การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ข้าว

Application of DNA markers for assessment of genetic diversity and rice improvement

จุฑาพร แสงประจักษ์[1*]

Juthaporn Saengprajak[1*]

บทนำ

การปรับปรุงพันธุ์เป็นกระบวนการเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีตรงตามความต้องการ เช่น ผลผลิตสูง ผลผลิตมีคุณภาพ ต้านทานต่อโรคและแมลง เป็นต้น โดยการประเมินลักษณะและการคัดเลือกสายพันธุ์มักใช้วิธีสังเกตลักษณะสัณฐานวิทยา (morphological character) หรือลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ซึ่งลักษณะที่ปรากฏเป็นผลจากการแสดงออกของจีโนไทป์ (genotype) และมีผลกระทบของสภาพแวดล้อมที่สิ่งมีชีวิตเจริญเติบโตในช่วงเวลานั้น (จรัสศรี, 2548) ดังนั้น การใช้ลักษณะที่ปรากฏจำแนกสิ่งมีชีวิตจึงอาจไม่เพียงพอในการคัดเลือกหรือระบุสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตให้ถูกต้องแม่นยำได้ นอกจากนั้น กระบวนการปรับปรุงพันธุ์ยังต้องอาศัยระยะเวลานานและใช้แรงงานจำนวนมากอีกด้วย (กรมวิชาการเกษตร, 2543)

ปัจจุบัน เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หรือเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ได้เข้ามามีบทบาทในงานด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมาก เนื่องจากการจัดกลุ่มหรือการจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาทำได้ยาก โดยเฉพาะพืชซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน (สรพงศ์, 2554) จึงทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์พืชบางชนิดที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุ์พืช (varietal identification) ได้เข้ามาช่วยให้การจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น (สุรีพร, 2546) และยังเป็นข้อมูลสำคัญในการจดสิทธิบัตรพันธุ์พืช (plant patent) (Paterson et al., 1991) นอกจากนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอยังได้รับความนิยมอย่างมากในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (genetic diversity) อีกด้วย (Mondini et al., 2009)

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์ส่วนใหญ่มีจุดประสงค์เพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีตามที่ต้องการ เรียกว่า การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection, MAS) ซึ่งเป็นวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าการคัดเลือกจากฟีโนไทป์ เนื่องจากเป็นการคัดเลือกจากจีโนไทป์โดยตรง (สุรีพร, 2546) เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถตรวจสอบได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต จึงมีส่วน

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150
Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantarawichai District, Mahasarakham 44150

* Corresponding author: juthaporn.s@msu.ac.th

ช่วยประหยัดเวลา ลดแรงงาน ลดต้นทุน และพื้นที่ในการเพาะปลูกได้ ดังนั้น งานปรับปรุงพันธุ์พืชซึ่งถือเป็นหัวใจสำคัญในการสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ให้ได้ผลผลิตสูง และเป็นที่ต้องการของเกษตรกร จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้เครื่องมือที่มีความแม่นยำในการคัดเลือกและแยกความแตกต่างของลักษณะเหล่านั้น จึงทำให้เครื่องหมายดีเอ็นเอหรือเครื่องหมายโมเลกุลเข้ามามีบทบาทและเพิ่มความสำคัญมากขึ้น (สรพงศ์, 2554) บทความนี้ได้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของเครื่องหมายดีเอ็นเอ และการประยุกต์ใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต และการนำมาใช้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึง ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายติดตามหน่วยพันธุกรรมหรือยีนของสิ่งมีชีวิตและสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกหลานได้ พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์และมีความแตกต่าง (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลดีเอ็นเอ จึงทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกันและสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอมีหลายประเภท เช่น RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), STS (Sequence Tagged Sites), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), SSR (Simple Sequence Repeats) หรือ microsatellites และ SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) เป็นต้น การเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละประเภท (Table 1)

Table 1 Comparison of the most common used DNA marker systems

Feature	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	SNP
DNA required (μg)	10	0.02	0.5-1.0	0.05	0.05
DNA quality	High	high	Moderate	moderate	high
PCR-based	No	yes	Yes	yes	yes
Number of polymorphic loci analyzed polymorphism	1.0-3.0	1.5-50	20-100	1.0-3.0	1.0
Ease of use	not easy	easy	easy	easy	easy
Amenable to automation	low	moderate	moderate	high	high
Reproducibility	high	unreliable	high	high	high
Development cost	low	low	moderate	high	high
Cost per analysis	high	low	moderate	low	low

(**Source**: Korzun, 2002)

