วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 34 : 1 (89 - 99)

การหาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับ QTLs ที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้นในประชากร BC_5F_2 ของคู่ผสมระหว่างข้าวไวต่อช่วงแสงพันธุ์ กข6 และข้าวไม่ไวต่อช่วงแสงพันธุ์ ไทชุง 65

Identification of Molecular Markers Linked to QTLs Related to Early Heading Date in BC_5F_2 Population from the Cross of Photoperiod-sensitive RD6 and Photoperiod-insensitive Taichung 65 Varieties

สุเทพ วัชรเวชศฤงคาร[1] วราภรณ์ แสงทอง[1] แสงทอง พงษ์เจริญกิต[1] และช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์[1]

บทคัดย่อ

อายุวันออกดอกเป็นลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญอย่างหนึ่งในข้าวแต่ละพันธุ์มีการปรับตัวให้สามารถปลูกได้ในพื้นที่ และฤดูกาลที่แตกต่างกัน นอกจากนี้อายุวันออกดอกที่เปลี่ยนแปลงไปมีผลอย่างมากต่อผลผลิตข้าว อายุวันออกดอกจึงเป็นวัตถุประสงค์หลักในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ดังนั้นการทดลองนี้ได้นำเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 11 ตำแหน่ง ที่พบในสายพันธุ์ข้าวเหนียว กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสง BC_3F_5-1752(6) มาใช้ศึกษาหาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับ QTLs ที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้นในประชากรผสมกลับของข้าวเหนียวสายพันธุ์ กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสง BC_5F_2 จำนวน 248 ต้น ผลการทดลองจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีโนไทป์กับอายุวันออกดอก (ฟีโนไทป์) ด้วยวิธี Single-Factor Analysis of Variance พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 11 ตำแหน่ง มีความสัมพันธ์กับลักษณะอายุวันออกดอกสั้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) จากนั้นทำการวิเคราะห์หาค่าสมการการถดถอยหลายตำแหน่งด้วยวิธี multiple regression ของเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะอายุวันออกดอกสั้น พบเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 3 ตำแหน่ง คือ *er3* marker มีความสัมพันธ์กับลักษณะอายุวันออกดอกสั้นมากที่สุด (P<0.0001) โดยมีค่า partial R-square เท่ากับ 0.1410 รองลงมา คือ เครื่องหมายโมเลกุล *hd1* marker และ *hd2* marker ที่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะอายุวันออกดอกสั้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.0001) มีค่า partial R-square เท่ากับ 0.0891 และ 0.0611 ตามลำดับ ดังนั้นสามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุล *er3* *hd1* และ *hd2* markers มาช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวสายพันธุ์ กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสงให้มีอายุวันออกดอกที่เหมาะสมได้ต่อไป

คำสำคัญ : ข้าว อายุวันออกดอก เครื่องหมายโมเลกุล การตอบสนองต่อช่วงแสง SSR marker

Abstract

Heading date is an important trait of each rice varieties which adapts it self to grow in different areas and seasons. Beside, change in heading date has a much effect on rice yields. Thus heading date is a major objective in rice breeding programs. Therefore, 11 molecular markers, found in photoperiod-insensitive glutinous rice RD6 line BC_3F_5-1752(6), were analyzed for their relationships with QTLs that control early heading date trait in BC_5F_2 population of photoperiod-insensitive glutinous rice

[1] สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290

10--[illegible].indd 89 10/3/2559 10:03:09

RD6 (248 plants). Based on the investigation of the relationship between genotype and heading date (phenotype) using Single-Factor Analysis of Varience method, it is found that 11 positions of molecular markers has high significant relationship (P<0.01) with the early heading date trait. After that, data were analyzed with multiple regression method for the molecular markers having a relationship with the early heading date trait. It is found that 3 positions of the molecular markers (*er3*) had a relationship with the early heading date trait most (P<0.0001) which the partial R-square value is 0.1410 followed by *hd1* marker and *hd2* marker (P<0.0001) which the partial R-square value are 0.0891 and 0.0611, respectively. Therefore *er3* , *hd1* and *hd2* markers can be used for the selection in photoperiod-insensitive RD 6 in order to have an appropriate heading date.

Keywords : rice, heading date, molecular marker, photoperiod sensitivity, SSR marker

คำนำ

ข้าวเป็นพืชที่มีความสำคัญมากต่อมนุษย์ ประชากรโลกมากกว่าครึ่งบริโภคข้าวเป็นอาหารหลักโดยเฉพาะคนเอเชีย ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่ประชากรบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก และมีพื้นที่สำหรับปลูกข้าวเพื่อใช้บริโภคภายในประเทศ และเพื่อส่งออกโดยในปีเพาะปลูก 2556/57 มีพื้นที่ปลูกข้าวนาปีประมาณ 62 ล้านไร่ และนาปรังประมาณ 16 ล้านไร่ นอกจากนี้ประเทศไทยมีปริมาณการส่งออกข้าวในปี 2557 เท่ากับ 10.9 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่า 174,853 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558)

