



การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีนแก้ความเป็นหมันของเกษตรกรผู้
ในข้าวไทย



กนกวรรณ จันทร์เพ็ญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีนแก่ความเป็นหมันของเกษตรกรผู้
ในข้าวไทย

กนกวรรณ จันทร์เพ็ญ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

กนกวรรณ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต)

วันที่ ๑๘ เดือน ๗.๓ พ.ศ. ๒๕๕๙

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

อรุณรัตน์ แสงทอง

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ แสงทอง)

วันที่ ๒๘ เดือน ๓.๑ พ.ศ. ๒๕๕๙

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ช่อทิพา สุกสิงหาโรจน์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สุกสิงหาโรจน์)

วันที่ ๒๘ เดือน ๓.๑ พ.ศ. ๒๕๕๙

ประธานอาจารย์ประจำหลักสูตร

กนกวรรณ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต)

วันที่ ๑๘ เดือน ๗.๓ พ.ศ. ๒๕๕๙

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ๒๘ เดือน ๓.๑ พ.ศ. ๒๕๕๙

ชื่อเรื่อง	การโคลนและศึกษาคุณสมบัติของยีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในข้าวไทย
ชื่อผู้เขียน	นางสาวกนกวรรณ จันทร์เพ็ญ
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต

บทคัดย่อ

ยีนแก้ความเป็นหมัน (fertility-restoring gene: *Rf*) ของเกสรตัวผู้ในระบบ WA (WA-CMS) ประกอบด้วยยีน 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่ง *Rf3* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 เป็นยีนของโปรตีนในไมโทคอนเดรีย และโปรตีนในละอองเกสร และตำแหน่ง *Rf4* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 10 เป็นยีนของโปรตีนกลุ่ม pentatricopeptide repeat (PPR) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาความแตกต่างของยีนแก้ความเป็นหมันตำแหน่ง *Rf3* และ *Rf4* จากข้าวสายพันธุ์ B และสายพันธุ์ R 6 พันธุ์ ด้วยการโคลนแล้วนำมาหาลำดับเบส ผลการศึกษาสามารถโคลนบางส่วนของยีนที่ตำแหน่ง *Rf3* ซึ่งเป็นรหัสของโปรตีน pollen-specific SF21 พบการขาดหายของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 29 ถึง 30 (GA) ในข้าวสายพันธุ์ R สำหรับยีนที่ตำแหน่ง *Rf4* สามารถโคลน ยีน *PPR7* และ *PPR10* โดยผลการเปรียบเทียบลำดับเบสสามารถแยกกลุ่มยีน *PPR7* ด้วยการขาดหายและการเพิ่มขึ้นของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 71 และตำแหน่ง 146 ถึง 154 ตามลำดับ ส่วนยีน *PPR10* พบลำดับเบสเปลี่ยนที่ตำแหน่ง 1,392 ทำให้เปลี่ยนโคดอนเป็นรหัสหยุดในข้าวสายพันธุ์ R โดยโปรตีน PPR10 ของข้าวสายพันธุ์ R มีขนาด 454 กรดอะมิโน แต่ในข้าวพันธุ์อื่นมีขนาด 569 กรดอะมิโน จากการศึกษาการติดสีย้อมของละอองเกสรลูกรุ่นที่ 1 ของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กับสายพันธุ์ A และของข้าวพันธุ์ กข47 กับสายพันธุ์ A พบเปอร์เซ็นต์การติดสีย้อมของละอองเกสรมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ข้าวทั้งสองพันธุ์จึงจัดเป็นสายพันธุ์ R และเมื่อเปรียบเทียบกับยีนที่นำมาศึกษาทั้ง 3 ยีน (*pollen-specific SF21*, *PPR7* และ *PPR9*) พบความแตกต่างในยีน *PPR7* โดยลำดับเบสของข้าวพันธุ์ กข47 เหมือนกับยีนที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ R แต่ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 จะเหมือนกับสายพันธุ์ A ความแตกต่างของยีนทั้งสามที่นำมาศึกษาจะสามารนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ต่อไป

คำสำคัญ: ข้าวไทย, การโคลน, ยีนแก้ความเป็นหมัน, ตำแหน่ง *Rf3*, ตำแหน่ง *Rf4*

Title	Cloning and Characterization of Fertility-Restoring Gene (<i>Rf</i>) from Thai Rice Varieties
Author	Miss Kanokwan Janphen
Degree of	Master of Science in Genetics
Advisory Committee Chairperson	Assistant Professor Dr. Saengtong Pongjaroenkit

ABSTRACT

Wild abortive cytoplasmic male sterility (WA-CMS) system is controlled by two major fertility-restorer loci, *Rf3* and *Rf4* which are on chromosome 1 and 10, respectively. *Rf3* locus consists of mitochondria-processing genes and pollen-specific genes whereas *Rf4* locus contains pentatricopeptide repeat (PPR) – encoding genes. In this study, the genes of two *Rf* loci from six rice varieties (B lines and R lines) were cloned and sequenced. The partial sequence of pollen-specific protein SF21 gene from *Rf3* locus was cloned. Sequence comparison of this gene revealed 2-bp deletion (GA) at position 29 in R lines. For *Rf4* locus, *PPR7* and *PPR10* genes were cloned, sequenced and compared. The *PPR7* genes could be divided based on nucleotide deletion and insertion at position 71 and 9-bp insertion at position 146. Comparison of *PPR10* genes showed single nucleotide polymorphism (SNP) at position 1,392, leading to premature stop codon in R lines. *PPR10* proteins of R lines and B lines were 454 and 569 amino acids, respectively. Pollen grain viability assay with I₂-KI revealed that the percentage of fertile pollens of F1 (RD47 X A line and Chainat 1 X A line) was more than 90. Therefore, both RD47 and Chainat1 varieties could be classified into R lines. However, the sequence comparison of three genes (*pollen-specific SF21* gene, *PPR7* gene, and *PPR10* gene) among three varieties, RD47, Chainat 1 and A lines, showed only the nucleotide change in the *PPR7* gene. Based on the difference of *PPR7* genes, RD47 and Chainat 1 could be classified into R line and B line, respectively. Thus, sequence diversity of these three genes from this study could be further developed as molecular markers for hybrid rice breeding programs.

Keywords: Thai rice, Cloning, Fertility-restoring genes, *Rf3* locus, *Rf4* locus

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นผลงานที่ผู้วิจัยได้ทุ่มเทสติปัญญา ความตั้งใจ ความมุ่งมั่นและกำลังกาย จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยได้รับความช่วยเหลือและความเมตตาจากอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิต ในการให้คำปรึกษาและแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นตลอด งานวิจัย รวมถึงอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภรณ์ แสงทอง ที่ให้คำแนะนำในการปลูกและการผสมพันธุ์ข้าว และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ช่อทิพา สกุศลสิงหาโรจน์ ที่ความให้ความช่วยเหลือในเรื่องพื้นที่สำหรับปลูกข้าวทดสอบและคำแนะนำที่ดีเสมอมา งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไป ได้ด้วยดี จึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างยิ่ง

และที่สำคัญงานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการทำวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2558 ประเภทบัณฑิตศึกษา ให้กับนางสาวกนกวรรณ จันทร์เพ็ญ ข้าพเจ้าจึงใคร่ ขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ช่วยสนับสนุนงบประมาณในการศึกษาวิจัยนี้ ให้ประสบผลสำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณ บิดาและมารดา ที่ให้การเลี้ยงดู อบรมสั่งสอน ให้คำปรึกษาและคอย เป็นกำลังใจที่ดี คอยสนับสนุนทั้งในด้านการเรียนและการดำรงชีวิต รวมไปถึงพี่ๆ และน้องๆ นักศึกษา ในห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์โมเลกุล ที่คอยให้กำลังใจและช่วยเหลือตลอดการทำวิจัยนี้

กนกวรรณ จันทร์เพ็ญ

ตุลาคม 2559

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญ	(6)
สารบัญตาราง	(8)
สารบัญภาพ	(9)
บทที่ 1 บทนำ	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	5
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว	5
การจำแนกชนิดของข้าว	7
ลูกผสม	8
การเป็นหมันของเกสรตัวผู้	13
ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้กับการนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตเมล็ดพันธุ์	24
ลูกผสม	24
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	25
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	31
ตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง	31
วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	31
วิธีการวิจัย	34
สถานที่และระยะเวลาในการวิจัย	50
บทที่ 4 ผลการวิจัย	51
การออกแบบโปรแกรมที่จำเพาะต่อยีนแก้ความเป็นหมันในระบบ WA-CMS	51
การสกัดดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษา	57

	หน้า
การทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแก่ความเป็นหมัน	58
ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นยีนที่เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR	61
การโคลนยีนเพื่อศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสของยีน PPR7 และ PPR10	64
การอ่านและวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนแก่ความเป็นหมันในระบบ WA-CMS	66
การศึกษาความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ด้วยสารละลายไอโอดีนโปแทสเซียมไอโอไดน์ (I ₂ -KI)	83
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการวิจัย	86
การวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากยีนแก่ความเป็นหมันในระบบ WA-CMS	86
การเปรียบเทียบระหว่างลำดับเบสกับการศึกษาความมีชีวิตของเกสรตัวผู้และการติดเมล็ด	89
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	91
ข้อเสนอแนะ	92
บรรณานุกรม	93
ภาคผนวก	98
ภาคผนวก ก ลำดับเบสจากฐานข้อมูลที่นำมาออกแบบไพรเมอร์	99
ภาคผนวก ข ประวัติผู้วิจัย	113

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวปลูก <i>O. sativa</i>	8
2	ยีนแก้ความเป็นหมัน <i>Rf</i> ของข้าวและการแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีรายงานในฐานข้อมูล	23
3	ข้อมูลของยีน <i>PPR7</i> , <i>PPR9</i> และ <i>PPR10</i> ที่ได้จากฐานข้อมูล	34
4	ผลการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนแก้ความเป็นหมันของเกษตรกรผู้ในระบบ WA-CMS	56
5	ผลการคัดเลือกโคลนที่ได้รับยีน <i>PPR7</i> เพื่อการวิเคราะห์ลำดับเบส	65
6	ผลการคัดเลือกโคลนที่ได้รับยีน <i>PPR10</i> เพื่อการวิเคราะห์ลำดับเบส	66
7	การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนแก้ความเป็นหมันในระบบ WA-CMS	80
8	เปอร์เซ็นต์การติดสียอมโดยใช้สารละลาย I_2 -KI	84
9	แสดงจำนวนการติดเมล็ดต่อรวงในต้นลูกรุ่นที่ 1	85

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว	7
2	ขั้นตอนการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสมรุ่นที่ 1	11
3	ระบบ cytoplasmic genetic male sterility (CMS) แบบ WA-CMS ในข้าว	17
4	แสดงจีโนมของไมโทคอนเดรียของข้าว	18
5	แผนที่ของดีเอ็นเอพาหะ pBluescript SK ⁺	41
6	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 กับลำดับเบสจาก ฐานข้อมูล	51
7	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน <i>PPR7</i> จากฐานข้อมูลที่ใช้ในการออกแบบไพร เมอร์	53
8	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน <i>PPR9</i> จากฐานข้อมูลที่ใช้ในการออกแบบไพร เมอร์	54
9	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน <i>PPR10</i> จากฐานข้อมูลที่ใช้ในการออกแบบ ไพรเมอร์	55
10	ผลการทำอะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟเรซิสของดีเอ็นเอที่สกัดได้	57
11	ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 ด้วยเทคนิค PCR ที่ อุณหภูมิ 50 และ 55 องศาเซลเซียส	58
12	ผลการเพิ่มจำนวนยีน <i>PPR7</i> , <i>PPR9</i> และ <i>PPR10</i> ด้วยเทคนิค PCR ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส	59
13	ผลการเพิ่มจำนวนยีน <i>PPR7</i> , <i>PPR9</i> และ <i>PPR10</i> ด้วยเทคนิค PCR ที่อุณหภูมิ 55, 58 และ 60 องศาเซลเซียส	60
14	ผลการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ DRCG-RF3-13	61
15	ผลการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ <i>PPR7</i> , <i>PPR9</i> และ <i>PPR10</i>	62
16	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ DRCG-RF3-13	67
17	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน <i>PPR7</i>	71
18	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน <i>PPR7</i>	72
19	ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน <i>PPR10</i>	76

ภาพที่		หน้า
20	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PPR10	77
21	ลักษณะของดอกของข้าวพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษา เปอร์เซ็นต์การติดสีส้มโดยใช้สารละลายไอโอดีนโปแทสเซียมไอโอไดน์ (I ₂ -KI)	83



บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ข้าว จัดเป็นพืชอาหารหลักของประชากรในประเทศไทยและในแถบอาเซียน โดยข้าวได้จัดเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศ ที่ทำรายได้หลักให้กับประเทศตั้งแต่อดีตมาจนถึงปัจจุบัน หากดูจากพื้นที่ในการเพาะปลูกข้าวมากกว่าร้อยละ 50 ของพื้นที่ทางการเกษตรทั้งหมด และเมื่อเทียบการส่งออกข้าวในช่วงปี 2531-2551 พบว่ามีการส่งออกข้าวเพิ่มขึ้นจากเดิมถึงร้อยละ 193 ในขณะเดียวกันแม้ประเทศไทยจะเป็นประเทศที่มีการผลิตและการส่งออกข้าวเป็นอันดับ 1 ของโลก แต่เมื่อมองดูประเทศในกลุ่มอาเซียนด้วยกันแล้วยังมีอีกหลายประเทศที่เป็นคู่แข่งและคู่ค้าข้าวของไทย คือ พม่า เวียดนาม ลาว อินโดนีเซีย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์และกัมพูชา (การปรับตัวกลยุทธ์รับ AEC, 2555)

หากทำการเปรียบเทียบตลาดข้าวในช่วงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2553 พบว่า ทั่วโลกมีการผลิตและบริโภคข้าวประมาณ 430 ล้านตันต่อปี ประเทศจีนจัดเป็นประเทศที่มีการผลิตข้าวได้เป็นอันดับ 1 (ประมาณ 130 ล้านตันต่อปี) อันดับ 2 คือประเทศอินเดีย (ประมาณ 80-90 ล้านตันต่อปี) และประเทศไทยจัดอยู่ในอันดับ 6 ซึ่งมีการผลิตข้าวอยู่ที่ประมาณ 19 ล้านตันต่อปี แต่ยังคงเป็นประเทศที่มีการส่งออกเป็นอันดับหนึ่ง โดยในปัจจุบันประเทศในกลุ่มอาเซียนที่มีบทบาทสำคัญอีกประเทศหนึ่งคือประเทศเวียดนาม ที่สามารถผลิตข้าวได้มากกว่าประเทศไทยอยู่ที่ประมาณ 24 ล้านตันต่อปี และมีการส่งออกเป็นอันดับสองรองจากไทย (บทความและบทวิเคราะห์ AEC, 2555) โดยจากการศึกษาพบว่าปัญหาหนึ่งของประเทศไทยที่สำคัญคือ ผลผลิตต่อไร่มีจำนวนที่ต่ำเมื่อเทียบกับประเทศอื่นในกลุ่มอาเซียน จึงมีผลต่อความสามารถในการผลิตที่จำกัด ทำให้ในปัจจุบันได้มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับเรื่องของการเพาะปลูกข้าวพันธุ์ลูกผสมมากขึ้น โดยเห็นได้จากประเทศจีน และประเทศเวียดนาม ที่มีการเพาะปลูกข้าวลูกผสม (ดวงพร, ม.ป.ป.) และจากรายสถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2555-2556 ของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2557) แสดงให้เห็นว่าทั้งสองประเทศนั้นได้มี

จำนวนผลผลิตข้าวต่อไร่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก คือ ประเทศจีน 1,085 กิโลกรัมต่อไร่ และประเทศเวียดนาม 902 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อเทียบกับประเทศไทยที่สามารถผลิตได้เพียง 509 กิโลกรัมต่อไร่

การพัฒนาพันธุ์ข้าวที่ให้ผลผลิตสูงตามความต้องการของผู้บริโภค คือ การใช้เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์ข้าวลูกผสม โดยพบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตได้สูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ (Chen et al., 2010 อ้างใน ขนิษฐา และคณะ, 2012) ในประเทศจีนใช้เทคโนโลยีการผลิตข้าวลูกผสมระบบการเป็นหมันของเกสรตัวผู้ควบคุมด้วยยีนในไซโทพลาซึม (cytoplasmic genetic male sterility; CMS male sterility) โดยมีสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้อง คือ สายพันธุ์ละอองเกสรตัวผู้เป็นหมัน (male sterile line; A line) ที่เรียกว่าสายพันธุ์ A สายพันธุ์รักษาความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ (maintainer line; B line) ที่เรียกว่าสายพันธุ์ B และสายพันธุ์แก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ (restorer line; R line) ที่เรียกว่าสายพันธุ์ R (ดวงพร และคณะ, ม.ป.ป.) ซึ่งหากต้องการจะพัฒนาพันธุ์ข้าวไทยให้สามารถใช้เทคนิคข้าวลูกผสม จะต้องมีการจำแนกกลุ่มข้าวไทยว่าเป็นสายพันธุ์ B หรือสายพันธุ์ R โดยข้าวไทยพันธุ์ดีที่เป็นสายพันธุ์ B นั้นจะสามารถนำไปผสมกับข้าวสายพันธุ์ A จำนวน 6-9 ชั่ว ก็จะได้ข้าวไทยสายพันธุ์ A และสายพันธุ์ B

สายพันธุ์ข้าวที่ใช้ในประเทศไทยเป็นสายพันธุ์แท้ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี ซึ่งมีอยู่จำนวนมาก หากต้องการพัฒนาข้าวไทยให้เป็นข้าวลูกผสมนั้น จะต้องจำแนกกลุ่มข้าวไทยว่าเป็นกลุ่มสายพันธุ์ A สายพันธุ์ B หรือสายพันธุ์ R ซึ่งสามารถจำแนก โดยวิธีการย้อมสีเกสรตัวผู้ด้วยสารละลายไอโอดีนโปแทสเซียมไอโอไดน์ (I_2-KI) หากเป็นเกสรตัวผู้ที่ปกติจะติดสีเข้ม แต่หากเป็นเกสรตัวผู้ที่เป็นหมันจะไม่ติดสี จัดได้เป็นสายพันธุ์ B และสายพันธุ์ A ตามลำดับ สำหรับสายพันธุ์ R นั้น จะต้องนำไปผสมกับสายพันธุ์ A จากนั้นตรวจสอบการติดสีของเกสรตัวผู้โดยใช้สารละลาย I_2-KI ของละอองเกสรตัวผู้ของลูกผสมที่ได้ หากละอองเกสรตัวผู้ติดสีเข้ม แสดงว่าสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบนั้นเป็นสายพันธุ์ R หากละอองเกสรตัวผู้ไม่ติดสี แสดงว่าเป็นสายพันธุ์ B ซึ่งวิธีนี้ต้องทำการปลูก ผสม จนถึงระยะเวลาของการออกดอก จึงสามารถทำการตรวจสอบได้ โดยสายพันธุ์ B และสายพันธุ์ R นั้นจะมีความแตกต่างที่ยีนควบคุมการแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ (male sterile restorer : Rf/rf) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ภายในนิวเคลียส หากเป็นสายพันธุ์ R จะมีจีโนไทป์ $RfRf$ หรือ Rf/rf (ลักษณะเด่น) หากเป็นสายพันธุ์ B จะมีจีโนไทป์ rf/rf (ลักษณะด้อย) ดังนั้นข้อมูลของยีน Rf/rf สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มข้าวได้ จึงมีแนวคิดศึกษาหา ยีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ (Rf/rf) ในข้าวไทย และหาความแตกต่างของยีนดังกล่าว เพื่อนำมาใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มของข้าวไทยต่อไป

Jing et al. (2001) ทำการวิจัยเกี่ยวกับการสร้างแผนที่ยีนที่ควบคุมการแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในข้าว (WA cytoplasmic male sterility) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด simple sequence length polymorphism (SSLP) พบว่าตำแหน่ง *Rf4* อยู่ที่บริเวณเครื่องหมาย RM171 (OSR33) และ RM228 ที่อยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมที่ 10 ที่ตำแหน่ง 3.7 และ 3.4 cM ตามลำดับ และพบยีนอีก 2 ยีน คือ *Rf1* และ *Rf5(t)* ที่อยู่ในกลุ่มของยีนควบคุมการแก้ความเป็นหมันบนโครโมโซมแท่งเดียวกัน และได้มีการใช้เทคนิค single segment substitution line (SSSP) พบว่าสาย W23-19-06-06-11 ที่มีชิ้นส่วนของตำแหน่ง *Rf4* และ *Rf3* มีความสามารถในการแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในข้าวได้ (Cai et al., 2013) รวมไปถึงการศึกษายีนที่ตำแหน่ง *Rf3* และ *Rf4* ในข้าวสายพันธุ์ A และสายพันธุ์ B ของ Suresh et al. (2012) พบว่ายีนที่ตำแหน่ง *Rf3* ซึ่งเป็นรหัสของโปรตีน pollen-specific protein นั้นมีการขาดหายไปของดีเอ็นเอจำนวน 2-3 คู่เบส ในสายพันธุ์ R และยีนที่ตำแหน่ง *Rf4* ซึ่งเป็นรหัสของโปรตีน PPR repeat มีการขาดหายไปของดีเอ็นเอจำนวน 327 และ 106 คู่เบส ในข้าวสายพันธุ์ R

ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการโคลนยีนที่ตำแหน่ง *Rf3* และ *Rf4* ซึ่งเป็นยีนควบคุมการแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในข้าวไทย จากนั้นจำแนกกลุ่มของยีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ ด้วยการศึกษาความหลากหลายของลำดับเบสของแต่ละยีน เปรียบเทียบการจัดจำแนกความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ด้วยการย้อมละอองเกสรตัวผู้ของลูกผสมระหว่างสายพันธุ์ไทยกับสายพันธุ์ A ด้วยสารละลาย I₂-KI โดยผลการวิจัยที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุล เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไทยให้เป็นข้าวลูกผสมต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อโคลนยีนที่คาดว่าจะจะเป็นยีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้อันเนื่องมาจากยีนในไซโทพลาซึม (WA cytoplasmic male sterility) ได้แก่ ยีนที่ตำแหน่ง *Rf3* และ *Rf4* จากข้าวไทย
2. เพื่อศึกษาความหลากหลายของยีนที่ตำแหน่ง *Rf3* และยีน *Rf4* ของข้าวไทยที่ได้
3. ทำการเปรียบเทียบผลการศึกษาข้อมูลที่ได้จากการศึกษาความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ของลูกผสมที่ได้จากสายพันธุ์ไทยกับสายพันธุ์ A ที่ได้จากการย้อมสีด้วยสารละลาย I_2-KI กับลำดับเบสของยีนที่ตำแหน่ง *Rf3* และ *Rf4* ของข้าวไทยที่ได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ยีนที่ตำแหน่ง *Rf3* และ *Rf4* ที่มีความเกี่ยวข้องกับการแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในข้าว สามารถนำไปใช้ในการศึกษาการถ่ายทอดยีนดังกล่าว
2. ลำดับเบสของยีนที่ตำแหน่ง *Rf3* และ *Rf4* ที่ทำการศึกษาเพื่อดูความหลากหลายและจัดกลุ่มตามลักษณะความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ สามารถนำไปใช้ในการเป็นเครื่องหมายโมเลกุล

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ข้าว (rice : *Oryza sativa* L.) จัดเป็นธัญพืชที่เป็นแหล่งของสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต แหล่งผลิตที่สำคัญอยู่ในแถบเอเชียและหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก นอกจากนี้ยังพบว่ามีการปลูกข้าวที่บริเวณประเทศอเมริกา ออสเตรเลีย และประเทศอื่นๆ เนื่องจากเป็นพืชที่สามารถทำการปลูกได้ทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ตั้งแต่ระดับน้ำทะเลถึงระดับความสูง 2,000 เมตร (เรวัต, 2541)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว

1. ราก ระบบรากเป็นแบบรากฝอย (fibrous root system) โดยจะมีการเจริญของราก 2 ส่วน คือ รากที่เจริญมาจากส่วนของคัพภะ (embryo) และรากที่เจริญมาจากส่วนข้อของลำต้น ซึ่งการเจริญของรากข้าวนั้นจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับวิธีการปลูก รวมไปถึงสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันก็ส่งผลให้การเจริญของรากอาจแตกต่างกัน (เรวัต, 2541)

2. ลำต้น (haulm หรือ culm) ประกอบด้วยข้อ (node) และปล้อง (internode) โดยลำต้นจะมีความสูงอยู่ที่ประมาณ 30-40 เซนติเมตรในพันธุ์เตี้ย และสูงมากกว่า 7 เมตรในข้าวพันธุ์ขึ้นน้ำ สำหรับพันธุ์ข้าวที่ปลูกเป็นการค้าจะมีความสูงประมาณ 1-2 เมตร และข้าวมีการแตกกอมาก จำนวนของหน่อที่เกิดขึ้นอยู่กับพันธุ์ ระยะปลูก การให้ปุ๋ย และสภาพแวดล้อม จะมีจำนวนอยู่ที่ประมาณ 4-80 หน่อ ดังภาพที่ 1 ก (เรวัต, 2541)

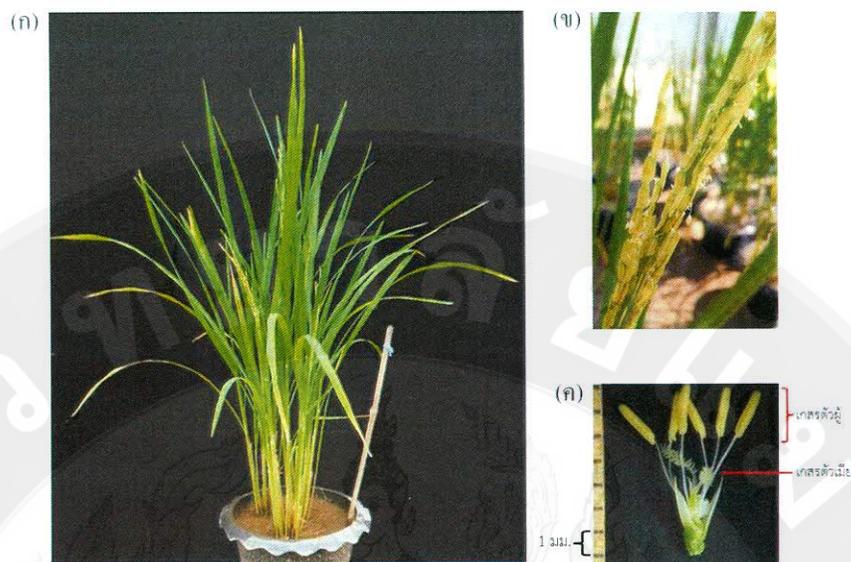
3. ใบ ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก คือ กาบใบ (leaf sheath) และแผ่นใบ (leaf blade) ความยาวของกาบใบข้าวจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับตำแหน่งของข้อบนลำต้น รวมไปถึงแผ่นใบนั้นก็จะมี ความกว้างที่แตกต่างกันของแต่ละพันธุ์ข้าว (เรวัต, 2541)

4. ช่อดอกและดอก ช่อดอกเป็นแบบช่อดอกแยกแขนง (panicle) ที่มีการเจริญมาจากตา ยอด (terminal bud) โดยมีปล้องสุดท้ายของลำต้น (uppermost internode) เป็นก้านช่อดอก (peduncle) แกนกลางช่อดอกเรียกว่า rachis หรือ panicle axis มีการแตกกิ่งก้านจากส่วนของ แกนกลางช่อดอก (rachis) โดยกิ่งก้านที่แตกจากแกนกลางช่อดอก (rachis) เรียกว่า ก้านช่อดอกปฐมภูมิ (primary branch) และกิ่งก้านที่แตกจากส่วนของก้านช่อดอกปฐมภูมิ (primary branch) เรียกว่า ก้านช่อดอกทุติยภูมิ (secondary branch) ดังภาพที่ 1 ข และ ค (เรวัต, 2541)

ดอกข้าวเกิดเป็นกลุ่มเรียกว่า กลุ่มดอกย่อย (spikelet) มีส่วนประกอบดังนี้ กลีบดอกที่หุ้มกลุ่มดอกย่อยมี 2 กลีบ ได้แก่ กลีบด้านนอก (outer glume) และกลีบด้านใน (inner glume) กลีบทั้งสองนี้ไม่มีการเจริญปรากฏเป็นเพียงส่วนเล็ก ๆ ซึ่งมองเห็นไม่ชัดเจน (rudimentary glume) อยู่ตรงปลายสุดของก้านดอก (pedicel) ภายในดอกประกอบด้วยดอกย่อย (floret) จำนวน 3 ดอก แต่มีดอกย่อยเพียงดอกเดียวที่มีการเจริญ เรียกว่า flowering glume ส่วนดอกย่อยที่ไม่เจริญ 2 ดอกนั้นเหลือเฉพาะส่วนกลีบดอกนอก (lemma) ที่เรียกว่า sterile lemma หรือ non-flowering glume หรือ empty glume จำนวน 2 กลีบ ที่มีความยาวไม่เกิน 1 ใน 3 ของดอกย่อยที่มีการเจริญ (flowering glume) กลีบทั้งสองนี้ยังคงปรากฏให้เห็นอยู่พื้นฐานของเมล็ด เมื่อเมล็ดแก่แล้ว (เรวัต, 2541)

ดอกย่อยที่มีการเจริญประกอบด้วยกลีบดอกย่อยด้านนอก (lemma) ที่มีเส้นตามความยาว 5 เส้น และกลีบดอกย่อยด้านใน (palea) ที่มีเส้นตามความยาว 3 เส้น ภายในดอกย่อยประกอบด้วยเกสรตัวผู้ (stamen) จำนวน 6 อัน เกสรตัวเมีย (pistil) ประกอบด้วยรังไข่ (ovary) ที่มี 1 ออวูล (ovule) มีก้านชูเกสรตัวเมีย (style) สั้น และยอดเกสรตัวเมีย (stigma) แยกเป็น 2 แฉก มีลักษณะคล้ายขนนกเรียกว่า plumose stigma เยื่อรองรับไข่ (lodicule) มี 2 อัน ขนาดเล็ก ใส อยู่ในส่วนฐานของรังไข่ ดังภาพที่ 1 ค (เรวัต, 2541)

5. ผลหรือเมล็ด เป็นแบบผลแห้งเมล็ดติดหรือผลแบบธัญพืช (caryopsis) ประกอบด้วยเยื่อหุ้มผล (pericarp) ติดอยู่กับส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat หรือ testa) มีเปลือกหุ้มเรียกว่า hull ซึ่งประกอบด้วยส่วนของกลีบดอกย่อยด้านนอกและกลีบดอกย่อยด้านใน (เรวัต, 2541)



ภาพที่ 1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าว (ก) ลักษณะของลำต้น การแตกกอ และใบข้าว (ข) ลักษณะของช่อดอกและดอก (ค) ลักษณะเกสรตัวเมียและเกสรตัวผู้

การจำแนกชนิดของข้าว

ข้าวเป็นพืชจัดอยู่ในตระกูล (tribe) *Oryzae* ซึ่งมีลักษณะเด่นของพืชในตระกูล (tribe) นี้คือ (เรวัต, 2541)

1. ดอกเกิดเป็นกลุ่ม (spikelet) แต่มีดอกย่อยเพียง 1 ดอกเท่านั้นที่มีการพัฒนา ในแต่ละกลุ่มดอกของข้าวจึงมีดอกที่ติดเมล็ดเพียง 1 ดอก จึงอาจเรียกกลุ่มดอกของข้าวว่าเป็นดอกหรือดอกย่อยก็ได้
2. ดอกมีลักษณะแบน ที่ฐานของดอกมีส่วนของกลีบดอกย่อยที่ไม่สมบูรณ์ติดอยู่ 2 อัน
3. เกสรตัวผู้มีจำนวน 6 อัน

พืชในสกุล *Oryza* ประกอบด้วยพืชหลายชนิด (species) แต่เท่าที่ยอมรับมีอยู่ 2 ชนิด แบ่งได้เป็น 2 พวก คือ ข้าวปลูก 2 ชนิด และข้าวป่า 20 ชนิด (Organisation for Economic Co-operation and Development; OECD, 2006) ได้แก่

1. ข้าวปลูก (cultivated rice) ประกอบด้วย *Oryza sativa* ซึ่งมีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก และ *Oryza glaberrima* ซึ่งเป็นข้าวที่มีการปลูกเฉพาะในแถบตะวันตกของทวีปแอฟริกา เท่านั้น ทั้งสองชนิดมีลักษณะที่แตกต่างกัน คือ ช่อดอกของ *O. glaberrima* ไม่มีก้านแขนงที่สอง มี

ลีนใบสั้น และไม่มีขนที่กลีบดอกนอก (lemma) และกลีบดอกย่อยด้านใน (palea) โดยในข้าวปลูกมีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด (diploid) $2n = 24$ (OECD, 2006 และ เรวัต, 2541)

ข้าวปลูกในกลุ่ม *O. sativa* แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดย่อย (sub-species) ได้แก่ *indica*, *japonica* และ *javanica* โดยแต่ละชนิดย่อยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวปลูก *O. sativa*

ลักษณะ	<i>indica</i>	<i>japonica</i>	<i>javanica</i>
ใบ	กว้าง สีเขียวอ่อน	แคบ สีเขียวแก่	กว้าง สีเขียวอ่อน
เมล็ด	ยาว ค่อนข้างแบน	สั้น กลม	กว้าง หนา
การแตกกอ	มาก	ปานกลาง	น้อย
ต้น	สูง อ่อน	เตี้ย แข็ง	สูง แข็ง
หางของเมล็ด	สั้นมาก	สั้นมาก-ยาว	สั้นมาก-ยาว
ขนของข้าวเปลือก	สั้น	มากและยาว	ยาว
การร่วงของเมล็ด	ง่าย	ยาก	ยาก

ที่มา: เรวัต (2541)

2. ข้าวป่า (wild rice) มีลักษณะเป็นวัชพืช เมล็ดมีขนาดเล็ก ร่วงง่าย และมีหาง (awn) ในประเทศไทยพบอยู่ 5 ชนิด ได้แก่ *O. perennis*, *O. fatua*, *O. officinalis*, *O. granulata* และ *O. ridleyi* (เรวัต, 2541) ในข้าวป่ามีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด (diploid) $2n = 24$ จำนวน 8 ชนิด และจำนวนโครโมโซม 4 ชุด (tetraploid) $4n = 48$ จำนวน 11 ชนิด และพบว่าในข้าวป่าชนิด *O. punctata* นั้นจะมีจำนวนโครโมโซมทั้งสองแบบ (OECD, 2006)

ลูกผสม

พันธุ์ลูกผสม (hybrid variety) หมายถึง ลูกผสมรุ่นแรกที่เกิดจากการควบคุมการผสมเกสรของพ่อแม่พันธุ์ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม และสามารถผลิตลูกผสมใหม่อีกครั้งให้เหมือนเดิมได้ ซึ่งพ่อแม่อาจเป็นพันธุ์แท้ (inbred line, pure line หรือ clone) หรือประชากรของพืช โดยชนิดของลูกผสมมีดังต่อไปนี้ (วันชัย, 2542)

ลูกผสมเดี่ยว (single cross hybrid) เป็นลูกผสมรุ่นแรกที่เกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์แท้ (inbred line) จำนวน 2 สายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ในสมัยแรกของการผลิตลูกผสมเป็นการค้ำนั้น ลูกผสมเดี่ยวได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจากมีความดีเด่นของลูกผสม (hybrid vigour) สูง มีความสม่ำเสมอของลักษณะต่าง ๆ เช่น ความสูงของฝัก และอายุการเก็บเกี่ยว เป็นต้น ข้อเสียของลูกผสมเดี่ยว คือ ผลผลิตและคุณภาพเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากสายพันธุ์แม่ที่ใช้มักมีคุณสมบัติต่ำกว่าลูกผสมแบบอื่น แต่ก็สามารถแก้ไขได้โดยใช้ลูกผสมเดี่ยวประยุกต์ (modified single-crosses) คือ ใช้สายพันธุ์แท้ที่ใกล้เคียงกัน (sister inbred line) มาผสมกัน ($A_1 \times A_2$) เพื่อสร้างสายพันธุ์แม่ ส่วนสายพันธุ์พ่อก็อาจสร้างจากการผสมสายพันธุ์แท้ที่แตกต่างกัน แต่สัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (sister inbred line) มาผสมกัน ($B_1 \times B_2$) หรืออาจใช้สายพันธุ์แท้ (B) ก็ได้ โดยวิธีนี้ ผลผลิตของเมล็ดพันธุ์ลูกผสม (hybrid seed) จะสูงกว่าที่ได้จากวิธีเดิม เนื่องจากต้นแม่ ($A_1 \times A_2$) มีความแข็งแรงกว่า และให้เมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพดีกว่าต้นแม่ที่เป็นสายพันธุ์แท้ (A) อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันสายพันธุ์แท้ได้รับการพัฒนาจนมีความแข็งแรงมากขึ้นจึงผลิตเมล็ดได้มากขึ้น ลูกผสมเดี่ยวจึงกลับมาได้รับความนิยมกันมากขึ้นอีกครั้ง (วันชัย, 2542)

ลูกผสมคู่ (double cross) คือ ลูกผสมรุ่นแรกที่เกิดจากการผสมระหว่างลูกผสมเดี่ยว 2 พันธุ์ ลูกผสมคู่จึงมาจากสายพันธุ์แท้ถึง 4 สายพันธุ์ ลูกผสมคู่มักมีความสม่ำเสมอของลักษณะต่างๆ ไม่ดีเท่าลูกผสมเดี่ยว (วันชัย, 2542)

ลูกผสมสามทาง (three-way cross) เป็นลูกผสมรุ่นแรกที่เกิดจากการผสมระหว่างลูกผสมเดี่ยวกับสายพันธุ์แท้หนึ่งสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน โดยในการผลิตนิยมใช้ลูกผสมเดี่ยวเป็นสายพันธุ์แม่ ลูกผสมสามทางมีข้อดี คือ การผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมสามทางมีต้นทุนที่ต่ำกว่า ผลิตได้ง่าย และผลผลิตไม่ด้อยกว่าลูกผสมเดี่ยวมากนัก (วันชัย, 2542)

การผลิตข้าวลูกผสม (บุญหงษ์, 2547)

การสร้างข้าวลูกผสม (hybrid rice) และการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานต่อโรคแมลง และสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (adverse conditions) เป็นทางเลือกที่ดีในการที่จะช่วยให้พันธุ์ข้าวมีผลผลิตเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งหลักการในการผลิตข้าวลูกผสมและการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อเพิ่มความต้านทานต่อโรค แมลง และสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ดังต่อไปนี้

ข้าวลูกผสม หมายถึง ข้าวที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์หรือสายพันธุ์แท้ของข้าวที่มีฐานทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน โดยที่ลูกผสมรุ่นที่ 1 จะให้ลักษณะทางด้านปริมาณและ/หรือทางด้านคุณภาพที่ดีขึ้นกว่าพันธุ์พ่อและ/หรือพันธุ์แม่อันเนื่องมาจากความดีเด่นของลูกผสม (heterosis หรือ hybrid vigor)

ขั้นตอนการผลิตข้าวลูกผสม อาจสรุปได้ต่อไปนี้

1. การกำหนดหรือสรรหาข้าวพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ที่จะใช้ในการผสมพันธุ์ เพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะที่ต้องการดีเด่นกว่าพันธุ์พ่อและ/หรือพันธุ์แม่ ซึ่งพันธุ์ที่สรรหาดังกล่าวควรจะเป็นพันธุ์ข้าวพันธุ์แท้ เช่น ข้าวพันธุ์รัฐบาล หรือข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีลักษณะดี เป็นต้น

2. การทดสอบสมรรถภาพหรือประสิทธิภาพในการผสม (combining ability) ของพันธุ์พ่อและแม่ ทั้งนี้เพื่อหาคู่ผสมที่เหมาะสมที่สุด ที่จะให้ผลตอบแทนคุ้มค่ากับเวลาและเงินทุนที่ใช้ไป

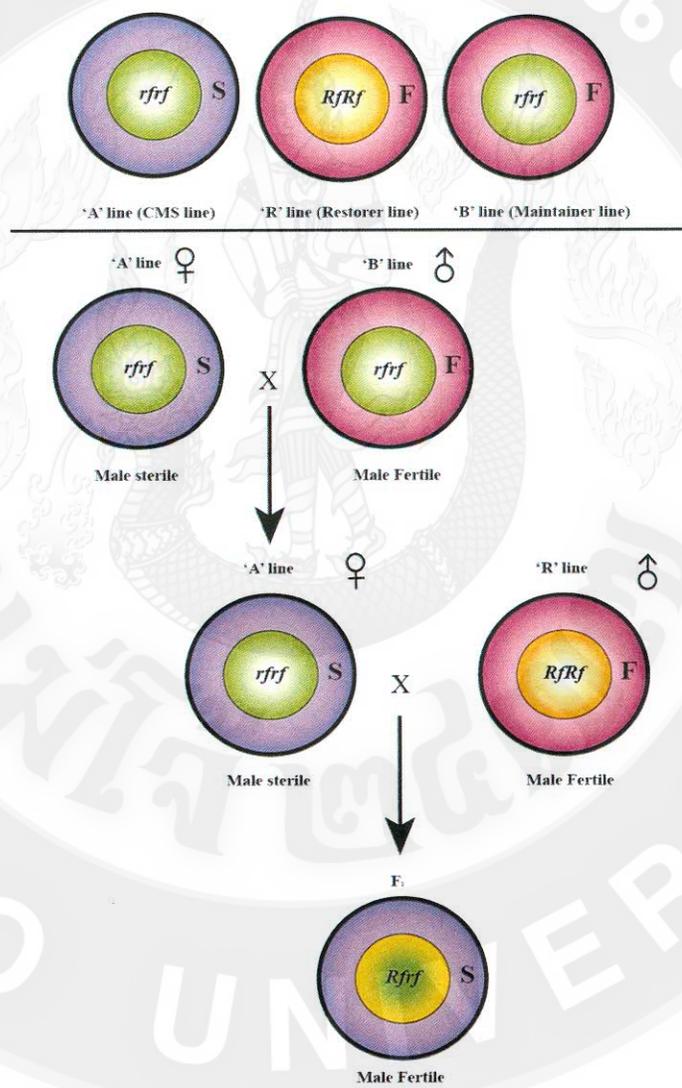
3. การดำเนินการผลิต เนื่องจากในการผลิตพันธุ์ลูกผสม จะต้องเสียแรงงานและค่าใช้จ่ายในการกำจัดเกสรตัวผู้ในต้นตัวเมียเป็นจำนวนมาก จึงทำให้ต้นทุนสูง โดยในปัจจุบันจึงได้นำเอาระบบเกสรตัวผู้เป็นหมันที่ควบคุมด้วยยีนในไซโทพลาซึม (cytoplasmic-genetic male sterility) มาใช้ในการผลิตพันธุ์ลูกผสม เพื่อลดต้นทุนค่าใช้จ่ายดังกล่าว ดังนั้นการผลิตพันธุ์ลูกผสมโดยใช้ระบบนี้จึงจำเป็นต้องมีพันธุ์หรือสายพันธุ์แท้ 3 ประเภท (ภาพที่ 2) ได้แก่

3.1 พันธุ์หรือสายพันธุ์แท้ที่มีเกสรตัวผู้เป็นหมันในระบบไซโทพลาซึม และไม่มีสารพันธุกรรมหรือยีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ (restorer gene for fertility) ในนิวเคลียส เรียกว่า สายพันธุ์ A (A-line หรือ male sterile line) ซึ่งสามารถสร้างขึ้นได้โดยนำพันธุ์แท้นั้น ๆ ผสมกลับ (back cross) ไปหาสายพันธุ์เกสรตัวผู้เป็นหมัน จำนวน 6-9 รุ่น (generation)

3.2 พันธุ์หรือสายพันธุ์แท้ที่จะรักษาความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ของสายพันธุ์ A เรียกว่าสายพันธุ์ B (B-line หรือ maintainer line) ได้แก่ พันธุ์ข้าวที่ลักษณะต่าง ๆ เหมือนกับสายพันธุ์ A ยกเว้นไม่มีความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในระบบไซโทพลาซึม เมื่อต้องการรักษาหรือขยายพันธุ์ของสายพันธุ์ A ทำได้โดยนำสายพันธุ์ B ผสมกับสายพันธุ์ A โดยวิธีปกติ ก็จะได้ลูกสายพันธุ์ A เป็นจำนวนมาก