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR และ AFLP เป็นที่ได้รับความนิยมใช้กันมากในปัจจุบัน เช่น การใช้เครื่องหมาย SSR ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) ที่มีความทนทานต่อความเค็มระดับต่างๆ (Seetharam et al., 2009; Kanawapee et al., 2011) และในสายพันธุ์ข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) (Salem et al., 2008) ส่วนเครื่องหมาย AFLP ก็ได้มีการนำมาใช้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* subsp. *indica*) (Prashanth et al., 2002) ในสายพันธุ์ข้าวป่า (Rajkumar et al., 2011) และในสายพันธุ์ข้าวเหนียว (Bao et al., 2006) เป็นต้น เนื่องจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว แม่นยำ และใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อย ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RFLP ได้รับการพัฒนามานานและเป็นประโยชน์ในการสร้างแผนที่ยีนของสิ่งมีชีวิตต่างๆ มีความแม่นยำ ความคงตัวสูง แต่วิธีการต้องใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณมาก และมีความยุ่งยากในทางปฏิบัติ มีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและลักษณะของสายพันธุ์ วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและระบุสายพันธุ์ ประเมินระยะห่างทางพันธุกรรมของประชากรที่เป็นสายพันธุ์แท้และลูกผสม การบ่งชี้ตำแหน่งของยีนควบคุมลักษณะปริมาณ (Quantitative trait loci, QTL) และเพื่อช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ เป็นต้น

เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการศึกษาความหลายหลายทางพันธุกรรม

เนื่องจากได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) จึงมีการใช้ประโยชน์จากเทคนิคดังกล่าวเพื่อการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ของสิ่งมีชีวิตด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่างๆ ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะในสิ่งมีชีวิตจะมีความเหมาะสมอย่างยิ่งในการใช้ระบุชนิดสิ่งมีชีวิต การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ คือ การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่างๆ จากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาแยกขนาดด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟริซิส (gel electrophoresis) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำมาใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น การระบุสายพันธุ์หรือชนิดของสิ่งมีชีวิต การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์หรือเมล็ดพันธุ์ ศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต และการวิเคราะห์ความแตกต่างของฐานพันธุกรรมเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ (Prashanth et al., 2002; Martos et al., 2005; Bao et al., 2006; Seetharam et al., 2009; Rajkumar et al., 2011; Kanawapee et al., 2011; Rahman et al., 2012)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอหากนำมาบันทึกความเหมือนและความต่างของแถบดีเอ็นเอ สามารถนำมาใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสายพันธุ์หรือชนิดต่างๆ ได้โดยการคำนวณค่าตัวแปรทางพันธุกรรม เช่น ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (genetic similarity, GS) หรือระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance, GD) เป็นต้น ตัวอย่างเช่น การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด AFLP ในการระบุสายพันธุ์ ความหลากหลายทางพันธุกรรมและสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพันธุ์ข้าวสาลี (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) (Martos et al., 2005) (**Figure 1**) โดยศึกษาในข้าวสาลี 24 สายพันธุ์จากประเทศอิตาลีและประเทศสเปน ซึ่งมีเชื้อพันธุกรรมเกี่ยวข้องกันจากการผสมข้ามสายพันธุ์ในศตวรรษที่ผ่านมา ณ ช่วงเวลาที่แตกต่างกัน จากข้อมูลแบบแผนแถบดีเอ็นเอโดยการใช้เครื่องหมาย AFLP จำนวน 186 แถบ นำมาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (Dice's coefficient) พบว่า ข้าวสาลีสายพันธุ์จากประเทศสเปนที่เก็บในช่วงก่อนปี 1945 (4) และข้าวสาลีสายพันธุ์จากประเทศอิตาลีที่เก็บในช่วงเวลาต่างๆ (1, 2 และ 3) มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมในระดับสูง อันเนื่องมาจาก

มีการนำเข้าสายพันธุ์ข้าวสาลีจากคาบสมุทรไอบีเรียสู่ประเทศอิตาลี และประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยคำนวณค่า PIC (Polymorphic Information Content) โดยสายพันธุ์ข้าวสาลีที่เก็บในช่วงก่อนปี 1945 ช่วงระหว่างปี 1950 ถึง 1985 และช่วงระหว่างปี 1988 ถึง 2000 มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (PIC) เป็น 0.27, 0.28 และ 0.29 ตามลำดับ แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าวสาลีในประเทศอิตาลีและประเทศสเปนค่อนข้างมีความคงที่ตลอดระยะเวลาของการปรับปรุงพันธุ์ในช่วงศตวรรษที่ผ่านมา

