

การผนวกยีนทนน้ำท่วมฉับพลัน (*Sub1*) ยีนต้านทานโรคไหม้ (*qB11*, *qB111*) และโรคขอบใบแห้ง (*xa5*, *Xa21*) ในพันธุ์ กข6 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก

Pyramiding submergence tolerance (*Sub1*) and blast (*qB11*, *qB111*) and bacterial blight (*xa5*, *Xa21*) resistance into rice cultivar RD6 by marker assisted selection

ธัญพร อุปธิ¹, บุปผา คงสมัย² และ ธีรยุทธ ฐัจฉินดา³

Thunyaporn Upathi¹, Buppha Kongsamai² and Theerayut Toojinda³

บทคัดย่อ: ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 นิยมปลูกมากในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากเป็นข้าวเหนียวที่มีคุณภาพสูงดีและมีกลิ่นหอม อย่างไรก็ตามข้าวพันธุ์นี้ไม่ทนต่อสภาพน้ำท่วมฉับพลัน และยังอ่อนแอต่อโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* (Cooke) Sacc. หรือ *Magnaporthe oryzae* (Hebert) Barr. และโรคขอบใบแห้งที่เกิดจากแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่กระทบต่อผลผลิตข้าวเหนียว กข6 อย่างมาก ดังนั้น เพื่อรักษาเสถียรภาพผลผลิต การใช้พันธุ์ต้านทานต่อลักษณะเหล่านี้จึงเป็นวิธีหนึ่งในแก้ไขปัญหาที่ประหยัดและไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการผนวกยีนทนน้ำท่วมฉับพลัน (*Sub1*) ยีนต้านทานโรคไหม้ (*qB11*, *qB111*) และโรคขอบใบแห้ง (*xa5*, *Xa21*) โดยยังคงคุณภาพการหุงต้มและความหอมของ กข6 ไว้ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (MAS) การดำเนินงานนั้นได้ผสมข้ามระหว่างต้นพ่อ คือ สายพันธุ์ปรับปรุง กข6 ที่มียีน *Sub1*, *qB11*, *qB111* และ *badh2* (RGD07491-MAS-72-MAS-1-3-MAS-2-5) กับต้นแม่ คือ สายพันธุ์ปรับปรุง กข6 ที่มียีน *xa5*, *Xa21*, *qB11* และ *qB111* (RGD07585-5-B-MAS-12-1-MAS-14) คัดเลือกได้ F₁ จำนวน 25 ต้น และทำการผสมกลับ 1 ครั้ง ได้ BC₁F₁ จำนวน 130 ต้น จากนั้นใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSRs จำนวน 4 เครื่องหมาย ได้แก่ R10783indel, PAXa5, PB7-8 และ Aromarker เพื่อคัดเลือกยีน *Sub1*, *xa5*, *Xa21* และ *badh2* ตามลำดับ สามารถคัดเลือกต้น BC₁F₁ ที่มียีน *Sub1*, *xa5*, *Xa21* และ *badh2* ได้จำนวน 23 ต้น และปล่อยผสมตัวเองเพื่อสร้างประชากร BC₁F₂ ขณะนี้อยู่ในระหว่างการปลูกคัดเลือกลักษณะทางการเกษตรให้ดีกว่าพันธุ์ กข6 ตั้งเดิมจากนั้นจะนำไปทดสอบความทนทานน้ำท่วมฉับพลันในบ่อทดสอบ ความต้านทานโรคในโรงเรือน และคุณภาพการหุงต้มต่อไป

คำสำคัญ: กข6, การผนวกยีน, เครื่องหมายโมเลกุล

¹ สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
Plant Breeding Program, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus. Nakhon Pathom, 73140, Thailand.

² ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus. Nakhon Pathom, 73140, Thailand.

³ หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
Rice gene discovery unit, BIOTEC, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Patom, 73140, Thailand

* Corresponding author: toojindatheerayut@gmail.com

ABSTRACT: A glutinous rice cultivar RD6 is popularly grown by farmers in the North and Northeast of Thailand, because of its premium cooking and eating quality and aroma. However, RD6 is susceptible to many diseases and intolerant to submergence. Blast (BL) disease caused by the fungus *Pyricularia oryzae* (Cooke) Sacc. or *Magnaporthe oryzae* (Hebert) Barr. and bacterial blight (BB) disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) are two major diseases threatening the productivity of RD6. In order to maintain its yield stability, it is necessary to incorporate resistant genes or QTL for these traits into RD6. The objective of this study was to pyramid genes conferring submergence tolerance, BL and BB resistance into a glutinous rice cultivar RD6 by marker assisted selection (MAS). RGD07491-MAS-72-MAS-1-3-MAS-2-5, backcross introgression line (BIL) that resembles submergence tolerance (*Sub1*) and blast resistance (*qB11*, *qB111*) was cross-pollinated with RGD07585-5-B-MAS-12-1-MAS-14, another RD6-BIL that resembles blast BL (*qB11*, *qB111*) and BLB (*xa5*, *Xa21*) resistance to generate 25 F₁ plants. One round of backcrossing was conducted using RGD07585-5-B-MAS-12-1-MAS-14 as recipient. Four markers including R10783indel, PAXa5, PB7-8 and Aromarker for *Sub1*, *xa5*, *Xa21* and *badh2* respectively were used for MAS. Twenty three BC₁F₁ plants carrying for *Sub1*, *xa5*, *Xa21* and *badh2* were identified. The identified BC₁F₁ plants were allowed to self-fertilize to produce BC₁F₂. Currently BC₁F₂ population was planted in the field for plant type selection. Pyramiding lines obtained from this project will be evaluated for submergence tolerance, BL and BB resistance and the quality of the cooking.

Keywords: RD6, gene pyramiding, marker-assisted selection

บทนำ

ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 นิยมปลูกมากที่สุดอันดับหนึ่งในพื้นที่นาข้าวของภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คิดเป็น 83% ของพื้นที่ปลูกข้าวเหนียวทั้งหมด (วราภรณ์, 2555) การที่เกษตรกรนิยมปลูกข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 เนื่องจากความนิยมในการบริโภคภายในครัวเรือนเอง และเป็นพันธุ์ที่มีคุณภาพการหุงต้มดี มีกลิ่นหอม รสชาติ เป็นที่นิยมของตลาด อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดที่สำคัญของการผลิตข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ในพื้นที่น่าน้ำฝนคือ ปัญหาอุทกภัยและปัญหาการระบาดของโรคต่างๆ ซึ่งข้าวเหนียวพันธุ์นี้ไม่ทนต่อสภาพน้ำท่วมฉับพลัน อีกทั้งยังอ่อนแอต่อโรค โดยเฉพาะโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง (สำนักงานวิจัยและพัฒนาข้าว, 2557)

โดยปกติแล้วข้าวเป็นพืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินที่มีน้ำขัง แต่ส่วนใหญ่แล้วไม่สามารถมีชีวิตรอดได้หากถูกน้ำท่วมมิดยอดเกินกว่า 7 วัน (Palada and Vergara, 1972) โดยพื้นที่ปลูกข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นพื้นที่ลุ่มที่มีความเสี่ยงต่อสภาวะน้ำท่วมฉับพลันจากรายงานปี 2556 พบว่าในพื้นที่ปลูกข้าวเสียหายจากน้ำท่วมฉับพลันประมาณ 3.7 ล้านไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2557) สร้างความเสียหายให้กับ

ผลผลิตข้าวและเกิดภาวะหนี้สินให้แก่เกษตรกร การระบาดของโรคก็เป็นปัญหาหนึ่งที่ทำให้ผลผลิต น้ำหนัก และคุณภาพของเมล็ดลดลงอย่างมาก ซึ่งจะลดลงตามระดับความรุนแรงของโรค (กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, 2543) และทำให้มีเปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบเพิ่มขึ้น (Mew, 1989) โดยเฉพาะโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* (Cooke) Sacc. หรือ *Magnaporthe oryzae* (Hebert) Barr. และโรคขอบใบแห้งที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) (Asuyama, 1965) ซึ่งการป้องกันแก้ไขปัญหานี้มีหลายวิธี นอกจากการเลือกพื้นที่ปลูกให้เหมาะสม การเขตกรรม การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคแล้ว อีกวิธีที่ได้ผลดีและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมคือ การใช้พันธุ์ข้าวต้านทาน