3.3 พันธุ์หรือสายพันธุ์แท้ที่มียีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในนิวเคลียส เรียกว่าสายพันธุ์ R (R-line หรือ fertility restorer line) สายพันธุ์ R นี้สามารถสร้างขึ้น โดยการนำสายพันธุ์

ที่มียีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ (restorer gene) ในนิวเคลียสไปผสมกับสายพันธุ์ที่มีเกสรตัวผู้เป็นหมันในไซโทพลาซึม แล้วนำพันธุ์หรือสายพันธุ์แท้ที่ต้องการผลิตลูกผสมไปผสมกับลูกผสมรุ่นที่ 1 ที่มีเกสรตัวผู้ปกติซึ่งได้จากคู่ผสมดังกล่าว ก็จะได้ลูกที่มีเกสรตัวผู้เป็นหมันและเกสรตัวผู้ปกติอย่างละครึ่ง จากนั้นในรุ่นต่อ ๆ ไป ก็นำพันธุ์หรือสายพันธุ์แท้ที่ต้องการผลิตลูกผสมกลับกับลูกที่มีลักษณะเกสรตัวผู้ปกติจำนวน 6-9 รุ่น ก็จะได้สายพันธุ์ R ที่มีลักษณะต่าง ๆ เหมือนพันธุ์แท้หรือสายพันธุ์แต่มียีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้อยู่ในนิวเคลียส



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวลูกผสมรุ่นที่ 1 โดย A-line คือ พันธุ์หรือสายพันธุ์แท้ที่มีเกสรตัวผู้เป็นหมันในระบบไซโทพลาซึม (male sterile line), B-line คือ พันธุ์หรือสายพันธุ์แท้ที่จะรักษาความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ของสายพันธุ์ A (maintainer line), B-line คือ พันธุ์หรือสายพันธุ์แท้ที่มียีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในนิวเคลียส (fertility restorer

line), ในระบบไซโทพลาซึมมี 2 ประเภท คือ ไซโทพลาซึมปกติ (F) และไซโทพลาซึมที่ ทำให้เกสรตัวผู้เป็นหมัน (S) ส่วนภายในนิวเคลียสมียีนด้อย (rf) ที่ทำให้เกสรตัวผู้เป็นหมันและยีนเด่นในนิวเคลียส (Rf) ทำให้พืชปกติไม่ว่าไซโทพลาซึมเป็น S หรือ F

ที่มา: ดัดแปลงจาก พชระ (2555)

เมื่อได้สายพันธุ์ A สายพันธุ์ B และสายพันธุ์ R ครบแล้ว จึงใช้สายพันธุ์เหล่านี้ในการผลิตข้าวลูกผสม เช่น ในการผลิตพันธุ์ลูกผสมคู่ (double cross F_1 hybrid) อาจทำได้โดยใช้สายพันธุ์แท้เกสรตัวผู้เป็นหมันจำนวน 2 สายพันธุ์ สายพันธุ์แท้ที่มียีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในนิวเคลียส 1 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ปกติอีก 1 สายพันธุ์

การจัดกลุ่มสายพันธุ์ในข้าวไทย (พชระ, 2555; ภาพร, 2555; สุวิทย์, 2555)

จากการค้นคว้าข้อมูลในขั้นต้น พบว่าในข้าวไทยพันธุ์ที่ได้มีการเพาะปลูกในปัจจุบันนั้น ส่วนใหญ่จะจัดอยู่ในกลุ่มของข้าวสายพันธุ์ B และข้าวสายพันธุ์ R โดยจะสามารถทำการจัดเป็นกลุ่มต่าง ๆ ได้ดังนี้

1. กลุ่มของข้าวสายพันธุ์ B ที่ได้จากการค้นคว้าพบว่ามีจำนวน 24 พันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์ กข6, กข15, กข21, กข33, เหลืองประทิว 123, หอมชลสิทธิ์, เจ้าหอมนิล, หอมสุพรรณบุรี, หอมมะลิแดง, มะลิโกเมนสุรินทร์, มะลินิลสุรินทร์, นางมลเอส 4, ปิ่นแก้ว 56, ดอกพะยอม, ขาวใหญ่, สีนเหล็ก, เล็บมือนาง 111, ขาวตาแห้ง 17, แปดริ้ว, สกลนคร, สุพรรณบุรี 3, สุพรรณบุรี 60, สุพรรณบุรี 80, และขาวดอกมะลิ 105

2. กลุ่มของข้าวสายพันธุ์ R ที่ได้จากการค้นคว้าพบว่ามีจำนวน 17 พันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์ กข 47, ปราจีนบุรี 2, พลายงามปราจีนบุรี, ปทุมธานี 1, ปทุมธานี 80 หรือ กข31, พิษณุโลก 2, พิษณุโลก 60, ชิวแม่จันทร์, เข้มทองพัทลุง, เล็บนก, เล็บนกปัตตานี, ลูกแดงปัตตานี, ส้มหยดพัทลุง, ชัยนาท 1, สุพรรณบุรี 1, สุพรรณบุรี 2 และสันป่าตอง 1

โดยในการจัดกลุ่มพันธุ์ข้าวไทยนั้นได้มาจากการนำข้าวไทยพันธุ์ที่ต้องการจัดกลุ่มมาผสมกับข้าวสายพันธุ์ A ที่มีเกสรตัวผู้เป็นหมัน แล้วทำการศึกษาลูกที่ได้จากรุ่นที่ 1 โดยหากเกสรตัวผู้ของลูกรุ่นที่ 1 ที่ได้ให้ลักษณะของละอองเกสรปกติหรือสามารถผสมตัวเองได้จะแสดงว่าข้าวไทยที่นำมา

ทำการผสมนั้นมียีนแก้ความเป็นหมันหรือสายพันธุ์ R แต่หากเกสรตัวผู้ของลูกรุ่นที่ 1 แสดงความเป็นหมันจะถือว่าเป็นสายพันธุ์ B โดยจากระยะเวลาตั้งแต่ในขั้นของการปลูกทดสอบรุ่นพ่อแม่และลูกรุ่นที่ 1 นั้นใช้ระยะเวลาอันยาวนานและความชำนาญในการผสม จึงจะสามารถจัดกลุ่มข้าวแต่ละพันธุ์ได้ ทำให้การจัดกลุ่มข้าวไทยทั้งหมดจึงทำได้ไม่รวดเร็วและต้องอาศัยความเชี่ยวชาญของผู้ทดสอบ

การเป็นหมันของเกสรตัวผู้

การเป็นหมันของเกสรตัวผู้ (male sterility) พบในพืชทุกชนิด และเกือบทั้งหมดถูกควบคุมด้วยยีนด้อย ทำให้พบได้ยากในสภาพธรรมชาติ ลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันมีหลายรูปแบบ ที่พบส่วนมากเป็นกลุ่มไม่สร้างละอองเกสรหรือละอองเกสรผิดปกติ และไม่ทำงาน (pollen sterility) ดังเช่นที่พบในข้าว ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง ยาสูบ พริก ถั่วเหลือง กลุ่มที่เกสรตัวผู้ไม่พัฒนา (staminal sterility) เช่นที่พบในมะเขือเทศ พืชวงศ์แตง และกลุ่มที่มีละอองเกสรปกติแต่อับละอองเกสรไม่เปิด (structural sterility หรือ functional sterility) ทำให้ละอองเกสรไม่สามารถเข้าผสมพันธุ์ได้ เช่นที่พบในมะเขือเทศ ยาสูบ (Briggs and Knowles, 1967 อ้างใน กฤษญา, 2544)

ยีนที่ควบคุมลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมัน

หากแบ่งยีนที่ควบคุมความเป็นหมันที่พบในพืชจะสามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบได้แก่ การเป็นหมันของเกสรตัวผู้เนื่องจากยีนในนิวเคลียส (genetic male sterility) หรือการเป็นหมันที่ถูกควบคุมด้วยสภาวะแวดล้อม (environment-conditioned genic male sterility; EGMS) และการเป็นหมันของเกสรตัวผู้เนื่องจากยีนในไซโทพลาซึม (cytoplasmic male sterility; CMS) (Huang et al., 2014; Wang et al., 2013) โดยในแต่ละแบบนี้จะถูกควบคุมจากยีนในตำแหน่งที่ต่างกัน ดังนี้

1. การเป็นหมันของเกสรตัวผู้เนื่องจากยีนในนิวเคลียส (genetic male sterility)

การเป็นหมันของเกสรตัวผู้เนื่องจากยีนในนิวเคลียส (genetic male sterility) เป็นการเป็นหมันที่ถูกควบคุมด้วยสภาวะแวดล้อม (environment-conditioned genic male sterility; EGMS) การเป็นหมันของเกสรตัวผู้แบบนี้ส่วนมากถูกควบคุมด้วยยีนด้อยเพียง 1 ยีน ใช้สัญลักษณ์ *ms* ซึ่งอาจพบได้ในธรรมชาติ แต่ความผิดปกติของพืชเศรษฐกิจส่วนมากได้มาจากการทำให้เกิดการ

กลายพันธุ์ ทั้งโดยทางกายภาพและทางเคมีในพืชแต่ละชนิด อาจพบยีนควบคุมความเป็นหมันของ
 เกสรตัวผู้หลายยีน แต่ยีนเพียงหนึ่งยีนก็สามารถทำให้เกิดเกสรตัวผู้เป็นหมันได้ อย่างไรก็ตาม ยังมี
 ข้อยกเว้น เช่น ในฝักกาดหอม ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ที่ควบคุมด้วยยีน ms_4 จะแสดงออกได้ไม่
 เต็มที่ เมื่ออยู่ร่วมกับยีนซ่ม Ms_5 หรือในยาสูบ ลักษณะเป็นหมันควบคุมด้วยยีนด้อย 2 ยีน ms_1 และ
 ms_2 สำหรับในถั่วปากอ้า (broad bean; *Vicia faba* L.) ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ควบคุมโดยยีน
 ซ่ม D_6 (Kalloo, 1988 อ้างใน กฤษภา, 2544)

ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ของข้าวพบว่า มีระบบที่ควบคุมด้วยยีนในนิวเคลียส จำนวน
 2 ระบบ (ขนิษฐา และคณะ, 2012; เทพสุตา และคณะ, 2553) คือ

1. ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ที่ควบคุมด้วยช่วงแสง (photoperiod sensitive genic male sterility; PGMS) ระบบนี้จะเกี่ยวข้องกับข้าวที่มีลักษณะวันสั้น หรือข้าวที่ไวต่อช่วงแสง เนื่องจากช่วงแสงมีความสำคัญต่อการผสมพันธุ์และการเจริญของช่อดอก ดังนั้นในช่วงวันยาวจะทำให้เกสรตัวผู้เป็นหมัน แต่หากเป็นช่วงวันสั้นจะทำให้เกสรตัวผู้ทำงานปกติ (Huang et al., 2014)

2. ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ที่ควบคุมด้วยอุณหภูมิ (thermo-sensitive genic male sterility; TGMS) ระบบนี้จะเกี่ยวข้องกับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น โดยหากอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิปกติจะทำให้เกสรตัวผู้เป็นหมัน (Huang et al., 2014)

ลักษณะของการเกิดหมันของ PGMS และ TGMS นั้นมีความแตกต่างกัน โดยจะขึ้นอยู่กับ
 สภาพที่ได้รับการกระตุ้นทำให้สามารถแบ่งระบบการเป็นหมันแบบ environment-conditioned
 genic male sterility (EGMS) ออกเป็น 3 แบบ (Huang et al., 2014) คือ

1. แบบ PGMS คือ การกระตุ้นให้เกิดการเป็นหมันจากช่วงแสง หรือจากช่วงแสงร่วมกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น แต่จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงหากได้รับการกระตุ้นจากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นเพียงอย่างเดียว

2. แบบ TGMS คือ การกระตุ้นให้เกิดการเป็นหมันจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ซึ่งไม่จำเป็นต้องมีการเปลี่ยนแปลงของช่วงแสงมาเกี่ยวข้อง

3. แบบ P/TGMS คือ จะต้องได้รับการกระตุ้นให้เกิดการเป็นหมันจากช่วงแสงร่วมกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น จึงจะสามารถเปลี่ยนจากข้าวปกติให้เป็นหมันได้แต่หากรับการกระตุ้นเพียงสภาพเดียวจะไม่ทำให้เกิดการเป็นหมัน

จากความรู้ที่ได้จากการศึกษาระบบความเป็นหมันระบบ EGMS นี้ ทำให้นักปรับปรุงพันธุ์ประเทศจีนได้พัฒนาข้าวลูกผสมจำนวน 3 พันธุ์ คือ จากระบบ PGMS ได้ข้าวพันธุ์ Nongken58S (NK58S) จากระบบ TGMS ได้ข้าวพันธุ์ Annong S-1 และ Zhu 1S ต่อมาได้มีการปรับปรุงข้าวลูกผสมพันธุ์อื่น ๆ ขึ้น จากการใช้ข้าวพันธุ์ NK58S เป็นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ (Huang et al., 2014)

2. การเป็นหมันของเกสรตัวผู้เนื่องจากยีนในไซโทพลาซึม (cytoplasmic male sterility) การเป็นหมันของเกสรตัวผู้เนื่องจากยีนในไซโทพลาซึมควบคุมโดยยีนในไซโทพลาซึมและมียีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ (restoring gene; *Rf/rf*) ที่เป็นยีนในนิวเคลียส แต่ไม่ใช่ยีนเดียวกับยีนในระบบแรกทีกล่าวมาแล้ว เรียกระบบนี้ว่า cytoplasmic genetic male sterility (CMS) ในระบบนี้ไซโทพลาซึมมี 2 ประเภท ไซโทพลาซึมปกติ (F) และไซโทพลาซึมที่ทำให้เกสรตัวผู้เป็นหมัน (S) ส่วนภายในนิวเคลียสมียีนด้อย (*rf*) ที่ทำให้เกสรตัวผู้เป็นหมันและยีนเด่นในนิวเคลียส (*Rf*) ทำให้เกสรตัวผู้ปกติ โดยเมื่อยีน *rf* อยู่ร่วมกับ S ในไซโทพลาซึมจะได้พืชที่มีเกสรตัวผู้เป็นหมัน และหากมียีนเด่นในนิวเคลียส (*Rf*) ทำให้พืชปกติ ไม่ว่าไซโทพลาซึมเป็น S หรือ F (กฤษฎา, 2528 อ้างโดย กฤษฎา, 2544)

โดยระบบความเป็นหมันแบบ CMS นั้นได้มีการศึกษาเป็นจำนวนมากและได้นำมาใช้ประโยชน์ในการสร้างข้าวลูกผสม จากการรวบรวมข้อมูลของ Bohra et al. (2016) ทำให้ทราบถึงระบบการเป็นหมัน CMS ในรูปแบบต่างๆ จากพืชแต่ละชนิด เช่น ข้าว, ดอกทานตะวัน, ข้าวฟ่าง, ถั่ว, ข้าวโพด และฝ้าย เป็นต้น ซึ่งในพืชแต่ละชนิดจะมีจำนวนและชื่อเรียกระบบที่แตกต่างกันโดยจะขึ้นอยู่กับชื่อพันธุ์ที่พบความเป็นหมัน

สำหรับการเป็นหมันแบบ CMS ในข้าวนั้นมีการศึกษาเกี่ยวกับการเกิดหมันเป็นจำนวนมาก โดยมีอยู่ 5 ระบบ คือ wild abortive - CMS (WA-CMS), honglian - CMS (HL-CMS), boro II - CMS (BT-CMS), lead rice - CMS (LD-CMS) และ Chinese wild rice - CMS (CW-CMS) โดยเฉพาะระบบความเป็นหมันในแบบ WA-CMS ที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากระบบดังกล่าวมีความชัดเจนในลักษณะของเกสรตัวผู้เมื่อเกิดการเป็นหมัน จึงทำให้ง่ายต่อการศึกษาลักษณะดังกล่าว โดยหากจะกล่าวถึงระบบความเป็นหมันแบบ CMS นั้นจะสามารถทำการแบ่งเป็นหัวข้อต่างๆ ดังนี้

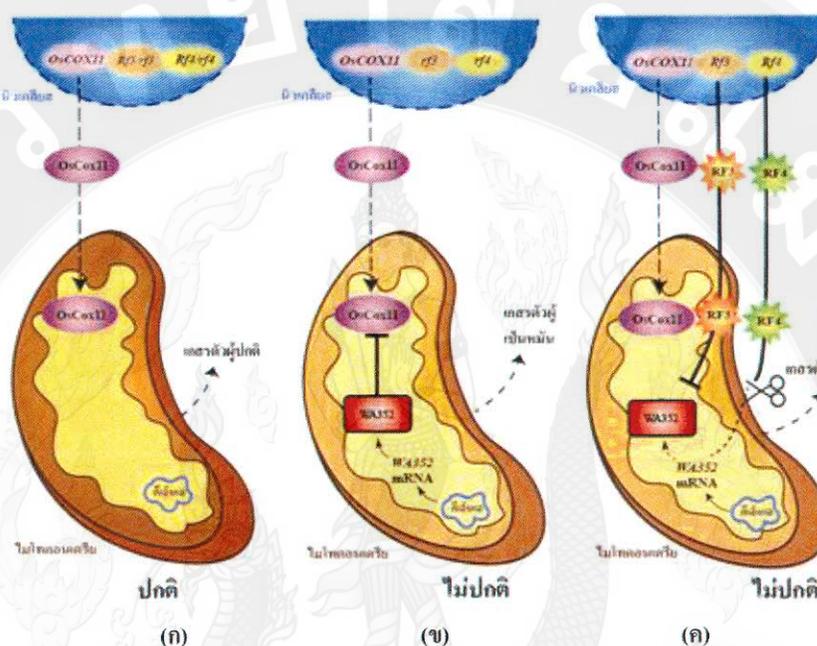
สาเหตุของการเกิดหมันในระบบ cytoplasmic genetic male sterility (CMS)

การเกิดความเป็นหมันในระบบ CMS นั้นเกิดจากการทำงานร่วมกันระหว่างยีนในนิวเคลียสกับยีนในไมโทคอนเดรีย โดยยีนที่อยู่ภายในนิวเคลียสจะเป็นตัวควบคุมการทำงานของยีนภายในไมโทคอนเดรีย ความผิดปกติที่เกิดขึ้นของไมโทคอนเดรียในระบบ CMS นั้นมีลักษณะที่แตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่การเป็นหมันนั้นเกิดในขั้น alloplasmic state คือความผิดปกติในไมโทคอนเดรียนั้นเกิดจากปฏิสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างยีนในไซโทพลาซึมและนิวเคลียส ทั้งในระดับโปรตีนและระดับอาร์เอ็นเอ โดยลักษณะของการแสดงออกเป็น CMS ในแต่ละรูปแบบนั้นเกิดจากการทำงานผิดปกติหรือความผิดปกติที่เกิดจาก ORFs (open reading frames) ที่ได้จากการจัดเรียงตัวใหม่ของดีเอ็นเอทำให้ได้โครงสร้างใหม่ที่ได้จากการรวมตัวกันของยีนในไมโทคอนเดรีย ยีนเหล่านี้มักจะถ่ายทอดไปพร้อมกับยีนในไมโทคอนเดรียที่ปกติ ทำให้เมื่อแปลรหัสจะได้โปรตีนที่เกิดจาก mRNA จำนวน 2 แบบ นอกจากนี้ยังพบความบกพร่องของการสร้าง ATP หรือ NADH และยังพบการสลายของจีโนมของไมโทคอนเดรีย ที่เกิดขึ้นในข้าวระบบ CMS

แม้จะพบความหลากหลายของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ CMS เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบขนส่งอิเล็กตรอน แต่จนถึงขณะนี้พบยีนของไมโทคอนเดรียที่เกี่ยวข้องกับความเป็นหมันแบบ CMS ในพืชเพียง 9 ยีน ได้แก่ ยีน *nad3*, *nad5*, *nad7* พบใน complex I ยีน *cox1*, *cox2* พบใน complex IV ยีน *atp1*, *atp6*, *atp8* และ *atp9* พบใน complex V

จากความเป็นหมันในขั้นต้นจะยกตัวอย่างการทำงานร่วมกันระหว่างยีนในนิวเคลียสกับยีนในไมโทคอนเดรียในข้าวระบบ CMS แบบ WA-CMS ถึงแม้ว่าไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์จะมีจีโนมเป็นของตัวเอง แต่ยังมีโปรตีนหลายชนิดที่ได้จากการแปลรหัสจากยีนในนิวเคลียสแล้วส่งผ่านเข้าไปยังไมโทคอนเดรีย เช่น ในนิวเคลียสของข้าวปกติจะมียีนของโปรตีน OsCOX11 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ cytochrome c oxidase ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในกระบวนการหายใจและการแลกเปลี่ยนก๊าซของเซลล์พืช เพื่อสร้าง ATP และ NADH (ภาพที่ 3 ก) ในข้าวที่เป็นหมันแต่ไม่มียีนแก้ความเป็นหมันแบบ WA-CMS ภายในไมโทคอนเดรียจะมียีน WA352 ซึ่งโปรตีน WA352 นี้จะสามารถเข้าจับกับโปรตีน OsCOX11 ที่นิวเคลียสสร้างแล้วส่งผ่านเข้ามายังไมโทคอนเดรีย ทำให้โปรตีนดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้ (ภาพที่ 3 ข) แต่หากข้าวที่เป็นหมันนั้นมียีนแก้ความเป็นหมันตำแหน่ง *Rf3* และ *Rf4* ที่แสดงลักษณะเด่น ซึ่งหากมียีนตำแหน่ง *Rf4* โปรตีนจาก *Rf4* จะทำ

ให้ปริมาณของอาร์เอ็นเอ WA352 ลดลง และหากมียืนตำแหน่ง *Rf3* โปรตีนดังกล่าวจะไม่ได้ทำให้ระดับของ WA352 mRNA ลดลง แต่ส่งผลทำให้ปริมาณของโปรตีน WA352 ลดลง แสดงให้เห็นว่ายืนที่ตำแหน่ง *Rf3* และ *Rf4* ส่งผลให้การทำงานของยีน WA352 ลดลงทำให้สามารถแก้ความเป็นหมันได้ (ภาพที่ 3 ค) (Ma, 2013)



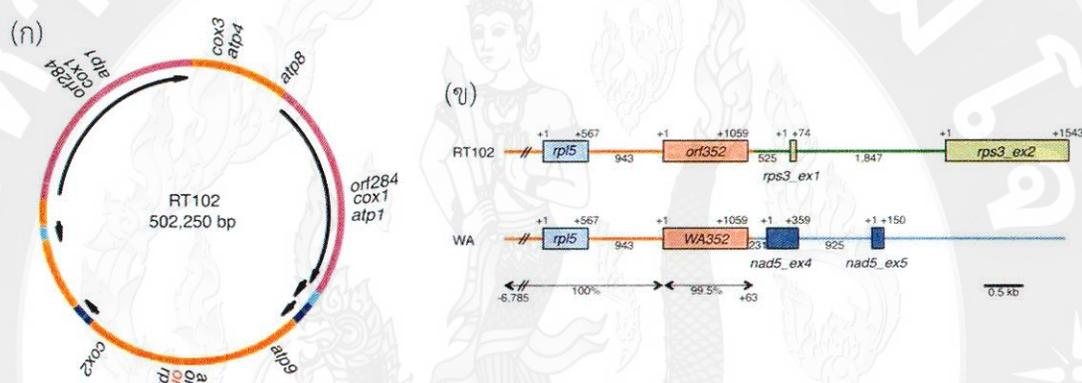
ภาพที่ 3 ระบบ cytoplasmic genetic male sterility (CMS) แบบ WA (WA-CMS) ในข้าว (ก) ข้าวปกติที่ไม่เป็นหมัน (ข) ข้าวที่เป็นหมันแต่ไม่มียืนแก้ความเป็นหมัน (ค) ข้าวที่เป็นหมันแต่มียืนแก้ความเป็นหมันตำแหน่ง *Rf3* และ *Rf4* ที่แสดงลักษณะเด่น

ที่มา: ดัดแปลงจาก Ma (2013)

โปรตีน WA352 ที่ยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นสาเหตุของการเป็นหมันนั้นจะไม่พบในทุกเนื้อเยื่อ แต่พบเฉพาะไมโทคอนเดรียภายในละอองเรณู (anther) จากการศึกษาปริมาณโปรตีน WA352 ในข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่มียืน WA352 ไม่พบการสะสมของโปรตีน WA352 ในใบพบเฉพาะในไมโทคอนเดรียของอับเรณูเท่านั้น และจากการศึกษาการทำงานของยีน *OxCOX11* พบว่าจะมีการแสดงออกเฉพาะในอับเรณูของข้าวปกติ แต่จะไม่พบการแสดงออกในข้าวที่เป็นหมัน เพราะถูกยับยั้งโดยโปรตีน WA352 นอกจากนี้โปรตีน WA352 ที่พบในอับละอองในระดับที่สูงจะกระตุ้นให้เกิด oxidative oxygen species (ROS) การหลุดของ cytochrome c ออกมานอกเยื่อหุ้ม

ไมโทคอนเดรียและภายในไซโทซอล (cytosol) และโปรตีน WA352 ยังกระตุ้นโปรแกรม premature programmed cell death (PCD) ในกระบวนการพัฒนาของอับละออง (Ma, 2013)

จากการศึกษาของ Okazaki et al. (2013) ที่ได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างจีโนมของไมโทคอนเดรียในข้าวป่าที่เกสรตัวผู้ปกติ (RT102) กับจีโนมของไมโทคอนเดรียข้าวที่เป็นหมันในระบบ WA-CMS (WA) พบว่าในข้าวปกติจะพบบริเวณที่เป็นรหัสของยีน *orf352* ภายในจีโนมของไมโทคอนเดรียแต่ในข้าวที่เป็นหมันจะเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของจีโนมเกิดเป็นยีน WA352 ขึ้นแทนที่ *orf352* ดังภาพที่ 4 ก และ ข



ภาพที่ 4 แสดงจีโนมของไมโทคอนเดรียในข้าว ก คือ จีโนมของไมโทคอนเดรียในข้าวป่าที่เกสรตัวผู้ปกติ โดยบริเวณสีแดงแสดงตำแหน่งของรหัส *orf352* ข คือ เปรียบเทียบจีโนมของไมโทคอนเดรียในข้าวป่าที่เกสรตัวผู้ปกติ (RT102) กับข้าวที่เป็นหมันในระบบ WA-CMS (WA)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Okazaki et al. (2013)

เนื่องจากในข้าวที่เป็นหมันนั้นเกิดจากการเรียงตัวใหม่ของดีเอ็นเอที่เป็นรหัสของยีน *orf352* จึงทำให้ได้โปรตีนใหม่ คือ WA352 ที่พบเฉพาะในไมโทคอนเดรียของข้าวที่เป็นหมันในระบบ WA-CMS เท่านั้น

ระบบ cytoplasmic genetic male sterility (CMS) แบบต่างๆ

หากศึกษาการเป็นหมันแบบ CMS ในเรื่องการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้จะสามารถทำการแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ แบบ sporophytic CMS (Sp-CMS) คือ มีการสร้างละอองเกสรแต่ละอองเกสรผิดปกติจึงทำให้เป็นหมัน และแบบ gametophytic CMS (Ga-CMS) คือ ความเป็นหมัน

ขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่างยีนเป็นหมันและยีนแก้ความเป็นหมัน จะส่งผลให้เกิดความผิดปกติกับ gametophyte ได้จากการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (ดวงพร และคณะ, มปป; Hu et al., 2014)

นอกจากการแบ่งกลุ่มของระบบการเป็นหมันแบบ CMS ดังที่กล่าวมาข้างต้นนั้น ได้มีการแบ่งกลุ่มอีกแบบ โดยการเรียกชื่อรูปแบบการเป็นหมันตามชื่อพันธุ์ข้าวที่ได้ทำการศึกษาและพบการเกิดความเป็นหมัน จึงทำให้มีความหลากหลายในเรื่องชนิดของความเป็นหมัน โดยต่อไปจะอธิบายเกี่ยวกับยีนที่ควบคุมลักษณะความเป็นหมันที่มีการศึกษาจำนวนมาก จำนวน 3 แบบ ได้แก่

1. แบบ BT-CMS เป็นลักษณะที่ได้มีการศึกษาเป็นลักษณะแรกโดย Weeraratne ในปี ค.ศ. 1954 (Bohra et al, 2016) พบในข้าวพันธุ์ Chinsurah Boro II (*O. sativa indica*) มีลักษณะความเป็นหมันแบบ gametophytic CMS ที่ควบคุมโดยยีนในไมโทคอนเดรีย *atp6/orf79* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ตำแหน่งด้านหลังของ *atp6* โดยเป็นรหัสของโปรตีน cytotoxic peptide (Wang et al, 2013 และ Huang et al., 2014)

2. แบบ HL-CMS พบในข้าวที่ได้จากการผสมกลับของข้าว red-awned wild rice (*O. rufipogon*) กับข้าวพันธุ์ Liantangzao (*O. sativa indica*) (Huang et al., 2014) จากมณฑลไหหลำ ประเทศจีน มีลักษณะความเป็นหมันแบบ gametophytic CMS ที่ควบคุมโดยยีนในไมโทคอนเดรีย *atp6/orfH79* ซึ่งเป็นยีนที่ตำแหน่งด้านหลังของ *atp6* หากเปรียบเทียบลำดับเบสของ *orfH79* กับ *orf79* จะพบว่ามีความคล้ายกันถึง 98 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า *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) ส่งผลให้เกิดการแท้งเนื่องจากละอองเกสรตัวผู้ผิดปกติ (Wang et al., 2013)

3. แบบ WA-CMS พบในข้าวพันธุ์ Zhenshan 97A (*O. sativa indica*) มีลักษณะความเป็นหมันแบบ sporophytic CMS ซึ่งจะมีรูปแบบการเป็นหมันที่ต่างจาก BT-CMS และ HL-CMS (Hu et al, 2014) โดยการเป็นหมันในแบบนี้เกิดจากยีนในไมโทคอนเดรียชื่อยีน WA352 ที่ได้มาจากการรวมกันของยีน *orf284*, *orf224* และ *orf288* กับอีกหนึ่งยีนที่ยังไม่ทราบตำแหน่งที่ตั้งของยีน ซึ่งโปรตีน WA352 นั้นจะพบเฉพาะในส่วนของอับเรณูโดยจะเข้าจับกับโปรตีน OsCOX11 ทำให้โปรตีน OsCOX11 ไม่สามารถทำงาน โปรตีน OsCOX11 เป็นโปรตีนที่สร้างจากยีนในนิวเคลียสจะส่งมายังไมโทคอนเดรียเพื่อทำหน้าที่ร่วมกับเอนไซม์ cytochrome c oxidase (Huang et al., 2014)

เนื่องจากหากทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่ทำให้เกิดการเป็นหมันในไมโทคอนเดรียทั้งหมดที่พบในระบบ CMS พบว่าลำดับเบสของยีนที่ทำให้เกิดความเป็นหมันแต่ละรูปแบบนั้นจะมีความจำเพาะต่อรูปแบบนั้นๆ โดยจะขึ้นอยู่กับรูปแบบของ CMS ในพืช อย่างไรก็ตามส่วนใหญ่เมื่อทำการแปลรหัสเป็นโปรตีนจะพบว่าโปรตีนที่ได้มีความเกี่ยวข้องกับผนังเซลล์ หรือมีกลไกการทำงานเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ATP ของไมโทคอนเดรีย (Bohra et al., 2016)

ยีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ (restoring gene; *Rf/rf*)

การเกิดการเป็นหมันนั้นเกิดขึ้นได้ตลอดเวลา ในช่วงของการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ระยะ sporogenous cell ไปจนถึงระยะ tri-nucleate การพัฒนาที่ผิดปกติหรือความเสียหายภายใน tapetal cell จะส่งผลให้เกิดการแท้ง โดยยีนแก้ความเป็นหมันของระบบ CMS คือ ยีน *Rf* ที่อยู่ภายในนิวเคลียสของพ่อ เมื่อได้รับการผสม ยีน *Rf* ที่แสดงลักษณะเด่นที่อยู่ในนิวเคลียสของพ่อ จะเข้าไปช่วยแก้ความเป็นหมัน ทำให้ลูกที่ได้จากการผสมกลับมาปกติ ดังนั้นในระบบการเป็นหมันแบบ CMS จึงขาดยีน *Rf* ไม่ได้ เนื่องจากหากยีน *Rf* มีลักษณะเป็นเฮเทอโรไซกัส (*Rf/rf*) ก็สามารถแก้ความเป็นหมันได้

โดยในการเป็นหมันในระบบ CMS แต่ละแบบนั้นจะมียีนแก้ความเป็นหมันแตกต่างกัน บางระบบการแก้ความเป็นหมันอาจจะใช้ยีนแก้ความเป็นหมันเพียง 1 ยีน แต่ในบางระบบอาจจะต้องใช้ยีนแก้ความเป็นหมันถึง 2 ยีนจึงจะสามารถแก้ความเป็นหมันของระบบนั้นได้ ดังตัวอย่าง

1. แบบ BT-CMS การแก้ความเป็นหมันจะต้องใช้ยีนจำนวน 2 ยีน คือ ยีน *Rf1a* และ *Rf1b* เป็นรหัสของโปรตีน pentatricopeptide repeat (PPR) ทั้ง 2 ยีน จะอยู่ที่ตำแหน่ง *Rf1* (Huang et al., 2014 และ Hu et al., 2014) บนโครโมโซมแท่งที่ 10 (Bohra et al., 2016) ยีน *Rf1a* สามารถแปลเป็นรหัสของโปรตีนมีความยาว 266 กรดอะมิโน พบการกลายพันธุ์แบบ frame shift ทำให้โปรตีนสั้นลง เกิดเป็น *rf1a* แต่ในยีน *rf1b* นั้นจะพบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส 1 ตำแหน่งจาก A¹²³⁵ เป็น G ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Asn⁴¹² เป็น Ser จึงทำให้โปรตีนที่ได้ต่างจาก *Rf1b* (Huang et al., 2014)

2. แบบ HL-CMS การแก้ความเป็นหมันใช้ยีนจำนวน 2 ยีน ได้แก่ ยีน *Rf5* และ *Rf6* โดยยีนดังกล่าวตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 10 และ 8 ตามลำดับ (Bohra et al., 2016) หากมียีนแก้ความเป็น

หมันเฉพาะยีน *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)

3. แบบ WA-CMS การแก้ความเป็นหมันใช้ยีนจำนวน 2 ตำแหน่ง ได้แก่ยีนที่ตำแหน่ง *Rf3* และ *Rf4* โดยยีนทั้งสองตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 และ 10 ตามลำดับ (Hu et al., 2014 และ Bohra et al., 2016) โดยพบว่าหากยีนที่ตำแหน่ง *Rf4* มีลักษณะเด่น (*Rf4Rf4/Rf4rf4*) แต่ยีนที่ตำแหน่ง *Rf3* มีลักษณะด้อย (*rf3rf3*) จะทำให้ปริมาณของอาร์เอ็นเอ *WA352* ลดลงจากเดิม 20 ถึง 25 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อศึกษาถึงกลไกการทำงานของยีนพบว่ายีนที่ตำแหน่ง *Rf4* จะเป็นตัวจับกับอาร์เอ็นเอ *WA352* และยีนที่ตำแหน่ง *Rf3* จะเป็นตัวควบคุมการแปลรหัสเป็นโปรตีน *WA352* (Huang et al., 2014)

4. แบบ LD-CMS ยีนแก้ความเป็นหมันในระบบนี้มีจำนวน 2 ยีน คือ ยีน *Rf1* หรือ *Rf2* ที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 10 และ 2 ตามลำดับ (Huang et al., 2014) พบว่ายีน *Rf2* นั้นเป็นรหัสของโปรตีนที่มีปริมาณกรดอะมิโนไกลซีนจำนวนมาก (glycine-rich protein) (Hu et al., 2014) แต่ยังไม่ทราบถึงกระบวนการทำงานที่แน่นอน (Huang et al., 2014)

5. แบบ CW-CMS ยีนแก้ความเป็นหมันในระบบนี้มีจำนวน 1 ยีน คือ ยีน *Rf17* บนโครโมโซมแท่งที่ 4 (Huang et al., 2014) แต่ยังไม่ทราบถึงโปรตีนและกระบวนการทำงานที่แน่นอน (Hu et al., 2014)

การศึกษากลไกการทำงานของยีนแก้ความเป็นหมัน *Rf* นี้ โดยส่วนใหญ่ได้มาจากการโคลนยีนที่อยู่ในระบบความเป็นหมันแบบต่างๆ ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการโคลนยีนแก้ความเป็นหมัน *Rf* โดยส่วนใหญ่หากทำการแปลเป็นโปรตีนจะเป็นโปรตีนในกลุ่ม pentatricopeptide-repeat (PPR) (Bohra et al., 2016)

โปรตีน pentatricopeptide repeat (PPR)

การเป็นหมันของพืชในระบบ CMS นั้นเกิดจากโปรตีนที่สร้างจากไมโทคอนเดรียจาก open reading frames (ORFs) ต่าง ๆ โดยในระบบ CMS แต่ละแบบก็จะมีการผลิต ORFs ที่ต่างกัน และในการแก้ความเป็นหมันนั้นจะได้จากยีนแก้ความเป็นหมัน *Rf* ที่สร้างจากนิวเคลียส ที่จะจำเพาะในการแก้ความเป็นหมันของยีนภายในไมโทคอนเดรีย ซึ่งพบว่ายีน *Rf* นั้นเป็นอยู่ในกลุ่มของยีน *PPR* โดยเมื่อแปลไปเป็นโปรตีนจะได้ pentatricopeptide repeat (PPR) (Huang et al., 2014; Hu et al., 2014; Saxena et al., 2015; Bohra et al., 2016)

ลำดับกรดอะมิโน PPR repeat จะประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 35 กรดอะมิโน โดยโครงสร้างของโปรตีนจะมีลักษณะเป็น helix-turn-helix ซึ่งจะคล้ายกับ tetratricopeptide repeat (TPR) (Delannoy et al., 2007) ทำหน้าที่เป็นโปรตีนที่จับอาร์เอ็นเอ (RNA-binding protein) ช่วยในกระบวนการหลังจากการถอดรหัส (post-transcriptional processes) ได้แก่ การปรับแก้อาร์เอ็นเอ (RNA editing) การตัดอินทรอน (RNA splicing) การสลายของ RNA (RNA cleavage) และการแปลรหัส (translation) พบมากภายในไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ของพืช แต่สำหรับในสัตว์จะพบยีน *PPR* จำนวนน้อยกว่าเมื่อเทียบกับที่พบในพืช (Schmitz-Linneweber and Small, 2008)

เนื่องจากระบบความเป็นหมัน CMS มีการค้นพบหลายแบบทั้งในข้าวและพืชชนิดอื่นดังได้กล่าวมาก่อนหน้านี้ จึงทำให้ในการแก้ความเป็นหมันแบบต่างๆ จะต้องเลือกใช้พันธุ์ข้าวและยีนที่สามารถแก้ความเป็นหมันแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ยีนแก้ความเป็นหมัน *Rf* ของข้าวและการแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีรายงานในฐานข้อมูล

ยีนแก้ความ เป็นหมัน (แบบที่พบ)	NCBI Accession	ชื่อพันธุ์ข้าวแก้ หมัน	การเรียกชื่อยีน	กลุ่มของ โปรตีน	ที่มา
<i>Rf-1</i> (BT- CMS)	AB106867 AB110016	BTR	<i>PPR8-1</i>	PPR	Kazama and Toriyama (2003)
<i>Rf-1</i> (BT-CMS)	AB110443 AB110444	IR24	<i>PPR791</i>	PPR	Komori et al. (2004)
<i>Rf-1</i> (BT-CMS)	AB112811	MTC-10R	<i>Rf-1A, Rf-1B</i>	PPR	Akagi et al. (2004)
<i>Rf</i> gene (<i>Rf1b</i>) (BT-CMS)	DQ311054	C9083	-	PPR	Wang et al. (2006)
<i>Rf17</i> (CW-CMS)	AB481199	CWR	<i>ORF11</i>	-	Fuji and Toriyama (2009)
<i>Rf2</i> (LD-CMS)	AB583700 AB583699 AB583698	Kasalath	<i>Os02g17380.1</i>	Glycine rich	Itabashi et al. (2011)
<i>Rf5</i> (HL-CMS)	-	Milyang23	<i>PPR791</i>	PPR	Hu et al. (2012)
<i>Rf4</i> (WA-CMS)	KJ680250 KJ680249 KJ680248	Minghui 63	<i>PPR7-454-M</i> <i>PPR9-782-M</i> <i>PPR10-454-M</i>	PPR	Tang et al. (2014)
<i>Rf4</i> (WA-CMS)	AB900791 AB900792 AB900793 AB900794	IR24	<i>PPR782a</i>	PPR	Kazama and Toriyama (2014)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Bohra et al. (2016)

ความเป็นหมันของเกษตรกรผู้กับการนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม

ในปัจจุบัน ความต้องการอาหารที่ดีและมีคุณภาพมาใช้ในการดำรงชีพนั้นเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้น การผลิตพันธุ์ลูกผสมซึ่งเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและมีคุณภาพสม่ำเสมอ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อที่จะช่วยให้มีปริมาณอาหารเพียงพอกับความต้องการบริโภคที่เพิ่มมากขึ้น (มะลิวรรณ, 2550)

การนำระบบความเป็นหมันของเกษตรกรผู้มาใช้ในการผลิตพันธุ์ลูกผสม จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยให้การสร้างลูกผสมทำได้สะดวกและมีประสิทธิภาพ เนื่องจากไม่ต้องทำหมันเกษตรกรผู้ก่อนการผสม แตกต่างจากการสร้างลูกผสมในสมัยก่อนที่ต้องมีการทำหมัน เพื่อกำจัดละอองเรณูของต้นแม่ ออกให้หมดก่อน ซึ่งเป็นขั้นตอนที่จะต้องใช้แรงงานและค่าใช้จ่ายมาก ทำให้การผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมมีต้นทุนในการผลิตสูง โดยในต่างประเทศได้มีการนำลักษณะความเป็นหมันของเกษตรกรผู้มาใช้ประโยชน์ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมในพืชเศรษฐกิจสำคัญหลายชนิด เช่น ข้าวโพด ข้าว ข้าวฟ่าง ทานตะวัน หอมหัวใหญ่ แครอท และผักเศรษฐกิจหลายชนิด (Eckard, 2006 อ้างใน มะลิวรรณ, 2550)

อย่างไรก็ดี การนำลักษณะเกษตรกรผู้เป็นหมันมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรนั้นก็ยังมีข้อจำกัดอยู่บ้าง กล่าวคือ ลักษณะความเป็นหมันของเกษตรกรผู้สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามสภาพแวดล้อมที่พืชได้รับ ทำให้โอกาสที่ยีนจะมีการแสดงออกได้หลาย ๆ ลักษณะก็เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้การคัดเลือกต้นแม่พันธุ์ที่จะนำมาใช้ในการผลิตลูกผสมมีขั้นตอนที่ซับซ้อนเพิ่มมากขึ้นไปด้วย เพราะนอกจากจะต้องหาอินที่ควบคุมลักษณะความเป็นหมันของเกษตรกรผู้แล้ว ยังจำเป็นที่จะต้องทราบอินที่จะนำมาใช้ในการแก้ความเป็นหมันด้วย เมื่อต้องการที่จะขยายพันธุ์ต้นที่มีลักษณะความเป็นหมันของเกษตรกรผู้ โดยต้นที่จะนำมาหาอินที่แก้ความเป็นหมันของเกษตรกรผู้ ต้องมีลักษณะที่เหมือนกับต้นที่เกษตรกรผู้เป็นหมันทุกประการ แตกต่างกันเพียงความเป็นหมันของละอองเรณูของเกษตรกรผู้เท่านั้น

