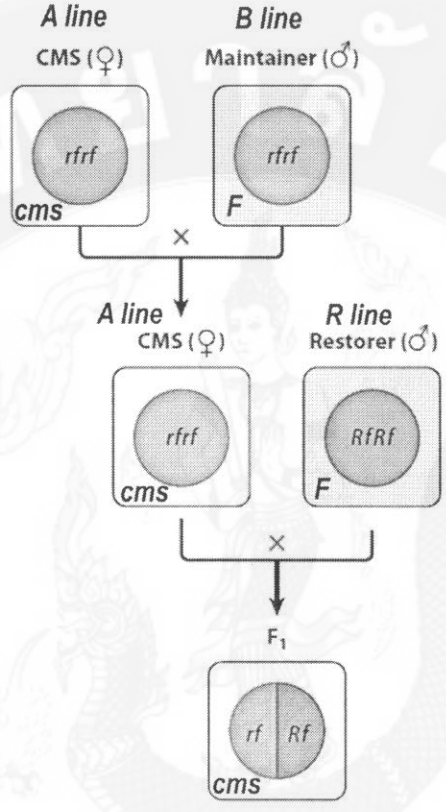
เทคโนโลยีข้าวลูกผสมที่น่าจะดำเนินการได้ดีในไทย ควรเป็นระบบ 3 สายพันธุ์ ในลักษณะสภาพความเป็นหมันของเรณูเกี่ยวข้องกับยีนทั้งในไซโทพลาซึมและนิวเคลียส (genic-cytoplasmic male sterility or cms) คือ สายพันธุ์เรณูหรือเกสรเพศผู้เป็นหมัน (A line) สายพันธุ์รักษาพันธุ์เรณูเป็นหมัน (B line) และสายพันธุ์แก้ความเป็นหมัน (R line) โดยที่ลักษณะเรณูเป็นหมันควบคุมโดยยีนที่อยู่ในไซโทพลาซึม (cytoplasmic male sterility; cms) ทำให้เรียกสายพันธุ์ A (A line) เป็น cms line (สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าว, 2557) ส่วนสายพันธุ์ B (B line) เป็นสายพันธุ์คู่แฝดหรือคู่เหมือน (isogenic line) ของสายพันธุ์ A (A line) แต่เกสรเพศผู้ไม่เป็นหมัน จึงใช้เป็นสายพันธุ์พ่อในการรักษาพันธุ์ จึงเรียกว่าเป็น maintainer line ส่วนสายพันธุ์ R (R line) นั้น จะมียีนแก้ความเป็นหมันของเรณู (pollen fertility restorer gene; *Rf/rf*) อยู่ในนิวเคลียส ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อ โดยการผลิตข้าวลูกผสมเป็นการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ A กับสายพันธุ์ R ได้ลูกผสมรุ่นที่ 1 (F_1) ที่ไม่เป็นหมัน ที่มีลักษณะดีเด่นกว่าพันธุ์พ่อแม่ ดังภาพที่ 1

ระบบพันธุกรรม

การผลิตลูกผสมระบบ 3 ทาง หรือใช้สายพันธุ์ A, B และ R โดยมีไซโทพลาสซึมเป็นหมันและยีนแก้ความเป็นหมันเกี่ยวข้อง (cms/*Rf*) ที่นิยมใช้ สามารถแบ่งได้เป็น 3 ระบบหลัก ได้แก่ wild-rice abortive (WA), Bao Tai (BT) และ Hong Lian (HL) โดยแต่ละระบบจะมียีนควบคุมความเป็นหมันซึ่งเป็นยีนในไซโทพลาซึม และยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูที่อยู่ภายในนิวเคลียสต่างกัน ดังนี้

ระบบ BT-cms เป็นลักษณะที่ได้มีการศึกษาเป็นลักษณะแรกโดย Weeraratne ค.ศ. 1954 (Bohra *et al.*, 2016) พบในข้าวพันธุ์ Chinsurah Boro II (*Oryza. sativa indica*) มีลักษณะความเป็นหมันแบบ gametophytic cms ควบคุมโดยยีนในไมโทคอนเดรีย *atp6/orf79* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ตำแหน่งด้านหลังของยีน *atp6* โดยเป็นรหัสของโปรตีน cytotoxic peptide (Wang *et al.*, 2013 ; Huang *et al.*, 2014) มียีนแก้ความเป็นหมันของเรณู 2 ยีน คือ ยีน *Rf1a* และ *Rf1b* เป็นรหัสของโปรตีน pentatricopeptide repeat (PPR) ทั้ง 2 ยีน จะอยู่ที่ตำแหน่ง Rf1 (Huang *et al.*, 2014 ; Hu *et al.*, 2014) บนโครโมโซมแท่งที่ 10 (Bohra *et al.*, 2016) ยีน *Rf1a* เป็นรหัสของโปรตีนมีความยาว 266

กรดอะมิโน เมื่อเกิดการกลายพันธุ์แบบ frame shift ทำให้โปรตีนสั้นลง ได้เป็น *rf1a* แต่ในยีน *rf1b* นั้น จะพบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส 1 ตำแหน่ง จาก A^{1235} เป็น G ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Asn^{412} เป็น Ser จึงทำให้โปรตีนที่ได้ต่างจาก *Rf1b* (Huang *et al.*, 2014)



ภาพที่ 1 แผนภูมิการผลิตลูกผสมระบบ CMS/Rf ที่จะต้องใช้พันธุ์/สายพันธุ์ข้าว 3 พันธุ์ ในการผลิตข้าวลูกผสม F_1 ได้แก่ A, B และ R lines โดยที่ภายในวงกลมคือ จีโนไทป์ของยีนภายในนิวเคลียส *Rf* เป็นสภาพเด่น สามารถแก้ความเป็นหมันของเรณู และ *rf* เป็นสภาพด้อย ส่วนนอกวงกลมเป็นยีนความเป็นหมันหรือปัจจัยควบคุมที่อยู่ในไซโทพลาซึม cms คือ เรณูเป็นหมัน และ F (fertile) คือ เรณูไม่เป็นหมัน ดัดแปลงจาก Chen and Liu, 2014

ระบบ HL-cms พบในข้าวที่ได้จากการผสมกลับ (backing)ของข้าว red-awned wild rice (*O. rufipogon*) กับข้าวพันธุ์ Liantangzao (*O. sativa indica*) (Huang *et al.*, 2014) จากมณฑลไหหลำ ประเทศจีน มีลักษณะความเป็นหมันแบบ gametophytic cytoplasmic male sterility ที่ควบคุมโดยยีนในไมโทคอนเดรีย *atp6/orfH79* ซึ่งเป็นยีนที่ตำแหน่งข้างเคียงของ *atp6* หากเปรียบเทียบลำดับเบสของ *orfH79* กับ *orf79* จะพบว่า มีความคล้ายกันถึง 98 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้

เห็นว่า *atp6/orf79* และ *atp6/orfH79* มีต้นกำเนิดเดียวกัน (Wang *et al.*, 2013) ซึ่งโปรตีนของยีน *atp6/orfH79* จะเข้าจับกับโปรตีน P61 ซึ่งเป็นกลุ่มของ electron transport chain (ETC) complex III (Huang *et al.*, 2014) ส่งผลทำให้เกิดการแท้งหรือฝ่อ ทำให้ไม่ติดเมล็ด เนื่องจากเรณูผิดปกติ (Wang *et al.*, 2013) มียีนแก้ความเป็นหมันของเรณู 2 ยีน ได้แก่ ยีน *Rf5* และ *Rf6* ซึ่งตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 10 และ 8 ตามลำดับ (Bohra et al., 2016) หากมียีนแก้ความเป็นหมันเฉพาะยีน *Rf5* หรือ *Rf6* (Hu et al., 2014) จะสามารถแก้ความเป็นหมันของลูกรุ่นที่ 1 ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ แต่หากมีทั้งยีน *Rf5* และ *Rf6* จะสามารถแก้ความเป็นหมันในลูกรุ่นที่ 1 ได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ (Huang et al., 2014)

ระบบ WA-cms ซึ่งเป็นรูปแบบที่มีการศึกษามากที่สุด พบในข้าวพันธุ์ Zhenshan 97A (*O. sativa indica*) มีลักษณะความเป็นหมันแบบ sporophytic cytoplasmic male sterility ซึ่งจะมีรูปแบบการเป็นหมันที่ต่างจาก BT-cms และ HL-cms (*Hu et al.*, 2014) โดยการเป็นหมันในแบบนี้เกิดจากยีนในไมโทคอนเดรียชื่อ *WA352* ที่ได้มาจากการรวมกันของยีน *orf284, orf224* และ *orf288* กับอีกหนึ่งยีนที่ยังไม่ทราบตำแหน่งที่ตั้งของยีนซึ่งโปรตีน WA352 นั้น จะพบเฉพาะในส่วนของอับเรณูโดยจะเข้าจับกับโปรตีน OsCOX11 ทำให้โปรตีน OsCOX11 ไม่สามารถทำงาน โปรตีน OsCOX11 เป็นโปรตีนที่สร้างจากยีนในนิวเคลียส จะถูกส่งมายังไมโทคอนเดรียเพื่อทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ cytochrome *c* oxidase (Huang *et al.*, 2014) และพบยีนหลักที่ควบคุมการแก้ความเป็นหมันของเรณูมี 2 ตำแหน่ง ได้แก่ยีนที่ตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 โดยยีนทั้งสองตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 และ 10 ตามลำดับ (Hu *et al.*, 2014 ; Bohra *et al.*, 2016) โดยพบว่า หากยีนที่ตำแหน่ง Rf4 มีลักษณะเด่น (*Rf4Rf4/Rf4rf4*) แต่ยีนที่ตำแหน่ง Rf3 มีลักษณะด้อย (*rf3rf3*) จะทำให้ปริมาณของอาร์เอ็นเอ *WA352* ลดลงจากเดิม 20 ถึง 25 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อศึกษาถึงกลไกการทำงานของยีน พบว่า ยีนที่ตำแหน่ง Rf4 จะเป็นตัวจับกับอาร์เอ็นเอ *WA352* และยีนที่ตำแหน่ง Rf3 จะเป็นตัวควบคุมการแปลรหัสเป็นโปรตีน WA352 (Huang *et al.*, 2014)

ระบบ WA-cms (wild abortive cytoplasmic male sterility)

เนื่องจากระบบ WA-cms เป็นระบบที่นิยมใช้ในการผลิตข้าวลูกผสมในประเทศจีนและอินเดีย จึงได้มีการศึกษายีนแก้ความเป็นหมันเป็นจำนวนมาก ซึ่งพบว่า มียีนหลักที่ควบคุมการแก้ความเป็นหมันของเรณู 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่ง Rf3 และตำแหน่ง Rf4 ซึ่งยีนทั้งสองตำแหน่งมีการทำงานร่วมกัน พบว่า ตำแหน่ง Rf4 จะแก้ความเป็นหมันของเรณูมากกว่าตำแหน่ง Rf3 เล็กน้อย

(Tan *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2013; Mehrajuddin *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2014) นอกจากนี้ ยังมีการใช้ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของจีโนมข้าวและเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR มาศึกษาเกี่ยวกับยีนที่ตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 พบเครื่องหมาย SSR ที่ใกล้ชิดกับยีนทั้งสอง โดยตำแหน่ง Rf3 มี 7 เครื่องหมาย ส่วนตำแหน่ง Rf4 มี 7 เครื่องหมาย และสามารถพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอต่อยีน ที่คาดว่าจะเป็นยีน *Rf3* และยีน *Rf4* ซึ่งยีนที่คาดว่าจะเป็นยีนที่ตำแหน่ง Rf3 ได้แก่ ยีนของโปรตีน mitochondrial-processing peptidase, pollen specific protein และโปรตีนในกลุ่ม pentatricopeptide repeat (PPR protein) ส่วนยีนที่คาดว่าจะเป็นยีนที่ตำแหน่ง Rf4 จะเป็นยีนของโปรตีนในกลุ่ม PPR protein (Suresh *et al.*, 2012) ซึ่งโปรตีนกลุ่ม PPR เป็นกลุ่มของโปรตีนที่จับอาร์เอ็นเอ (RNA binding protein) ที่จะทำหน้าที่เกี่ยวกับการดัดแปลงอาร์เอ็นเอ เช่น editing, splicing, cleavage, degradation เพื่อทำหน้าที่แก้ไข ดัดแปลงอาร์เอ็นเอของยีนที่ผิดปกติภายในไมโทคอนเดรีย ให้กลับมาเป็นอาร์เอ็นเอปกติ เมื่อเกิดการแปลรหัสเป็นโปรตีน จะได้โปรตีนที่สามารถกลับมาทำงานได้ปกติ เรณูจึงกลับมาเป็นปกติ ไม่เป็นหมัน (Chen and Liu., 2014)

การเป็นหมันของพืชในระบบ cms นั้น เกิดจากโปรตีนที่สร้างจากไมโทดอนเดรียจาก open reading frames (ORFs) ต่าง ๆ โดยในระบบ cms แต่ละแบบก็จะมีการผลิต ORF ที่ต่างกัน และในการแก้ความเป็นหมันนั้น จะได้จากยีนแก้ความเป็นหมัน *Rf* ที่สร้างจากนิวเคลียส ที่จะจำเพาะในการแก้ความเป็นหมันของยีนภายในไมโทคอนเดรีย ซึ่งพบว่า ยีน *Rf* นั้นเป็นกลุ่มของยีน *PPR* ลำดับเบสซ้ำที่กระทบต่อการสร้างโปรตีน (pentatricopeptide repeat or PPR) โดยเมื่อแปลไปเป็นโปรตีนจะได้ pentatricopeptide (Huang *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2014; Saxena *et al.*, 2015; Bohra *et al.*, 2016)

ลำดับกรดอะมิโนของ PPR repeat จะประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 35 กรดอะมิโน โดยโครงสร้างของโปรตีนจะมีลักษณะเป็น helix-turn-helix ซึ่งจะคล้ายกับ tetratricopeptide repeat (TPR) ทำหน้าที่เป็นโปรตีนที่จับอาร์เอ็นเอ (RNA-binding protein) ช่วยในกระบวนการหลังจากการถอดรหัส (post-transcriptional processes) ได้แก่ การปรับแก้อาร์เอ็นเอ (RNA editing) การตัดอินทรอน (RNA splicing) การสลายของ RNA (RNA cleavage) และการแปลรหัส (translation) พบมากภายในไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ของพืช แต่สำหรับในสัตว์ จะพบยีน *PPR* จำนวน

น้อยกว่าเมื่อเทียบกับที่พบในพืช (Schmitz-Linneweber and Small, 2008) ซึ่งได้มีการศึกษาและรายงานลำดับเบสของยีนแก้ความเป็นหมัน (*Rf*) จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ยีนแก้ความเป็นหมัน *Rf* ของข้าวและการแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีรายงานในฐานข้อมูล

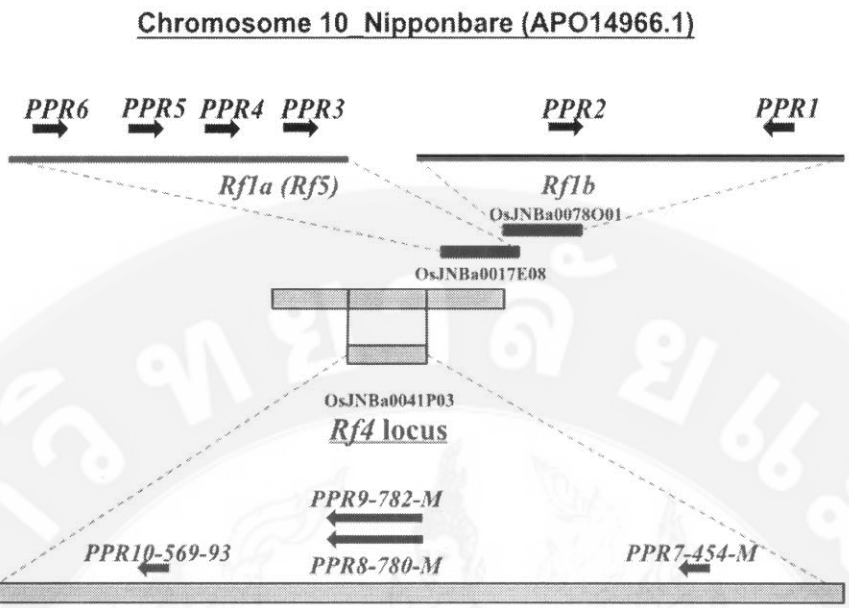
ยีนแก้ความเป็นหมันเพศผู้ (แบบที่พบ)	เลขที่ NCBI Accession	พันธุ์ข้าวแก้หมันของเรณู	การเรียกชื่อยีน	กลุ่มของโปรตีน	ที่มา
Rf-1 (BT- CMS)	AB106867 AB110016	BTR	*PPR8-1*	PPR	Kazama *et al.* (2008)
Rf-1 (BT-CMS)	AB110443 AB110444	IR24	*PPR791*	PPR	Komori *et al.* (2004)
Rf-1 (BT-CMS)	AB112811	MTC-10R	*Rf-1A, Rf-1B*	PPR	Akagi *et al.* (2004)
Rf gene (*Rf1b*) (BT-CMS)	DQ311054	C9083	–[1]	PPR	Wang *et al.* (2006)
Rf17 (CW-CMS)	AB481199	CWR	*ORF11*	-[1]	Fuji and Toryama (2009)
Rf2 (LD-CMS)	AB583700 AB583699 AB583698	Kasalath	*Os02g17380.1*	Glycine rich	Itabashi *et al.* (2011)
Rf5 (HL-CMS)	-[1]	Milyang23	*PPR791*	PPR	Hu et al. (2012)
Rf4 (WA-CMS)	KJ680250 KJ680249 KJ680248	Minghui 63	*PPR7-454-M* *PPR9-782-M* *PPR10-454-M*	PPR	Tang et al. (2014)
Rf4 (WA-CMS)	AB900791 AB900792 AB900793 AB900794	IR24	*PPR782a*	PPR	Kazama and Toriyama (2014)

ที่มา; ดัดแปลงจาก Bohra et al. (2016) -[1] หมายถึง ไม่มี

ยีนแก้ความเป็นหมันเรณูที่ตำแหน่ง Rf4

จากการศึกษาของ Kazama and Toriyama (2014) พบว่า ในการพัฒนาพันธุ์ข้าวลูกผสมนั้นประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์ ได้มาจากระบบความเป็นหมันแบบ WA-cms ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการโคลนยีนแก้ความเป็นหมันของเรณู ในตำแหน่งของยีน *Rf4* จากข้าวพันธุ์ IR24 พบว่า บริเวณดังกล่าวเป็นยีนในกลุ่ม PPR โดยประกอบด้วยยีน *PPR454, PPR782a, PPR782b* และ *PPR458* (ตารางที่ 1) เมื่อทำการถ่ายยีนที่ตำแหน่ง Rf4 ยีน *PPR782a* เข้าไปในข้าวพันธุ์ WAA ที่สร้างหรือพัฒนาให้มีความเป็นหมันของเรณูแบบ WA-cms แต่มีพื้นฐานมาจากข้าวพันธุ์ Taichung 65 เพื่อดูระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าว และพบการมีชีวิตของเรณูหลังจากทำการย้อมด้วย I_2-KI ซึ่งยีนที่อยู่ตำแหน่ง Rf4 ที่เป็นรหัสของโปรตีน PPR สามารถลดปริมาณของอาร์เอ็นเอ *WA352* ลงจากเดิม นอกจากนี้ จากการศึกษาเพิ่มเติมถึงการสร้างแผนที่ยีน และโคลนยีนตำแหน่ง *Rf4* ของ Tang *et al.* (2014) (ภาพที่ 2) การศึกษาในข้าวพันธุ์ Minghui 63 (M) ที่มียีนที่ตำแหน่ง Rf4 และ Rf3 พบว่าบริเวณของยีนที่ตำแหน่ง Rf4 นั้น เป็นรหัสของโปรตีน ที่เรียกว่า pentatricopeptide repeat (PPR) หลายยีน จากนั้น จึงได้ทำการโคลนยีน *PPR* ต่าง ๆ ได้แก่ *PPR7-454-M*, *PPR9-782-M* และ *PPR10-454-M* (ตารางที่ 1) เพื่อถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวพันธุ์ Zhenshan 97A (ZS97A) ที่แสดงความเป็นหมันแบบระบบ WA-cms และมียีนที่ตำแหน่ง rf3 และ rf4แสดงลักษณะด้อย ได้ต้นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมรุ่น T_0 จากยีน *PPR7-454-M* (17 ต้น) และ *PPR10-454-M* 21 ต้น นั้นแสดงลักษณะเป็นหมันของเรณู แต่ต้นข้าวที่มียีน *PPR9-782-M* 11 ต้น นั้นใน 3 ต้น พบการมีชีวิตของเกสรเพศผู้หลังจากทำการย้อมด้วย I_2-KI เท่ากับ 35, 29 และ 36 เปอร์เซ็นต์

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนที่ตำแหน่ง Rf4 จากงานวิจัยของ Kazama and Toriyama (2014) จากข้าวพันธุ์ IR24 และ Tang *et al.* (2014) จากข้าวพันธุ์ Minghui 63 จะพบว่า ยีน *PPR454* จะมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับยีน *PPR10-454-M*, ยีน *PPR782a* จะมีลำดับกรดอะมิ-โนเหมือนกับยีน *PPR9-782-M* และยีน *PPR458* จะมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับยีน *PPR7-454-M* ตามลำดับ



ภาพที่ 2 แผนที่ของยีนแก้ความเป็นหมันเรณู *Rf* ที่ตำแหน่ง Rf4 บนโครโมโซมแท่งที่ 10 [ดัดแปลงจาก Tang *et al.* (2014)]

ยีนแก้ความเป็นหมันเรณูที่ตำแหน่ง Rf3

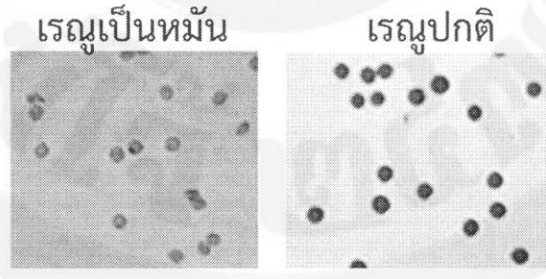
จากงานวิจัยของ Suresh *et al.* (2012) ที่ได้พัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายจำนวน 23 ไพรเมอร์ เพื่อใช้แยกระบุความต่างระหว่างข้าวสายพันธุ์ A และข้าวสายพันธุ์ R ออกจากกัน โดยไพรเมอร์ที่ได้เลือกมาใช้ในงานทดลองเพื่อโคลนยีนบริเวณยีน *Rf3* จำนวน 4 ยีน ที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 ได้แก่ ยีน *Os01g09560* ที่เป็นรหัสของโปรตีน mitochondrial-processing peptidase subunit alpha ยีน *Os01g09670* ที่เป็นรหัสของโปรตีน pollen-specific protein SF21 และยีน *Os01g10090* กับ *Os01g10800* ที่เป็นรหัสของโปรตีน PPR

เครื่องหมายจำเพาะกับยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูตำแหน่ง Rf3 และ Rf4

จากข้อมูลลำดับเบสของยีนแก้ความเป็นหมันตำแหน่ง Rf4 ที่ยีนหลักในการแก้ความเป็นหมัน คือ ยีน *PPR9* (Tang *et al.*, 2014; Kazama and Toriyama 2014) ซึ่งต่อมา ได้มีการพัฒนาเป็นเครื่องหมายจำเพาะกับยีน PPR9 จำนวน 5 เครื่องหมาย เมื่อนำไปจำแนกพันธุ์ข้าวของอิหร่าน พบเครื่องหมาย RMS_PPR9_1 ส่วนยีนแก้ความเป็นหมันตำแหน่ง Rf3 พบเครื่องหมาย RMS-SF21-5 สามารถจำแนกกลุ่มพันธุ์ข้าว โดยเมื่อนำทั้ง 2 เครื่องหมายไปใช้จะมีความสามารถแก้ความเป็นหมันเกือบสมบูรณ์ (Pranathi *et al.*, 2016)

การจัดกลุ่มข้าวไทยด้วยการย้อมเรณูด้วยสารละลาย I_2–KI เพื่อตรวจสอบความเป็นหมันของเกสรเพศผู้

จากการตรวจสอบเกสรเพศผู้พันธุ์ข้าวไทยเพื่อพัฒนาเป็นพันธุ์ข้าวลูกผสม พบว่าสามารถจัดกลุ่มข้าวไทยออกเป็นกลุ่ม พันธุ์ B (B line) และพันธุ์ R (R line) ด้วยการนำสายพันธุ์ที่ต้องการทดสอบผสมข้าม (cross pollination) กับสายพันธุ์ A (A line) ได้เมล็ดเป็นลูกรุ่นที่ 1 จากนั้นนำอับละอองเรณูของลูกรุ่นที่ 1 ไปย้อมด้วยสารละลาย I_2–KI เพื่อตรวจสอบความเป็นหมันหรือความสมบูรณ์ของเรณู หากละอองเรณู (pollen grain) ไม่ติดสีหรือสีจาง คือ ละอองเรณูเป็นหมัน หากละอองเรณูติดสีเข้ม คือ ละอองเรณูปกติ (ภาพที่ 3) โดย Seesang *et al.* (2014) ได้จัดกลุ่มจากการตรวจสอบด้วยการผสมข้ามพันธุ์ข้าวไทยกับข้าวเป็นหมันสายพันธุ์ A (CHA01 และ IR805151A) ส่วนภวพร (2555) และสุวิทย์ (2556) จัดกลุ่มด้วยการผสมข้ามพันธุ์ข้าวไทยกับ IR58025A (A line) ซึ่งผลการจัดกลุ่มพันธุ์ข้าวไทยและต่างประเทศนั้น เป็นพันธุ์ B มากกว่าพันธุ์ R ดังแสดงในตารางที่ 2 แต่พันธุ์ R ก็มีจำนวนมาก ทำให้สามารถคาดได้ว่า ข้าวไทยจำนวนมากมียีน *Rf* และน่าจะมียีนที่ตำแหน่ง Rf3/Rf4 ซึ่งเป็นยีนหลักในการแก้ความเป็นหมันดังที่พบในข้าวอื่น ๆ นอกจากนี้ ในกลุ่มสายพันธุ์ B ก็คาดว่า จะมียีน *rf3/rf4* โดยข้อมูลลำดับเบสของยีนแก้ความเป็นหมันที่ตำแหน่ง Rf4 จากข้าวทั้ง 2 กลุ่ม จะนำมาใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอต่อไป



ภาพที่ 3 ผลการย้อมเรณูด้วยสารละลาย I_2–KI

ใน ค.ศ. 2014 กลุ่มนักวิจัยจากประเทศจีนและญี่ปุ่น (Tang *et al.*, 2014, Kazama and Toriyama 2014) ได้รายงานแผนที่ของยีนในตำแหน่ง Rf4 ที่จะประกอบด้วยยีนในกลุ่ม pentatricopeptide_repeat (PPR) 3-4 ยีน ในข้าวญี่ปุ่น ได้แก่ ยีน *PPR7* , *PPR8* *PPR9* และ *PPR10* แต่ได้รายงานว่า ยีน *PPR8* จะพบเฉพาะในข้าวอินดิกา ในการศึกษาปี 2559 ได้ดำเนินการโคลนยีนในตำแหน่ง Rf4 ได้แก่ ยีน *PPR7* ยีน *PPR9* และยีน *PPR10* ซึ่งได้รายงานไปแล้วในปี 2559 ส่วน

ในปี 2560 ได้ดำเนินการโคลนยีนที่ตำแหน่ง Rf3 จำนวน 4 ยีน และพัฒนาเครื่องหมายที่เป็นส่วนหนึ่งของยีนตำแหน่ง Rf4 และ Rf3 และเพื่อให้เกิดความต่อเนื่องระหว่างการโคลนยีนและการพัฒนาเครื่องหมาย จึงจะกล่าวถึงการโคลนยีนตำแหน่ง Rf4 อย่างย่อ ในรายงานปี 2560 นี้

ตารางที่ 2 ผลการจัดกลุ่มข้าวพันธุ์ B หรือพันธุ์ R ของพันธุ์ข้าว

จากการนำพันธุ์ที่ต้องการทดสอบผสมข้ามกับสายพันธุ์ A ได้เป็นลูกรุ่นที่ 1 จากนั้น นำอับเรณูของลูกรุ่นที่ 1 ไปย้อมด้วยสารละลาย I_2–KI เพื่อทดสอบความสมบูรณ์ของละอองเกสรที่บ่งถึงความปกติ

พันธุ์ B (B- line)		**พันธุ์ R (R- line)**	
กข6[3]	ปิ่นแก้ว 56[3]	กข17[3]	ลูกแดงปัตตานี[3]
กข15[3]	ดอกพยอม[3]	กข47[3]	สังข์หยดพัทลุง[3]
กข21[2]	ขาวใหญ่[3]	ปราจีนบุรี 2[2,3]	ชัยนาท 1[14]
กข33[3]	สินเหล็ก[3]	พลายงามปราจีนบุรี[2]	สุพรรณบุรี 1[1,4]
เหลืองประทิว 123[2]	เล็บมือนาง 111[3]	ปทุมธานี 1[3]	สุพรรณบุรี 2[1]
หอมชลสิทธิ์[3]	ขาวตาแห้ง 17[3]	ปทุมธานี 80/กข 31[1,3]	IR64[3]
เจ้าหอมนิล[1,3]	แปดริ้ว[3]	พิษณุโลก-2[3]	
หอมสุพรรณบุรี[2]	สกลนคร[1]	พิษณุโลก 60[3]	
หอมมะลิแดง[3]	สุพรรณบุรี 3[1]	ซิวแม่จันทร์[3]	
มะลิโกเมนสุรินทร์[3]	สุพรรณบุรี 60[1]	เข็มทองพัทลุง[3]	
มะลินิลสุรินทร์[3]	สุพรรณบุรี 80[1]	เล็บนก[2]	
นางมลเอส 4[3]	บาสมาติ[2]	เล็บนกปัตตานี[3]	

หมายเหตุ

[1] จากผลการวิจัยของ Seesang *et al.* (2014) [2] จากผลการวิจัยของ ภวพร (2555)

[3] จากผลการวิจัยของสุวิทย์ (2556) และ [4] จากผลการวิจัยของ พชระ (2555)

พันธุ์ข้าวที่นำมาตรวจสอบและวิธีการดำเนินการวิจัย

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาทดลอง

โดยจะสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

ตารางที่ 3 พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	กลุ่มความเป็นหมัน
1	IR58025A	ข้าวพันธุ์ A (A-line หรือ male sterile line)
2	IR58025B	ข้าวพันธุ์ B (B-line หรือ maintainer line)
3	ขาวดอกมะลิ 105	
4	เจ้าหอมนิล	
5	นางมลเอส 4	
6	ปิ่นแก้ว 56	
7	กข21	
8	บาสมาติ	
9	ปทุมธานี 1	ข้าวพันธุ์ R (R-line หรือ fertility restorer line)
10	สุพรรณบุรี 1	
11	ชัยนาท 1	
12	ปราจีนบุรี 2	
13	ลูกแดงปัตตานี	
14	สังข์หยดพัทลุง	
15	กข47	
16	IR64	

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากใบอ่อนข้าวที่ใช้ในการศึกษา

ในการสกัดดีเอ็นเอ เริ่มจากการเพาะเมล็ดข้าวที่ใช้ในการศึกษาทั้ง 16 พันธุ์ เป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ แล้วตัดใบอ่อนใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมเม็ด (bead) บีดสำหรับการบดตัวอย่างลงไปในหลอดประมาณ 3 เม็ด ในการสกัดดีเอ็นเอ จะทำตามขั้นตอนการสกัดด้วยวิธี CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromind) ดัดแปลง (Hwang and Kim, 2000) ที่มีรายละเอียดดังนี้

1. เติมสารละลาย mCTAB ซึ่งเป็นสารดัดแปลง (modified cetyl rimethyl ammonium bromind buffer) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีตัวอย่างของใบข้าวอยู่ โดยในสารละลาย mCTAB ดัดแปลงจะมี 1 เปอร์เซ็นต์ (V/V) ของ 2-mercaptoethanol

2. บดตัวอย่างโดยใช้เครื่องตีตัวอย่าง โดยจะทำการตีตัวอย่างนาน 30 วินาที ซ้ำจำนวน 6 ครั้ง หรือจนกว่าใบละเอียด

3. บ่มตัวอย่างในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำการผสมโดยการกลับหลอดทุก ๆ 10 นาที

4. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที

5. ย้ายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ และเติมเอนไซม์ RNaseA (ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) หากมีปริมาตรของสารละลาย 300 ไมโครลิตร จะทำการเติม RNaseA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

6. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

7. เติม chlorofrom ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หรือเติมเท่ากับปริมาตร 1 เท่า ของตัวอย่างที่ดูดได้จากข้อ 5 ทำการผลิกหลอดไปมาเพื่อผสมตัวอย่าง

8. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที

9. ย้ายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ แล้วทำซ้ำในข้อ 7 และ 8 จำนวน 1 รอบ

10. เติม absolute ethanol เย็น ปริมาตร 2 เท่า ของสารละลาย จากนั้น ทำการผสมให้เข้ากัน

11. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

12. เท absolute ethanol ทิ้ง เติม ethanol เย็น ที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อทำการล้างตะกอน

13. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที (ทำการล้างตะกอนด้วย ethanol เย็น ที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง)

14. ตากตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ให้แห้ง จากนั้น ทำการละลายตะกอนกลับด้วย 10 mM tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

จากนั้น ตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis

2. การศึกษาความต่างของยีนที่ตำแหน่ง Rf4 และ Rf3 ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR

ในการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่บ่งความต่างหรือความหลากหลาย (polymorphism) ในข้าวที่มีเรณูเป็นหมัน และไม่เป็นหมัน ได้ศึกษาเครื่องหมาย SSR (simple sequence repeat) ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง Rf4 จำนวน 5 เครื่องหมาย ที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 10 เครื่องหมาย SSR ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง Rf3 จำนวน 6 เครื่องหมาย ที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 รวม 11 เครื่องหมาย ดังแสดงในตารางที่ 4 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณตามที่รายงานในบทความวิจัย (Alavi *et al.*, 2009, Kiani, 2015 ; Jing, 2001) คาดว่า เครื่องหมายเหล่านี้อาจจะเป็นส่วนหนึ่งของยีน *Rf/rf* ที่ค้นหา ซึ่งข้อมูลที่ได้ หากไม่เป็นบริเวณของยีน ก็จะสามารถใช้เป็นเครื่องหมายชนิดที่ใกล้ชิดกับยีนแก้ความเป็นหมันของเรณู (linked DNA marker) ได้เช่นกัน

ตารางที่ 4 ลำดับเบสของเครื่องหมาย SSR

ที่มีรายงานว่าสัมพันธ์กับความสามารถในการแก้ความเป็นหมันเรณูในโครโมโซมที่ 1 และ 10

โครโมโซมแท่งที่	ชื่อเครื่องหมาย SSR	ลำดับเบส 5'- ไป –3'
Chromosome 1	RM1	F: GCG AAA ACA CAA TGC AAA AA
		R: GCG TTG GTT GGA CCT GAC
	RM443	F: GGG AGT TAG GGT TTT GGA GC
		R: TCC AGT TTC ACA CTG CTT CG
	RM315	F: CGG TCA AAT CAT CAC CTG AC
		R: CAA GGC TTG CAA GGG AAG
	RM294	F: TTG GCC TAG TGC CTC CAA TC
		R: GAG GGT ACA ACT TAG GAC GCA
	RM3148	F: GAC TAT TGC TCG AAC ACT TTG
		R: TTG TCT TGC TTT GGT ATT TGC
	RM171	F: AAC GCG AGG ACA CGT ACT TAC
		R: ACG AGA TAC GTA CGC CTT TG
Chromosome 10	RM258	F: TGC TGT ATG TAG CTC GCA CC
		R: TGG CCT TTA AAG CTG TCG C
	RM244	F: CCG ACT GTT CGT CCT TAT CA
		R: CTG CTC TCG GGT GAA CGT
	RM591	F: CGG TTA ATG TCA TCT GAT TGG
		R: TTC GAG ATC CAA GAC TGA CC
	RM6100	F: TCC TCT ACC AGT ACC GCA CC
		R: GCT GGA TCA CAG ATC ATT GC
	RM3123	F: ATT TCC CAC ACA TCT CGC TG
		R: GTG TCG CCG GTC AAG AAC

หมายเหตุ

F ย่อมาจาก ไพรเมอร์ Forward

R ย่อมาจาก ไพรเมอร์ Reverse

3. การค้นหายีนที่คาดว่าจะเป็นยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูที่ตำแหน่ง Rf4

3.1 การศึกษาไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแก้ความเป็นหมันตำแหน่ง Rf4

จากการศึกษาของ Tang *et al.* (2014) และ Kazama and Toriyama (2014) พบว่ายีนแก้ความเป็นหมันที่ตำแหน่ง Rf4 นั้น ประกอบไปด้วยยีนโปรตีน pentatricopeptide repeat หรือ PPR ซึ่งยีนดังกล่าวนี้จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มที่ตำแหน่ง Rf4 ประกอบด้วยยีน *PPR7, PPR8, PPR9* และ *PPR10* แต่ยีน *PPR8* จะพบเฉพาะในข้าวอินดิกาเท่านั้น ในงานวิจัยนี้ จึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *PPR7, PPR9* และ *PPR10* โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีน *PPR* ที่มีรายงานฐานข้อมูล (NCBI; http://www.ncbi.nlm. nih.gov/) จากข้าวแสดงพันธุ์ต่าง ๆ ที่ Tang *et al.* (2014) และ Kazama and Toriyama (2014) รายงานโดยผลการออกแบบไพรเมอร์ ดังในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับเบสในฐานข้อมูลสำหรับยีนที่ตำแหน่ง *Rf4*

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส 5'- ไป –3'	ยีนบริเวณตำแหน่ง *Rf4*
PPR7_F	CGGAGACCGATCTGGGC	ยีน *PPR7* ขนาด 1,700 คู่เบส ประกอบด้วย 1 exon
PPR7_R	TATGACAGAACTAGGGAGGG	
PPR9_F	AGTTTGAAGAGCGTGCTAACGG	ยีน *PPR9* ขนาด 2,800 คู่เบส ประกอบด้วย 1 exon
PPR9_R	GACATGAGGTGATCTGCTTGC	
PPR9-Top_R	GTCATTCTGCGGAGCACTATG	
PPR9-Botton_F	CTCACTGACGAGGCACTTC	
Os10g0495200_F	ACGCCACGTGTTCGACGAA	
Os10g0495200_R	CGAAGTGCCTCGTCAGTGAGA	
PPR10_F	TGCTGCTGCACCTGTCAGC	ยีน *PPR10* ขนาด 2,200 คู่เบส ประกอบด้วย 1 exon
PPR10_R	GCCGATTAGGGTAGTATCGGGG	

หมายเหตุ

F ย่อมาจาก ไพรเมอร์ Forward

R ย่อมาจาก ไพรเมอร์ Reverse

3.2 การเพิ่มปริมาณยีนแก้ความเป็นหมันตำแหน่ง Rf4 จากข้าว

การเพิ่มปริมาณของยีนแก้ความเป็นหมันที่ตำแหน่ง *Rf4* จำนวน 3 ยีน ได้แก่ ยีน *PPR7, PPR9* และ *PPR10* โดยในแต่ละยีนนั้น ได้ทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบได้กับตัวอย่างข้าวทั้ง 16 พันธุ์ ข้าวไทย 14 พันธุ์ และพันธุ์ตรวจสอบ 2 พันธุ์ ดังในตารางที่ 3 หน้า 19 โดยจะเริ่มจากการทดสอบหาอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 50, 55, 58 และ 60 องศาเซลเซียส ด้วยชุดน้ำยา 1×Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA)

โดยพบว่า ในการเพิ่มปริมาณยีน *PPR* แต่ละยีน จะใช้อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมกับแต่ละยีน ที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้าแล้ว โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *PPR7* จะใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *PPR10* จะใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ส่วนไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *PPR9* นั้น พบว่า จากการเพิ่มปริมาณและส่งไปอ่านลำดับไม่ใช่ยีน *PPR9* ที่ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ไว้ จึงได้มีการใช้ไพรเมอร์ Os10g0495200 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่อยู่ภายในยีน *PPR9* แทนเพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวนบางส่วนของยีนที่อยู่ด้านใน และสำหรับในส่วนหน้าของยีนที่เป็นบริเวณรหัสเริ่มต้น และส่วนท้ายของยีนที่เป็นบริเวณของรหัสหยุดนั้น ได้ออกแบบไพรเมอร์ใหม่โดยให้ไพรเมอร์อยู่ภายในยีนและเพิ่มปริมาณของยีน *PPR9* ออกมา ให้ครอบคลุมบริเวณรหัสทั้งหมด โดยจะใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวร่วมกับไพรเมอร์ *PPR9* ที่ได้ทำการออกแบบไว้แล้วก่อนหน้านี้ แต่ชิ้นที่ได้นี้จะต้องใช้ชิ้นของ PCR ในการสร้าง contig จำนวน 3 ชิ้น จึงจะครอบคลุมทั้งบริเวณรหัส สำหรับอุณหภูมิ annealing จะใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สำหรับการแบ่งช่วงในการเพิ่มปริมาณของชิ้นยีนดังแสดงในตาราง 6 และภาพที่ 4

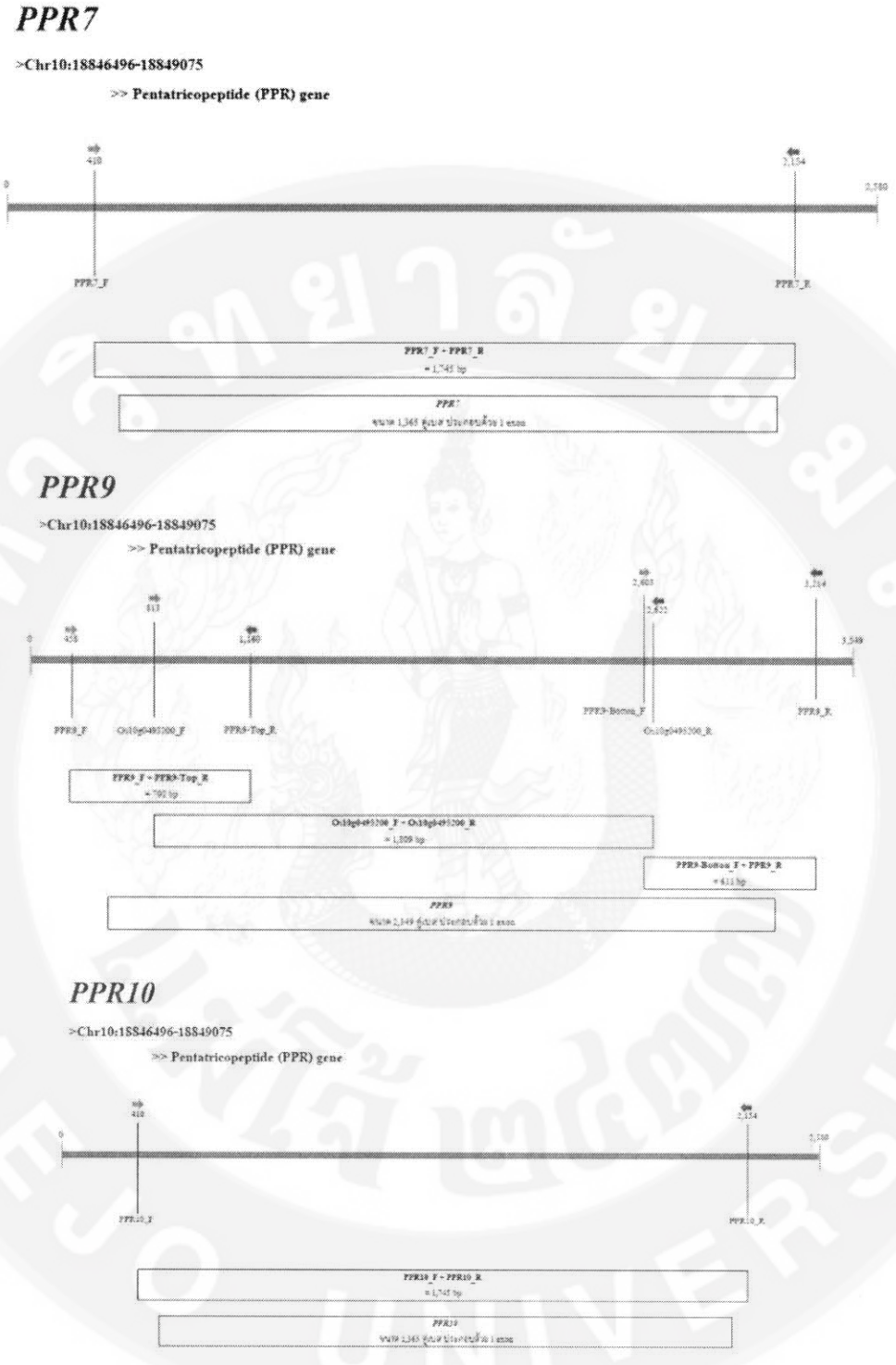
ตารางที่ 6 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนที่ตำแหน่ง Rf4 และขนาดที่ได้

ยีนบริเวณตำแหน่ง Rf4	ชิ้นที่	ชื่อไพรเมอร์	ขนาดที่ได้ (bp)
ยีน *PPR7* ขนาด 1,700 คู่เบส	Segment 1	PPR7_F	1,744
		PPR7_R	
ยีน *PPR9* ขนาด 2,800 คู่เบส	Segment 1	PPR9_F	700
		PPR9-Top_R	
	Segment 2	Os10g0495200_F	1,800
		Os10g0495200_R	
	Segment 3	PPR9-Botton_F	800
		PPR9_R	
ยีน *PPR10* ขนาด 2,200 คู่เบส	Segment 1	PPR10_F	2,194
		PPR10_R	

หมายเหตุ

F ย่อมาจาก ไพรเมอร์ Forward

R ย่อมาจาก ไพรเมอร์ Reverse



ภาพที่ 4 ตำแหน่งของไพรเมอร์ Rf4 และปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณของแต่ละยีน คือ ยีน *PPR7, PPR9* และ *PPR10*

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

3.4 การโคลนยีนที่บริเวณตำแหน่ง Rf4

การโคลนหรือแยกยีนนั้น ได้ทำการโคลนเฉพาะยีนที่ตำแหน่ง Rf4 เนื่องจากในขั้นต้น ได้ทำการเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอทุกตำแหน่งตามที่ได้แสดงดังในตารางที่ 5 และ 6 และในภาพที่ 4 พบว่า ในส่วนของยีนที่ตำแหน่ง *Rf3* นั้น สามารถใช้การอ่านลำดับเบสจากชิ้น PCR ได้ แต่ในส่วนของยีนที่ตำแหน่ง Rf4 นั้น ไม่สามารถใช้ผลที่ได้จาก PCR ไปอ่านลำดับเบส เนื่องจากเมื่อส่งไปอ่านลำดับเบสในขั้นต้นแล้ว พบว่า มีการซ้อนทับกันของโครมาโทแกรมที่ได้ ซึ่งอาจจะเกิดจากการที่แถบที่ได้มีลำดับเบสมากกว่าแบบเดียว จึงต้องใช้เทคนิคการโคลนยีนมาใช้ในการแยกลำดับเบสบริเวณดังกล่าว

4. การค้นหาลำดับดีเอ็นเอที่คาดว่าจะเป็นยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูที่ตำแหน่ง Rf3

4.1 การศึกษาไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแก้ความเป็นหมันตำแหน่ง Rf3

จากงานวิจัยของ Suresh *et al.* (2012) ที่ได้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายจำนวน 23 ไพรเมอร์ เพื่อใช้ระบุความต่างระหว่างข้าวพันธุ์ A และพันธุ์ R ออกจากกัน โดยไพรเมอร์ที่ได้เลือกมาใช้ในงานทดลองเพื่อโคลนยีนบริเวณ *Rf3* จำนวน 4 ยีน ที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 ได้แก่ ยีน *Os01g09560* ที่เป็นรหัสของโปรตีน mitochondrial-processing peptidase subunit alpha ยีน *Os01g09670* ที่เป็นรหัสของโปรตีน pollen-specific protein SF21 และยีน *Os01g10090* กับ *Os01g10800* ที่เป็นรหัสของโปรตีน PPR

โดยในส่วนของยีน *Os01g10090* และ *Os01g10800* ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับเบสที่ได้จากฐานข้อมูล ร่วมกับไพรเมอร์ที่ได้จากงานวิจัยของ Suresh *et al.* (2012) เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนและอ่านลำดับเบส ดังในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ไพรเมอร์สำหรับยีนที่ตำแหน่ง Rf3 จากงานวิจัยของ Suresh *et al.* (2012) และจากลำดับเบสในฐานข้อมูล

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส 5'- ไป –3'	ยีนบริเวณตำแหน่ง *Rf3*
DRCG-RF3-2_F	CTTCCCCTTCCACTTGTCTG	*Os01g09560* (mitochondrial-processing peptidase subunit alpha) ขนาด 5,361 คู่เบส ประกอบด้วย 13 exon 12 intron
DRCG-RF3-4_R	AACTGAACAAGATGGTCCCTGT	
DRCG-RF3-5_R	GGCTTTGCTGGTCCAGTTAC	
DRCG-RF3-6_R	AGCGCCACAAGATTTTCGAT	
DRCG-RF3-7_F	CTGTTAAGTGTGCAGTGTCCTG	
DRCG-RF3-8_R	TGGAGGGAACTTCATCATTTG	
DRCG-RF3-9_R	TGGTATTCTCAATCATCCAGAGTT	
DRCG-RF3-10_F	TCTGTGCATTGCCTGAACAT	*Os01g09670* (pollen-specific protein SF21) ขนาด 3,001 คู่เบส ประกอบด้วย 11 exon 10 intron
DRCG-RF3-10_R	TCGTATGGAACGATGTGATGA	
DRCG-RF3-11_F	AATGCTGTGCTTCTGGCTTT	
DRCG-RF3-11_R	GCTTCCGTCAGGTCATGTCT	
DRCG-RF3-12_F	TGTTAAGCAATGTCGGTGGA	
DRCG-RF3-12_R	AAAGACAAGGCAAGCTTTGAA	
DRCG-RF3-13_F	AGGCAGCGAGGAGAGAGAG	
DRCG-RF3-13_R	CGGCTCGAGTAACATTGCAACC	
Os01g10090_F[1]	CCGAAGACATCCTCAGCTCC	*Os01g10090* (PPR gene) ขนาด 1,711 คู่เบส ประกอบด้วย 1 exon
Os01g10090_R[1]	CAGATCCTCGCCGCCTACTC	
Os01g10800_F[1]	CTCACCAATAACCTCTGCAAGAAC	*Os01g10800* (PPR gene) ขนาด 3,308 คู่เบส ประกอบด้วย 1 exon
Os01g10800_R[1]	TTCGCGGCAAAATTTGAACTC	
DRCG-RF3-20_F	AGCAATCTTGCCAATGAAGC	
DRCG-RF3-22_F	GATGGTTTGGTGGTTCATGG	
DRCG-RF3-23_F	TTTGGGCAGTATTGCAGATG	
DRCG-RF3-23_R	TGATGTCACGTTGAGGCATT	

หมายเหตุ

[1] คือ ไพรเมอร์ที่ได้ทำการออกแบบเพิ่มเติมจากลำดับเบสในฐานข้อมูล

F ย่อมาจาก ไพรเมอร์ Forward

R ย่อมาจาก ไพรเมอร์ Reverse

4.2 การเพิ่มปริมาณยีนแก้ความเป็นหมันตำแหน่ง Rf3 จากข้าว

พันธุ์ข้าวที่ได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของยีนที่ตำแหน่ง Rf3 นั้นมี 8 พันธุ์ ได้แก่ IR58025A, IR58025B, ขาวดอกมะลิ105, นางมลเอส 4, ปทุมธานี 1, ชัยนาท 1, กข47 และ IR64 โดยการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง Rf3 นั้นมีจำนวน 4 ยีน คือ *Os01g09560, Os01g09670, Os01g10090* และ *Os01g10800* โดยใช้ชุดน้ำยา 1×Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA) ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา คือ 0.5 ไมโครโมลาร์ ดีเอ็นเอตัวอย่างประมาณ 20 นาโนกรัม ในปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา จากนั้น ทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้สภาวะที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส 10 วินาที จากนั้นเข้าสู่ 98 องศาเซลเซียส 10 วินาที 58 หรือ 60 องศาเซลเซียส 10 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที 50 รอบ สุดท้ายอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

เนื่องจากยีน *Os01g09560, Os01g09670* และ *Os01g10800* มีขนาดของยีนมากกว่า 1,500 คู่เบส จึงจะต้องแบ่งการเพิ่มจำนวนออกเป็นช่วง เพื่อให้ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณและการส่งไปอ่านลำดับเบส สำหรับการแบ่งช่วงในการเพิ่มจำนวนของชิ้นยีน ดังแสดงในตารางที่ 8 และภาพที่ 5

4.3 การแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอของชิ้นยีนที่ตำแหน่ง Rf3 ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ

เมื่อได้ผลสภาวะของการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แล้ว ได้ทำการเพิ่มปริมาณของปฏิกิริยาการทำ PCR เป็น 60 ไมโครลิตร ต่อตัวอย่างข้าว 1 พันธุ์ หรือเท่ากับ 3 เท่า ของปฏิกิริยาในข้าวแต่ละพันธุ์ จากนั้น ทำ 1% agarose gel electrophoresis แยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสำเร็จรูป PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA)

ตารางที่ 8 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนที่ตำแหน่ง Rf3 และขนาดที่ได้

ยีนบริเวณตำแหน่ง *Rf3*	ชิ้นที่	ชื่อไพรเมอร์	ขนาดที่ได้ (bp)
Os01g09560 ขนาด 5,361 คู่เบส	Segment 1	DRCG-RF3-2_F	2,979
		DRCG-RF3-6_R	
	Segment 2	DRCG-RF3-7_F	2,234
		DRCG-RF3-9_R	
	Segment 3	DRCG-RF3-8_F	1,580
		DRCG-RF3-9_R	
Os01g09670 ขนาด 3,001 คู่เบส	Segment 1	DRCG-RF3-10_F	821
		DRCG-RF3-10_R	
	Segment 2	DRCG-RF3-11_F	841
		DRCG-RF3-11_R	
	Segment 3	DRCG-RF3-13_F	1,481
		DRCG-RF3-12_R	
	Segment 4	DRCG-RF3-13_F	652
		DRCG-RF3-13_R	
Os01g10090 ขนาด 1,711 คู่เบส	Segment 1	Os01g10090_F[1]	1,522
		Os01g10090_R[1]	
Os01g10800 ขนาด 3,308 คู่เบส	Segment 1	Os01g10800_F[1]	1,974
		DRCG-RF3-22_F	
	Segment 2	DRCG-RF3-23_R	1,472
		Os01g10800_R[1]	

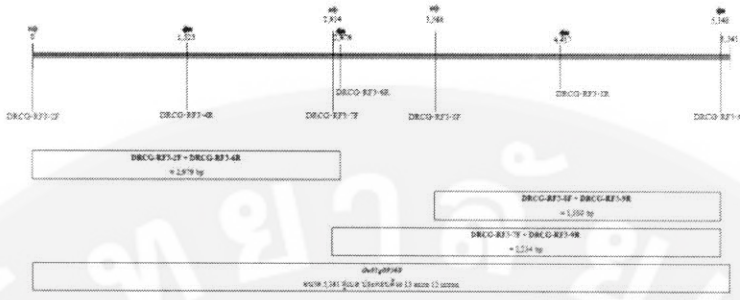
หมายเหตุ

[1] คือ ไพรเมอร์ที่ได้ทำการออกแบบเพิ่มเติมจากลำดับเบสในฐานข้อมูล

Os01g09560

>OS01G09560-CHR1:4891516-4896876

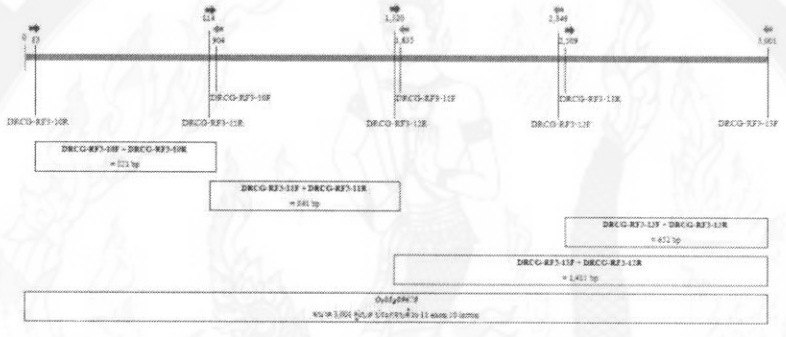
>> Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha



Os01g09670

>Os01g09670-CHR1:4982142-4985143

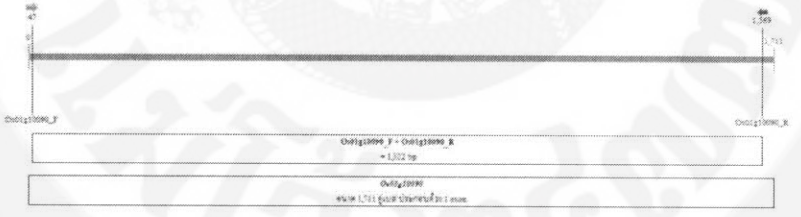
>> pollen-specific protein SF21



Os01g10090

>Os01g10090-Chr1:5261189-5262898

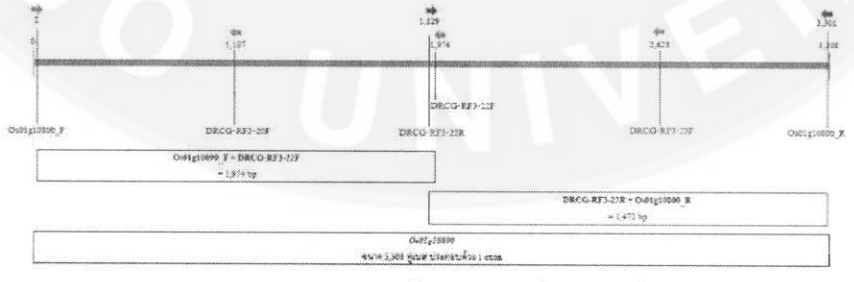
>>Pentatricopeptide (PPR) gene



Os01g10800

>Os01g10800-Chr1:5764652-5767959

>> Pentatricopeptide (PPR) gene



ภาพที่ 5 ตำแหน่งของไพรเมอร์ Rf3 และจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณ ยีน *Os01g09560, Os01g09670, Os01g10090* และ *Os01g10800*

5. การอ่านและวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนแก้ความเป็นหมันตำแหน่ง Rf4 และ Rf3

ส่งตัวอย่างไปอ่านลำดับเบสนั้นได้จาก 2 เทคนิค คือ การอ่านลำดับเบสจากชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยตรง คือยีนตำแหน่ง *Rf3* จำนวน 4 ยีน ได้แก่ ยีน *Os01g09560, Os01g09670, Os01g10090* และ *Os01g10800* และบริเวณส่วนหน้าและท้ายของยีน *PPR9* และการอ่านลำดับเบสดีเอ็นเอที่ได้จากการโคลนยีน แล้วสกัดดีเอ็นเอสายผสมของข้าวแต่ละพันธุ์ เพื่อส่งไปอ่านลำดับเบส ได้แก่ ยีน *PPR7, PPR10* และ *PPR9* ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ *Os10g0495200* ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่อยู่ในยีน *PPR9*

โดยส่งตัวอย่างไปอ่านผลลำดับเบสที่บริษัท 1st Base Sequencing (Malaysia) และผลการอ่านลำดับเบสที่ได้ จะนำไปเปรียบเทียบกับยีนแก้ความเป็นหมันแต่ละยีน ที่อยู่ในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม clustalX (1.8)

6. การศึกษาความเป็นหมันของเกสรเพศผู้ด้วยสารละลายไอโอดีนในโพแทสเซียมไอโอไดน์ (I_2-KI)

ศึกษาความมีชีวิต (fertility) ของเกสรเพศผู้ ในข้าวพันธุ์ IR58025A ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์ A ที่มีเกสรเพศผู้เป็นหมัน ผสมข้ามด้วยพันธุ์ B ซึ่งเป็นพันธุ์รักษาความเป็นหมันของเกสรเพศผู้ และข้าวสายพันธุ์ R ที่มีการรายงานว่า สามารถแก้ความเป็นหมันของเกสรเพศผู้ได้ (ภวพร, 2555; สุวิทย์, 2555) (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดสอบความเป็นหมัน

ในเกสรเพศผู้หรือละอองเรณูโดยย้อมด้วยสารละลายไอโอดินในโพแทสเซียมไอโอไดน์

ข้าวพันธุ์รับ	ข้าวพันธุ์ใช้	ชื่อของข้าวพันธุ์ใช้
สายพันธุ์ A (IR58025A)	สายพันธุ์ B	IR58025B
		ขาวดอกมะลิ 105
		เจ้าหอมนิล
		นางมลเอส 4
		หอมมะลิแดง
	สายพันธุ์ R	ปทุมธานี 1
		ชัยนาท 1
		สุพรรณบุรี 1
		สังข์หยดพัทลุง
		กข47
		IR64

นำเรณูหรืออับเรณู (anther) ของข้าวที่ได้จากการผสมข้าม (cross pollination) แช่ในสารละลาย I_2-KI ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วพิจารณาจากการติดสีของเมล็ดแป้ง (starch grain) หรือละอองเรณู (pollen grain) บริเวณไซโทพลาซึม โดยละอองเกสรที่มีชีวิต (viable pollen) จะพบการติดสีน้ำเงินเข้มเต็มพื้นที่ของเรณู ส่วนเรณูที่ไม่มีชีวิต (sterile pollen) ไม่พบการติดสีหรือมีสีเหลือง (อุษณีย์, 2557) ทำการจำแนกความมีชีวิตของเรณูหรือนับจำนวนละอองเรณูใช้ข้อมูลร้อยละของเรณูที่ติดสีของสารละลาย I_2-KI เพื่อเป็นการยืนยันหรือพิจรณาความมีชีวิตของเรณูที่ได้นำมาใช้ในการทดสอบ หากเป็นสายพันธุ์ A จะย้อมด้วยสารละลาย I_2-KI ไม่ติดสี แต่สำหรับในข้าวสายพันธุ์ B และสายพันธุ์ R ละอองเกสรตัวผู้จะมีการติดสีเข้มชัดเจน

จากการผสมข้ามพันธุ์ข้าวเพื่อศึกษาความสามารถในการติดเมล็ดในลูกรุ่นที่ 1 ของแต่ละพันธุ์ โดยใช้ข้าวสายพันธุ์ A เป็นพันธุ์รับ (แม่) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่เกสรเพศผู้เป็นหมัน เนื่องจากยีนในไซโทพลาซึม และยีนแก้ความเป็นหมันในนิวเคลียสมีลักษณะเป็นยีนด้อย ผสมข้ามกับข้าวที่ต้องการทดสอบเป็นพันธุ์ให้ (พ่อ) ซึ่งอาจจะเป็นพันธุ์ B หรือพันธุ์ R โดยข้าวพันธุ์ R จะเป็นพันธุ์ที่มียีนแก้

ความเป็นหมันของเกสรเพศผู้ในนิวเคลียสเป็นลักษณะเด่น โดยคาดว่า จะไปช่วยแก้ความเป็นหมันเรณูในลูกรุ่นที่ 1 นำอับเรณูของลูกผสมที่ได้ไปแช่ในสายละลาย I_2-KI ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

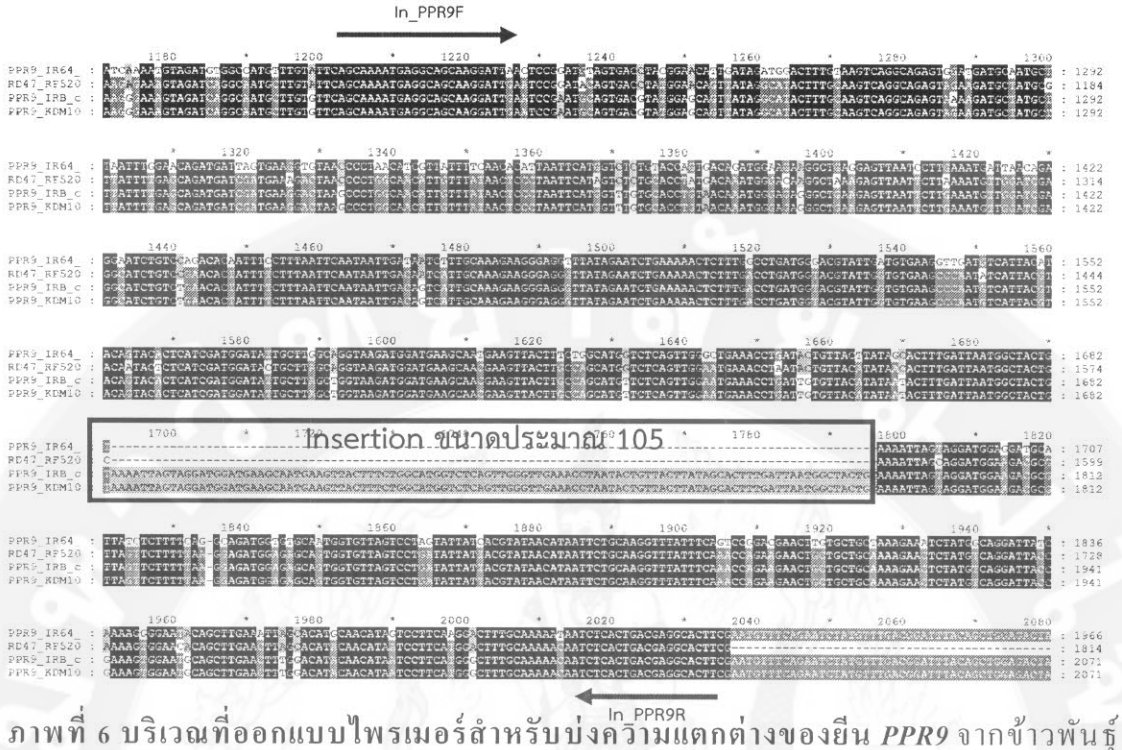
7. การพัฒนาเครื่องหมายของยีนที่ตำแหน่ง Rf4

จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูที่ตำแหน่ง Rf4 จำนวน 3 ยีน ได้แก่ ยีน *PPR7 PPR9* และ *PPR10* พบบริเวณลำดับเบสที่ต่างระหว่างพันธุ์ข้าว B และ R ในยีน *PPR9* และ *PPR10* ทำให้จึงพัฒนาเครื่องหมายของยีนที่ตำแหน่ง Rf4 เพียง 2 ยีน คือ ยีน *PPR9* และ *PPR10* ในขณะที่การเปรียบเทียบยีนแก้หมันตำแหน่ง Rf3 จำนวน 4 ยีน พบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส 1 ตำแหน่ง ที่เรียกว่า single nucleotide polymorphism (SNP) เพียง 1 ตำแหน่ง ที่ต่างกันระหว่างพันธุ์ข้าว B และ R ในบริเวณอินทรอนของ *Os01g09560* (Mitochondrial-processing peptidase subunit α) จึงไม่ได้ดำเนินการพัฒนาเครื่องหมายของยีนแก้ความเป็นหมันเรณูตำแหน่ง Rf3

7.1 การพัฒนาเครื่องหมายของยีนที่ตำแหน่ง Rf4 ยีน *PPR9*

7.1.1 ศึกษาบริเวณเพื่อออกแบบเครื่องหมายที่จำเพาะต่อยีน *PPR9*

จากได้การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *PPR9* จากข้าว 14 พันธุ์ พบบริเวณที่สามารถใช้ในการออกแบบเพื่อระบุความต่างของยีน *PPR9* คือ บริเวณชิ้นยีนขนาด 105 คู่เบส แทรกหลังจุดเริ่มต้นของการแปลรหัส ตำแหน่งที่ 1,692 ถึง 1,796 ดังภาพที่ 6 ซึ่งบริเวณดังกล่าว สามารถแยกข้าวพันธุ์ที่นำมาศึกษาได้ 2 กลุ่ม



ภาพที่ 6 บริเวณที่ออกแบบไพรเมอร์สำหรับบ่งความแตกต่างของยีน *PPR9* จากข้าวพันธุ์ IR58025B (IRB), ขาวดอกมะลิ 105 (KDM), กข47 (RD47) และ IR64 (IR64) กรอบ คือ บริเวณที่พบการแทรกของชิ้นยีนที่ขนาด 105 คู่เบส และแสดงบริเวณที่ออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการแยกข้าวทั้ง 2 กลุ่ม ออกจากกัน

จึงได้ออกแบบไพรเมอร์ที่คร่อมบริเวณที่พบการแทรกของชิ้นดีเอ็นเอ ดังแสดงในภาพที่ 6 เพื่อใช้บ่งความต่างของข้าวทั้ง 2 กลุ่มออกจากกัน ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อใช้บ่งความต่างของยีน *PPR9*

ยีน	Primer name	ลำดับเบส	bp	%GC	Tm (°C)	Size (bp)
RF5200 (*PPR9*)	In_PPR9F	5'-TTCAGCAAAATGAGGCAGCA-3'	20	45.0	55.5	730 หรือ 835
	In_PPR9R	5'-GAAGTGCCTCGTCAGTGAG-3'	19	57.9	55.4	

นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาเปรียบเทียบกับเครื่องหมายของยีน *PPR9* ที่มีรายงาน คือ RMS_PPR9_1 และ RMS_PPR9_4 (Pranathi *et al.*, 2016)

7.1.3 การทดสอบเครื่องหมายที่จำเพาะต่อยีน *PPR9* ที่ออกแบบได้

ตรวจสอบหรือทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบได้กับตัวอย่างข้าวทั้ง 16 พันธุ์ โดยใช้ชุดน้ำยา 2xMyTaq™ Red Mix (BioLine, Australia) ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา คือ 0.5 ไมโครโมลาร์ ใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างประมาณ 20 นาโนกรัม ในปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา จากนั้น ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้สภาวะที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้น เข้าสู่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที เป็นจำนวน 50 รอบ สุดท้าย ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที เมื่อสิ้นสุดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จะวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยเทคนิค 2% agarose gel electrophoresis เพื่อศึกษาแถบดีเอ็นเอ

7.1.4 การเปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นยีนที่ได้จากเครื่องหมายที่จำเพาะต่อยีน *PPR9*

จากข้าวทั้ง 16 พันธุ์ ที่นำมาทดสอบนั้น พบการเพิ่มปริมาณปรากฏแถบแบนจำนวน 2 แถบ ขนาด 730 และ 830 คู่เบส จากข้าวบางพันธุ์ จึงได้ทำการแยกบริสุทธิ์แถบดีเอ็นเอที่สนใจ โดยใช้ชุดสำเร็จรูป PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA) จากพันธุ์ข้าว 6 พันธุ์ คือ พันธุ์ IR58025A ขนาด 730 และ 830 คู่เบส, พันธุ์ IR58025B ขนาด 730 เบส, พันธุ์เจ้าหอมนิล ขนาด 730 คู่เบส, พันธุ์ กข21 ขนาด 730 คู่เบส, พันธุ์ชัยนาท 1 ขนาด 730 และ 830 คู่เบส และพันธุ์ IR64 ขนาด 730 และ 830 คู่เบส

จากนั้น ส่งตัวอย่างไปอ่านลำดับเบสที่บริษัท 1st Base Sequencing (Malaysia) และผลการอ่านลำดับเบสที่ได้ จะนำไปเปรียบเทียบกับยีนแก้ความเป็นหมันแต่ละยีนที่อยู่ในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม clustalX (1.8)

7.2 การพัฒนาเครื่องหมายของยีน *PPR10* ที่ตำแหน่ง *Rf4*

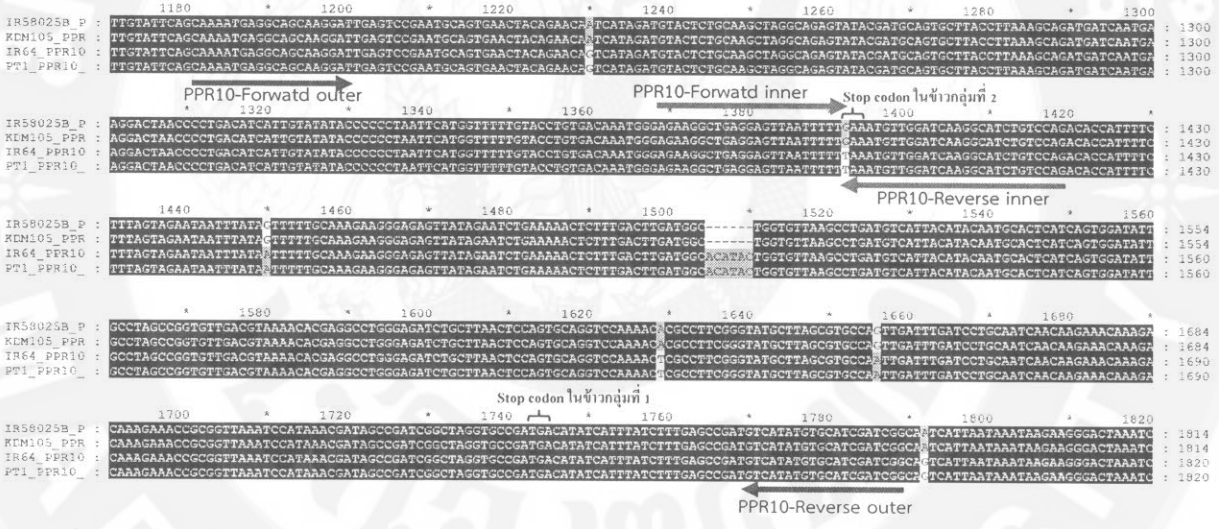
7.2.1 การศึกษาบริเวณลำดับดีเอ็นเอเพื่อออกแบบเครื่องหมายที่จำเพาะต่อยีน *PPR10*

จากผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *PPR10* จากข้าวทั้ง 11 พันธุ์ ที่นำมาศึกษาเทียบกับลำดับเบสของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล พบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบส SNP ที่เบสตำแหน่ง 1,392 เป็น G หรือ T จึงสามารถแบ่งกลุ่มยีน *PPR10* ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ G specific

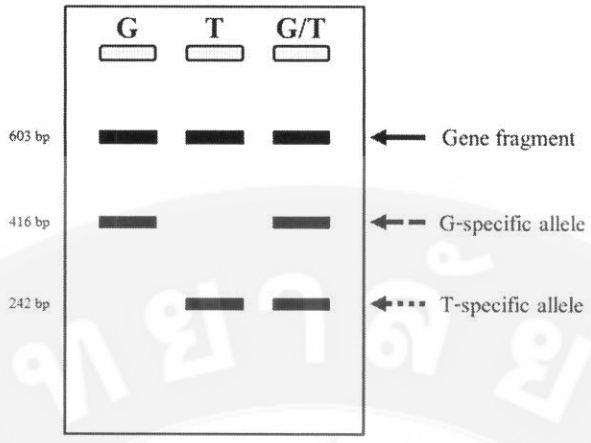
allele และ T specific allele ตามลำดับ จึงนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อบ่งความต่างของข้าวทั้ง 2 กลุ่ม ออกจากกัน

โดยไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบนั้นจะเป็นไพรเมอร์ชนิด tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction (tetra-primer ARMS-PCR) คือ ไพรเมอร์ที่มี 4 สาย โดยไพรเมอร์ 2 สาย ที่อยู่ด้านใน ซึ่งแต่ละสายจะมีลำดับเบสที่เกิดจาก SNP ที่ต่างกัน ทำให้ได้ขนาดและการเข้าจับของไพรเมอร์ที่ต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 7 และ 8 และตารางที่ 11

โดยหากบริเวณตำแหน่ง 1,392 เป็นเบส T (T specific allele) จะสามารถเพิ่มจำนวนได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่ขนาด 242 และ 603 คู่เบส แต่หากบริเวณตำแหน่ง 1,392 เป็นเบส G (G specific allele) จะสามารถเพิ่มจำนวนได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่ขนาด 416 และ 603 คู่เบส



ภาพที่ 7 บริเวณที่ออกแบบไพรเมอร์สำหรับแยกความแตกต่างของยีน *PPR10* จากข้าวพันธุ์ IR58025B (IRB), ขาวดอกมะลิ 105 (KDM), ปทุมธานี 1 (PT1) และ IR64 (IR64)



ภาพที่ 8 ผลการเพิ่มปริมาณจาก tetra-primer ARMS-PCR ของยีน *PPR10*

ตารางที่ 11 ไพรเมอร์ tetra-primer ARMS-PCR ที่ใช้บ่งความต่างของยีน *PPR10*

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' ไป 3')	SNP (Allele)	ขนาดของ amplicon (bp)
PPR10-Forward outer	CAAAATGAGGCAGCAAGGAT		603
PPR10-Reverse outer	CCGATCGATGCACATATGAC		
PPR10-Forward inner	AGAAGGCTGAGGAGTTAATTTTTG	G	416
PPR10-Reverse inner	CTGGACAGATGCCTTGATCCAACATTTA	T	242

7.2.2 การทดสอบเครื่องหมายที่จำเพาะต่อยีน *PPR10* ที่ออกแบบได้

ได้ทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบได้กับตัวอย่างข้าวทั้ง 16 พันธุ์ โดยใช้ชุดน้ำยา 2xMyTaq™ Red Mix (BioLine, Australia) ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยามีอัตราส่วนระหว่าง Inner:Outer เท่ากับ 0.5:1 เท่า ดีเอ็นเอตัวอย่างประมาณ 20 นาโนกรัม ในปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา จากนั้น ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้สภาวะที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้น เข้าสู่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 60 องศาเซลเซียส 15

วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที เป็นจำนวน 45 รอบ สุดท้ายอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที เมื่อสิ้นสุดการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ จะวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยเทคนิค 2% agarose gel electrophoresis

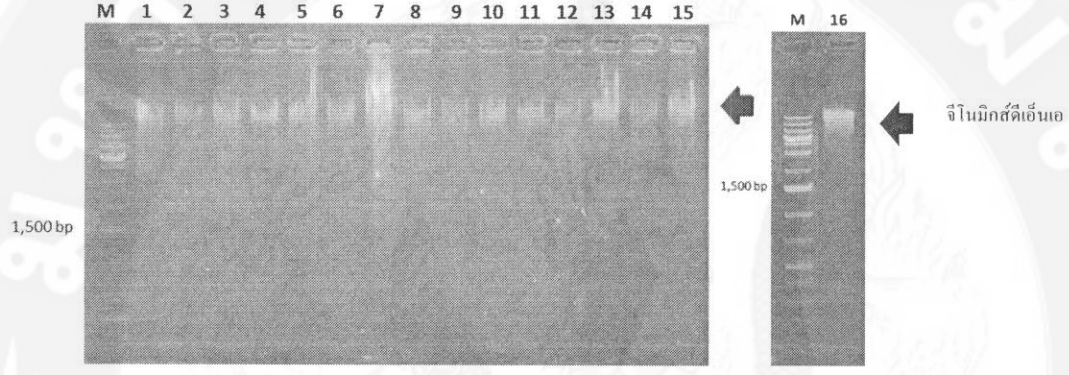
7.2.3 การเปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นยีนที่ได้จากเครื่องหมายยีน *PPR10*

เมื่อทดสอบ tetra-primer ARMS-PCR ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะต่อบริเวณ SNP ของยีน *PPR10* เพื่อใช้ในการบ่งความต่างของข้าวที่มีลำดับเบสต่างกันทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าไพรเมอร์ที่ได้นั้นสามารถใช้ในการแยกข้าวทั้ง 2 กลุ่ม ที่มีลำดับเบสต่างกันได้ ซึ่งจะให้แถบที่ต่างกันออกไป แต่พบแถบดีเอ็นเอที่ต่างจากที่ออกแบบ ในข้าวพันธุ์ปราจีนบุรี 2 และสังข์หยดพัทลุง จึงแยกบริสุทธิ์แถบที่สนใจด้วยชุดสำเร็จรูป PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA) สำหรับพันธุ์ข้าวที่ได้ส่งแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทดสอบไปอ่านลำดับเบสมี 8 พันธุ์ คือ พันธุ์ IR58025A ขนาด 400 คู่เบส, ขาวดอกมะลิ 105 ขนาด 400 คู่เบส, เจ้าหอมนิล ขนาด 600 คู่เบส, ปราจีนบุรี 2 ขนาด 600, 700 และ 800 คู่เบส, ลูกแดงปัตตานี ขนาด 200 และ 600 คู่เบส, สังข์หยดพัทลุง ขนาด 600, 700 และ 800 คู่เบส, กข47 ขนาด 600คู่เบส และ IR64 ขนาด 600 คู่เบส โดยส่งตัวอย่างไปอ่านลำดับเบสที่บริษัท 1st Base Sequencing (Malaysia) และผลการอ่านลำดับเบสที่ได้ จะนำไปเปรียบเทียบกับยีนแก้ความเป็นหมันแต่ละยีนที่อยู่ในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม clustalX (1.8)

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างข้าวที่นำมาศึกษา

จากการสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากการเพาะต้นข้าวเป็นเวลา 2 สัปดาห์ สามารถสกัดดีเอ็นเอจากข้าวทั้ง 16 พันธุ์ โดยสังเกตจากแถบดีเอ็นเอที่มีความสว่างเข้มอยู่สูงกว่าแถบของ DNA ladder และเมื่อดูถึงคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้น จะเห็นได้ว่า มีการแตกหักของดีเอ็นเอเล็กน้อย เมื่อเทียบกับแถบหลักที่ปรากฏ ดังนั้น ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดีพอ ที่จะนำมาใช้ในการทดสอบต่อไป (ภาพที่ 9)

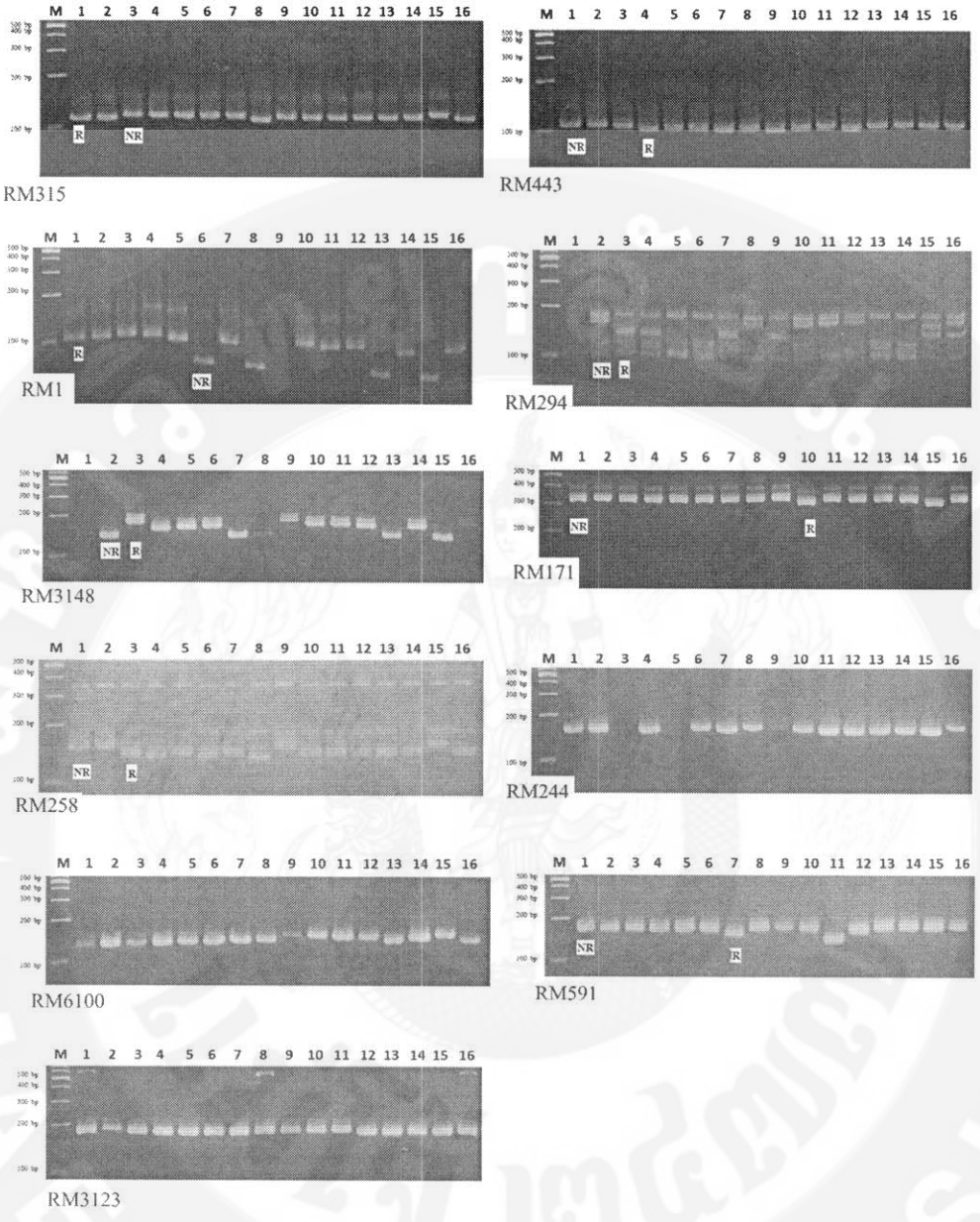


ภาพที่ 9 ผลการทำ 1% agarosegel electrophoresis ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ โดย เลน M คือ GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder เลน 1 คือ พันธุ์ IR582025B เลน 2 คือ ขาวดอกมะลิ 105 เลน 3 คือ เจ้าหอมนิล เลน 4 คือ นางมลเอส 4 เลน 5 คือ ปิ่นแก้ว 56 เลน 6 คือ กข21 เลน 7 คือ บาสมาติ เลน 8 คือ ปทุมธานี 1 เลน 9 คือ สุพรรณบุรี 1 เลน 10 คือ ชัยนาท 1 เลน 11 คือ ปราจีนบุรี 2 เลน 12 คือ ลูกแดงปัตตานี เลน 13 คือ สังข์หยดพัทลุง เลน 14 คือ กข47 เลน 15 คือ IR64 และเลน 16 คือ IR582025A ตามลำดับ

2. การศึกษาความต่างของยีนที่ตำแหน่ง Rf4 และ Rf3 ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR

จากรายงานเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่แสดงความต่าง (polymorphism) ในข้าวที่เรณูเป็นหมันและไม่เป็นหมัน มีรายงานว่า สัมพันธ์กับยีนแก้ความเป็นหมันตำแหน่ง Rf4 และ Rf3 โดยเครื่องหมาย SSR ที่รายงานว่าตั้งอยู่ใกล้ชิดที่ตำแหน่ง Rf4 จำนวน 5 เครื่องหมาย ที่อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 10 ได้แก่ RM258, RM244, RM6100, RM591, และ RM3123 ส่วนเครื่องหมาย SSR ที่รายงานว่า ตั้งอยู่ใกล้ชิดที่ตำแหน่ง Rf3 จำนวน 6 เครื่องหมาย ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1

ได้แก่ RM315, RM443, RM1, RM294, RM3148 และ RM171 โดยผลการเพิ่มปริมาณให้แถบดีเอ็นเอ ตามภาพที่ 10 พบเครื่องหมายที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างกลุ่มพันธุ์แก้ความเป็นหมันของเรณู (R line) กับพันธุ์ที่ไม่แก้ความเป็นหมัน (A หรือ B line) จำนวน 6 เครื่องหมาย โดยการจำแนกแถบดีเอ็นเอจะเป็นไปตามการวิจัยที่มีรายงานก่อนหน้า (Alavi *et al*., 2009; Kiani, 2015, Jing, 2001) หากแถบที่ได้มีขนาดเป็นของกลุ่มแก้ความเป็นหมัน จะแสดงเป็น R ถ้าแถบดีเอ็นเอที่ให้เป็นของกลุ่มไม่แก้ความเป็นหมันของเรณูจะแสดงเป็น NR ดังแสดงในตารางที่ 12 จากนั้นคำนวณเป็นค่าความถูกต้อง โดยการนำจำนวนเครื่องหมายที่ให้แถบดีเอ็นเอที่จำแนกได้สอดคล้องกับกลุ่มของพันธุ์ข้าว หารด้วยจำนวนเครื่องหมายทั้งหมด ตัวอย่างเช่น เครื่องหมาย RM258 พบเครื่องหมายที่ให้แถบที่สอดคล้องกับกลุ่มของข้าวจำนวน 8 พันธุ์ จาก 16 พันธุ์ ทำให้มีความถูกต้องเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เครื่องหมาย RM315 และ RM1 แสดงแถบดีเอ็นเอที่สอดคล้องกับกลุ่ม R line ในข้าวพันธุ์ IR58025A/ IR58025B ซึ่งไม่ถูกต้อง จึงไม่ทำการประเมินค่าความถูกต้องของเครื่องหมายเหล่านี้ (N/A) โดยที่ตำแหน่ง Rf4 พบเครื่องหมาย RM258 และ RM591 มีความถูกต้อง 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ตำแหน่ง Rf3 พบเครื่องหมาย RM443 RM294 RM3148 และ RM171 โดยที่เครื่องหมาย RM3148 ให้ความถูกต้องสูงสุดเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น เครื่องหมาย RM3148 นี้จะสามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกยีนแก้ความเป็นหมันที่ตำแหน่ง Rf3 ได้



ภาพที่ 10 ผลการทำ 4% agarose gel electrophoresis ของเครื่องหมาย SSR จำนวน 11 เครื่องหมาย ที่ได้จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ โดยเลน M คือ GeneRuler 100 bp DNA Ladder เลน 1-16 คือ พันธุ์ IR582025A, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, นางมลเอส 4, ปิ่นแก้ว 56, กข21, บาสมาติ, ปทุมธานี 1, สุพรรณบุรี 1, ชัยนาท 1, พันธุ์ปราจีนบุรี 2, ลูกแดงปัตตานี, สังข์หยดพัทลุง, กข47, IR64 และ IR582025B ตามลำดับ

ตารางที่ 12 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมาย SSR ต่าง ๆ ที่ตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ

กลุ่ม	ลำดับที่	พันธุ์	*Rf3*						*Rf4*				
			Chromosome 1						Chromosome 10				
			RM315	RM443	RM1	RM294	RM3148	RM171	RM258	RM244	RM6100	RM591	RM3123
A line	1	IR58025A	R	NR	R	NR	NR	NR	NR	-	-	NR	-
B line	2	IR58025B	R	NR	R	NR	NR	NR	NR	-	-	NR	-
	3	ขาวดอกมะลิ 105	NR	NR	R	R	R	NR	R	-	-	NR	-
	4	เจ้าหอมนิล	NR	R	R	R	R	NR	R	-	-	NR	-
	5	นางมลเอส 4	NR	NR	R	R	R	NR	R	-	-	NR	-
	6	ปิ่นแก้ว 56	NR	NR	NR	R	R	NR	R	-	-	NR	-
	7	กข21	NR	R	R	R	NR	NR	R	-	-	R	-
	8	บาสมาติ	NR	NR	NR	NR	NR	NR	R	-	-	NR	-
R line	9	ปทุมธานี 1	R	R	R	R	R	NR	NR	-	-	NR	-
	10	สุพรรณบุรี 1	R	NR	R	NR	R	R	R	-	-	NR	-
	11	ชัยนาท 1	R	NR	R	NR	R	NR	R	-	-	R	-
	12	ปราจีนบุรี 2	R	R	R	NR	R	NR	R	-	-	NR	-
	13	ลูกแดงปัตตานี	R	NR	NR	R	NR	NR	R	-	-	NR	-

กลุ่ม	ลำดับที่	พันธุ์	*Rf3*						*Rf4*				
			Chromosome 1						Chromosome **10**				
			RM315	RM443	RM1	RM294	RM3148	RM171	RM258	RM244	RM6100	RM591	RM3123
	14	สังข์หยดพัทลุง	R	NR	R	R	R	NR	R	-	-	NR	-
	15	กข47	NR	NR	NR	R	NR	R	NR	-	-	NR	-
	16	IR64	R	NR	R	R	R	NR	R	-	-	NR	-
	เปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง		N/A	50	N/A	50	75	62.5	50	-	-	50	-

หมายเหตุ R คือ ปรากฏหรือระบุว่า พันธุ์ที่ทดสอบมีแถบดีเอ็นเอของยีนเครื่องหมายแก้ความเป็นหมันของเรณู

NR คือ ไม่ปรากฏหรือระบุว่า พันธุ์ที่ทดสอบมีแถบดีเอ็นเอของยีนเครื่องหมายแก้ความเป็นหมัน-v'giI^

N/A คือ ไม่สามารถประเมิน

- คือ ไม่ได้ดำเนินการทดสอบ

3. ลำดับเบสของยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูตำแหน่ง *Rf4* จากข้าวไทย

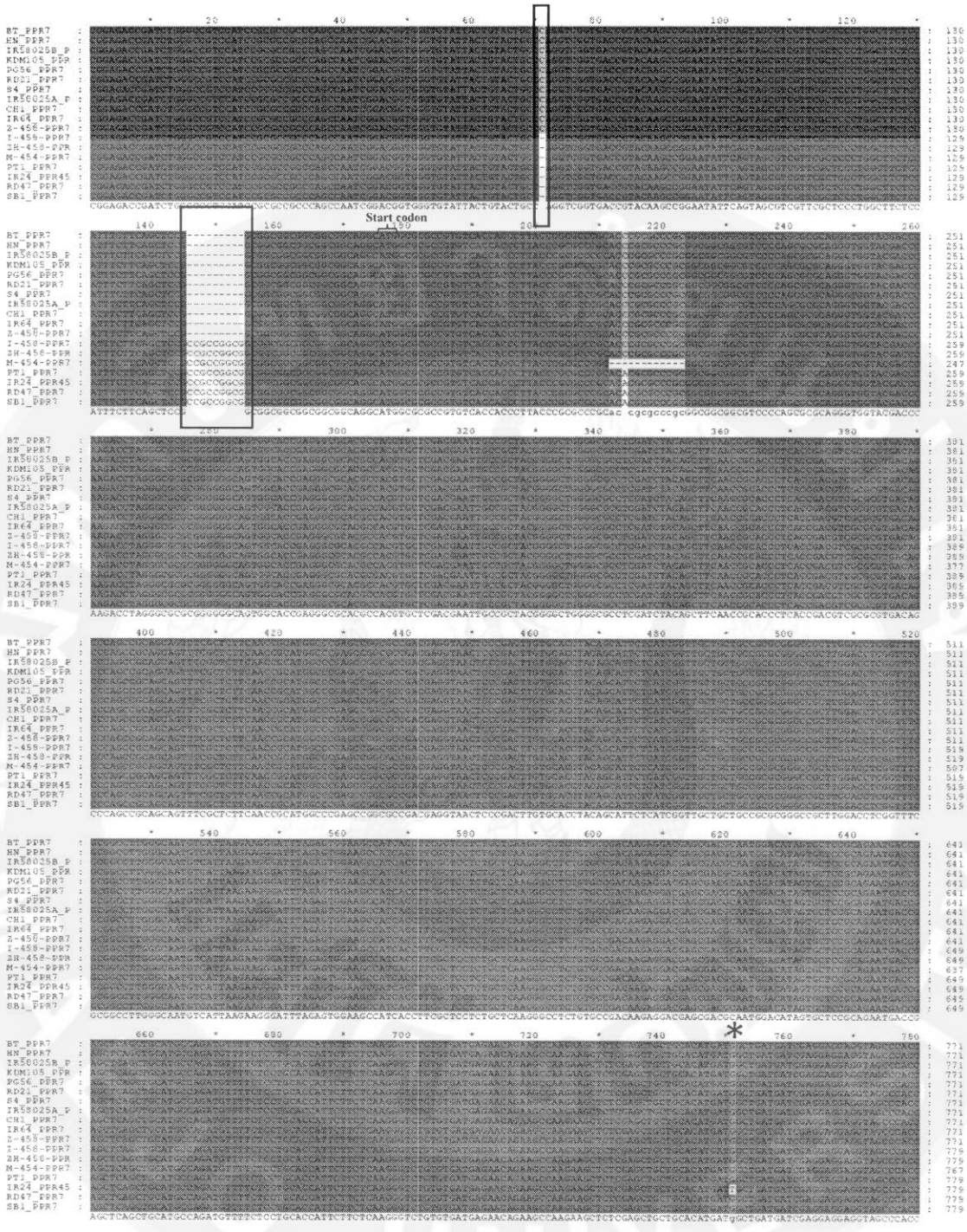
3.1 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *PPR7*

เปรียบเทียบลำดับเบสที่โคลนได้จากข้าวทั้ง 13 พันธุ์ กับลำดับเบสของยีน *PPR7* ที่มีรายงานในฐานข้อมูล คือ ข้าวพันธุ์ Minghui 63, IR24, ZS97A และ ZH11 (Tang *et al.*, 2014) และยีน *PPR458* จากข้าวพันธุ์ IR24 (Kazama and Toriyama, 2014) รายละเอียดผลการเปรียบเทียบลำดับเบสเป็นดังแสดงในภาพที่ 11 ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบลำดับเบสที่โคลนได้จากข้าวแต่ละพันธุ์เทียบกับลำดับเบสที่ได้จากฐานข้อมูล พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มตามขนาดที่ได้ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

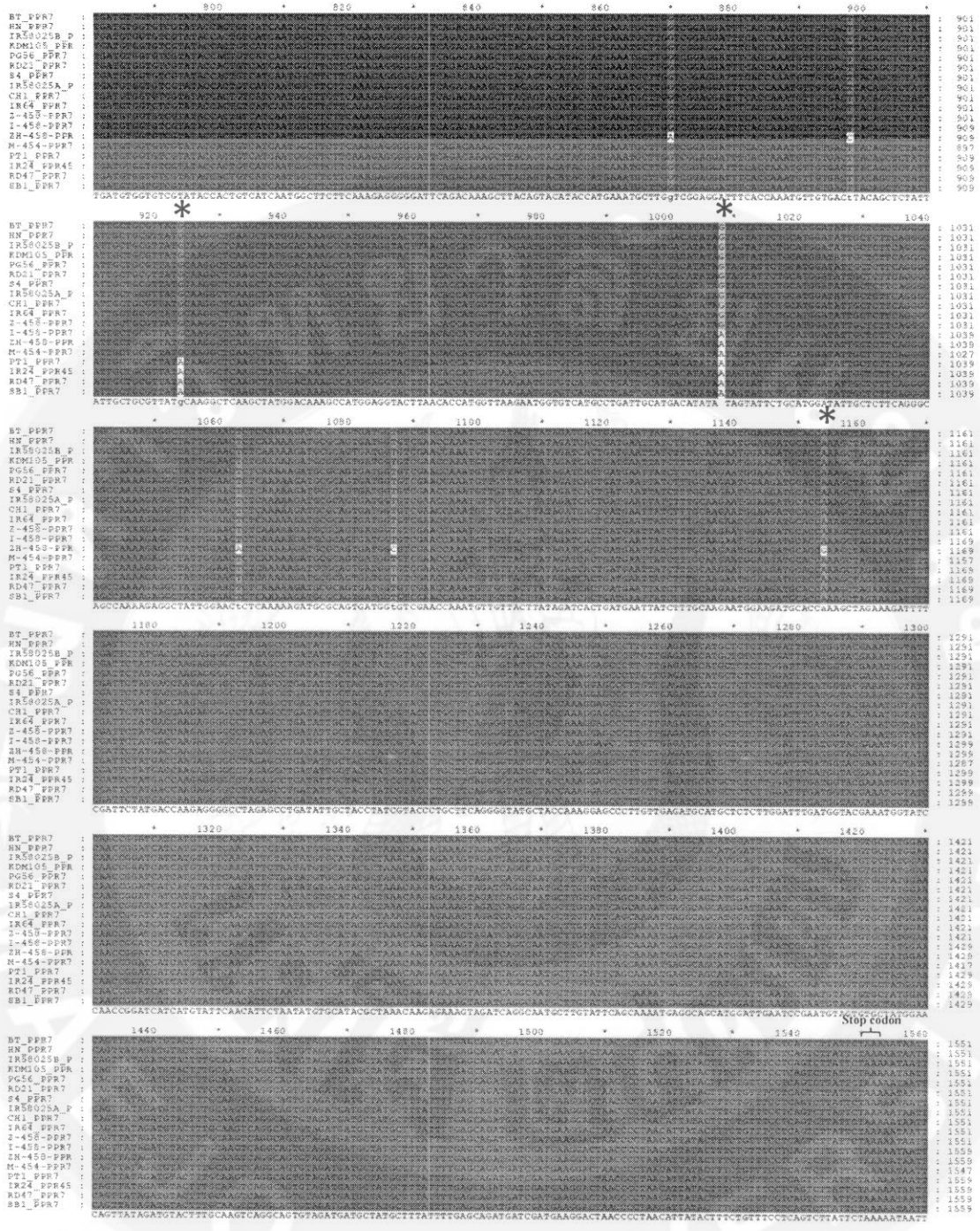
- กลุ่มที่ 1 ยีน *PPR7* ที่มีขนาดของลำดับเบสยาว 1,744 คู่เบส จากข้าวพันธุ์ IR24, ZH11 และยีน *PPR458* จากข้าวพันธุ์ IR24 และยีน *PPR7* ที่ได้จากข้าวพันธุ์กข47, สุพรรณบุรี 1 และปทุมธานี 1 เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะบริเวณ รหัสที่แปลรหัสไปเป็นโปรตีนนั้นมีขนาด 1,377 คู่เบส หรือมีขนาดของโปรตีน 458 กรดอะมิโน