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความทนทานน้ำท่วมฉับพลันและต้านทาน ต่อโรคไหม้และขอบใบแห้งเป็นวิธีการหนึ่งในการแก้ไขปัญหามีความยั่งยืนและเป็นวิธีที่ประหยัดเนื่องจากช่วยลดการใช้ต้นทุนการผลิตการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยการผนวกยีนต้านทานเข้าด้วยกันเป็นวิธีการหนึ่งในการควบคุมการระบาดของโรคที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ส่วนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวแบบผสมกลับ (backcrossing) เป็นวิธีการที่ใช้เพิ่มยีนต้านทานที่ต้องการในพันธุ์ที่มีลักษณะอื่นๆ ดิอยู่แล้ว โดยนำรุ่นลูกที่มียีนต้านทานผสมกลับไปยังพันธุ์แม่

หลายๆ ครั้ง เพื่อให้ได้ต้นข้าวที่มีลักษณะทุกอย่างเหมือนพันธุ์แม่แต่ยีนต้านทานที่ต้องการเพิ่มขึ้น (Russell, 1978) ซึ่งหากใช้ควบคู่กับวิธีการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีมาตรฐาน ต้องใช้ระยะเวลาการคัดเลือกนาน โดยเฉพาะลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนด้อย ดังนั้นการคัดเลือกทางอ้อมโดยนำเอาเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection: MAS) จะสามารถแก้ปัญหาอุปสรรคต่างๆ ของการคัดเลือกแบบมาตรฐาน โดยลดระยะเวลาในการคัดเลือก มีความแม่นยำ รวดเร็ว ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกอีกด้วย

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ทนต่อน้ำท่วมฉับพลันนั้น ใช้แหล่งพันธุกรรมของยีนทนน้ำท่วมจากสายพันธุ์ FR13A ซึ่งเป็นข้าวพื้นเมืองไวแสงของประเทศอินเดียที่สามารถทนน้ำท่วมขังได้นาน 2-3 อาทิตย์ ได้มีการศึกษาเพื่อหา ยีนที่ควบคุมพบว่า ยีนควบคุมเป็นยีนเด่น (dominant genes) ชื่อ *Sub1* อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 9 มีพันธุ์ข้าวที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ให้ทนน้ำท่วมฉับพลันที่ประสบความสำเร็จจำนวนหลายสายพันธุ์ เช่น พันธุ์ Swarna, Samba Mahsuri และ TDK1 เป็นต้น (Nandi et al., 1997; Xu et al., 2000; Toojinda et al., 2003) ในส่วนของยีนต้านทานต่อโรคไหม้ Wongsaprom et al. (2010) ได้รายงานว่ายีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิลมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 1 และ 11 เมื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข6 ให้ต้านทานโรคไหม้ พบว่าสายพันธุ์ กข 6 ที่มี *qBL1* และ *qBL11* จากข้าวเจ้าหอมนิล มีความต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ในประเทศไทยอย่างกว้างขวาง และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *xa5*, *Xa21* เป็นยีนที่ให้ความต้านทานในเชื้อก่อโรคขอบใบแห้งในประเทศไทย โดยยีน *xa5* มีลักษณะความต้านทานแบบยีนด้อย (recessive genes) ตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 5 โดยภมร (2548) รายงานว่าข้าวสายพันธุ์ IR62266 ซึ่งมียีน *xa5* แสดงความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Xoo* จากภาคกลางของประเทศไทยโดยมีความยาวของบาดแผลน้อยกว่าข้าวสายพันธุ์อื่นๆ ส่วนยีน *Xa21* ยีนควบคุมเป็นยีนเด่น อยู่บนโครโมโซมที่ 11 มีความต้านทาน