อายุวันออกดอกเป็นลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญอย่างหนึ่งในข้าว โดยข้าวแต่ละพันธุ์สามารถปรับตัวให้ปลูกในพื้นที่ และฤดูกาลที่แตกต่างกัน นอกจากนี้อายุวันออกดอกที่เปลี่ยนแปลงไปมีผลอย่างมากต่อผลผลิตข้าว อายุวันออกดอกจึงเป็นวัตถุประสงค์หลักในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว จากการศึกษา quantitative trait loci (QTLs) มากกว่า 100 ตำแหน่ง ที่มุ่งเน้นไปที่อายุวันออกดอกข้าว (http://www.gramene.org/qtl) โดยในทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลศึกษา QTLs ที่สัมพันธ์กับอายุวันออกดอกข้าว โดยประชากรที่นำมาศึกษาเกิดจากการผสมระหว่างข้าวไวต่อช่วงแสงพันธุ์ Nipponbare ที่เป็นข้าวจาโปนิกา กับข้าวไม่ไวต่อช่วงแสงพันธุ์ Kasalath ที่เป็นข้าวอินดิกา ทำการวิเคราะห์ตำแหน่งของ QTLs ที่ควบคุมอายุวันออกดอกข้าวบนโครโมโซมต่างๆ จำนวน 15 ตำแหน่ง คือ *Hd1-Hd14* (Yano *et al*., 2001)

ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 เป็นพันธุ์ข้าวเหนียวที่นิยมปลูกกันมากในฤดูนาปี เนื่องจากเป็นข้าวเหนียวที่มีคุณภาพการหุงต้มดี มีกลิ่นหอมน่ารับประทาน และเหนียวนุ่ม ในปีเพาะปลูก 2555/56 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวเหนียวทั้งหมด 20.3 ล้านไร่ หรือร้อยละ 31.2 ของพื้นที่ปลูกข้าวนาปีทั้งหมด โดยเป็นพื้นที่ปลูกข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 สูงถึง 16.6 ล้านไร่ หรือร้อยละ 81.8 ของพื้นที่ปลูกข้าวเหนียวทั้งหมด (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558) แต่ผลผลิตที่ได้ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการ เนื่องมาจากข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 เป็นข้าวที่ไวต่อช่วงแสงสามารถปลูกให้ผลผลิตได้เพียงปีละหนึ่งครั้งในฤดูนาปีเท่านั้น ที่ผ่านมามีโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี molecular marker-asisted backcrossing เพื่อปลูกในฤดูนาปรัง โดยมีข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 เป็นพันธุ์รับ และข้าวเจ้าพันธุ์ Taichung 65 เป็นพันธุ์ให้ (วราภรณ์ และคณะ, 2551) ซึ่งเป็นการนำเอาความรู้ทางเทคโนโลยีชีวภาพมาช่วยทำให้งานด้านการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้รับการพัฒนามากยิ่งขึ้น จากโครงการดังกล่าวนี้ทำให้ได้สายพันธุ์ข้าวเหนียว กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสง จำนวนหลายสายพันธุ์ โดยพบว่าในข้าวเหนียว กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสงสายพันธุ์ RD6 BC_8F_5-505 ที่มีพันธุกรรมร้อยละ 99.80 เหมือนกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 เดิมยกเว้นตำแหน่งของยีน *Hd1/hd1* เป็นอัลลีลของข้าวพันธุ์ Taichung 65 มียีโนไทป์เป็น hd1hd1 มีอายุวันออกดอก 129 วันเมื่อปลูกในฤดูนาปรัง

10--[illegible].indd 90 10/3/2559 10:03:09

พ.ศ. 2554 (วราภรณ์ และคณะ, 2555) ซึ่งเมื่อรวมกับระยะเวลาการพัฒนาของเมล็ดจนกระทั่งสุกแก่พร้อมเก็บเกี่ยว ทำให้ข้าวเหนียว กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสงสายพันธุ์นี้มีอายุเก็บเกี่ยวประมาณ 160 วัน ซึ่งถือว่ามีอายุเก็บเกี่ยวที่ยาวนานไม่เป็นที่ยอมรับของเกษตรกร ขณะเดียวกันได้มีการปลูกศึกษาพันธุ์ขั้นต้นของสายพันธุ์ข้าวเหนียว กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสงจำนวน 53 สายพันธุ์ พบว่ามีสายพันธุ์ที่มีอายุออกดอกสั้น คือสายพันธุ์ RD6 BC_3F_5-1752(6) มีอายุวันออกดอกเมื่อปลูกในฤดูนาปรัง พ.ศ. 2553 และ 2554 เท่ากับ 98 และ 106 วันตามลำดับ จึงทำให้สนใจว่าในข้าวเหนียวสายพันธุ์ RD6 BC_3F_5-1752(6) ได้รับยีนใดจากพันธุ์ให้จึงทำให้ข้าวเหนียวไม่ไวต่อช่วงแสงสายพันธุ์นี้มีอายุวันออกดอกสั้นลง

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้ หรือยึดติดกับ QTLs ที่ควบคุมอายุวันออกดอกสั้น และเป็นเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะอายุวันออกดอกสั้น เพื่อใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวในแต่ละครั้งของการผสมกลับเพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ให้ไม่ไวต่อช่วงแสง และมีอายุวันออกกดอกที่เหมาะสม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พันธุ์ และสายพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย

ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 เป็นข้าวไวต่อช่วงแสงใช้เป็นพันธุ์รับในการสร้างประชากร

ข้าวเจ้าพันธุ์ Taichung 65 เป็นข้าวไม่ไวต่อช่วงแสงใช้เป็นพันธุ์ให้ในการสร้างประชากร