นอกจากนี้ การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้เกิดลักษณะความเป็นหมันของเกษตรกรผู้ นั้นยังสามารถทำได้โดยการผสมพันธุ์พืชข้ามชนิด ซึ่งในกรณีนี้ ต้องการให้เกิดการรวมตัวกันของพันธุกรรมในนิวเคลียส (ต้นพ่อ) ของพืชชนิดหนึ่ง กับพันธุกรรมในไซโทพลาซึม (ต้นแม่) ของพืชอีกชนิดหนึ่งนั้น ทำให้เกิดลูกผสมที่มีลักษณะเกษตรกรผู้เป็นหมันได้ เนื่องจากอินที่ก่อให้เกิดการเป็นหมันของเกษตรกรผู้ ในไมโทคอนเดรียของต้นแม่อาจถูกข่มโดยอินในนิวเคลียส ทำให้ต้นแม่ไม่แสดงอาการเกษตรกรผู้เป็น

หมัน แต่เมื่อนำมาผสมข้ามชนิดกับต้นพ่อที่มียีนในนิวเคลียส เมื่อมีปฏิสัมพันธ์กับยีนในไมโทคอนเดรียของต้นแม่ จึงก่อให้เกิดลักษณะเกสรตัวผู้เป็นหมันในรุ่นลูกได้

ดังนั้น หากมีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับพื้นฐานทางชีวโมเลกุลของระบบการเป็นหมันของเกสรตัวผู้ ที่จะใช้ในการผลิตลูกผสมแล้ว ก็อาจจะสามารถนำความรู้เหล่านั้นมาใช้ในการปรับปรุงเทคโนโลยีต่างๆ เพื่อนำมาใช้ในการผลิตพันธุ์ลูกผสมได้ดีขึ้น

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวลูกผสมแบบ cytoplasmic male sterile (CMS)

จากงานวิจัยของเพ็ญภา และเบญจวรรณ (2553) พบว่าข้าวที่มีเกสรตัวผู้เป็นหมันเนื่องจากยีนในกลุ่มไซโทพลาสมิก (cytoplasmic male sterile ; CMS) จำเป็นต้องมีการผสมข้ามจึงจะเกิดเมล็ดได้ โดยในงานวิจัยได้ทำการประเมินปัจจัยที่มีผลต่อการติดเมล็ดของข้าวเกสรตัวผู้เป็นหมัน โดยปลูกข้าวพันธุ์ IR80154A ซึ่งเป็นข้าว CMS ในแปลงข้าวพันธุ์สันป่าตอง 1 ที่ใช้เป็นแหล่งของละอองเรณู โดยมีปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย คือ การครอบมุ้ง และช่วงวันออกดอก พบว่าพันธุ์ IR80154A ที่มีเกสรตัวผู้เป็นหมัน มีการติดเมล็ดสูงสุด เมื่อมีการออกรวงในเวลาเดียวกันกับข้าวพันธุ์สันป่าตอง 1 และมีการติดเมล็ดลดลง หากมีการออกรวงช้าไปกว่าข้าวพันธุ์สันป่าตอง 1 ทำให้พบว่าข้าวที่เป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามนั้นมีประโยชน์ต่อการเพิ่มผลผลิตต่อรวงได้ ต่อมาดวงพร และคณะ (ม.ป.ป.) ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะความเป็นหมันของละอองเกสรตัวผู้ในประชากรข้าวรุ่นที่ 2 จำนวน 10 คู่ผสม โดยการย้อมสีละอองเกสรตัวผู้ด้วยสารละลาย I₂-KI พบการกระจายตัวของลักษณะละอองเกสรตัวผู้ปกติต่อละอองเกสรตัวผู้เป็นหมัน 15:1 จำนวน 6 คู่ผสม แสดงว่าความเป็นหมันควบคุมด้วยยีนจำนวน 2 คู่ และการกระจายตัวของลักษณะละอองเกสรตัวผู้ปกติต่อละอองเกสรตัวผู้เป็นหมัน 3:1 จำนวน 4 คู่ผสม แสดงว่าความเป็นหมันควบคุมด้วยยีนจำนวน 1 คู่ อาจสามารถสรุปได้ว่า จำนวนยีนแก่ความเป็นหมันของลักษณะละอองเกสรตัวผู้เป็นหมันในแต่ละคู่ผสมที่ศึกษาจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์พ่อและแม่ในแต่ละคู่ผสม

จากนั้นจึงได้มีการพัฒนาข้าวลูกผสมในระบบ 3 สายพันธุ์ เพิ่มมากขึ้นจากงานวิจัยของ สุชาติ และคณะ (ม.ป.ป.) ได้ทำการวิจัยและพัฒนาการผลิตข้าวลูกผสมของกรมการข้าว ในระบบ WA-CMS

เพื่อสร้างสายพันธุ์สำหรับใช้ในการผลิตข้าวลูกผสมที่เหมาะสมสำหรับปลูกในสภาพแวดล้อมของการทำนาในประเทศไทยและให้ผลผลิตมากกว่า 1,200 กิโลกรัมต่อไร่ หรือให้ผลผลิตสูงกว่าข้าวพันธุ์ดีทั่วไปประมาณ 15-20 เปอร์เซ็นต์ โดยในรอบปี พ.ศ. 2551 งานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาสายพันธุ์เกษตรกรตัวผู้เป็นหมันใหม่ได้จำนวน 4 คู่สายพันธุ์ คือ SPR06186A/B, SPR06187A/B, SPR06188A/B และ SPR06189A/B ค้นพบลูกผสมดีเด่น จำนวน 4 ลูกผสม คือ PTT06001H, PTT06008H, PTT06022H และ PTT06029H ที่สามารถผลิตเมล็ดพันธุ์สายพันธุ์เกษตรกรตัวผู้เป็นหมันให้ผลผลิตเมล็ดพันธุ์ระหว่าง 184-495 กิโลกรัมต่อไร่ มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด 22.26-58.22 เปอร์เซ็นต์ รวมไปถึงงานวิจัยของ พชระ และคณะ (ม.ป.ป.) ที่ได้พัฒนาสายพันธุ์พ่อแม่ในข้าวลูกผสมระบบ WA-CMS โดยวิธีการผสมกลับและทดสอบสมรรถนะการผสมในรุ่นแรกๆ และพัฒนาสายพันธุ์เกษตรกรตัวผู้เป็นหมัน (สายพันธุ์ A) และสายพันธุ์แก้ความเป็นหมันของเกษตรกรตัวผู้ (สายพันธุ์ R) ไปพร้อมกัน โดยข้าวลูกผสมที่ได้ให้ค่าความดีเด่นเหนือสายพันธุ์พ่อแม่ที่ดีที่สุดทางด้านผลผลิต มีจำนวน 2 คู่ผสม ได้แก่ PTT08003A/CK168 และ PTT08001A/RD31 ที่ให้ค่าความดีเด่นเหนือสายพันธุ์พ่อแม่ที่ดีที่สุดเป็น 63.84 และ 40.27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ข้าวลูกผสมมีค่าความดีเด่นเหนือสายพันธุ์เปรียบเทียบ กขพ1, ปทุมธานี 1 และพิษณุโลก 2 ตั้งแต่ 67.16 ถึง 107.18 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวลูกผสมที่ปลูกเป็นการค้าของประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน จำนวน 5 สายพันธุ์ พบว่า ข้าวลูกผสมสายพันธุ์ PTT08001A/RD31 ให้ค่าความดีเด่นเหนือกว่าข้าวลูกผสม HSLY-26 ที่ให้ผลผลิตสูงสุด 40.28 เปอร์เซ็นต์

งานวิจัยที่เกี่ยวกับการหาแผนที่ยีนแก้ความเป็นหมันในระบบ WA-CMS

การหาแผนที่ยีนแก้ความเป็นหมันในระบบ WA-CMS เริ่มจากการศึกษาของ Jing et al. (2001) ได้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSLP จากลูกผสมทั้งหมด 210 ต้น ที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์ที่เป็นหมัน Zhenshan 97A กับสายพันธุ์แก้ความเป็นหมันของเกษตรกรตัวผู้ IR24 เพื่อใช้ในการสร้างแผนที่ยีนที่ตำแหน่ง *Rf4* โดยพบว่าระยะห่างทางพันธุกรรมของยีนที่ตำแหน่ง *Rf4* อยู่ที่บริเวณ RM171 (OSR33) และ RM228 ที่อยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 10 ที่ตำแหน่ง 3.7 และ 3.4 cM และพบมียีนอีก 2 ยีน คือ *Rf1* และ *Rf5(t)* ที่อยู่ในกลุ่มของยีนที่ควบคุมการแก้ความเป็นหมันของเกษตรกรตัวผู้ที่อยู่บนโครโมโซมเดียวกัน ต่อมาได้มีการศึกษาเพิ่มเติมโดย Suresh et al. (2012)

พบว่าในการแก้ความเป็นหมันในระบบ WA-CMA นั้นไม่ได้เกิดจากการทำงานของยีนที่ตำแหน่ง *Rf4* เพียงตำแหน่งเดียว แต่เกิดขึ้นจากการทำงานร่วมกันของยีนที่ตำแหน่ง *Rf3* และได้มีการเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่แตกต่างจากการศึกษาของ Alavi et al. (2009) โดยได้เลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR และ CAPS ในประชากร F_2 ที่พัฒนามาจากการผสมระหว่างพันธุ์ Neda-AxIR36 จากการวิเคราะห์พบว่ายีนที่ตำแหน่ง *Rf3* เมื่อทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 3 ตำแหน่ง (RM1, RM3233 และ RM3873) และพบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด CAPS จำนวน 1 ตำแหน่ง (RG140/*EcoRI*) อยู่บริเวณแขนข้างสั้นของโครโมโซมแท่งที่ 1 โดยตำแหน่ง *Rf3* ที่พบนั้นอยู่บริเวณระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR คือ RM1 และ RM3873 ที่ตำแหน่ง 5.6 และ 14 cM

ต่อมาในปี ค.ศ. 2010 Nematzadeh และ Kiani ทำการวิเคราะห์ยีนควบคุมการแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในข้าว (WA-CMS) โดยได้มีการพัฒนาข้าวสายพันธุ์ R ขึ้นมา 3 สายพันธุ์ คือ DN-33-1, DN-33-18, และ DN-32-6 จากนั้นนำไปผสมกับ Neda A พบว่าคู่ผสมระหว่าง Neda A และ DN-33-18 ให้ละอองเกสรตัวผู้ปกติมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผสมต่อและเมื่อวิเคราะห์ประชากร F_2 พบการกระจายตัวของลักษณะละอองเกสรตัวผู้ปกติต่อละอองเกสรตัวผู้เป็นหมัน 15:1 แสดงว่ายีนควบคุมการแก้เป็นหมันของเกสรตัวผู้มีการทำงานร่วมกันจำนวน 2 ยีน ได้แก่ ยีนที่ตำแหน่ง *Rf3* และ *Rf4* โดยพบว่าตำแหน่ง *Rf4* อยู่บริเวณระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR คือ RM258 และ RM171 (บนโครโมโซมแท่งที่ 10) ที่ตำแหน่ง 3.1 และ 6.3 cM สำหรับตำแหน่ง *Rf3* ไม่พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล RM1 RM315 และ RM294 ที่อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 แต่พบใน RM3148 ที่ตำแหน่ง 19.7 cM และเมื่อศึกษาถึงความแตกต่างระหว่างยีนแก้ความเป็นหมันระบบ WA-CMS ในข้าวสายพันธุ์ A กับสายพันธุ์ R ที่ได้จากงานวิจัยของ Suresh et al. (2012) โดยพบว่ายีนควบคุมการแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในข้าว *indica* ควบคุมด้วยยีน 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่ง *Rf3* ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 และตำแหน่ง *Rf4* ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 10 จากการศึกษาประชากร F_2 โดยการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ที่มีเกสรตัวผู้เป็นหมัน (สายพันธุ์ A) กับสายพันธุ์ที่ยีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ (สายพันธุ์ R) พบบริเวณยีนที่ตำแหน่ง *Rf3* ที่เป็นรหัสของโปรตีน mitochondrial-processing peptidase หรือ pollen-specific protein ของสายพันธุ์ A นั้นมีการขาดหายไปของดีเอ็นเอ อยู่ที่บริเวณ DRRM-RF3-5/DRRM-RF3-10 และยีนที่ตำแหน่ง *Rf4* ที่เป็นรหัสของโปรตีน PPR repeat ของสายพันธุ์ R นั้นมี

การขาดหายไปของดีเอ็นเอ อยู่ที่บริเวณ DRCG-RF4-14 และ DRCG-RF4-8 ต่อมาได้มีการศึกษาเพื่อ ยืนยันการทำงานของยีนที่ตำแหน่ง *Rf3* และ *Rf4* ถึงความสามารถในการแก้ความเป็นหมันในระบบ WA-CMS โดย Cai et al. (2013) ได้ทำการศึกษาลักษณะแตกต่างของอัลลีลและผลกระทบของยีน ควบคุมการแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในข้าว (WA-CMS) ได้แก่ยีนตำแหน่ง *Rf3* และ *Rf4* พบว่า ยีนตำแหน่ง *Rf3* ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 และยีนตำแหน่ง *Rf4* ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 10 โดย ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการใช้ single segment substitution line (SSSL) คือโคลน W23-19-06-06-11 ที่มีส่วนของยีนตำแหน่ง *Rf4* และ *Rf3* แสดงความสามารถในการแก้ความเป็นหมันของ เกสรตัวผู้ได้

งานวิจัยที่ศึกษายีนแก้หมันที่ตำแหน่ง *Rf3*

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ทำให้ทราบว่ายีนที่ตำแหน่ง *Rf3* นั้นตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 ต่อมา Zhang et al. (1997) ได้ทำการสร้างแผนที่ของยีนตำแหน่ง *Rf3* จากประชากรจำนวน 3 กลุ่ม ได้แก่ ประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างข้าวพันธุ์ Zhensham97A กับ ZSR21 การผสมระหว่าง ข้าวพันธุ์ Zhensham97A กับ IR24 และประชากร BC_1 ที่ได้จากการผสมระหว่างข้าวพันธุ์ IR58025A/IR36/IR58025B จากนั้นได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD จำนวน 720 ไพรเมอร์ ใน การศึกษาพบว่ามีจำนวน 6 ไพรเมอร์ ที่อยู่บริเวณตำแหน่ง *Rf3* จากนั้นได้มีการทดสอบด้วย เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RFLP พบว่าไพรเมอร์ RG532 ในข้าวกลุ่มเดียวกับคือสายพันธุ์ A จากข้าว พันธุ์ Zhensham97A และ IR58025A นั้นปรากฏแถบแบนที่ขนาดแตกต่างกัน เช่นเดียวกับในกลุ่ม สายพันธุ์ R จากข้าวพันธุ์ IR24 และ IR36 ซึ่งต่อมา Alavi et al. (2009) ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติม เกี่ยวกับตำแหน่ง *Rf3* ที่ทำการศึกษาจากประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่างข้าวพันธุ์ Neda-A กับ IR36 พบว่าตำแหน่ง *Rf3* นั้นตั้งอยู่บริเวณแขนข้างสั้น บนโครโมโซมแท่งที่ 1 พบ RM1 ตำแหน่ง 5.6 cM และที่ RM3873 ตำแหน่ง 14 cM

จากการศึกษาของ Tada (2007) ที่ได้ศึกษาถึงยีนแก้ความเป็นหมันที่ตำแหน่ง *Rf3* เพื่อ ทดสอบความสามารถในการแก้ความเป็นหมัน พบว่ายังไม่สามารถบอกได้ถึงการทำงานของยีนที่ ตำแหน่ง *Rf3* ที่แน่นอน แต่จากการศึกษาทำให้เห็นว่ายีนที่ตำแหน่ง *Rf3* ที่แสดงลักษณะเด่นเพียงยีน เดียวยังไม่สามารถแก้ความเป็นหมันในระบบ WA-CMS ได้ ซึ่งอาจจะเกิดจากการที่จะต้องมีการ

ทำงานร่วมกับยีนอื่น และจากการศึกษานี้พบว่า ยีนที่ตำแหน่ง *Rf3* ไม่สามารถแก้ความเป็นหมันได้ แต่จะช่วยสนับสนุนในส่วนของการพัฒนาของละอองเกสรในเกสรตัวผู้ ในปี 2012 ได้มีการศึกษาถึง ยีนที่ตำแหน่ง *Rf3* เพื่อนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายที่ใช้ในการคัดเลือกข้าวในกลุ่มต่างๆ โดยงานวิจัยของ Suresh et al. (2012) พบว่ายีนที่ตำแหน่ง *Rf3* ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบความเป็นหมันแบบ WA-CMS นั้น คาดว่าจะประกอบด้วยยีนจำนวน 4 ยีน ได้แก่ ยีน *Os01g09560* ที่เป็นรหัสของโปรตีน mitochondrial-processing peptidase subunit alpha ยีน *Os01g09670* ที่เป็นรหัสของโปรตีน pollen-specific protein SF21 และ ยีน *Os01g10090* กับ *Os01g10800* ที่เป็นรหัสของโปรตีน PPR โดยยีน 4 ยีนนี้ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 และได้พัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมาย เพื่อใช้แยกความแตกต่างระหว่างข้าวสายพันธุ์ A และข้าวสายพันธุ์ R ออกจากกัน พบว่าจากไพรเมอร์ที่ออกแบบทั้งหมดจำนวน 23 ไพรเมอร์ มีจำนวน 4 ไพรเมอร์ ที่สามารถแยกความแตกต่างของยีนได้ ได้แก่ ไพรเมอร์ DRCG-RF3-2 และ DRCG-RF3-13 โดยไพรเมอร์ DRCG-RF3-2 อยู่ภายในยีน *Os01g09560* ซึ่งเป็นรหัสของโปรตีน mitochondrial-processing peptidase subunit alpha โดยพบว่าเกิดการขาดหายไปของลำดับเบส TT ที่ตำแหน่ง 907 ถึง 908 ในข้าวสายพันธุ์ R และไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 อยู่ภายในยีน *Os01g09670* ซึ่งเป็นรหัสของโปรตีน pollen-specific SF21 โดยพบว่าเกิดการขาดหายไปของลำดับเบส 2 ตำแหน่งในข้าวสายพันธุ์ R คือ ที่ตำแหน่ง 29 ถึง 30 คือเบส GA และที่ตำแหน่ง 77 ถึง 79 คือเบส GAG

งานวิจัยที่ศึกษา ยีนแก้หมันที่ตำแหน่ง *Rf4*

การพัฒนาข้าวลูกผสม พบระบบที่นิยมนำมาใช้คือระบบ WA-CMS โดยจากการศึกษาของ Kazama and Toriyama (2014) พบว่าในการพัฒนาพันธุ์ข้าวลูกผสมประมาณ 99 เปอร์เซ็นต์ ได้มาจากระบบความเป็นหมันแบบ WA-CMS ซึ่งผู้วิจัยได้ทำการโคลนยีนแก้ความเป็นหมัน ในตำแหน่งของยีน *Rf4* จากข้าวพันธุ์ IR24 พบว่าบริเวณดังกล่าวเป็นยีนในกลุ่ม PPR โดยประกอบด้วยยีน *PPR454*, *PPR782a*, *PPR782b* และ *PPR458* เมื่อทำการถ่ายยีน *PPR782a* เข้าไปในข้าวพันธุ์ WAA ที่สร้างให้มีความเป็นหมันแบบ WA-CMS แต่มีพื้นฐานมาจากข้าวพันธุ์ Taichung 65 เพื่อดูระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าว และพบการมีชีวิตของเกสรตัวผู้หลังจากทำการย้อมด้วย I_2-KI ซึ่งยีนที่อยู่ตำแหน่ง *Rf4* ที่เป็นรหัสของโปรตีน PPR สามารถลดระดับของอาร์เอ็นเอ WA352 ลงจากเดิม

นอกจากนี้จากการศึกษาเพิ่มเติมถึงการสร้างแผนที่ยีน และโคลนยีนตำแหน่ง *Rf4* ของ Tang et al. (2014) ซึ่งศึกษาในข้าวพันธุ์ Minghui63 ที่มียีนที่ตำแหน่ง *Rf4* และ *Rf3* พบว่าบริเวณของยีนที่ตำแหน่ง *Rf4* นั้นเป็นรหัสของโปรตีน pentatricopeptide repeat (PPR) หลายยีน จากนั้นจึงได้ทำการโคลนยีน PPR ต่างๆ ได้แก่ PPR7-454-M, PPR9-782-M และ PPR10-454-M เพื่อถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวพันธุ์ Zhenshan 97A (ZS97A) ที่แสดงความเป็นหมันแบบ WA-CMS และมียีนที่ตำแหน่ง *rf4* และ *rf3* แสดงลักษณะต้อย ได้ต้นข้าวตัดแปลงรุ่น T₀ จากยีน PPR7-454-M (จำนวน 17 ต้น) และ PPR10-454-M จำนวน 21 ต้น นั้นแสดงลักษณะเป็นหมัน แต่ต้นข้าวที่มียีน PPR9-782-M จำนวน 11 ต้น โดยจำนวน 3 ต้น พบการมีชีวิตของเกสรตัวผู้หลังจากทำการย้อมด้วย I₂-KI ที่ 35, 29 และ 36 เปอร์เซ็นต์

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนที่ตำแหน่ง *Rf4* จากงานวิจัยของ Kazama and Toriyama (2014) จากข้าวพันธุ์ IR24 และ Tang et al. (2014) จากข้าวพันธุ์ Minghui63 จะพบว่า ยีน PPR454 จะมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับยีน PPR10-454-M, ยีน PPR782a จะมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับยีน PPR9-782-M และยีน PPR458 จะมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับยีน PPR7-454-M ตามลำดับ

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างข้าวที่นำมาใช้ในการศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสของยีนแก้ความเป็นหมัน มีทั้งหมด 7 พันธุ์ โดยแบ่งกลุ่มเป็น

ข้าวพันธุ์ A (A-line หรือ male sterile line) ได้แก่ ข้าวพันธุ์ IR58025A

ข้าวพันธุ์ B (B-line หรือ maintainer line) ได้แก่ ข้าวพันธุ์ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105 และเจ้าหอมนิล

ข้าวพันธุ์ R (R-line หรือ fertility restorer line) ได้แก่ ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1, กข47 และ IR64

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

เชื้อสายพันธุ์ต่างๆ และ เอนไซม์ตัดจำเพาะ

1. เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α
2. ดีเอ็นเอพาทะ pBluescript SK⁺
3. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII* (Biolabs, New England)

สารเคมี

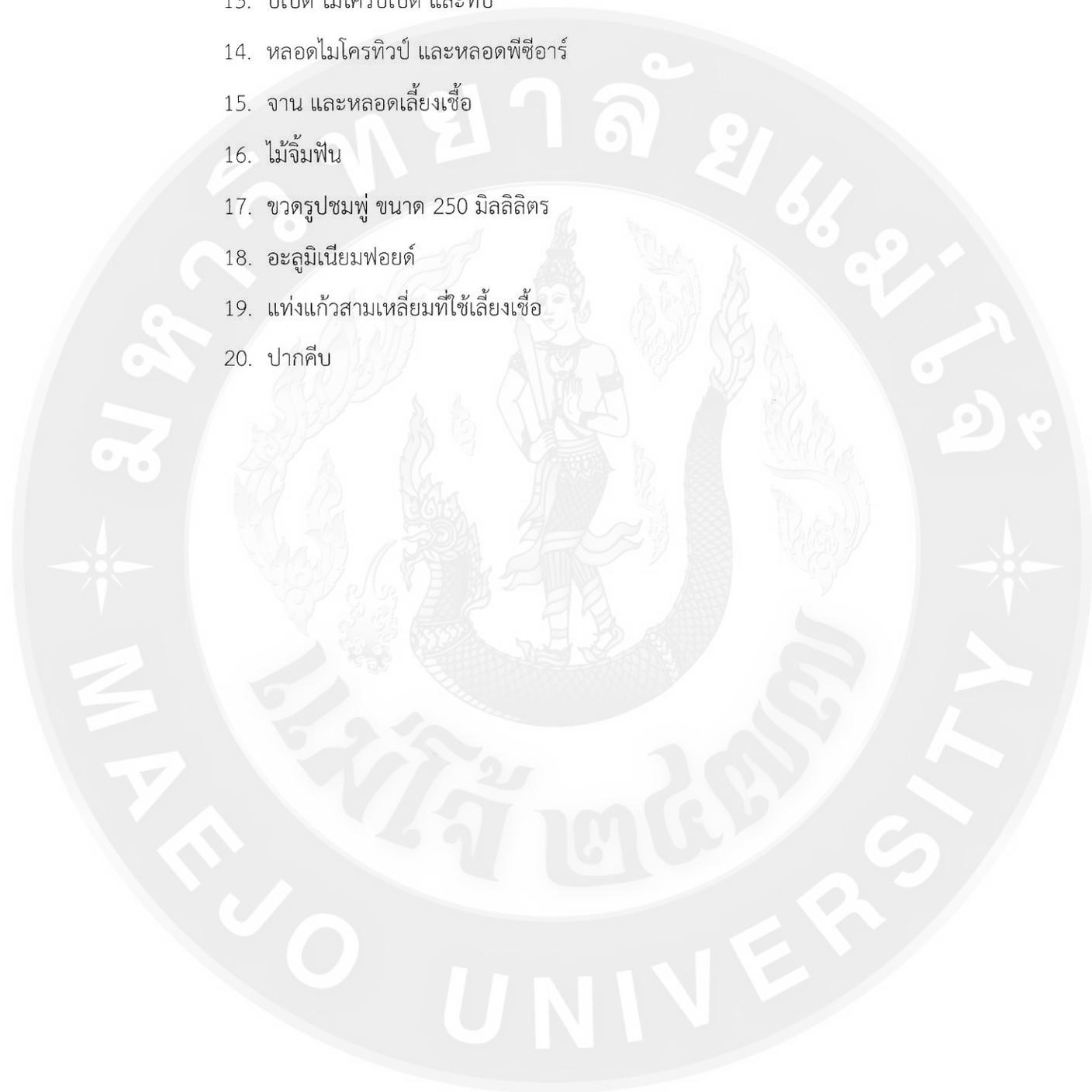
1. บัฟเฟอร์สำเร็จรูป GeNei™ Red Dye PCR Master Mix (Merck, India)
2. บัฟเฟอร์สำเร็จรูป Phusion Flash High-Fidelity PCR Mester Mix (Thermo Scientific, USA)
3. ชุดการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอของ PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen USA)

4. สารละลายสำหรับการสกัดดีเอ็นเอสายผสมของ CTAB Mini Plasmid Preparation
5. อาหารแข็ง และอาหารเหลว สูตร LB (Luria-Bertani medium)
6. อะกาโรส (agarose) (Invitrogen, USA)
7. สาร SYBR Safe (Invitrogen, USA)
8. บัฟเฟอร์ TBE
9. ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน
10. บัฟเฟอร์ Rapid size screening ที่ประกอบด้วย 5 mM EDTA, 10% (w/v) sucrose, 0.25% (w/v) SDS, 100 mM NaOH, 60 mM KCl, 0.05% (w/v) bromophenol blue
11. สาร 5-Bromo-4-chloro-Indolyl- β -D-Galactoside (X-gal)
12. สาร Isopropyl-beta-thio galactopyranoside (IPTG)
13. สารละลายไอโอดีนโปแทสเซียมไอโอดีน (I_2 -KI)
14. แอลกอฮอล์

อุปกรณ์

1. เครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ T100™ Thermal Cycler และ C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-rad, Singapore)
2. อุปกรณ์สำหรับการทำ electrophoresis
3. เครื่อง UV transilluminator (Major Science®, Taiwan)
4. ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
5. ตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
6. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง
8. ตู้ปัม
9. เครื่องเขย่า (Vortex)
10. เต้าไมโครเวฟ
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

12. เครื่องผสมสาร (Magnetic Sterrier)
13. ปิเปต ไมโครปิเปต และทิป
14. หลอดไมโครทิวบ์ และหลอดพีซีอาร์
15. จาน และหลอดเลี้ยงเชื้อ
16. ไม้จิ้มฟัน
17. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
18. อะลูมิเนียมฟอยด์
19. แท่งแก้วสามเหลี่ยมที่ใช้เลี้ยงเชื้อ
20. ปากคืบ



วิธีการวิจัย

1. การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแก้ความเป็นหมันในระบบ WA-CMS

1.1 การศึกษาไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแก้ความเป็นหมันตำแหน่ง *Rf3*

งานวิจัยของ Suresh et al. (2012) ที่ได้พัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายจำนวน 23 ไพรเมอร์ เพื่อใช้แยกความแตกต่างระหว่างข้าวสายพันธุ์ A และข้าวสายพันธุ์ R ออกจากกัน โดยพบว่าไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 ที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน *Os01g09670* ซึ่งเป็นรหัสของโปรตีน pollen-specific SF21 จะเกิดการขาดหายไปของลำดับเบส 2 ตำแหน่งในข้าวสายพันธุ์ R ได้แก่ตำแหน่ง 29 ถึง 30 คือเบส GA และที่ตำแหน่ง 77 ถึง 79 คือเบส GAG เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ A จึงทำให้สามารถแยกข้าวทั้งสองกลุ่มออกจากกันได้ โดยจากการตรวจสอบเอกสารจะพบว่าข้าวสายพันธุ์ A และข้าวสายพันธุ์ B นั้นจะมียีนในนิวเคลียสเหมือนกันแต่จะต่างกันที่ยีนในไซโทพลาซึม

ดังนั้นไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 ก็น่าจะสามารรถทำการแยกข้าวสายพันธุ์ B ออกจากข้าวสายพันธุ์ R ได้เช่นกัน ในงานวิจัยนี้จึงจะใช้ไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 ในการแยกความแตกต่างของข้าวทั้ง 2 กลุ่ม โดยได้ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของไพรเมอร์ที่กับลำดับเบสของยีน *Os01g09670* ที่อยู่ในฐานข้อมูล (RGAP ; <http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>) เพื่อหาบริเวณที่ไพรเมอร์เข้าไปจับและขนาดของชิ้นยีนที่จะเพิ่มจำนวนได้

1.2 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแก้ความเป็นหมันตำแหน่ง *Rf4*

จากการศึกษาของ Tang et al. (2014) พบว่ายีนแก้ความเป็นหมันที่ตำแหน่ง *Rf4* นั้นประกอบไปด้วยยีนโปรตีน pentatricopeptide repeat หรือ PPR ซึ่งยีนดังกล่าวนี้มักจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม โดยยีน PPR ที่อยู่ในตำแหน่ง *Rf4* นี้ประกอบไปด้วยยีน *PPR7*, *PPR8*, *PPR9* และ *PPR10* แต่ยีน *PPR8* จะพบเฉพาะในข้าวอินดิกาเท่านั้น ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *PPR7*, *PPR9* และ *PPR10* โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีน PPR ที่มีรายงานฐานข้อมูล (NCBI ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) จากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่ Tang et al. (2014) ได้ทำการศึกษา

นอกจากนั้น Kazama and Toriyama (2014) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ คาดว่าจะเป็นยีนแก้ความเป็นหมันตำแหน่ง *Rf4* โดยทางผู้ศึกษาได้เรียกชื่อของยีนต่างๆ แตกต่างไป จากทาง Tang et al. (2014) โดยจะใช้ขนาดของโปรตีนต่อท้ายยีน *PPR* แต่หากเปรียบเทียบลำดับ เบสแล้วจะพบว่าเป็นลำดับเบสของยีนเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ข้อมูลของยีน *PPR7*, *PPR9* และ *PPR10* ที่ได้จากฐานข้อมูล

ชื่อยีน ที่ศึกษา	ชื่อข้าวพันธุ์	ชื่อยีนใน ฐานข้อมูล	รหัสใน ฐานข้อมูล (accession)	ชนิดของข้าว (Subspecies)	ประเภทของ พันธุ์
<i>PPR7</i>	Minghui 63*	<i>PPR7-454-M</i>	KJ680242	<i>indica</i>	R-line
	IR24*	<i>PPR7-458-I</i>	KJ680243	<i>indica</i>	R-line
	ZS97A*	<i>PPR7-458-Z</i>	KJ680244	<i>indica</i>	A-line
	ZH11*	<i>PPR7-458-ZH</i>	KJ680245	<i>japonica</i>	B-line
	IR24**	<i>PPR458</i>	AB900794	<i>indica</i>	R-line
<i>PPR9</i>	Minghui 63*	<i>PPR9-782-M</i>	KJ680249	<i>indica</i>	R-line
	IR24*	<i>PPR9-782-I</i>	KJ680248	<i>indica</i>	R-line
	ZS97A*	<i>PPR9-409-Z</i>	KJ680247	<i>indica</i>	A-line
	ZH11*	<i>PPR9-782-ZH</i>	KJ680250	<i>japonica</i>	B-line
	IR24**	<i>PPR782a</i>	AB900792	<i>indica</i>	R-line
<i>PPR10</i>	Minghui 63*	<i>PPR10-454-M</i>	KJ680251	<i>indica</i>	R-line
	ZS97A*	<i>PPR10-454-Z</i>	KJ680252	<i>indica</i>	A-line
	93-11*	<i>PPR10-569-93</i>	KJ680253	<i>indica</i>	B-line
	IR24**	<i>PPR454</i>	AB900791	<i>indica</i>	R-line

หมายเหตุ: * คือ จากการศึกษาของ Tang et al. (2014)

** คือ จากการศึกษาของ Kazama and Toriyama (2014)

โดยหลักการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนของโปรตีน PPR ในงานวิจัยนี้จะทำการออกแบบไพรเมอร์อยู่ภายนอกของบริเวณรหัสที่จะถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีนทั้งในด้าน Forward และ Reverse ดังนี้

1. ไพรเมอร์ด้าน Forward: ออกแบบจากปลายด้าน 5' ที่อยู่หน้ารหัสเริ่มต้นการแปลรหัส (start codon) โดยมีลำดับเบสและทิศทาง เช่นเดียวกับสายดีเอ็นเอที่ได้จากฐานข้อมูล
2. ไพรเมอร์ด้าน Reverse: ออกแบบจากปลายด้าน 3' ที่อยู่หลังรหัสหยุด (stop codon) โดยเป็นสาย reverse complementary กับสายดีเอ็นเอที่ได้จากฐานข้อมูล

เริ่มจากเปรียบเทียบลำดับเบสของแต่ละยีนด้วยโปรแกรม ClustalX (1.8) ร่วมกับโปรแกรม GeneDoc (2.7.0.0) เพื่อหาบริเวณอนุรักษ์ที่จำเพาะกับแต่ละยีน โดยไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบนั้นจะต้องไม่สามารถจับกับยีนอื่นได้

จากนั้นจะทำการวิเคราะห์ลักษณะต่างๆ ของไพรเมอร์ที่ได้ทำการออกแบบโดยใช้โปรแกรม OligoAnalyzer 3.1 (<http://sg.idtdna.com/calc/analyzer>) ซึ่งลักษณะของไพรเมอร์ที่เหมาะสมนั้นควรมีความยาวอยู่ที่ประมาณ 15-30 นิวคลีโอไทด์ ในส่วนของด้านปลาย 3' ควรเป็นลำดับเบส C, G, CG หรือ GC เพื่อประสิทธิภาพในการจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ และจากการใช้โปรแกรม OligoAnalyzer 3.1 ในการช่วยวิเคราะห์ความเหมาะสมของไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบนั้นควรมีปริมาณ GC (%GC) ประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ ค่า Melt temp (T_m) ควรอยู่ระหว่าง 55-80 องศาเซลเซียส และไม่พบการเกิด primer dimer และ hairpin ในไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบ

2. การสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากใบข้าวที่ใช้ในการศึกษา

ในการสกัดดีเอ็นเอเริ่มจากการเพาะเมล็ดข้าวที่ใช้ในการศึกษาทั้ง 6 พันธุ์ ได้แก่ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1, กข47 และ IR64 เป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการตัดใบขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 10-15 ชิ้น ใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งได้ใส่เม็ดปัดสำหรับการบดตัวอย่างลงไปหลอดประมาณ 3 เมล็ด โดยในการสกัดดีเอ็นเอจะมีขั้นตอนต่อไปนี้

2.1 เติมสารละลาย CTAB ดัดแปลง (modified Cetyl Trimethyl ammonium Bromide buffer) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ (V/V) ของ 2-mercaptoethanol ลงในหลอดที่มีตัวอย่างของใบข้าวอยู่

2.2 บดตัวอย่างโดยใช้เครื่องตีตัวอย่าง โดยจะทำการตีตัวอย่างนาน 30 วินาที จำนวน 6 ครั้ง หรือจนกว่าใบข้าวจะแตกละเอียด

2.3 บ่มตัวอย่างในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ผสมโดยการกลับหลอดทุก ๆ 10 นาที

2.4 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที

2.5 ย้ายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ และเติมเอนไซม์ RNaseA ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1/300 เท่าของสารละลาย

2.6 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.7 เติมโคลิฟอร์ม ปริมาตร 500 มิลลิลิตร หรือเติมเท่ากับปริมาตร 1 เท่าของตัวอย่างที่ดูดได้จากข้อ 2.5. ทำการกลับหลอดไปมาเพื่อผสมตัวอย่าง

2.8 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที

2.9 ย้ายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ โดยทำซ้ำในข้อ 2.7 และ 2.8 จำนวน 1 รอบ

2.10 เติม 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลเย็น ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย จากนั้นผสมให้เข้ากัน

2.11 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

2.12 เท 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลทั้ง เติมเอทานอลเย็น ที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ

2.13 ปั่นเหยียงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที โดยล้างตะกอนด้วยเอทานอลเย็น ที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง

2.14 ตากตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ให้แห้ง แล้วละลายตะกอนกลับด้วย 10 ไมโครโมลาร์ Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

จากนั้นตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็นเอด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟเรซิส ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1XTBE ที่มีส่วนผสมของ SYBR Safe (Invitrogen, USA) เพื่อใช้ในการย้อมแถบดีเอ็นเอ

3. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

3.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ DRCG-RF3-13

ไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 ที่ได้จากการศึกษาของ Suresh et al. (2012) เพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างของยีนตำแหน่ง *Rf3* ในข้าวสายพันธุ์ B และสายพันธุ์ R ในการทดลองขั้นต้นนี้จะเป็นการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยีน โดยในขั้นตอน annealing จะทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 50 และ 55 องศาเซลเซียส ด้วยชุดน้ำยา 1X Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA) ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา คือ 0.5 ไมโครโมลาร์ ดีเอ็นเอตัวอย่างประมาณ 50 นาโนกรัม ในปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้สภาวะที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส 10 วินาที จากนั้นเข้าสู่ 98 องศาเซลเซียส 5 วินาที 50 หรือ 55 องศาเซลเซียส 5 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที เป็นจำนวน 50 รอบ สูดท้ายอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

3.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ของยีน *PPR*

นำไพรเมอร์ของยีน *PPR* ทั้ง 3 คู่ ที่ออกแบบได้ มาใช้ในการทดลอง โดยจะเริ่มจากการทดสอบหาอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่เหมาะสม โดยทดสอบที่อุณหภูมิ 50, 55, 58 และ 60 องศาเซลเซียส ด้วยชุดน้ำยา 1X Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA) ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา คือ 0.5 ไมโครโมลาร์ ดีเอ็นเอตัวอย่างประมาณ 50 นาโนกรัม ในปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา จากนั้นทำ

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้สภาวะที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส 10 วินาที จากนั้นเข้าสู่ 98 องศาเซลเซียส 10 วินาที 50 - 60 องศาเซลเซียส 5 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที เป็นจำนวน 50 รอบ สุดท้ายอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

เมื่อสิ้นสุดการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจะทำการวิเคราะห์ผลที่ได้โดยใช้เทคนิคอะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1XTBE ที่มีส่วนผสมของ SYBR Safe (Invitrogen, USA) เพื่อใช้ในการย้อมแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที

4. การเพิ่มจำนวนยีนแก้ความเป็นหมันจากข้าว

4.1 การเพิ่มจำนวนยีนที่ตำแหน่ง *Rf3* ด้วยไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 จากข้าว

จากการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ด้วยไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 พบว่าในขั้นตอน annealing อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 จากตัวอย่างข้าวจำนวน 6 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1, กข47 และ IR64 โดยใช้ชุดน้ำยา 1X Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA) ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา คือ 0.5 ไมโครโมลาร์ ดีเอ็นเอตัวอย่างประมาณ 50 นาโนกรัม ในปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้สภาวะที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส 10 วินาที จากนั้นเข้าสู่ 98 องศาเซลเซียส 5 วินาที 55 องศาเซลเซียส 5 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที เป็นจำนวน 50 รอบ สุดท้ายอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที โดยในข้าวแต่ละพันธุ์จะทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเท่ากับ 2 ปฏิกิริยาต่อตัวอย่างเพื่อใช้ในการแยกบริสุทธิ์ต่อไป

4.2 การเพิ่มจำนวนยีน *PPR* ทั้ง 3 ยีนจากข้าว

ในการเพิ่มจำนวนยีน *PPR* จะใช้อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมกับแต่ละยีนที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้า โดยยีน *PPR7* จะใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ส่วนยีน *PPR9* และ *PPR10* จะใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ตัวอย่างข้าวที่ใช้ จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ IR58025B, ชัยนาท1 และ IR64 โดยใช้ชุดน้ำยา 1X Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific, USA) ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา คือ 0.5 ไมโครโมลาร์ สำหรับดีเอ็นเอตัวอย่างประมาณ 50 นาโนกรัม ในปริมาตรรวมของปฏิกิริยาเท่ากับ 20 ไมโครลิตรต่อปฏิกิริยา จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้สภาวะที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส 10 วินาที จากนั้นเข้าสู่ 98 องศาเซลเซียส 10 วินาที ยีน *PPR7* จะใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 5 วินาที ส่วนยีน *PPR10* จะใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 5 วินาที จากนั้นเข้าสู่ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที เป็นจำนวน 50 รอบ สุดท้ายอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที โดยในข้าวแต่ละพันธุ์จะทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเท่ากับ 2 ปฏิกิริยาต่อตัวอย่างเพื่อใช้ในการแยกบริสุทธิ์ต่อไป

จากเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 และการเพิ่มจำนวนยีน *PPR* ทั้ง 3 ยีนจากข้าว วิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยการแยกขนาดโดยใช้เทคนิคอะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1XTBE ที่มีส่วนผสมของ SYBR Safe (Invitrogen, USA) เพื่อใช้ในการย้อมแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที จากนั้นทำการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสำเร็จรูป PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA) และส่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่แยกบริสุทธิ์ได้ไปอ่านลำดับเบสที่บริษัท 1st Base Sequencing (Malaysia)

5. การโคลนยีน *PPR7* และ *PPR10*

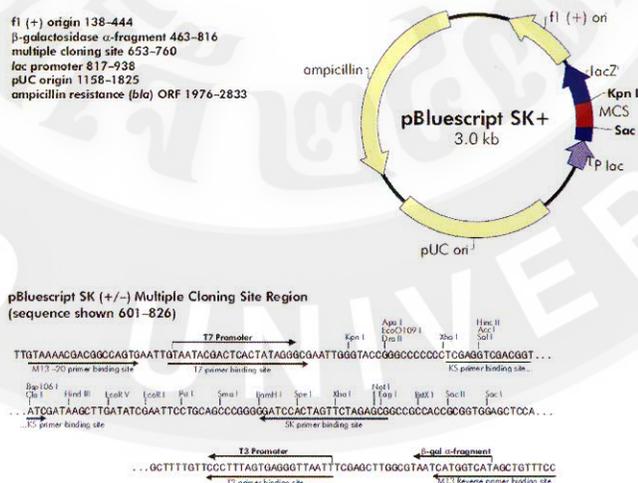
จากการเลือกแถบแบนที่คาดว่าจะเป็ยีน *PPR9* ไปทำการวิเคราะห์ลำดับเบสแล้วพบว่าไม่ใช่ยีน *PPR9* ที่สนใจ ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้จะทำการศึกษาเฉพาะในส่วนของยีน *PPR7* และยีน *PPR10* โดยขั้นตอนในการโคลนยีนจะมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

5.1 การเตรียมตัวอย่างชิ้นยีนที่ศึกษาจากข้าวพันธุ์ต่างๆ

ทำการเพิ่มปริมาณของยีนด้วยการทำ PCR ของตัวอย่างข้าว 6 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1, กข47 และ IR64 โดยขั้นตอนในการเพิ่มชิ้นยีนด้วยเทคนิค PCR นั้นจะใช้ขั้นตอนเดียวกับขั้นตอนที่ 4.2 โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อยีน *PPR7* จะใช้อุณหภูมิในขั้น Annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะต่อยีน *PPR10* จะใช้อุณหภูมิในขั้น Annealing ที่ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสำเร็จรูป PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA) ตอนขั้นตอนของชุดสำเร็จรูป