ลักษณะวงกว้าง ยีน *Xa21* ถูกค้นพบครั้งแรกในสายพันธุ์ข้าวป่า species *Oryza longistaminata* (Khush et al., 1989) ข้อจำกัดของยีน *Xa21* คือลักษณะของความต้านทานส่วนใหญ่จะต้านทานต่อเชื้อ *Xoo* ในแถบทางทิศใต้และทิศตะวันออกเฉียงใต้ของเอเชีย (Ronald 1997) กลุ่มข้าวที่ยีน *Xa21* เหมือนกันคือข้าว IRBB21 และ IR1188 (Jataboon et al., 2004)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการผนวกรวมยีนทนน้ำท่วมฉับพลัน ยีนต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้งในฐานพันธุกรรมของ กข6 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (MAS)

วิธีการศึกษา

การสร้างประชากร

ทำการผสมข้ามระหว่างข้าวเหนียว กข6 สายพันธุ์ปรับปรุง RGD07491-MAS-72-MAS-1-3-MAS-2-5 (RGD07491) ที่มียีนทนทานน้ำท่วมฉับพลัน (*Sub1*) และยีนต้านทานโรคไหม้ (*qBL1*, *qBL11*) และความหอม (*badh2*) โดยใช้เป็นพันธุ์ให้ (donor parent) กับข้าวเหนียว กข6 สายพันธุ์ปรับปรุง RGD07585-5-B-MAS-12-1-MAS-14 (RGD07585) ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ (*qBL1*, *qBL11*) และโรคขอบใบแห้ง (*xa5*, *Xa21*) โดยทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ได้รับการพัฒนาสายพันธุ์โดยหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน เมื่อได้รุ่น F_1 ทำการเช็คการผสมข้ามโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล PB7-8 ช่วยในการคัดเลือกสำหรับยีน *Xa21* จากนั้นทำการผสมกลับ (backcross) เข้าหาสายพันธุ์รับ 1 ครั้ง เพื่อให้ได้ประชากรผสมกลับครั้งที่ 1 ช่วงที่ 1 (BC_1F_1)

การสกัดดีเอ็นเอและการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

การสกัดดีเอ็นเอใช้ตัวอย่างใบข้าวอายุ 15 วัน สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป DNA Trap Kit จากห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี (<http://dnatec.kps.ku.ac.th>) เมื่อได้ดีเอ็นเอแล้วทำการเพิ่มปริมาณ

ดีเอ็นเอโดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาถูกใช้จำลองตัวเอง (PCR reaction) เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะกับยีน (Table 1) สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล R10783indel, PB7-8 และ Aromarker การทำ PCR ประกอบด้วย DNA template 2 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer 1 ไมโครลิตร, 2.5 mM $MgCl_2$ 0.6 ไมโครลิตร, 10 mM dNTPs 0.2 ไมโครลิตร, 5 μM of each primers 0.8 ไมโครลิตร, 5U Taq DNA polymerase 0.02 ไมโครลิตร และเติม deionized water จนได้ปริมาตรสุดท้าย 10 μl จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง

GeneAmp® PCR System 9700 โดยใช้ PCR profile ดังนี้ อุณหภูมิ Pre-denaturation $94^\circ C$ นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ denature $94^\circ C$ นาน 30 วินาที อุณหภูมิ annealing $55^\circ C$ นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ extension $72^\circ C$ นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ long extension ที่ $72^\circ C$ นาน 5 นาที ส่วนเครื่องหมายโมเลกุล PAXa5 ใช้ส่วนผสมตามรายงานของ Korinsak et al. (2014) แล้วนำ PCR products มาทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันออกจากกันด้วยสนามไฟฟ้าโดยใช้เจล (Gel Electrophoresis)

Table 1 DNA markers used for selection of certain genotype in breeding scheme .