สายพันธุ์ผสมกลับข้าวเหนียว กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสง BC_3F_5-1752(6) ได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี molecular marker-asisted backcrossing เพื่อปลูกในฤดูนาปรัง โดยมีข้าวเหนียวไวต่อช่วงแสงพันธุ์ กข6 เป็นพันธุ์รับ และข้าวเจ้าไม่ไวต่อช่วงแสงพันธุ์ Taichung 65 เป็นพันธุ์ให้ ทำการผสมกลับจำนวน 3 ครั้ง และผสมตัวเอง 4 ครั้ง จากนั้นทำการปลูกศึกษาพันธุ์ขั้นต้น ในฤดูนาปรัง (มกราคม-มิถุนายน) ฤดูนาปี (กรกฎาคม-ธันวาคม) พ.ศ. 2553 และฤดูนาปรัง (มกราคม-มิถุนายน) พ.ศ. 2554 ทำการเก็บข้อมูลอายุวันออกดอก พบว่าสายพันธุ์ข้าวเหนียว กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสง BC_3F_5-1752(6) มีอายุวันออกดอก 98 94 และ 106 วัน ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ข้าวเหนียว กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสง BC_8F_5-505 มีอายุวันออกดอกในฤดูนาปรัง (มกราคม-มิถุนายน) พ.ศ. 2554 เท่ากับ 129 วัน จึงได้นำสายพันธุ์ข้าวเหนียว กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสง BC_3F_5-1752(6) ใช้เป็นพันธุ์ให้ในการสร้างประชากรตัวอย่าง

2. เครื่องหมายโมเลกุล

จากข้อมูลของโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี molecular marker-asisted backcrossing เพื่อปลูกในฤดูนาปรัง ที่มีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น background marker จำนวน 160 ตำแหน่ง ที่แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างข้าวพันธุ์รับ (ข้าวไวต่อช่วงแสงพันธุ์ กข6) กับข้าวพันธุ์ให้ (ข้าวไม่ไวต่อช่วงแสงพันธุ์ Taichung 65) ตรวจสอบบนโครโมโซมของสายพันธุ์ข้าวเหนียว กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสง BC_3F_5-1752(6) แล้วทำการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่เป็น homozygous ของอัลลีลข้าวไม่ไวต่อช่วงแสงพันธุ์ Taichung 65 (วราภรณ์ และคณะ, 2551) ได้จำนวน 11 ตำแหน่ง พบบนโครโมโซม 5 จำนวน 2 ตำแหน่ง คือ *er3* marker และ RM507 โครโมโซม 6 จำนวน 4 ตำแหน่ง คือ *hd1* marker, RM5963, *se5* marker และ RM136 และโครโมโซม 7 จำนวน 5 ตำแหน่ง คือ RM505, RM234, RM18, *er2* marker และ *hd2* marker จึงได้นำเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 11 ตำแหน่ง มาใช้เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับ QTLs ที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้นในประชากรตัวอย่าง

3. การสร้างประชากร BC_5F_2

สร้างประชากร BC_5F_2 เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับ

10--[illegible].indd 91 10/3/2559 10:03:09

QTLs ที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้นมีรายละเอียด ดังนี้

3.1 ฤดูนาปรัง (มกราคม-มิถุนายน) พ.ศ. 2553

ปลูกสายพันธุ์ข้าวเหนียว กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสง BC_3F_5-1752(6) ในแปลงนาทดลอง จากนั้นทำการตัดช่อดอกมาผสมกลับไปยังพันธุ์รับ (ข้าวเหนียวไวต่อช่วงแสงพันธุ์ กข6) ผลิตเมล็ด BC_4F_1 ได้จำนวน 12 เมล็ด

3.2 ฤดูนาปี (กรกฎาคม-ธันวาคม) พ.ศ. 2553

ปลูกสายพันธุ์ข้าวเหนียว กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสง BC_4F_1 จำนวน 12 เมล็ด จากนั้นทำการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล จำนวน 5 ตำแหน่ง คือ *er3*, *hd1*, *se5*, *er2* และ *hd2* markers ได้ต้นที่มียีโนไทป์เป็น heterozygous ทั้ง 5 ตำแหน่ง จำนวน 1 ต้น คือ BC_4F_1-2640 นำไปผสมกลับไปหาพันธุ์รับ (ข้าวเหนียวไวต่อช่วงแสงพันธุ์ กข6) ผลิตเมล็ด BC_5F_1 ได้จำนวน 18 เมล็ด

3.3 ฤดูนาปรัง (มกราคม-มิถุนายน) พ.ศ. 2554

ปลูกข้าวเหนียว กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสงสายพันธุ์ BC_5F_1 จำนวน 18 เมล็ด จากนั้นทำการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล จำนวน 5 ตำแหน่ง เหมือนในฤดูนาปี พ.ศ. 2553 ได้ต้นที่มียีโนไทป์เป็น heterozygous ทั้ง 5 ตำแหน่ง จำนวน 1 ต้น คือ BC_5F_1-4247 ผสมตัวเองผลิตเมล็ด BC_5F_2

4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับ QTLs ที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้น

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับ QTLs ที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้น ในประชากร BC_5F_2 มีรายละเอียดดังนี้

4.1 ปลูกเมล็ด BC_5F_2 เพื่อใช้ศึกษาข้อมูลฟีโนไทป์ ในฤดูนาปรัง (มกราคม-มิถุนายน) พ.ศ. 2555 โดยปลูก 1 ต้นต่อหลุม ระยะปลูก 25x25 เซนติเมตร จำนวน 400 ต้น เก็บข้อมูลอายุวันออกดอก (ข้อมูลฟีโนไทป์) โดยให้หมายเลขประจำกอข้าวจำนวน 248 กอ โดยแต่ละกอต้องมีต้นข้าวกออื่นขนาบข้างครบทั้งสี่ด้าน จากนั้นสังเกตช่อดอกแรกของข้าวกอนั้นๆ บาน 50 เปอร์เซ็นต์ นำมาคำนวณอายุวันออกดอกโดยนับตั้งแต่วันที่เพาะกล้าจนกระทั่งวันที่ช่อดอกแรกบานของข้าวกอนั้นบาน 50 เปอร์เซ็นต์เพื่อใช้เป็นข้อมูลฟีโนไทป์ (phenotype) ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับเครื่องหมายโมเลกุลอยู่ใกล้หรือยึดติดกับ QTLs ที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้นที่ใช้เป็นข้อมูลยีโนไทป์ (genotype)