- กลุ่มที่ 2 ยีน *PPR7* ที่มีขนาดของลำดับเบสยาว 1,736 คู่เบส จากข้าวพันธุ์ ZS97A และยีน *PPR7* ที่ได้จากข้าวพันธุ์ IR58025A, IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, นางมลเอส 4, ปิ่นแก้ว 56, บาสมาติ, กข21, ชัยนาท 1 และ IR64 เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะบริเวณรหัสที่แปลรหัสไปเป็นโปรตีนนั้นมีขนาด 1,377 คู่เบส หรือมีขนาดของโปรตีน 458 กรดอะมิโน โดยพบการขาดหายไปของลำดับเบส (deletion) ที่ตำแหน่ง 71 (C) และการเพิ่มขึ้นของลำดับเบส (insertion) ที่ตำแหน่ง 146 ถึง 154 หรือเท่ากับ 9 คู่เบส (5'-CCGCCGGCG-3') ซึ่งทั้งสองบริเวณนี้จะพบที่ตำแหน่งด้านหน้า (upstream) ของจุดเริ่มต้นการแปลรหัส (start codon)

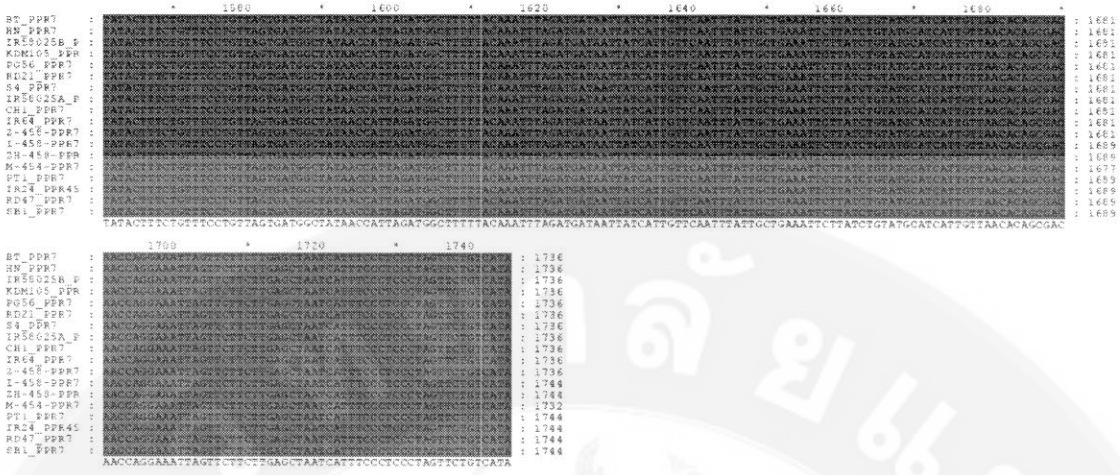
- กลุ่มที่ 3 ยีน *PPR7* ที่มีขนาดของลำดับเบสยาว 1,732 คู่เบส จากข้าวพันธุ์ Minghui 63 ที่ได้จากฐานข้อมูล และเมื่อเปรียบเทียบเฉพาะบริเวณรหสที่แปลรหัสไปเป็นโปรตีน นั้นมีขนาด 1,365 คู่เบส หรือมีขนาดของโปรตีน 454 กรดอะมิโน เนื่องจากบริเวณที่อยู่ด้านหลัง (downstream) ของจุดเริ่มการแปลรหัส (start codon) หรือบริเวณรหัสมีการขาดหายไปของลำดับเบส (deletion) จำนวน 12 คู่เบส (5'-CCCGCACCCGCG-3') ตำแหน่งที่ 32 ถึง 44 นับจากจุดเริ่มการแปลรหัสซึ่งแปลรหัสได้เป็น 4 กรดอะมิโน (TRAR)



ภาพที่ 11 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *PPR7* จากข้าวพันธุ์ IR58025A (IRA), IR58025B (IRB), ขาวดอกมะลิ 105 (KDM), เจ้าหอมนิล (HN), นางมล เอส-4 (S4), ปิ่นแก้ว 56 (PG56), กข21 (RD21), บาสมาติ (BT), ปทุมธานี 1 (PT1), สุพรรณบุรี 1 (SB1), ชัยนาท 1 (CH1), กข47 (RD47), IR64 (IR64) และข้าวพันธุ์ที่ได้รายงานไว้ในฐานข้อมูล โดย * คือ บริเวณ SNP ที่เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน กรอบ คือ บริเวณที่เกิดการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของลำดับเบส



ภาพที่ 11 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *PPR7* (ต่อ)



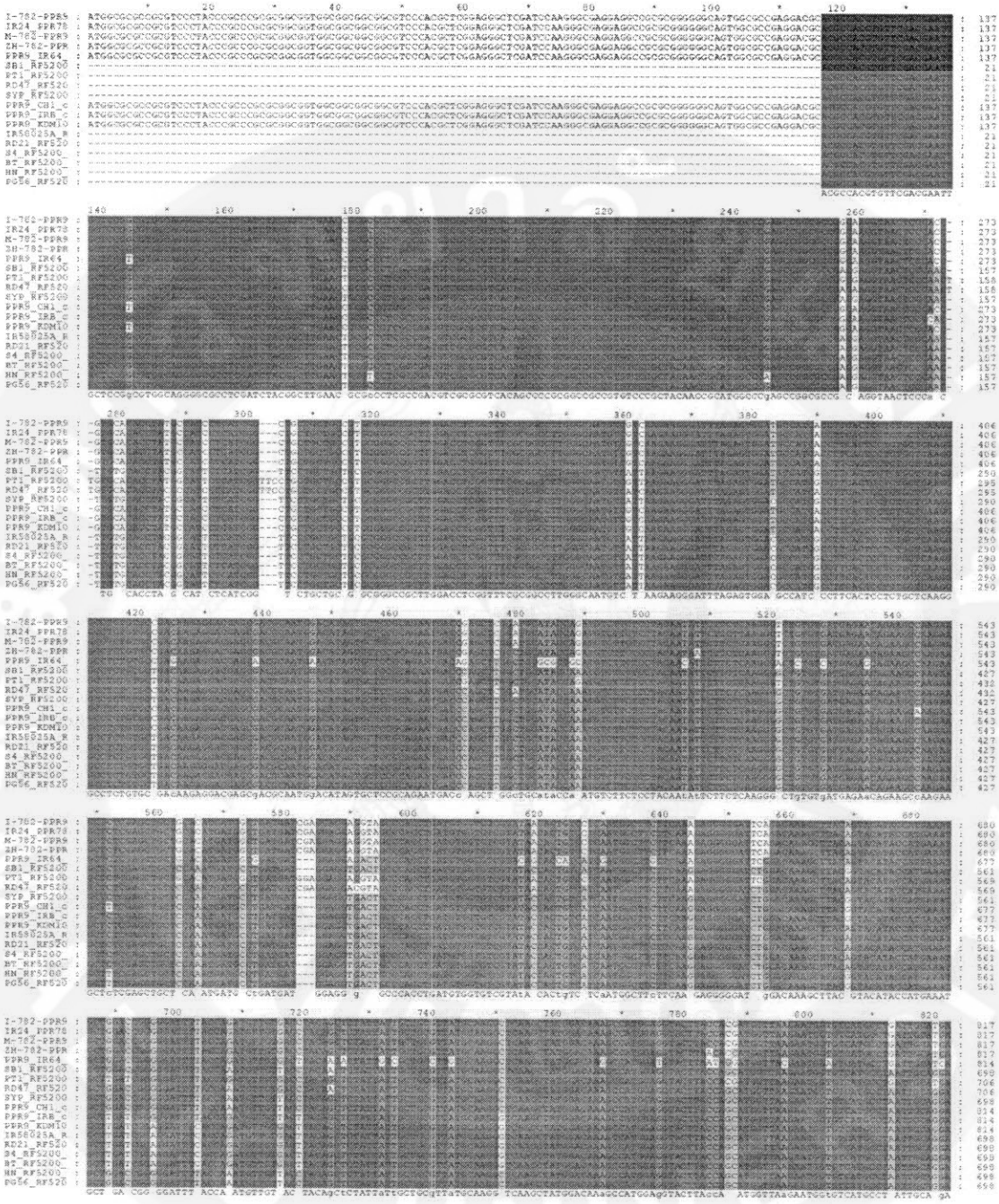
ภาพที่ 11 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *PPR7* (ต่อ)

3.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *PPR9*

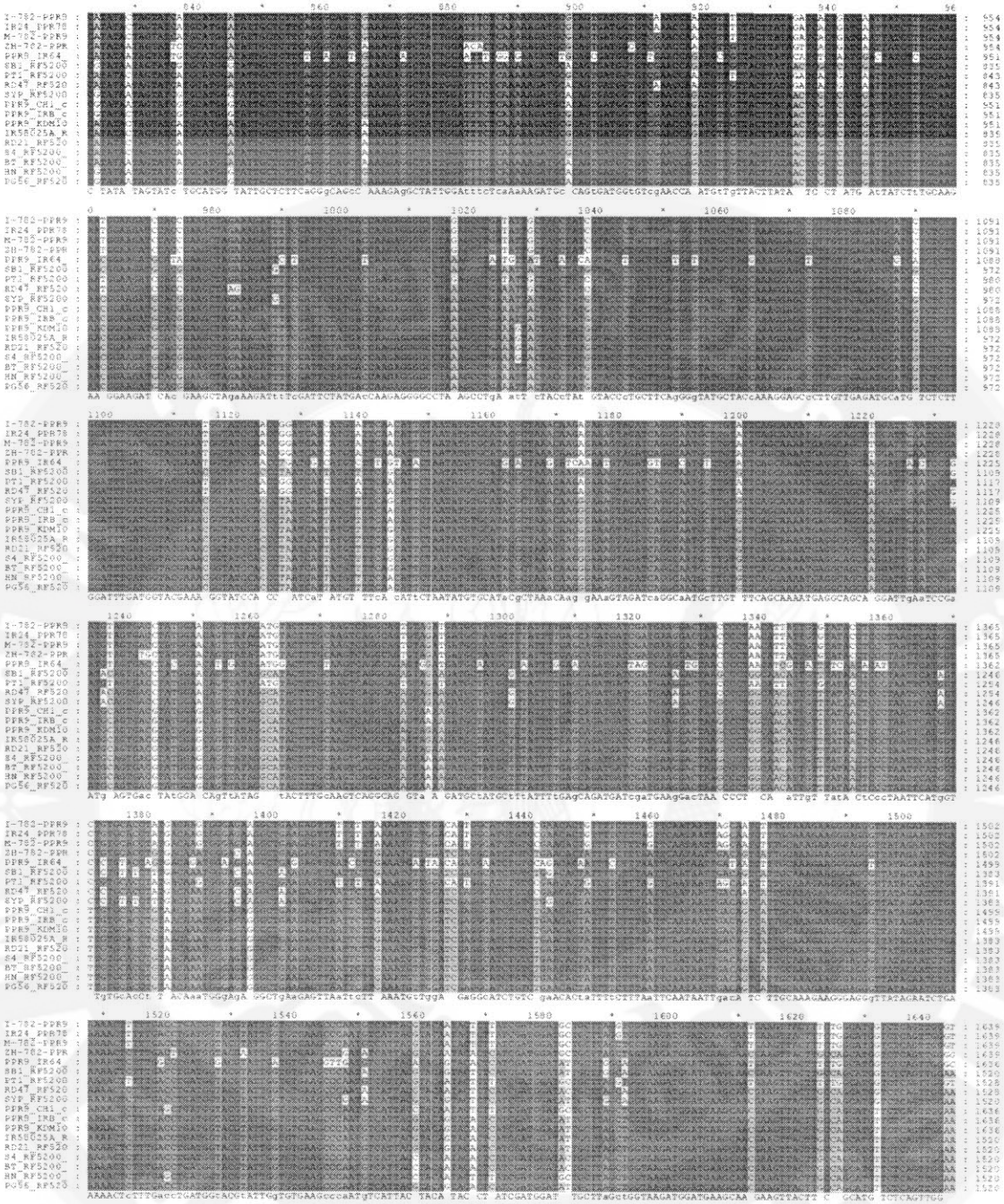
จากการอ่านลำดับเบสของข้าวทั้ง 14 พันธุ์ ที่ทำการศึกษา โดยจะแบ่งเป็น 10 พันธุ์ ที่ได้จากการอ่านลำดับเบสเฉพาะช่วงที่ได้จากไพรเมอร์ Os10g0495200 ได้แก่ พันธุ์ IR58025A, เจ้าหอมนิล, นางมลเอส 4, ปิ่นแก้ว 56, ปทุมธานี 1, สุพรรณบุรี 1, กข47, กข21, บาสมาติ และสังข์หยดพัทลุง และข้าวอีก 4 พันธุ์ คือ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, ชัยนาท 1, และ IR64 ที่ได้จากการโคลนยีนจากไพรเมอร์ Os10g0495200 และทำการเพิ่มปริมาณบริเวณที่คร่อมด้านหน้าของยีน *PPR9* ด้าน start codon และบริเวณท้ายของยีน *PPR9* ด้าน stop codon เทียบกับกับลำดับเบสของยีน *PPR7* ที่มีรายงานในฐานข้อมูลจากข้าวพันธุ์ Minghui 63, IR24, และ ZH11 (Tang *et al*., 2014) และยีน *PPR782* จากข้าวพันธุ์ IR24 (Kazama and Toriyama, 2014) ผลการเปรียบเทียบลำดับเบส ดังแสดงในภาพที่ 12 ซึ่งจะเป็นการเปรียบเทียบลำดับเบสที่โคลนได้จากข้าวแต่ละพันธุ์ เทียบกับลำดับเบสที่ได้จากฐานข้อมูล พบว่า สามารถทำการแบ่งกลุ่มตามขนาดที่ได้ออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 พบการแทรกของลำดับเบส (insertion) ขนาด 105 คู่เบส หลังจุดเริ่มต้นของการแปลรหัสประมาณตำแหน่งที่ 1,692 ถึง 1,796 ได้แก่ ข้าวพันธุ์ IR58025A, IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, นางมลเอส 4, ปิ่นแก้ว 56, กข21 และชัยนาท 1

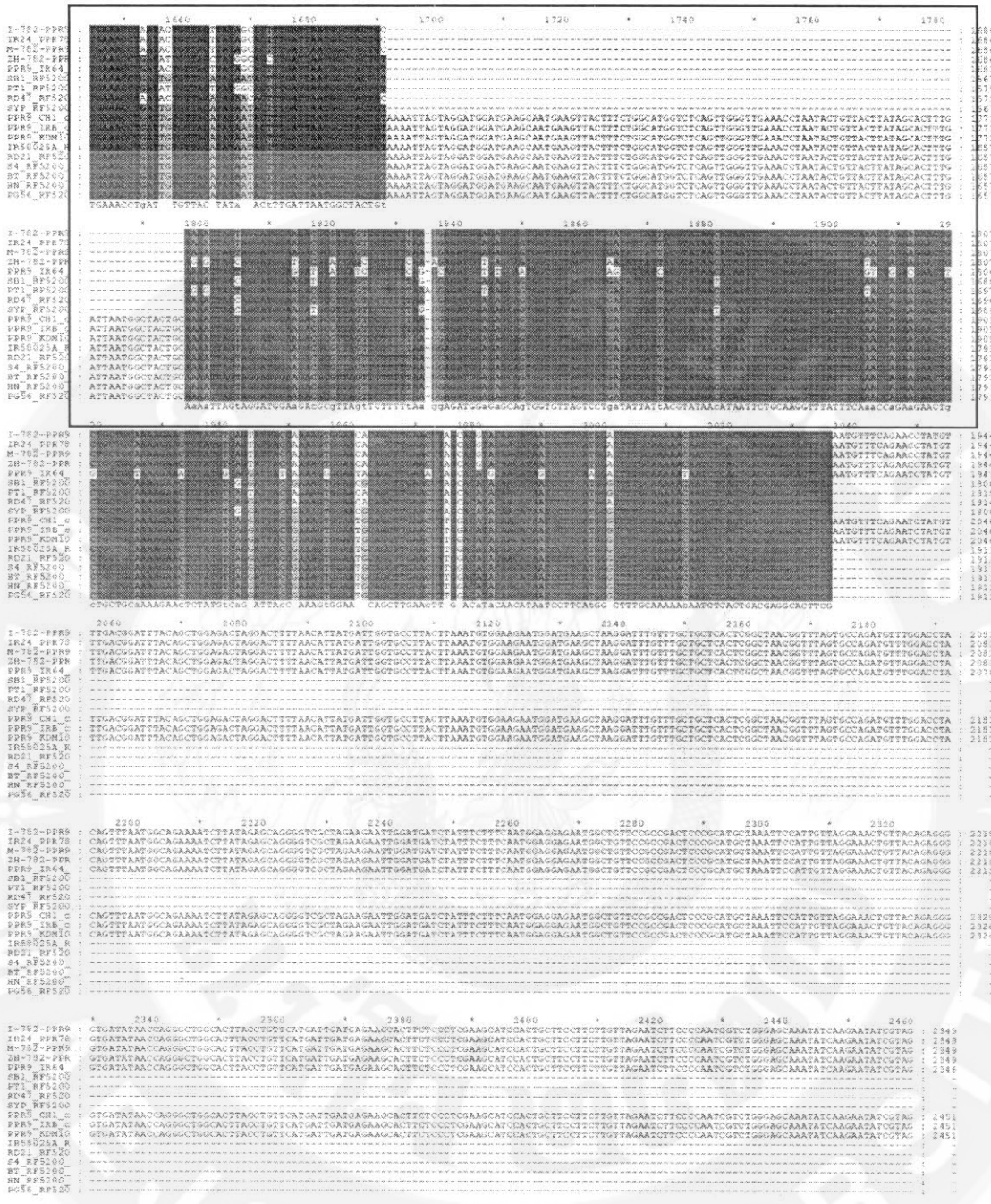
- กลุ่มที่ 2 ไม่พบการแทรกตัวของลำดับเบส ได้แก่ ข้าวพันธุ์ Minghui 63, IR24, และ ZH11, ยีน *PPR782* จากข้าวพันธุ์ IR24, สุพรรณบุรี 1, ปทุมธานี 1, สังข์หยดพัทลุง กข47 และ IR64



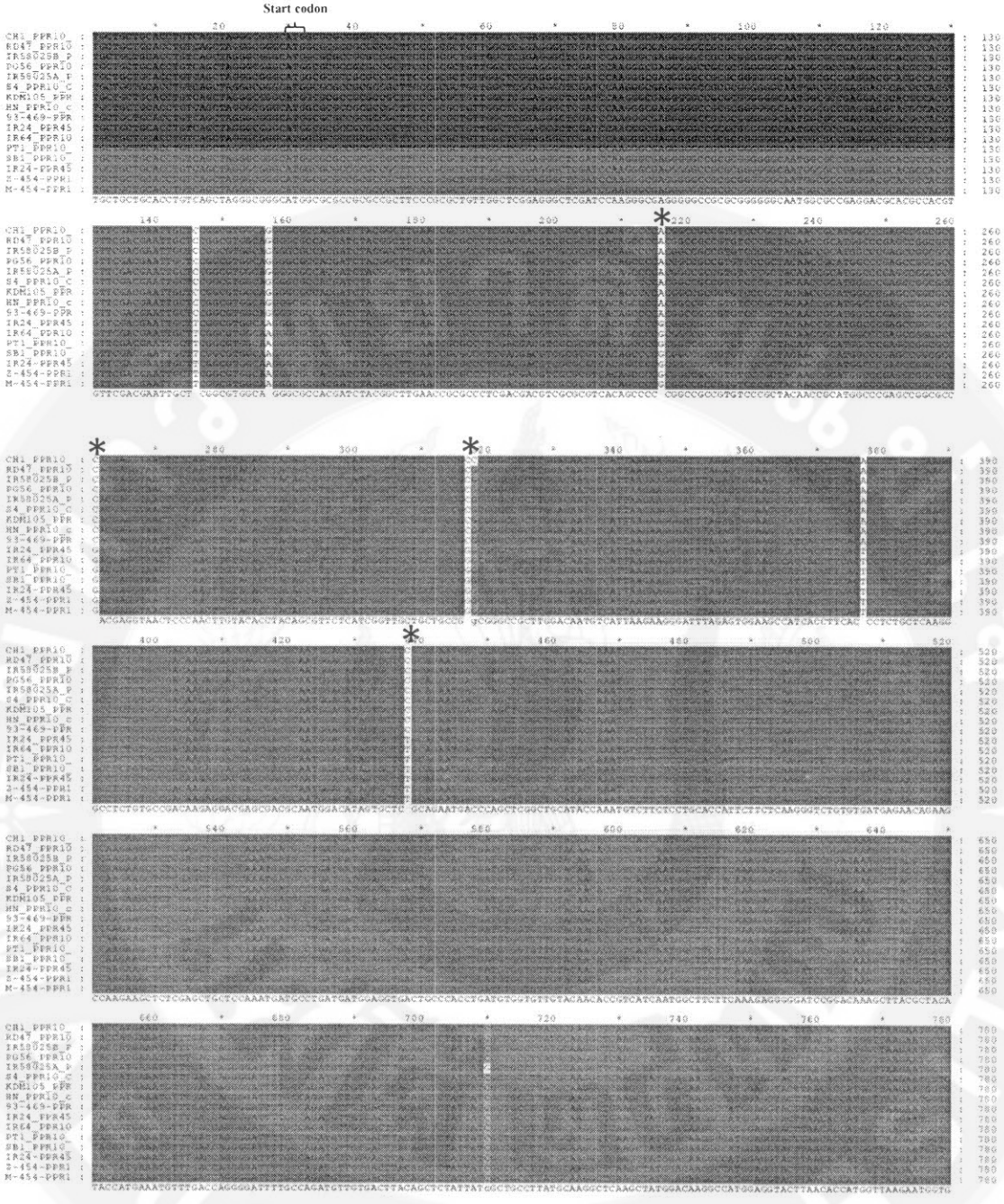
ภาพที่ 12 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *PPR9* จากข้าวพันธุ์ IR58025A (IRA), IR58025B (IRB), ขาวดอกมะลิ 105 (KDM), เจ้าหอมนิล (HN), นางมลเอส 4 (S4), ปิ่นแก้ว 56 (PG56), กข21 (RD21), บาสมาติ (BT), ปทุมธานี 1 (PT1), สุพรรณบุรี 1 (SB1), ชัยนาท 1 (CH1), สังข์หยดพัทลุง (SYP), กข47 (RD47) IR64 (IR64) และข้าวพันธุ์ที่รายงานในฐานข้อมูล โดยกรอบ คือ บริเวณที่เกิดการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของลำดับเบส



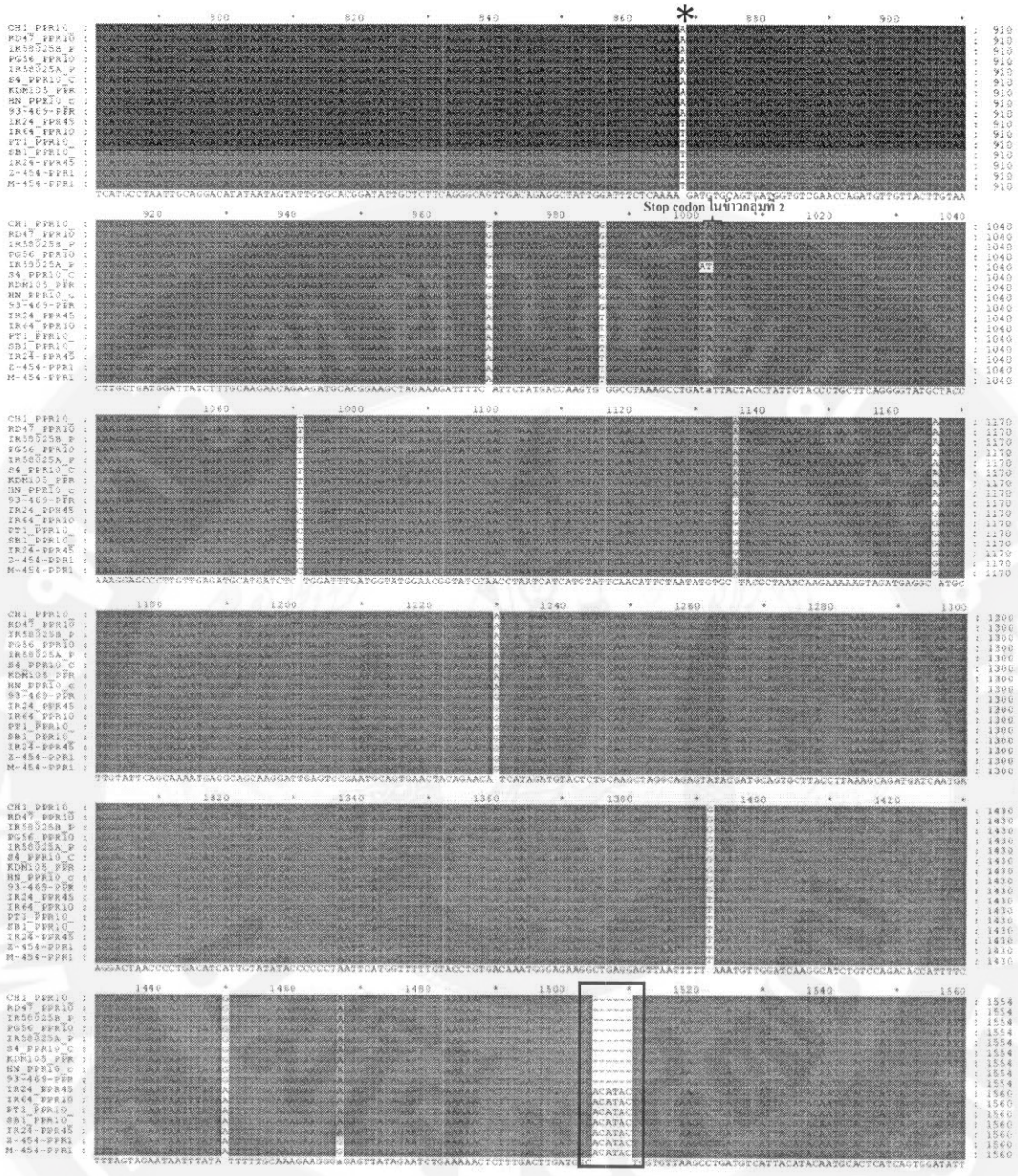
ภาพที่ 12 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *PPR9* (ต่อ)



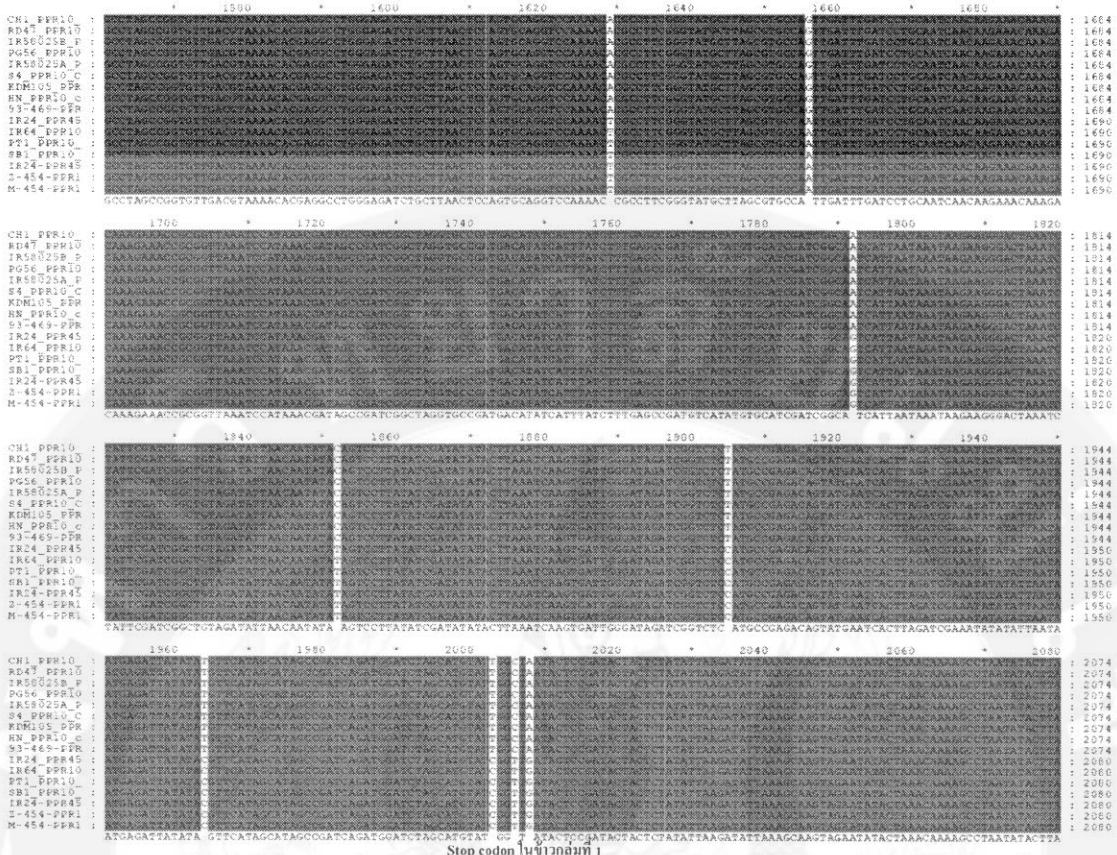
ภาพที่ 12 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *PPR9* (ต่อ)



ภาพที่ 13 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *PPR10* จากข้าวพันธุ์ IR58025A (IRA), IR58025B (IRB), ขาวดอกมะลิ 105 (KDM), เจ้าหอมนิล (HN), นางมลเอส 4 (S4), ปิ่นแก้ว 56 (PG56), ปทุมธานี 1 (PT1), สุพรรณบุรี 1 (SB1), ชัยนาท 1 (CH1), กข47 (RD47) IR64 (IR64) และจากข้าวพันธุ์ที่ได้รายงานไว้ในฐานข้อมูล (*PPR10*) โดย * คือ บริเวณ SNP ที่เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน กรอบ คือ บริเวณที่เกิดการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของลำดับเบส



ภาพที่ 13 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *PPR10* (ต่อ)



ภาพที่ 13 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *PPR10* (ต่อ)

3.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *PPR10*

ในการเปรียบเทียบลำดับเบสที่โคลนจากข้าวทั้ง 11 พันธุ์ กับลำดับเบสที่มีรายงานในฐานข้อมูลจากข้าวพันธุ์ Minghui 63, ZS97A และ 93-11 (Tang *et al.*, 2014) และยีน *PPR454* จากข้าวพันธุ์ IR24 (Kazama and Toriyama 2014) ซึ่งจากผลการเปรียบเทียบลำดับเบส พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตามขนาดที่ได้ออกเป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 13) ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 ยีน *PPR10* ที่มีขนาดของลำดับเบสยาว 2,194 คู่เบส จากข้าวพันธุ์ Minghui 63 และ ZS97A ยีน *PPR454* จากข้าวพันธุ์ IR24, ปทุมธานี 1, สุพรรณบุรี 1 และ IR64 เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะบริเวณรหัสที่แปลรหัสไปเป็นโปรตีนขนาด 1,365 คู่เบส หรือมีขนาด

ของโปรตีน 454 กรดอะมิโน เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ตำแหน่ง 1,392 จาก G ไปเป็น T ทำให้เกิดเป็นรหัสหยุด (stop codon) เรียกว่า T specific allele