5.2 การเตรียมดีเอ็นเอพาหะ pBluescript SK⁺

ในการโคลนยีนจะใช้ดีเอ็นเอพาหะ pBluescript SK⁺ (ภาพที่ 5) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV* (Biolabs, New England) ซึ่งจะทำให้ดีเอ็นเอพาหะมีปลายทั้งสองด้านของดีเอ็นเอเป็นปลายที่ เพื่อให้เชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจ ซึ่งได้จากการทำ PCR



ภาพที่ 5 แผนที่ของดีเอ็นเอพาหะ pBluescript SK⁺

ที่มา: https://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/pBluescript_SK_plus.pdf

เริ่มจากการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี CTAB Mini Plasmid Preparation ซึ่งจะมีขั้นตอนดังนี้

5.2.1 ตูตเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pBluescript SK⁺ ที่เลี้ยงไว้ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่ตั้งส่วนใส ทำซ้ำ 3 ครั้ง

5.2.2 เติมสารละลาย STET Buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ lysozyme ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร แล้วนำละลายตะกอนเซลล์โดยใช้เครื่อง vortex

5.2.3 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการบ่มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

5.2.4 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ย้ายส่วนใสไปไว้ในหลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

5.2.5 เติมเติมสายละลาย CTAB ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเพื่อผสม แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

5.2.6 ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่ตั้งส่วนน้ำ

5.2.7 เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ RNaseA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

5.2.8 เติมโคโลฟอร์ม 1 ปริมาตร (ประมาณ 510 ไมโครลิตร) ผสม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ตูดส่วนบนไว้หลอดใหม่ (ประมาณ 400 ไมโครลิตร)

5.2.9 เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) pH 5.6 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ เท่ากับ 0.1 ปริมาตร (ประมาณ 40 ไมโครลิตร) และเติม 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 2 ปริมาตร (ประมาณ 880 ไมโครลิตร)

5.2.10 บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ค้างคืน (ประมาณ 15-17 ชั่วโมง)

5.2.11 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งส่วนน้ำ
ระวังอย่าให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุด

5.2.12 เติม 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่
ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำ ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ

5.2.13 ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง และละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยสารละลาย Tris-HCl pH 8.0
ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV* (Biolabs, New England)
บ่มปฏิกิริยาการตัดที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมคินแล้วทำการทำการแยกขนาดโดยใช้
เทคนิคอะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟเรซิส และแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอด้วยชุดสำเร็จรูป PureLink™ Quick
Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA) จากนั้นวิเคราะห์ผลการแยกบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค อะกาโรส
เจล อิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

5.3 การเชื่อมชิ้นยีน *PPR7* และ *PPR10* เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pBluescript SK⁺

จากการเตรียมชิ้นยีน *PPR7* และ *PPR10* ในขั้นตอนที่ 5.1 จากข้อ 6 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์
IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1, กข47 และ IR64 จะทำการเชื่อมชิ้นยีนกับดี
เอ็นเอพาหะที่เตรียมไว้ในขั้นตอนที่ 5.2 ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase (Biolabs, New England)
โดยในการเชื่อมนั้นจะใช้อัตราส่วนระหว่างชิ้นยีนที่ศึกษากับดีเอ็นเอพาหะเป็น 3 : 2

บ่มตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ซ้ำมคิน เก็บปฏิกิริยาการเชื่อมไว้ที่ -
20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coil* ต่อไป

5.4 การเตรียม competent cell เชื้อ *E. coil* สายพันธุ์ DH5 α

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เชื้อ *E. coil* สายพันธุ์ DH5 α โดยในขั้นต้นได้ทำการขีดเชื้อ
E. coil สายพันธุ์ DH5 α ลงในอาหารแข็ง LB บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมคิน

5.4.1 นำโคโลนีเดี่ยวของ *E. coil* สายพันธุ์ DH5 α เลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5
มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมคินสำหรับเตรียม starter

5.4.2 ใส่เชื้อ (จากข้อ 5.4.1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50
มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เลี้ยงจนกว่าได้ค่าการ
ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2-0.5

5.4.3 เทเชื้อใส่ในหลอดสำหรับปั่นเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร ปั่นเก็บเซลล์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

5.4.4 เทอาหารออก จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) เย็น ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ทำการเติมสารละลายเพิ่มอีก 16 มิลลิลิตร

5.4.5 บ่มในน้ำแข็ง นาน 20 นาที จากนั้นทำการปั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

5.4.6 เทสารละลายทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 50 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติม 80 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลง จากนั้นแบ่งเซลล์ใส่หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 200 ไมโครลิตร จากนั้นจะทำการเก็บเซลล์ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมต่อไป

5.5 การถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมที่ได้เข้าสู่เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α

การถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมจะใช้ดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จากการเชื่อมชิ้นยีนในขั้นตอนที่ 5.3 มาทำการถ่ายฝากเข้าสู่ competent cell ที่เตรียมจากเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ในขั้นตอนที่ 5.4 โดยขั้นตอนในการถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมมีดังนี้

5.5.1 เติมดีเอ็นเอสายผสมปริมาตร 10 ไมโครลิตร ที่ได้จากการเชื่อมไว้แล้วใส่ในหลอดที่มี competent cell ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำการบ่มในน้ำแข็ง 20 นาที

5.5.2 นำอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินมาตากให้แห้ง จากนั้นหาสารละลาย 5-bromo-4-chloro-indoly- β -D-galactoside (X-gal) และสารละลาย isopropyl-beta-thio galactopyranoside (IPTG) ลงบนอาหาร

5.5.3 ทำการบ่มหลอดตัวอย่างจากข้อ 5.5.1 ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

5.5.4 เมื่อครบเวลาย้ายหลอดบ่มในน้ำแข็งทันที จากนั้นเติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ทำการเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 60 นาที

5.5.5 นำหลอดมาปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

5.5.6 ตูดส่วนใสด้านบนปริมาณ 800 ไมโครลิตร ทิ้ง จึงเหลือประมาณ 200 ไมโครลิตร ทำการดูดชั้นลงเพื่อละลายตะกอนเซลล์จากนั้นตูดใส่อาหารแข็ง LB ที่เตรียมไว้ในข้อ 5.5.2 ทำการทาบอาหารจนแห้ง

บ่มจานอาหารแข็งในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน จากนั้นนำไปแช่ตู้เย็นเพื่อช่วยเพิ่มปฏิกิริยาการเกิดสีของโคลีนีสีฟ้า โดยหากเป็นโคลีนีสีขาวแสดงว่าได้รับดีเอ็นเอสายผสม

5.6 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด

ทำการคัดเลือกโคลีนีสีฟ้าที่ได้จากการถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสม โดยจากตัวอย่างทั้งสิ้น 12 ตัวอย่าง จะทำการคัดเลือกโคลีนีสีขาวในแต่ละตัวอย่างมา ตัวอย่างละ 10 โคลีนีสีและโคลีนีสีฟ้าจำนวน 1 โคลีนีสี เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม จากนั้นทำการเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีแอมพิซิลินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เชย้าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ซ้ำมคืน จากนั้นคัดเลือกด้วยวิธีการดังนี้

5.6.1 เก็บเซลล์จากเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส

5.6.2 เติมนสารละลาย lysis buffer (5 mM EDTA, 10% w/v sucrose, 0.25%w/v SDS, 100 mM NaOH, 60 mM KCl, 0.05%w/v bromophenol blue) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมด้วยเครื่อง Vortex

5.6.3 บ่มหลอดในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

5.6.4 เมื่อครบเวลาย้ายหลอดไปบ่มในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที

5.6.5 ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที

5.6.6 ตูดเฉพาะของเหลวด้านบนปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการวิเคราะห์

แยกดีเอ็นเอสายผสมด้วยขนาด โดยเทคนิคอะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1XTBE ที่มีส่วนผสมของ SYBR Safe (Invitrogen, USA) เพื่อใช้ในการย้อมแถบดีเอ็นเอ ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง โดยจะต้องใช้ตัวอย่างจากโคลีนีสีฟ้าเป็นตัวควบคุมที่ใสในช่องแรก และช่องสุดท้ายของเจล ส่วนช่องที่เหลือให้ใส่ตัวอย่างที่ได้จากโคลีนีสีขาว จากนั้นทำการคัดเลือกโคลีนีสีที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ช้ากว่าตัวอย่างในช่อง

โคลนนี้สีฟ้า มาทำการสกัดดีเอ็นเอสายผสมด้วยวิธี CTAB Mini Plasmid Preparation เพื่อใช้ในขั้นต่อไป

5.7 การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตัดดีเอ็นเอสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (Biolabs, New England) ร่วมกับ *HindIII* (Biolabs, New England) ที่มีบริเวณจดจำขาหน้าบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV* เพื่อเป็นการตรวจสอบว่าเป็นดีเอ็นเอสายผสม เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองชิ้นของยีนจะแยกออกจากดีเอ็นเอพาหะ pBluescript SK⁺ ทำให้สามารถคัดเลือกโคลนที่มีการแทรกของชิ้นยีนในขนาดที่ต้องการได้

บ่มปฏิบัติการการตัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นทำการทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอขนาดโดยใช้เทคนิคอะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1XTBE ที่มีส่วนผสมของ SYBR Safe (Invitrogen, USA) เพื่อใช้ในการย้อมแถบดีเอ็นเอ ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที

คัดเลือกโคลนของดีเอ็นเอสายผสมที่ได้ทำการตรวจสอบไปอ่านลำดับเบสที่บริษัท 1st Base Sequencing (Malaysia) โดยจากการคัดเลือกโคลนที่ได้จากข้าวแต่ละพันธุ์จำนวนอย่างน้อย 2 โคลน เพื่อส่งไปอ่านลำดับเบส

6. การอ่านและวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนแก้ความเป็นหมันระบบ WA-CMS

6.1 ลำดับเบสของยีนที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ DRCG-RF3-13

จากการเพิ่มจำนวนชิ้นยีนที่ได้จากไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 ของข้าวจำนวน 6 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1, กข47 และ IR64 ที่ได้ทำการแยกบริสุทธิ์จากเจลด้วยชุดสำเร็จก่อนจะส่งไปอ่านลำดับเบสที่บริษัท 1st Base Sequencing (Malaysia)

ในขั้นต้นเมื่อได้ผลลำดับเบสจากบริษัทจะต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสที่ได้โดยใช้โปรแกรม FinchTV (1.4.0) เพื่อดูความถูกต้องของลำดับเบสโดยหากโครมาโทแกรมเกิดการซ้อนทับกันของสัญญาณแสงที่แสดงในแต่ละลำดับเบส จะส่งผลให้การอ่านลำดับเบสมีความผิดพลาดได้ จากนั้นจะทำการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้โดยมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

6.1.1 ทำการตัดลำดับเบสส่วนปลายของการอ่านลำดับเบสที่เกิดการซ้อนทับกันของสัญญาณแสงออก

6.1.2 นำลำดับเบสที่ได้จากการอ่านลำดับเบสในข้าวแต่ละพันธุ์ซึ่งจะได้จากโดยจะทำการอ่านลำดับเบส 2 ทิศทาง มาสร้างเป็นลำดับเบสสายยาว (Contig) โดยใช้โปรแกรม BioEdit (7.1.3.0) ในการสร้างสาย Contig

6.1.3 ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสที่ได้จากฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม ClustalX (1.8) ร่วมกับโปรแกรม GeneDoc (2.7.0.0) เพื่อหาบริเวณที่แตกต่างกันของลำดับเบส

6.2 ลำดับเบสของยีน *PPR7* และ *PPR10*

ได้จากดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอสายผสมของยีน *PPR7* และ *PPR10* ของข้าวจำนวน 6 พันธุ์ได้แก่ พันธุ์ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1, กข47 และ IR64 ที่ส่งไปอ่านลำดับเบสที่บริษัท 1st Base Sequencing (Malaysia)

ในขั้นต้นเมื่อได้ผลลำดับเบสจากบริษัทจะต้องทำการตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสที่ได้โดยใช้โปรแกรม FinchTV (1.4.0) โดยหากเกิดการซ้อนทับกันของโครมาโทแกรมที่แสดงในแต่ละลำดับเบสจะส่งผลให้การอ่านลำดับเบสมีความผิดพลาดได้ จากนั้นจะทำการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้โดยมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

6.2.1 นำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ได้มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูล (NCBI ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อทำการคัดเลือกลำดับเบสที่เป็นยีน *PPR7* หรือ *PPR10* และทำการตัดลำดับเบสที่เป็นส่วนของดีเอ็นเอพาหะรวมไปถึงบริเวณปลายของการอ่านลำดับเบสที่เกิดการซ้อนทับกันของสัญญาณออก

6.2.2 นำลำดับเบสที่ได้จากการอ่านลำดับเบสในแต่ละโคลนมารวมกันแล้วทำการสร้างเป็นตัวแทนสาย Contig ของข้าวพันธุ์นั้นเพียง 1 สาย ตัวอย่างเช่น โคลนของยีน *PPR7* จากข้าวพันธุ์ IR58025B ที่ส่งไปอ่านลำดับเบสมีจำนวน 2 โคลน ซึ่งในแต่ละโคลนมีอ่านลำดับเบส 2 ทิศทาง ดังนั้นในการสร้าง Contig ของยีน *PPR7* จากข้าวพันธุ์ IR58025B จะได้มาจากผลการอ่านลำดับเบสทั้งหมด 4 สาย เป็นต้น โดยใช้โปรแกรม BioEdit (7.1.3.0) ในการสร้างสาย Contig

6.2.3 ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสที่ได้จากฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม ClustalX (1.8) ร่วมกับโปรแกรม GeneDoc (2.7.0.0) เพื่อหาบริเวณที่แตกต่างกันของลำดับเบส

7. การศึกษาความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ด้วยสารละลายไอโอดีนโปแทสเซียมไอโอไดน์ (I_2 -KI)

การศึกษาความมีชีวิตของเกสรตัวผู้ ศึกษาในข้าวพันธุ์ IR58025A ซึ่งเป็นข้าวสายพันธุ์ A ที่มีเกสรตัวผู้เป็นหมัน ข้าวพันธุ์ IR58025B คือ สายพันธุ์ B เป็นพันธุ์รักษาความเป็นหมันของเกสรตัวผู้และข้าวพันธุ์ชยันนาท1 และ กข47 ซึ่งข้าวทั้ง 2 พันธุ์นี้ได้มีการรายงานที่สามารถแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ได้ คือ สายพันธุ์ R (ภพร, 2555; สุวิทย์, 2555)

นำละอองเกสรตัวผู้ของข้าวที่นำมาผสม แซ่ในสายละลาย I_2 -KI ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากการติดสีของเมล็ดแป้ง (starch grain) บริเวณไซโทพลาซึม โดยละอองเกสรที่มีชีวิต (viable pollen) จะพบการติดสีน้ำเงินเข้มเต็มพื้นที่ของละอองเกสร แต่ละอองเกสรที่ไม่มีชีวิต (sterile pollen) ไม่พบการติดสีหรือมีสีเหลือง (อุษณีย์, 2557) ทำการจำแนกความมีชีวิตของละอองเกสรตัวผู้โดยใช้ข้อมูลร้อยละของละอองเกสรที่ติดสีของสารละลาย I_2 -KI เพื่อเป็นการยืนยันความมีชีวิตของละอองเกสรตัวผู้ที่ได้นำมาใช้ในการทดสอบหากเป็นสายพันธุ์ A จะย้อมด้วยสารละลาย I_2 -KI ไม่ติดสี แต่สำหรับในข้าวสายพันธุ์ B และสายพันธุ์ R ละอองเกสรตัวผู้จะมีการติดสีเข้มชัดเจน

ทำการผสมพันธุ์ข้าวเพื่อศึกษาความสามารถในการติดเมล็ดในลูกรุ่นที่ 1 แต่ละพันธุ์ โดยใช้ข้าวสายพันธุ์ A เป็นพันธุ์รับ (แม่) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่เกสรตัวผู้เป็นหมันเนื่องจากยีนในไซโทพลาซึมและยีนแก้ความเป็นหมันในนิวเคลียสมีลักษณะเป็นยีนด้อย ผสมกับข้าวที่ต้องการทดสอบเป็นพันธุ์ให้ (พ่อ) ซึ่งอาจจะเป็นสายพันธุ์ B หรือสายพันธุ์ R โดยข้าวสายพันธุ์ R จะเป็นพันธุ์ที่มียีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในนิวเคลียสเป็นลักษณะเด่น โดยคาดว่าจะไปช่วยแก้ความเป็นหมันลูกรุ่นที่ 1

นำละอองเกสรตัวผู้ของลูกผสมที่ได้ไปแช่ในสายละลาย I_2 -KI ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนละอองเกสรที่ติดสีและจำนวนละอองเกสรทั้งหมดนำไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์เกสรตัวผู้ปกติ จากนั้นคลุมช่อดอกของข้าวลูกผสม ปล่อยให้ติดเมล็ด

จากนั้นนับจำนวนเมล็ดดีต่อจำนวนเมล็ดทั้งหมด เพื่อนำไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์เมล็ดดี (% spikelet fertility)



สถานที่และระยะเวลาในการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์โมเลกุล หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

ระยะเวลาการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้ใช้ระยะเวลา 2 ปี โดยเริ่มตั้งแต่เดือนกันยายน 2557 ถึง เดือนสิงหาคม
2559



โดยผลจากการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ของไพรเมอร์ของ Suresh et al. (2012) คือ ยีน *Os01g09670* ซึ่งเป็นลำดับเบสที่ได้จากจีโนมิกส์ดีเอ็นเอซึ่งจะมีความยาว 3,002 คู่เบส เมื่อเทียบกับลำดับเบสที่รายงานในฐานข้อมูล NCBI คือ AK100731 และ XM_015767514 ซึ่งเป็นลำดับเบสที่ได้มาจากเอ็มอาร์เอ็นเอที่ความยาวเท่ากับ 1,481 และ 1,589 คู่เบส ตามลำดับ และเมื่อแปลเป็นโปรตีนพบว่าที่ยีน *Os01g09670* นั้นเป็นรหัสของโปรตีน pollen-specific SF21 มีความยาวเท่ากับ 1,041 คู่เบส หรือ 347 กรดอะมิโน โดยประกอบด้วย 11 เอกซอน และ 10 อินทรอน โดยไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 จะอยู่ระหว่างเอกซอนที่ 1 กับอินทรอนที่ 1 โดยจะคล่อมจุดเริ่มต้นการแปลรหัสเป็นโปรตีน (ATG)

1.2 การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ตำแหน่ง *Rf4*

การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อของยีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ตำแหน่ง *Rf4* ที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 10 จำนวน 3 ยีน ได้แก่ ยีน *PPR7*, *PPR9* และ *PPR10* โดยใช้ข้อมูลการรายงานลำดับเบสของยีน *PPR* ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank (NCBI ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยผลที่ได้จากการออกแบบไพรเมอร์จะทำการแบ่งเป็นแต่ละยีน ดังนี้

1.2.1 ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *PPR7* ของข้าว

ไพรเมอร์ที่ได้ทำการออกแบบนั้นได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *PPR7* จากข้าวพันธุ์ Minghui 63, IR24, ZS97A และ ZH11 (Tang et al., 2014) และยีน *PPR458* จากข้าวพันธุ์ IR24 (Kazama and Toriyama 2014) จากผลการเปรียบเทียบลำดับเบสจึงเลือกบริเวณอนุรักษ์ที่ปลาย 5' สำหรับไพรเมอร์ด้าน forward (ภาพที่ 7 ก) และที่ปลาย 3' สำหรับไพรเมอร์ด้าน reverse (ภาพที่ 7 ข) เป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *PPR7* คือ ไพรเมอร์ forward (*PPR7-F* ; 5'-CGGAGACCGATCTGGGC-3') และไพรเมอร์ reverse (*PPR7-R* ; 5'-TATGACAGAACTAGGGAGGG-3') ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่คาดหวังเมื่อนำไพรเมอร์ไปเพิ่มจำนวนคือ ประมาณ 1,700 คู่เบส (ตารางที่ 4)

(ก)

```

                                PPR9-F
PER782a 9 : CTTTTTAAACAACCTTTTATATAGATAITTTTTTAA-AAAAAATACACCAITTAATAGTTTGAAGAGCCTGCTAACGTAACGAAAAACGAGGAAGTGAAGTGT : 450
PER9-M-782 : ..... : 459
PER9-I-782 : ..... : 450
PER9-ZH-78 : ..... : 450
PER9-Z-409 : ..... : 451

                                *          *          *          *          *
PER792a 9 : AAGTGGAGAAATAGAACTCACCCITGCTATGCAARACCCCCCTCATGTGTAGTACTGTARACATGGGAGTGGGGATAAAGCATGGCCCTCACTCGCGC : 550
PER9-M-782 : ..... : 559
PER9-I-782 : ..... : 550
PER9-ZH-78 : ..... : 550
PER9-Z-409 : ..... : 551

                                *          *          *          *          *          Start codon
PER782a 9 : ATCAAACGTGAGGGCACCCCTCCCTCCCTGCGCCCGCGCGCGCTGAICTGTTGCGCCCTGTCCTCAGGCTGCGCCCGCGGGGGCAGGCATG : 650
PER9-M-782 : ..... : 659
PER9-I-782 : ..... : 650
PER9-ZH-78 : ..... : 650
PER9-Z-409 : ..... : 651

```

(ข)

```

                                Stop codon
PER782a 9 : CGAAGCAATCCACTGCTTCCTTCTGTTAGAACTTCCCAATCGCTCTGGGAGCAAAATATCAAGAAATATCGTAGGTTTTCCCTGAAAAATACGAGGCTTC : 3022
PER9-M-782 : ..... : 3071
PER9-I-782 : ..... : 3022
PER9-ZH-78 : ..... : 3022
PER9-Z-409 : ..... : 4643

                                *          *          *          *          *
PER782a 9 : TATAGAACTTGAAGTGGTTCGAGCTTTTTCAGCTTTGAAGTCTGAGTGGAAATCTTTTCTACTACACTCTACAGTGTACTAGAGGAGGTACT : 3122
PER9-M-782 : ..... : 3171
PER9-I-782 : ..... : 3122
PER9-ZH-78 : ..... : 3122
PER9-Z-409 : ..... : 4743

                                PPR9-R
PER782a 9 : TTTCTGTGTTGTGTAATATCAAGCAGATCACCTCATGTGTTTGTAGTTCATGTTAACCAAGAGACTATAAAATATACACAGTCTGGCAGTATAGAA : 3222
PER9-M-782 : ..... : 3271
PER9-I-782 : ..... : 3222
PER9-ZH-78 : ..... : 3222
PER9-Z-409 : ..... : 4843

```

ภาพที่ 8 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *PPR9* จากฐานข้อมูลที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

(ก) ภาพแสดงบริเวณลำดับเบสที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์ด้าน forward (*PPR9-F*) และ (ข) ภาพ

แสดงบริเวณลำดับเบสที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์ด้าน reverse (*PPR9-R*) โดยลำดับเบสยีน

PPR9 เป็นยีนจากข้าวพันธุ์ Minghui 63 (M), IR24 (I), ZS97A (Z) และ ZH11

(ZH) และยีน *PPR782a* จากข้าวพันธุ์ IR24 (*PPR782a*)

1.2.3 ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *PPR10* ของข้าว

ไพรเมอร์ที่ได้ทำการออกแบบนั้นได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *PPR10* จากข้าวพันธุ์ Minghui 63, ZS97A และ 93-11 (Tang et al., 2014) และยีน *PPR454* จากข้าวพันธุ์ IR24 (Kazama and Toriyama 2014) จากผลการเปรียบเทียบลำดับเบสจึงเลือกบริเวณอนุรักษ์ในการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *PPR10* คือไพรเมอร์ด้าน forward (*PPR10-F* ; 5'-TGCTGCTGCACCTGTCAGC-3') และไพรเมอร์ด้าน reverse (*PPR10-R* ; 5'-GCCGATTAGGGTAGTATCGGGG-3') ดังแสดงในภาพที่ 9 ก และ ข ตามลำดับ ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่คาดหวังประมาณ 2,200 คู่เบส (ตารางที่ 4)

(ก)

```

PPR10-F
PPR10-M : CACTGGGCACGGTGCCTGTGTGGGAGTCAGGCCTCGCAGCCGCCGCCGC---TGCCTGCTGCTGCACCTGTGAGCAGTAGGGCCGGCCATGCCGCC : 396
PPR10-Z-45 : ..... : 286
PPR454_10 : .....T.TGC..... : 329
PPR10-93-4 : .....C.....TTTT.A.GATG---.A.AATCCC..T-TT..T.C..A.....G--- : 225

PPR10-M : GCGCCGCTTCCCGCGTGTGGCTCGGAGGGCTCGATCCAAGGCGGAGGGGCCCGCGGGGGCAATGCGCCGAGGACCGCAGCCACGTTGTCGACGA : 496
PPR10-Z-45 : ..... : 386
PPR454_10 : ..... : 439
PPR10-93-4 : ..... : 325

PPR10-M : AITGCTTCGGGCGCAAGGCGCCAGATCTACGGCTTGAACCGGCCCTCGACGACGTGCGCGCTCAGACCCCGCGCCCGCTGTCCCGCTACAC : 596
PPR10-Z-45 : ..... : 486
PPR454_10 : ..... : 539
PPR10-93-4 : .....C.....G..... : 425
    
```

(ข)

```

Stop codon
PPR10-M : TCAATGTTTGTACCTGTGACAAATGGGAGAGGCTGAGGAGTTAATTTTAAATGTGGATCANGSCATCTGTCCAGACACCATTTTCTTAGTAGA : 1796
PPR10-Z-45 : ..... : 1686
PPR454_10 : ..... : 1799
PPR10-93-4 : .....G..... : 1625

Stop codon ของข้าวพันธุ์ 93-11
PPR10-M : CGATGACATATCATTTATCTTTGAGCCGATGTCATATGTGCATCGATCGGCGTCAITTAATAAATAAGAGGGGACTAAATCTATTTCGATCGGCTGTAGAT : 2136
PPR10-Z-45 : ..... : 2096
PPR454_10 : ..... : 2159
PPR10-93-4 : .....A..... : 2019

PPR10-R
PPR10-M : AAAAGTAGTAAATCAGGTAAGATCGGCTGAATCCCGGATACCTACCTAATCGGCTACCCAAAGACAGACTAGAGATTGAGATTCTAATTACGACTCATAA : 2596
PPR10-Z-45 : ..... : 2486
PPR454_10 : ..... : 2599
PPR10-93-4 : .....A.....A.....G.....A.....A..... : 2419
    
```

ภาพที่ 9 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *PPR10* จากฐานข้อมูลที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์
 (ก) ภาพแสดงบริเวณลำดับเบสที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์ด้าน forward (PPR10-F) และ (ข) ภาพ
 แสดงบริเวณลำดับเบสที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์ด้าน reverse (PPR10-R) โดยลำดับเบสยีน
PPR10 เป็นยีนจากข้าวพันธุ์ Minghui 63 (M), ZS97A (Z) และ 93-11 (93)
 และยีน *PPR454* จากข้าวพันธุ์ IR24 (*PPR454*)

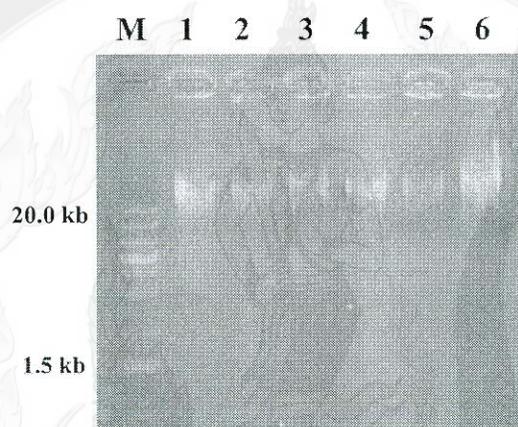
ตารางที่ 4 ผลการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในระบบ WA-CMS

ตำแหน่ง	ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' ไป 3')	ความยาว (นิวคลีโอไทด์)	ขนาดของ ชั้นดีเอ็นเอ ที่คาดหวัง (คู่เบส)
<i>Rf3</i>	pollen-specific	DRCG-RF3-13-F	AGGCAGCGAGGAGAGAGA	18	472
	SF21	DRCG-RF3-13-R	CGGCTCGAGTAACATTGCAACC	22	
<i>PPR7</i>		PPR7-F	CGGAGACCGATCTGGGC	17	1,700
		PPR7-R	TATGACAGAACTAGGGAGGG	20	
<i>Rf4</i>	<i>PPR9</i>	PPR9-F	AGTTTGAAGAGCGTGCTAACGG	22	2,800
		PPR9-R	GACATGAGGTGATCTGCTTGC	21	
	<i>PPR10</i>	PPR10-F	TGCTGCTGCACCTGTCAGC	19	2,200
		PPR10-R	GCCGATTAGGGTAGTATCGGGG	22	

การออกแบบไพรเมอร์ของยีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ในระบบ WA-CMS ที่ตำแหน่ง *Rf3* คือ ไพรเมอร์ของยีน *pollen-specific SF21* (DRCG-RF3-13) และที่ตำแหน่ง *Rf4* คือ ไพรเมอร์ของยีน *PPR7*, *PPR9* และ *PPR10* จะนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนในข้าวพันธุ์ต่างๆ เพื่อศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสของยีนแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ แต่ละยีนในข้าวแต่ละพันธุ์ต่อไป

2. การสกัดดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษา

การสกัดดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 6 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ IR58025B, ข้าวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1, กข47 และ IR64 ที่นำมาทำการศึกษาด้วยวิธี CTAB ดัดแปลง (Hwang and Kim, 2000) นำดีเอ็นเอในจีโนมที่สกัดได้มาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่าสามารถทำการสกัดดีเอ็นเอจากข้าวทั้ง 6 พันธุ์ ได้ โดยเหมือนเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นมีความสมบูรณ์เนื่องจากเกาะกลุ่มเป็นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ภาพที่ 10



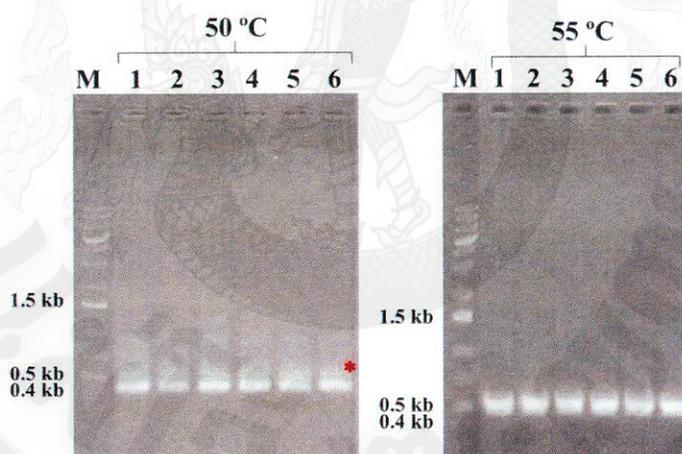
ภาพที่ 10 ผลการทำอะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟเรซิสของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์อะกาโรสเจล ให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที เลน M คือ GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA) เลน 1 คือ ข้าวพันธุ์ IR58025B เลน 2 คือ ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 เลน 3 คือ ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล เลน 4 คือ ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เลน 5 คือ ข้าวพันธุ์กข47 และเลน 6 คือ ข้าวพันธุ์ IR64 ตามลำดับ

โดยก่อนที่จะนำไปใช้งานนั้นจะทำการเจือจางปริมาณของดีเอ็นเอทุกตัวอย่าง ก่อนนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ต่อไป

3. การทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแก่ความเป็นหมัน

3.1 การทดสอบไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 ที่จำเพาะต่อยีนแก่ความเป็นหมันของเกษตรกรผู้
ตำแหน่ง *Rf3*

การเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 ของตัวอย่างดีเอ็นเอข้าว
จำนวน 6 พันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์ IR58025B, ข้าวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1, กข47 และ
IR64 พบว่าอุณหภูมิที่ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (annealing) เป็น 50 องศาเซลเซียส ผลจาก
การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 400
คู่เบส และแถบดีเอ็นเอที่ต้องการคือ ขนาดประมาณ 500 คู่เบส แต่แถบที่ปรากฏนั้นมีความเข้มข้น
กว่าแถบที่ขนาดประมาณ 400 คู่เบส ซึ่งอาจจะเกิดจากอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing ต่ำเกินไป
ทำให้ไพรเมอร์สามารถเข้าจับที่บริเวณอื่นได้ดีกว่า จึงได้ทำการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 55 องศาเซลเซียส
พบว่าปรากฏแถบที่ขนาดประมาณ 500 คู่เบส ชัดเจน ซึ่งเป็นขนาดที่ต้องการ ดังภาพที่ 11



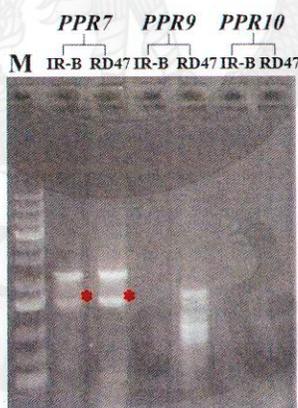
ภาพที่ 11 ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 ด้วยเทคนิค PCR ที่อุณหภูมิ 50
และ 55 องศาเซลเซียส เลน M คือ GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific,
USA) เลน 1 คือ ข้าวพันธุ์ IR58025B เลน 2 คือ ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 เลน 3 คือ
ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล เลน 4 คือ ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เลน 5 คือ ข้าวพันธุ์กข47 และ
เลน 6 คือ ข้าวพันธุ์ IR64 ตามลำดับ และ * คือ แถบดีเอ็นเอที่คาดหวัง

ในขั้นตอนต่อไปจะทำการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 ที่
อุณหภูมิในขั้นตอน annealing เท่ากับ 55 องศาเซลเซียส กับตัวอย่างจากดีเอ็นเอข้าวจำนวน 6 พันธุ์

จากนั้นจะทำการแยกบริสุทธิ์แลบตีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส จากเจลด้วยชุดสำเร็จรูป PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA) เพื่อส่งตัวอย่างดีเอ็นเอไปอ่านลำดับเบสต่อไป

3.2 การทดสอบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *PPR7*, *PPR9* และ *PPR10*

การทดสอบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มชิ้นยีน *PPR7*, *PPR9* และ *PPR10* ที่ได้ทำการออกแบบ ในขั้นแรกได้ทดสอบกับดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ IR58025B, และ กข47 โดยอุณหภูมิในขั้นไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (annealing) เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคอะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่า ผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ *PPR7* เกิดแลบตีเอ็นเอจำนวน 2 แลบ ที่ขนาดประมาณ 2.5 และ 1.7 กิโลเบส ซึ่งขนาดที่ต้องการคือ 1.7 กิโลเบส ส่วนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ *PPR9* นั้นไม่เกิดแลบตีเอ็นเอในข้าวพันธุ์ IR58025B แต่ในข้าวพันธุ์ กข47 นั้นเกิดแลบตีเอ็นเอแต่ไม่ใช่แลบที่ต้องการคือขนาดประมาณ 2.8 กิโลเบส และในส่วนของ การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ *PPR10* พบว่าไม่เกิดแลบตีเอ็นเอขนาดที่ต้องการคือประมาณ 2.2 กิโลเบส ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 ผลการเพิ่มจำนวนยีน *PPR7*, *PPR9* และ *PPR10* ด้วยเทคนิค PCR ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เลน M คือ GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)

เลน IR-B และ RD47 เป็นผลการเพิ่มจำนวนจากตัวอย่างดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์

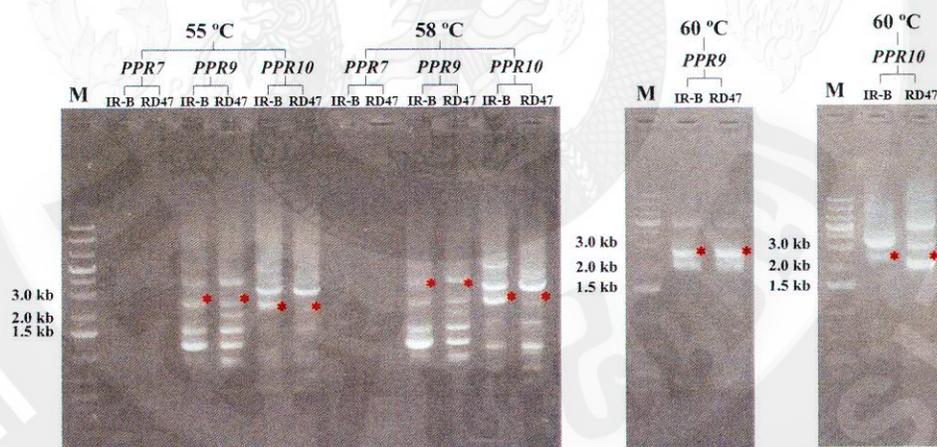
IR58025B และ กข47 ตามลำดับ และ * คือ แลบตีเอ็นเอที่คาดหวัง

ซึ่งจากผลการทดสอบไพรเมอร์โดยใช้อุณหภูมิในขั้นให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (annealing) เท่ากับ 50 องศาเซลเซียส พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *PPR9* และ

PPR10 นั้นยังไม่ปรากฏแถบแบนที่ต้องการ และสำหรับไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *PPR7* ยังปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2.8 กิโลเบส

การทดลองต่อไปจึงได้ทำการเพิ่มอุณหภูมิในขั้น annealing เป็น 55 และ 58 องศาเซลเซียส จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคอะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่า ไพรเมอร์ของยีน *PPR7* ในตัวอย่างข้าวทั้ง 2 พันธุ์ ไม่ปรากฏแถบของชิ้นยีนที่ต้องการ ส่วนไพรเมอร์ของยีน *PPR9* และ *PPR10* นั้นปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ คือขนาดประมาณ 2.8 และ 2.2 กิโลเบส ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 55 และ 58 องศาเซลเซียส นั้นยังเกิดแถบที่ไม่จำเพาะเป็นจำนวนมาก ในการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ของยีน *PPR9* และ *PPR10* จึงได้ทำการเพิ่มอุณหภูมิขั้น annealing เป็น 60 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 13) ในการเพิ่มจำนวนยีน *PPR7* จะใช้อุณหภูมิขั้น annealing เป็น 50 องศาเซลเซียส ส่วนยีน *PPR9* และ *PPR10* จะใช้อุณหภูมิขั้น annealing เป็น 60 องศาเซลเซียส จึงได้เลือกแถบที่มีขนาดใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอที่คาดหวังหรือแถบที่เข้ม เพื่อนำไปอ่านลำดับเบสต่อไป พบว่าจะให้แถบจำนวน 2-3 แถบ



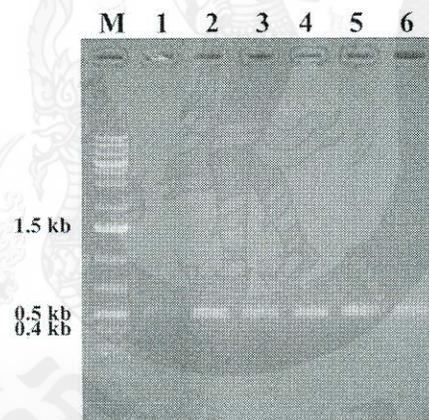
ภาพที่ 13 ผลการเพิ่มจำนวนยีน *PPR7*, *PPR9* และ *PPR10* ด้วยเทคนิค PCR ที่อุณหภูมิ 55, 58 และ 60 องศาเซลเซียส เลน M คือ GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA) เลน IR-B และ RD47 เป็นผลการเพิ่มจำนวนจากตัวอย่างดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์

IR58025B และ กข47 ตามลำดับ และ * คือ แถบดีเอ็นเอที่คาดหวัง

4. ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นยีนที่เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR

4.1 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสชิ้นยีนที่เพิ่มจำนวนจากไพรเมอร์ DRCG-RF3-13

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 จากตัวอย่างดีเอ็นเอข้าวจำนวน 6 พันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1, กข47 และ IR64 โดยใช้อุณหภูมิขั้น annealing ที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้า คือ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 500 คู่เบส มาทำการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอด้วยชุดสำเร็จรูป PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA) ผลการแยกบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอแสดงดังภาพที่ 14 จากนั้นส่งไปอ่านลำดับเบสและวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสกับลำดับเบสที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับเบสเป็นดังนี้



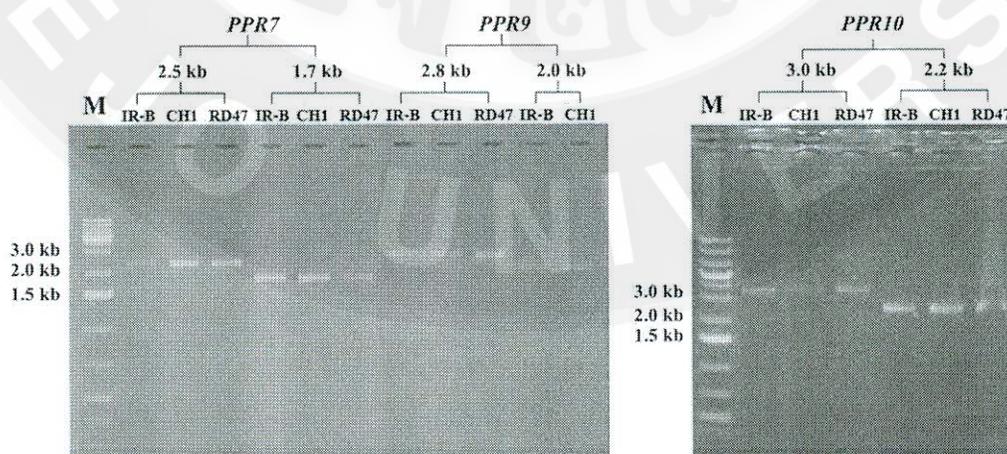
ภาพที่ 14 ผลการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 เลน M คือ GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA) เลน 1 คือ ข้าวพันธุ์ IR58025B เลน 2 คือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เลน 3 คือ ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล เลน 4 คือ ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เลน 5 คือ ข้าวพันธุ์กข47 และเลน 6 คือ ข้าวพันธุ์ IR64 ตามลำดับ

ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส ที่ได้จากการอ่านลำดับเบสด้วยไพรเมอร์ด้าน forward เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล พบว่า ลำดับเบสที่อ่านได้นั้น เหมือนกับ pollen-specific protein SF21 (accession: XM_015767514) เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ และผลจากการอ่านลำดับเบสด้วยไพรเมอร์ด้าน forward นั้นสามารถอ่านได้ไปจนถึงบริเวณไพรเมอร์

ด้าน reverse เนื่องจากขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 นั้นมีความยาวเพียง 500 คู่เบส จึงสามารถอ่านลำดับเบสได้จากชิ้น PCR โดยไม่ต้องทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ และโครมาโทแกรมที่ได้ไม่เกิดการซ้อนทับกัน จึงจะใช้ผลที่ได้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับเบสในข้าวแต่ละพันธุ์ โดยจะทำการอ่านลำดับเบสเพิ่มเติมด้วยไพรเมอร์ด้าน reverse เพื่อใช้ในการสร้างสายยาวและนำไปวิเคราะห์ต่อไป

4.2 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นยีน *PPR7*, *PPR9* และ *PPR10* ที่เพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR

การเพิ่มปริมาณชิ้นยีนด้วยเทคนิค PCR จากตัวอย่างดีเอ็นเอของข้าวจำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ IR58025B, พันธุ์ชัยนาท 1 และพันธุ์ IR64 โดยใช้อุณหภูมิขั้น annealing ที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้า ซึ่งการเพิ่มจำนวนยีน *PPR7* จะให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ ขนาดประมาณ 1.7 และ 2.5 กิโลเบส ที่จะนำไปแยกบริสุทธิ์แต่ละแถบ ส่วนการเพิ่มจำนวนยีน *PPR9* และ *PPR10* นั้นให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก จึงเลือกแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับแถบดีเอ็นเอที่คาดหวังหรือแถบที่มีการเพิ่มจำนวนมาก โดยยีน *PPR9* เลือกแถบดีเอ็นเอขนาด 2.0 และ 2.8 กิโลเบส และยีน *PPR10* เลือกแถบดีเอ็นเอขนาด 2.2 และ 3.0 กิโลเบส โดยแถบดีเอ็นเอทั้ง 6 แถบจะแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจลด้วยชุดสำเร็จรูป PureLink[®] Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA) ผลการแยกบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอแสดงดังภาพที่ 15 จากนั้นส่งไปอ่านลำดับเบสและวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสกับลำดับเบสที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับเบสเป็นดังนี้