4.2 การเก็บข้อมูลยีโนไทป์ โดยเก็บใบข้าวของต้น BC_5F_2 จำนวน 248 ต้น ที่ใช้ศึกษาข้อมูลฟีโนไทป์มาสกัดดีเอ็นเอ โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป genomic DNA purification kit ของบริษัท Fermentas จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยมีดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์รับพันธุ์ กข6 และพันธุ์ให้ BC_3F_5-1752(6) และดีเอ็นเอของข้าวแต่ละกอในประชากรที่ทำการศึกษาเป็นแม่พิมพ์ โดยในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย น้ำกลั่นปริมาตร 1.5 µl สารละลาย 2x Promega's PCR green master mix (ประกอบด้วย 400 µM dNTPs reaction buffer (pH 9) 3 mM $MgCl_2$ และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.1 units/µl) ปริมาตร 7.5 µl สารละลายไพรเมอร์ ชนิด forward และ reverse ของเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับ QTLs ที่ศึกษาจำนวน 11 ตำแหน่ง ที่ความเข้มข้น 5 µM ปริมาตร 2 µl และ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) ปริมาตร 2 µl รวมปริมาตรทั้งหมด เท่ากับ 15 µl เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่องพีซีอาร์รุ่น PCT-100 โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ในขั้นตอน predenaturing แล้วเริ่มต้นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในรอบที่ 1 ด้วยขั้นตอน denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที ทำปฏิกิริยาซ้ำอีกจำนวน 35 รอบ เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และระยะ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

10--[illegible].indd 92 10/3/2559 10:03:09

วิเคราะห์การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis) โดยอาศัยการเคลื่อนที่ผ่านวุ้นอะกาโรส (NuSieve ® 3:1 Agarose) ความเข้มข้น 4% ในสารละลาย TBE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นย้อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย SYBR ® Safe DNA gel stain บันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Doc 2000 (บริษัท BIO-RAD Laboratory) โดยใช้ซอฟท์แวร์ Quantity One (บริษัท BIO-RAD Laboratory)

โดยประชากร BC_5F_2 จะมีการกระจายตัวของยีนได้ยีโนไทป์ 3 แบบ คือ homozygous ของพันธุ์รับ (ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6) homozygous ของพันธุ์ให้ (ข้าวพันธุ์ Taichung 65) และ heterozygous ซึ่งตัวอย่างต้นข้าวที่มียีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์รับ ให้คะแนนเป็น 2 ต้นข้าวที่มียีโนไทป์แบบ homozygous ของพันธุ์ให้ ให้คะแนนเป็น 0 และต้นข้าวที่มียีโนไทป์แบบ heterozygous ให้คะแนนเป็น 1 เพื่อใช้เป็นข้อมูลของยีโนไทป์สำหรับการวิเคราะห์

การวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล (ข้อมูลยีโนไทป์) ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับ QTLs ที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกกับอายุวันออกดอก (ข้อมูลฟีโนไทป์) โดยนำข้อมูลฟีโนไทป์ และยีโนไทป์ของข้าวแต่ละต้นที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์ของสมการการถดถอย (regression coefficient, R^2) ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับ QTLs ที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกกับข้อมูลอายุวันออกดอกด้วยวิธี Single-Factor Analysis of Variance เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลว่าเครื่องหมายโมเลกุล (ข้อมูลยีโนไทป์) ที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับ QTLs แต่ละตำแหน่งนั้นมีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกสั้น (ข้อมูลฟีโนไทป์) หรือไม่ จากนั้นนำเครื่องหมายโมเลกุลที่วิเคราะห์โดยวิธี Single-Factor Analysis of Variance ซึ่งแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ มาวิเคราะห์ต่อด้วยสมการถดถอยหลายตำแหน่ง (multiple-locus regression) โดยวิธี multiple regression เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับ QTL แต่ละตำแหน่งนั้นเครื่องหมายใดมีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกสั้นมากที่สุด โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS) version 8 ในการวิเคราะห์

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการเก็บข้อมูลอายุวันออกดอก (ข้อมูลฟีโนไทป์) ในประชากร BC_5F_2 จำนวน 248 ต้น คำนวณอายุวันออกดอกตั้งแต่วันที่เพาะเมล็ดจนถึงวันที่ช่อดอกแรกบานครึ่งช่อ พบว่ามีอายุวันออกดอกอยู่ในช่วงระหว่าง 71 วัน ถึงไม่ออกดอก โดยมีค่าเฉลี่ยของต้นที่ออกดอกอยู่ที่ 100 วัน ส่วนค่าเฉลี่ยอายุวันออกดอกของข้าวไม่ไวต่อช่วงแสงพันธุ์ Taichung 65 และสายพันธุ์ข้าวเหนียว กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสง BC_3F_5-1752(6) เท่ากับ 88 และ 98 วันตามลำดับ ขณะที่ข้าวไวต่อช่วงแสงพันธุ์ กข6 ไม่ออกดอก (Figure 1) เมื่อนำข้อมูลฟีโนไทป์ของประชากรตัวอย่าง BC_5F_2 จำนวน 248 ต้นมาวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะอายุวันออกดอกด้วยโปรแกรม SAS พบว่าประชากร BC_5F_2 ของข้าวเหนียวสายพันธ์ กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสง มีการกระจายตัวแบบไม่ปกติ (non-normal distribution) (P<0.0001) มีค่า skewness ซึ่งอธิบายความเบ้ของกราฟเท่ากับ 0.762 โดยมีค่าเป็นบวกมากกราฟเบ้ขวา แสดงให้เห็นว่าประชากร BC_5F_2 ของข้าวเหนียวสายพันธ์ กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสงส่วนมากมีค่าอายุวันออกดอกน้อย และมีส่วนน้อยที่มีค่าอายุวันออกดอกมาก (Figure 2)