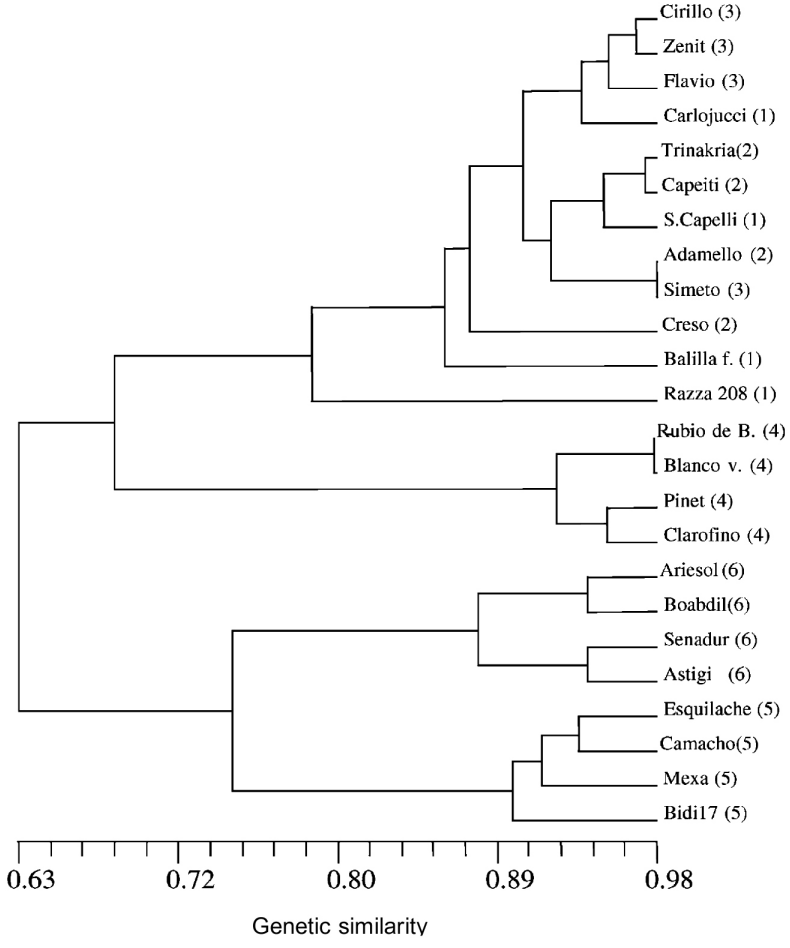

Figure 1 Dendrogram of 24 cultivars of durum wheat from Italy and Spain released in the last century based on 186 AFLP fragments. (1, 2, and 3 are Italian cultivars released before 1945, between 1950 and 1985, and between 1988 and 2000, respectively. 4, 5 and 6 are Spanish cultivars released before 1945, between 1950 and 1985, and between 1988 and 2000, respectively.)
(**Source:** Martos et al., 2005)

ข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ที่เก็บรวบรวมอยู่ในธนาคารเชื้อพันธุกรรม เช่น ศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติ นอกจากจะเป็นการอนุรักษ์พันธุกรรมแล้วยังเป็นแหล่งของความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อที่นักปรับปรุงพันธุ์ข้าวจะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ให้มีลักษณะตามที่ต้องการได้ (เกษม และคณะ, 2553) มีรายงานการจัดเก็บข้าวพื้นเมืองทั่วประเทศจำนวน 17,093 ตัวอย่าง โดยจำแนกชื่อในเบื้องต้นทั้งหมด 5,928 ตัวอย่าง จึงยังมีข้าวอีกหลายตัวอย่างที่ยังคงไม่ทราบชื่อ (ฉวีวรรณ, 2543) ธนาคารเชื้อพันธุกรรมจึงมีงานประเมินลักษณะพันธุ์ซึ่งต้องทำอย่างต่อเนื่อง แต่วิธีการนี้อาจทำให้ได้ข้อมูลที่ไม่สมบูรณ์เนื่องจากข้าวอาจแสดงลักษณะที่แตกต่างกันได้ในสภาพแวดล้อมหรือฤดูกาลปลูกที่ต่างกัน (เกษม และคณะ, 2553) ดังนั้น การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจสอบเชื้อพันธุ์ข้าวจึงสามารถช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ เนื่องจากเป็นการตรวจสอบจีโนไทป์โดยตรงซึ่งไม่ผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมและระยะของการเจริญเติบโต

เกษม และคณะ (2553) ได้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มสายพันธุ์ข้าวหอมมะลิจำนวน 213 accessions ที่เก็บอนุรักษ์ในศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอร่วมกับการประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า การใช้ไพรเมอร์ SSR จำนวน 32 คู่ วิเคราะห์แบบแผนของแถบดีเอ็นเอและจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) โดยใช้ค่า Nei72 coefficient สามารถแบ่งข้าวออกได้เป็น 29 กลุ่ม โดยข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบ่งข้าวออกเป็น 4 กลุ่ม แสดงว่ากลุ่มข้าวที่มีชื่อเหมือนกันหรือมีความคล้ายกันของลักษณะสัณฐานวิทยาค่อนข้างมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม อีกทั้งมีการใช้เครื่องหมาย SSR ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวสายพันธุ์ดี 21 สายพันธุ์ในประเทศบังคลาเทศ (*Oryza sativa* L.) โดยสามารถระบุเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ข้าวหอม (Rahman et al., 2012) และนอกจากนั้นมีการใช้เครื่องหมาย SSR เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและลายพิมพ์ดีเอ็นเอในข้าวสายพันธุ์ดี 15 สายพันธุ์ในอินเดีย จากการใช้ไพรเมอร์ SSR 30 คู่ ซึ่งวางตัวบนโครโมโซมที่ 7 ถึง 12 สามารถจัดกลุ่มสายพันธุ์ข้าวออกเป็น 11 กลุ่ม ด้วยวิธี UPGMA และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้สามารถระบุสายพันธุ์ข้าวได้ 9 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นข้อมูลที่ใช้ประกอบเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป (Chakravarthi and Naravaneni, 2006) (**Figure 2**)