No.	Markers	Traits	Chromosome	Type of marker	Reference
1	R10783Indel	Submergence (<i>Sub1</i>)	9	Gene specific marker	Toojinda et al., 2003
2	PAXa5	Bacterial blight (<i>xa5</i>)	5	Gene specific marker	Korinsak et al., 2014
3	PB7-8	Bacterial blight (<i>Xa21</i>)	11	Gene specific marker	Mohler and Singrun, 2004
4	Aromarker	Aroma (<i>badh2</i>)	8	Gene specific marker	Vanavichit et al. (2008)

ผลการศึกษา

การสร้างประชากร

ทำการสร้างประชากรชั่วที่ 1 (F_1) โดยใช้สายพันธุ์แม่คือ RGD07585 ที่มียีน *xa5*, *Xa2*, *qBL1* และ *qBL11* ผสมกับสายพันธุ์พ่อคือ RGD07491 ที่มียีน *Sub1*, *qBL1* และ *qBL11* ได้ F_1 จำนวน 34 ต้น เมื่อทำการเช็คการผสมข้ามโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล PB7-8 ซึ่งใกล้ชิดกับยีน *Xa21* พบว่า มีต้นที่ผสมข้ามจริงจำนวน 25 ต้น และจำนวนต้นที่ผสมตัวเองจำนวน 9 ต้น แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่ใกล้ชิดกับยีนเป้าหมายสามารถนำมาใช้ตรวจสอบความถูกต้องในการผสมข้ามได้ จากนั้นนำต้น F_1 ที่ได้มาสร้างประชากรผสมกลับครั้งที่ 1ชั่วที่ 1 (BC_1F_1) โดยคัดเลือก

ต้น F_1 จำนวน 5 ต้น ผสมกลับเข้าหาสายพันธุ์รับ (re-current parent) RGD07585 เพื่อให้ได้ทรงต้นที่ดี ทรงกอไม่เบะ ลำต้นเตี้ยกว่าเดิม ได้จำนวนประชากร BC_1F_1 จำนวน 130 ต้น

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก

จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลคัดเลือกต้นที่มีตำแหน่งยีนที่ต้องการครบทุกตำแหน่งคือ *Sub1*, *xa5*, *Xa21*, *qBL1*, *qBL1* และ *badh2* ได้ทั้งหมดจำนวน 23 ต้น คิดเป็น 29.9 % จากทั้งหมด 130 ต้น พบการกระจายตัวของยีนในรูปแบบต่างๆ ดังนี้

จากประชากร BC_1F_1 จำนวน 130 ต้น นำมาจีโนไทป์เพื่อคัดเลือกยีนเป้าหมาย *xa5*, *Xa21*, *Sub1* และ *badh2* ส่วนตำแหน่งยีน *qBL1* และ *qBL11* ไม่

ต้องทำการคัดเลือกเนื่องจากมียีนนี้ในฐานพันธุกรรมของทั้งสายพันธุ์พ่อและแม่ จึงไม่มีการกระจายตัว การคัดเลือกต้นที่มียีน *xa5* ใช้เครื่องหมายโมเลกุล PAXa5 หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ และตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2 % พบต้นที่มีจีโนไทป์ที่เป็น homozygous จำนวน 15 ต้น และ heterozygous จำนวน 8 ต้น การคัดเลือกต้นที่มียีน *Xa21* ใช้เครื่องหมายโมเลกุล PB7-8 แยกชิ้นดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 % พบต้นที่มีจีโนไทป์ที่เป็น homozygous จำนวน 14 ต้น และ heterozygous จำนวน 9 ต้น การคัดเลือกต้นที่มียีน *Sub1* ใช้เครื่องหมายโมเลกุล R10783Indel ทำการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอในอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 4.5 % พบต้นที่มีจีโนไทป์ที่เป็น heterozygous จำนวน 23 ต้น โดยไม่พบต้นที่เป็น homozygous เนื่องจากในการสร้างประชากร BC₁F₁ สายพันธุ์แม่ที่ใช้ไม่มียีน *Sub1* จึงทำให้ลูกที่คัดเลือกมียีนที่เป็น heterozygous ทั้งหมด การคัดเลือกต้นที่มียีน *badh2* ใช้เครื่องหมายโมเลกุล Aromarker ทำการตรวจสอบ ชิ้นดีเอ็นเอในอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 4.5 % พบต้นที่มีจีโนไทป์ที่เป็น heterozygous จำนวน 23 ต้น โดยไม่พบต้นที่เป็น homozygous เนื่องจากในการสร้างประชากร BC₁F₁ สายพันธุ์แม่ที่ใช้ไม่มียีน *badh2* จึงทำให้ลูกที่คัดเลือกมียีนที่เป็น heterozygous ทั้งหมด เช่นเดียวกับยีน *Sub1*