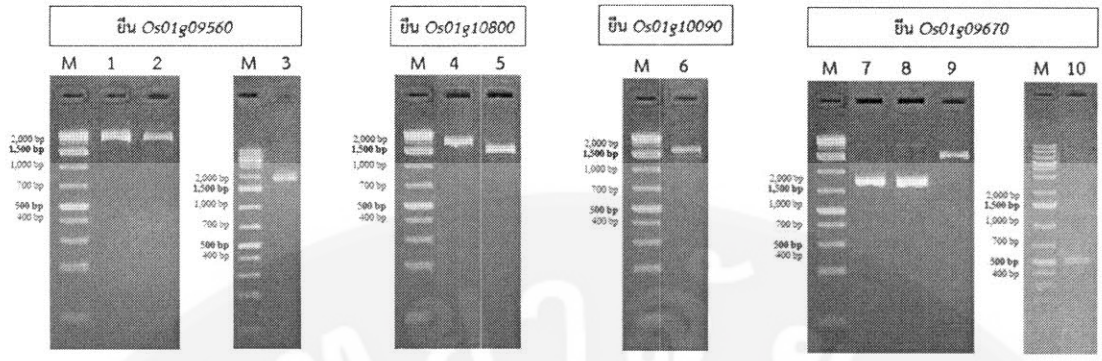
- กลุ่มที่ 2 ยีน *PPR10* ที่มีขนาดของลำดับเบสยาว 2,188 คู่เบส จากข้าวพันธุ์ 93-11, IR58025A, IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ปิ่นแก้ว 56, นางมลเอส 4, ชัยนาท 1 และ กข 47 เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะบริเวณรหัสที่จะถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีนขนาด 1,710 คู่เบส หรือมีขนาดของโปรตีน 569 กรดอะมิโน G specific allele

4. การค้นหายีนที่คาดว่าจะเป็นยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูที่ตำแหน่ง Rf3

4.1 การเพิ่มปริมาณยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูตำแหน่ง Rf3 จากข้าวไทย

การเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับยีนแก้ความเป็นหมันที่ตำแหน่ง Rf3 พบว่าหลังเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอได้ตามขนาดที่คาดหวังไว้ จากนั้น ได้เพิ่มปริมาณของชิ้นยีนในข้าว 8 พันธุ์ เพื่อแยกบริสุทธิ์ชิ้นยีนขนาดที่ต้องการและส่งไปอ่านลำดับเบสในขั้นต่อไป โดยพันธุ์ข้าวที่เลือกมาได้แก่ ข้าวสายพันธุ์ A ที่มีเรณูเป็นหมันจำนวน 1 พันธุ์ คือ IR58025A ข้าวสายพันธุ์ B เป็นพันธุ์รักษาความเป็นหมันของเรณูจำนวน 3 พันธุ์ คือ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105 และนางมลเอส 4 ข้าวสายพันธุ์ R ที่มีการรายงานว่าสามารถแก้ความเป็นหมันของเรณูได้จำนวน 4 พันธุ์ คือปทุมธานี 1, ชัยนาท 1, กข47 และ IR64

สำหรับการแยกบริสุทธิ์ของชิ้นยีนที่ได้จากข้าวแต่ละพันธุ์ เพื่อส่งไปอ่านลำดับเบสที่ตำแหน่ง Rf3 นั้น จะประกอบด้วยบริเวณต่าง ๆ ดังนี้ ยีน *Os01g09560* จำนวน 3 ชิ้น ที่มีขนาดประมาณ 2,949 คู่เบส, 2,234 คู่เบส และ 1,580 คู่เบส ยีน *Os01g09670* จำนวน 4 ชิ้น ที่มีขนาดประมาณ 861 คู่เบส, 841 คู่เบส, 1,481 คู่เบส และ 652 คู่เบส ยีน *Os01g10090* จำนวน 1 ชิ้น ที่มีขนาดประมาณ 1,522 คู่เบส และยีน *Os01g10800* จำนวน 2 ชิ้น ที่มีขนาดประมาณ 1,974 คู่เบสและ 1,472 คู่เบส ดังนั้น ในข้าว 1 พันธุ์ ที่นำมาทำการศึกษา จะมีชิ้นยีนที่ตำแหน่ง Rf3 ที่ต้องส่งไปอ่านลำดับเบส 10 ชิ้น ดังแสดงตัวอย่างผลจากการแยกบริสุทธิ์ของชิ้นยีนของข้าวพันธุ์ กข47ที่จะส่งไปอ่านลำดับเบสในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 ผลการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ กข47 จากยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูตำแหน่ง Rf3 เลนที่ M คือ GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder โดยเลนที่ 1 – 3 คือ ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *Os01g09560* เลนที่ 4 และ 5 คือ ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนยีน *Os01g10800* เลนที่ 6 คือชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *Os01g10090* และเลนที่ 7 - 10 คือ ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนยีน *Os01g09670*

4.2 การอ่านลำดับเบสและวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนแก้ความเป็นหมันตำแหน่ง Rf3 จากข้าวไทย

4.1. ยีน *Os01g09560* (mitochondrial-processing peptidase subunit α)

จากการอ่านลำดับเบสของข้าวที่ศึกษา 8 พันธุ์ คือ พันธุ์ IR58025A, IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105 นางมลเอส 4, ปทุมธานี 1, ชัยนาท 1, กข47 และ IR64 พบว่า ชิ้นยีนที่ส่งไปอ่านลำดับเบสนั้นมีขนาดของลำดับเบสที่เพิ่มจำนวนอยู่ที่ 5,491 ถึง 5,493 คู่เบส โดยสามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ 3 กลุ่ม คือ

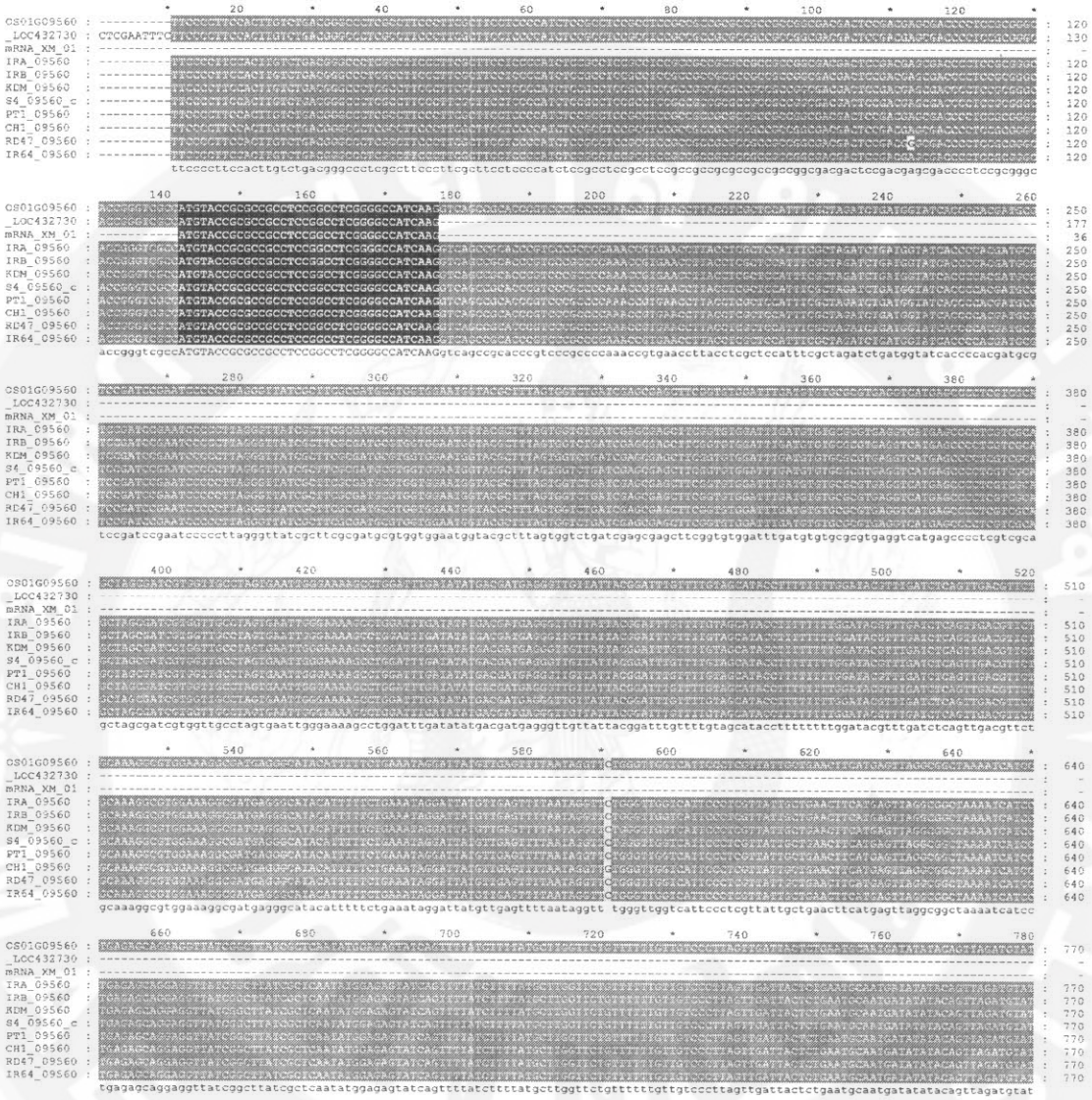
กลุ่มที่มีความยาวเท่ากับ 5,491 คู่เบส 2 พันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์ IR58025B และชัยนาท 1

กลุ่มที่มีความยาวเท่ากับ 5,492 คู่เบส 4 พันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์ IR58025A, ขาวดอกมะลิ 105, ปทุมธานี 1 และ IR64

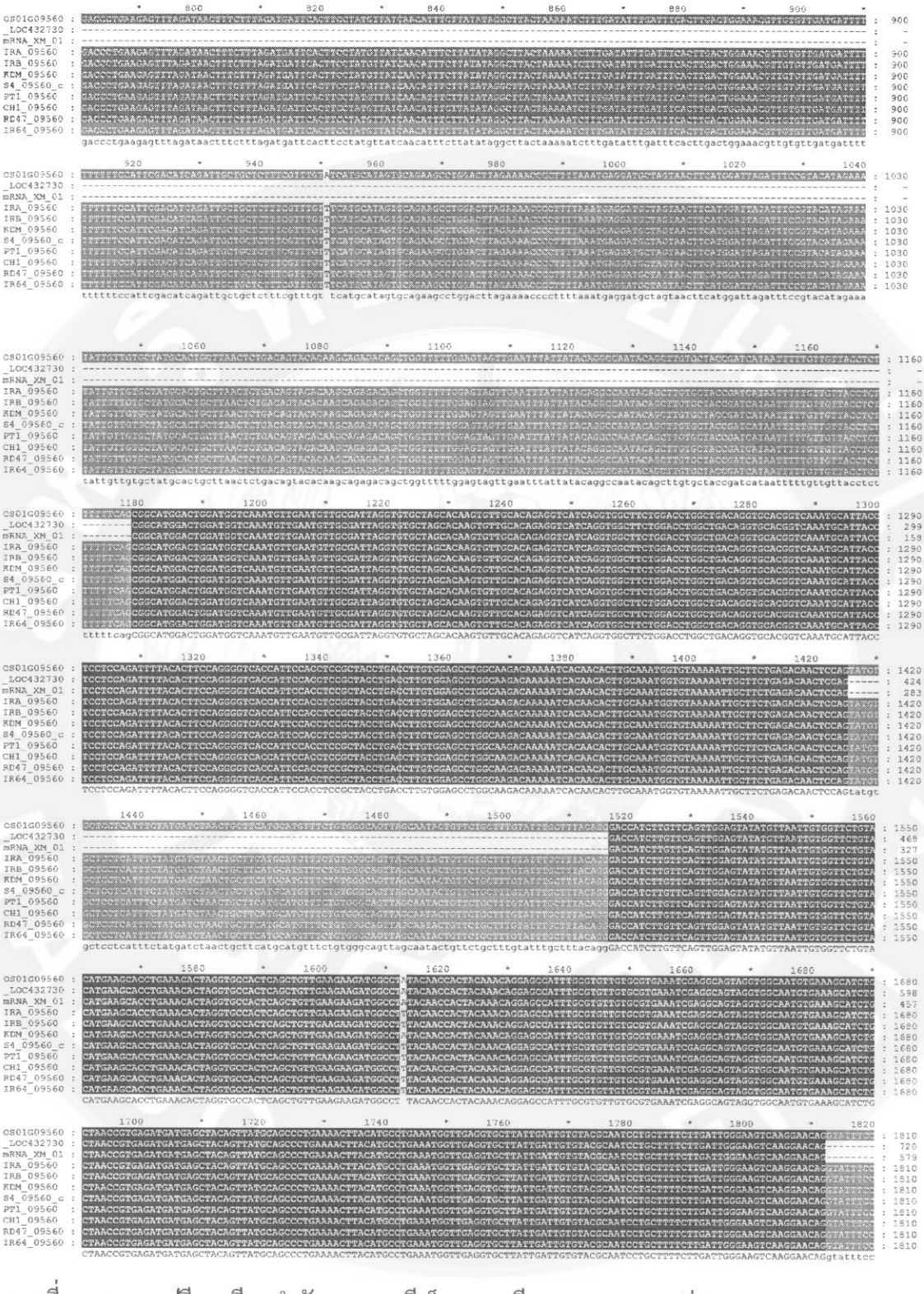
กลุ่มที่มีความยาวเท่ากับ 5,493 คู่เบส จำนวน 2 พันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์นางมลเอส 4 และ กข47

ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้จากข้าวทั้ง 8 พันธุ์ กับลำดับเบสของยีน *Os01g09560* (mitochondrial-processing peptidase subunit α) ที่มีรายงานในฐานข้อมูล พบว่า บริเวณระหว่าง exon ที่ 11 และ 12 นั้น มีการเพิ่มขึ้น (insertion) ของลำดับเบสในข้าวทั้ง 8 พันธุ์ ที่มีขนาดประมาณ 342 ถึง 344 คู่เบส และพบว่า บริเวณดังกล่าวนี้มีตำแหน่งของการแทนที่ (SNP) ของลำดับเบส 1

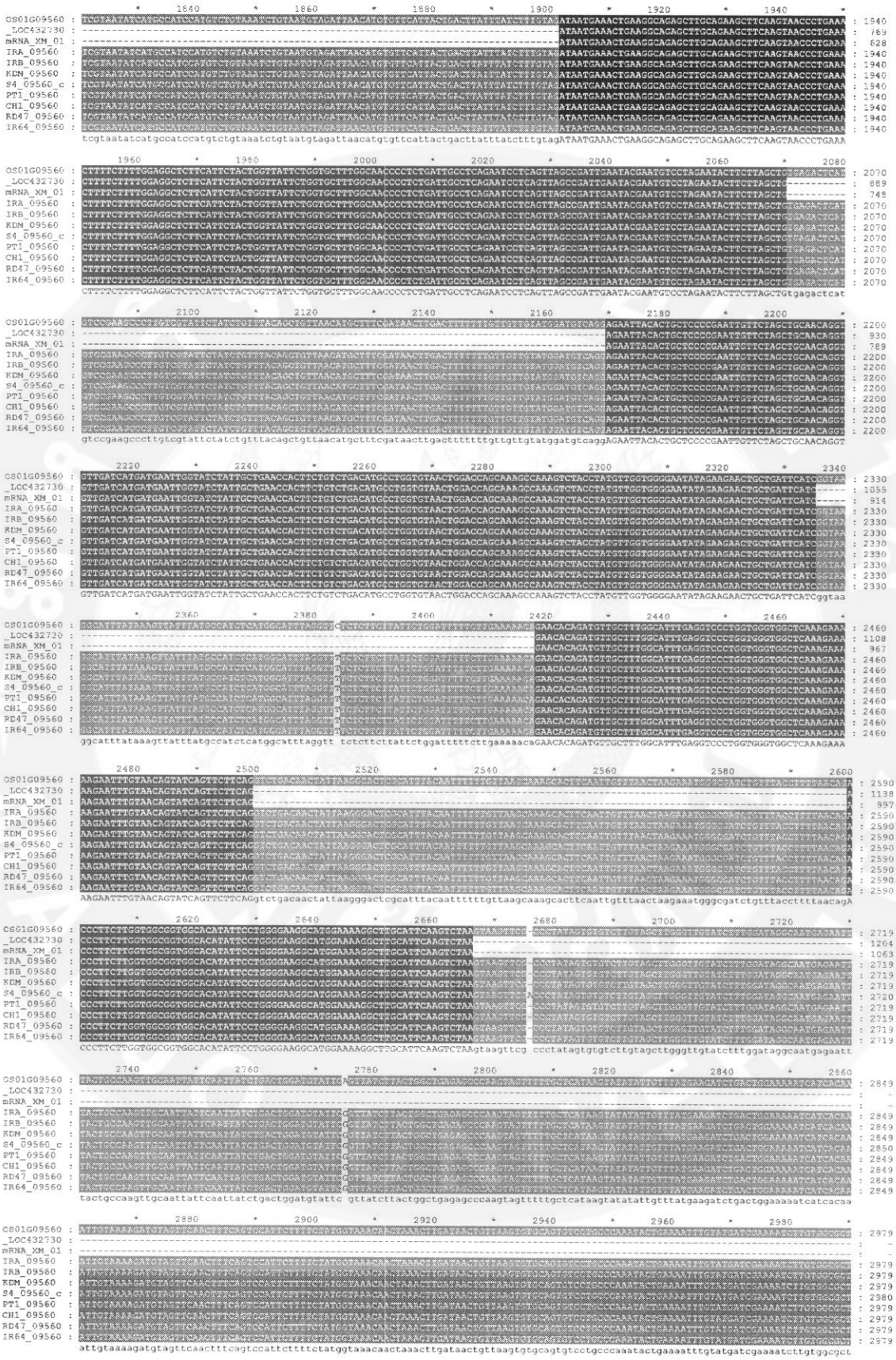
ตำแหน่ง ที่สามารถให้แยกกลุ่มคือ ข้าวสายพันธุ์ A และ B จะมีลำดับเบส C แต่ในข้าวสายพันธุ์ R จะเปลี่ยนเป็นเบส T ดังแสดงในภาพที่ 15



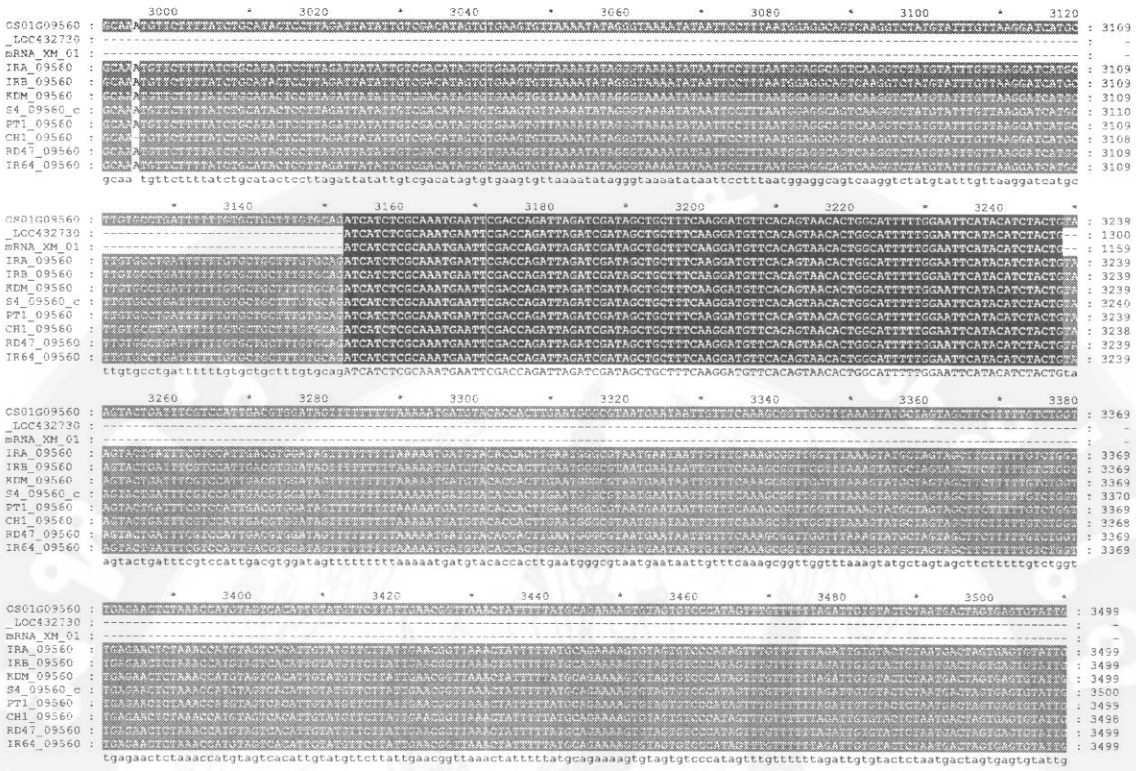
ภาพที่ 15 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอของยีน *Os01g09560* (mitochondrial-processing peptidase subunit α) จากข้าวพันธุ์ IR58025A (IRA), IR58025B (IRB), ขาวดอกมะลิ 105 (KDM), นางมลเอส 4 (S4), ปทุมธานี 1 (PT1), ชัยนาท 1 (CH1), กข47 (RD47) และIR64 (IR64) เทียบกับข้าวพันธุ์นิปปอนบาร์เลย์ ที่รายงานในฐานข้อมูล (*Os01g09560*) ร่วมกับเส้น mRNA โดยกรอบ คือ บริเวณที่เกิดการเพิ่มขึ้น (insertion) * คือ ตำแหน่งของการแทนที่ (SNP) และ แถบสีน้ำเงิน คือ บริเวณที่เป็นตำแหน่งของ exon ของยีน



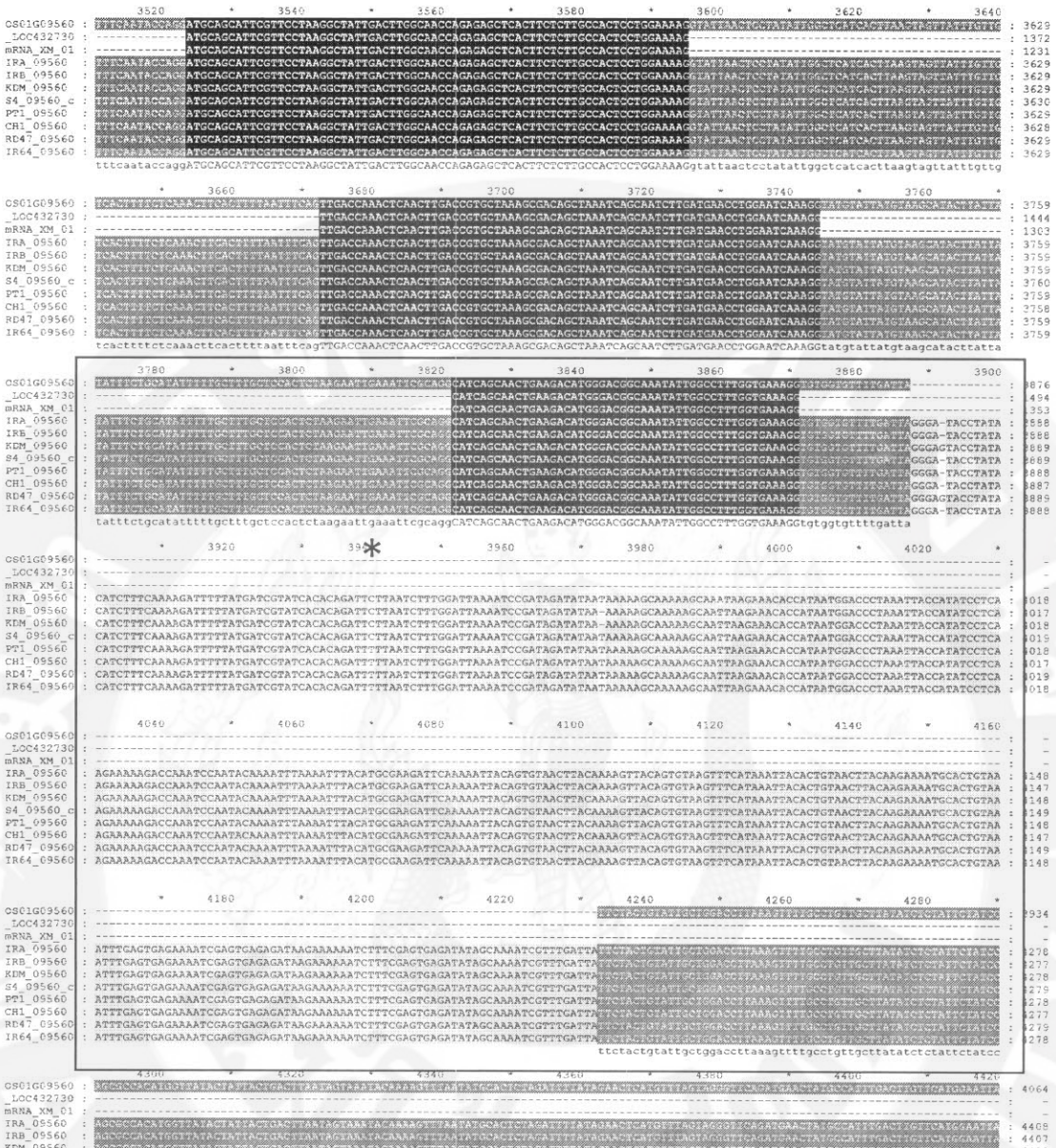
ภาพที่ 15 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอของยีน *Os01g09560* (ต่อ)



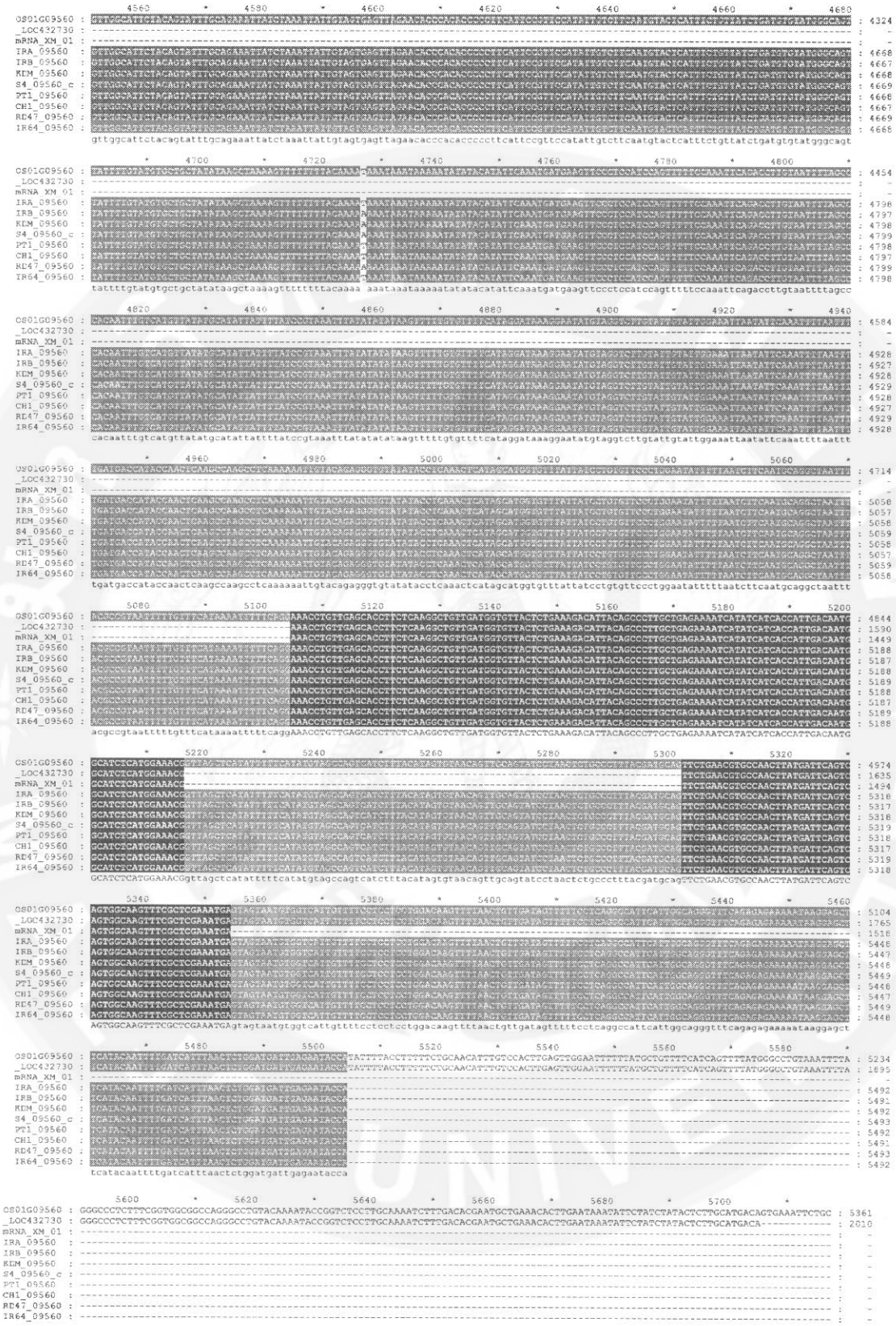
ภาพที่ 15 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอของยีน *Os01g09560* (ต่อ)



ภาพที่ 15 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอของยีน *Os01g09560* (ต่อ)



ภาพที่ 15 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอของยีน *Os01g09560* (ต่อ)



ภาพที่ 15 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอของยีน *Os01g09560* (ต่อ)

4.2. ยีน *Os01g09670* (pollen-specific protein)

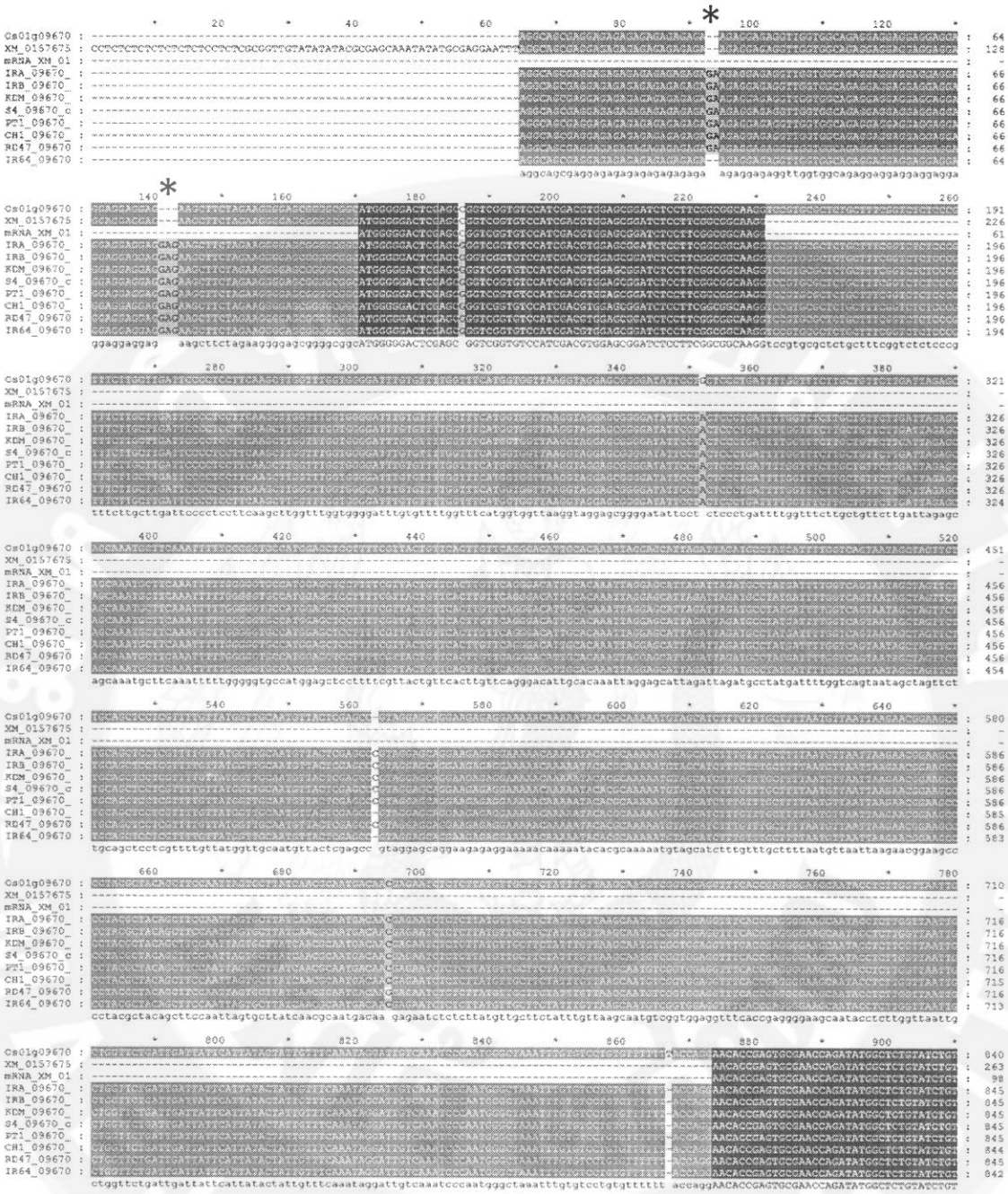
จากการวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริเวณยีน *Os01g09670* จากข้าวทั้ง 8 พันธุ์ พบว่า ได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ต่างกัน แบ่งได้ 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มมีความยาว 2,927 คู่เบส จำนวน 6 พันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์ IR58025A, IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, นางมลเอส 4, ปทุมธานี 1 และ กข47