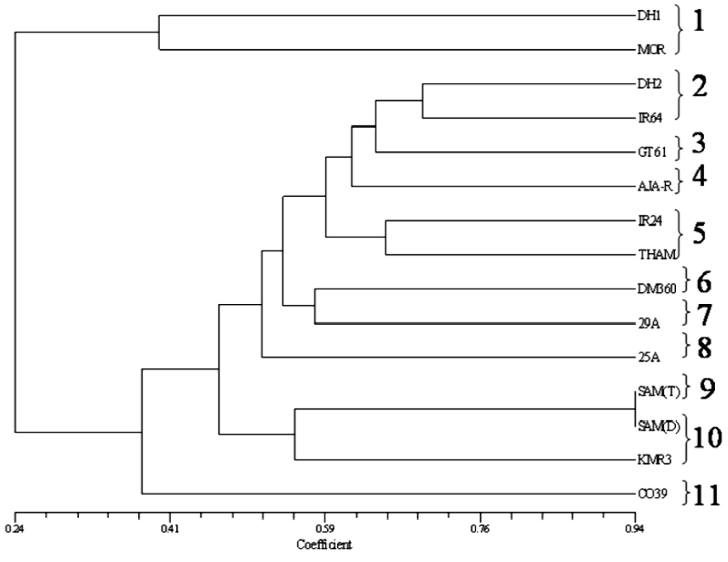

Figure 2 Clustering of 15 *Oryza sativa* species based on pooled SSR markers.

(**Source:** Chakravarthi and Naravaneni, 2006)

การค้นหายีนและการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือก (Gene tagging and marker-assisted selection)

การพัฒนาด้านเครื่องหมายดีเอ็นเอมีบทบาทอย่างมากต่อการค้นหายีน (gene tagging) ที่ควบคุมลักษณะที่ดีต่างๆ ในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เช่น ข้าว ข้าวสาลี และข้าวโพด เป็นต้น นอกจากประโยชน์เพื่อใช้ในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อหาตำแหน่งยีน การโคลนยีน การศึกษาวิวัฒนาการของพันธุ์พืชต่างๆ แล้วนั้น นักปรับปรุงพันธุ์ได้นำมาใช้ประโยชน์โดยตรง คือ การใช้เพื่อจำแนกและคัดเลือกสายพันธุ์พืช เช่น การระบุเครื่องหมาย sequence characterized amplified region (SCAR) ซึ่งพัฒนาจากเครื่องหมาย RAPD เพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (Saengprajak, 2012) และการใช้เครื่องหมาย SSR เพื่อระบุอัลลีล (allele) ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ข้าวในอินเดีย (Upadhyay et al., 2011) อีกทั้งยังมีการผนวกรวมยีนที่ควบคุมลักษณะดีต่างๆ เข้าด้วยกันในพืชต้นเดียวกัน (gene pyramiding) เช่น การผนวกยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง โรคไหม้ และแมลงบั่วในข้าว เป็นต้น (กรมวิชาการเกษตร, 2543)

ปัจจุบัน การระบุตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้เพื่อติดตามยีนหรือตำแหน่ง QTL ที่ควบคุมลักษณะต่างๆ ในพันธุ์พืชมีจำนวนมาก และได้มีการผนวกรวมยีนของลักษณะดีต่างๆ เข้าในพืชสายพันธุ์ดี เช่น ในข้าวสาลีได้มีการระบุเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมลักษณะที่ดีทางการเกษตรแล้วประมาณ 40 ลักษณะ (Gurta et al., 1999) โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอหรืออัลลีลที่ใช้ในการติดตามยีนดังกล่าวได้มีการนำมาใช้เพื่อช่วยคัดเลือกโดยตรงจากพันธุกรรมของพืช จึงไม่มีผลกระทบจากสิ่งแวดล้อม ทำให้ผลการคัดเลือกมีความแม่นยำสูง สามารถคัดเลือกได้ครั้งละหลายๆ ลักษณะ สะดวกรวดเร็ว โดยกระบวนการจำเพาะตามชนิดของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้และเทคนิค PCR และสามารถคัดเลือกได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช

ตัวอย่างการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น Korzun (2002) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวบาร์เลย์ที่มีความต้านทานต่อโรค Barley Yellow Mosaic Virus (BaMV) เป็นโรคสำคัญที่ส่งผลต่อการสูญเสียผลผลิต ซึ่งมีเชื้อสาเหตุ 2 ชนิด คือ *Barley mild mosaic virus* (BaMMV) และ *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) เป็นเชื้อที่อาศัยในดินโดยมีเชื้อรา *Polymyza graminis* เป็นพาหะ การพัฒนาสายพันธุ์ต้านทานโรคเป็นวิธีการที่สำคัญเพื่อลดการสูญเสียของผลผลิต แต่เนื่องจากการคัดเลือกสายพันธุ์ต้านทานในแปลงปลูกบ่อยครั้งที่มีผลกระทบจากสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง จึงได้มีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อติดตามยีนต้านทานโรค BaMV ในการคัดเลือกต้นพืชที่ต้านทานโรคได้สำเร็จ (Table 2)

Table 2 Application of PCR-based marker MG3H001 for detecting of yellow mosaic virus resistant plant allele. 169 bp corresponds to the susceptible plants, alleles 146 bp and 150 bp to *ym4* and *ym5* resistant plants, respectively.