จากนั้นนำต้นที่ผ่านการคัดเลือกนี้จำนวน 23 ต้น ผสมตัวเองเพื่อสร้างประชากร BC₁F₂ ไปปลูกคัดเลือกลักษณะทางการเกษตรที่ดี จำนวนสายพันธุ์ละ 200 ต้น เมื่อคัดเลือกลักษณะทางการเกษตรแล้วต้นที่ได้รับการคัดเลือกจะนำไปคัดเลือกยีนเป้าหมายโดยเครื่องหมายโมเลกุลอีกที เพื่อเข้าสู่การประเมินลักษณะความทนน้ำท่วมฉับพลัน ความต้านทานโรคไหม้โรคขอบใบแห้ง จะเห็นได้ว่าการผนวกยีนโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกเหมาะสำหรับการคัดเลือกลักษณะต่างๆ ทั้งที่เป็นลักษณะเด่นและลักษณะด้อย โดยเฉพาะลักษณะที่ยุ่งยากในการประเมินในแปลง และ

ลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนด้อย เช่น ยีน *xa5* และยีน *badh2* สามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุลคัดเลือกได้โดยไม่ต้องคัดเลือกจากลักษณะปรากฏ (Phenotype) เพราะสามารถคัดเลือกได้จากความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรม (Genotype) ซึ่งอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมไม่มีผลต่อการคัดเลือก คัดเลือกได้ตั้งแต่ต้นพีชมีอายุน้อย (สุริพร, 2556) สามารถย่นระยะเวลาและคัดเลือกยีนให้อยู่ในสภาพคงตัวได้ตั้งแต่ช่วงต้นๆ ของการปรับปรุงพันธุ์

สรุป

จากการคัดเลือกจีโนไทป์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล สามารถคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า โดยสามารถคัดเลือกต้นที่มียีนเป้าหมาย *Sub1*, *xa5*, *Xa21*, *qBL1*, *qBL1* และ *badh2* ครบทุกตำแหน่งยีน จำนวน 23 ต้น จากประชากร BC₁F₁ จำนวน 130 ต้น มีรูปแบบของยีน *xa5* ที่เป็น homozygous จำนวน 15 ต้น และ heterozygous จำนวน 8 ต้น รูปแบบของยีน *Xa21* ที่เป็น homozygous จำนวน 14 ต้น และ heterozygous จำนวน 9 ต้น รูปแบบของยีน *Sub1* ที่เป็น heterozygous จำนวน 23 ต้น และรูปแบบของยีน *badh2* ที่เป็น heterozygous จำนวน 23 ต้น ปล่อยผสมตัวเองเพื่อให้ได้ประชากร BC₁F₂ จำนวน 23 ต้น นำต้นที่ผ่านการคัดเลือกนี้ไปปลูกคัดเลือก ลักษณะทางการเกษตรที่ดี มีคุณภาพเมล็ดเหมือนพันธุ์ กข6 แล้วนำต้นที่ได้รับการคัดเลือกมาคัดต้นที่มียีนเป้าหมายโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลคัดเลือก แล้วนำไปประเมินลักษณะความทนน้ำท่วมฉับพลัน ความต้านทานโรคไหม้ โรคขอบใบแห้งต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กรมการข้าว. 2557. องค์ความรู้เรื่องข้าว: พันธุ์ข้าว กข6. <http://www.brrd.in.th/rkb/varieties>. ค้นเมื่อ 3 ธันวาคม 2557.
กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. 2543. คู่มือโรคข้าวและการป้องกันกำจัด. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