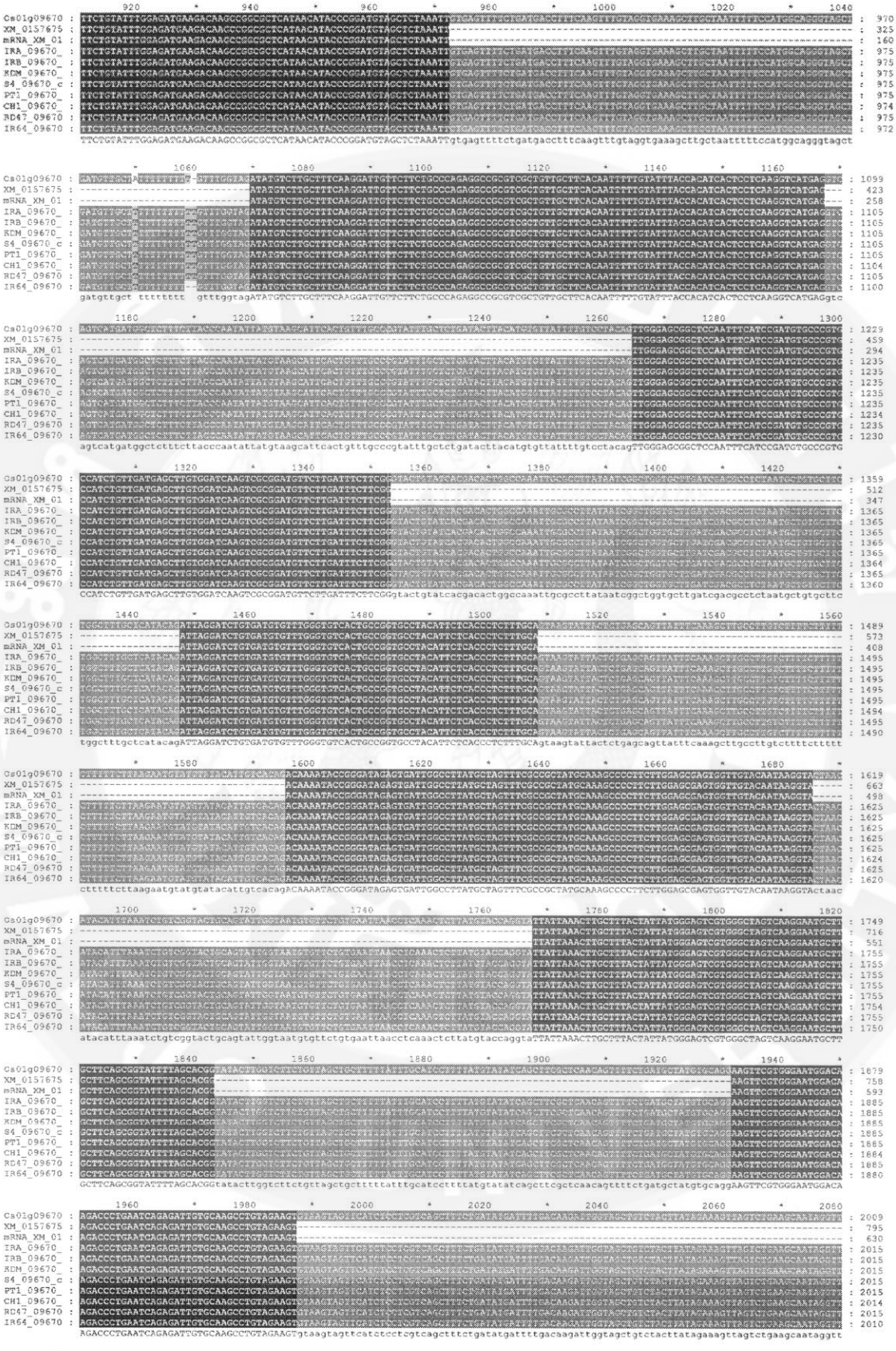
กลุ่มที่ 2 กลุ่มมีความยาว 2,926 คู่เบส จำนวน 1 พันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1

กลุ่มที่ 3 กลุ่มมีความยาว 2,922 คู่เบส จำนวน 1 พันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์ IR64 โดยที่ตำแหน่งหน้า exon ที่ 1 ห่างจากลำดับเบส start codon ขึ้นไป 77 คู่เบส พบว่า เกิดการขาดหายไปของลำดับเบส (deletion) จำนวน 2 คู่เบส (GA) ซึ่งเป็นบริเวณเดียวกับที่ Suresh *et al.* (2012) ได้รายงานไว้ว่าหากเป็นข้าวสายพันธุ์ R จะพบบริเวณการขาดหายไปของลำดับเบสที่ตำแหน่งดังกล่าว

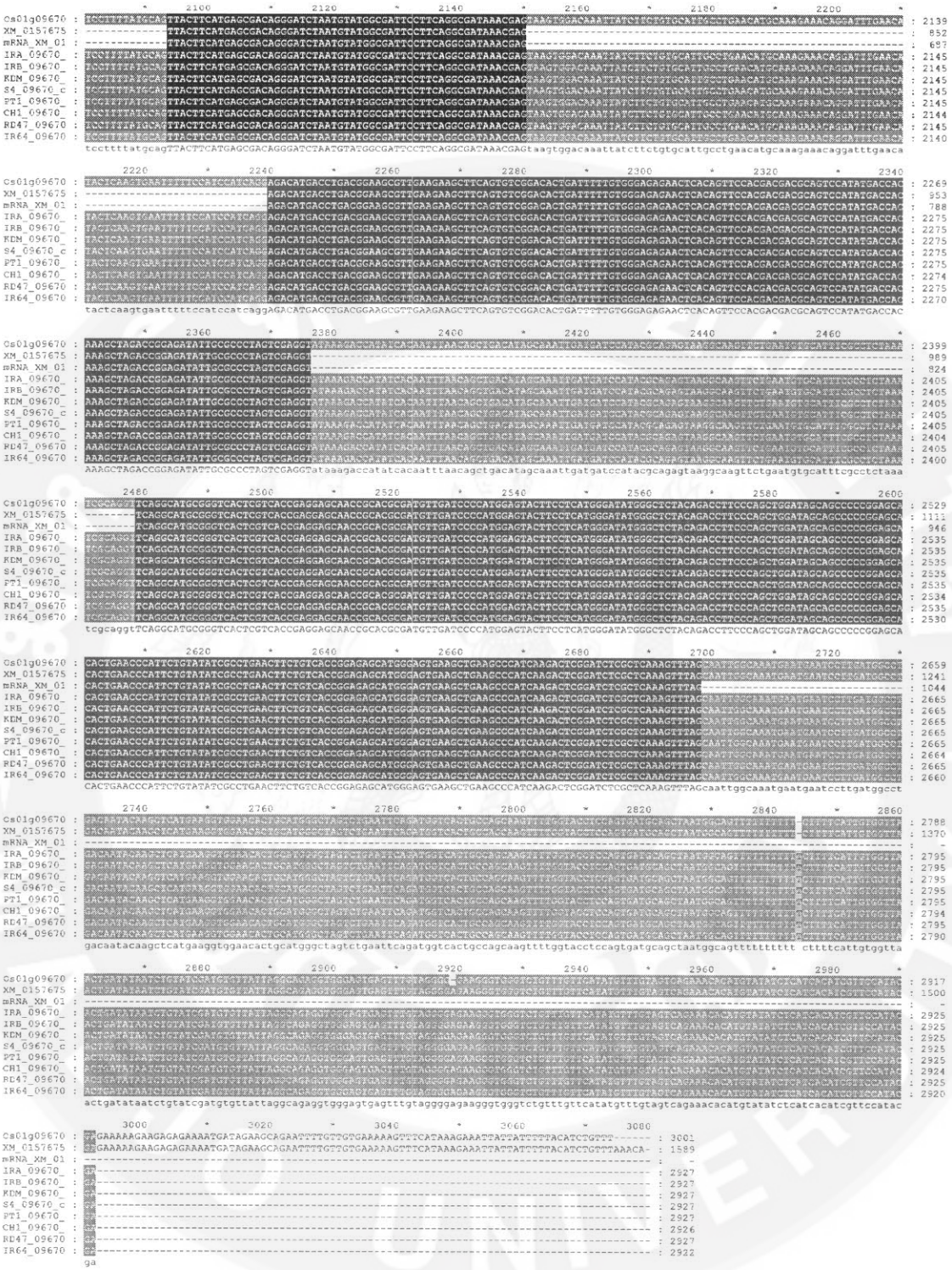
โดย Suresh *et al.* (2012) รายงานยีนนี้จากข้าวพันธุ์นิปปอนบาร์เลย์ (*Os01g09670*) ในฐานข้อมูล พบการขาดหายไปของลำดับเบส (deletion) 2 บริเวณ ที่ตำแหน่งหน้า exon ที่ 1 ห่างจากลำดับเบส start codon ขึ้นไป 77 คู่เบส และ 28 คู่เบส พบว่า เกิดการขาดหายไปของลำดับเบส (deletion) จำนวน 2 คู่เบส (GA) และ 3 คู่เบส (GAG) ตามลำดับ ซึ่งหากเป็นข้าวสายพันธุ์ R จะพบบริเวณการขาดหายไปของลำดับเบสทั้ง 2 ตำแหน่ง ดังแสดงในภาพที่ 16



ภาพที่ 16 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสยีน *Os01g09670* (pollen-specific protein) จากข้าวพันธุ์ IR58025A (IRA), IR58025B (IRB), ขาวดอกมะลิ 105 (KDM), นางมลเอส 4 (S4), ปทุมธานี 1 (PT1), ชัยนาท 1 (CH1), กข47 (RD47) พันธุ์ IR64 (IR64) จากข้าวพันธุ์นิปปอนบาร์เลย์ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล (*Os01g09670*) ร่วมกับเส้น mRNA โดย * คือ บริเวณที่พบการขาดหายไปของลำดับเบสในข้าวสายพันธุ์ R ซึ่งรายงานโดย Suresh *et al.*, (2012) และ แถบสีน้ำเงิน คือ บริเวณที่เป็นตำแหน่งของ exon ของยีน



ภาพที่ 16 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสยีน *Os01g09670* (ต่อ)

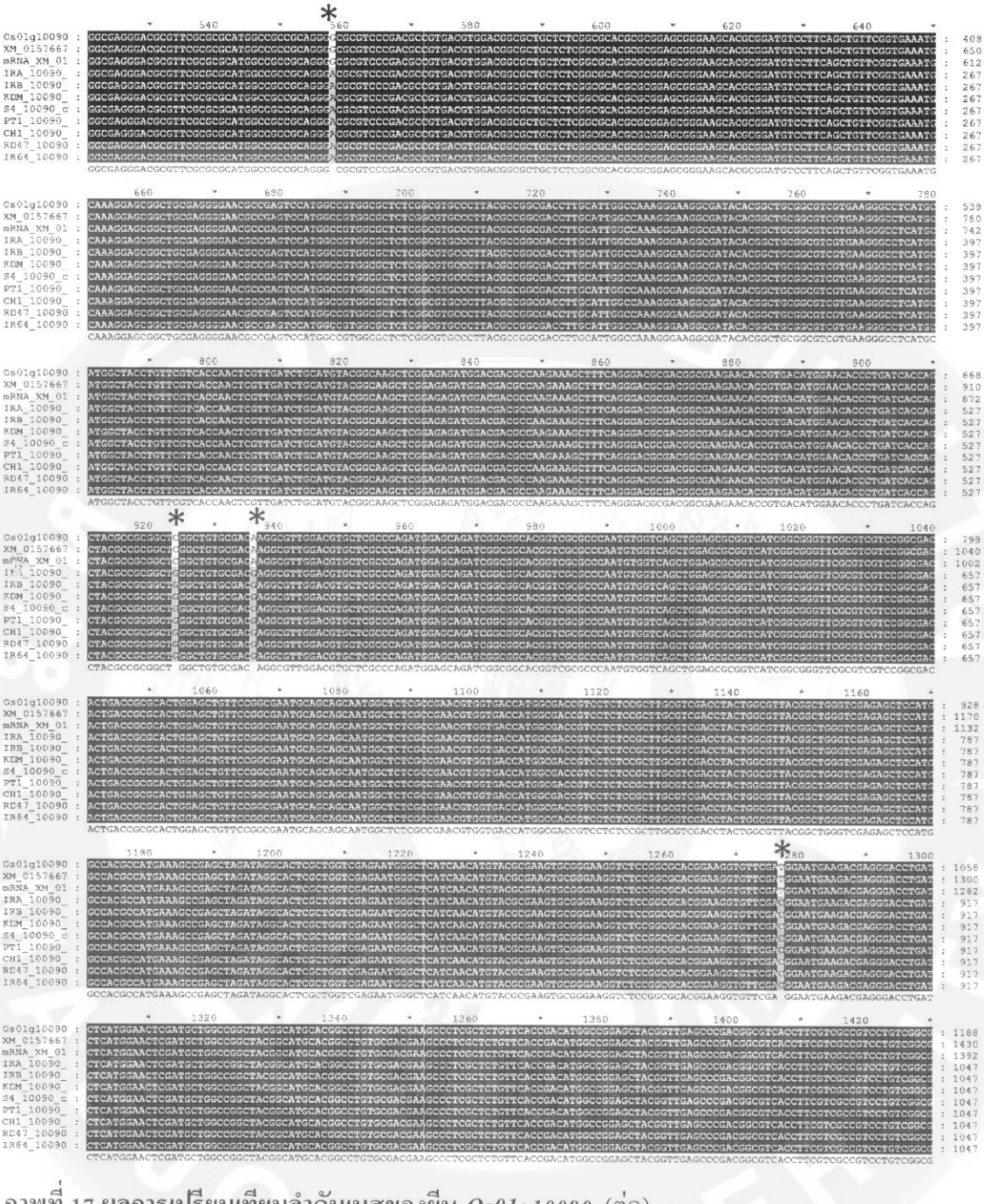


ภาพที่ 16 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสยีน *Os01g09670* (ต่อ)

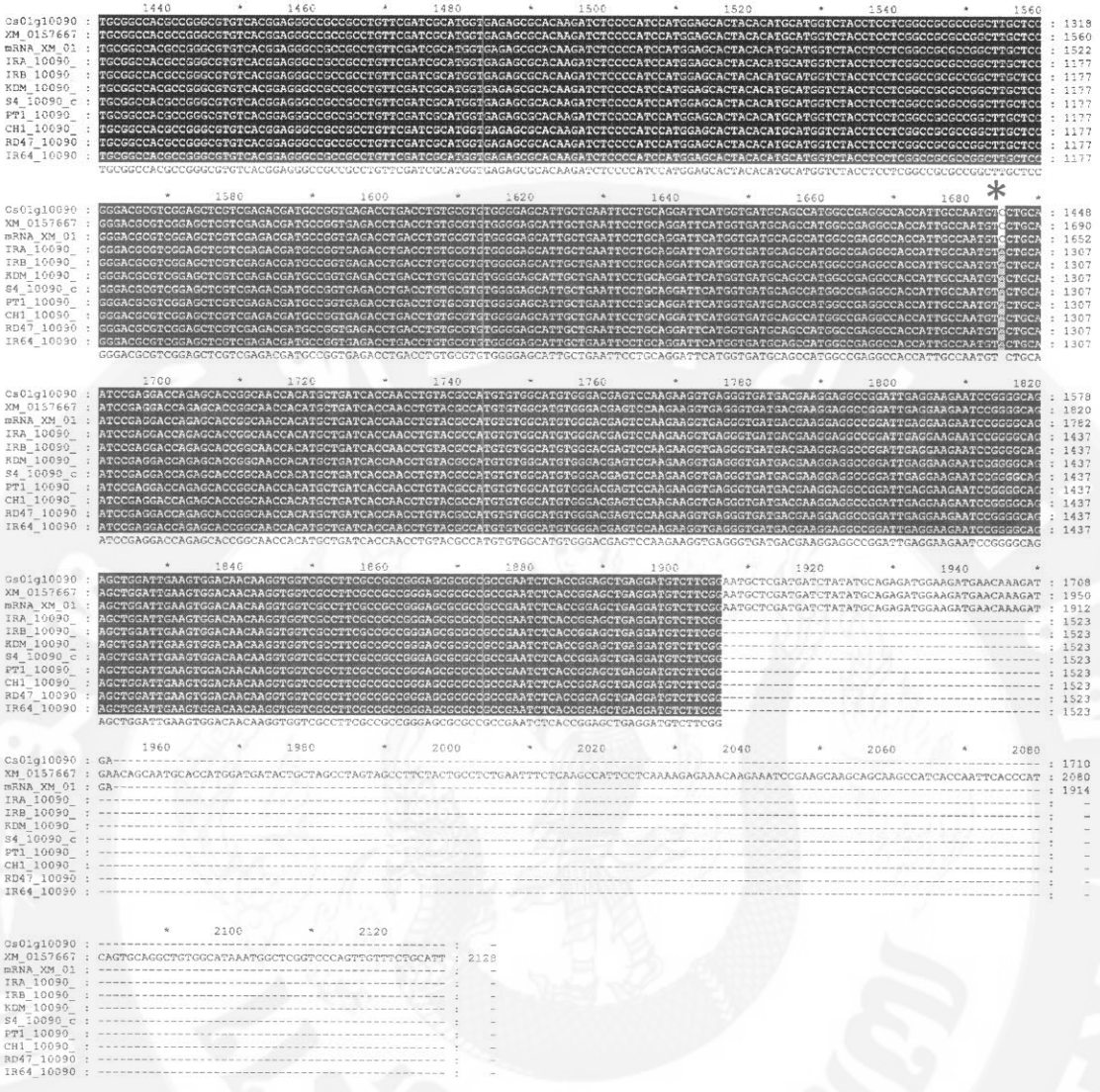
4.3. ยีน *Os01g10090* (PPR protein)

การเพิ่มปริมาณของชิ้นยีน *Os01g10090* ที่ได้จากข้าวทั้ง 8 พันธุ์ ที่นำมาศึกษานั้น สามารถเพิ่มปริมาณได้ขนาดเท่ากับ 1,523 คู่เบส โดยลำดับเบสที่ได้นั้นมีขนาดเท่ากับลำดับเบสที่มีรายงานในฐานข้อมูล จากการเปรียบเทียบลำดับเบสพบบริเวณที่ต่างจากฐานข้อมูลหรือตำแหน่ง SNP จำนวน 5 ตำแหน่ง ที่อยู่ภายในบริเวณรหัส คือ ตำแหน่งที่ 1 เปลี่ยนจาก G เป็น A ตำแหน่งที่ 2 เปลี่ยนจาก C เป็น G ตำแหน่งที่ 3 เปลี่ยนจาก A เป็น G ตำแหน่งที่ 4 เปลี่ยนจาก T เป็น C และตำแหน่งที่ 5 เปลี่ยนจาก C เป็น T โดยทั้ง 5 ตำแหน่ง ที่พบในข้าวทั้ง 8 พันธุ์ ที่นำมาทำการศึกษาในครั้งนี้ ไม่สามารถใช้ในการแยกข้าวสายพันธุ์ B จากสายพันธุ์ R ออกจากกันได้ ดังแสดงในภาพที่ 17

ภาพที่ 17 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Os01g10090* (PPR protein) จากข้าวพันธุ์ IR58025A (IRA), IR58025B (IRB), ขาวดอกมะลิ 105 (KDM), นางมลเอส 4 (S4), ปทุมธานี 1 (PT1), ชัยนาท 1 (CH1), กข47 (RD47), IR64 (IR64) กับข้าวพันธุ์นิปปอนบาร์เลย์ที่รายงานในฐานข้อมูล (*Os01g10090*) ร่วมกับเส้น mRNA เพื่อแสดงบริเวณที่เป็น exon โดย * คือ บริเวณที่ต่างจากฐานข้อมูลหรือตำแหน่ง SNP ของทั้ง 8 พันธุ์ที่นำมาทำการศึกษาในครั้งนี้ และ แถบสีน้ำเงิน คือ บริเวณที่เป็นตำแหน่งของ exon ของยีน



ภาพที่ 17 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Os01g10090* (ต่อ)



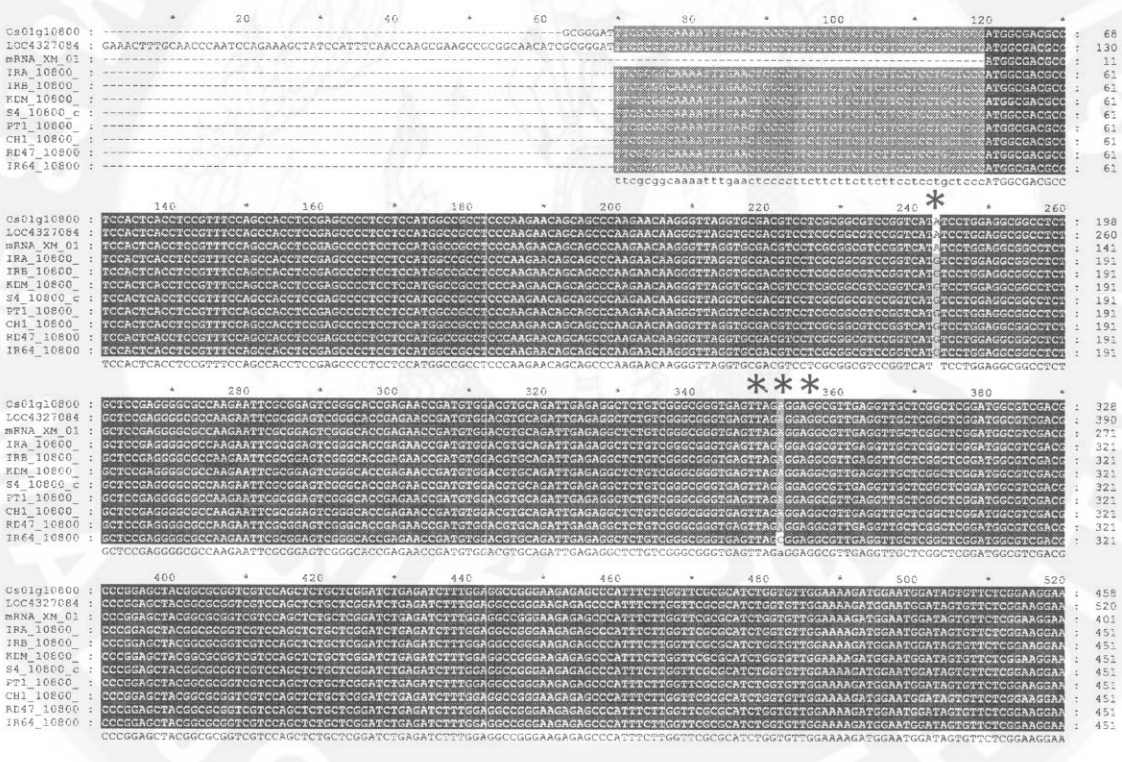
ภาพที่ 17 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Os01g10090* (ต่อ)

4.4. ยีน *Os01g10800* (PPR protein)

จากการอ่านลำดับเบสของข้าวทั้ง 8 พันธุ์ จากชิ้นยีน *Os01g10800* ที่เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR พบว่า ข้าวทั้ง 8 พันธุ์ ที่ได้นำมาศึกษานี้มีความยาวเท่ากัน คือ 3,300 คู่เบส และยีนนี้จากข้าวทั้ง 8 พันธุ์ ที่ส่งไปอ่านลำดับเบสมีลำดับเบสเหมือนกับลำดับเบสในฐานข้อมูล และพบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส (SNP) เพียง 1 ตำแหน่ง ของข้าวทั้ง 8 พันธุ์ที่ต่างจากลำดับเบสในฐานข้อมูลคือเปลี่ยนจากเบส A เป็น G และพบการเปลี่ยนแปลงบริเวณอื่นเฉพาะในข้าวพันธุ์นางมล เอส 4 และพันธุ์ IR64 (ภาพที่ 18) ดังนี้

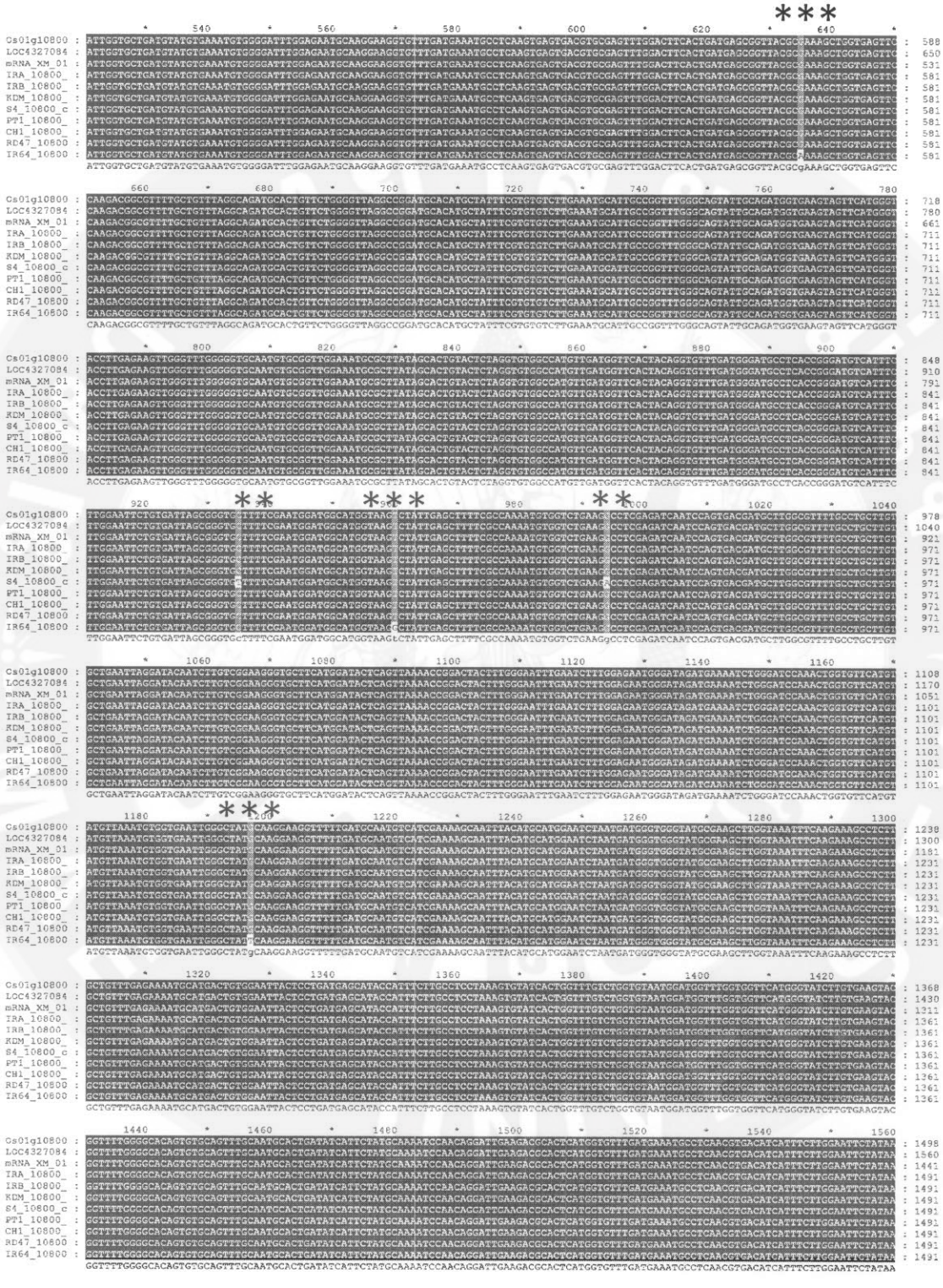
ในข้าวพันธุ์นางมลเอส 4 พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส (SNP) จำนวน 2 ตำแหน่ง ที่ต่างจากข้าวทั้ง 7 พันธุ์ ที่ทำการศึกษาและพันธุ์ที่มีรายงานในฐานข้อมูล คือ ตำแหน่งที่ 1 เปลี่ยนจากเบส C เป็น T และตำแหน่งที่ 2 เปลี่ยนจากเบส G เป็น A

ในข้าวพันธุ์ IR64 พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส (SNP) จำนวน 7 ตำแหน่ง ทีต่างจากข้าวทั้ง 7 พันธุ์ ที่ทำการศึกษาและพันธุ์ที่มีรายงานในฐานข้อมูล คือ ตำแหน่งที่ 1 เปลี่ยนจากเบส A เป็น C ตำแหน่งที่ 2 เปลี่ยนจากเบส G เป็น A ตำแหน่งที่ 3 เปลี่ยนจากเบส T เป็น G ตำแหน่งที่ 4 เปลี่ยนจากเบส G เป็น T ตำแหน่งที่ 5 เปลี่ยนจากเบส A เป็น G ตำแหน่งที่ 6 เปลี่ยนจากเบส T เป็น A และตำแหน่งที่ 7 เปลี่ยนจากเบส C เป็น T

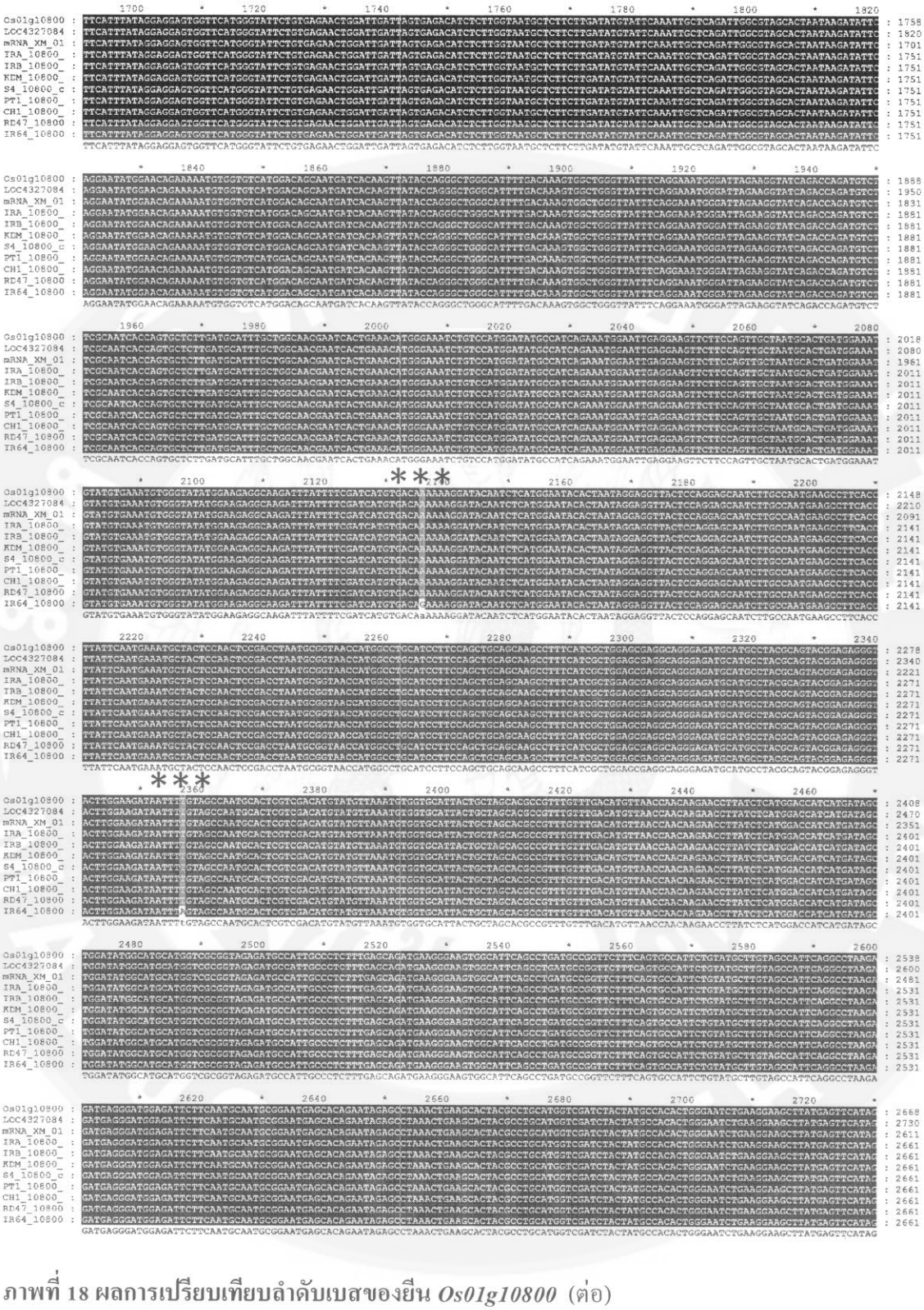


ภาพที่ 18 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Os01g10800* (PPR protein) จากข้าวพันธุ์ IR58025A (IRA), IR58025B (IRB), ขาวดอกมะลิ 105 (KDM), นางมลเอส 4 (S4), ปทุมธานี 1 (PT1), ชัยนาท 1 (CH1), กข47 (RD47), IR64 (IR64) ข้าวพันธุ์นิปปอนบาร์เลย์ที่รายงานในฐานข้อมูล (*Os01g10800*) ร่วมกับเส้น mRNA เพื่อแสดงบริเวณที่เป็น exon โดย * คือ บริเวณที่ต่างจากฐานข้อมูลหรือตำแหน่ง SNP ของทั้ง 8 พันธุ์ที่นำมาทำการศึกษาในครั้งนี้ ** คือ SNPใน