ภาพที่ 15 ผลการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ *PPR7*, *PPR9* และ *PPR10*

เลน M คือ GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA) เลน IR-B, CH1 และ RD47 เป็นผลการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจลโดยชุดสำเร็จรูป PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, USA) จากตัวอย่างดีเอ็นเอของ ข้าวพันธุ์ IR58025B, ชัยนาท 1 และ กข47 ตามลำดับ

4.2.1 แลบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ PPR7 ขนาด 2.5 กิโลเบส ของข้าว 3 พันธุ์ มีลำดับเบสคล้ายกับยีนในคลอโรพลาสต์ *Oryza sativa* Indica Group cultivar RP Bio-226 chloroplast (accession: KU705873) เท่ากับ 79 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแลบดีเอ็นเอขนาด 1.7 กิโลเบส มีลำดับเบสเหมือนยีน PPR7 ที่ได้รายงานในฐานข้อมูล จึงจะโคลนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1.7 กิโลเบสต่อไป

4.2.2 แลบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ PPR9 ขนาด 2.0 และ 2.8 กิโลเบส ที่ได้จากข้าวทั้ง 3 พันธุ์ พบว่ามีลำดับเบสคล้ายกับลำดับเบสของโครโมโซมแท่งที่ 6 ของข้าวพันธุ์นิปปอนบาร์เลย์ accession: AP014962 และ accession: AP0149629 ตามลำดับ ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าชิ้นดีเอ็นเอทั้ง 2 ขนาด ที่เพิ่มจำนวนได้นั้นไม่ใช่ยีน PPR9 ซึ่งเป็นยีนที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 10 โดยแถบที่เกิดขึ้นอาจจะเกิดจากการที่ไพรเมอร์สามารถจับที่ตำแหน่งอื่นบนดีเอ็นเอของข้าวได้จึงเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ จึงไม่ศึกษา ยีน PPR9 ในขั้นตอนต่อไป

4.2.3 แลบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ PPR10 ขนาด 3.0 กิโลเบส ที่ได้จากข้าวทั้ง 3 พันธุ์ พบว่าเมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสกับลำดับเบสในฐานข้อมูลไม่พบความเหมือนกับลำดับเบสที่ได้มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ ส่วนแลบดีเอ็นเอขนาด 2.2 กิโลเบส มีลำดับเบสเหมือนกับลำดับเบสของยีน PPR10 จึงโคลนชิ้นดีเอ็นเอขนาด 2.2 กิโลเบสต่อไป

ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปของการทดลองจะทำการโคลนในส่วนของยีน PPR7 จากการใช้ไพรเมอร์ PPR7 ที่แลบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.7 กิโลเบส และยีน PPR10 จากการใช้ไพรเมอร์ PPR10 ที่แลบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2.2 กิโลเบส โดยพันธุ์ข้าวที่จะทำการโคลนยีนที่ศึกษาในครั้งนี้ คือ ข้าวพันธุ์ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1, กข47 และ IR64

5. การโคลนยีนเพื่อศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสของยีน *PPR7* และ *PPR10*

ในการโคลนยีน *PPR7* และ *PPR10* ใช้ดีเอ็นเอพาหะ pBluescript SK⁺ ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV* เพื่อเชื่อมกับชิ้นยีน *PPR7* และ *PPR10* ขนาด 1.7 และ 2.2 กิโลเบส ตามลำดับ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยน้ำยา Phusion Flash High-Fidelity PCR Mester Mix (Thermo Scientific, USA) จากเทคนิค PCR ตามอุณหภูมิที่ได้ทำการทดสอบในขั้นต้น กับตัวอย่างข้าวจำนวน 6 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์ IR58025B, พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, พันธุ์เจ้าหอมนิล, พันธุ์ชัยนาท 1, พันธุ์ กข47 และพันธุ์ IR64

จากนั้นทำการถ่ายดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จากการเชื่อมชิ้นยีนกับดีเอ็นเอพาหะเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α และทำการคัดเลือกโคลนที่มีการแทรกของชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจด้วยขนาดและการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ร่วมกับ *HindIII* และทำการยืนยันผลการแทรกของชิ้นยีนที่สร้างโปรตีน *PPR7* หรือ *PPR10* โดยการใช้ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบจำเพาะกับแต่ละยีนมาใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นยีนที่ศึกษาก่อนทำการส่งไปอ่านลำดับเบส โดยผลการโคลนยีน *PPR7* หรือ *PPR10* นั้นสามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วนดังนี้

5.1 การโคลนยีน *PPR7* ในพันธุ์ข้าวที่ทำการศึกษา

จากการคัดเลือกด้วยขนาดและการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ร่วมกับ *HindIII* สามารถใช้ในการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมที่ได้รับการแทรกของชิ้นยีน *PPR7* ขนาดประมาณ 1.7 กิโลเบส โดยหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด ในส่วนที่เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่สนิใจนั้นจะได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบ ที่ขนาดประมาณ 900 คู่เบส ซึ่งเกิดจากการที่ภายในยีน *PPR7* นั้นมีบริเวณที่เป็นลำดับเบสจดจำของเอนไซม์ *HindIII* (5'-AAGCTT-3') อยู่ 1 ตำแหน่ง และเมื่อดูผลจากการเปรียบเทียบลำดับเบสจากฐานข้อมูลจะพบว่ายีน *PPR7* ที่มีรายงานในฐานข้อมูลนั้นมีบริเวณของเอนไซม์ *HindIII* 1 ตำแหน่ง เช่นกัน โดยอยู่ลำดับเบสที่ 840 คู่เบส ซึ่งอยู่กลางชิ้นยีน *PPR7* จึงทำให้ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขึ้นเพียงแถบเดียว

โดยจากการคัดเลือกโคลนที่ได้จากข้าวแต่ละพันธุ์ เพื่อส่งไปอ่านลำดับเบสดังตารางที่ 5 ซึ่งในการคัดเลือกในข้าว 1 พันธุ์จะทำการเลือกตัวอย่างโคลนที่จะส่งไปอ่านลำดับเบสอย่างน้อย 2 โคลน และในแต่ละโคลนจะทำการอ่าน 2 ทิศทาง เพื่อเป็นการยืนยันลำดับเบสที่ได้จากการโคลนในข้าวแต่ละพันธุ์

ตารางที่ 5 ผลการคัดเลือกโคลนที่ได้รับยื่น *PPR7* เพื่อการวิเคราะห์ลำดับเบส

พันธุ์ข้าว	โคลนที่อ่านลำดับเบส	จำนวนโคลนที่อ่านลำดับเบสได้
R58025B	โคลนที่ 1 และ 3	2 โคลน
ข้าวดอกมะลิ 105	โคลนที่ 1, 2 และ 3	3 โคลน
เจ้าหอมนิล	โคลนที่ 1, 2 และ 3	3 โคลน
ชัยนาท 1	โคลนที่ 1 และ 5	2 โคลน
กข47	โคลนที่ 7 และ 8	2 โคลน
IR64	โคลนที่ 1, 2 และ 4	3 โคลน

จากการส่งตัวอย่างไปอ่านลำดับเบสสามารถสรุปได้ดังนี้ ข้าวพันธุ์ IR58025B, ชัยนาท 1 และกข47 ทำการส่งไปอ่านลำดับเบสพันธุ์ละ 2 โคลน ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และเจ้าหอมนิล สำหรับข้าวพันธุ์ IR64 ทำการส่งไปอ่านลำดับเบสพันธุ์ละ 3 โคลน

5.2 การโคลนยีน *PPR10* ในพันธุ์ข้าวที่ทำการศึกษ

จากการคัดเลือกด้วยขนาดและการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ร่วมกับ *HindIII* สามารถใช้ในการคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมที่ได้รับการแทรกของชิ้นยีน *PPR10* ขนาดประมาณ 2.2 กิโลเบส โดยหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด ในส่วนที่เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจนั้นจะได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ ที่ขนาดประมาณ 1,500 และ 700 คู่เบส ซึ่งเกิดจากการที่ภายในยีน *PPR10* นั้นมีบริเวณที่เป็นลำดับเบสจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII* (5'-AAGCTT-3') อยู่ 1 ตำแหน่ง และเมื่อดูผลจากการเปรียบเทียบลำดับเบสจากฐานข้อมูลจะพบว่ายีน *PPR10* ที่มีรายงานในฐานข้อมูลนั้นมีบริเวณเอนไซม์ *HindIII* 1 ตำแหน่ง เช่นกัน โดยอยู่ลำดับเบสที่ 650 คู่เบส จึงทำให้ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ

โดยจากการคัดเลือกโคลนที่ได้จากข้าวแต่ละพันธุ์เพื่อส่งไปอ่านลำดับเบสดังตารางที่ 6 ซึ่งในการคัดเลือกข้าว 1 พันธุ์จะทำการเลือกตัวอย่างโคลนที่จะส่งไปอ่านลำดับเบสอย่างน้อย 2 โคลน และในแต่ละโคลนจะทำการอ่าน 2 ทิศทาง และในส่วนของตรงกลางยีนจะอ่านลำดับเบสด้วยไพรเมอร์ Os10g0495100R (5'-CCTCAGCCTTCTCCCATTTG-3') ที่สามารถจับบริเวณส่วนกลางของ

ยีน *PPR10* ได้ ดังนั้นโคลน 1 โคลน จะทำการส่งไปอ่านลำดับเบส 3 ครั้ง เพื่อเป็นการยืนยันลำดับเบสที่ได้จากการโคลนในข้าวแต่ละพันธุ์

ตารางที่ 6 ผลการคัดเลือกโคลนที่ได้รับยีน *PPR10* เพื่อการวิเคราะห์ลำดับเบส

พันธุ์ข้าว	โคลนที่อ่านลำดับเบส	จำนวนโคลนที่อ่านลำดับเบสได้
IR58025B	โคลนที่ 3 และ 5	2 โคลน
ขาวดอกมะลิ105	โคลนที่ 2 และ 4	2 โคลน
เจ้าหอมนิล	โคลนที่ 4 และ 5	2 โคลน
ชัยนาท1	โคลนที่ 1, 2 และ 3	3 โคลน
กข47	โคลนที่ 5, 6 และ 9	3 โคลน
IR64	โคลนที่ 1, 2 และ 3	3 โคลน

จากการส่งตัวอย่างไปอ่านลำดับเบสสามารถสรุปได้ดังนี้ ข้าวพันธุ์ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105 และเจ้าหอมนิล ทำการส่งไปอ่านลำดับเบสพันธุ์ละ 2 โคลน สำหรับพันธุ์ชัยนาท 1, กข47 และ IR64 การส่งไปอ่านลำดับเบสพันธุ์ละ 3 โคลน

6. การอ่านและวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนแก้ความเป็นหมันในระบบ WA-CMS

6.1 การอ่านและวิเคราะห์ลำดับเบสจากการเพิ่มจำนวนของยีนตำแหน่ง *Rf3* ด้วยไพรเมอร์ DRCG-RF3-13

จากการอ่านลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 ในข้าวจำนวน 6 พันธุ์ ที่ได้ทำการศึกษากับลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้จากฐานข้อมูล พบว่าดีเอ็นเอดังกล่าวสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม โดยมีขนาดที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 16) ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 มีขนาดความยาวของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 เท่ากับ 499 คู่เบส คือ จากข้าวพันธุ์ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1 และ กข47 โดยจะมีความยาวเท่ากับข้าวสายพันธุ์ A ที่ได้จากการศึกษาของ Suresh et al. (2012)

- กลุ่มที่ 2 มีขนาดความยาวของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 เท่ากับ 497 คู่เบส คือ จากข้าวพันธุ์ IR64 โดยพบว่าเกิดการขาดหายไปของลำดับเบส

6.2 การอ่านและวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *PPR7* และ *PPR10* ที่ตำแหน่ง *Rf4*

จากการอ่านลำดับเบสของโคลนที่คาดว่าเป็นยีน *PPR7* หรือ *PPR10* ข้าวแต่ละพันธุ์ได้นำมาใช้ในการสร้างเป็นลำดับเบสสายยาว (contiguous sequence ; contig) ซึ่งการสร้าง contig ของข้าวแต่ละพันธุ์จะได้มาจากการอ่านลำดับเบสในแต่ละโคลนที่ส่งไปมารวมกันแล้ว ทำการสร้างเป็นลำดับเบสของสาย contig ของข้าวพันธุ์นั้นเพียง 1 สาย ตัวอย่างเช่น โคลนที่คาดว่าจะได้รับการแทรกของยีน *PPR7* จากข้าวพันธุ์ IR58025B ที่ได้ส่งไปอ่านลำดับเบสมีจำนวน 2 โคลน โดยในแต่ละโคลนได้มีอ่านลำดับเบส 2 ทิศทาง ดังนั้นในการสร้างลำดับเบสของสาย contig ของยีน *PPR7* จากข้าวพันธุ์ IR58025B จะได้มาจากการอ่านลำดับเบสทั้งหมด 4 สาย เป็นต้น

จากนั้นนำลำดับเบสของสาย contig ที่ได้จากข้าวแต่ละพันธุ์มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสกับยีนที่ได้จากข้าวที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ในฐานข้อมูล GenBank (NCBI ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสจะทำการแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *PPR7* และผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *PPR10* ดังนี้

6.2.1 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *PPR7*

ในการเปรียบเทียบลำดับเบสที่โคลนได้จากข้าวทั้ง 6 พันธุ์ กับลำดับเบสของยีน *PPR7* ที่มีรายงานในฐานข้อมูลจากข้าวพันธุ์ Minghui 63, IR24, ZS97A และ ZH11 (Tang et al, 2014) และยีน *PPR458* จากข้าวพันธุ์ IR24 (Kazama and Toriyama, 2014) ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสดังแสดงในภาพที่ 17 ซึ่งจะเป็นการเปรียบเทียบลำดับเบสที่โคลนได้จากข้าวแต่ละพันธุ์เทียบกับลำดับเบสที่ได้จากฐานข้อมูล พบว่าสามารถทำการแบ่งกลุ่มตามขนาดที่ได้ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 ยีน *PPR7* ที่มีขนาดของลำดับเบสยาว 1,744 คู่เบส ซึ่งเท่ากับยีนจากข้าวพันธุ์ IR24, ZH11 และยีน *PPR458* จากข้าวพันธุ์ IR24 ได้แก่ ยีน *PPR7* ที่ได้จากข้าวพันธุ์ กข47 และเมื่อเปรียบเทียบเฉพาะบริเวณที่แปลรหัสไปเป็นโปรตีนนั้นมีขนาดเท่ากับ 1,377 คู่เบส หรือมีขนาดของโปรตีนเท่ากับ 458 กรดอะมิโน

- กลุ่มที่ 2 ยีน *PPR7* ที่มีขนาดของลำดับเบสยาว 1,736 คู่เบส ซึ่งเท่ากับยีนจากข้าวพันธุ์ ZS97A ได้แก่ ยีน *PPR7* ที่ได้จากข้าวพันธุ์ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1 และ IR64 และเมื่อเปรียบเทียบเฉพาะบริเวณที่แปลรหัสไปเป็นโปรตีนนั้นมีขนาดเท่ากับ

1,377 คู่เบส หรือมีขนาดของโปรตีนเท่ากับ 458 กรดอะมิโน โดยพบว่าเกิดการขาดหายไปของลำดับเบส (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 ซึ่งเป็นยีนจากข้าวพันธุ์ Minghui 63 ที่ได้จากฐานข้อมูล และเมื่อเปรียบเทียบเฉพาะบริเวณที่แปลรหัสไปเป็นโปรตีนนั้นมีขนาดเท่ากับ 1,365 คู่เบส หรือมีขนาดของโปรตีนเท่ากับ 454 กรดอะมิโน เนื่องจากบริเวณที่อยู่ด้านหลัง (downstream) ของจุดเริ่มต้นการแปลรหัส (start codon) หรือบริเวณรหัสมีการขาดหายไปของลำดับเบส (deletion) จำนวน 12 คู่เบส (5'-CCCGCACCCGCG-3') ตำแหน่งที่ 32 ถึง 44 นับจากจุดเริ่มต้นการแปลรหัสซึ่งแปลรหัสได้เป็น 4 กรดอะมิโน (TRAR)

```

CH1_PPR7 : CCGAGACCGATCTGGCCCTCCATCCGCGCGCCGACCAATCGGACGGTGGTGTATTACTGTAAGTCCAGGTCGGTGACCGTACAAGCCGGAATATTCAATAGCGTC : 110
IR64_PPR7 : ..... : 110
PPR7-2-458 : ..... : 110
KDM105_PPR : ..... : 110
IR58025B_P : ..... : 110
HN_PPR7 : ..... : 110
PPR7-I : ..... : 105
PPR7-ZH-45 : ..... : 109
PPR7-M-454 : ..... : 109
RD47_PPR7 : ..... : 109
PPR458_7 : ..... : 109

```

```

CH1_PPR7 : GTTCGGTCCCTGGCTTCCATTTCTCAGCTCCG-----CGCGCGCGCGCGGGGAGGCTCGCGCGCGGTGCACACCCCTACCGCGCGCGCACCGCGCGCC : 211
IR64_PPR7 : ..... : 211
PPR7-2-458 : ..... : 211
KDM105_PPR : ..... : 211
IR58025B_P : ..... : 211
HN_PPR7 : ..... : 219
PPR7-I : ..... : 219
PPR7-ZH-45 : ..... : 219
PPR7-M-454 : ..... : 210
RD47_PPR7 : ..... : 219
PPR458_7 : ..... : 219

```

```

CH1_PPR7 : CGCGCGCGCGCGTCCCAGCGCGCAGGGTGTACGACCCAAGACTAGGGCGCGCGGGGGCAGTGGCACCAGGGCGCGCAGCGTGTCTGACGAATTGCCGCTACG : 321
IR64_PPR7 : ..... : 321
PPR7-2-458 : ..... : 321
KDM105_PPR : ..... : 321
IR58025B_P : ..... : 321
HN_PPR7 : ..... : 323
PPR7-I : ..... : 329
PPR7-ZH-45 : ..... : 317
PPR7-M-454 : ..... : 329
RD47_PPR7 : ..... : 329
PPR458_7 : ..... : 329

```

```

CH1_PPR7 : GGGTGGGGGGCTCCGATCTACAGCTTCAACCGCACCTCACCGACCTCGCGGTTGACAGCCAGCGCGAGCAGTTTGGTCTTCAACCGGATGGCCGAGCGGGCGCGG : 431
IR64_PPR7 : ..... : 431
PPR7-2-458 : ..... : 431
KDM105_PPR : ..... : 431
IR58025B_P : ..... : 431
HN_PPR7 : ..... : 439
PPR7-I : ..... : 439
PPR7-ZH-45 : ..... : 427
PPR7-M-454 : ..... : 439
RD47_PPR7 : ..... : 439
PPR458_7 : ..... : 439

```

```

CH1_PPR7 : ACGAGTAACTCCCAGCTTGTGCACCTACAGCATTCTCATCGTTGCTGCTGCCGCGCGGGCGGTTGGACCTCGGTTTCGGCGCCTTGGGCAATGTCATTAAAGAGGGA : 541
IR64_PPR7 : ..... : 541
PPR7-2-458 : ..... : 541
KDM105_PPR : ..... : 541
IR58025B_P : ..... : 541
HN_PPR7 : ..... : 541
PPR7-I : ..... : 549
PPR7-ZH-45 : ..... : 537
PPR7-M-454 : ..... : 549
RD47_PPR7 : ..... : 549
PPR458_7 : ..... : 549

```

```

CH1_PPR7 : TTTAGAGTGGAGCCATCACCTTCGCTCCCTGCTCAAGGGCCTTGTGCCGACAAGGACGAGCGCAGCAATGGACATAGTGTCCCGGAAATGACCCGAGCTCGCTG : 651
IR64_PPR7 : ..... : 651
PPR7-2-458 : ..... : 651
KDM105_PPR : ..... : 651
IR58025B_P : ..... : 651
HN_PPR7 : ..... : 659
PPR7-I : ..... : 659
PPR7-ZH-45 : ..... : 647
PPR7-M-454 : ..... : 659
RD47_PPR7 : ..... : 659
PPR458_7 : ..... : 659

```

```

CH1_PPR7 : CATGCCAGATGTTTCTCCTCGACCATTTCTTCTCAGGGTCTCTGTGATGAGAAGAGGCAAGAGCTCTCGAGCTGCTGCACATGATGGCTGATGATCGAGGAGGAG : 761
IR64_PPR7 : ..... : 761
PPR7-2-458 : ..... : 761
KDM105_PPR : ..... : 761
IR58025B_P : ..... : 761
HN_PPR7 : ..... : 769
PPR7-I : ..... : 769
PPR7-ZH-45 : ..... : 757
PPR7-M-454 : ..... : 769
RD47_PPR7 : ..... : 769
PPR458_7 : ..... : 769

```

```

CH1_PPR7 : GTAGCCACCTGATGTGGTGTCTGATATACCCTGTCTATCAATGGCTTCTTCAAAGAGGGGATTCAGACAAAGCTTACAGTACATACCATGAAATGCTTGGTCGGAGGATT : 871
IR64_PPR7 : ..... : 871
PPR7-2-458 : ..... : 871
KDM105_PPR : ..... : 871
IR58025B_P : ..... : 871
HN_PPR7 : ..... : 871
PPR7-I : ..... : 879
PPR7-ZH-45 : ..... : 867
PPR7-M-454 : ..... : 879
RD47_PPR7 : ..... : 879
PPR458_7 : ..... : 879

```

CH1_PPR7	:	TCACCAAAATGTTGTGACTAGACGCTCTATTGCTGGGTTATGGAAGGCTCAAGCTATGGACAAAGCCATGGAGGTA	900	*	920	*	940	*	960	*	980	*	981
IR64_PPR7	:											981
PPR7-2-458	:											981
KDM105_PPR	:											981
IR58025B_P	:											981
HN_PPR7	:											981
PPR7-I	:											989
PPR7-ZH-45	:											989
PPR7-M-454	:											989
RD47_PPR7	:											989
PPR458_7	:											989
CH1_PPR7	:	TGATTGCATGACATAGTAGTATTCTGCATGGATTTGCTCTCAGGGCAGCAAAAGAGGCTATTGGAACCTC	1000	*	1020	*	1040	*	1060	*	1080	*	1100
IR64_PPR7	:											1091
PPR7-2-458	:											1091
KDM105_PPR	:											1091
IR58025B_P	:											1091
HN_PPR7	:											1091
PPR7-I	:											1099
PPR7-ZH-45	:											1099
PPR7-M-454	:											1087
RD47_PPR7	:											1099
PPR458_7	:											1099
CH1_PPR7	:	TTGTTACCTATAGATCACTGATGAATATCTTTGCAAGAAATGGAAGTGCACCAAAGCTAGAAAGATTT	1120	*	1140	*	1160	*	1180	*	1200	*	1201
IR64_PPR7	:											1201
PPR7-2-458	:											1201
KDM105_PPR	:											1201
IR58025B_P	:											1201
HN_PPR7	:											1201
PPR7-I	:											1209
PPR7-ZH-45	:											1209
PPR7-M-454	:											1197
RD47_PPR7	:											1209
PPR458_7	:											1209
CH1_PPR7	:	ACCTATCGTACCCCTGCTTCAGGGTATGCTACCAAAAGGAGCCCTTGTGAGATGCATGCTCTCTTGGATT	1220	*	1240	*	1260	*	1280	*	1300	*	1320
IR64_PPR7	:											1311
PPR7-2-458	:											1311
KDM105_PPR	:											1311
IR58025B_P	:											1311
HN_PPR7	:											1311
PPR7-I	:											1319
PPR7-ZH-45	:											1319
PPR7-M-454	:											1307
RD47_PPR7	:											1319
PPR458_7	:											1319
CH1_PPR7	:	CAACATTCTAATATGTGCATACGCTAAACAAAGAGAAAGTAGATCAGGCAATGCTTGTATTGAGCAAAAT	1340	*	1360	*	1380	*	1400	*	1420	*	1421
IR64_PPR7	:											1421
PPR7-2-458	:											1421
KDM105_PPR	:											1421
IR58025B_P	:											1421
HN_PPR7	:											1421
PPR7-I	:											1429
PPR7-ZH-45	:											1429
PPR7-M-454	:											1417
RD47_PPR7	:											1429
PPR458_7	:											1429
CH1_PPR7	:	CAGTTATGATGTACTTTGCAAGTACGGCAGGTAGATGATGCTATGCTTATTTGAGCAGATGATCGATGA	1440	*	1460	*	1480	*	1500	*	1520	*	1540
IR64_PPR7	:											1531
PPR7-2-458	:											1531
KDM105_PPR	:											1531
IR58025B_P	:											1531
HN_PPR7	:											1531
PPR7-I	:											1539
PPR7-ZH-45	:											1539
PPR7-M-454	:											1527
RD47_PPR7	:											1539
PPR458_7	:											1539
CH1_PPR7	:	GCTTATCTAAATAAATTTATACTTTCGTTTCTCTTGTAGTATGCTATAACCAATTAGATGGCTTTT	1560	*	1580	*	1600	*	1620	*	1640	*	1641
IR64_PPR7	:											1641
PPR7-2-458	:											1641
KDM105_PPR	:											1641
IR58025B_P	:											1641
HN_PPR7	:											1641
PPR7-I	:											1649
PPR7-ZH-45	:											1637
PPR7-M-454	:											1649
RD47_PPR7	:											1649
PPR458_7	:											1649
CH1_PPR7	:	TGAAATTCCTATCTGTATGCATCATTGTTAACACAGCGACACACGAAATAGTCTTCTTGAGCTAATCATT	1660	*	1680	*	1700	*	1720	*	1740	*	1736
IR64_PPR7	:											1736
PPR7-2-458	:											1736
KDM105_PPR	:											1736
IR58025B_P	:											1736
HN_PPR7	:											1736
PPR7-I	:											1744
PPR7-ZH-45	:											1744
PPR7-M-454	:											1732
RD47_PPR7	:											1744
PPR458_7	:											1744

ภาพที่ 17 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน PPR7 ของข้าวพันธุ์ Minghui 63 (M), พันธุ์ IR24 (I), พันธุ์ ZS97A (Z) และพันธุ์ ZH11 (ZH) และยีน PPR458 จากข้าวพันธุ์ IR24 (PPR458) และจากการโคลนยีนข้าวพันธุ์ IR58025B (IR58025B), พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (KDM105), พันธุ์เจ้าหอมนิล (HN), พันธุ์ชัยนาท 1 (CH1), พันธุ์กข 47 (RD47) และพันธุ์ IR64 (IR64)

โดย * สีแดง คือบริเวณที่มีผลกระทบต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงลำดับโปรตีน

และหากทำการเปรียบเทียบเฉพาะบริเวณรหัสที่แปลโปรตีนนั้น จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส 4 ตำแหน่ง จากจุดเริ่มต้นการแปลรหัส คือตำแหน่งที่ 870, 924, 1,008 และ 1,154 ที่ส่งผลให้ลำดับของกรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลง คือตำแหน่งที่ 232 (G หรือ D), 250 (Y หรือ C), 278 (N หรือ S) และ 327 (K หรือ E) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 18

PPR458 7	MARRVTTTLTRARTRARGGVPSAQQGTTQDLGRAGGSSTEGARHVLDELPLRGWGASIYSFNRTLTDVARDSPAAAVSLFNRMARAGADEVIFPLCTTSITLIGCCCRAGR	110
RD47 PPR7	110
I-PPR7-458	110
M-PPR7-454	106
HN PPR7	110
IR58025B P	110
KDM105 PPR	110
CH1 PPR7	110
IR64 PPR7	110
Z-PPR7-458	110
ZH-PPR7-45	110

PPR repeat 1		140	160	180	200	220
PPR458 7	LDLGFALGNVIRKGRVEAITFAPLLKGLCADKRTSDAMDIVLRMTLSCMPDVFSCITILLKGLCDENRSQEALELLHMIADDRGGSPDVSYYTTVINGFPFKGDS	220				
RD47 PPR7	220				
I-PPR7-458	220				
M-PPR7-454	216				
HN PPR7	220				
IR58025B P	220				
KDM105 PPR	220				
CH1 PPR7	220				
IR64 PPR7	220				
Z-PPR7-458	220				
ZH-PPR7-45	220				

PPR repeat 2	PPR repeat 3	PPR repeat 4	PPR repeat 5
PPR458 7	DKAVSYTHEMLGRISPNVYYSSTIAALYKAQAMDRAEVLNITMVKNGVMPDCATYNSILHGVCSSGQPKKAIGTIRKRRSDGVEFNVITYRSLMNYLCKNGRGTAKRK	330	
RD47 PPR7	330	
I-PPR7-458	330	
M-PPR7-454	326	
HN PPR7	330	
IR58025B P	330	
KDM105 PPR	330	
CH1 PPR7	330	
IR64 PPR7	330	
Z-PPR7-458	330	
ZH-PPR7-45	330	

PPR repeat 6	PPR repeat 7	PPR repeat 8
PPR458 7	IFDSMTKRGLFPIATYRITLLGGVATKGLVEMHALDLMVRENGIQPDHVFNNILICAVAKQEKVDCAMLVFSKMRQHLGNPNVICYGTVIDVLCSSGSDDAMLYFEQK	440
RD47 PPR7	440
I-PPR7-458	440
M-PPR7-454	436
HN PPR7	440
IR58025B P	440
KDM105 PPR	440
CH1 PPR7	440
IR64 PPR7	440
Z-PPR7-458	440
ZH-PPR7-45	440

PPR458 7	IDEGLTPNIIILSVSSVLF	458
RD47 PPR7	458
I-PPR7-458	458
M-PPR7-454	454
HN PPR7	458
IR58025B P	458
KDM105 PPR	458
CH1 PPR7	458
IR64 PPR7	458
Z-PPR7-458	458
ZH-PPR7-45	458

ภาพที่ 18 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PPR7 ที่ได้จากฐานข้อมูลข้าวพันธุ์ Minghui 63 (M), พันธุ์ IR24 (I), พันธุ์ ZS97A (Z) และพันธุ์ ZH11 (ZH) และโปรตีน PPR458 จากข้าวพันธุ์ IR24 (PPR458) และจากการโคลนยีนข้าวพันธุ์ IR58025B (IR58025B), พันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 (KDM105), พันธุ์เจ้าหอมนิล (HN), พันธุ์ชัยนาท 1 (CH1), พันธุ์กข47 (RD47) และพันธุ์ IR64 (IR64) โดย * สีแดง คือบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน กรอบสี่เหลี่ยมสีแดง คือบริเวณที่แสดงตำแหน่ง PPR (pentatricopeptide

repeat) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม TPRpred (ที่มา; <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tprpred>)

จากการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม TPRpred (ที่มา; <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tprpred>) ทำให้ทราบถึงบริเวณที่เป็นลำดับกรดอะมิโนในกลุ่ม PPR repeat ที่อยู่ในโปรตีน PPR7 มีจำนวนทั้งสิ้น 8 ซ้ำ (ภาพที่ 18) ซึ่งมีลำดับของกรดอะมิโนอยู่ในตำแหน่งเดียวกัน แม้ในข้าวพันธุ์ Minghui 63 ที่มีการขาดหายไป 4 กรดอะมิโน (TRAR) ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 13 ถึง 16 นั้นไม่มีผลกระทบต่อจำนวนของ PPR repeat เนื่องจากบริเวณดังกล่าวอยู่หน้าบริเวณ PPR repeat

6.2.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *PPR10*

ในการเปรียบเทียบลำดับเบสที่โคลนจากข้าวทั้ง 6 พันธุ์ กับลำดับเบสที่มีรายงานในฐานข้อมูลจากข้าวพันธุ์ Minghui 63, ZS97A และ 93-11 (Tang et al., 2014) และยีน *PPR454* จากข้าวพันธุ์ IR24 (Kazama and Toriyama 2014) ซึ่งผลการเปรียบเทียบลำดับเบสพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตามขนาดที่ได้ออกเป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 19) ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 ยีน *PPR10* ที่มีขนาดของลำดับเบสยาว 2,194 คู่เบส ซึ่งเป็นยีนจากข้าวพันธุ์ Minghui 63 และ ZS97A และยีน *PPR454* จากข้าวพันธุ์ IR24 และข้าวพันธุ์ IR64 เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะบริเวณที่แปลรหัสไปเป็นโปรตีนนั้นมีขนาดเท่ากับ 1,365 คู่เบส หรือมีขนาดของโปรตีนเท่ากับ 454 กรดอะมิโน เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสที่ตำแหน่ง 1,392 จาก G ไปเป็น T ทำให้เกิดเป็นรหัสหยุด (stop codon)

- กลุ่มที่ 2 ยีน *PPR10* ที่มีขนาดของลำดับเบสยาว 2,188 คู่เบส ซึ่งเป็นยีนจากข้าวพันธุ์ 93-11, IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1 และ กข 47 เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะบริเวณที่จะถูกแปลรหัสไปเป็นโปรตีนนั้นมีขนาดเท่ากับ 1,710 คู่เบส หรือมีขนาดของโปรตีนเท่ากับ 569 กรดอะมิโน

Start codon

```

CH1_PPR10 : TGCTGCTGCACCTGTACAGTATAGGGCGGGCATGGCCGCCGGCGCCGCTTCCCGCGCTGTGGCTCGGAGGGCTCGATCCAAGGGCGAGGGGGCCGGGGGGGCARTGGC : 110
RD47_PPR10 : ..... : 110
KDM105_PPR : ..... : 110
IR58025B_P : ..... : 110
HN_PPR10 : ..... : 110
PPR10-93-4 : ..... : 110
PPR10-M : ..... : 110
PPR10-2-45 : ..... : 110
PPR454_10 : ..... : 110
IR64_PPR10 : ..... : 110

CH1_PPR10 : GCGGAGGACGCACGCCACGTTGCGACGAATTGCTCCGGCGTGGCAGGGGGCCACGATCTACGGGTTGARCCGGCCCTCGACAGACTCGCGCGTCCACAGCCCAAGGC : 220
RD47_PPR10 : ..... : 220
KDM105_PPR : ..... : 220
IR58025B_P : ..... : 220
HN_PPR10 : ..... : 220
PPR10-93-4 : ..... : 220
PPR10-M : ..... : 220
PPR10-2-45 : ..... : 220
PPR454_10 : ..... : 220
IR64_PPR10 : ..... : 220

CH1_PPR10 : CGCGTGTCCCGCTACAACCGCATGGCCCGAGCCGGCGCCACGAGGTAACCTCCCAACTGTACACCTACAGCGTTCTCATCGGTTGCTGGCCGCCGGCCGCTGG : 330
RD47_PPR10 : ..... : 330
KDM105_PPR : ..... : 330
IR58025B_P : ..... : 330
HN_PPR10 : ..... : 330
PPR10-93-4 : ..... : 330
PPR10-M : ..... : 330
PPR10-2-45 : ..... : 330
PPR454_10 : ..... : 330
IR64_PPR10 : ..... : 330

CH1_PPR10 : ACAATGTCATTAAGAAGGGATTAGAGTGGAGGCCATCACCTTCACACCTCTGCTCAAGGGCCTCTGTGCCGACAGAGGACGAGCGCAATGACATAGTGTCCGC : 440
RD47_PPR10 : ..... : 440
KDM105_PPR : ..... : 440
IR58025B_P : ..... : 440
HN_PPR10 : ..... : 440
PPR10-93-4 : ..... : 440
PPR10-M : ..... : 440
PPR10-2-45 : ..... : 440
PPR454_10 : ..... : 440
IR64_PPR10 : ..... : 440

CH1_PPR10 : AGAATGACCCAGCTCGGCTGCATACCAAAATGCTTCTCCCTGACCATTCTTCTCAAGGCTCTGTGTGATGAGAAGCAAGCAAGAGCTCTCGAGCTGTCCAAATGAT : 550
RD47_PPR10 : ..... : 550
KDM105_PPR : ..... : 550
IR58025B_P : ..... : 550
HN_PPR10 : ..... : 550
PPR10-93-4 : ..... : 550
PPR10-M : ..... : 550
PPR10-2-45 : ..... : 550
PPR454_10 : ..... : 550
IR64_PPR10 : ..... : 550

CH1_PPR10 : GCCTGATGATGGAGTGACTGCCACCTGATGTGGTGTGTACAAACCCGTCATCAATGGCTCTTCAAGAGGGGATCCGGACAAGCTTACGTCATACCATCCATGA : 660
RD47_PPR10 : ..... : 660
KDM105_PPR : ..... : 660
IR58025B_P : ..... : 660
HN_PPR10 : ..... : 660
PPR10-93-4 : ..... : 660
PPR10-M : ..... : 660
PPR10-2-45 : ..... : 660
PPR454_10 : ..... : 660
IR64_PPR10 : ..... : 660

CH1_PPR10 : TGTGGACCCAGGGATTTGCCAGATGTTGTGACTTACAGCTCTATTATCGCTGCCCTTATGCAAGGCTCAAGCTATGGACAGGCATGGAGGTACTTACACCATGGT : 770
RD47_PPR10 : ..... : 770
KDM105_PPR : ..... : 770
IR58025B_P : ..... : 770
HN_PPR10 : ..... : 770
PPR10-93-4 : ..... : 770
PPR10-M : ..... : 770
PPR10-2-45 : ..... : 770
PPR454_10 : ..... : 770
IR64_PPR10 : ..... : 770

CH1_PPR10 : AAGNATGGTTCATGCCTAATTCAGGACATATAATGATATTGGACGGATATTGCTCTTCAGGGCAGTTGACAGAGGCTATTGGATTCTCAAAAAGATGTGCAATGA : 880
RD47_PPR10 : ..... : 880
KDM105_PPR : ..... : 880
IR58025B_P : ..... : 880
HN_PPR10 : ..... : 880
PPR10-93-4 : ..... : 880
PPR10-M : ..... : 880
PPR10-2-45 : ..... : 880
PPR454_10 : ..... : 880
IR64_PPR10 : ..... : 880

CH1_PPR10 : TGGTGTGCAACAGATGTTGTTACTGTAACTTGGTGATGGATTATCTTTGCAAGAACAGAGATGCACGGAGCTAGAAAAGATTTTCGATTCTATGACCAAGTGGGGC : 990
RD47_PPR10 : ..... : 990
KDM105_PPR : ..... : 990
IR58025B_P : ..... : 990
HN_PPR10 : ..... : 990
PPR10-93-4 : ..... : 990
PPR10-M : ..... : 990
PPR10-2-45 : ..... : 990
PPR454_10 : ..... : 990
IR64_PPR10 : ..... : 990

CH1_PPR10 : TAAAGCTGATATTACTACCTATTGTACCCGCTTCAGGGGTATGCTACCAAAGAGGCCCTTGTGAGATGCATGATCTCTGGATTGATGGTATGGACGGTATCCAA : 1100
RD47_PPR10 : ..... : 1100
KDM105_PPR : ..... : 1100
IR58025B_P : ..... : 1100
HN_PPR10 : ..... : 1100
PPR10-93-4 : ..... : 1100
PPR10-M : ..... : 1100
PPR10-2-45 : ..... : 1100
PPR454_10 : ..... : 1100
IR64_PPR10 : ..... : 1100

```

CH1_PPR10 : CCTAATCATCATGATTCAACATTTCTAATATGTCATACGCTAAACAAGAAAAAGTAGATGAGGCAATGCTTGTATT CAGCAAAATGAGCAGCAAGGATGAGTCCGAA : 1210
RD47_PPR10 : : 1210
KDM105_PPR : : 1210
IR58025B_P : : 1210
HN_PPR10 : : 1210
PPR10-93-4 :G..... : 1210
PPR10-M :G..... : 1210
PPR10-Z-45 :G..... : 1210
PPR454_10 :G..... : 1210
IR64_PPR10 :G..... : 1210

CH1_PPR10 : TGCAGTGAATACAGAAACATCATAGATGTACTCTGCAAGCTAGGCAGAGATACAGATGCAAGTACCTTAAAGCAGATGATCAATGAAGGACTAAGCCCTGACATCA : 1320
RD47_PPR10 : : 1320
KDM105_PPR : : 1320
IR58025B_P : : 1320
HN_PPR10 : : 1320
PPR10-93-4 :G..... : 1320
PPR10-M :G..... : 1320
PPR10-Z-45 :G..... : 1320
PPR454_10 :G..... : 1320
IR64_PPR10 :G..... : 1320

CH1_PPR10 : TTGTATATACCCCTTAATTCTAGGTTTTGTACCTGTGACAAATGGGAGAAGGCTGAGGAGCTTAATTTTAAATGTTGGATCAAGGATCTGTCCAGCACACCATTTTC : 1430
RD47_PPR10 : : 1430
KDM105_PPR : : 1430
IR58025B_P : : 1430
HN_PPR10 : : 1430
PPR10-93-4 : : 1430
PPR10-M : : 1430
PPR10-Z-45 : : 1430
PPR454_10 : : 1430
IR64_PPR10 : : 1430

Stop codon ในขั้วกลุ่มที่ 2

1,505-1,510

CH1_PPR10 : TTTAGTAGAATATTTATAGTTTTTGCAAAGAGGGAGAGTTATAGAACTGAAAAACTTTTGACTTGTATGGC-----TGGTGTAAAGCCTGATGTCATTACATACAA : 1534
RD47_PPR10 : : 1534
KDM105_PPR : : 1534
IR58025B_P : : 1534
HN_PPR10 : : 1534
PPR10-93-4 : : 1534
PPR10-M :G.....ACATAG : 1540
PPR10-Z-45 :G.....ACATAG : 1540
PPR454_10 :G.....ACATAG : 1540
IR64_PPR10 :G.....ACATAG : 1540

CH1_PPR10 : TGCACATCATGATGGATATTGCCTAGCCGGTGTGACGTAAACACGAGCCCTGGGAGATCTGCTTAACTCCAGTGCAGGTCCAAAACACGCCCTCGGGTATGCTTAGCG : 1644
RD47_PPR10 : : 1644
KDM105_PPR : : 1644
IR58025B_P : : 1644
HN_PPR10 : : 1644
PPR10-93-4 : : 1644
PPR10-M :T..... : 1650
PPR10-Z-45 :T..... : 1650
PPR454_10 :T..... : 1650
IR64_PPR10 :T..... : 1650

Stop codon ในขั้วกลุ่มที่ 1

CH1_PPR10 : TGCAGTGAATTTGATCCTGCAATCAGCAAGAAACAAAGCAAAAGAACCGGGCTTAATCCATAACGATAGCCGATCGGCTAGGCGCCGATGACATACATTTATCTT : 1754
RD47_PPR10 : : 1754
KDM105_PPR : : 1754
IR58025B_P : : 1754
HN_PPR10 : : 1754
PPR10-93-4 : : 1760
PPR10-M :A..... : 1760
PPR10-Z-45 :A..... : 1760
PPR454_10 :A..... : 1760
IR64_PPR10 :A..... : 1760

CH1_PPR10 : TGAGCCGATGTCATATGTGCATCGGCAATCATTATAAATAAGAGGGATTAATCTATTTCGATCGGCTGTAGATTAAACAATACAGTCCCTTATCGATATA : 1864
RD47_PPR10 : : 1864
KDM105_PPR : : 1864
IR58025B_P : : 1864
HN_PPR10 : : 1864
PPR10-93-4 : : 1864
PPR10-M :G.....T..... : 1870
PPR10-Z-45 :G.....T..... : 1870
PPR454_10 :G.....T..... : 1870
IR64_PPR10 :G.....T..... : 1870

CH1_PPR10 : TACTTAAATCAAGTATTGGGATAGATCGGCTCTCTATGCGGAGACAGATGAATCACTTAGATCGAATATATATTAATATGAGATTATATGTTTCATAGCATAGCGC : 1974
RD47_PPR10 : : 1974
KDM105_PPR : : 1974
IR58025B_P : : 1974
HN_PPR10 : : 1974
PPR10-93-4 : : 1980
PPR10-M :C..... : 1980
PPR10-Z-45 :C..... : 1980
PPR454_10 :C..... : 1980
IR64_PPR10 :C..... : 1980