10--[illegible].indd 93 10/3/2559 10:03:09

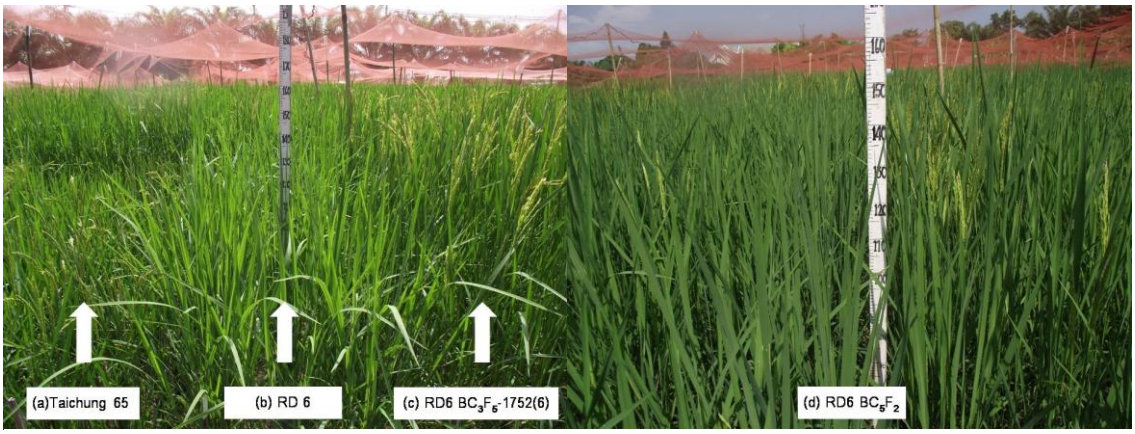

Figure 1 Shows the phenotype of photoperiod sensitivity in off-season 2012 (a) non-photoperiod sensitive rice variety Taichung 65 (b) photoperiod sensitive rice variety RD6 (c) non-photoperiod sensitive rice line RD6 BC_3F_5-1752(6) and (d) RD6 BC_5F_2 populations have segregation in terms of days to heading date.

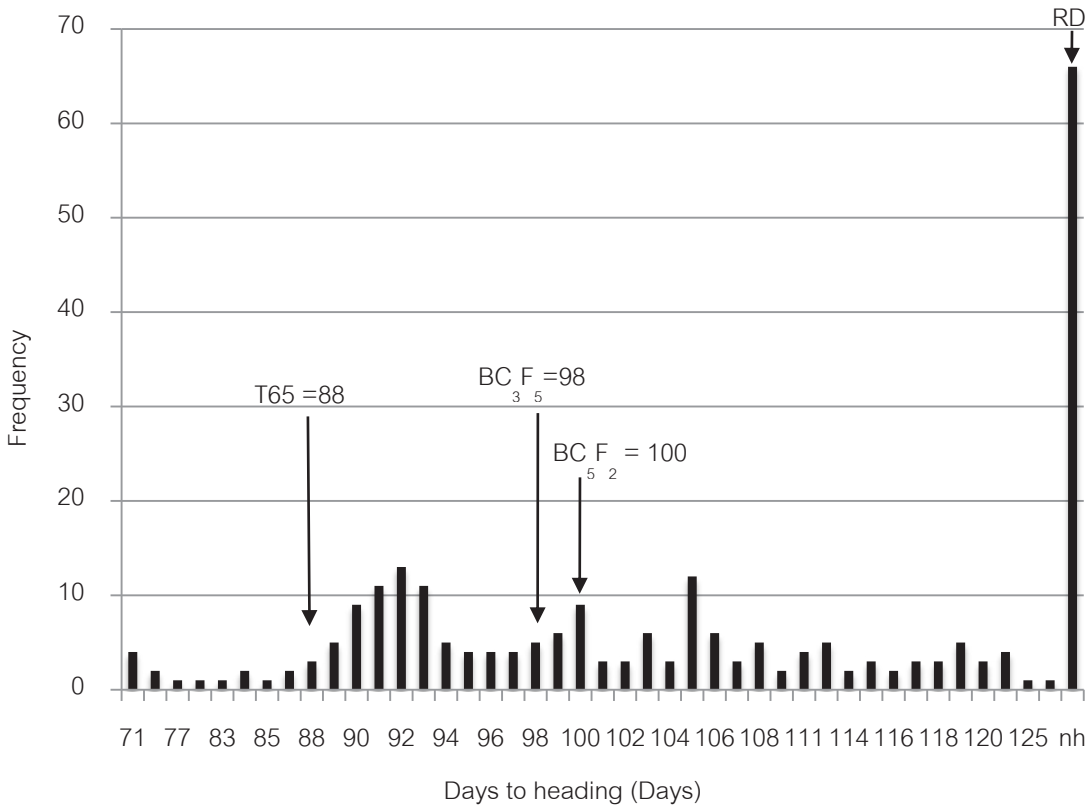

Figure 2 Frequency distributions of days to heading shows non-normal distribution in BC_5F_2 population and the parental lines, Taichung 65, RD6 BC_3F_5-1752(6) and RD6 in off-season 2012. Arrows are indicated mean value. (nh = no heading date after 170 days)