No.	Plants	Allele	MG3H1_ 146	MG3H1_ 150	MG3H1_ 169	Resistance
1	Ge0043_001	MG3H001_146	1			resistance *ym4*
2	Ge0043_002	MG3H001_169			1	susceptible
3	Ge0043_003	MG3H001_146	1			resistance *ym4*
4	Ge0043_004	MG3H001_169			1	susceptible
5	Ge0043_005	MG3H001_146	1			resistance *ym4*
6	Ge0043_006	MG3H001_146	1			resistance *ym4*
7	Ge0043_007	MG3H001_169			1	susceptible
8	Ge0043_008	MG3H001_169			1	susceptible
9	Ge0043_009	MG3H001_150		1		resistance *ym5*
10	Ge0043_010	MG3H001_150		1		resistance *ym5*
11	Ge0043_011	MG3H001_150		1		resistance *ym5*
12	Ge0043_012	MG3H001_169			1	susceptible

(**Source**: Korzun, 2002)

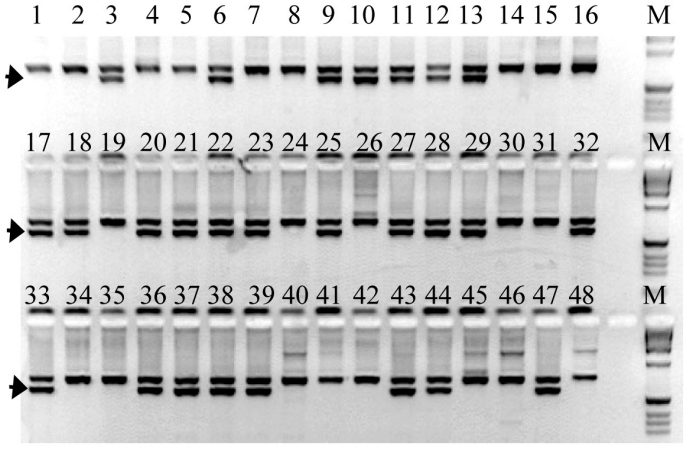

Figure 3 Application of DNA marker, SR4R04 for selecting fertile plants. M - 1 kb ladder, lanes 1-48 rye plants, fertile plants detected by two fragments.

(**Source**: Miedaner et al., 2000)

สำหรับลักษณะตัวผู้เป็นหมัน (male fertility restoration) มีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอไปใช้เพื่อคัดเลือกลักษณะดังกล่าวในการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อประโยชน์ในการสร้างสายพันธุ์ลูกผสมและจากกลไกของยีนในไซโทพลาสซึมที่ควบคุมการเป็นหมันของดอกตัวผู้ (cytoplasmic male sterility, CMS) เช่น Miedaner et al. (2000) ได้ระบุเครื่องหมายดีเอ็นเอ SR4R04 ที่ใช้คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะตัวผู้เป็นหมันในสายพันธุ์ข้าวไรย์ (**Figure 3**)

นอกจากนั้นได้มีการพัฒนาพันธุ์ข้าวไทยให้มีลักษณะที่ดี เช่น มีความต้านทานโรค แมลง สภาพน้ำท่วม การตอบสนองต่อความยาวของช่วงแสง รวมทั้งคุณภาพหุงต้ม ความหอมและคุณค่าทางโภชนาการสูง เป็นต้น การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการสืบหายีนช่วยให้การปรับปรุงพันธุ์ข้าวมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น พันธุ์ข้าวไทยที่นิยมปลูกอย่างแพร่หลาย เช่น ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ข้าวพันธุ์ กข 6 และข้าวเจ้าหอมสุพรรณบุรี ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่มีความสามารถปรับตัวได้ดีกับพื้นที่ปลูกข้าวทั่วประเทศ และด้วยเหตุที่ข้าวพันธุ์เหล่านี้ไม่ต้านทานโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง และไม่ทนสภาพจมน้ำท่วมฉับพลัน ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการสูญเสียผลผลิตอย่างมาก มีงานวิจัยเพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานโรค แมลง และทนสภาพน้ำท่วม โดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือก เช่น การสืบหายีนควบคุมความต้านทานโรคไหม้ (เชื้อสาเหตุ *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc.) โดยการวิเคราะห์ตำแหน่งของยีนควบคุมลักษณะปริมาณ พบว่า ตำแหน่งระหว่างเครื่องหมาย RM212 ถึง RM319 และ RM144 ถึง RM139 บนโครโมโซมที่ 1 และ 11 ตามลำดับ เป็นยีนหลัก (major gene) ที่ควบคุมความต้านทานโรคไหม้ในข้าวเจ้าหอมนิล และตำแหน่งใกล้เครื่องหมาย RM208 และ RM179 บนโครโมโซมที่ 2 และ 12 ตามลำดับ ในข้าวพันธุ์ IR64 (Sirithunya et al., 2004; Noenplab et al., 2006) นอกจากนั้นตำแหน่งระหว่างเครื่องหมาย RM179 ถึง RM309 บนโครโมโซมที่ 12 เป็นยีนรอง (minor gene) ที่ควบคุมความต้านทานโรคไหม้ที่พบทั้งในข้าวเจ้าหอมนิลและขาวดอกมะลิ 105 (Noenplab et al., 2006) และยังพบว่าเครื่องหมาย RM72 บนโครโมโซมที่ 8 เป็นยีนรองที่ควบคุมความต้านทานโรคไหม้ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 (Korinsak et al., 2009) (**Figure 4**) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้เป็นประโยชน์เพื่อช่วยคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคไหม้ในงานปรับปรุงพันธุ์ข้าว

