รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวดอกพยอมและกู้เมืองหลวงไม่ให้ไวแสงด้วยวิธีผสมกลับและคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ (ระยะที่ 1)

Breeding of Rice cv. Dawk Pa-yawm and Goo Meuang Luang for Non-photoperiod Sensitivity and using SSR Marker-assisted Backcrossing (phase I)

คณะนักวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.วัชรินทร์ ซุ้นสุวรรณ

รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี

นางสาวกันรบ เพ็งแก้ว

นายศักดา โชโต

นายณัฐพล จันทร์สว่าง

นายประมวล หน่อสกูล

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก งบประมาณแผ่นดิน

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2556-2557

รหัสโครงการ NRT550033S

ภาควิชาพืชศาสตร์ และศูนย์วิจัยระบบเกษตรทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม

คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

จังหวัดสงขลา

ชื่อโครงการเดี่ยว การปรับปรุงพันธุ์ข้าวดอกพยอมและกู้เมืองหลวงไม่ให้ไวแสงด้วยวิธีผสมกลับและคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ (ระยะที่ 1)

Breeding of Rice cv. Dawk Pa-yawm and Goo Meuang Luang for Non-photoperiod Sensitivity and using SSR Marker-assisted Backcrossing (phase I)

คณะนักวิจัยและหน่วยงานต้นสังกัด

ชื่อผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.วัชรินทร์ ซุ้นสุวรรณ[1] รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี[1] นางสาวกันรบ เพ็งแก้ว[1] นายศักดา โชโต[2] นายณัฐพล จันทร์สว่าง[2] และนายประมวล หน่อสกูล[2]

หน่วยงานที่สังกัด ทบวงมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ คณะทรัพยากรธรรมชาติ [1]ภาควิชาพืชศาสตร์ และ[2]ศูนย์วิจัยระบบเกษตรทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม หมายเลขโทรศัพท์ (074) 286139 หรือ (074) 212846 โทรสาร (074) 212823 e-mail watcharin.s@psu.ac.th

สารบัญ

	หน้า
ชื่อโครงการเดี่ยว	1
คณะนักวิจัยและหน่วยงานต้นสังกัด	1
สารบัญ	2
รายการตาราง	3
รายการภาพ	3
กิตติกรรมประกาศ	4
บทคัดย่อ	5
Abstract	6
บทนำ	7
วัตถุประสงค์	7
การตรวจเอกสาร	7
วิธีการทดลอง	8
ผลการทดลองและวิจารณ์	10
สรุปผลการทดลอง	12
เอกสารอ้างอิง	12
ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป	13

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่ไม่ไวแสง	9

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แปลงพ่อแม่พันธุ์ของแต่ละแถว ได้แก่ พันธุ์กู้เมืองหลวง (A) ดอกพยอม (B) และ Taichung 65 (C)	10
2	ต้นพ่อแม่พันธุ์ ได้แก่ ดอกพยอม อายุ 110 วัน (A) พันธุ์กู้เมืองหลวง อายุ 120 วัน (B) และ Taichung 65 อายุ 60 วัน (C) ที่ปลูกในสภาพโรงเรือน	10
3	การผสมพันธุ์เพื่อย้ายยีนที่ไม่ไวแสง (hd1hd1) จากพันธุ์Taichung 65 ไปสู่พันธุ์ดอกพยอมและกู้เมืองหลวงที่ไวแสง หรือการผสมกลับเพื่อย้ายยีนอื่น ๆของพันธุ์รับไปยังต้นลูกผสมกลับ	11
4	ต้นลูกผสมกลับ ได้แก่ ลูกผสมกลับดอกพยอม อายุ 70 วัน (A) และกู้เมืองหลวง อายุ 90 วัน (B) ที่ปลูกในสภาพโรงเรือน	11
5	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ Taichung 65 (T) กู้เมืองหลวง (K) ดอกพยอม (D) และลูกผสมระหว่างพันธุ์กู้เมืองหลวง x Taichung 65 (K x T) และดอกพยอม x Taichung 65 (D x T)	12

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาพืชศาสตร์ และศูนย์วิจัยระบบเกษตรทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่สนับสนุนการวิจัย และโครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2556-2557

ท้ายนี้ ข้าพเจ้าหวังว่ารายงานฉบับนี้ จะเป็นประโยชน์กับนักวิชาการ และผู้สนใจทั่วไป