10--[illegible].indd 94 10/3/2559 10:03:10

เมื่อวิเคราะห์หาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับ QTLs ที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้นแต่ละเครื่องหมายกับอายุวันออกดอกในประชากรตัวอย่างของประชากรผสมกลับ BC_5F_2 ด้วยวิธี Single-Factor Analysis of Variance เพื่อวิเคราะห์ว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับ QTLs นั้นมีความสัมพันธ์กับอายุวันออกดอกหรือไม่ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS ผลการทดลองพบว่าทุกเครื่องหมายโมเลกุลมีความสัมพันธ์กับลักษณะอายุวันออกดอกสั้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) โดยเครื่องหมายโมเลกุล *er3* marker, RM507, *hd1* marker, RM5963, *se5* marker, RM136, RM505, RM234, RM18, *er2* marker และ *hd2* marker มีค่า R-square เท่ากับ 0.1429, 0.0661, 0.1150, 0.1097, 0.0645, 0.1094, 0.0379, 0.0442, 0.0409, 0.0513 และ 0.0730 ตามลำดับ (Table 1)

จากนั้นจึงวิเคราะห์หาค่าสมการการถดถอยหลายตำแหน่งด้วยวิธี multiple regression ของเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะอายุวันออกดอกสั้น ผลการทดลองพบเครื่องหมายโมเลกุล 3 ตำแหน่ง คือ เครื่องหมายโมเลกุล *er3* marker มีความสัมพันธ์กับลักษณะอายุวันออกดอกสั้นมากที่สุด โดยมีความสัมพันธ์กับลักษณะอายุวันออกดอกสั้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.0001$) และมีค่า partial R-square เท่ากับ 0.1410 รองลงมา คือ *hd1* marker และ *hd2* marker มีค่าน้อยสุด โดยมีค่า partial R-square เท่ากับ 0.0891 และ 0.0611 ตามลำดับ ($P<0.0001$) (Table 2) (Figure 3, 4 และ 5) สอดคล้องกับรายงานของ Yano *et al*. (2000) ที่ได้ทำการโคลนยีน *Hd1* ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 6 ซึ่งเป็น QTL หลักที่ควบคุมการตอบสนองต่อช่วงแสงของข้าว โดยพบว่าอัลลีล *Hd1* ของข้าวไวต่อช่วงแสง Nipponbare เป็น functional allele ยังยั้งการออกดอกของข้าวในสภาพวันยาว ส่วนอัลลีลของข้าวไม่ไวต่อช่วงแสงพันธุ์ Kasalath เป็น non-functional allele ทำให้ข้าวไม่ตอบสนองต่อช่วงแสง ส่วนอัลลีล *Hd1* ของข้าวพันธุ์ Taichung 65 พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของลำดับเบส อีก 1901 bp ใน เอกซอนที่ 2 ทำให้เกิดรหัสหยุด (premature stop codon) ทำให้อัลลีล *Hd1* ของข้าวพันธุ์ Taichung 65 สูญเสียการทำงาน จึงทำให้ข้าวพันธุ์ Taichung 65 ไม่ตอบสนองต่อช่วงแสง (Doi *et al*., 2004) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี molecular marker-asisted backcrossing เพื่อปลูกในฤดูนาปรัง โดยมีข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 เป็นพันธุ์รับ และข้าวเจ้าพันธุ์ Taichung 65 เป็นพันธุ์ให้ ของ วราภรณ์ และคณะ (2551) ที่ได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *Hd1/hd1* ในสภาพวันยาว พบว่า ต้น BC_4F_2 ที่ออกดอกได้ในสภาพวันยาวมียีโนไทป์เพียงแบบเดียว คือ hd1hd1

ส่วนเครื่องหมาย *hd2* marker ที่มีค่า partial R-square เท่ากับ 0.0611 เมื่อวิเคราะห์หาค่าสมการการถดถอยหลายตำแหน่งด้วยวิธี multiple regression นั้นสอดคล้องกับรายงานของ Fujino and Sekiguchi (2005) ที่ได้ทำการศึกษาผลของ QTLs 2 ตำแหน่งคือ qDTH-7-1 และ qDTH7-2 มีตำแหน่งอยู่บนส่วนปลายของแขนด้านยาวโครโมโซมที่ 7 ในประชากร F_2 และ BC_1F_1 ที่ได้จากการผสมระหว่าง ข้าวไม่ไวต่อช่วงแสงพันธุ์ Hoshinoyume กับข้าวไวต่อช่วงแสงพันธุ์ Nipponbare โดยพบว่า qDTH7-2 ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RM1306 มีผลทำให้ข้าวมีอายุวันออกดอกสั้นลง โดยต้น BC_1F_1 ที่มี ยีโนไทป์แบบ hd2hd2 ของอัลลีลข้าวพันธุ์ Hoshinoyume มีอายุวันออกดอกน้อยกว่าต้นที่มียีโนไทป์แบบ Hd2hd2 เฉลี่ยเท่ากับ 12.2 วัน และตำแหน่งของ qDTH7-2 เป็นตำแหน่งเดียวกันกับยีน *hd2* ซึ่งเป็น QTL ที่ทำให้อายุวันออกดอกของข้าวสั้นลง (Yano *et al*., 1997)

ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล *er3* marker แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะอายุวันออกดอกสั้นมากที่สุดโดยมีค่า partial R-square มากที่สุดเท่ากับ 0.1410 เมื่อวิเคราะห์หาค่าสมการการถดถอยหลายตำแหน่งด้วยวิธี multiple regression นั้นมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 5 ซึ่งจากการตรวจเอกสารยังไม่เคยมีรายงานว่าเป็น QTLs ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อช่วงแสง และอายุวันออกดอกของข้าวซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 5 มาก่อน (Yano *et al*., 2001) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าตำแหน่งดังกล่าวที่แสดงความสัมพันธ์กับเครื่องหมายโมเลกุล *er3* marker เป็น QTL ใหม่ที่ควบคุมลักษณะอายุวันออกดอกสั้นในข้าวที่ได้จากข้าวพันธุ์ Taichung 65

10--[illegible].indd 95 10/3/2559 10:03:10

Table 1 Shows single-factor analysis of variance, which analyze of each SSR marker with it's linkage gene related to early heading date in BC_5F_2 population of photoperiod-sensitive RD6 and photoperiod- insensitive Taichung 65 varieties in off-season 2012.