CH1_PPR10 : ATCAGATGGATCTAGGATGTATTGGCTAATCTCCGATACTACTCTATATTAAGATATTAAGCAAGTAGAATATACTAAACAAAAGCCCTAATATACTTAAATGCAACAA : 2084
RD47_PPR10 : : 2084
KDM105_PPR : : 2084
IR58025B_P : : 2084
HN_PPR10 : : 2084
PPR10-93-4 : : 2084
PPR10-M :C.T.G.....G..... : 2090
PPR10-Z-45 :C.T.G.....G..... : 2090
PPR454_10 :C.T.G.....G..... : 2090
IR64_PPR10 :C.T.G.....G..... : 2090

CH1_PPR10 : GATCTTAAATAAAGGCGAGTTTTAATCATGTCATCGAGCATATAGGATAAAAGTAGTAAATCAGATAAGATCGACTGAAACCCCGATACCTCCATCGGC- : 2188
RD47_PPR10 : : 2188
KDM105_PPR : : 2188
IR58025B_P : : 2188
HN_PPR10 : : 2188
PPR10-93-4 : : 2194
PPR10-M : T.....A.....G.....G..... : 2194
PPR10-Z-45 : T.....A.....G.....G..... : 2194
PPR454_10 : T.....A.....G.....G..... : 2194
IR64_PPR10 : T.....A.....G.....G..... : 2194

ภาพที่ 19 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *PPR10* จากข้าวพันธุ์ Minghui 63 (M), พันธุ์ ZS97A (Z) และพันธุ์ 93-11 (93) และยีน *PPR454* จากข้าวพันธุ์ IR24 (*PPR454*) และจากการโคลนยีนข้าวพันธุ์ IR58025B (*IR58025B*), พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (*KDM105*), พันธุ์เจ้าหอมนิล (HN), พันธุ์ชัยนาท 1 (CH1), พันธุ์กข47 (RD47) และพันธุ์ IR64 (*IR64*) โดย * สีแดง คือบริเวณที่มีผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงลำดับโปรตีน

จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าหากทำการเปรียบเทียบใน ส่วนของบริเวณที่อยู่ด้านหลังของบริเวณรหัสหยุดในข้าวกลุ่มที่ 2 นั้นจะพบบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสระหว่าง 2 กลุ่มอยู่ทั้งสิ้น 15 ตำแหน่ง โดยพบว่ามี การเกิดการเพิ่มขึ้นของลำดับเบส (insertion) ในข้าวกลุ่มที่ 2 อีก 1 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 1,505 ถึง 1,510 หรือเท่ากับ 6 คู่เบส (5'-ACATAC-3') ซึ่งบริเวณดังกล่าวอยู่นั้นอยู่หลังรหัสหยุดของข้าวในกลุ่มที่ 2 แต่ยังเป็นบริเวณรหัสของข้าวในกลุ่มที่ 1

และหากทำการเปรียบเทียบเฉพาะบริเวณที่แปลไปเป็นรหัสของโปรตีนนั้น โดย จะใช้รหัสของข้าวในกลุ่มที่ 2 เป็นหลักเนื่องจากลำดับกรดอะมิโนสั้นกว่าในกลุ่มที่ 1 จะเห็นได้ว่าพบ การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส 12 ตำแหน่ง โดยมีทั้งสิ้น 5 ตำแหน่งที่ผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน คือตำแหน่งที่ 187, 232, 409, 839 และ 957 ในข้าวกลุ่มที่ 2 จะมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสจากเบส A ไปเป็น G, C ไปเป็น G, C ไปเป็น T, A ไปเป็น T และ G ไปเป็น T ตามลำดับ โดยส่งผลให้ลำดับของกรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลงจากกรดอะมิโน T ไปเป็น A, กรดอะมิโน H ไปเป็น D, กรดอะมิโน R ไปเป็น C, กรดอะมิโน K ไปเป็น M และกรดอะมิโน W ไปเป็น C ตามลำดับด้วยเช่นกัน ดังแสดงในภาพที่ 20

KDM105 PPR	:	MARRAASHAVGSEGSIQGRGGGRAGGNGAEDDARHVFDLRRGRGATYYGLNRALDDVARHSPTAAVSRYNPMARAGAHEVTINLYTYSVLIGCCCRAGRLDNVHKGFV	:	110				
CH1 PPR10	:	:	110				
RD47 PPR10	:	:	110				
IR58025B P	:	:	110				
HN PPR10	:	:	110				
PPR10_93_4	:	:	110				
PPR10_M_45	:	:	110				
PPR454_10	:	:	110				
IR64 PPR10	:	:	110				
PPR10_Z_45	:	:	110				
<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; text-align: center;">PPR repeat 1</td> <td style="width: 50%; text-align: center;">PPR repeat 2</td> </tr> </table>					PPR repeat 1	PPR repeat 2		
PPR repeat 1	PPR repeat 2							
KDM105 PPR	:	EAITETPLLLKGLCADKRTSDAMDIVLRMTQLGCI PNVSCTLLKGLGIDENRSQEALELLOMMPDGGDCPSDVLVYNTVINGFFKEGDPKAYATYHEMFDQGLPDI	:	220				
CH1 PPR10	:	:	220				
RD47 PPR10	:	:	220				
IR58025B P	:	:	220				
HN PPR10	:	:	220				
PPR10_93_4	:	:	220				
PPR10_M_45	:	:	220				
PPR454_10	:	:	220				
IR64 PPR10	:	:	220				
PPR10_Z_45	:	:	220				
<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 25%;">PPR repeat 3</td> <td style="width: 25%;">PPR repeat 4</td> <td style="width: 25%;">PPR repeat 5</td> <td style="width: 25%;"></td> </tr> </table>					PPR repeat 3	PPR repeat 4	PPR repeat 5	
PPR repeat 3	PPR repeat 4	PPR repeat 5						
KDM105 PPR	:	VTYSSIIIALCKRAQAMDKAMEVLTMTVKNGVMPNRTYNSIVHGYGSSGQLEAIGFLKMKCSGVEFDVTCNLLMDVLCNKRRCTEARKIFDSMTRWGLKPDITTYCT	:	330				
CH1 PPR10	:	:	330				
RD47 PPR10	:	:	330				
IR58025B P	:	:	330				
HN PPR10	:	:	330				
PPR10_93_4	:	:	330				
PPR10_M_45	:	:	330				
PPR454_10	:	:	330				
IR64 PPR10	:	:	330				
PPR10_Z_45	:	:	330				
<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 33%;">PPR repeat 6</td> <td style="width: 33%;">PPR repeat 7</td> <td style="width: 33%;">PPR repeat 8</td> </tr> </table>					PPR repeat 6	PPR repeat 7	PPR repeat 8	
PPR repeat 6	PPR repeat 7	PPR repeat 8						
KDM105 PPR	:	LIQGYATRGALVEMHDLDDLMVWNGIQNHVFNILICAYAKQEKVDEAMLVFSKMRQQGLSPNVNYRTIIDVLCCKLGRVYDAVLTIKQMINEGLTPTDIEVYTPLIHGF	:	440				
CH1 PPR10	:	:	440				
RD47 PPR10	:	:	440				
IR58025B P	:	:	440				
HN PPR10	:	:	440				
PPR10_93_4	:	:	440				
PPR10_M_45	:	:	440				
PPR454_10	:	:	440				
IR64 PPR10	:	:	440				
PPR10_Z_45	:	:	440				
<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">PPR repeat 9</td> <td style="width: 50%;">PPR repeat 10</td> </tr> </table>					PPR repeat 9	PPR repeat 10		
PPR repeat 9	PPR repeat 10							
KDM105 PPR	:	CTCDKWERAEELIFEMLDQGIQCPDTIFFSRITIIYSPCKEGRVIESEKLPDLMAGVKPDVITYNALISGYCLAGVDVKHEAWEICLTPVQVQNTPSGMLVSPVDLILQSTRN	:	550				
CH1 PPR10	:	:	550				
RD47 PPR10	:	:	550				
IR58025B P	:	:	550				
HN PPR10	:	:	550				
PPR10_93_4	:	:	550				
PPR10_M_45	:	:	550				
PPR454_10	:	:	550				
IR64 PPR10	:	:	550				
PPR10_Z_45	:	:	550				
KDM105 PPR	:	KDKETAVRSINDRSARCR	:	569				
CH1 PPR10	:	:	569				
RD47 PPR10	:	:	569				
IR58025B P	:	:	569				
HN PPR10	:	:	569				
PPR10_93_4	:	:	569				
PPR10_M_45	:	:	569				
PPR454_10	:	:	569				
IR64 PPR10	:	:	569				
PPR10_Z_45	:	:	569				

ภาพที่ 20 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน PPR10 ที่ได้จากฐานข้อมูลข้าว พันธุ์ Minghui 63 (M), พันธุ์ ZS97A (Z) และพันธุ์ 93-11 (93) และโปรตีน PPR454 จากข้าวพันธุ์ IR24 (PPR454) และจากการโคลนยีนข้าวพันธุ์ IR58025B (IR58025B), พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (KDM105), พันธุ์เจ้าหอมนิล (HN), พันธุ์ชัยนาท 1 (CH1), พันธุ์กข47 (RD47) และพันธุ์ IR64 (IR64) โดย * สีแดง คือบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน

กรอบสี่เหลี่ยมสีเหลือง คือ บริเวณที่แสดงตำแหน่ง PPR (pentatricopeptide repeat) ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม TPRpred (ที่มา: <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tpred>)

จากการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม TPRpred (ที่มา; <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tpred>) ทำให้ทราบถึงบริเวณที่เป็นลำดับกรดอะมิโนในกลุ่ม PPR repeat ที่อยู่ในยีน *PPR10* (ภาพที่ 20) สามารถทำการตามจำนวนของบริเวณ PPR repeat ได้ 2 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่ 1 ยีน *PPR710* ที่ได้จากข้าวพันธุ์ 93-11, IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1 และ กข47 มีขนาดของโปรตีนเท่ากับ 454 กรดอะมิโน พบบริเวณลำดับกรดอะมิโนที่มีลักษณะเป็น PPR repeat จำนวน 8 ซ้ำ อยู่ระหว่างตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 149 ถึง 430

- กลุ่มที่ 2 ยีน *PPR10* ที่ได้จากข้าวพันธุ์ Minghui 63 และ ZS97A และยีน *PPR454* จากข้าวพันธุ์ IR24 และ IR64 มีขนาดของโปรตีนเท่ากับ 569 กรดอะมิโน พบบริเวณลำดับกรดอะมิโนที่มีลักษณะเป็น PPR repeat จำนวน 10 ซ้ำ อยู่ระหว่างตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 149 ถึง 500

โดยบริเวณ PPR repeat ทั้ง 8 ซ้ำในข้าวกลุ่มที่ 1 นั้นอยู่บริเวณเดียวกับข้าวในกลุ่มที่ 2 แต่เนื่องจากในข้าวกลุ่มที่ 1 เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 1,392 (เปลี่ยนจาก G ไปเป็น T) ซึ่งเมื่อแปลเป็นกรดอะมิโนเป็นรหัสหยุด จึงทำให้เมื่อแปลเป็นโปรตีนแล้วในข้าวกลุ่มที่ 1 แปลได้โปรตีนที่สั้นกว่าในกลุ่มที่ 2 จึงทำให้ในข้าวกลุ่มที่ 2 มีจำนวนของ PPR repeat มากกว่า 2 ซ้ำ

จากภาพที่ 19 และ 20 จะเห็นได้ว่าในส่วนของยีน *PPR10* ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์ต่างๆ จะสามารถแยกยื่นออกเป็น 2 กลุ่ม ออกจากกันได้อย่างชัดเจนโดยดูได้จากบริเวณที่ถูกแปลไปเป็นรหัสของโปรตีนที่มีความยาวที่แตกต่างกัน โดยจากการโคลนยีน *PPR10* จากข้าวทั้ง 6 พันธุ์ สามารถแยกตามแตกต่างของยีน *PPR10* จากข้าวพันธุ์ IR64 ออกจากข้าวที่เหลืออีก 5 พันธุ์ จากความยาวของบริเวณรหัสของโปรตีนได้ เนื่องจากขนาดของโปรตีนในข้าวพันธุ์ IR46 นั้นมีขนาดสั้นกว่าพันธุ์อื่นคือ 454 กรดอะมิโน เมื่อเทียบกับข้าวพันธุ์อื่นที่มีขนาดเท่ากับ 569 กรดอะมิโน แต่กับเหมือนลำดับกรดอะมิโนของกับข้าวพันธุ์ Minghui 63 และพันธุ์ ZS97A และยีน *PPR454* จากข้าวพันธุ์ IR24 ที่มีรายงานในฐานข้อมูล

จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสของยีนแก้ความเป็นหมันในระบบ WA-CMS ของยีน *pollen-specific SF21* ที่ตำแหน่ง *Rf3* และยีน *PPR7* และ *PPR10* ที่ตำแหน่ง *Rf4* นั้นสามารถใช้ในการแบ่งแยกลำดับเบสจากข้าวแต่ละสายพันธุ์ออกเป็นกลุ่มได้ชัดเจน โดยจากการเปลี่ยนแปลงจุดต่าง ๆ ของทั้ง 3 บริเวณ ที่ทำการศึกษานี้อาจจะสามารถทำการสรุปออกมาเป็นตารางได้ดังนี้ (ตารางที่ 7)



ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนแก่ความเป็นหมันในระบบ WA-CMS ของยีน pollen-specific SF21 ตำแหน่ง Rf3 และยีน PPR7 และ PPR10 ตำแหน่ง Rf4

ชื่อพันธุ์ข้าว	ตำแหน่ง Rf4													
	ยีน PPR7							ยีน PPR10						
	ขนาด (คู่เบส)	ดีเอ็นเอ (คู่เบส)	ขนาด (คู่เบส)	โปรตีน (กรดอะมิโน)	ก่อนจุดเริ่มต้นการแปลรหัส	จำนวนซ้ำ	PPR repeat	ดีเอ็นเอ (คู่เบส)	ขนาด (คู่เบส)	โปรตีน (กรดอะมิโน)	การเปลี่ยนแปลงที่ใช้ในการแบ่งกลุ่ม	จำนวนซ้ำ	การเปลี่ยนแปลงที่ใช้ในการแบ่งกลุ่ม	ที่มา
Minghui 63	-	1,732	1,365	454	2	8	2,194	1,365	454	1	10	1	10	PPR repeat
IR24	-	1,736	1,377	458	2	8	-	-	-	-	-	-	-	Tang et al. (2014)
ZS97A	-	1,744	1,377	458	1	8	2,194	1,365	454	1	10	1	10	
ZH11	-	1,736	1,377	458	2	8	-	-	-	-	-	-	-	
93-11	-	-	-	-	-	-	2,188	1,710	569	2	8	2	8	
IR24	-	1,736	1,377	458	2	8	2,194	1,365	454	1	10	1	10	Kazama and Toriyama (2014)
IR58025B	499	1,744	1,377	458	1	8	2,188	1,710	569	2	8	2	8	
ขาวดอกมะลิ105	499	1,744	1,377	458	1	8	2,188	1,710	569	2	8	2	8	การศึกษานี้
เจ้าหอมนิล	499	1,744	1,377	458	1	8	2,188	1,710	569	2	8	2	8	
ชัยนาท1	499	1,744	1,377	458	1	8	2,188	1,710	569	2	8	2	8	
กข47	499	1,736	1,377	458	2	8	2,188	1,710	569	2	8	2	8	
IR64	497	1,744	1,377	458	1	8	2,194	1,365	454	1	10	1	10	

หมายเหตุ:

- * หมายถึง การขาดหายไปของลำดับเบส (deletion) ที่ตำแหน่ง 29 ถึง 30 (GA) ซึ่ง Suresh et al. (2012) ได้รายงานไว้ว่า หากเป็นซ้ำสายพันธุ์ R จะพบบริเวณการขาดหายไปของลำดับเบสตำแหน่งดังกล่าว
- ** หมายถึง การขาดหายไปของลำดับเบส (deletion) ที่ตำแหน่ง 77 ถึง 79 (GAG) ซึ่ง Suresh et al. (2012) ได้รายงานไว้ว่า หากเป็นซ้ำสายพันธุ์ R จะพบบริเวณการขาดหายไปของลำดับเบสตำแหน่งดังกล่าว
- *** คือ การขาดหายไปของลำดับเบส ที่ตำแหน่ง 71 (C) และการเพิ่มขึ้นของลำดับเบส ที่ตำแหน่ง 146 ถึง 154 หรือ เท่ากับ 9 คู่เบส (5'-CCGCCGGCG-3')
- 2 คือ ไม่เกิดความแตกต่างดังเช่นหมายเลข 1
- 1 คือ ไม่เกิดการเพิ่มขึ้นของลำดับเบส 1 ตำแหน่ง คือตำแหน่งที่ 1,505 ถึง 1,510 หรือเท่ากับ 6 คู่เบส (5'-ACATAC-3') ซึ่งบริเวณดังกล่าวนี้ได้อยู่หลังตำแหน่งหยุดของซ้ำในกลุ่มหนึ่ง แต่ยังเป็นบริเวณรหัสของซ้ำอีกกลุ่ม
- 2 คือ เกิดการเพิ่มขึ้นของลำดับเบสดังเช่นหมายเลข 1
- หมายถึง ไม่มีข้อมูล

จากตารางที่ 7 หากทำการเปรียบเทียบในส่วนของขนาดของยีนแก่ความเป็นหมันในระบบ WA-CMS บางส่วนของยีน *pollen-specific SF21* ที่ตำแหน่ง *Rf3* และลำดับเบสที่ได้จากการโคลนยีน *PPR7* และ *PPR10* ที่ตำแหน่ง *Rf4* จากข้าวจำนวน 6 พันธุ์ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ณ บริเวณต่างๆ นั้นจะสามารถทำการแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 พบในข้าวจำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล และ ชัยนาท 1 โดยลำดับเบสบางส่วนของยีน *pollen-specific SF21* ที่ตำแหน่ง *Rf3* นั้น ไม่พบการขาดหายไปของลำดับเบส (deletion) ทั้ง 2 ตำแหน่ง และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในยีน *PPR7* เหมือนกับยีนที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ A และยีน *PPR10* เหมือนกับยีนที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ B ที่ได้รายงานไว้ในฐานข้อมูล

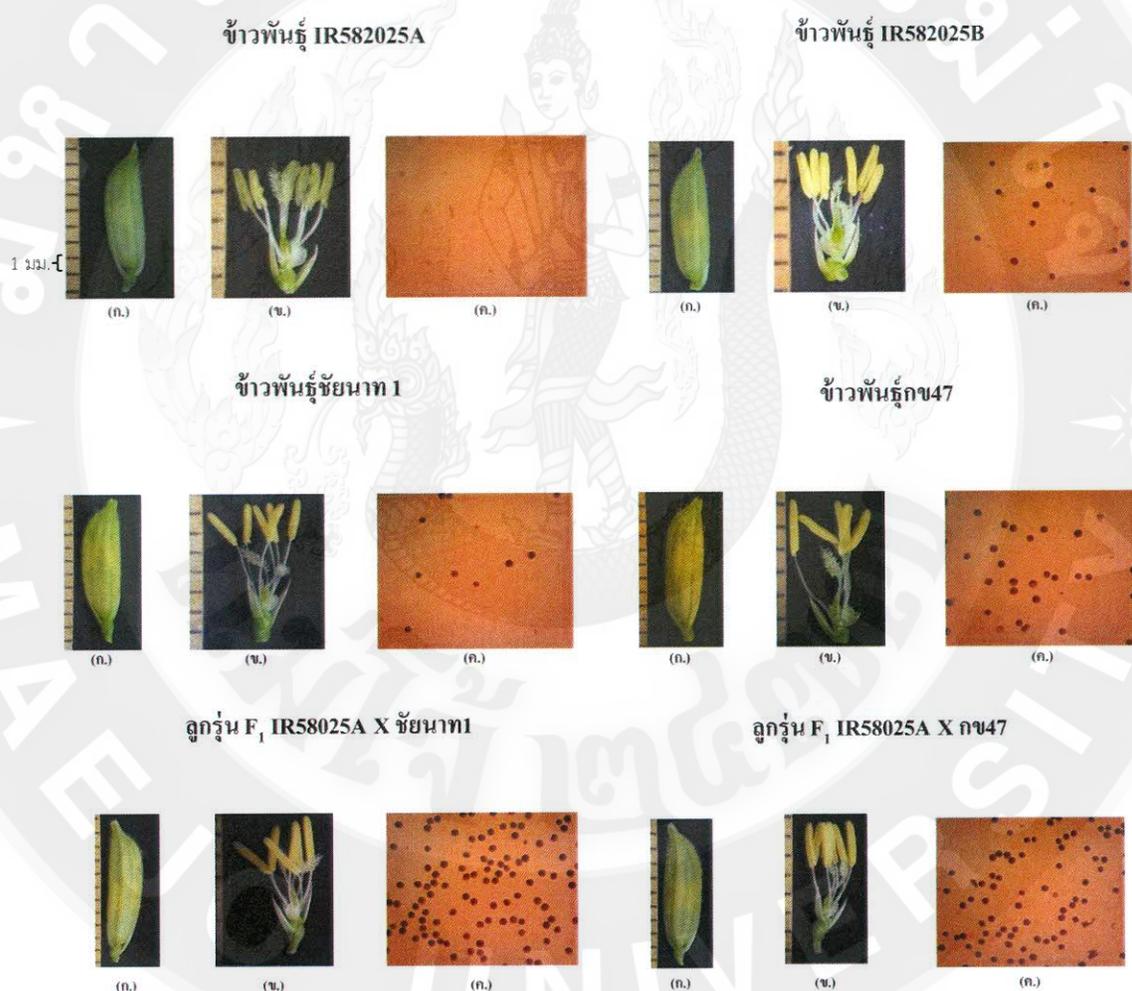
- กลุ่มที่ 2 พบในข้าวจำนวน 1 พันธุ์ ได้แก่ กข47 โดยลำดับเบสบางส่วนของยีน *pollen-specific SF21* ที่ตำแหน่ง *Rf3* นั้น ไม่พบการขาดหายไปของลำดับเบส (deletion) ทั้ง 2 ตำแหน่ง และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในยีน *PPR7* เหมือนกับยีนที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ R แต่ยีน *PPR10* เหมือนกับยีนที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ B ที่ได้รายงานไว้ในฐานข้อมูล

- กลุ่มที่ 3 พบในข้าวจำนวน 1 พันธุ์ ได้แก่ IR64 ลำดับเบสบางส่วนของยีน *pollen-specific SF21* นั้นพบการขาดหายไปของลำดับเบส (deletion) 1 ตำแหน่ง คือ ที่ตำแหน่ง 29 ถึง 30 (GA) เหมือนข้าวสายพันธุ์ R และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในยีน *PPR7* เหมือนกับยีนที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ A แต่ยีน *PPR10* เหมือนกับยีนที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ R ที่ได้รายงานไว้ในฐานข้อมูล

โดยจากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่า จากข้าวที่นำมาทดสอบจำนวน 6 พันธุ์ มีข้าวอยู่ 2 พันธุ์ที่มีลักษณะของยีนที่นำมาศึกษาอยู่ในกลุ่มสายพันธุ์ R คือ ข้าวพันธุ์ กข47 ที่มีลักษณะของยีน *PPR7* ในข้าวกลุ่มสายพันธุ์ R ที่มีรายงานในฐานข้อมูล และข้าวพันธุ์ IR64 คือ การขาดหายไปของลำดับเบส (deletion) 1 ตำแหน่ง ในยีน *pollen-specific SF21* เหมือนข้าวสายพันธุ์ R และยีน *PPR10* เหมือนกับยีนที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ R ที่ได้รายงานไว้ในฐานข้อมูล

7. การศึกษาความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ด้วยสารละลายไอโอดีนโปแทสเซียมไอโอไดน์ (I₂-KI)

ในการศึกษาความมีชีวิตของเกสรตัวผู้จากจากผสมข้าวสายพันธุ์ A คือพันธุ์ IR58025A ซึ่งเป็นข้าวที่มีเกสรตัวผู้เป็นหมัน กับข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และ กข47 ซึ่งข้าวทั้ง 2 พันธุ์นี้ได้มีการรายงานว่าสามารถแก้ความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ (ภวพร, 2555; สุวิทย์, 2555) โดยการนำเกสรตัวผู้ที่ได้จากลูกรุ่นที่ 1 มาทำการย้อมด้วยสารละลาย I₂-KI แล้วปรากฏว่าละอองเกสรติดสีเข้ม ดังแสดงในภาพที่ 21



ภาพที่ 21 ลักษณะของดอกของข้าวพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษา (ก.) คือ ลักษณะของดอกข้าวก่อนที่จะได้รับการผสม (ข.) คือ ลักษณะของเกสรตัวผู้และเกสรตัวแม่ (ค.) คือ ลักษณะการติดสีย้อมโดยใช้สารละลาย I₂-KI ที่ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์

โดยในขั้นต้นได้ย้อมละอองเกสรตัวผู้ของข้าวทุกสายพันธุ์ที่ได้ทำการศึกษา เพื่อเป็นการยืนยันผลว่าข้าวที่เลือกมาทำศึกษานี้ไม่ได้มีความผิดปกติของเกสรตัวผู้ โดยคาดว่าในส่วนของข้าวสายพันธุ์ A จะต้องไม่สามารถย้อมด้วยสารละลาย I_2-KI จึงไม่ติดสี แต่ในส่วนของละอองเกสรตัวผู้ที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ B และสายพันธุ์ R นั้นจะต้องมีการติด ดังภาพที่ 21

จากภาพจะพบข้าวพันธุ์ IR58025A ซึ่งเป็นข้าวสายพันธุ์ A นั้นจะมีลักษณะของเกสรตัวผู้ที่แตกต่างกันจากข้าวพันธุ์อื่น โดยสังเกตได้จากสีของเกสรตัวผู้ที่มีสีเหลืองอ่อนเมื่อเทียบกับข้าวพันธุ์อื่นที่มีสีเหลืองเข้ม และเมื่อทำการเปิดอับละอองเกสรจะพบละอองเกสรที่มีลักษณะสีเหลืองใสต่างจากข้าวพันธุ์อื่นที่จะเป็นสีเหลืองเข้ม ลักษณะเป็นผงสีเหลืองคล้ายฝุ่น เมื่อดูในส่วนของ การติดสีย้อมละอองเกสรตัวผู้โดยใช้สารละลาย I_2-KI ที่ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ในข้าวพันธุ์ IR58025B ชัยนาท 1 และ กข47 ละอองเกสรตัวผู้จะมีการติดสีเข้มชัดเจนโดยจะเป็นสีน้ำเงินเข้ม แต่ในส่วนของข้าวพันธุ์ IR58025A นั้นเมื่อย้อมด้วยสารละลาย I_2-KI ไม่ติดสี โดยจะมีลักษณะเป็นสีใสโปร่งแสง จากผลการทดสอบนี้สามารถใช้ในการตรวจสอบการมีชีวิตของละอองเกสรตัวผู้

เมื่อเปรียบเทียบกับ การติดสีย้อมละอองเกสรตัวผู้โดยใช้สารละลาย I_2-KI ที่ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เกสรตัวผู้จากต้นรุ่นที่ 1 มาย้อม จะติดสีเข้มเป็นจำนวนมากและเมื่อเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์เกสรตัวผู้ปกติ พบว่า ลูกรุ่นที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์เกสรตัวผู้ปกติไม่แตกต่างกันกับข้าวพันธุ์พ่อแม่ คือ มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การติดสีย้อมโดยใช้สารละลาย I_2-KI ระหว่างละอองเกสรที่ได้จากพ่อแม่เทียบกับที่ได้จากต้นลูกรุ่นที่ 1 จากการนับจำนวน 3 ซ้ำ

พันธุ์ข้าว	เปอร์เซ็นต์การติดสีย้อม (เปอร์เซ็นต์)
IR58025A	6.06 ± 10.50
IR58025B	66.67 ± 15.28
กข47	90.63 ± 0.00
ชัยนาท 1	89.68 ± 9.01
ลูกรุ่นที่1 (IR58025A X กข47)	96.58 ± 2.39
ลูกรุ่นที่1 (IR58025A X ชัยนาท 1)	96.03 ± 2.64

จากแผนภูมิจะเห็นได้ว่าละอองเกสรจากลูกรุ่นที่ 1 นั้นสามารถกลับมามีชีวิตได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันที่ Li et al. (2007) ได้รายงานไว้ว่าในระบบความเป็นหมันแบบ WA-CMS ละอองเกสรจากต้นลูกผสมรุ่นที่ 1 ที่ได้ทำการผสมกับข้าวสายพันธุ์ R จะสามารถกลับมามีชีวิตได้ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่ายีนในนิวเคลียสของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 หรือที่อยู่ในข้าวพันธุ์ กข47 นั้นสามารถแก้ความเป็นหมันของยีนที่อยู่ในไซโทพลาซึมในระบบ WA-CMS ได้ และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับต้นพ่อแม่จะพบว่า เปอร์เซ็นต์การติดสีสูงกว่าต้นพ่อแม่ที่นำมาทดสอบคือ ชัยนาท 1 (89.68 เปอร์เซ็นต์) น้อยกว่าลูกรุ่นที่ 1 (96.03 เปอร์เซ็นต์) และ กข47 (90.63 เปอร์เซ็นต์) น้อยกว่าลูกรุ่นที่ 1 (96.58 เปอร์เซ็นต์)

การทดสอบการติดเมล็ดของข้าวลูกผสม จากการนับจำนวน 3 รวงต่อพันธุ์ พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีของลูกผสมระหว่างพันธุ์ IR58025A กับพันธุ์ กข47 คือ 45.57 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่าของลูกผสมระหว่างพันธุ์ IR58025A กับพันธุ์ชัยนาท 1 คือ 34.61 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9) แสดงให้เห็นว่าข้าวพันธุ์ กข47 มีความสามารถในการแก้ความเป็นหมันได้ดีกว่าพันธุ์ชัยนาท 1 ซึ่งอาจจะเกิดจากการที่ยีน *PPR7* ของข้าวพันธุ์ กข47 เหมือนกับยีนที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ R ที่ได้จากฐานข้อมูล ซึ่งต่างจากข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ยีน *PPR7* เหมือนกับยีนที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ A ตารางที่ 9 แสดงจำนวนการติดเมล็ดต่อรวงในต้นลูกรุ่นที่ 1

พันธุ์พ่อแม่ที่นำมาผสมกับพันธุ์ IR58025A	เปอร์เซ็นต์เมล็ดดี (% spikelet fertility)
กข47	45.57 ± 14.19
ชัยนาท 1	34.61 ± 4.80

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากยีนแก้ความเป็นหมันในระบบ WA-CMS

1.1 การวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *pollen-specific SF21* ที่ตำแหน่งยีนแก้ความเป็นหมัน *Rf3*

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของยีน *pollen-specific SF21* ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 6 พันธุ์ คือ ข้าวพันธุ์ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1, กข47 และ IR64 ด้วยไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 พบว่า สามารถทำการแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ

- กลุ่มที่มีความยาวลำดับเบสเท่ากับ 499 คู่เบส คือจากข้าวพันธุ์ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1 และ กข47 ซึ่งมีลำดับเบสเหมือนกับลำดับเบสในข้าวสายพันธุ์ A จากการศึกษาคือของ Suresh et al. (2012)

- กลุ่มที่มีความยาวของดีเอ็นเอเท่ากับ 497 คู่เบส คือจากข้าวพันธุ์ IR64 โดยพบการขาดหายไปของลำดับเบส (deletion) ที่ตำแหน่ง 29 ถึง 30 (GA) ซึ่งบริเวณที่ขาดหายไปนั้นเป็นบริเวณเดียวกับที่ Suresh et al. (2012) ได้รายงานไว้ว่าจะพบการขาดหายที่บริเวณดังกล่าวร่วมกับบริเวณที่ตำแหน่ง 77 ถึง 79 (GAG) ที่ทำการตรวจพบในข้าวสายพันธุ์ R

ลำดับเบสบางส่วนของยีน *pollen-specific SF21* ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 นี้สามารถใช้ในการแยกกลุ่มของข้าวสายพันธุ์ A และสายพันธุ์ R ที่ Suresh et al. (2012) ใช้ในการศึกษา แต่เมื่อนำมาใช้ในการแยกกลุ่มข้าวที่นำมาใช้ทดสอบพบว่าสามารถใช้แยกข้าวพันธุ์ IR64 ที่ได้มีการรายงานว่าเป็นข้าวสายพันธุ์ R (Li et al., 2007) ออกจากข้าวพันธุ์อื่นๆ ได้ แต่พบการเปลี่ยนแปลงที่ต่างจากที่ Suresh et al. (2012) โดยผลการทดสอบนี้คล้ายกับผลการวิจัยของ Zhang et al. (1997) ที่ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RFLP ในการสร้างแผนที่ของยีนตำแหน่ง *Rf3* พบว่าไพรเมอร์ RG532 ในข้าวกลุ่มเดียวกันคือ สายพันธุ์ A จากข้าวพันธุ์ Zhensham97A และ IR58025A นั้นปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดแตกต่างกัน เช่นเดียวกับในกลุ่มสายพันธุ์ R จากข้าวพันธุ์ IR24 และ IR36

1.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *PPR* ที่ตำแหน่งยีนแก้ความเป็นหมัน *Rf4*

1.2.1 การโคลนยีน *PPR7* และการวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้จากการโคลนยีน

จากการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *PPR7* โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสจากฐานข้อมูลที่ได้จากการศึกษายีนแก้ความเป็นหมันที่ตำแหน่ง *Rf4* ที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 10 สามารถแยกยีน *PPR7* จากดีเอ็นเอตัวอย่างของข้าวพันธุ์ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1, กข47 และ IR64 มีที่ขนาดความยาวของลำดับเบสที่โคลนได้แตกต่างกัน 2 ขนาดคือขนาด 1,744 คู่เบส จากข้าวพันธุ์กข47 และขนาด 1,736 คู่เบส จากข้าวพันธุ์ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1 และ IR64 แต่เมื่อทำการแปลเป็นโปรตีนบริเวณที่เป็นรหัสของโปรตีนมีความยาวเท่ากัน คือ 1,377 คู่เบส หรือมีขนาดของโปรตีนเท่ากับ 458 กรดอะมิโน สอดคล้องกับศึกษาของ Tang et al. (2014) ที่พบว่าจากข้าวสายพันธุ์ B และสายพันธุ์ R ที่ได้นำมาทำการศึกษานั้นมีบริเวณที่เป็นรหัสของโปรตีน *PPR7* เท่ากับ 1,377 คู่เบส หรือมีขนาดของโปรตีนเท่ากับ 458 กรดอะมิโน เช่นเดียวกับขนาดที่ได้จากการศึกษานี้ และได้มีผลจากการศึกษาของ Kazama and Toriyama (2014) ที่ได้ทำการโคลนยีน *PPR458* จากข้าวพันธุ์ IR24 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ R มีลำดับเบสและขนาดของโปรตีนเช่นเดียวกับยีน *PPR7* ที่ Tang et al. (2014) ศึกษา จากผลการเปรียบเทียบลำดับเบสแสดงให้เห็นว่าในการทดลองนี้ประสบความสำเร็จการโคลนยีน *PPR7* จากพันธุ์ข้าวที่นำมาทำการศึกษา

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสด้วยโปรแกรม TPRpred (ทีมา; [https:// toolkit.tuebingen.mpg.de/tpred](https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tpred)) พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *PPR7* ที่ได้จากการโคลนในข้าวทั้ง 6 พันธุ์ นั้นจัดอยู่ในกลุ่มโปรตีน pentatricopeptide repeat (PPR) เช่นเดียวกับการรายงานของ Bohra et al. (2016) ที่พบว่ายีนแก้ความเป็นหมัน *Rf* โดยส่วนใหญ่หากทำการแปลเป็นโปรตีนจะแปลเป็นโปรตีนในกลุ่ม pentatricopeptide-repeat (PPR) และกลไกการทำงานจะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ATP ของไมโทคอนเดรีย (Huang et al., 2014; Hu et al, 2014; Saxena et al., 2015) และในแต่ละ PPR repeat จะประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน 35 กรดอะมิโน จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม TPRpred พบว่าโปรตีน *PPR7* ที่ได้นั้นพบบริเวณ PPR repeat จำนวน 8 ซ้ำ เท่ากันในข้าวทุกพันธุ์ โดยจะพบที่บริเวณกรดอะมิโนที่ 96 ถึง

449 ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกับผลที่ได้จากโปรตีน PPR7 จากการศึกษาของ Tang et al. (2014) และ Kazama and Toriyama (2014)

1.2.2 การโคลนยีน *PPR10* และผลการวิเคราะห์ลำดับเบส

จากการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *PPR10* โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสจากฐานข้อมูลที่ได้จากการศึกษายีนแก้ความเป็นหมันที่ตำแหน่ง *Rf4* ที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 10 สามารถแยกยีน *PPR10* จากดีเอ็นเอตัวอย่างของข้าวพันธุ์ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1, กข47 และ IR64 ที่มีขนาดความยาวของลำดับเบสที่โคลนได้แตกต่างกัน 2 ขนาด คือ

- ขนาด 2,194 คู่เบส จากข้าวพันธุ์ IR64 โดยบริเวณที่เป็นรหัสของโปรตีนมีความยาวเท่ากับ 1,365 คู่เบส หรือมีขนาดของโปรตีนเท่ากับ 454 กรดอะมิโน สอดคล้องกับการศึกษาของ Kazama and Toriyama (2014) ที่รายงานว่ายีน *PPR454* จากข้าวพันธุ์ IR24 มีขนาดเท่ากับ 1,365 คู่เบส หรือมีขนาดของโปรตีนเท่ากับ 454 กรดอะมิโน

- ขนาด 2,188 คู่เบส จากข้าวพันธุ์ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1 และ กข47 โดยบริเวณที่เป็นรหัสของโปรตีนมีความยาวเท่ากับ 1,710 คู่เบส หรือมีขนาดของโปรตีนเท่ากับ 569 กรดอะมิโน

สาเหตุที่ทำให้ยีน *PPR10* นั้นมีขนาดของบริเวณที่แปลไปเป็นโปรตีนยาวแตกต่างกันเนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 1,392 (เปลี่ยนจาก G ไปเป็น T) ซึ่งเมื่อแปลรหัสเป็นรหัสหยุด ทำให้เมื่อแปลเป็นโปรตีนแล้วในข้าวที่โคลนยาว 2,188 คู่เบส จึงทำให้แปลได้โปรตีนที่สั้นกว่า เช่นเดียวกับการศึกษาของ Tang et al. (2014) พบว่า ยีน *PPR10* ที่ได้จากข้าวแต่ละพันธุ์ที่นำมาทำการศึกษานั้นสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มเช่นเดียวกับที่พบในดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวที่นำมาทดลอง

จากนั้นได้ทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสด้วยโปรแกรม TPRpred (ที่มา; [https:// toolkit.tuebingen.mpg.de/tpred](https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tpred)) พบว่าลำดับกรดอะมิโน *PPR10* ที่ได้จากการโคลนในข้าวทั้ง 6 พันธุ์ นั้นจัดอยู่ในกลุ่มโปรตีน pentatricopeptide repeat (PPR) เช่นเดียวกับที่ได้มีการรายงานมาก่อนหน้านี้โดย Huang et al. (2014); Hu et al. (2014); Saxena et al. (2015) และ Bohra et al. (2016) เกี่ยวกับยีนแก้ความเป็นหมัน *Rf* ที่สร้างจากนิวเคลียสซึ่งจะมีบริเวณจดจำที่จำเพาะในการแก้ความเป็นหมันของยีนภายในไมโทคอนเดรีย โดยพบว่ายีน *Rf* นั้น

เป็นอยู่ในกลุ่มของ PPR ยีน โดยเมื่อแปลไปเป็นโปรตีนจะได้ pentatricopeptide repeat (PPR) ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมแสดงให้เห็นถึงความยาวที่ต่างกันของลำดับโปรตีนนั้นส่งผลให้จำนวนของ PPR repeat ที่แตกต่างกัน โดยในกลุ่มที่มีขนาดของโปรตีน 569 กรดอะมิโน จะมีพบ PPR repeat จำนวน 10 ซ้ำ แต่ในกลุ่มที่มีขนาดของโปรตีน 454 กรดอะมิโน พบ PPR repeat จำนวน 8 ซ้ำ สอดคล้องกับการศึกษาของ Tang et al. (2014) และ Kazama and Toriyama (2014)

จากการที่จำนวนของ PPR repeat ที่แตกต่างกันในข้าวแต่ละพันธุ์อาจจะส่งผลต่อโครงสร้างของโปรตีนที่ได้หรืออาจจะส่งผลต่อความสามารถในการทำงานของโปรตีน เนื่องจากได้มีการรายงานโดย Schmitz-Linneweber และ Small (2008) พบว่าโปรตีน PPR ทำหน้าที่เป็นโปรตีนจับกับอาร์เอ็นเอ (RNA-binding protein) ช่วยในกระบวนการหลังจากการถอดรหัส (post-transcriptional processes) ได้แก่ การปรับเปลี่ยนอาร์เอ็นเอ (RNA editing), การตัดอินทอน (RNA splicing), การสลายของ RNA (RNA cleavage) และกระบวนการแปลรหัส (translation) ภายในไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ของพืช

2. การเปรียบเทียบระหว่างลำดับเบสกับการศึกษาความมีชีวิตของเกสรตัวผู้และการติดเมล็ด

เมื่อเปรียบเทียบความมีชีวิตละอองเกสรจากต้นลูกรุ่นที่ 1 ของพันธุ์ IR58025A กับชัชนาท 1 มีค่าเป็น 96.03 เปอร์เซ็นต์ ส่วนลูกรุ่นที่ 1 ของพันธุ์ IR58025A กับ กข47 มีค่าเป็น 96.58 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกันที่ Li et al. (2007) ได้รายงานไว้ว่าในระบบความเป็นหมันแบบ WA-CMS ละอองเกสรจากต้นลูกผสมรุ่นที่ 1 จะสามารถกลับมามีชีวิตได้ที่ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่ายีนที่อยู่ในนิวเคลียสข้าวพันธุ์ชัชนาท 1 หรือที่อยู่ในข้าวพันธุ์ กข47 นั้นสามารถแก้ความเป็นหมันของยีนที่อยู่ในไซโทพลาซึมในระบบ WA-CMS ได้

ประสิทธิภาพในการติดเมล็ดของข้าวลูกในรุ่นที่ 1 ทั้ง 2 พันธุ์ นั้น พบว่าในข้าวลูกผสมระหว่างพันธุ์ IR58025A กับพันธุ์ กข47 มีค่าเปอร์เซ็นต์ติดเมล็ดที่สูงกว่า ลูกผสมระหว่างพันธุ์ IR58025A กับพันธุ์ชัชนาท 1

หากทำการเปรียบเทียบระหว่างยีนแก้ความเป็นหมันในระบบ WA-CMS ของข้าวพันธุ์ชัชนาท 1 และ กข47 ที่อยู่บริเวณตำแหน่ง *Rf3* และ *Rf4* พบว่า ลำดับเบสบางส่วนของยีน *pollen-*

specific SF21 ที่ได้จากไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 ที่ตำแหน่ง *Rf3* นั้นไม่พบการขาดหายไปของลำดับเบส (deletion) ทั้ง 2 ตำแหน่ง และยีน *PPR10* เหมือนกับยีนที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ B ที่ได้รายงานไว้ในฐานข้อมูล แต่ในส่วนของยีน *PPR7* นั้นมีความแตกต่างกันคือ ข้าวพันธุ์ชัชยานา 1 พบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในยีน *PPR7* เหมือนกับยีนที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ A และลำดับเบสนั้นอยู่ในกลุ่มเดียวกับข้าวพันธุ์ IR58025B สำหรับข้าวพันธุ์ กข47 พบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในยีน *PPR7* เหมือนกับยีนที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ R ซึ่งอาจส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดดี และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของละอองเกสรตัวผู้ในต้นลูกรุ่นที่ 1 ในข้าวพันธุ์ กข47 ที่ให้ค่าสูงกว่าในข้าวพันธุ์ชัชยานา 1 ที่นำมาทดสอบ