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยการปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ได้ใช้ข้าวพันธุ์ต้านทาน คือ *Abhaya* ผสมกลับเข้าหาข้าวขาวดอกมะลิ 105 เพื่อรักษาพันธุกรรมของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ไว้ และเพิ่มเติมความต้านทานดังกล่าวเข้าไปอีกด้วย เพื่อความแม่นยำในการคัดเลือกลูกผสมกลับจึงได้ใช้เครื่องหมาย AFLP ร่วมกับวิธี bulked segragant analysis (Michelmore et. al., 1991) พบว่า เครื่องหมาย E4/M2-1 และ E1/M13-1 วางตัวใกล้ยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เพื่อช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (Jairin et al., 2005) (**Figure 5**)

สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ทนทานต่อน้ำท่วมขัง โดยใช้ข้าวพันธุ์ทนทาน ได้แก่ FR13A, IR67819F2-CA-61 และ IR49830-7-1-2-2 ผสมกลับข้าวขาวดอกมะลิ 105 พบว่า ยีนหลักในการตอบสนองต่อน้ำท่วมขังอยู่บนโครโมโซมที่ 9 ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวให้ทนทานต่อน้ำท่วมขังได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Siangliw et al., 2003) และได้มีการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความเกี่ยวข้องกับความหอมในข้าวหอมมะลิ 105 โดยวิธี bulked segregant analysis ค้นพบเครื่องหมายดีเอ็นเอ Jas 1.5 ที่จำเพาะต่อกลุ่มข้าวหอมอย่างชัดเจน ซึ่งสามารถใช้เพื่อช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอม (Singh et. al., 2000)

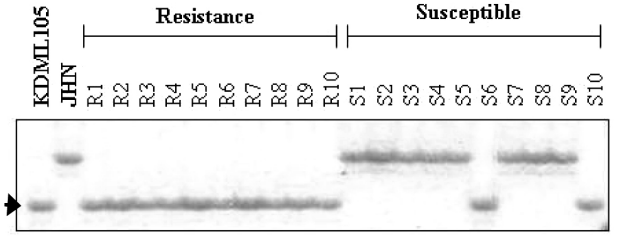

Figure 4 The microsatellite marker RM72, linked to blast resistance gene in KDML105. The marker was identified in resistant and susceptible individual plants of the RILs population. KDML 105 - Khao Dawk Mali 105, JHN - Jao Hom Nin, R1-R10 are blast resistant plants, and S1-S10 are blast susceptible plants.

(**Source**: Korinsak et al., 2009)

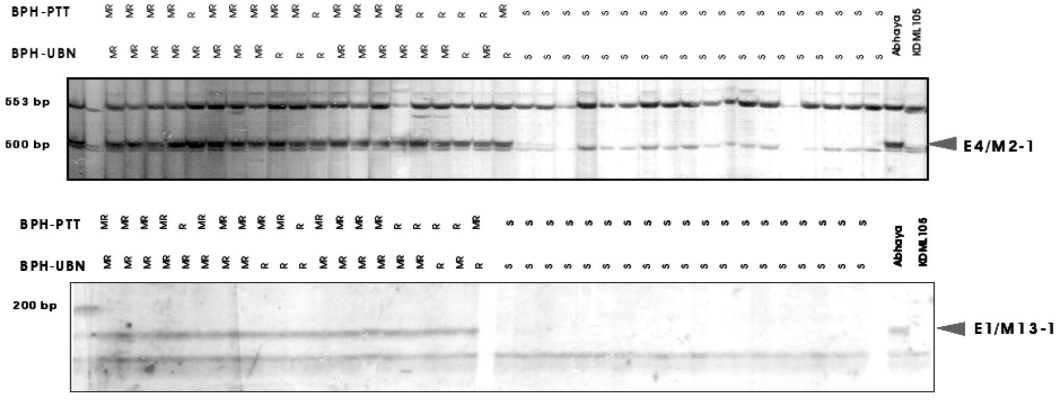

Figure 5 AFLP marker E4/M2-1 and E1/M13-1 linked to brown planthopper resistance. The markers were identified in individual lines of the cross between susceptible KDML105 and resistant *Abhaya*. The arrows indicate the polymorphic fragments, E4/M2-1 and E1/M13-1. The reaction of individual lines to BPH from Pathum Thani (BPH-PTT) and Ubon Ratchathani (BPH-UBN) were shown. R, MR, and S refer to resistance, moderate resistance, and susceptible, respectively.