Chromosome No.	SSR marker	R-square	P-value
5	*er3* marker	0.1429	<.0001**
5	RM507	0.0661	<.0001**
6	*hd1* marker	0.1150	<.0001**
6	RM5963	0.1097	<.0001**
6	*se5* marker	0.0645	<.0001**
6	RM136	0.1094	<.0001**
7	RM505	0.0379	0.0021**
7	RM234	0.0442	0.0009**
7	RM18	0.0409	0.0014**
7	*er2* marker	0.0513	0.0003**
7	*hd2* marker	0.0730	<.0001**

** Highly significant

Table 2 Multiple regression analysis of each SSR marker with it's linkage gene related to early heading date in BC_5F_2 population of photoperiod-sensitive RD6 and photoperiod-insensitive Taichung 65 varieties in off-season 2012.

Chromosome No.	SSR marker	R-square	P-value
5	*er3* marker	0.1410	<.0001**
6	*hd1* marker	0.0891	<.0001**
7	*hd2* marker	0.0611	<.0001**

** Highly significant

10--[illegible].indd 96 10/3/2559 10:03:10

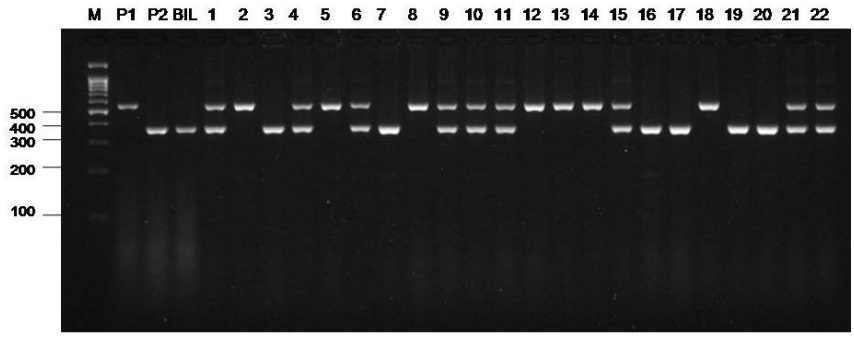

Figure 3 Profiles of *hd1* marker that linked to gene *hd1* on 3% agarose gel in BC_5F_2 population. M represents 100 bp ladder, P1 = RD6, P2 = Taichung 65, BIL= photoperiod-insensitive rice line RD6 BC_3F_5-1752(6), lane 1-22 are BC_5F_2 population of photoperiod-sensitive RD6 and photoperiod-insensitive Taichung 65 varieties.

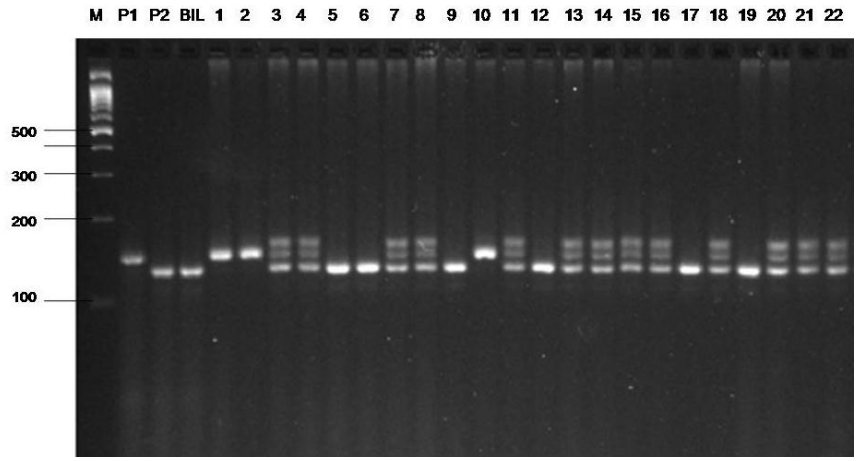

Figure 4 Profiles of *er3* marker that linked to QTL *er3* on 4% agarose gel in BC_5F_2 population. M represents 100 bp ladder, P1 = RD6, P2 = Taichung 65, BIL= photoperiod-insensitive rice line RD6 BC_3F_5-1752(6), lane 1-22 are BC_5F_2 population of photoperiod-sensitive RD6 and photoperiod-insensitive Taichung 65 varieties.