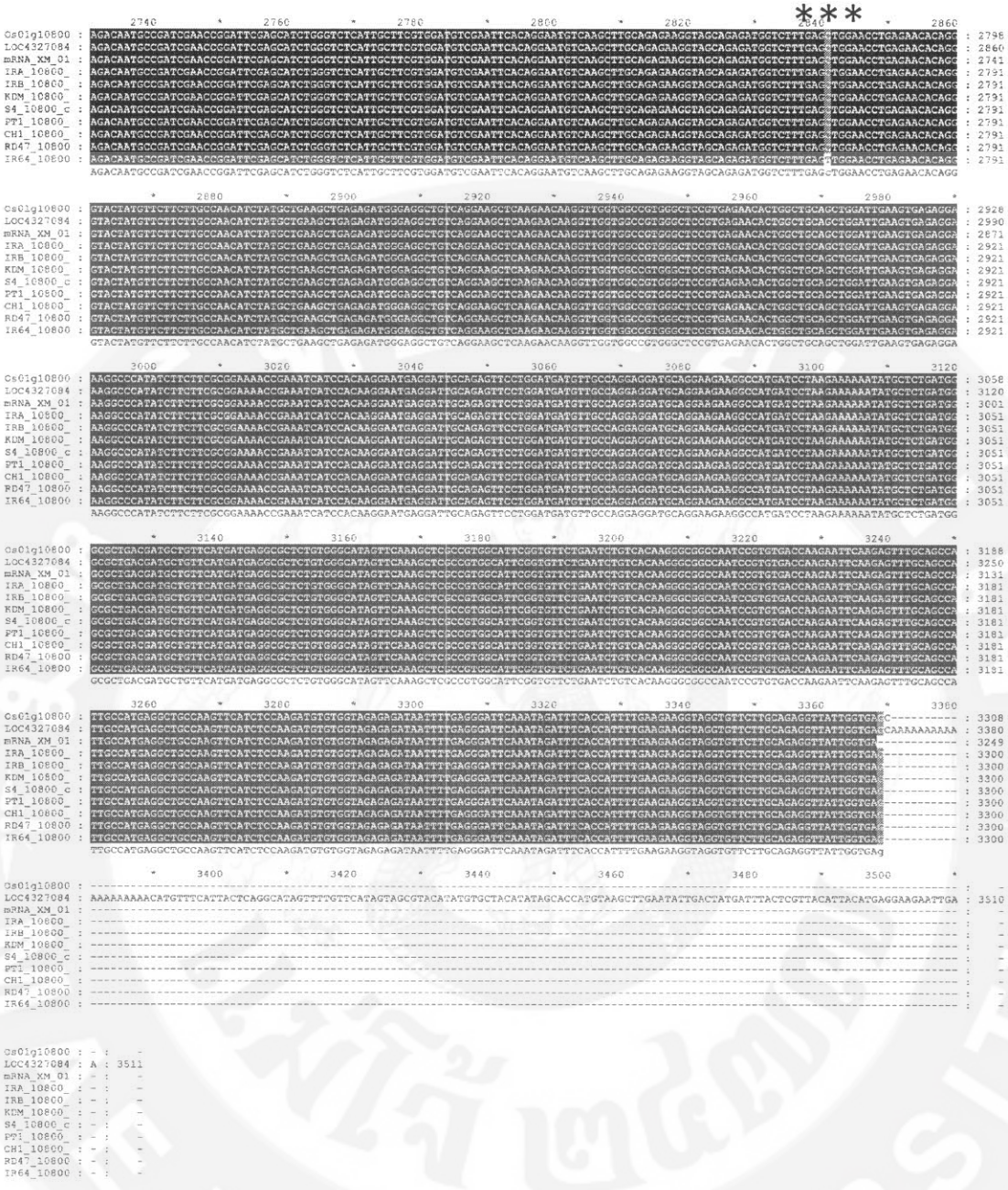
ข้าวนางมลเอส 4 และ *** คือ SNP ในข้าว IR64 และ แถบสีน้ำเงิน คือ บริเวณที่เป็นตำแหน่งของ exon ของยีน



ภาพที่ 18 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Os01g10800* (ต่อ)



ภาพที่ 18 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Os01g10800* (ต่อ)



ภาพที่ 18 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *Os01g10800* (ต่อ)

การศึกษานี้สามารถแยกยีนแก้ความเป็นหมันของเรณู ที่ตำแหน่ง Rf4 และ Rf3 จากข้าวไทย ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงจากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูต่าง ๆ ที่ตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 จำนวน 7 ยีน ดังสรุปได้ในตารางที่ 13 โดยไม่พบความต่างในบริเวณรหัสของยีนแก้ความเป็นหมันที่ตำแหน่ง Rf3 ที่จำเพาะกลุ่มของข้าว R line ออกจาก A/B line เช่นเดียวกับที่รายงานว่าพบบริเวณ InDel ในบริเวณด้านหน้าของยีน pollen-specific protein (SF21)

ที่พัฒนาเป็นเครื่องหมายต่อยีนแก้ความเป็นหมันที่ตำแหน่ง Rf3 ที่มีความถูกต้องในการจำแนก 57 เปอร์เซ็นต์ (Pranathi *et al*., 2016) ส่วนในยีนแก้ความเป็นหมันที่ตำแหน่ง Rf4 พบบริเวณที่สามารถจำแนกกลุ่มของข้าว R line ออกจาก A/B line ได้ 2 บริเวณ คือ บริเวณ InDel ขนาด 150 คู่เบสในยีน *PPR9* และบริเวณ SNP ที่ตำแหน่ง 1,392 ในยีน *PPR10* ซึ่งจะนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายต่อไป

ตารางที่ 13 สรุปผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 7 ยีน ที่ตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 จากข้าวที่นำมาศึกษา

ชื่อพันธุ์ข้าว	กลุ่มสายพันธุ์	ยีนที่ตำแหน่ง *Rf3*									ยีนที่ตำแหน่ง *Rf4*					
		Os01g09560 (mitochondrial-processing peptidase subunit alpha)			*Os01g09670* (pollen-specific protein SF21)		*Os01g10090* (PPR)		*Os01g10800* (PPR)		*PPR7*		*PPR9*[4]		*PPR10*	
		ขนาด (bp)	SNP (เบส)	Insertion (ระหว่าง exon 11 และ 12)	ขนาด (bp)	Deletion (หน้า start codon)	ขนาด (bp)	SNP (ตำแหน่ง)	ขนาด (bp)	SNP (ตำแหน่ง)	ขนาด (bp)	Deletion หรือ Insertion	ขนาด (bp)	Insertion (105 คู่เบส)	ขนาด (bp)	SNP (Stop codon)
IR58025A	A-line	5,492	C	Insertion	2,927	-	1,523	5	3,300	1	1,736	2	1,911	Insertion	2,188	G
IR58025B	B-line	5,491	C	Insertion	2,927	-	1,523	5	3,300	1	1,736	2	1,911	Insertion	2,188	G
ขาวดอกมะลิ 105		5,492	C	Insertion	2,927	-	1,523	5	3,300	1	1,736	2	1,911	Insertion	2,188	G
เจ้าหอมนิล		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,736	2	1,911	Insertion	2,188	G
นางมลเอส 4		5,493	C	Insertion	2,927	-	1,523	5	3,300	3	1,736	2	1,911	Insertion	2,188	G
ปิ่นแก้ว 56		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,736	2	1,911	Insertion	2,188	G
กข21		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,736	2	1,911	Insertion	NA	NA
บาสมาติ		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,736	2	1,911	Insertion	NA	NA
ปทุมธานี 1	R-line	5,492	T	Insertion	2,927	-	1,523	5	3,300	1	1,744	-	1,815	-	2,194	T
สุพรรณบุรี 1		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,744	-	1,806	-	2,194	T
ชัยนาท 1		5,491	T	Insertion	2,926	-	1,523	5	3,300	1	1,736	2	1,911	Insertion	2,188	G
ปราจีนบุรี 2		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

ชื่อพันธุ์ข้าว	กลุ่มสายพันธุ์	ยีนที่ตำแหน่ง *Rf3*									ยีนที่ตำแหน่ง *Rf4*					
		Os01g09560 (mitochondrial-processing peptidase subunit alpha)			*Os01g09670* (pollen-specific protein SF21)		*Os01g10090* (PPR)		*Os01g10800* (PPR)		*PPR7*		*PPR9*[4]		*PPR10*	
		ขนาด (bp)	SNP (เบส)	Insertion (ระหว่าง exon 11 และ 12)	ขนาด (bp)	Deletion (หน้า start codon)	ขนาด (bp)	SNP (ตำแหน่ง)	ขนาด (bp)	SNP (ตำแหน่ง)	ขนาด (bp)	Deletion หรือ Insertion	ขนาด (bp)	Insertion (105 คู่เบส)	ขนาด (bp)	SNP (Stop codon)
ลูกแดงปัตตานี		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
สังข์หยดพัทลุง		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
กข47		5,493	T	Insertion	2,927	-	1,523	5	3,300	1	1,744	-	1,814	-	2,188	G
IR64		5,492	T	Insertion	2,922	GA	1,523	5	3,300	8	1,736	2	1,806	-	2,194	T
ZS97A[2]	A-line	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,736	-	NA	NA	2,194	T
ZH11[2]	B-line	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,744	-	1,806	-	NA	NA
93-11[2]		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2,188	G
นิปปอนบาร์เลย์[1]		5,149	-	-	2,920	GA, GAG	1,535	-	3,300	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Minghui 63[2]	R-line	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,732	1	NA	NA	2,194	T
IR24[2]		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,744	-	1,806	-	2,194	T
IR24[3]		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1,744	-	1,806	-	2,194	T

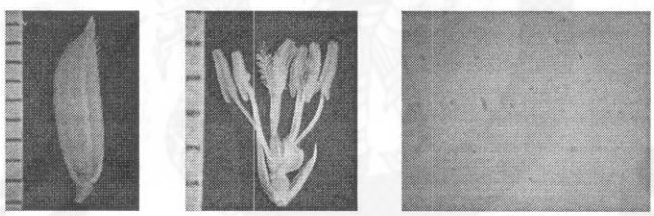
หมายเหตุ

1	หมายถึง	ลำดับเบสจากข้าวพันธุ์นิปปอนบาร์เลย์ที่ได้รายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI
2	หมายถึง	ข้าวพันธุ์ที่รายงานของ Tang *et al*. (2014)
3	หมายถึง	ข้าวพันธุ์ที่รายงานของ Kazama and Toriyama (2014)
4	หมายถึง	ผลที่แสดงในส่วนของยีน *PPR9* จะเป็นผลที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยใช้ไพรเมอร์ Os10g0495200
NA	หมายถึง	ตำแหน่งนั้นไม่พบความต่าง
-	หมายถึง	ไม่ได้ทำการส่งตัวอย่างไปอ่านลำดับเบส

5. การศึกษาความเป็นหมันของเรณูด้วยสารละลายไอโอดีนในโฟแทสเซียมไอโอไดด์ (I_2-KI)

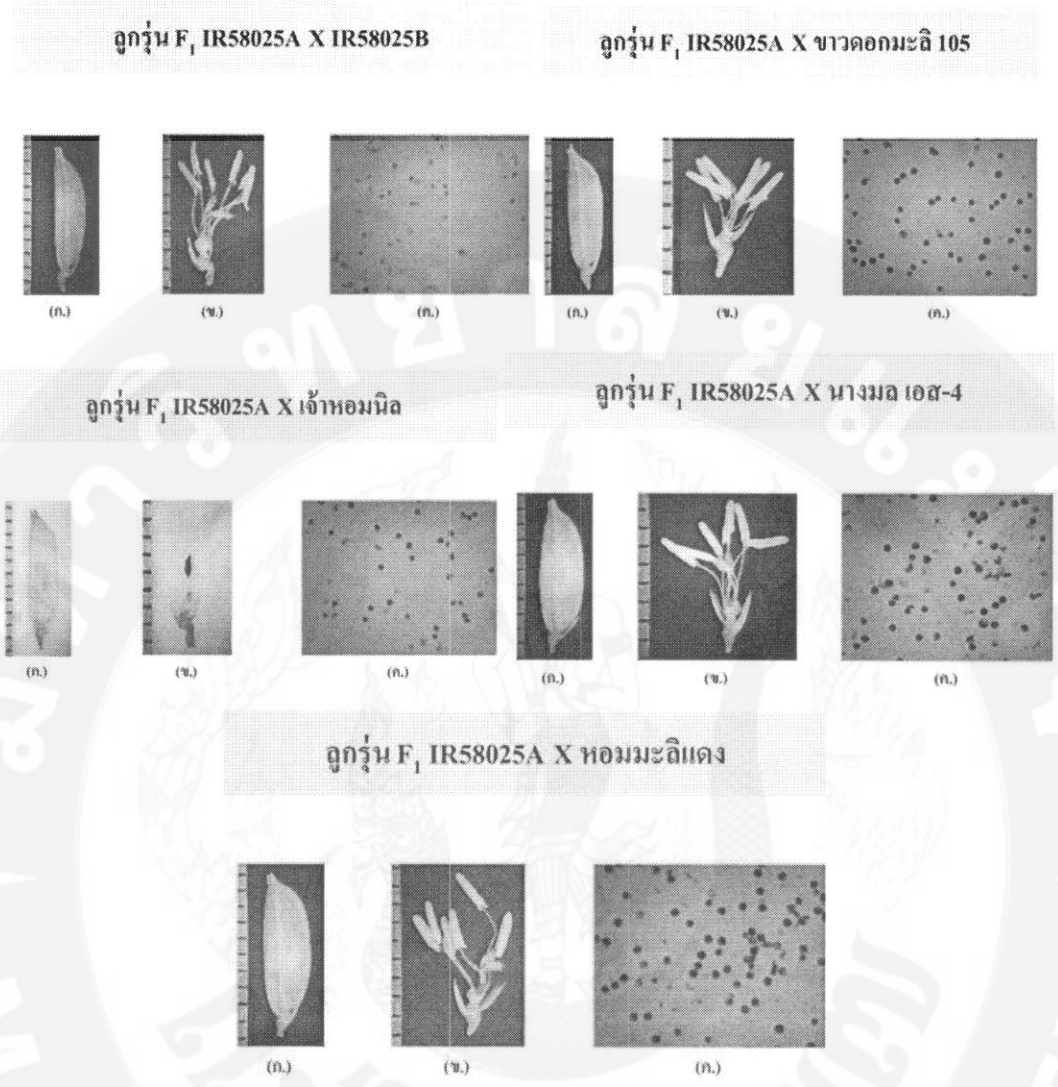
ในการศึกษาความมีชีวิตของเรณูในลูกผสมนั้นจากผสมข้าวสายพันธุ์ A คือ พันธุ์ IR58025A ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่มีเรณูเป็นหมัน (ภาพที่ 19) ผสมข้ามกับข้าวพันธุ์ B จำนวน 5 พันธุ์ คือ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, นางมลเอส 4 และหอมมะลิแดง ข้าวพันธุ์ R จำนวน 6 พันธุ์ คือ ปทุมธานี 1, ชัยนาท 1, สุพรรณบุรี 1, สังข์หยดพัทลุง, กข47 และ IR64 ซึ่งเป็นการจัดกลุ่มที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้า (ภวพร, 2555; สุวิทย์, 2555) จากนั้น นำเรณูที่ได้จากลูกรุ่นที่ 1 มาทำการย้อมด้วยสารละลาย I_2-KI ที่ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการติดสีของละอองเรณูก็จะต่างกันไปบ้างในการผสมข้ามสานพันธุ์ A และ B โดดยลูกผสม IR58025A×หอมมะลิแดง ติดสีค่อนข้างดี (ภาพที่ 20) ส่วนในลูกผสมสานพันธุ์ A กับสังข์หยดพัทลุง (R) ติดสีไม่ค่อยดี (ภาพที่ 21)

ข้าวพันธุ์ IR582025A

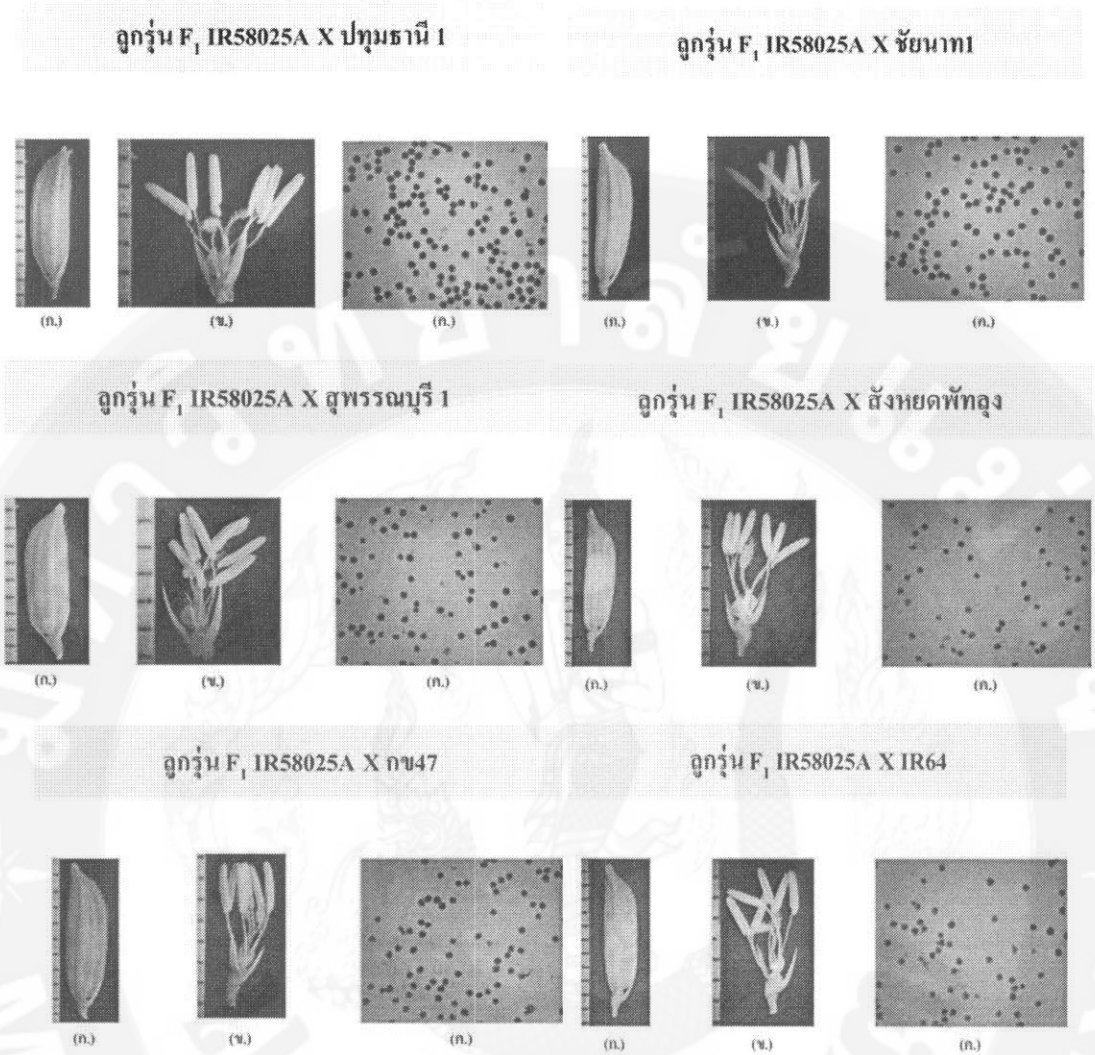


(ก.) (ข.) (ค.)

ภาพที่ 19 ลักษณะดอกและละอองกสรที่ย้อมข้าวสายพันธุ์ A (IR58025A) ที่ใช้ในการศึกษา (ก.) ลักษณะของดอกข้าวก่อนได้รับการผสม (ข.) ลักษณะของเรณูและเกสรตัวเมีย (ค.) การติดสีย้อมละอองเกสร โดยใช้สารละลาย I_2-KI ซึ่งเป็นลักษณะละอองเรณูเป็นหมันหรือฝ่อ (abortiva pollen)



ภาพที่ 20 ลักษณะดอกและละอองเกสรที่ย้อมสีข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ A และสายพันธุ์ B ที่ใช้ในการศึกษา (ก.) ลักษณะของดอกข้าวก่อนได้รับการผสม (ข.) ลักษณะของเรณูและเกสรตัวเมีย (ค.) การติดสีย้อมละอองเกสร โดยใช้สารละลาย I_2-KI



ภาพที่ 21 ลักษณะดอกข้าวและละอองเกสรที่ย้อมสีลูกผสมรุ่นที่ 1 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ A และสายพันธุ์ R ที่ใช้ในการศึกษา (ก.) ลักษณะของดอกข้าวก่อนที่จะได้รับการผสม (ข.) ลักษณะของเรณูและเกสรตัวเมีย (ค.) การติดสีย้อมละอองเกสรโดยใช้สารละลาย I_2-KI

จากการทดสอบด้วยการย้อมเรณูด้วยสารละลายไอโอดีนในโพแทสเซียมไอโอไดด์ ผลจากการติดสีของละอองเรณูในข้าวพันธุ์ IR58025A (A-line) นั้น จะไม่พบการติดสีย้อม โดยเรณูจะมีลักษณะใส (ภาพที่ 19) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความไม่มีชีวิตของเรณู (abortive pollen grain) เช่นเดียวกับลูกผสมรุ่นที่ 1 ที่ได้จากข้าวพันธุ์ IR58025B (B-line) (ภาพที่ 20) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ใช้ในการรักษาความเป็นหมันของข้าวในระบบ WA-CMS แต่เมื่อเปรียบเทียบผลที่ได้จากประชากรรุ่นที่ 1 ของข้าวพันธุ์อื่นที่ใช้ในการศึกษาที่อยู่ในกลุ่ม B-line เช่นเดียวกัน ได้แก่ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, นางมล เอส-4 และหอมมะลิแดง พบว่า มีการติดสีย้อมของเรณูเกิดขึ้นด้วย (ภาพที่ 20)

โดยผลที่ได้นี้เหมือนกับการติดสีย้อมของประชากรรุ่นที่ 1 ของข้าวในกลุ่ม R-line ได้แก่ พันธุ์ปทุมธานี 1, ชัยนาท 1, สุพรรณบุรี 1, สังข์หยดพัทลุง, กข47 และ IR64 ซึ่งเรณูของลูกรุ่นแรก (F_1) จากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, นางมลเอส 4 และหอมมะลิแดง ละอองเรณูติดสีมากกว่าละอองเรณูของลูกรุ่นแรก (F_1) จากข้าว IR58025B (ภาพที่ 20) แสดงว่า ข้าวไทยพันธุ์ดังกล่าวน่าจะมีความสามารถแก้ความเป็นหมัน และน่าจะจัดเป็นข้าวในกลุ่ม partially maintainer ในขณะที่พันธุ์ข้าวในกลุ่มสายพันธุ์ R จะพบว่าเรณูของลูกรุ่นแรก (F_1) ละอองเรณูติดสีเข้มจำนวนมาก (ภาพที่ 21) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความมีชีวิตของเรณูที่ได้ดำเนินการไปแล้วก่อนหน้า

ผลของการตรวจสอบเรณูในลูกรุ่นที่ 1 อาจจะเกิดจากการที่เมื่อเปรียบเทียบยีนแก้ความเป็นหมันในระบบ WA-CMS ที่ตำแหน่ง Rf3 และ Rf4 ทั้ง 7 ยีน ที่ทำการโคลนและวิเคราะห์ลำดับเบสจากข้าวในกลุ่ม B-line และ R-line ที่นำมาศึกษานั้น จะพบความต่างในยีน *PPR9* และยีน *PPR10* ซึ่งทั้ง 2 ยีน จะมีความต่างระหว่างข้าวในกลุ่ม B line และ R line แต่เนื่องจากยีนแก้ความเป็นหมันเรณูนั้นมีจำนวนมาก โยเฉพาะอย่างยิ่งบนโครโมโซมแท่งที่ 10 ที่จะประกอบด้วยยีน *PPR* ไม่ต่ำกว่า 20 ยีน และยังมียีนอื่น ๆ ที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งอื่น ๆ จึงเป็นไปได้ว่าข้าวไทยในกลุ่ม B line จะมียีนอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการแก้ความเป็นหมัน จึงทำให้ประชากรรุ่นที่ 1 ที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ B-line ยังพบการติดสีย้อมหรือการมีชีวิตของเรณู

6. เครื่องหมายของยีนที่ตำแหน่ง Rf4 ยีน *PPR9*

6.1 การทดสอบเครื่องหมายที่จำเพาะต่อยีน *PPR9* ที่ออกแบบ

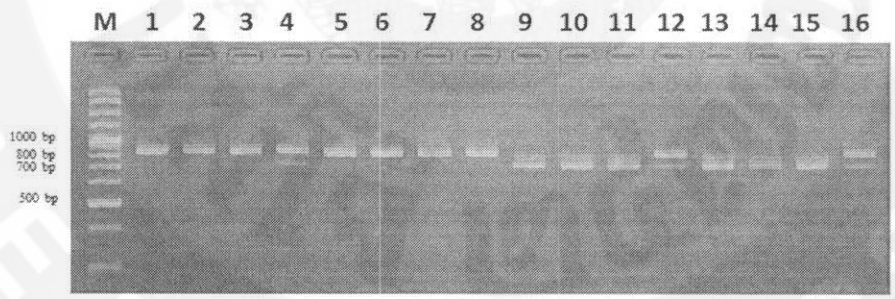
ในการทดสอบไพร์เมอร์ Indel_PPR9 ที่ออกแบบเพื่อใช้ในการแยกลำดับเบสของยีน *PPR9* โดยผลที่คาดหวัง คือ พันธุ์ข้าวที่ไม่มีความสามารถแก้ความเป็นหมัน (A/B line) จะแสดงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 คู่เบส ส่วนพันธุ์ข้าวมีความสามารถแก้ความเป็นหมันของเรณู (R line) จะแสดงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 คู่เบส แต่จากการทดสอบเครื่องหมาย InDel_PPR9 กับข้าวที่ทำการศึกษาทั้ง 16 พันธุ์ แสดงผลต่างจากที่คาดหวัง โดยพบว่า เครื่องหมาย InDel_PPR9 ให้ผลเป็นแถบดีเอ็นเอเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ (ภาพที่ 22)

- กลุ่มที่ 1 ให้แถบขนาดประมาณ 800 คู่เบส จากข้าวพันธุ์ IR58025A, IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, นางมลเอส 4, ปิ่นแก้ว 56, กข21 และบาสมาติ ซึ่งผลที่ได้จากการใช้

ไพรเมอร์ Indel_PPR9 นี้ ได้ผลเช่นเดียวกับที่คาดหวัง ซึ่งเป็นผลที่ได้จากการโคลนยีน *PPR9* ที่พบการแทรกของลำดับเบส (Insertion) ขนาด 105 คู่เบส หลังจุดเริ่มต้นของการแปลรหัสประมาณตำแหน่งที่ 1,692 ถึง 1,796 ได้แก่ ข้าวพันธุ์ IR58025A, IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, นางมลเอส 4, ปิ่นแก้ว 56 และ กข21

- กลุ่มที่ 2 ให้แถบขนาดประมาณ 700 คู่เบส จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1, สุพรรณบุรี 1, ชัยนาท 1, ลูกแดงปัตตานี และ กข47 ซึ่งผลที่คาดหวัง ซึ่งเป็นผลที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ Indel_PPR9 นี้ ได้ผลเช่นเดียวกับที่ได้จากการโคลนยีน *PPR9* ที่ไม่พบการแทรกตัวของลำดับเบส ได้แก่ ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1, ปทุมธานี 1 และ กข47
- กลุ่มที่ 3 ให้แถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบ จากข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล, ปราจีนบุรี 2, สังข์หยดพัทลุง และ IR64

ในส่วนของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 นั้น ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 700 คู่เบส ซึ่งขัดแย้งกับผลจากการโคลนที่พบการแทรกของชิ้นดีเอ็นเอ ดังนั้น ขนาดที่ได้ควรจะมีขนาดเท่ากับ 800 คู่เบส เช่นเดียวกับผลที่ได้จากข้าวพันธุ์สังข์หยดพัทลุง และ IR64 ที่ได้จากการโคลน พบว่า ไม่พบการแทรกตัวของลำดับเบส จะต้องได้แถบขนาด 700 คู่เบส



ภาพที่ 22 ผลการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Indel_PPR9 ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่จำเพาะต่อยีน *PPR9* ในข้าวที่ศึกษา เลนที่ M คือ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder เลน 1 คือ ข้าวพันธุ์ IR582025A เลน 2 คือ IR582025B เลน 3 คือ ขาวดอกมะลิ 105 เลน 4 คือ เจ้าหอมนิล เลน 5 คือ นางมลเอส 4 เลน 6 คือ ปิ่นแก้ว 56 เลน 7 คือ กข21 เลน 8 คือ บาสมาติ เลน 9 คือ ปทุมธานี 1 เลน 10 คือ สุพรรณบุรี 1 เลน 11 คือ ชัยนาท 1 เลน 12 คือ ปราจีนบุรี 2 เลน 13 คือ ลูกแดงปัตตานี เลน 14 คือ สังข์หยดพัทลุง เลน 15 คือ กข47 และเลน 16 คือ IR64

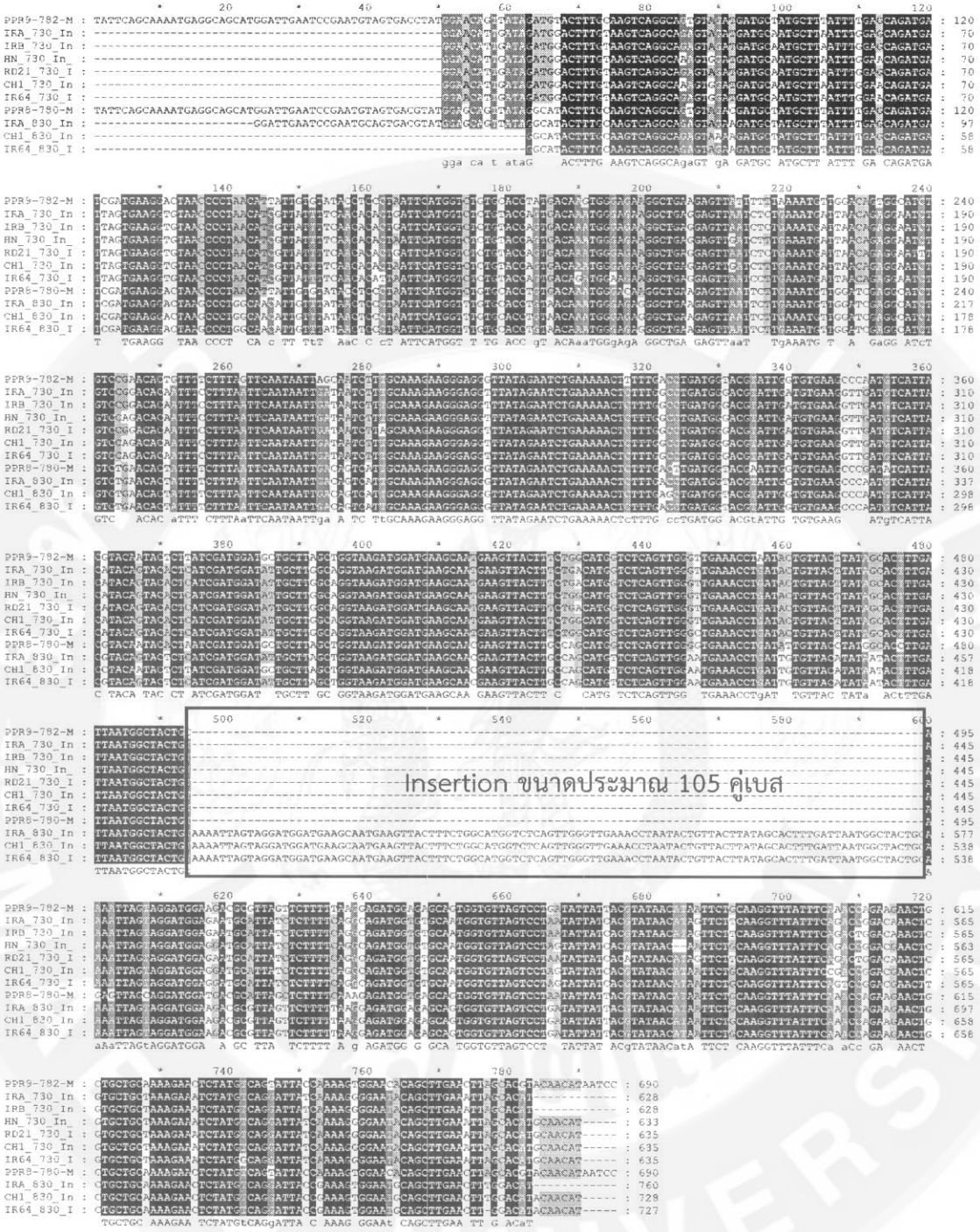
จากผลการทดสอบไพรเมอร์ในขั้นต้น จึงได้สุ่มเลือกตัวอย่างแถบดีเอ็นเอในแต่ละกลุ่มส่งไปอ่านลำดับเบส โดยการแยกบริสุทธิ์แถบที่สนใจจากข้าวแต่ละพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ IR58025A, IR58025B, เจ้าหอมนิล, กข21, ชัยนาท 1 และ IR64 เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสต่อไป