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

1. ผลการอ่านลำดับเบสบางส่วนของยีน *pollen-specific SF21* จากไพรเมอร์ DRCG-RF3-13 ที่ตำแหน่ง *Rf3* สามารถใช้ในการแบ่งกลุ่มข้าวที่นำมาศึกษาได้ 2 กลุ่ม จากการขาดหายไปของลำดับเบส (deletion) ที่ตำแหน่ง 29 ถึง 30 ซึ่งบริเวณที่ขาดหายไปนั้นเป็นบริเวณเดียวกับที่ Suresh et al. (2012) ได้รายงานไว้ว่าจะพบการขาดหายที่บริเวณดังกล่าวร่วมกับบริเวณที่ตำแหน่ง 77 ถึง 79 คู่เบส ในข้าวสายพันธุ์ R ที่นำมาทดสอบ

2. ยีน *PPR7* ที่อยู่ตำแหน่งยีนแก่ความเป็นหมัน *Rf4* ในข้าวทั้ง 6 พันธุ์ ที่นำมาทดสอบนั้นมีขนาดของโปรตีนเท่ากัน คือ 458 กรดอะมิโน แต่ในข้าวพันธุ์ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1 และ IR64 เกิดการขาดหายไปของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 71 และการเพิ่มขึ้นของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 146 ถึง 154 ซึ่งทั้งสองบริเวณนี้จะพบที่ตำแหน่งด้านหน้าของจุดเริ่มการแปลรหัส เหมือนกับยีนที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ A ที่ได้รายงานไว้ในฐานข้อมูล

3. ยีน *PPR10* ที่อยู่ตำแหน่งยีนแก่ความเป็นหมัน *Rf4* ในข้าวทั้ง 6 พันธุ์ ที่นำมาทดสอบนั้นมีขนาดของโปรตีนต่างกัน คือ ขนาด 569 กรดอะมิโน ในข้าวพันธุ์ IR58025B, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1 และ กข47 และขนาด 454 กรดอะมิโน ในข้าวพันธุ์ IR64 ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนของลำดับเบสที่ตำแหน่ง 1,392 (จาก G เป็น T) ซึ่งเป็นคำสั่งหยุดเหมือนกับยีนที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ R ที่ได้รายงานไว้ในฐานข้อมูล

4. ผลการเปรียบเทียบค่าความมีชีวิตของละอองเกสรจากต้นลูกรุ่นที่ 1 มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่ายีนที่อยู่ในนิวเคลียสของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 หรือในข้าวพันธุ์ กข47 นั้นสามารถแก่ความเป็นหมันของยีนที่อยู่ในไซโทพลาซึมในระบบ WA-CMS ได้ หากเปรียบเทียบที่ระดับยีนที่นำมาศึกษาจะพบว่าข้าวพันธุ์ กข47 มีการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในยีน *PPR7* เหมือนกับยีนที่ได้จากข้าวสายพันธุ์ R แต่ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 จะเหมือนกับสายพันธุ์ A ซึ่งจากบริเวณดังกล่าวอาจจะส่งผลให้การติดเมล็ดที่แตกต่างกัน

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษานี้จะเห็นได้ว่ายังไม่สามารถทำการแยกความแตกต่างระหว่างข้าวสายพันธุ์ B และสายพันธุ์ R ที่นำมาศึกษาได้ชัดเจน ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากยีนที่ทำการศึกษานั้นยังไม่ครอบคลุมทั้งระบบความเป็นหมันแบบ WA-CMS ประกอบไปด้วยยีน 2 ตำแหน่ง คือ *Rf3* และ *Rf4* โดยที่ตำแหน่ง *Rf3* นั้นจะประกอบด้วย 4 ยีน คือ ยีนของโปรตีน mitochondrial-processing peptidase subunit alpha ยีนของโปรตีน pollen-specific SF21 และยีน PPR อีก 2 ยีน โดยทั้ง 4 ยีนนี้ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 (Suresh et al, 2012) โดยในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการแยกความแตกต่างบางส่วนของยีน *pollen-specific SF21* ได้สำเร็จ แต่ยังขาดอีก 3 ตำแหน่ง สำหรับในส่วนของตำแหน่ง *Rf4* นั้นจากรายงานของ Tang et al (2014) พบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องจำนวน 3 ยีน คือ *PPR7*, *PPR9* และ *PPR10* โดยในงานวิจัยนี้โคลนยีนได้ 2 ยีน คือ ยีน *PPR7* และ *PPR10* สำหรับยีน *PPR9* นั้นไม่สามารถโคลนได้ ซึ่งหากต้องการศึกษาถึงความแตกต่างของระบบยีนแก่ความเป็นหมันแบบ WA-CMS ทั้งระบบอาจจะต้องศึกษาให้ครบทุกยีนซึ่งจะพบยีนที่สำคัญและสามารถแยกความแตกต่างของยีนแก่ความเป็นหมันของระบบนี้ได้

อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างของลำดับเบสของยีนที่ได้จากการศึกษานี้ สามารถนำไปพัฒนาต่อเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้แยกความแตกต่างของข้าวแต่ละกลุ่มได้

บรรณานุกรม

- กฤษฎา สัมพันธ์รักษ์. 2544. ปรับปรุงพันธุ์พืช: ความหลากหลายของแนวคิด. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- การปรับตัวกลยุทธ์รับ AEC. 2555. ผลกระทบข้าวไทยใน AEC และการวางแผนปรับตัวให้อยู่รอด. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.thai-aec.com/51> (25 สิงหาคม 2557).
- ขนิษฐา แสงสว่าง, สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, จรีรัตน์ มงคลศิริวัฒนา และอมรทิพย์ เมืองพรหม. 2012. การหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับยีนที่มีอิทธิพลต่อการเป็นหมันของเรณูเนื่องจากอุณหภูมิสูงในข้าว (*Oryza sativa* L.). Thai J. Genet, 5(1), 50-56.
- ดวงพร จันทร์ประภา, จักรกฤษณ์ ศรีแสง, ประภา ศรีพิจิตร และธานี ศรีวงศ์ชัย. ม.ป.ป. การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของยีนแก่ความเป็นหมันของละอองเกสรตัวผู้ของการผลิตข้าวลูกผสมระบบสามสายพันธุ์. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตร.
- บทความและบทวิเคราะห์ AEC. 2555. ตลาดส่งออกข้าวโอกาสและอุปสรรคของไทย. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.thai-aec.com/371> (25 สิงหาคม 2557).
- บุญหงษ์ จงคิด. 2547. ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- เทพสุดา รุ่งรัตน์, สุทัศน์ จุลศรีไคววัล, ดำเนิน กาละดี และม.ล.อโณทัย ชุมสาย. 2553. ความดีเด่นของผลผลิตและลักษณะอื่นที่เกี่ยวข้องในข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างข้าวพันธุ์ดีของไทยกับข้าวสายพันธุ์เกสรตัวผู้เป็นหมันแบบไวต่ออุณหภูมิ. วารสารเกษตร, 26(1), 79-84.
- พชระ แสงสว่างค์. 2555. การพัฒนาสายพันธุ์เพศผู้เป็นหมันของข้าวโดยวิธีการผสมกลับและทดสอบสมรรถนะการผสม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.
- พชระ แสงสว่างค์, สุภาพร จันทร์บัวทอง และปิยะวดี เจริญวัฒนะ. ม.ป.ป. การพัฒนาสายพันธุ์เพศผู้เป็นหมันของข้าวโดยวิธีการผสมกลับและทดสอบสมรรถนะการผสม. 1-12.
- เพ็ญญา จักรสมศักดิ์ และเบญจวรรณ ฤกษ์เกษม. 2553. ปัจจัยที่มีผลต่อการติดเมล็ดของข้าวเกสรเพศผู้เป็นหมันในแปลงข้าวของเกษตรกร. วารสารเกษตร, 26(ฉบับพิเศษ), 37-42.

ภวพร สุขเกษม. 2555. การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวพันธุ์ดีของไทยให้เป็นสายพันธุ์เรณูเป็นหมันและ
การคัดเลือกข้าวพันธุ์ดีของไทยที่เป็นพันธุ์รักษาเรณูเป็นหมันและพันธุ์แก้ความเป็นหมัน.
ปัญหาพิเศษ. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

มะลิวรรณ จุฑาทา. 2550. การเป็นหมันของเกสรเพศผู้ที่เกิดจากความผิดปกติของยีนในไมโทคอน
เดรีย. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.agri.ubu.ac.th/masterstu/docs/20080430-Maliwan.doc> (9 สิงหาคม 2559).

เรวัต เลิศฤทัยโยธิน. 2541. พฤกษศาสตร์พืชเศรษฐกิจ. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

วันชัย จันทรประเสริฐ. 2542. เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์พืชไร่. กรุงเทพฯ:
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2557. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปี 2556. กรุงเทพฯ:
สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร.

สุชาติ นักปราชญ์, สุภาพร จันทรบัวทอง, สุรพงศ์ โพธิพิบูลย์, สุภาวิณี สวงโท, ชวนชม ตีร์รัมย์,
บังอร ธรรมสามิสรณ์, กุลชญา เกตุสุวรรณ, สุนิยาม ตาปราบ, อัญชลี ประเสริฐศักดิ์, พีระ ดุง
สูงเนิน, ไพลิน รัตนจันทร์, นิตยา รื่นสุข, ดารา เจตนะจิตร, พจน์ วัจนะภูมิ, นงนุช
ประดิษฐ์, สกฤต มุลคำ, สุรเดช ปาละวิสุทธ์, กัญญา เชื้อพันธุ์ และวัชรี สุขวิวัฒน์. ม.ป.ป.
ข้าวลูกผสม : สถานภาพการวิจัยและพัฒนาของกรมการข้าว. ศูนย์วิจัยข้าว, 308-316.

สุวิทย์ พันธุ์ลี. 2556. การคัดเลือกพันธุ์ข้าวไทยที่มีคุณสมบัติเป็นพันธุ์รักษาเรณูเป็นหมันแก้ความ
เป็นหมันของเรณูที่ดีและการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวไทยพันธุ์ดีของไทยให้เป็นสายพันธุ์เรณู
เป็นหมัน. ปัญหาพิเศษ. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

อุษณีย์ วงศ์ปัดน์ษา. 2557. ผลของอุณหภูมิต่อการพัฒนาการของเรณูสายพันธุ์แม่ในระบบการผลิต
ข้าวลูกผสมแบบสองสายพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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., & 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. & 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.
- Hu, J., Huang, W., Huang, Q., Qin, X., Yu, C., Wang, L., & Zhu, Y. 2014. Mitochondria and cytoplasmic male sterility in plants. *Mitochondrion*, 19, 282-288.
- Huang, J. Z., Zhi-Guo, E., Zhang, H. L., & Shu, Q. Y. 2014. Workable male sterility systems for hybrid rice: Genetics, biochemistry, molecular biology, and utilization. *Rice*, 7(1), 1-14.
- Hwang, S. K. & Kim, Y. M. 2000. A simple and reliable method for preparation of cross-contamination-free plant genomic DNA for PCR-based detection of transgenes. *J. Biochem. Mol. Biol*, 33, 537-546.
- 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, 167-171.
- Kazama, T., & Toriyama, K. 2014. A fertility restorer gene, *Rf4*, widely used for hybrid rice breeding encodes a pentatricopeptide repeat protein. *Rice*, 7(1), 1-5.
- Li, S., Yang, D., & Zhu, Y. 2007. Characterization and use of male sterility in hybrid rice breeding. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(6), 791-804.
- Ma, H. 2013. A battle between genomes in plant male fertility. *Nature genetics*, 45(5).

- Nematzadeh, G. A., & Kiani, G. 2010. Genetic analysis of fertility restoration genes for WAtype cytoplasmic male sterility in Iranian restorer rice line DN-33-18. *African Journal of Biotechnology*, 9(38), 6273-6277.
- Okazaki, M., Kazama, T., Murata, H., Motomura, K., & Toriyama, K. 2013. Whole mitochondrial genome sequencing and transcriptional analysis to uncover an RT102-type cytoplasmic male sterility-associated candidate gene derived from *Oryza rufipogon*. *Plant and cell physiology*, 54(9), 1560-1568.
- Organisation for Economic Co-operation and Development; OECD. 2006. "Section 5 - Rice (*ORYZA SATIVA L.*)", in *Safety Assessment of Transgenic Organisms*. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.oecd-ilibrary.org/science-and-technology/safety-assessment-of-transgenic-organisms/section-5_9789264095380-8-en (18 กันยายน 2559).
- Saxena, R. K., Saxena, K. B., Pazhamala, L. T., Patel, K., Parupalli, S., Sameerkumar, C. V., & Varshney, R. K. 2015. Genomics for greater efficiency in pigeonpea hybrid breeding. *Frontiers in plant science*, 6, 1-7.
- Schmitz-Linneweber, C., & Small, I. 2008. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends in plant science*, 13(12), 663-670.
- Suresh, B. P., Srikanth, B., Hemanth Kishore, V., Subhakar Rao, I., Vemireddy, L. R., Dharika, N., Sundaram, R. M., Ramesha, M. S., Sambasiva Rao, K. R. S., Viraktamath, B. C. & 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(3), 421-435.

- Tada, Y. 2007. Effects of *Rf-1*, *Rf-3* and *Rf-6 (t)* genes on fertility restoration in rice (*Oryza sativa* L.) with WA-and BT-type cytoplasmic male sterility. **Breeding Science**, 57(3), 223-229.
- Tang, H., Luo, D., Zhou, D., Zhang, Q., Tian, D., Zheng, X., Chen, L., & 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. & 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.
- Zhang, G., Lu, Y., Bharaj, T. S., Virmani, S. S., & Huang, N. 1997. Mapping of the *Rf-3* nuclear fertility-restoring gene for WA cytoplasmic male sterility in rice using RAPD and RFLP markers. **Theoretical and applied genetics**, 94(1), 27-33.



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

ลำดับเบสจากฐานข้อมูลที่นำมาออกแบบโปรแกรม

TCGATGTGTTATTAGGCAGAGGTGGGAGTGAGTTTGTAGGGGAGAAGGGTGGGTCTGTTTGTTCAT
 ATGTTTGTAGTCAGAAACACATGTATATCTCATCACATCGTTCCATACGAGAAAAAGAAGAGAGAA
 AATGATAGAAGCAGAATTTTGTGTTGTAAAAAGTTTCATAAAGAAATTATTATTTTTTACATCTGTTT
 AAACA

ลำดับเบสจากฐานข้อมูลที่น่ามาออกแบปไฟรเมอร์สำหรับยีน *PPR7*

>PPR7-M-454

CGGAGACCGATCTGGGCCGTCCATCCGCGCCGCCAGCCAATCGGACGGTGGGTGTATTACTGTACTGC
 CAGGTCGGTGACCGTACAAGCCGGAATATTCAGTAGCGTCGTTCCGCTCCCTGGCTTCTCCATTTCTTCA
 GCTCCGCGCCGGCGGGCGGGCGGGCGGGCAGGCATGGCGCGCCGTGTACCACCCCTACCCGCGCC
 CGCGGGCGGGCGTCCCCAGCGCGCAGGGTGGTACGACCCAAGACCTAGGGCGCGCGGGGGGCAGTGGC
 ACCGAGGGCGCACGCCACGTGCTCGACGAATTGCCGCTACGGGGCTGGGGCGCTCGATCTACAGCTTC
 AACCGCACCCCTACCGACGTGCGCGGTGACAGCCAGCCGACGAGTTTCGCTCTTCAACCGCATGGCC
 CGAGCCGGCGCCGACGAGGTAACCTCCGACTTGTGCACCTACAGCATTCTCATCGGTTGCTGCTGCCGC
 GCGGGCCGCTTGGACCTCGGTTTTCGCGGCCCTTGGGCAATGTCATTAAGAAGGGATTTAGAGTGGAGCC
 ATCACCCTTCGCTCCTCTGCTCAAGGGCCTCTGTGCCGACAAGAGGACGAGCGACGCAATGGACATAGTG
 CTCCGCAGAATGACCGAGCTCAGCTGCATGCCAGATGTTTTCTCCTGCACCATTCTTCTCAAGGGTCTG
 TGTGATGAGAACAGAAGCCAAGAAGCTCTCGAGCTGCTGCACATGATGGCTGATGATCGAGGAGGAGGT
 AGCCACCTGATGTGGTGTGCTATACCACTGTCATCAATGGCTTCTTCAAAGAGGGGGATTACAGACAAA
 GCTTACAGTACATACCATGAAATGCTTGGTTCGGAGGATTTACCAAATGTTGTGACTTACAGCTCTATT
 ATTGCTGCGTTATGCAAGGCTCAAGCTATGGACAAAGCCATGGAGGTAACACCATGGTTAAGAAT
 GGTGTCATGCCTGATTGCATGACATATAATAGTATTCTGCATGGATATGCTCTTCAGGGCAGCCAAAA
 GAGGCTATTGGAACCTCTCAAAAAGATGCGCAGTGATGGTGTGCAACCAAATGTTGTTACTTATAGATCA
 CTGATGAATATCTTTGCAAGAATGGAAGATGCACCAAAGCTAGAAAGATTTTCGATTCTATGACCAAG
 AGGGCCATAGAGCTGATATTGCTACCTATCGTACCCTGCTTCAGGGGTATGCTACCAAAGGAGCCCTT
 GTTGAGATGCATGCTCTCTTGGATTTGATGGTACGAAATGGTATCCAACCGGATCATCATGTATTCAAC
 ATTCTAATATGTGCATACGCTAAACAAGAGAAAAGTAGATCAGGCAATGCTTGTATTTCAGCAAAAATGAGG
 CAGCATGGATTGAATCCGAATGTAGTGTGCTATGGAACAGTTATAGATGTACTTTGCAAGTCAGGCAGT
 GTAGATGATGCTATGCTTTATTTTGGCAGATGATCGATGAAGGACTAACCCTAACATTTATACTTTCT
 GTTTCTCAGTCTTATTCTAAAAATAATTTATACTTTCTGTTTCTGTTAGTGTGCTATAACCATT
 GATGGCTTTTTTACAAATTTAGATGATAATTATCATTGTTCAATTTATTGCTGAAATTTCTATCTGTATG
 CATCATTGTTAACACAGCGACAACCAGGAAATTAGTTCTTCTTGAGCTAATCATTTCCTCCCTAGTTC
 TGTCATA

>PPR7-I-458

CGGAGACCGATCTGGGCCGTCCATCCGCGCCGCCAGCCAATCGGACGGTGGGTGTATTACTGTACTGC
 CAGGTCGGTGACCGTACAAGCCGGAATATTCAGTAGCGTCGTTCCGCTCCCTGGCTTCTCCATTTCTTCA
 GCTCCGCGCCGGCGGGCGGGCGGGCGGGCAGGCATGGCGCGCCGTGTACCACCCCTACCCGCGCC
 CGCACCCGCGCCCGCGGGCGGGCGGGTCCCCAGCGCGCAGGGTGGTACGACCCAAGACCTAGGGCGCGCG
 GGGGGCAGTGGCACCGAGGGCGCACGCCACGTGCTCGACGAATTGCCGCTACGGGGCTGGGGCGCTCG
 ATCTACAGCTTCAACCGCACCCCTACCGACGTGCGCGGTGACAGCCAGCCGACGAGTTTCGCTCTTC
 AACCGCATGGCCCGAGCCGGCGCCGACTCCCGACTTGTGCACCTACAGCATTCTCATCGGT
 TGCTGCTGCCGCGGGCCGCTTGGACCTCGGTTTCGCGGCCCTTGGGCAATGTCATTAAGAAGGGATTT
 AGAGTGGAAGCCATCACCTTCGCTCCTCTGCTCAAGGGCCTCTGTGCCGACAAGAGGACGAGCGACGCA
 ATGGACATAGTGCTCCGCAGAATGACCGAGCTCAGCTGCATGCCAGATGTTTTCTCCTGCACCATTCTT
 CTCAAGGGTCTGTGTGATGAGAACAGAAGCCAAGAAGCTCTCGAGCTGCTGCACATGATGGCTGATGAT
 CGAGGAGGAGGTAGCCACCTGATGTGGTGTGCTATACCACTGTCATCAATGGCTTCTTCAAAGAGGGG
 GATTACAGCAAAAGCTTACAGTACATACCATGAAATGCTTGGTTCGGAGGATTTACCAAATGTTGTGACT
 TACAGCTCTATTATTGCTGCGTTATGCAAGGCTCAAGCTATGGACAAAGCCATGGAGGTAACACC
 ATGGTTAAGAATGGTGTGATGCCTGATTGCATGACATATAATAGTATTCTGCATGGATATGCTCTTCA
 GGGCAGCCAAAAGAGGCTATTGGAACCTCTCAAAAAGATGCGCAGTGATGGTGTGCAACCAAATGTTGTT
 ACTTATAGATCACTGATGAATTATCTTTGCAAGAATGGAAGATGCACCAAAGCTAGAAAGATTTTCGAT
 TCTATGACCAAGAGGGGCTTAGAGCCTGATATTGCTACCTATCGTACCCTGCTTCAGGGGTATGCTACC
 AAAGGAGCCCTTGTGAGATGCATGCTCTCTTGGATTTGATGGTACGAAATGGTATCCAACCGGATCAT
 CATGTATTCAACATTCTAATATGTGCATACGCTAAACAAGAGAAAAGTAGATCAGGCAATGCTTGTATTTC

AGCAAAATGAGGCAGCATGGATTGAATCCGAATGTAGTGTGCTATGGAACAGTTATAGATGTACTTTGC
 AAGTCAGGCAGTGTAGATGATGCTATGCTTTATTTTTGAGCAGATGATCGATGAAGGACTAACCCCTAAC
 ATTATACTTTCTGTTTCTCAGTCTTATTCTAAAAATAATTTATACTTTCTGTTTCTGTTAGTGATGG
 CTATAACCATTAGATGGCTTTTTTACAAATTTAGATGATAATTATCATTGTTCAATTTATTGCTGAAATT
 CTTATCTGTATGCATCATTGTTAACACAGCGACAACCAGGAAATTAGTTTCTTCTTGAGCTAATCATTTC
 CCTCCCTAGTTCTGTCATA

>PPR7-Z-458

CGGAGACCGATCTGGGCCGTCCATCCGCGCCGCCAGCCAATCGGACGGTGGGTGTATTACTGTACTGC
 CCAGGTCGGTGACCGTACAAGCCGGAATATTCAGTAGCGTTCGTTCCCTGGCTTCTCCATTTCTTTC
 AGTCCGCGCGCCGCGCGCCGCGCAGGCATGGCGCGCGTGTACCACCCTTACCCGCGCCCGCACCCG
 CGCCCGCGCGCGCGCGCTCCCCAGCGCGCAGGGTGGTACGACCCAAGACCTAGGGCGCGCGGGGGCAG
 TGGCACCAGGGGCGCACGCCACGTGCTCGACGAATTGCCGCTACGGGGCTGGGGCGCTCGATCTACAG
 CTTCAACCGCACCCCTCACCGACGTGCGCGGTGACAGCCAGCCGCGCAGCAGTTTCGCTCTTCAACCGCAT
 GGCCCGAGCCGGCGCCGACGAGGTAACCTCCCGACTTGTGCACCTACAGCATTCTCATCGGTTGCTGCTG
 CCGCGCGGGCCGCTTGGACCTCGGTTTCGCGGCCCTTGGGCAATGTCATTAAGAAGGGGATTTAGAGTGGA
 AGCCATCACCTTCGCTCCTCTGCTCAAGGGCCTCTGTGCCGACAAGAGGACGAGCGACGCAATGGACAT
 AGTGCTCCGAGAATGACCGAGCTCAGCTGCATGCCAGATGTTTTCTCCTGCACCATTCTTCTCAAGGG
 TCTGTGTGATGAGAACAGAAGCCAAGAAGCTCTCGAGCTGCTGCACATGATGGCTGATGATCGAGGAGG
 AGGTAGCCACCTGATGTGGTGTGCTATAACCACTGTCATCAATGGCTTCTTCAAAGAGGGGGATTCAGA
 CAAAGCTTACAGTACATAACCATGAAATGCTTGGTTCGGAGGATTTACCAAATGTTGTGACTTACAGCTC
 TATTATTGCTGCGTTATGCAAGGCTCAAGCTATGGACAAAGCCATGGAGGTAACACCATGGTTAA
 GAATGGTGTGCATGCCTGATTGCATGACATATAGTAGTATTCTGCATGGATATTGCTCTTCAGGGCAGCC
 AAAAGAGGCTATTGGAACCTCAAAAAGATGCGCAGTGTGGTGTGCAACCAAATGTTGTTACTTATAG
 ATCACTGATGAATTATCTTTGCAAGAATGGAAGATGCACCAAAGCTAGAAAAGATTTTCGATTCTATGAC
 CAAGAGGGGCCTAGAGCCTGATATTGCTACCTATCGTACCCTGCTTCAGGGGTATGCTACCAAAGGAGC
 CCTTGTGAGATGCATGCTCTCTTGGATTTGATGGTACGAAATGGTATCCAACCGGATCATCATGTATT
 CAACATTCTAATATGTGCATACGCTAAACAAGAGAAAGTAGATCAGGCAATGCTTGTATTTCAGCAAAAT
 GAGGCAGCATGGATTGAATCCGAATGTAGTGTGCTATGGAACAGTTATAGATGTACTTTGCAAGTCAGG
 CAGTGTAGATGATGCTATGCTTTATTTTTGAGCAGATGATCGATGAAGGACTAACCCCTAACATTACT
 TTCTGTTTTCTCAGTCTTATTCTAAAAATAATTTATACTTTCTGTTTCTGTTAGTGATGGCTATAACC
 ATTAGATGGCTTTTTTACAAATTTAGATGATAATTATCATTGTTCAATTTATTGCTGAAATTTCTTATCTG
 TATGCATCATTGTTAACACAGCGACAACCAGGAAATTAGTTTCTTCTTGAGCTAATCATTTCCTCCCTA
 GTTCTGTCATA

>PPR7-ZH-458

CGGAGACCGATCTGGGCCGTCCATCCGCGCCGCCAGCCAATCGGACGGTGGGTGTATTACTGTACTGC
 CAGGTCGGTGACCGTACAAGCCGGAATATTCAGTAGCGTTCGTTCCCTGGCTTCTCCATTTCTTCA
 GCTCCGCGCCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCAGGCATGGCGCGCCGTGTACCACCCTTACCCGCGCC
 CGCACCCGCGCCCGCGCGCGCGCGCTCCCCAGCGCGCAGGGTGGTACGACCCAAGACCTAGGGCGCGCG
 GGGGGCAGTGGCACCAGGGGCGCACGCCACGTGCTCGACGAATTGCCGCTACGGGGCTGGGGCGCCTCG
 ATCTACAGCTTCAACCGCACCCCTCACCGACGTGCGCGGTGACAGCCAGCCGCGCAGCAGTTTCGCTCTTC
 AACCGCATGGCCCGAGCCGGCGCCGACGAGGTAACCTCCCGACTTGTGCACCTACAGCATTCTCATCGGT
 TGCTGCTGCCGCGCGGGCCGCTTGGACCTCGGTTTCGCGGCCCTTGGGCAATGTCATTAAGAAGGGGATTT
 AGAGTGGAAAGCCATCACCTTCGCTCCTCTGCTCAAGGGCCTCTGTGCCGACAAGAGGACGAGCGACGCA
 ATGGACATAGTGTCCGAGAATGACCGAGCTCAGCTGCATGCCAGATGTTTTCTCCTGCACCATTCTT
 CTCGAAGGTTCTGTGTGATGAGAACAGAAGCCAAGAAGCTCTCGAGCTGCTGCACATGATGGCTGATGAT
 CGAGGAGGAGGTAGCCACCTGATGTGGTGTGCTATAACCACTGTCATCAATGGCTTCTTCAAAGAGGGG
 GATTTCAGACAAAGCTTACAGTACATAACCATGAAATGCTTGGTTCGGAGGATTTACCAAATGTTGTGACC
 TACAGCTCTATTATTGCTGCGTTATGCAAGGCTCAAGCTATGGACAAAGCCATGGAGGTAACACCC
 ATGGTTAAGAATGGTGTGCATGCCTGATTGCATGACATATAATAGTATTCTGCATGGATATTGCTCTTCA
 GGGCAGCCAAAAGAGGCTATTGGAACACTCAAAAAGATGCGCAGTGTGGCGTGAACCAAATGTTGTT
 ACTTATAGATCACTGATGAATTATCTTTGCAAGAATGGAAGATGCACCGAAGCTAGAAAAGATTTTCGAT
 TCTATGACCAAGAGGGGCCTAGAGCCTGATATTGCTACCTATCGTACCCTGCTTCAGGGGTATGCTACC
 AAAGGAGCCCTTGTGAGATGCATGCTCTCTTGGATTTGATGGTACGAAATGGTATCCAACCGGATCAT
 CATGTATTCAACATTCTAATATGTGCATACGCTAAACAAGAGAAAGTAGATCAGGCAATGCTTGTATTTC
 AGCAAAATGAGGCAGCATGGATTGAATCCGAATGTAGTGTGCTATGGAACAGTTATAGATGTACTTTGC
 AAGTCAGGCAGTGTAGATGATGCTTTATTTTTGAGCAGATGATCGATGAAGGACTAACCCCTAAC

ATTATACTTTCTGTTTCCTCAGTCTTATTCTAAAAATAATTTATACTTTCTGTTTCCTGTTAGTGATGG
 CTATAACCATTAGATGGCTTTTTACAAAATTTAGATGATAAATTATCATTGTTCAATTTATTGCTGAAATT
 CTTATCTGTATGCATCATTGTTAACACAGCGACAACCAGGAAATTAGTTCTTCTTGAGCTAATCATTTCC
 CCTCCCTAGTTCTGTCATA

>PPR458_7

CGGAGACCGATCTGGGCCGTCCATCCGCGCCGCCAGCCAATCGGACGGTGGGTGTATTACTGTACTGC
 CAGGTCGGTGACCGTACAAGCCGGAATATTCAGTAGCGTCGTTTCGCTCCCTGGCTTCTCCATTTCTTCA
 GCTCCGCCGCCGGCGGGCGGGCGGGCGGGCAGGCATGGCGCGCCGTGTACCACCCCTACCCGCGCC
 CGCACACGCGCCCGGGCGGGCGGGCGTCCCAGCGCGCAGGGTGGTACGACCCAAGACCTAGGGCGCGCG
 GGGGGCAGTGGCACCAGGGGCGCACGCCACGTGCTCGACGAATTGCCGCTACGGGGCTGGGGCGCCTCG
 ATCTACAGCTTCAACCGCACCCCTCACCGACGTCGCGCGTGACAGCCCAGCCGACAGATTTTCGCTCTTC
 AACCGCATGGCCGAGCCGGCGCCGACGAGGTAACTCCCGACTTGTGCACCTACAGCATTCTCATCGGT
 TGCTGCTGCCGCGGGCCGCTTGGACCTCGGTTTCGCGGCCCTTGGGCAATGTCATTAAGAAGGGATTT
 AGAGTGGAAAGCCATCACCTTCGCTCCTCTGCTCAAGGGCCTCTGTGCCGACAAGAGGACGAGCGACGCA
 ATGGACATAGTGTCCGAGAATGACCGAGCTCAGCTGCATGCCAGATGTTTTCTCCTGCACCATTCTT
 CTCAAGGGTCTGTGTGATGAGAACAGAAGCCAAGAAGCTCTCGAGCTGCTGCACATGATTGCTGATGAT
 CGAGGAGGAGGTAGCCACCTGATGTGGTGTGCTATACCACTGTCATCAATGGCTTCTTCAAAGAGGGG
 GATTCAGACAAAAGCTTACAGTACATAACCATGAAATGCTTGGTCCGAGGATTTACCAAATGTTGTGACT
 TACAGCTCTATTATTGCTGCGTTATACAAGGCTCAAGCTATGGACAAAAGCCATGGAGGTACTTAACACC
 ATGGTTAAGAATGGTGTGATGCCTGATTGCATGACATATAATAGTATTCTGCATGGATATTGCTCTTCA
 GGGCAGCCAAAAGAGGCTATTGGAACCTCAAAAAGATGCGCAGTGATGGTGTGCAACCAAATGTTGTT
 ACTTATAGATCACTGATGAATTATCTTTGCAAGAATGGAAGATGCACCAAAGCTAGAAAGATTTTCGAT
 TCTATGACCAAGAGGGGCTAGAGCCTGATATTGCTACCTATCGTACCCTGCTTCAGGGGTATGCTACC
 AAAGGAGCCCTTGTGAGATGCATGCTCTCTTGGATTTGATGGTACGAAATGGTATCCAACCGGATCAT
 CATGTATTCAACATTTAATATGTGCATACGCTAAACAAGAGAAAGTAGATCAGGCAATGCTTGTATTTC
 AGCAAAATGAGGCAGCATGGATTGAATCCGAATGTAGTGTGCTATGGAACAGTTATAGATGTACTTTGC
 AAGTCAGGCAGTGTAGATGATGCTATGCTTTATTTTGGAGCAGATGATCGATGAAGGACTAACCCCTAAC
 ATTATACTTTCTGTTTCCTCAGTCTTATTCTAAAAATAATTTATACTTTCTGTTTCCTGTTAGTGATGG
 CTATAACCATTAGATGGCTTTTTACAAAATTTAGATGATAAATTATCATTGTTCAATTTATTGCTGAAATT
 CTTATCTGTATGCATCATTGTTAACACAGCGACAACCAGGAAATTAGTTCTTCTTGAGCTAATCATTTCC
 CCTCCCTAGTTCTGTCATA

ลำดับเบสจากฐานข้อมูลที่นำมาออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน PPR9

>PPR9-409-Z

AGTTTGAAGAGCGTGCTAACGGAAAACGAGGAAGTTGAAGTTGAAGTTGGAGAAATAGAACTCACCCCTT
 GCTATGCAACACCCCTCAATGTTAGTACTGTAACATGGGAGTGAGGGATAAAAAGCATTGCCCTCACT
 CGCGCATCAAACGTGAGGGCACCCCTCCCTTCCCCTGGCGCCCGCGGGCGGCTGATCTGTTCCGCCGT
 GTCCGTCAGGCCTGGCGCCCGCGGGGGCAGGCATGGCGCGCCCGCTCCCTACCCGCCCGCGGGCGGTG
 GCGGGCGGGCGTCCCACGCTCGGAGGGCTCGATCCAAGGGCGAGGAGCCGCGGGGGGCGAGTGGCG
 CCGAGGACGCACGCCAGTGTTCGACGAATTGCTCCGTGTCGAGGGGCGCCTCGATCTACGGCTTGA
 ACCGCGCCCTCGCCGACGTCGCGCGTACAGCCCCGCGCCCGCTGTCCTCGCTACAACCGCATGGCCC
 GAGCCGGCGCCGGCAAGGTAACCTCCACCGTGCACACCTATGCCATCCTCATCGGCTGCTGCTGCCGTG
 CGGGCCGCTTGGACCTCGGTTTCGCGCCCTTGGGCAATGTGCTCAAGAAGGGATTTAGAGTGGATGCCA
 TCACCTTCACTCCTCTGCTCAAGGGCCTCTGTGCCGACAAGAGGACGAGCGACGCAATGGACATAGTGC
 TCCGCAGAATGACCGAGCTCGGCTGCATAACCAATGTCTTCTCCTACAATAATCTTCTCAAGGGTCTGT
 GTGATGAGAACAGAAGCCAAGAAGCTCTCGAGCTGCTGCACATGATGGCTGATGATCGAGGAGGAGGTA
 GCCACCTGATGTGGTGTGCTATACCACTGTCATCGATGGCTTCTTCAAGGAGGGGGATTTCAGACAAAAG
 CATAAGTACATAACCATGAAATGCTGGACCGGGGGATTTTACCAAATGTTGTGACCTACAGCTCTATTA
 TTGCTGCGTTATGCAAGGCTCAAGCTATGGACAAAAGCCATGGAGGTACTTACCACGATGGTTAAGAATG
 GTGTCATGCCTGATTGCAGGACATATACTAGTATCATGCATGGATATTGCTCTTCAGGGCAGCCGAAAG
 AGGCTATTGGATTTCTCAAAAAGATGCGCAGTGATGGTGTGCAACAGATGTTGTTACTTATAACTCGC
 TCATGGATTATCTTTGCAAGAATGGAAGATCCACCGAAGCTAGAAAGATTTTCGATTCTATGACCAAGA

GGGGCCTTAAGCCTGATATTACTACCTATGGTACCCTGCTTCAGGGGTATGCTACCAAAGGAGCCCTTT
 TTGACATGCATGCTCTCTTGGATTTGATGGTACGAAACGGCATCCACCCTGATCATTATGTTTACAACA
 TTCTAATATGTGCATACGCTAAACAAGAGAAAGTAGAAGAGGTAATGCTTGTTTATAACAGGATGGACG
 TTGTTTATAACAGCGTCTAGACCTAGACGCGCTTGCAAACCTGCGGCCACCCTTTTATCACACAAATTTT
 TGACAATTTGACACTTTCCGAAAATTAATTTTATAAAATTAACCGTGACCAAAACTTATTTAAAAATGAT
 CTTTTTGTGTAACGCAAAATCGTATACTTCAGCGCCAAATAGCACGGCGCCGACCTCCCCCTTCCCCTC
 CCCTCTATCCTCCACTGCTGCCGCCACCTCTCCGTATCAGCTGCGTCGCGTTGGTTTCCGCGGGCGCT
 GCTGCTGCTGCACCAGTCCGCTAGGGCGGGCGGGCATGGCGCGCCGCGCCGCTTCCCGCGCCGCGCCG
 GCGCTGTTGGCGCCCTTCGCTCGGAGGGCTCGACCCAAGGGCGAGGGGGCCGCGCGGGGGCAGTGGCG
 CCGAGGACGCACGCCACGTGTTGACGAATTGCTCCGGCGTGGCAGGGGGCGCCTCGATCTACGGCTTGA
 ACTGCGTCCCTCGCCGACGTGCGCGCTCACAGCCCCGCGGCCCGCGTGTCCCGCTACAACCGCATGGCCC
 AAGCCGGCGCCGACGAGGTAACCTCCCAACTTGTGCACCTACGGCATTCTCATCGGTTCTGCTGCTGCG
 CGGGCCGCTTGGACCTCGGTTTCGCGGCCTTGGGCAATGTCATTAAGAAGGGATTTAGAGTGGACGCCA
 TCGCCTTCACTCCTCTGCTCAAGGGCCTCTGTGCTGACAAGAGGACGAGCGACGCAATGGACATAGTGC
 TCCGAGAATGACCCAGCTTGGCTGCATACCAATGTCTTCTCCTACAATATTCTTCTCAAGGGGCTGT
 GTGATGAGAACAGAAGCCAAGAAGCTTTCGAGCTGCTCCAATGATGCCTGATGATGGAGGTGACTGCC
 CACCTGATGTGGTGTGCTATAACCCTGTGCATCAATGGCTTCTTCAAGGAGGGGGATCTGGACAAAGCTT
 ACGGTACATAACCATGAAATGCTGGACCGGGGGATTTTACCAAATGTTGTTACCTACAGCTCTATTATTG
 CTGCGTTATGCAAGGCTCAAGCTATGGACAAAGCCATGGAGGTAACCTACCAGCATGGTTAAGAATGGTG
 TCATGCCTAATTGCAGGACGTATAATAGTATCGTGCATGGGTATTGCTCTTCAGGGCAGCCGAAAGAGG
 CTATTGGATTTCTCAAAAAGATGCACAGTGTGGTGTGCAACCAGATGTTGTTACTTATAACTCGCTCA
 TGGATTATCTTTGCAAGAACGGAAGATGCACGGAAGCTAGAAAAGATTTTCGATTCTATGACCAAGAGGG
 GCCTAAAGCCTGAAATTAACCTATGGTACCCTGCTTCAGGGGTATGCTACCAAAGGAGCCCTTGTTG
 AGATGCATGGTCTCTTGGATTTGATGGTACGAAACGGTATCCACCCTAATCATTATGTTTTCAACATTC
 TAATATGTGCATACGCTAAACAAGGGAAAGTAGATCAGGCAATGCTTGTGTTGAGCAAAATGAGGCAGC
 AAGGATTGAATCCGAATGCAGTGACGTATGGAGCAGTTATAGGCATACTTTGCAAGTCAAGGCAGAGTAA
 AAGATGCTATGCTTTATTTTGGAGCAGATGATCGATGAAGGACTAAGCCCTGGCAACATTGTTTATAACT
 CCCTAATTCATGGTTTGTGCACCTGTAACAAATGGGAGAGGGCTGAAGAGTTAATTCCTTGAAATGTTGG
 ATCGAGGCATCTGTCTGAACACTATTTTCTTTAATTCAATAATTGACAGTCATTGCAAAGAAGGGAGGG
 TTATAGAATCTGAAAACCTCTTTGAGCTGATGGTACGTATTGGTGTGAAGCCCAATGTCATTACCTACA
 ATACTCTTATCGATGGATGCTGCTTAGCTGGTAAGATGGATGAAGCAACGAAGTTACTTGCCAGCATGT
 TCTCAGTTGGAATGAAACCTGATTGTGTTACATATAACTTTGATTAATGGCTACTGTAAAATTAGTA
 GGATGGATGAAGCAATGAAGTTACTTTCTGGCATGGTCTCAGTTGGGTGAAACCTAATACTGTTACTT
 ATAGCACTTTGATTAATGGCTACTGCAAAATTAGTAGGATGGAAGACCGGTTAGTTCTTTTTAAGGAGA
 TGGAGAGCAGTGGTGTAGTCTGATATTATTACGTATAACATAATTCTGCAAGGTTTTATTTCAAACCA
 GAAGAATGCTGCTGCAAAAAGAACTCTATGTCAGGATTACCGAAAGTGAATGCAGCTTGAACCTTTGGA
 CATAACAATAATCCTTCATGGGCTTTGCAAAAACAATCTCACTGACGAGGCACTTCGAATGTTTCAGA
 ATCTATGTTTACGAGATTTACAGCTGGAGACTAGGACTTTTAAACATTATGATTGGTGCCTTACTTAAAT
 GTGGAAGAATGGATGAAGCTAAGGATTTGTTTGTGCTCACTCGGCTAACGGTTTGTGCCAGATGTTT
 GGACCTACAGTTTAAATGGCAGAAAATCTTATAGAGCAGGGGTGCTAGAAGAATTGGATGATCTATTTT
 TTTCAATGGAGGAGAATGGCTGTTCCGCCGACTCCCGCATGCTAAATTCATTGTTAGGAAACTGTTAC
 AGAGGGGTGATATAACCAGGGCTGGCACTTACCTGTTTCATGATTGATGAGAAGCACTTCTCCCTCGAAG
 CATCCACTGCTTCTTCTTGTGTTAGAATCTTCCCAATCGTCTGGGAGCAAATATCAAGAATATCGTAGG
 TTTTTCCCTGAAAATACGAGGCTTCTATAGAATCTTTGAACTGCTTTCGAAGCTTTTTGACGCTTTGAA
 GTTCTGAGTTGGAATTCCTTTCTACTACACTCTACAGTTGTAAGGAGGATCTTTTTCTCTGTTTG
 TGTAATAGCAAGCAGATCACCTCATGTC

>PPR9-782-I

AGTTTGAAGAGCGTGCTAACGGAAAACGAGGAAGTTGAAGTTGAAGTTGGAGAAATAGAAGTCAACCTT
 GCTATGCAAACACCCCTCAATGTTAGTACTGTAACATGGGAGTGAGGGATAAAAGCATTGCCCTCACT