(**Source**: Jairin et al., 2005)

พันธุ์ข้าวพื้นเมืองของไทยส่วนใหญ่เป็นข้าวไวแสง ซึ่งจะออกดอกในระยะเวลาที่ช่วงแสงสั้น ซึ่งเข้ากับระบบการปลูกข้าวนาปีโดยอาศัยน้ำฝนเป็นอย่างดี สำหรับในเขตชลประทานซึ่งมีน้ำเพียงพอต่อการปลูกข้าวตลอดปี การพัฒนาพันธุ์ข้าวที่ไม่ไวแสงจึงมีความสำคัญเนื่องจากสามารถให้ผลผลิตได้แม้ในระยะเวลาที่ช่วงแสงยาว การวิเคราะห์ตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะดังกล่าว พบว่า ตำแหน่งใกล้เครื่องหมาย A19 และ RG64 บนโครโมโซมที่ 5 และ 6 ตามลำดับ เป็นยีนควบคุมความไวต่อช่วงแสงของข้าว (Khush and Brar, 2000) จึงสามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนดังกล่าวช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่ไม่ไวต่อแสงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุป

ปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นเป็นจำนวนมากและได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในการศึกษาความหลายหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต การระบุสายพันธุ์หรือความบริสุทธิ์ของพันธุ์ และในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช นอกจากนั้นยังมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อติดตามยีนที่ควบคุมลักษณะที่ดีต่างๆ ซึ่งสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการได้อย่างแม่นยำ เป็นวิธีการที่สะดวกรวดเร็ว สามารถคัดเลือกได้ในทุกระยะการเติบโตของพืช และไม่มีผลกระทบจากสิ่งแวดล้อม เป็นต้น นอกจากนั้น เครื่องหมายดีเอ็นยังใช้เป็นข้อมูลสำหรับวิเคราะห์ตำแหน่งยีนและการสร้างแผนที่ยีน (gene mapping) ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญที่ช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์ทราบถึงจำนวน ตำแหน่ง และอิทธิพลของยีนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพื่อเป็นแนวทางในการผนวกรวมยีนเหล่านั้นมาสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ได้อย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตาม การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวก็ไม่สามารถเข้ามาแทนที่วิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional breeding) ได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอจึงเป็นเครื่องมือสำคัญที่สามารถใช้เพื่อช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์ได้ทราบถึงจำนวน ตำแหน่ง และอิทธิพลของยีนที่ควบคุมลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจต่างๆ สามารถใช้เป็นแนวทางในการผนวกรวมยีนดีเด่นเหล่านั้นมาสร้างพืชพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ต้องการได้อย่างรวดเร็ว อันเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในโครงการปรับปรุงพันธุ์และเป็นการพัฒนาพันธุ์เพื่อให้ได้สายพันธุ์ในอุดมคติต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2543. การพัฒนาการเกษตรไทยยุคเทคโนโลยีชีวภาพ. สำนักงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ. กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ.

เกษม สุนทราจารย์, สมทรง โชติชื่น, วาสนา พันธุ์เพ็ง และ วราพงษ์ ชมาฤกษ์. 2553. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวหอมมะลิบนฐานการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลและลักษณะทางสัณฐานวิทยา. น. 242-256. ใน: ประชุมวิชาการกลุ่มศูนย์วิจัยข้าวภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคตะวันตก 23-24 กุมภาพันธ์ 2553. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, กรุงเทพฯ.

จรัสศรี นวลศรี. 2548. เอกสารคำสอนการปรับปรุงพันธุ์พืชสวน. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

ฉวีวรรณ วุฒิญาโณ. 2543. เอกสารวิชาการ พันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทย. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

สรพงศ์ เบญจศรี. 2554. เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 39:350-363.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 5:37-59.

Bao, J, H. Corke, and M. Sun. 2006. Analysis of genetic diversity and relationships in waxy rice (*Oryza sativa* L.) using AFLP and ISSR markers. Genet. Resour. Crop Ev. 53:323-330.

Chakravarthi, B.K., and R. Naravaneni. 2006. SSR marker based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*Oryza sativa* L). Afr. J. Biotechnol. 5:684-688.

Gurta, P.K., R.K. Varshney, P.C. Sharma, and B. Ramesh. 1999. Molecular markers and their applications in wheat breeding. Plant Breed. 118:369-390.