- ภรณ์ ปัตตาวะตัง. 2548. การศึกษาดำแหน่งของยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งในข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วราภรณ์ แสงทอง. 2555. ผลงานเด่น สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ: การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียว กข6 สำหรับนาปรัง. <http://www.most.go.th>. ค้นเมื่อ 3 ธันวาคม 2557.
- ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี. 2557. ชุุดสำเร็จในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ. http://dnatec.kps.ku.ac.th/index.php?option=com_content&view=article&id=38&Itemid=115. ค้นเมื่อ 3 ธันวาคม 2557.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2557. เอกสารเผยแพร่: รายงานสถานการณ์และการให้ความช่วยเหลือเกษตรกรผู้ประสบภัยธรรมชาติ ปี 2556. <http://www.oae.go.th>. ค้นเมื่อ 16 ตุลาคม 2557.
- สุริพร เกตุงาม. 2556. การปรับปรุงพันธุ์พืชระดับโมเลกุล. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, อุบลราชธานี
- Asuyama, H. 1965. Morphology taxonomy host range and life cycle of *Pyricularia oryzae*. pp. 9-22. In *The Rice Blast Disease Proceedings of a Symposium at IRRI*. John Hopkins Press, Baltimore, Maryland, USA.
- Jataboon, J., M. Siangliw, C. Wongsaprom, T. Toojinda and A. Vanavichit. 2004. Discovery of New Bacterial Blight Resistance Genes in Backcross Introgressed Lines of KDML105. In *The 1st International Conference on Rice for the future*, 31 August – 3 September, 2004, Kasetsart University. Bangkok.
- Khush, G.S., D.J. MacKill and G.S. Sidhu. 1989. Breeding rice for resistance to bacterial blight. In *Bacterial blight of rice*, Proc. Int. Workshop Bacterial Blight Rice. IRRI. Manila, The Philippines.
- Korinsak, S., Sirithunya K., and Toojinda, T. 2014. Identifying a source of a bacterial blight resistance gene *xa5* in rice variety IR62266 and development of a functional marker 'PAxa5', the easy agarose based detection. *Thai J. Genet.* Vol 7, No 3.
- Mew, T.W. 1989. An overview of the world bacterial blight situation, pp. 7 - 12. In *Proceedings of the International Workshop on Bacterial Blight of Rice* March 14 - 18, 1988. The International Rice Research Institute. Manila, Philippines
- Mohler, V. and C.Singrun. 2004. General considerations: Marker-assisted selection. P.305-313. In H. Lorz and G. Wenzel. *Biotechnology in Agricultural and Forestry*, Vol. 55 Molecular markers Systems in Plant Breeding and Crop Improvement. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Nandi, S., P.K. Subudhi, D. Senadhira, N.L. Manigbas, S. Sen-Mandi and N. Huang. 1997. Mapping QTLs for submergence tolerance in rice by AFLP analysis and selective genotyping. *Mol. Gen. Genet.* 255: 1-8.
- Palada, MC. and Vergara, BS. 1972. Environmental effects on the resistance of rice seedlings to complete submergence. *Crop Sci.* 12:209-212.
- Ronald, P.C. 1997. Molecular basis of disease resistance. *Plant Mol. Biol.* 35: 179 -186.
- Russell, G.E. 1978. *Plant Breeding for Pest and Disease Resistance*. Butterworth, New York.
- Toojinda, T., M. Siangliw, S. Tragoonrun and A. Vanavichit. 2003. Molecular genetics of submergence tolerance in rice : QTL analysis of key traits. *Ann.Bot. (Lond)* 91 : 243-253.
- Vanavichit, A., Tragoonrun, S., Toojinda, T., Wanchana, S. and Kamolsukyunyong, W. 2008. Transgenic rice plants with reduced expression of Os2AP and elevated levels of 2-acetyl-1-pyrroline. United States Patent. Patent No. 7,319,181
- Wongsaprom, C. and et al. 2010. Two introgressed quantitative trait loci confer a broad spectrum resistance to blast disease in the genetic background of the cultivar RD6 a Thai glutinous jasmine rice. *Field Crops Research.* 119: 245-251.
- Xu, K., X. Xu, P.C. Ronald and D.J. MacKill. 2000. A high-resolution linkage map of the vicinity of the rice submergence tolerance locus Sub1. *Mol. Gen. Genet.* 263: 681-689.