CGCGCATCAAACGTGAGGGCACCCCTCCCTTCCCCTGGCGCCCGCGGGCGGCGCTGATCTGTTCCGCCGCT
 GTCCGTGAGGCCTGGCGCCCGCGGGGGCAGGCATGGCGCGCCGCGTCCCTACCCGCCCGCGGGCGGCTG
 GCGGGCGGGCGTCCCACGCTCGGAGGGCTCGATCCAAGGGCGAGGAGCCGCGCGGGGGGCAGTGGCG
 CCGAGGACGCACGCCACGTGTTGACGAATTGCTCCGGCGTGGCAGGGGCGCCTCGATCTACGGCTTGA
 ACCGCGCCCTCGCCGACGTCGCGCGTCACAGCCCCGCGGCCGCGTGTCCCGCTACAACCGCATGGCCC
 GAGCCGGCGCCGGAAGGTAACCTCCACCGTGCACACCTATGCCATCCTCATCGGCTGCTGCTGCCGTG
 CGGGCCGCTTGGACCTCGGTTTTGCGGGCCTTGGGCAATGTCGTCAAGAAGGGATTTAGAGTGGATGCCA
 TCACCTTACTCCTCTGCTCAAGGGCCTCTGTGCCGACAAGAGGACGAGCGACGCAATGGACATAGTGC
 TCCGAGAATGACCGAGCTCGGATGCATACCAGATGTCTTCTCCTACAATATTCTTCTCAAGGGTCTGT
 GTGATGAGAACAGAAGCCAAGAAGCTCTCGAGCTGCTGCACATGATGGCTGATGATCGAGGAGGAGGTA
 GCCACCTGATGTGGTGTGCGTATAACACTGTCCTCAATGGCTTCTTCAAAGAGGGGGATTTCAGACAAA
 CTTACAGTACATACCATGAAATGCTGGACCGGGGGATTTTACCAGATGTTGTGACCTACAGCTCTATTA
 TTGCTGCGTTATGCAAGGCTCAAGCTATGGACAAAGCCATGGAGGTAATTACCACGATGGTTAAGAATG
 GTGTCATGCCTGATTGCATGACATATACTAGTATCATGCATGGATATTGCTCTTCAGGGCAGCCGAAA
 AGGCTATTGGATTTCTCAAAAAGATGCGCAGTGTGGTGTCAAACCAAATGTTTTTACTTATAGATCAC
 TGATGAATTATCTTTGCAAGAATGGAAGATCCACCGAAGCTAGAAAAGATTTTCGATTCTATGACCAAGA
 GGGCCCTAGAGCCTGATATTGCTACCTATCGTACCCTGCTTCAGGGGTATGCTACCAAAGGAGCCCTTG
 TTGAGATGCATGCTCTCTGGATTTGATGGTACGAAATGGTATCCAACCGGATCATCATGTATTCAACA
 TTCTAATATGTGCATACGCTAAACAAGAGAAAGTAGATCAGGCAATGCTTGTATTTCAGCAAAATGAGGC
 AGCATGGATTGAATCCGAATGTAGTGACCTATGGAACAGTTATAGATGTAATTTGCAAGTCAGGCAGTG
 TAGATGATGCTATGCTTTATTTTGGAGCAGATGATCGATGAAGGACTAACCCCTAACATTATTGTGTATA
 CCTCCCTAATTCATGGTCTGTGCACCTATGACAAGTGGGAGAAGGCTGAAGAGTTATTTTTTAAAATGT
 TGGACAGTGGCATCTGTCCGAACACTGTTTTCTTTAGTTCAATAATTAGCAATCTTTGCAAAGAAGGGA
 GGGTTATAGAATCTGAAAAACTTTTTGACCTGATGGTACGTATTGGTGTGAAGCCCAATGTCATTACGT
 ACAATACTCTTATCGATGGATGCTGCTTAGGTGGTAAGATGGATGAAGCAATGAAGTTACTTTCTGGCA
 TGGTCTCAGTTGGGTTGAAACCTAATACTGTTACTTATAGCACTTTGATTAATGGCTACTGCAAAATTA
 GTAGGATGGAAGACGCGTTAGTTCTTTTTAAGGAGATGGAGAGCAGTGGTGTAGTCTGATATTATTA
 CGTATAACATAATTCTGCAAGGTTTATTTCAAACCAGAAGAAGTCTGCTGCAAAAAGAACTCTATGTCA
 GTATTACCAAAGTGAACACAGCTTGAACCTAGCACGTACAACATAATCCTTCATGGACTTTGCAAAA
 ACAATCTCACTGACGAGGCACCTCGAATGTTTTCAGAACCTATGTTTGACGGATTTACAGCTGGAGACTA
 GGACTTTTAACTTATGATTGGTGCCTTACTTAAATGTGGAAGAATGGATGAAGCTAAGGATTTGTTTG
 CTGCTCACTCGGCTAACGGTTTAGTGCCAGATGTTTGGACCTACAGTTTAAATGGCAGAAAATCTTATAG
 AGCAGGGGTGCGTAGAAGAATTGGATGATCTATTTCTTTCAATGGAGGAGAATGGCTGTTCCGCCGACT
 CCCGCATGCTAAATTCCATTGTTAGGAAACTGTTACAGAGGGGTGATATAACCAGGGCTGGCACTTACC
 TGTTTCATGATTGATGAGAAGCACTTCTCCCTCGAAGCATCCACTGCTTCTTCTTGTAGAACTTCCC
 CAATCGTCTGGGAGCAAATATCAAGAATATCGTAGGTTTTTCCCTGAAAAATACGAGGCTTCTATAGAA
 TCTTTGAACTGCTTCGAAGCTTTTTGCAGCTTTGAAGTTCTGAGTTGGAATTCTTTTCTACTACACTCT
 ACAGTTGTACTAGAGGAGGTATCTTTTCTGTTTGTGTAATAGCAAGCAGATCACCTCATGTC

>PPR9-782-M

AGTTTGAAGAGCGTGCTAACGGAAAACGAGGAAGTTGAAGTTGAAGTTGGAGAAATAGAACTCACCCCTT
 GCTATGCAAACACCCCTCAATGTTAGTACTGTAACATGGGAGTGAGGGATAAAAGCATTGCCCTCACT
 CGCGCATCAAACGTGAGGGCACCCCTCCCTTCCCCTGGCGCCCGCGGGCGGCGCTGATCTGTTCCGCCGCT
 GTCCGTGAGGCCTGGCGCCCGCGGGGGCAGGCATGGCGCGCCGCGTCCCTACCCGCCCGCGGGCGGCTG
 GCGGGCGGGCGTCCCACGCTCGGAGGGCTCGATCCAAGGGCGAGGAGCCGCGCGGGGGGCAGTGGCG
 CCGAGGACGCACGCCACGTGTTGACGAATTGCTCCGGCGTGGCAGGGGCGCCTCGATCTACGGCTTGA
 ACCGCGCCCTCGCCGACGTCGCGCGTCACAGCCCCGCGGCCGCGTGTCCCGCTACAACCGCATGGCCC
 GAGCCGGCGCCGGAAGGTAACCTCCACCGTGCACACCTATGCCATCCTCATCGGCTGCTGCTGCCGTG
 CGGGCCGCTTGGACCTCGGTTTTGCGGGCCTTGGGCAATGTCGTCAAGAAGGGATTTAGAGTGGATGCCA
 TCACCTTACTCCTCTGCTCAAGGGCCTCTGTGCCGACAAGAGGACGAGCGACGCAATGGACATAGTGC

TCCGCAGAATGACCGAGCTCGGATGCATACCAGATGTCTTCTCCTACAATATTCTTCTCAAGGGTCTGT
 GTGATGAGAACAGAAGCCAAGAAGCTCTCGAGCTGCTGCACATGATGGCTGATGATCGAGGAGGAGGTA
 GCCACCTGATGTGGTGTCTGATAAAGCTGTCTCAATGGCTTCTTCAAAGAGGGGGATTTCAGACAAAG
 CTTACAGTACATAACCATGAAATGCTGGACCGGGGATTTTACCAGATGTTGTGACCTACAGCTCTATTA
 TTGCTGCGTTATGCAAGGCTCAAGCTATGGACAAAGCCATGGAGGTAAGTACCACGATGGTTAAGAATG
 GTGTCATGCCTGATTGCATGACATATACTAGTATCATGCATGGATATTGCTCTTCAGGGCAGCCGAAAG
 AGGCTATTGGATTTCTCAAAAAGATGCGCAGTGTGGTGTGCAACCAAATGTTTTTACTTATAGATCAC
 TGATGAATTATCTTTGCAAGAATGGAAGATCCACCGAAGCTAGAAAAGATTTTCGATTCTATGACCAAGA
 GGGGCTAGAGCCTGATATTGCTACCTATCGTACCCTGCTTCAGGGGTATGCTACCAAAGGAGCCCTTG
 TTGAGATGCATGCTCTCTTGATTTGATGGTACGAAATGGTATCCAACCGGATCATCATGTATTCAACA
 TTCTAATATGTGCATACGCTAAACAAGAGAAAAGTAGATCAGGCAATGCTTGTATTTCAGCAAAAATGAGGC
 AGCATGGATTGAATCCGAATGTAGTGACCTATGGAACAGTTATAGATGTACTTTGCAAGTCAGGCAGTG
 TAGATGATGCTATGCTTTATTTGAGCAGATGATCGATGAAGGACTAACCCCTAACATTATTGTGTATA
 CCTCCCTAATTCATGGTCTGTGCACCTATGACAAGTGGGAGAAGGCTGAAGAGTTATTTTTTAAAATGT
 TGGACAGTGGCATCTGTCCGAACACTGTTTTCTTTAGTTCAATAATTAGCAATCTTTGCAAAGAAGGGA
 GGGTTATAGAATCTGAAAAACTTTTTGACCTGATGGTACGTATTGGTGTGAAGCCCAATGTCATTACGT
 ACAATACTCTTATCGATGGATGCTGCTTAGCTGGTAAGATGGATGAAGCAATGAAGTTACTTTCTGGCA
 TGGTCTCAGTTGGGTTGAAACCTAATACTGTTACTTATAGCACTTTGATTAATGGCTACTGCAAAAATTA
 GTAGGATGGAAGACGCGTTAGTTCTTTTTAAGGAGATGGAGAGCAGTGGTGTAGTCTGATATTATTA
 CGTATAACATAAATCTGCAAGGTTTATTTCAAACCAGAAGAACTGCTGCTGCAAAAAGAACTCTATGTCA
 GTATTACCAAAAAGTGGAAACACAGCTTGAACCTAGCACGTACAACATAATCCTTCATGGACTTTGCAAAA
 ACAATCTCACTGACGAGGCACCTTCGAATGTTTTCAGAACCTATGTTTTGACGGATTTACAGCTGGAGACTA
 GGACTTTTAAACATTATGATTGGTGCCTTACTTAAATGTGGAAGAATGGATGAAGCTAAGGATTTGTTTG
 CTGCTCACTCGGCTAACGGTTTAGTGCCAGATGTTTGGACCTACAGTTTAAATGGCAGAAAATCTTATAG
 AGCAGGGGTCGCTAGAAGAATTGGATGATCTATTTCTTTCAATGGAGGAGAATGGCTGTTCCGCCGACT
 CCCGCATGCTAAATTCATTGTTAGGAACTGTTACAGAGGGGTGATATAACCAGGGCTGGCACTTACC
 TGTTTCATGATTGATGAGAAGCACTTCTCCCTCGAAGCATCCACTGCTTCCCTTCTGTTAGAACTTCCC
 CAATCGTCTGGGAGCAAATATCAAGAATATCGTAGGTTTTTCCCTGAAAAATACGAGGCTTCTATAGAA
 TCTTTGAACTGCTTCGAAGCTTTTTGCAGCTTTGAAGTTCTGAGTTGGAATCTTTTCTACTACACTCT
 ACAGTTGTACTAGAGGAGGTATCTTTCTCTGTTTGTGTAATAAGCAAGCAGATCACCTCATGTC

>PPR9-782-ZH

AGTTTGAAGAGCGTGCTAACGGAAAACGAGGAAGCTGAAGTTGGAGTTGGAGAAAATAGAACTCACCCCT
 GCTATGCAAAACACCCCTCAATGTTAGTACTGTAACATGGGAGTGAGGGATAAAAAGCAATGCCCTCACT
 CGAGCATCAAACGTGAGGGCACCCCTCCCTTCCCTGGCGCCCGCGCGGCGCTGATCTGTTCCGCCGCT
 GTCCGTGAGGCTGGCGCCCGGGGGCAGGCATGGCGCGCCGCTCCCTACCCGCCCGCGCGGGTG
 GCGGCGGCGGCGTCCCACGCTCGGAGGGCTCGATCCAAGGGCGAGGAGCCGCGCGGGGGCAGTGGCG
 CCGAGGACGCACGCCACGTGTTGACGAATTGCTCCGGCGTGGCAGGGGCGCCTCGATCTACGGCTTGA
 ACCGCGCCCTCGCCGACGTGCGCGCTCACAGCCCCGCGCCCGCCGTGTCGCTACAACCGCATGGCCC
 GAGCCGCGCCGGCAAGGTAACCTCCACCGTGCACACCTATGCCATCCTCATCGGCTGCTGCTGCCGTG
 CGGGCCGCTTGGACCTCGGTTTCGCGGCCTTGGGCAATGTCGTCAAGAAGGGATTTAGAGTGGATGCCA
 TCACCTTCACTCCTCTGCTCAAGGGCCTCTGTGCCGACAAGAGGACGAGCGACGCAATGGACATAGTGC
 TCCGCAGAATGACCGAGCTCGGCTGCATACCAGATGTCTTCTCCTACAATAATCTTCTCAAGGGTCTGT
 GTGATGAGAACAGAAGCCAAGAAGCTCTCGAGCTGCTGCACATGATGGCTGATGATCGAGGAGGAGGTA
 GCCACCTGATGTGGTGTCTGATAAAGCTGTCTCAATGGCTTCTTCAAAGAGGGGGATTTCAGACAAAG
 CTTACAGTACATAACCATGAAATGCTGGACCGGGGATTTTACCAGATGTTGTGACCTACAGCTCTATTA
 TTGCTGCGTTATGCAAGGCTCAAGCTATGGACAAAGCCATGGAGGTAAGTACCACCATGGTTAAGAATG
 GTGTCATGCCTGATTGCATGACATATAATAGTATTCTGCATGGATATTGCTCTTCAGGGCAGCCAAAAG
 AGGCTATTGGAACACTCAAAAAGATGCGCAGTGTGGCTGCAACCAAATGTTGTTACTTATAGTTTAC
 TGATGAATTATCTTTGCAAGAATGGAAGATCCACCGAAGCTAGAAAAGATTTTCGATTCTATGACCAAGA

GGGGCCTAGAGCCTGATATTGCTACCTATCGTACCCTGCTTCAGGGGTATGCTACCAAAGGAGCCCTTG
 TTGAGATGCATGCTCTCTTGGATTTGATGGTACGAAATGGTATCCAACCGGATCATCATGTATTCAACA
 TTCTAATATGTGCATACGCTAAACAAGAGAAAAGTAGATCAGGCAATGCTTGTATTTCAGCAAAAATGAGGC
 AGCATGGATTGAATCCGAATGTAGTGTGCTATGGAACAGTTATAGATGTACTTTGCAAGTCAGGCAGTG
 TAGATGATGCTATGCTTTATTTTGGAGCAGATGATCGATGAAGGACTAACCCCTAACATTATTGTGTATA
 CCTCCCTAATTCATGGTCTGTGCACCTGTGACAAATGGGACAAGGCTGAAGAGTTAATTCCTTGAAATGT
 TGGATCGAGGCATCTGTCTGAACACTATTTTCTTTAATTCATAAATTGACAGTCATTGCAAAGAAGGGA
 GGGTTATAGAATCTGAAAACTCTTTGACTTGATGGTACGAATGGTGTGAAGCCCGATATCATTACGT
 ACAATACACTCATCGATGGATGCTGCTTAGCTGGTAAGATGGATGAAGCAACGAAGTTACTTGCCAGCA
 TGGTCTCAGTTGGGGTGAAACCTGATATTGTTACCTATGGCACCTTGATTAATGGCTACTGTAGAGTTA
 GCAGGATGGATGACGCATTAGCTCTTTTCAAAGAGATGGTGAGCAGTGGTGTAGTCCCTAATATTATTA
 CGTATAACATAAATTCGCAAGGTTTATTTTCATAACCAGAAGAACTGCTGCTGCAAAAAGAACTCTATGTCA
 GTATTACCAAAGTGGAAACACAGCTTGAACCTTAGCACGTACAACATAATCCTTCATGGACTTTGCAAAA
 ACAATCTCACTGACGAGGCCTTCGAATGTTTCAGAACCTATGTTTGACGGATTTACAGCTGGAGACTA
 GGACTTTTAAACATTATGATTGGTGCCCTACTTAAATGTGGAAGAATGGATGAAGCTAAGGATTTGTTTG
 CTGCTCACTCGGCTAACGGTTTAGTGCCAGATGTTAGGACCTACAGTTAATGGCAGAAAATCTTATAG
 AGCAGGGGTCGCTAGAAGAATTGGATGATCTATTTCTTTCAATGGAGGAGAATGGCTGTTCCGCCGACT
 CCCGCATGCTAAATCCATTGTTAGGAACTGTTACAGAGGGTGATATAACCAGGGCTGGCACTTACC
 TGTTTCATGATTGATGAGAAGCACTTCTCCCTCGAAGCATCCACTGCTTCCCTCTTGTAGAACTTCCC
 CAATCGTCTGGGAGCAAATATCAAGAATATCGTAGGTTTTCCTTGAAAAATACGAGGCTTCTATAGAA
 TCTTTGAACTGCTTCGAAGCTTTTTGACGCTTTGAAAGTTCTGAGTTGGAATTCCTTTCTACTACACTCT
 ACAGTTGTACTAGAGGAGGTATCTTTTCTCTGTTTGTGTAATAGCAAGCAGATCACCTCATGTC

>PPR782a_9

AGTTTGAAGAGCGTGCTAACGGAACGAGGAAGTTGAAGTTGAAGTTGGAGAAATAGAACTCACCCCTT
 GCTATGCAAAACCCCCCTCAATGTTAGTACTGTAACATGGGAGTGAGGGATAAAAGCATTGCCCTCACT
 CGCGCATCAAACGTGAGGGCACCCCTCCCTTCCCTGGCGCCCGCGGGCGCGCTGATCTGTTCCGCCGCT
 GTCCGTCAGGCCCTGGCGCCCGCGGGGGCAGGCATGGCGCGCCCGCTCCCTACCCGCCCGCGCGGGTG
 GCGGCGGGCGCGTCCCACGCTCGGAGGGCTCGATCCAAGGGCGAGGAGGCCGCGGGGGGCGAGTGGCG
 CCGAGGACGCACGCCACGTGTTGACGAATTGCTCCGGCGTGGCAGGGGCGCCTCGATCTACGGCTTGA
 ACCGCGCCCTCGCCGACGTGCGCGTACAGCCCCGCGCCCGCTGTCCCGCTACAACCGCATGGCCC
 GAGCCGGCGCCGGAAGGTAACCTCCACCGTGACACCTATGCCATCCTCATCGGCTGCTGCTGCCGTG
 CGGGCCGCTTGGACCTCGGTTTCGCGGCCCTTGGGCAATGTCGTCAAGAAGGGATTTAGAGTGGATGCCA
 TCACCTTCACTCCTCTGCTCAAGGGCCTCTGTGCCGACAAGAGGACGAGCGACGCAATGGACATAGTGC
 TCCGAGAATGACCGAGCTCGGATGCATACCAGATGCTTCTCCTACAATATCTTCTCAAGGGTCTGT
 GTGATGAGAACAGAAGCCAAGAAGCTCTCGAGCTGCTGCACATGATGGCTGATGATCGAGGAGGAGGTA
 GCCACCTGATGTGGTGTGCTATAACACTGTCCTCAATGGCTTCTTCAAAGAGGGGATTCAGACAAAG
 CTTACAGTACATACCATGAAATGCTGGACCGGGGGATTTTACCAGATGTTGTGACCTACAGCTCTATTA
 TTGCTGCGTTATGCAAGGCTCAAGCTATGGACAAAGCCATGGAGGTACTTACCACGATGGTTAAGAATG
 GTGTCATGCCGATTGCATGACATATACTAGTATCATGCATGGATATTGCTCTCAGGGCAGCCGAAAG
 AGGCTATTGGATTTCTCAAAAAGATGCGCAGTGATGGTGTCAAACCAAATGTTTTTACTTATAGATCAC
 TGATGAATTATCTTTGCAAGAATGGAAGATCCACCGAAGCTAGAAAAGATTTTCGATTCTATGACCAAGA
 GGGGCCTAGAGCCTGATATTGCTACCTATCGTACCCTGCTTCAGGGGTATGCTACCAAAGGAGCCCTTG
 TTGAGATGCATGCTCTCTTGGATTTGATGGTACGAAATGGTATCCAACCGGATCATCATGTATTCAACA
 TTCTAATATGTGCATACGCTAAACAAGAGAAAAGTAGATCAGGCAATGCTTGTATTTCAGCAAAAATGAGGC
 AGCATGGATTGAATCCGAATGTAGTGACCTATGGAACAGTTATAGATGTACTTTGCAAGTCAGGCAGTG
 TAGATGATGCTATGCTTTATTTTGGAGCAGATGATCGATGAAGGACTAACCCCTAACATTATTGTGTATA
 CCTCCCTAATTCATGGTCTGTGCACCTATGACAAGTGGGAGAAGGCTGAAGAGTTATTTTTTAAAATGT
 TGGACAGTGGCATCTGTCCGAACACTGTTTTCTTTAGTTCAATAAATTAGCAATCTTTGCAAAGAAGGGA
 GGGTTATAGAATCTGAAAACTTTTTGACCTGATGGTACGTATTGGTGTGAAGCCCAATGTCATTACGT

ACAATACTCTTATCGATGGATGCTGCTTAGGTGGTAAGATGGATGAAGCAATGAAGTTACTTTCTGGCA
 TGGTCTCAGTTGGGTTGAAACCTAATACTGTTACTTATAGCACTTTGATTAATGGCTACTGCAAAATTA
 GTAGGATGGAAGACGCGTTAGTCTTTTTAAGGAGATGGAGAGCAGTGGTGTAGTCCTGATATTATTA
 CGTATAACATAAATCTGCAAGGTTTATTTCAAACCAGAAGAACTGCTGCTGCAAAAGAACTCTATGTCA
 GTATTACCAAAAAGTGGAACACAGCTTGAACCTAGCACGTACAACATAATCCTTCATGGACTTTGCAAAA
 ACAATCTCACTGACGAGGCACTTCGAATGTTTCAGAACCTATGTTTGACGGATTTACAGCTGGAGACTA
 GGACTTTTAAACATTATGATTGGTGCCTTACTTAAATGTGGAAGAATGGATGAAGCTAAGGATTTGTTG
 CTGCTCACTCGGCTAACGGTTTAGTGCCAGATGTTTGGACCTACAGTTTAAATGGCAGAAAATCTTATAG
 AGCAGGGGTGCTAGAGAATTTGGATGATCTATTTCTTTCAATGGAGGAGAATGGCTGTTCCGCCGACT
 CCCGCATGCTAAATTCATTTGTTAGGAACTGTTACAGAGGGGTGATATAACCAGGGCTGGCATTACC
 TGTTTCATGATTGATGAGAAGCACTTCTCCCTCGAAGCATCCACTGCTTCCCTTCTTGTAGAACTTCCC
 CAATCGTCTGGGAGCAAAATATCAAGAATATCGTAGGTTTTTCCCTGAAAAATACGAGGCTTCTATAGAA
 TCTTTGAACTGCTTCGAAGCTTTTTGCAGCTTTGAAGTTCTGAGTTGGAATCTTTTTCTACTACACTCT
 ACAGTTGTACTAGAGGAGGTATCTTTTCTCTGTTTGTGTAATAGCAAGCAGATCACCTCATGTC

ลำดับเบสจากฐานข้อมูลที่นำมาออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน *PPR10*

>PPR10-M-454

TGCTGCTGCACCTGTCAGCTAGGGCGGGCATGGCGCGCCGCGCCGCTTCCCGCGCTGTTGGCTCGGAGG
 GCTCGATCCAAGGGCGAGGGGGCCGCGCGGGGGGCAATGGCGCCGAGGACGCACGCCACGTGTTTCGACG
 AATTGCTTCGGCGTGGCAAGGGCGCCACGATCTACGGCTTGAACCGCGCCCTCGACGACGTGCGCGGTC
 ACAGCCCCGCGGCCGCCGTGTCCTCCTACAACCGCATGGCCCCGAGCCGGCGCCGACGAGGTAACCTCCA
 ACTTGTACACCTACAGCGTTCTCATCGGTTGCTGCTGCCGGGCGGGCCGCTTGGACAATGTCATTAAGA
 AGGGATTTAGAGTGAAGCCATCACCTTCACTCCTCTGCTCAAGGGCCTCTGTGCCGACAAGAGGACGA
 GCGACGCAATGGACATAGTGTCTGTCAGAATGACCCAGCTCGGCTGCATACCAAATGTCTTCTCCTGCA
 CCATTCTTCTCAAGGGTCTGTGTGATGAGAACAGAAGCCAAGAAGCTCTCGAGCTGCTCCAAATGATGC
 CTGATGATGGAGGTGACTGCCACCTGATGTGGTGTGTGACAACACCGTCATCAATGGCTTCTTCAAAG
 AGGGGGATCCGGACAAAGCTTACGCTACATACCATGAAATGTTTGACCAGGGGATTTTGCCAGATGTTG
 TGACTTACAGCTCTATTATCGCTGCCTTATGCAAGGCTCAAGCTATGGACAAGGCCATGGAGGTACTTA
 ACACCATGGTTAAGAATGGTGTGATGCCTAATTGCAGGACATATAATAGTATTGTGCACGGATATTGCT
 CTTACAGGGCAGTTGACAGAGGCTATTGGATTTCTCAAAATGATGTGCAGTGATGGTGTGCAACCAGATG
 TTGTTACTTGTAACTTGTGATGGATTATCTTTGCAAGAACAGAAGATGCACGGAAGCTAGAAAAGATTT
 TCAATTCTATGACCAAGTGTGGCCTAAAGCCTGATATTACTACCTATTGTACCTGCTTCAGGGGTATG
 CTACCAAAGGAGCCCTTGTTGAGATGCATGATCTCCTGGATTTGATGGTATGGAACGGTATCCAACCTA
 ATCATCATGTATTCAACATTCTAATATGTGCATACGCTAAACAAGAAAAAGTAGATGAGGCGATGCTTG
 TATTACGCAAAATGAGGCAGCAAGGATTGAGTCCGAATGCAGTGAACACAGAACAGTCATAGATGTAC
 TCTGCAAGCTAGGCAGAGTATACGATGCAGTGTACCTTAAAGCAGATGATCAATGAAGGACTAACCC
 CTGACATCATTGTATATAACCCCTAATTCATGGTTTTTTGTACCTGTGACAAATGGGAGAAGGCTGAGG
 AGTTAATTTTTTAAATGTTGGATCAAGGCATCTGTCCAGACACCATTTTCTTTAGTAGAATAATTTATA
 ATTTTTGCAAGAAGGGGGAGTTATAGAATCTGAAAACTCTTTGACTTGATGGCACATACTGGTGTTA
 AGCCTGATGTCATTACATACAATGCACTCATCAGTGGATATTGCCTAGCCGGTGTGACGTAAAACACG
 AGGCCTGGGAGATCTGCTTAACTCCAGTGCAGGTCCAAAACCTCGCCTTCGGGTATGCTTAGCGTGCCAA
 TTGATTTGATCCTGCAATCAACAAGAAAACAAAGACAAAAGAAACCGCGGTAAATCCATAAACGATAGCC
 GATCGGCTAGGTGCCGATGACATATCATTTATCTTTGAGCCGATGTCATATGTGCATCGATCGGCAGTC
 ATTAATAAATAAGAAGGGACTAAATCTATTGATCGGCTGTAGATATTAACAATATATAGTCCTTATAT
 CGATATATACTTAAATCAAGTGATTGGGATAGATCGGTCTCCATGCCGAGACAGTATGAATCACTTAGA
 TCGAAATATATATTAATAATGAGATTATATACGTTTCATAGCATAGCCGATCAGATGGATCTAGCATGTA
 TCGGTTGATACTCCGATACTACTCTATATTAAGATATTAAGCAAGTAGAATATACTAAAACAAAAGCCT
 AATATACTTAAATGCAGCAATATCTTAATATAAAGGGCAGATTTAACATGTCAATCGAGCATATAGGAT
 AAAAGTAGTTAAATCAGGTAAGATCGGCTGAAACCCCGATACTACCCTAATCGGC

>PPR10-Z-454

TGCTGCTGCACCTGTCAGCTAGGGCGGGCATGGCGCGCCGCGCCGCTTCCC GCGCTGTTGGCTCGGAGG
 GCTCGATCCAAGGGCGAGGGGGCCGCGCGGGGGGCAATGGCGCCGAGGACGCACGCCACGTGTTTCGACG
 AATTGCTTCGGCGTGGCAAGGGCGCCACGATCTACGGCTTGAACCGCGCCCTCGACGACGTCGCGCGTC
 ACAGCCCCGCGGCCCGGTGTCCCCTACAACCGCATGGCCCCGAGCCGGCGCCGACGAGGTAAC TCCCA
 ACTTGTACACCTACAGCGTTCTCATCGGTTGCTGCTGCCGGGCGGGCCGCTTGGACAATGTCATTAAGA
 AGGGATTTAGAGTGGAAGCCATCACCTTCACTCCTCTGCTCAAGGGCCTCTGTGCCGACAAGAGGACGA
 GCGACGCAATGGACATAGTGCTCTGCAGAATGACCCAGCTCGGCTGCATACCAAATGTCTTCTCCTGCA
 CCATTCTTCTCAAGGGTCTGTGTGATGAGAACAGAAGCCAAGAAGCTCTCGAGCTGCTCCAAATGATGC
 CTGATGATGGAGGTGACTGCCCACCTGATGTGGTGTGTGACAACACCGTCATCAATGGCTTCTTCAAAG
 AGGGGGATCCGGACAAAGCTTACGCTACATAACCATGAAATGTTTGACCAGGGGATTTTGCCAGATGTTG
 TGACTTACAGCTCTATTATCGCTGCCTTATGCAAGGCTCAAGCTATGGACAAGGCCATGGAGGTACTTA
 ACACCATGGTTAAGAATGGTGTGCATGCCTAATTCAGGACATATAATAGTATTGTGCACGGATATTGCT
 CTTACAGGGCAGTTGACAGAGGCTATTGGATTTCTCAAAAATGATGTGCAGTGATGGTGTGCAACCAGATG
 TTGTTACTTGTAACCTGCTGATGGATTATCTTTGCAAGAACAGAAGATGCACGGAAGCTAGAAAAGATTT
 TCAATTCTATGACCAAGTGTGGCCTAAAGCCTGATATTACTACCTATTGTACCCTGCTTCAGGGGTATG
 CTACCAAAGGAGCCCTTGTGAGATGCATGATCTCCTGGATTTGATGGTATGGAACGGTATCCAACCTA
 ATCATCATGTATTCAACATTCTAATATGTGCATACGCTAAACAAGAAAAAGTAGATGAGGCGATGCTTG
 TATTACGCAAAAATGAGGCAGCAAGGATTGAGTCCGAATGCAGTGAACACTACAGAACAGTCATAGATGTAC
 TCTGCAAGCTAGGCAGAGTATACGATGCAGTGCTTACCTTAAAGCAGATGATCAATGAAGGACTAACCC
 CTGACATCATTGTATATACCCCCCTAATTCATGGTTTTTTGTACCTGTGACAAATGGGAGAAGGCTGAGG
 AGTTAATTTTTTAAATGTTGGATCAAGGCATCTGTCCAGACACCATTTTCTTTAGTAGAATAATTTATA
 ATTTTTGCAAAGAAGGGGGAGTTATAGAATCTGAAAACTCTTTGACTTGATGGCACATACTGGTGTTA
 AGCCTGATGTCATTACATAACAATGCACTCATCAGTGGATATTGCCTAGCCGGTGTGACGTAAAAACAG
 AGGCCTGGGAGATCTGCTTAACTCCAGTGCAGGTCCAAAACCTCGCCTTCGGGTATGCTTAGCGTGCCAA
 TTGATTTGATCCTGCAATCAACAAGAAAACAAAGACAAAAGAAACC GCGGTAAATCCATAAACGATAGCC
 GATCGGCTAGGTGCCGATGACATATCATTATCTTTGAGCCGATGTCATATGTGCATCGATCGGCAGTC
 ATTAATAAATAAGAAGGGACTAAATCTATTTCGATCGGCTGTAGATATTAACAATATATAGTCCCTATAT
 CGATATATACTTAAATCAAGTGATTGGGATAGATCGGTCTCCATGCCGAGACAGTATGAATCACTTAGA
 TCGAAATATATATTAATAATGAGATTATATACGTTTCATAGCATAGCCGATCAGATGGATCTAGCATGTA
 TCGGTTGATACTCCGATACTACTCTATATTAAGATATTAAGCAAGTAGAATATACTAAACAAAAGCCT
 AATATACTTAAATGCAGCAATATCTTAATATAAAGGGCAGATTTAACATGTCAATCGAGCATATAGGAT
 AAAAGTAGTTAAATCAGGTAAGATCGGCTGAAACCCCGATACTACCTAATCGGC

>PPR10-93-469

TGCTGCTGCACCTGTCAGCTAGGGCGGGCATGGCGCGCCGCGCCGCTTCCC GCGCTGTTGGCTCGGAGG
 GCTCGATCCAAGGGCGAGGGGGCCGCGCGGGGGGCAATGGCGCCGAGGACGCACGCCACGTGTTTCGACG
 AATTGCTCCGGCGTGGCAGGGGGCGCCACGATCTACGGCTTGAACCGCGCCCTCGACGACGTCGCGCGTC
 ACAGCCCCACGGCCCGGTGTCCCCTACAACCGCATGGCCCCGAGCCGGCGCCGACGAGGTAAC TCCCA
 ACTTGTACACCTACAGCGTTCTCATCGGTTGCTGCTGCCGGCGGGCCGCTTGGACAATGTCATTAAGA
 AGGGATTTAGAGTGGAAGCCATCACCTTCACTCCTCTGCTCAAGGGCCTCTGTGCCGACAAGAGGACGA
 GCGACGCAATGGACATAGTGCTCCGCAGAATGACCCAGCTCGGCTGCATACCAAATGTCTTCTCCTGCA
 CCATTCTTCTCAAGGGTCTGTGTGATGAGAACAGAAGCCAAGAAGCTCTCGAGCTGCTCCAAATGATGC
 CTGATGATGGAGGTGACTGCCCACCTGATGTGGTGTGTGACAACACCGTCATCAATGGCTTCTTCAAAG
 AGGGGGATCCGGACAAAGCTTACGCTACATAACCATGAAATGTTTGACCAGGGGATTTTGCCAGATGTTG
 TGACTTACAGCTCTATTATCGCTGCCTTATGCAAGGCTCAAGCTATGGACAAGGCCATGGAGGTACTTA
 ACACCATGGTTAAGAATGGTGTGCATGCCTAATTCAGGACATATAATAGTATTGTGCACGGATATTGCT
 CTTACAGGGCAGTTGACAGAGGCTATTGGATTTCTCAAAAAGATGTGCAGTGATGGTGTGCAACCAGATG
 TTGTTACTTGTAACCTGCTGATGGATTATCTTTGCAAGAACAGAAGATGCACGGAAGCTAGAAAAGATTT
 TCGATTCTATGACCAAGTGGGGCCTAAAGCCTGATATTACTACCTATTGTACCCTGCTTCAGGGGTATG

CTACCAAAGGAGCCCTTGTTGAGATGCATGATCTCCTGGATTTGATGGTATGGAACGGTATCCAACCTA
 ATCATCATGTATTCAACATTCTAATATGTGCGTACGCTAAACAAGAAAAAGTAGATGAGGCAATGCTTG
 TATTCAGCAAAATGAGGCAGCAAGGATTGAGTCCGAATGCAGTGAACACAGAACAGTCATAGATGTAC
 TCTGCAAGCTAGGCAGAGTATACGATGCAGTGCTTACCTTAAAGCAGATGATCAATGAAGGACTAACCC
 CTGACATCATTGTATATACCCCCCTAATTCATGGTTTTTGTACCTGTGACAAATGGGAGAAGGCTGAGG
 AGTTAATTTTTGAAATGTTGGATCAAGGCATCTGTCCAGACACCATTTCTTTAGTAGAATAATTTATA
 GTTTTTGCAAAGAAGGGAGAGTTATAGAATCTGAAAACTCTTTGACTTGATGGCTGGTGTAAAGCCTG
 ATGTCATTACATACAATGCACTCATCAGTGGATATTGCCTAGCCGGTGTGACGTAAAAACACGAGGCCCT
 GGGAGATCTGCTTAACTCCAGTGCAGGTCCAAAACACGCCCTTCGGGTATGCTTAGCGTGCCAGTTGATT
 TGATCCTGCAATCAACAAGAAAACAAAGACAAAAGAAACCGCGGTTAAATCCATAAACGATAGCCGATCGG
 CTAGGTGCCGATGACATATCATTATCTTTGAGCCGATGTCATATGTGCATCGATCGGCAATCATTAAAT
 AAATAAGAAGGGACTAAATCTATTCGATCGGCTGTAGATATTAACAATATACAGTCCTTATATCGATAT
 ATACTTAAATCAAGTGATTGGGATAGATCGGTCTCTATGCCGAGACAGTATGAATCACTTAGATCGAAA
 TATATATTAATAATGAGATTATATATGTTTCATAGCATAGCCGATCAGATGGATCTAGCATGTATTGGCT
 AATACTCCGATACTACTCTATATTAAGATATTAAGCAAGTAGAATATACTAAACAAAAGCCTAATATA
 CTTAAATGCAACAAGATCTTAATATAAAGGGCAGTTTTAACATGTCAATCGAGCATATAGGATAAAAGT
 AGTTAAATCAGATAAGATCGACTGAAACCCCGATACTACCCTAATCGGC

>PPR454_10

TGCTGCTGCACCTGTCAGCTAGGGCGGGCATGGCGCGCCGCGCCGCTTCCC GCGCTGTTGGCTCGGAGG
 GCTCGATCCAAGGGCGAGGGGGCCGCGCGGGGGGCAATGGCGCCGAGGACGCACGCCACGTGTTGACG
 AATTGCTTCGGCGTGGCAAGGGCGCCACGATCTACGGCTTGAACCGCGCCCTCGACGACGTCGCGCGTC
 ACAGCCCCGCGGCCCGCTGTCCCCTACAACCGCATGGCCCGAGCCGGCGCCGACGAGGTAACCTCCA
 ACTTGTACACCTACAGCGTCTCATCGGTTGCTGCTGCCGGGCGGGCCGCTTGGACAATGTCATTAAGA
 AGGGATTTAGAGTGGAAGCCATCACCTTCACTCCTCTGCTCAAGGGCCTCTGTGCCGACAAGAGGACGA
 GCGACGCAATGGACATAGTGTCTGTCAGAATGACCCAGCTCGGCTGCATACCAAATGTCTTCTCCTGCA
 CCATTCTTCTCAAGGGTCTGTGTGATGAGAACAGAAGCCAAGAAGCTCTCGAGCTGCTCCAAATGATGC
 CTGATGATGGAGGTGACTGCCCACCTGATGTGGTGTGTACAACACCGTCATCAATGGCTTCTTCAAAG
 AGGGGGATCCGGACAAAGCTTACGCTACATAACCATGAAATGTTTGACCAGGGGATTTTGCCAGATGTTG
 TGACTTACAGCTCTATTATCGCTGCCTTATGCAAGGCTCAAGCTATGGACAAGGCCATGGAGGTACTTA
 ACACCATGGTTAAGAATGGTGTGCATGCCTAATTGCAGGACATATAATAGTATTGTGCACGGATATTGCT
 CTTCAGGGCAGTTGACAGAGGCTATTGGATTTCTCAAAATGATGTGCAGTGTGGTGTGCGAACCCAGATG
 TTGTTACTTGTAACTTGTGATGGATTATCTTTGCAAGAACAGAAGATGCACGGAAGCTAGAAAAGATTT
 TCAATTCTATGACCAAGTGTGGCCTAAAGCCTGATATTACTACCTATTGTACCCTGCTTCAGGGGTATG
 CTACCAAAGGAGCCCTTGTTGAGATGCATGATCTCCTGGATTTGATGGTATGGAACGGTATCCAACCTA
 ATCATCATGTATTCAACATTCTAATATGTGCGTACGCTAAACAAGAAAAAGTAGATGAGGCGATGCTTG
 TATTCAGCAAAATGAGGCAGCAAGGATTGAGTCCGAATGCAGTGAACACAGAACAGTCATAGATGTAC
 TCTGCAAGCTAGGCAGAGTATACGATGCAGTGCTTACCTTAAAGCAGATGATCAATGAAGGACTAACCC
 CTGACATCATTGTATATACCCCCCTAATTCATGGTTTTTGTACCTGTGACAAATGGGAGAAGGCTGAGG
 AGTTAATTTTTTAAATGTTGGATCAAGGCATCTGTCCAGACACCATTTCTTTAGTAGAATAATTTATA
 ATTTTTGCAAAGAAGGGAGAGTTATAGAATCTGAAAACTCTTTGACTTGATGGCACATACTGGTGTTA
 AGCCTGATGTCATTACATACAATGCACTCATCAGTGGATATTGCCTAGCCGGTGTGACGTAAAAACACG
 AGGCCTGGGAGATCTGCTTAACTCCAGTGCAGGTCCAAAACACGCCCTTCGGGTATGCTTAGCGTGCCAA
 TTGATTTGATCCTGCAATCAACAAGAAAACAAAGACAAAAGAAACCGCGGTTAAATCCATAAACGATAGCC
 GATCGGCTAGGTGCCGATGACATATCATTATCTTTGAGCCGATGTCATATGTGCATCGATCGGCAGTC
 ATTAATAAATAAGAAGGGACTAAATCTATTCGATCGGCTGTAGATATTAACAATATATAGTCCTTATAT
 CGATATATACTTAAATCAAGTGATTGGGATAGATCGGTCTCCATGCCGAGACAGTATGAATCACTTAGA
 TCGAAATATATATTAATAATGAGATTATATACGTTTCATAGCATAGCCGATCAGATGGATCTAGCATGTA
 TCGGTTGATACTCCGATACTACTCTATATTAAGATATTAAGCAAGTAGAATATACTAAACAAAAGCCT

AATATACTTAAATGCAGCAATATCTTAATATAAAGGGCAGATTTAACATGTCAATCGAGCATATAGGAT
AAAAGTAGTTAAATCAGGTAAGATCGGCTGAAACCCCGATACTACCCTAATCGGC





ภาคผนวก ข

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวกนกวรรณ จันทร์เพ็ญ	
เกิดเมื่อ	31 ตุลาคม 2531	
ประวัติการศึกษา	พ.ศ.2546	มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนสันทรายวิทยาคม จังหวัดเชียงใหม่
	พ.ศ.2549	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสันทรายวิทยาคม จังหวัดเชียงใหม่
	พ.ศ.2553	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ) จังหวัดเชียงใหม่

ผลงานวิจัย:

แสงทอง พงษ์เจริญกิต, กนกวรรณ จันทร์เพ็ญ, วริศรา สุวรรณ, ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์, วราภรณ์ แสงทอง และอนุรักษ โปธิเอี่ยม. 2015. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างรากของข้าวตัดแปลงพันธุกรรมที่มีการแสดงออกของยีน *OsHsp* ขนาดเล็กเพิ่มขึ้น. *Thai J. Genet.*, 8(3), 175-181.

Wongtrakul, J., Paemanee, A., Wintachai, P., Thepparit, C., Roytrakul, S., Thongtan, T., Janphen, K., Supparatpinyo, K. & Smith, D. R. 2016. Nevirapine induces apoptosis in liver (HepG2) cells. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 9(6), 547-553.

Wongtrakul, J., Thongtan, T., Roytrakul, S., Kumrapich, B., Janphen, K., Preparattanapan, J., Supparatpinyo, K. & Smith, D. R. 2014. Proteomic analysis of serum and urine of HIV-monoinfected and HIV/HCV-coinfected patients undergoing long term treatment with nevirapine. *Disease markers*, 2014. 1-12.

Wongtrakul, J., Janphen, K., Saisawang, C., & Ketterman, A. J. 2014. Interaction of Omega, Sigma, and Theta glutathione transferases with *p38b*

mitogenactivated protein kinase from the fruit fly, *Drosophila melanogaster*.

Journal of Insect Science, 14(1), 60.

ประสบการณ์ทำงาน:

2553-2555

ทำงานที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ศูนย์วิจัยชีวโมเลกุลและเซลล์วิทยาของโรคติดเชื้อ

ตำแหน่งผู้ช่วยนักวิจัย

2554

เข้ารับการฝึกอบรมทำวิจัยร่วมกับห้องปฏิบัติการวิจัยโปรตีนโอมิกส์

ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค)

สถาบันวิทยากร สวทช