Jairin, J., T. Toojinda, S. Tragoonrung, S. Tayapat, and A. Vanavichit. 2005. Multiple genes determining brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) resistance in backcross introgressed lines of Thai jasmine rice 'KDML105'. Sci. Asia. 31:129-135.

Kanawapee, N., J. Sanitchon, P. Srihaban, and P. Theerakulpisut. 2011. Genetic diversity analysis of rice cultivars (*Oryza sativa* L.) differing in salinity tolerance based on RAPD and SSR markers. Electron. J. Biotechnol. 14:1-17.

Khush, G.S., and D.S. Brar. 2000. Rice Genetics IV. p. 642. In: proceedings of the fourth international rice genetics symposium, 22-27 October 2000. Los Baños, Laguna, Philippines.

Korinsak, S., T. Toojinda, and C. Jantasuriyarat. 2009. Identification of a new blast resistance gene in Thai jasmine rice 'KDML105' by using microsatellite markers. pp. 11-16. In: proceedings of the 35th congress on science and technology of Thailand, Burapha University, 15-17 October 2009. Chonburi, Thailand.

Korzun, V. 2002. Use of molecular markers in cereal breeding. Cell. Mol. Biol. Lett. 7:811-820.

Martos V., C. Royo, Y. Rharrabti, and L.F. Garcia del Moral. 2005. Using AFLPs to determine phylogenetic relationships and genetic erosion in durum wheat cultivars released in Italy and Spain throughout the 20th century. Field Crops Res. 91:107-116.

Michelmore, R.W., I. Paran, and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:9828-9832.

Miedaner, T., C. Glass, F. Dreyer, P. Wilde, H. Wortmann, and H.H. Geiger. 2000. Mapping of genes for male-fertility restoration in 'Pampa' CMS winter rye (*Secale cereale* L.). Theor. Appl. Genet. 101:1226-1233.

Mondini, L., A. Noorani, and M.A. Pagnotta. 2009. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. Diversity. 1:19-35.

Noenplab, A., A. Vanavichit, T. Toojinda, P. Sirithunya, S. Tragoonrung, S. Sriprakhon, and C. Vongsaprom. 2006. QTL mapping for leaf and neck blast resistance in Khao Dawk Mali 105 and Jao Hom Nin recombinant inbred lines. Sci. Asia. 32:133-142.

Paterson, A.H., S.D. Tankslay, and M.E. Sorrells. 1991. DNA markers in plant improvement. Adv. Agron. 46:39-90.

Prashanth, S.R., M. Parani, B.P. Mohanty, V. Talame, R. Tuberosa, and A. Parida. 2002. Genetic diversity in cultivars and landraces of *Oryza sativa* subsp. *indica* as revealed by AFLP markers. Genome. 45:451-459.

Rahman, M.M, M.G. Rasaul, M.A. Hossain, K.M. Iftekharuddaula, and H. Hasegawa. 2012. Molecular characterization and genetic diversity analysis of rice (*Oryza sativa* L.) using SSR markers. Journal of Crop Improvement. 26:244-257.

Rajkumar, G., W. Jagathpriya, F. Kumudu, A. Liyanage, and R. Silva. 2011. Genetic differentiation among Sri Lankan traditional rice (*Oryza sativa* L.) varieties and wild rice species by AFLP markers. Nord. J. Bot. 29:238-243.

Saengprajak, J. 2012. Development of a sequence characterized amplified region (SCAR) marker for identification of Thai jasmine rice (*Oryza sativa* L.) variety 'KDML105'. Afr. J. Biotechnol. 11:12262-12268.

Salem, K.F.M., A.M. El-Zanaty, and R.M. Esmail. 2008. Assessing wheat (*Triticum aestivum* L.) genetic diversity using morphological characters and microsatallite markers. J. Agric. Sci. 4:538-544.

Seetharam, K., S. Thirumeni, and K. Paramasivam. 2009. Estimation of genetic diversity in rice (*Oryza sativa L.*) genotypes using SSR markers and morphological characters. Afr. J. Biotechnol. 8:2050-2059.

Siangliw, M., T. Toojinda, S. S. Tragoonrung, and A. Vanavichit. 2003. Thai jasmine rice carrying QTLch9 (*Sub*QTL) is submergence tolerant. Ann. Bot. 91:255-261.

Singh, R.K., U.S. Singh, and G.S. Khush. 2000. Aromatic Rices. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., Janpath, New Delhi, India.

Sirithunya, P., S. Sriprakhon, C. Vongsaprom, T. Sreewongchai, A. Vanavichit, and T. Toojinda. 2004. Discovery of broad spectrum blast resistance in rice, pp. 71-80. In: proceedings of the 1st international conference on rice for the future. 31 August - 3 September 2004, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

Upadhyay, P., V.K. Singh, and C.N. Neeraja. 2011. Identification of genotype specific alleles and molecular diversity assessment of popular rice *(Oryza sativa* L.) varieties of India. Int. J. Plant Breed. Genet. 5:130-140.