10--[illegible].indd 97 10/3/2559 10:03:10

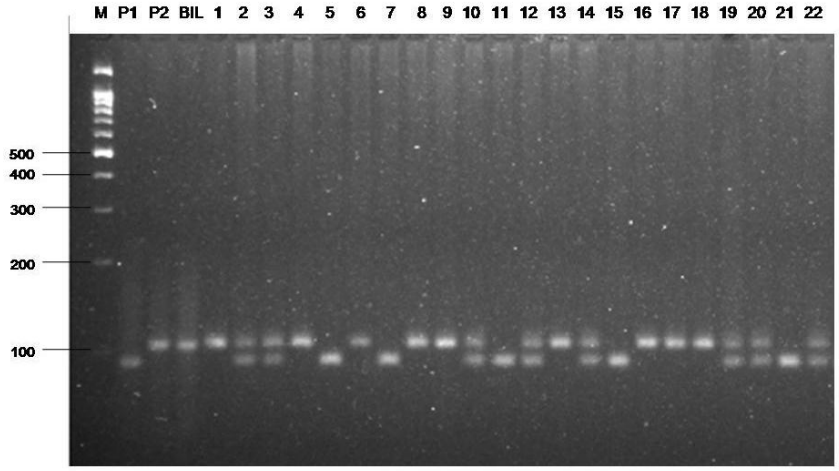

Figure 5 Profiles of *hd2* marker that linked to gene *hd2* on 4% agarose gel in BC_5F_2 population. M represents 100 bp ladder, P1 = RD6, P2 = Taichung 65, BIL= photoperiod-insensitive rice line RD6 BC_3F_5-1752(6), lane 1-22 are BC_5F_2 population of photoperiod-sensitive RD6 and photoperiod-insensitive Taichung 65 varieties.

สรุปผลการทดลอง

จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ด้วยวิธี Single-Factor Analysis of Variance พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 11 ตำแหน่ง (*er3* marker, RM507, *hd1* marker, RM5963, RM7434, RM136, RM505, RM234, RM18, RM248 และ *hd2* marker) มีความสัมพันธ์กับลักษณะอายุวันออกดอกสั้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) มีค่า R^2 อยู่ระหว่าง 0.0379 - 0.1429 และเมื่อทำการวิเคราะห์หาค่าสมการการถดถอยหลายตำแหน่งด้วยวิธี multiple regression ของเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะอายุวันออกดอกสั้นจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Single-Factor Analysis of Variance เพื่อหาว่าเครื่องหมายโมเลกุลใดมีความสัมพันธ์กับลักษณะอายุวันออกดอกสั้นมากที่สุด พบเครื่องหมายโมเลกุล 3 ตำแหน่ง คือ เครื่องหมายโมเลกุล *er3* marker มีความสัมพันธ์กับลักษณะอายุวันออกดอกสั้นมากที่สุด ($P<0.0001$) โดยมีค่า partial R-square เท่ากับ 0.1410 รองลงมาคือเครื่องหมายโมเลกุล *hd1* marker และ *hd2* marker ที่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะอายุวันออกดอกสั้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.0001$) มีค่า partial R-square เท่ากับ 0.0891 และ 0.0611 ตามลำดับ ดังนั้นสามารถใช้เครื่องหมายโมกุล *er3* marker *hd1* marker และ *hd2* marker มาช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวสายพันธุ์ กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสงให้มีอายุวันออกดอกสั้นที่เหมาะสม สามารถนำไปปลูกในพื้นที่ และฤดูกาลที่แตกต่างกันได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยการปรับปรุงพันธุ์ข้าวระดับโมเลกุล มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้อนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์และสารเคมีในการทำวิจัย และภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ที่อนุเคราะห์พื้นที่บริเวณฟาร์มวิจัย และพัฒนาการผลิตพืชไร่ เพื่อใช้ในการปลูก เก็บข้อมูลศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ของประชากรตัวอย่าง

10--[illegible].indd 98 10/3/2559 10:03:10

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2558.ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร. สืบค้นเมื่อ 15 กุมภาพันธ์ 2558. จากเวปไซต์: http://www.oaego.th/ewt_news.php?nid=13577.

วราภรณ์ แสงทอง วิลาวรรณ ศิริพูนวิวัฒน์ ประทีป พิณตานนท์ สมเกียรติ วัฒกวิกรานต์ นลินี รุ่งเรืองศรี อุทัย รุ่งเรืองศรี และ ศุภางค์ ทิพย์พิทักษ์. 2551. รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี molecular marker-assisted backcrossing เพื่อปลูกในฤดูนาปรัง. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 56 น.

วราภรณ์ แสงทอง ประทีป พิณตานนท์ พันนิพา ยาใจ พึ่งพร เนียมทรัพย์ และ ศุภางค์ ทิพย์พิทักษ์. 2555. รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการการศึกษาพันธุ์ขั้นต้น และการทดสอบผลผลิตเบื้องต้นของข้าวเหนียวสายพันธุ์ กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสง. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 177 น.

Doi, K., T. Izawa, T. Fuse, U. Yamanouchi, T. Kubo, Z. Shimatani, M. Yano and A. Yoshimura. 2004. Ehd1, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls FT-like gene expression independently of Hd1. Genes Dev. 18:926–936.

Fujino, K. and H. Sekiguchi. 2005. Mapping of QTLs conferring early heading date in rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet. 111:393–398.

Yano, M., Y. Harushima, Y. Nagamura, N. Kurata, Y. Minobe and T. Sasaki. 1997. Identification of quantitative trait loci controlling heading date in rice using a high-density linkage map. Theor Appl Genet. 95:1025–1032.

Yano, M., Y. Katayose, M. Ashikari, U. Yamanouchi, L. Monna, T. Fuse, T. Baba, K. Yamamoto, Y. Umehara, Y. Ngamura and T. Sasaki. 2000. Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene CONSTANS. Plant Cell. 12:2473–2484.

Yano, M., S. Kojima, Y. Takahashi, H.X. Lin and T. Sasaki. 2001. Genetic control of flowering time in rice, a short-day plant. Plant Physiol. 127:1425–1429.

10--[illegible].indd 99 10/3/2559 10:03:10