6.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสจากดีเอ็นเอเครื่องหมายที่จำเพาะต่อยีน *PPR9*

การวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ Indel_PPR9 จากข้าว 6 พันธุ์ โดยแต่ละพันธุ์ได้ ทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่ขนาดต่าง ๆ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ดังนี้ พันธุ์ IR58025A ขนาด 730 และ 830 คู่เบส, พันธุ์ IR58025B ขนาด 730 เบส, พันธุ์เจ้าหอมนิล ขนาด 730 คู่เบส, พันธุ์ กข 21 ขนาด 730 คู่เบส, พันธุ์ชัยนาท 1 ขนาด 730 และ 830 คู่เบส และพันธุ์ IR64 ขนาด 730 และ 830 คู่เบส ซึ่งผลที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสสามารถสรุปได้ ดังนี้ (ภาพที่ 23)

- ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 830 คู่เบส ที่ส่งไปจากข้าวพันธุ์ IR58025A, ชัยนาท 1 และ IR64 ให้ผลของลำดับเบสที่คล้ายกัน และพบการแทรกของลำดับเบส (Insertion) ขนาดประมาณ 105 คู่เบส
- ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 730 คู่เบส ที่ส่งไปจากข้าวพันธุ์ IR58025A, IR58025B, เจ้าหอมนิล, กข21, ชัยนาท 1 และ IR64 ให้ผลของลำดับเบสที่คล้ายกัน และไม่พบการแทรกของลำดับเบส (Insertion) ขนาดประมาณ 105 คู่เบส

ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน *PPR8* และ *PPR9* จากข้าวพันธุ์ Minghui 63 (Tang *et al.*, 2014) พบบริเวณที่ได้นำมาออกแบบไพรเมอร์ในยีน *PPR8* แสดงว่า เครื่องหมาย Indel_PPR9 ที่ได้ออกแบบมานั้น สามารถจับที่ยีน *PPR8* ได้เช่นเดียวกัน และขนาดที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ คือ ขนาดประมาณ 730 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับยีน *PPR9* แสดงให้เห็นว่าแถบขนาด 730 คู่เบส ที่ปรากฏในตัวอย่างข้าวบางพันธุ์ ที่นำมาศึกษาที่ให้ผลไม่เหมือนกับผลที่ได้จากการโคลนนั้น อาจจะเป็นชิ้นยีนที่ได้จากการเข้าไปจับของไพรเมอร์ที่ยีน *PPR8* จึงทำให้ปรากฏแถบขนาดดังกล่าว ดังแสดงในภาพของการเปรียบเทียบลำดับเบส ที่ได้จากการส่งไปวิเคราะห์ผลเทียบกับยีน *PPR8* และ *PPR9* จากข้าวพันธุ์ Minghui 63 (Tang *et al.*, 2014) (ภาพที่ 23)



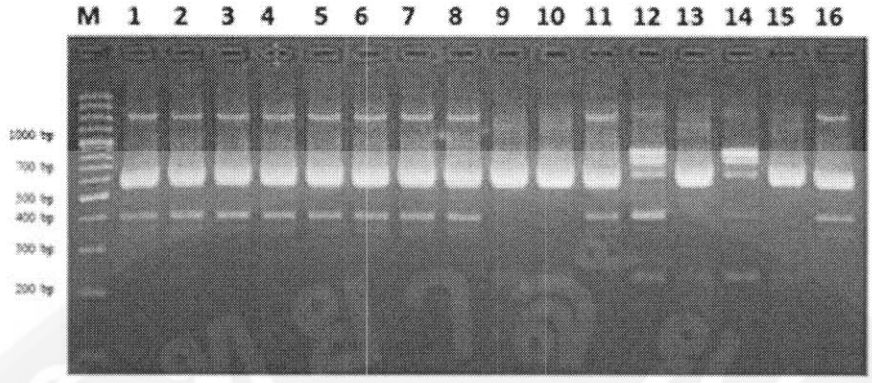
ภาพที่ 23 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ Indel_PPR9 จากข้าวพันธุ์ IR58025A (IRA), IR58025B (IRB), เจ้าหอมนิล (HN), กข21 (RD21), บาสมาติ (BT), ชัยนาท 1 (CH1), และ IR64 (IR64) เทียบกับลำดับเบสจากข้าวพันธุ์ที่ได้รายงานไว้ในฐานข้อมูล (*PPR8* และ *PPR9*) กรอบสีเหลี่ยม คือ บริเวณที่พบความแทรกของชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 105 คู่เบส

7. เครื่องหมายของยีนที่ตำแหน่ง Rf4 ยีน *PPR10*

7.1 ผลการทดสอบเครื่องหมายที่จำเพาะต่อยีน *PPR10* ที่ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์

ในการทดสอบไพร์เมอร์ SNP_PPR10 ที่ออกแบบ เพื่อใช้ในการจำแนกลำดับเบสของยีน *PPR10* ผลที่คาดหวัง คือ G specific allele ที่ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดประมาณ 600 และ 400 คู่เบส และ T specific allele ที่ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาดประมาณ 600 และ 2 00 คู่เบส โดยการทดสอบกับข้าวที่ทำการศึกษาทั้ง 16 พันธุ์ ให้ผลต่างจากที่คาดหวัง โดยพบว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้แถบดีเอ็นเอเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ (ภาพที่ 24)

- กลุ่มที่ 1 ให้แถบขนาดประมาณ 600 และ 400 คู่เบส จากข้าวพันธุ์ IR58025A, IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, นางมลเอส 4, ปิ่นแก้ว 56, กข21, บาสมาติ, ชัยนาท 1 และ IR64 ซึ่งผลที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ SNP_PPR10 ทดสอบนี้ ได้ผลเช่นเดียวกับที่คาดหวัง ซึ่งเป็นผลที่ได้จากการโคลนยีน *PPR10* ที่พบว่า ข้าวพันธุ์ IR58025A, IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ปิ่นแก้ว 56, นางมลเอส 4 และชัยนาท 1 ดังกล่าวที่บริเวณ SNP จะเป็นเบส G ซึ่งจะสามารถเพิ่มจำนวนได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่ขนาด 416 และ 603 คู่เบส
- กลุ่มที่ 2 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 และ 200 คู่เบส จากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1, สุพรรณบุรี 1, ลูกแดงปัตตานี และ กข47 ซึ่งผลที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ SNP_PPR10 ทดสอบนี้ได้ผลเช่นเดียวกับที่คาดหวัง ซึ่งเป็นผลที่ได้จากการโคลนยีน *PPR10* ที่พบว่า ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 และ สุพรรณบุรี 1 ที่บริเวณ SNP จะเป็นเบส T จะสามารถเพิ่มปริมาณได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่ขนาด 242 และ 603 คู่เบส
- กลุ่มที่ 3 ให้แถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบ จากข้าวพันธุ์ปราจีนบุรี 2 และสังข์หยดพัทลุง



ภาพที่ 24 ผลการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SNP_PPR10 ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่จำเพาะต่อยีน *PPR10* เลนที่ M คือ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder เลน 1 คือ ข้าวพันธุ์ IR582025A เลน 2 คือ IR582025B เลน 3 คือ ขาวดอกมะลิ 105 เลน 4 คือ เจ้าหอมนิล เลน 5 คือ นางมล เอส-4 เลน 6 คือ ปิ่นแก้ว 56 เลน 7 คือ กข21 เลน 8 คือ บาสมาติ เลน 9 คือ ปทุมธานี 1 เลน 10 คือ สุพรรณบุรี 1 เลน 11 คือ ชัยนาท 1 เลน 12 คือ ปราจีนบุรี 2 เลน 13 คือ ลูกแดงปัตตานี เลน 14 คือ สังข์หยดพัทลุง เลน 15 คือ กข47 และเลน 16 คือ IR64

จากผลการทดสอบไพรเมอร์ในขั้นต้น จึงได้สุ่มเลือกตัวอย่างในแต่ละกลุ่มส่งไปอ่านลำดับเบสโดยการแยกบริสุทธิ์แถบดีเอ็นเอที่สนใจจากข้าวแต่ละพันธุ์ ได้แก่ IR58025A, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ปราจีนบุรี 2, ลูกแดงปัตตานี, พันธุ์สังข์หยดพัทลุง, กข47 และ IR64 เพื่อเปรียบเทียบลำดับเบสต่อไป

7.2 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสจากเครื่องหมายที่จำเพาะต่อยีน *PPR10*

การวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ SNP_PPR10 จากข้าว 8 พันธุ์ โดยแต่ละพันธุ์ได้ทำการตัดแถบที่ขนาดต่าง ๆ ดังนี้ พันธุ์ IR58025A ขนาด 400 คู่เบส, ขาวดอกมะลิ 105 ขนาด 400 คู่เบส, เจ้าหอมนิล ขนาด 600 คู่เบส, ปราจีนบุรี 2 ขนาด 600, 700 และ 800 คู่เบส, ลูกแดงปัตตานี ขนาด 200 และ 600 คู่เบส, สังข์หยดพัทลุง ขนาด 600, 700 และ 800 คู่เบส, กข47 ขนาด 600 คู่เบส และ IR64 ขนาด 600 คู่เบส ซึ่งผลที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสสามารถสรุปได้ (ภาพที่ 25) คือ

- แถบเครื่องหมายดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 คู่เบส เพื่อใช้ศึกษาบริเวณลำดับเบสที่เกิด SNP ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

G specific allele ที่ได้จากข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล, ปราจีนบุรี 2 และ IR64 พบว่า ได้ผลเช่นเดียวกับผลของการทดสอบไพรเมอร์ SNP_PPR10 (ภาพที่ 24) ซึ่งหากบริเวณ SNP เป็นเบส G จะสามารถเพิ่มจำนวนได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่ขนาด 416 และ 603 คู่เบส

T specific allele ที่ได้จากข้าวพันธุ์ลูกแดงปัตตานี และ กข47 พบว่า ได้ผลเช่นเดียวกับผลของการทดสอบไพรเมอร์ SNP_PPR10 (ภาพที่ 24) ซึ่งหากบริเวณ SNP เป็นเบส T จะสามารถเพิ่มจำนวนได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 แถบที่ขนาด 242 และ 603 คู่เบส

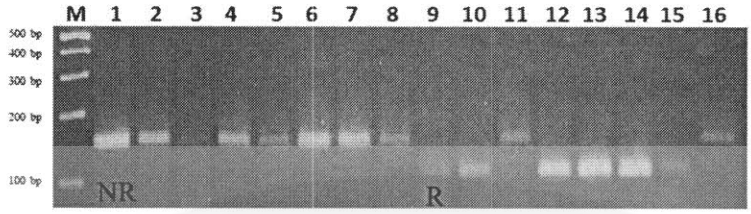
- แถบขนาดประมาณ 200 คู่เบส ของข้าวพันธุ์ลูกแดงปัตตานี จากการอ่านลำดับเบส 2 ครั้ง พบว่า มีลำดับเบสเหมือนกับบริเวณที่ได้จากการเพิ่มปริมาณจากไพรเมอร์ PPR10-Forward outer กับ PPR10-Reverse inner ซึ่งไพรเมอร์ PPR10-Reverse inner นั้นจะเป็นไพรเมอร์ที่จับบริเวณ SNP เป็นเบส T จะสามารถเพิ่มจำนวนได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 242 คู่เบส

- แถบขนาดประมาณ 400 คู่เบส ของข้าวพันธุ์ IR58025A, ขาวดอกมะลิ 105 จากการอ่านลำดับเบส 2 ครั้ง พบว่า มีลำดับเบสเหมือนกับบริเวณที่ได้จากการเพิ่มปริมาณจากไพรเมอร์ PPR10-Forwatd inner กับ PPR10-Reverse outer ซึ่งไพรเมอร์ PPR10-Forward inner นั้น จะเป็นไพรเมอร์ที่จับบริเวณ SNP เป็นเบส G จะสามารถเพิ่มจำนวนได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาด 416 คู่เบส

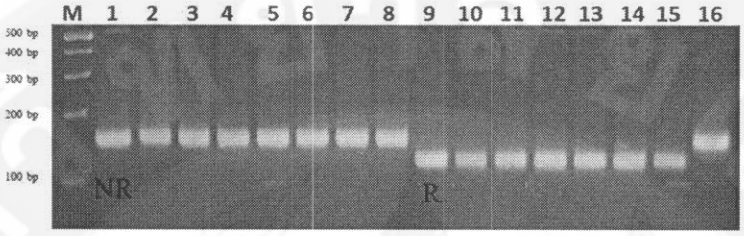
- สำหรับแถบขนาด 700 และ 800 คู่เบส ที่ได้จากข้าว 2 พันธุ์ คือ ปราจีนบุรี 2 และสังข์หยดพัทลุง และแถบขนาด 600 คู่เบส จากข้าวพันธุ์สังข์หยดพัทลุง พบว่า ลำดับเบสไม่มีความเหมือนกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากพันธุ์อื่นที่นำมาศึกษา ซึ่งอาจจะเกิดจากการที่ไพรร์เมอร์ SNP_PPR10 สามารถจับกับบริเวณอื่นในจีโนมของข้าว จึงทำให้ปรากฏแถบแบนที่ขนาดต่างกัน

ภาพที่ 25 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ SNP_PPR10 ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่จำเพาะต่อยีน *PPR10* จากข้าวพันธุ์ IR58025A (IRA), IR58025B (IRB),ขาวดอกมะลิ 105 (KDM), เจ้าหอมนิล (HN), ปราจีนบุรี 2 (PG2), ลูกแดงปัตตานี (LDP) IR64 (IR64) ลำดับเบสข้าวพันธุ์ที่มีรายงานในฐานข้อมูล (*PPR10*) กรอบสีเหลี่ยม คือ บริเวณ SNP ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

ในการศึกษานี้ได้พัฒนาเครื่องหมายที่จำเพาะกับยีน *PPR9* และยีน *PPR10* โดยเครื่องหมาย SNP_PPR10 เป็นเครื่องหมายแรกของยีน *PPR10* และพบว่า มีรายงานเครื่องหมายที่จำเพาะต่อยีน *PPR9* จำนวน 5 เครื่องหมาย และพบว่า RMS_PPR9_1 มีความถูกต้องในการจัดกลุ่มข้าวของประเทศอิหร่านสูงสุด คือ 91 เปอร์เซ็นต์ (Pranathi *et al.*, 2016) ในการศึกษานี้จึงได้นำเครื่องหมาย RMS_PPR9_1 และ RMS_PPR9_4 มาใช้ในการจัดกลุ่มข้าวไทย จำนวน 16 พันธุ์ พบว่าเครื่องหมาย RMS_PPR9_1 ให้แถบที่สอดคล้องกับการจำแนกด้วยการย้อมสีเรณู 14 พันธุ์ ส่วน RMS_PPR9_4 ให้แถบที่สอดคล้องกับการจำแนกด้วยการย้อมสีเรณู 15 พันธุ์ (ภาพที่ 26)



RMS_PPR9_1



RMS_PPR9_4

ภาพที่ 26 ผลการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ด้วยเครื่องหมาย RMS_PPR9_1 และ RMS_PPR9_4 เลน M คือ GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder เลน 1 คือ ข้าวพันธุ์ IR582025A เลน 2 คือ IR582025B เลน 3 คือ ขาวดอกมะลิ 105 เลน 4 คือ เจ้าหอมนิล เลน 5 คือ นางมลเอส 4 เลน 6 คือ ปิ่นแก้ว 56 เลน 7 คือ กข21 เลน 8 คือ บาสมาติ เลน 9 คือ ปทุมธานี 1 เลน 10 คือ สุพรรณบุรี 1 เลน 11 คือ ชัยนาท 1 เลน 12 คือ ปราจีนบุรี 2 เลน 13 คือ ลูกแดงปัตตานี เลน 14 คือ สังข์หยดพัทลุง เลน 15 คือ กข47 และเลน 16 คือ IR64

โดยในการทดสอบเครื่องหมาย InDel_ PPR9, RMS_PPR9_1, RMS_PPR9_4 และ SNP_PPR10 กับข้าวจำนวน 16 พันธุ์ หากแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดเป็นของกลุ่มแก้ความเป็นหมันของเรณู จะแสดงเป็น R แต่หากแถบดีเอ็นเอที่ให้เป็นของกลุ่มไม่แก้ความเป็นหมันจะแสดงเป็น NR ดังแสดงในตารางที่ 12 จากนั้น คำนวณเป็นค่าความถูกต้อง โดยการนำจำนวนเครื่องหมายที่ให้แถบดีเอ็นเอที่จำแนกได้สอดคล้องกับกลุ่มของพันธุ์ข้าวหารด้วยจำนวนเครื่องหมายทั้งหมด (ภาพที่ 22, 24 และ 26) สามารถคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องในความสามารถแก้ความเป็นหมันของเรณู ของเครื่องหมายทั้ง 4 เครื่องหมาย ดังแสดงในตารางที่ 14 โดยที่เครื่องหมาย RMS_PPR9_4 จะมีความถูกต้องสูงที่สุด คือ 93.75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่างจากการศึกษาในข้าวของประเทศอิหร่าน ที่ RMS_PPR9_1 ให้ความถูกต้องสูงที่สุด เป็น 91 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ RMS_PPR9_4 นั้น จะพบในบริเวณ 25 กิโลเบสด้านหน้าของยีน *PPR9* ในขณะที่ RMS_PPR9_1 พบบริเวณ InDel ขนาด 42 คู่เบส ภายในบริเวณรหัสของยีน *PPR9* แสดงให้เห็น ว่ายีน *PPR9* ของข้าวไทยและ

อิหร่านมีความต่างกันในบริเวณรหัสของยีน *PPR9* ทำให้เครื่องหมายที่พัฒนาจากลำดับเบสในฐานข้อมูลให้ผลการจำแนกต่างกัน

ตารางที่ 14 สรุปผลจากการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายจำเพาะกับยีน *PPR9* และ *PPR10* จากข้าว 16 พันธุ์ต่าง ๆ

กลุ่ม	ลำดับที่	พันธุ์	Indel_PPR9[1]	RMS_ PPR9_1[2]	RMS_ PPR9_4[2]	SNP_PPR10[1]
A-line	1	IR58025A	NR	NR	NR	NR
B- line	2	IR58025B	NR	NR	NR	NR
	3	ขาวดอกมะลิ 105	NR	NR	NR	NR
	4	เจ้าหอมนิล	R/NR	NR	NR	NR
	5	นางมลเอส 4	NR	NR	NR	NR
	6	ปิ่นแก้ว 56	NR	NR	NR	NR
	7	กข21	NR	NR	NR	NR
	8	บาสมาติ	NR	NR	NR	NR
R-line	9	ปทุมธานี 1	R	R	R	R
	10	สุพรรณบุรี 1	R	R	R	R
	11	ชัยนาท 1	R	NR	R	NR
	12	ปราจีนบุรี 2	R/NR	R	R	R/NR
	13	ลูกแดงปัตตานี	R	R	R	R
	14	สังข์หยดพัทลุง	R	R	R	R/NR
	15	กข47	R	R	R	R
	16	IR64	R/NR	NR	NR	NR
	เปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง		81.25	87.5	93.75	87.5

[1] เครื่องหมายที่พัฒนาในการศึกษานี้ [2] จากการศึกษาของ Pranathi, *et al.*, 2016

R หมายถึง ปรากฏ NR หมายถึง ไม่ปากฏ R/NR หมายถึง ปรากฏทั้ง 2 อย่าง

นอกจากนี้ยังรายงานว่าพบบริเวณ InDel ขนาด 105 คู่เบส ในยีน *PPR762*, *PPR9* และ *PPR3* เช่นเดียวกับที่พบในยีน *PPR9* ในการศึกษานี้ ทำให้เครื่องหมายที่พัฒนาจากบริเวณ InDel ขนาด 105 คู่เบส อาจจะไม่จำเพาะกับยีน *PPR9* จึงทำให้เครื่องหมาย InDel_PPR9 มีความถูกต้องในการจำแนก 81.25 เปอร์เซ็นต์ แต่ผลการจำแนกของเครื่องหมายจำเพาะกับยีน PPR9 ทั้ง 3 เครื่องหมาย (Indel_PPR9,RMS_PPR9_1, และRMS_PPR9_4) มีความถูกต้อง 81- 94 เปอร์เซ็นต์ ก็น่าจะคาดเดาได้ว่า ยีน *PPR9* เป็นยีนหลักในการแก้ความเป็นหมันเรณูของข้าวไทย

ในการพัฒนาเครื่องหมายที่จำเพาะยีนแก้ความเป็นหมันเรณูตำแหน่ง Rf4 นั้น จะพบว่า ไม่มีเครื่องหมายใดมีความถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า ในข้าวพันธุ์ ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้น่าจะมียีนแก้ความเป็นหมันอื่น ๆ อยู่ในจีโนม เช่น ข้าว IR64 ที่เครื่องหมายจำเพาะกับยีน *PPR9* และยีน *PPR10* แสดงแถบดีเอ็นเอไม่แก้หมัน แต่ผลการย้อมเรณูของลูกรุ่น F_1 ให้ผลว่าเป็นพันธุ์ IR64 มีความสามารถในการแก้หมันเรณูได้

ในการศึกษายีนแก้ความเป็นหมันของเรณูของระบบ WA-CMS ที่ตำแหน่ง Rf4 และ Rf3 จากข้าวไทย พบเครื่องหมายจำเพาะกับยีนแก้ความเป็นหมันที่ตำแหน่ง Rf4 คือ RMS_PPR9_4 (ตารางที่ 14) ส่วนเครื่องหมายสำหรับยีนแก้ความเป็นหมันเรณูที่ตำแหน่ง Rf3 คือ เครื่องหมาย RM3148 (ตารางที่ 12) ที่เป็นเครื่องหมายชนิด SSR ซึ่งเครื่องหมายของยีนแก้ความเป็นหมันทั้ง 2 ตำแหน่งนี้ จะสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไทยพันธุ์ดีให้มีความสามารถในการแก้ความเป็นหมันเรณูต่อไป และนำไปใช้ในการศึกษาการทำงานของยีนแก้ความเป็นหมันเรณูในประชากรลูกผสมรุ่นที่ 2 (F_2) ของข้าวพันธุ์ต่างๆ ต่อไป

สรุป

1. จากงานวิจัยนี้ สามารถแยกและหาลำดับเบสของยีนแก้ความเป็นหมันของเรณูของระบบ WA-CMS ที่ตำแหน่ง Rf4 คือ ยีน pentatricopeptide_repeat (PPR) จำนวน 3 ยีน ได้แก่ ยีน *PPR7* ยีน *PPR9* และยีน *PPR10* และยีนแก้ความเป็นหมันที่ตำแหน่ง Rf3 จำนวน 4 ยีน ได้แก่ ยีนโปรตีน mitochondrial-processing peptidase subunit alpha ยีนโปรตีน pollen-specific protein SF21 และยีน *PPR* จำนวน 2 ยีน

2. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนทั้ง 7 ยีน ที่แยกได้ จากข้าวไทย พบบริเวณที่แตกต่างที่สามารถนำมาจำแนกกลุ่มพันธุ์แก้ความเป็นหมันเรณูได้ 2 บริเวณ คือ บริเวณลำดับเบสเพิ่มขึ้นหรือลดลงขนาด 105 คู่เบส ในยีน *PPR9* และบริเวณเปลี่ยนแปลงลำดับเบสเพียง 1 ลำดับเบส (SNP) ที่เบส 1,392 ในยีน *PPR10* ซึ่งได้ออกแบบเป็นเครื่องหมายจำเพาะกับยีน คือ InDel_PPR9 และ SNP_PPR10

3. จากการทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR พบเครื่องหมาย RM3148 มีความถูกต้องในการจำแนกกลุ่มของข้าวที่มีความสามารถในการแก้ความเป็นหมันเรณูตำแหน่ง Rf3 สูงที่สุดเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เครื่องหมาย RM258 และ RM591 มีความถูกต้องในการจำแนกกลุ่มของข้าวที่มีความสามารถในการแก้ความเป็นหมันตำแหน่ง Rf4 เป็น 50 เปอร์เซ็นต์

4. ในตำแหน่ง Rf4 การทดสอบเครื่องหมายที่จำเพาะกับยีน *PPR9* ในตำแหน่ง Rf4 จำนวน 3 เครื่องหมาย คือ InDel_PPR9, RMS_PPR9_1 และ RMS_PPR9_4 พบว่า เครื่องหมาย RMS_PPR9_4 มีความถูกต้องในการจำแนกกลุ่มของข้าวที่มีความสามารถในการแก้ความเป็นหมันเรณูสูงที่สุด 93.75 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เครื่องหมายที่จำเพาะกับยีน *PPR10* คือ SNP_PPR10 มีความถูกต้องในการจำแนกกลุ่มของข้าวที่มีความสามารถในการแก้ความเป็นหมันเรณู 87.5 เปอร์เซ็นต์

5. เครื่องหมายที่สามารถนำไปใช้ในการศึกษาความสามารถในการแก้ความเป็นหมันเรณูของข้าวไทย ได้แก่ เครื่องหมายจำเพาะกับยีนแก้ความเป็นหมันเรณูที่ตำแหน่ง Rf4 คือ RMS_PPR9_4 ส่วนเครื่องหมายสำหรับยีนแก้ความเป็นหมันเรณูที่ตำแหน่ง Rf3 คือ เครื่องหมาย RM3148

เอกสารอ้างอิง

ข้าวลูกผสม.องค์ความรู้เรื่องข้าว. 2557. จาก **ข้าวลูกผสม.องค์ความรู้เรื่องข้าว.** http://www.brrd.in.th/rkb/Fact%20Sheet/varieties/fs_hybrid.pdf [4 สิงหาคม 2557].

ทันข่าว CP. 2554 **กรมการข้าวประกาศรับรองพันธุ์ข้าวลูกผสม "ซีพี 304" ข้าวลูกผสมทางการค้ารายแรกในประเทศไทย ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่สูง อายุการเก็บเกี่ยวสั้น.** จาก http://www.cpthailand.com/%E0%B8%A3%E0%B8%A7%E0%B8%A1%E0%B8%84%E0%B8%AD%E0%B8%A5%E0%B8%A1%E0%B8%99/tabid/129/articleType/ArticleView/articleId/306/-304--.aspx [4 สิงหาคม 2557].

พชระ แสงสวงค์. 2555. **การพัฒนาสายพันธุ์เพศผู้เป็นหมันของข้าวโดยวิธีการผสมกลับและทดสอบสมรรถนะการผสม.** วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ปทุมธานี

ภวพร สุขเกษม. 2555. **การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวพันธุ์ดีของไทยให้เป็นสายพันธุ์เรณูเป็นหมันและการคัดเลือกข้าวพันธุ์ดีของไทยที่เป็นพันธุ์รักษาเรณูเป็นหมันและพันธุ์แก้ความเป็นหมัน.** ปัญหาพิเศษ วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

สำนักวิจัยและพัฒนา กรมการข้าว. 2555. *ข้าวลูกผสม* กขผ.1 และเทคโนโลยีการผลิตที่เหมาะสม. **วารสารธุรกิจเมล็ดพันธุ์ไทย.** จาก http://www.thasta.com/pdf/article/%E0%B8%81%E0%B8%82%E0%B8%9C1.pdf [4 สิงหาคม 2557].

สุวิทย์ พันธุลิ. 2556. **การคัดเลือกพันธุ์ข้าวไทยที่มีคุณสมบัติเป็นพันธุ์รักษาเรณูเป็นหมันแก้ความเป็นหมันของเรณูที่ดีและการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวไทยพันธุ์ดีของไทยให้เป็นสายพันธุ์เรณูเป็นหมัน.** ปัญหาพิเศษ วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

Ahmadikhah, A and Karlov, G. I. 2006. Molecular mapping of the fertility-restoration gene *Rf4* for WA-cytoplasmic male sterility in rice. **Plant Breeding** 125 (4): 363–367.

Alavi, M., Ahmadikhah, A., Kamkar, B., & Kalateh, M. (2009). Mapping Rf3 locus in rice by SSR and CAPS markers. International Journal of Genetics and Molecular Biology, 1(7), 121-126.

Bohra, A.; Jha, U.C.; Adhimoolam, P.; Bisht, D. and Singh, N. P. 2016. Cytoplasmic male sterility (CMS) in hybrid breeding in field crops. **Plant Cell Reports** 35(5): 967-993.

Cai, J.; Liao, Q.P.; Dai, Z.J.; Zhu, H.T.; Zeng, R.Z.; Zhang, Z.M. and Zhang, G.-Q. 2013. Allelic differentiations and effects of the *Rf3* and *Rf4* genes on fertility restoration in rice with wild abortive cytoplasmic male sterility. **Biologia Plantarum** 57(2): 274-280.

Cai, J.; Dai, Z.J.; Zhu, H.T.; Zeng, R.Z.; Zhang, Z.M.; Ma, T.-F.and Zhang, G.-Q. 2014. Comparative analysis of fertility restoration genes for WA, Y, and DA cytoplasmic male sterility in rice. **Biologia Plantarum** 58(2): 241-246.

Chen, L. and Liu, Y. 2014. Male Sterility and Fertility Restoration in Crops. **Annu. Rev. Plant Biol.** 65: 579–606.

Hu, J.; Huang, W.; Huang, Q.; Qin, X.; Yu, C.; Wang, L. and Zhu, Y. 2014. Mitochondria and cytoplasmic male sterility in plants. **Mitochondrion** 19: 282-288.

Huang, J. Z.; Zhi-Guo, E.; Zhang, H. L. and Shu, Q. Y. 2014. Workable male sterility systems for hybrid rice: Genetics, biochemistry, molecular biology, and utilization. **Rice** 7(13): 1-14.

Kazama, T. and Toriyama, K. 2014. A fertility restorer gene, *Rf4*, widely used for hybrid rice breeding encodes a pentatricopeptide repeat protein. **Rice** 7(28): 1-5.

Kiani, G. (2015). Validation of SSR markers linked to restoring fertility (Rf) genes and genotyping of rice lines at Rf loci. Journal of Agricultural Science and Technology, 17, 1931-1938.

Jing, R., Li, X., Yi, P., & Zhu, Y. (2001). Mapping fertility-restoring genes of rice WA cytoplasmic male sterility using SSLP markers. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 42.

Li, S.; Yang, G.; Li, S.; Li, Y.; Chen, Z. and Zhu, Y. I. 2005. Distribution of Fertility-restorer Genes for Wild-abortive and Honglian CMS Lines of Rice in the AA Genome Species of Genus *Oryza.* **Annals of Botany** 96: 461–466.

Kazama, T., Nakamura, T., Watanabe, M., Sugita, M., & Toriyama, K. (2008). Suppression mechanism of mitochondrial ORF79 accumulation by Rf1 protein in BT-type cytoplasmic male sterile rice. **The Plant Journal**. 55(4), 619-628.

Mehrajuddin, R;. Salgotra, K. and Gupta, B.B. 2013. Interaction of Restorer Genes in 'WA'-type Cytoplasmic Male Sterility System in Rice (*Oryza sativa* L.). **Natl. Acad. Sci. Lett**. 36(3): 259–264.

Nematzadeh, Gh. A. and Kiani, G. 2010. Genetic analysis of fertility restoration genes for WA-type cytoplasmic male sterility in Iranian restorer rice line DN-33-18. **African Journal of Biotechnology** 9(38): 6273-6277.

Pranathi, K., Viraktamath, B. C., Neeraja, C. N., Balachandran, S. M., Rao, P. K., Revathi, P., ... & Abhilash, V. (2016). Development and validation of candidate gene-specific markers for the major fertility restorer genes, Rf4 and Rf3 in rice. Molecular breeding, 36(10), 145.

Saxena, R. K.; Saxena, K. B.; Pazhamala, L. T.; Patel, K.; Parupalli, S.; Sameerkumar, C. V. and Varshney, R. K. 2015. Genomics for greater efficiency in pigeonpea hybrid breeding. **Frontiers in Plant Science** 6: 1-7.

Schmitz-Linneweber, C. and Small, I. 2008. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. **Trends in Plant Science** 13(12): 663-670.

Seesang, J.; Sripichitt, P. and Sreewongcha, T. 2014. Heterosis and inheritance of fertility-restorer genes in rice. **ScienceAsia** 40: 48–52.

Suresh, P.B.; Srikanth, B.V.; Kishore, H.; Rao, I. S.; Vemireddy, L.R.; Dharika, N.; Sundaram, R.M.; Ramesha, M. S.; Sambasiva Rao, K.R.S.; Viraktamath, B. C. and Neeraja, C. N. 2012. Fine mapping of Rf3 and Rf4 fertility restorer loci of WA-CMS of rice (*Oryza sativa* L.) and validation of the developed marker system for identification of restorer lines. **Euphytica** 187: 421–435.

Tan, Y.P.; Li, S.Q.; Wang, L.; Liu, G.; Hu, J. and Zhu,,Y.G. 2008. Genetic analysis of fertility-restorer genes in rice. **Biologia Plantarum** 52(3): 469-474.

Tang, H.; Luo, D.; Zhou, D.; Zhang, Q.; Tian, D.; Zheng, X.; Chen, L. and Liu, Y. G. 2014. The rice restorer Rf4 for wild-abortive cytoplasmic male sterility encodes a mitochondrial-localized PPR protein that functions in reduction of WA352 transcripts. **Molecular Plant** 7(9); 1497-1500.

Wang, K.; Gao, F.; Ji, Y.; Liu, Y.; Dan, Z.; Yang, P.; Zhu, Y. and Li, S. 2013. *ORFH79* impairs mitochondrial function via interaction with a subunit of electron transport chain complex III in Honglian cytoplasmic male sterile rice. **New Phytologist** 198(2): 408-418.