วัชรินทร์ ชุ้นสุวรรณ
หัวหน้าโครงการ
มีนาคม 2559

บทคัดย่อ

การเกิดสภาวะโลกร้อนทำให้สภาพภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง เช่น การกระจายตัวของฝนไม่เป็นไปตามฤดูกาล ดังนั้นการปลูกพันธุ์ข้าวไร่ไม่ไวแสง จะสามารถเลือกวันปลูกข้าวได้ตลอดฤดูฝน ช่วยลดความเสี่ยงของเกษตรกรและเสถียรภาพของผลผลิตข้าวไร่ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวไร่พันธุ์ดีดอกพยอม และกู้เมืองหลวงที่ไวแสง ทำให้ไม่ไวแสงด้วยวิธีการผสมกลับ เพื่อย้ายยีนที่ไม่ไวแสง (hd1hd1) จากพันธุ์ให้ Taichung 65 ไปสู่พันธุ์รับ และคัดเลือกยีนไม่ไวแสงในระยะต้นกล้า โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ RM8225 ผลการศึกษาคาดว่าจะได้ข้าวไร่พันธุ์ดีดอกพยอม และกู้เมืองหลวงไม่ไวแสง

คำสำคัญ: การผสมกลับ ข้าวไร่ ยีนที่ไม่ไวแสง เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

Abstract

The global warming has caused climate variability such as abnormal rainfall distribution. The non- photoperiod sensitive upland rice can be grown early or lately in the rainy season for reducing the risk of farmers and stability upland rice yield. Breeding of the superior upland rice cv. Dawk Pa-Yawm and Goo Meuang Luang for non-photoperiod sensitivity can be made by using SSR (RM8225) marker-assisted backcrossing in seedling stage. The donor parent was non-photoperiod sensitivity Taichung 65. The result is expected that the superior upland rice cv. Dawk Pa-Yawm and Goo Meuang Luang for non-photoperiod sensitivity can be improved by that method.

Key words: Marker-assisted Backcrossing, non-photoperiod sensitivity gene, SSR marker, upland rice

บทนำ

ข้าวไร่ในภาคใต้นิยมปลูกแซมยางพาราหรือปาล์มน้ำมัน และปลูกตามเชิงเขา พันธุ์ข้าวไร่ที่นิยมปลูกเป็นพันธุ์ข้าวไร่ไวแสง เช่น พันธุ์เล็บนก ดอกพะยอม และกู้เมืองหลวง หรือพันธุ์พื้นเมืองอื่น ๆ เช่น พันธุ์ดอกขาม นางครวญ นางเขียน ภูเขาทอง สามเดือน และสาวน้อย เป็นต้น (เกษตรแผ่นดินทอง, 2554) ซึ่งจะปลูกได้เฉพาะช่วงนาปี หรือประมาณเดือนสิงหาคม – มกราคม (กรมการข้าว, 2554)

ปัจจุบันการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศในประเทศไทย โดยเฉพาะในภาคใต้ เช่น จังหวัดสงขลา ปรากฏว่าช่วงเดือนเมษายนถึงมิถุนายน 2550-2553 มีปริมาณน้ำฝนมากกว่าปกติ โดยมีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 250–600 มม./เดือน (สำนักงานชลประทาน, 2554) ซึ่งปกติเป็นช่วงแล้ง หากช่วงดังกล่าวเกษตรกรสามารถปลูกข้าวไร่ที่ไม่ไวแสงได้ หรือการปลูกข้าวไร่ที่ไม่ไวแสงได้ทั้งปีโดยอาศัยน้ำชลประทาน ซึ่งใช้น้ำน้อยกว่าข้าวนาปี ก็จะเพิ่มโอกาสในการเพิ่มผลผลิตข้าวและรายได้แก่เกษตรกร โดยเฉพาะข้าวไร่พันธุ์ดอกพยอมและกู้เมืองหลวงที่เกษตรกรนิยมปลูกในภาคใต้ ดังนั้นเพื่อให้เกษตรกรสามารถปลูกข้าวไร่ได้ทั้งปี จึงจำเป็นต้องปรับปรุงข้าวไร่พันธุ์ดอกพยอมและกู้เมืองหลวงไม่ให้ไวต่อช่วงแสง

วัตถุประสงค์

เพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวดอกพยอมและกู้เมืองหลวงไม่ให้ไวแสงโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

การตรวจเอกสาร

พันธุ์ข้าวไร่พื้นเมืองภาคใต้

ดอกพยอม เป็นพันธุ์ข้าวไร่ ข้าวเจ้าพันธุ์พื้นเมือง ไวต่อช่วงแสงอย่างอ่อน ได้การรับรองพันธุ์ปี 2552 อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 145–150 วัน ผลผลิต 250 กก./ไร่ ต้านทานโรคไหม้ โรคใบจุดสีน้ำตาล และโรคใบขีดสีน้ำตาล เหมาะปลูกแซมยางพารา (กรมการข้าว, 2554)

กู้เมืองหลวง เป็นพันธุ์ข้าวไร่ ข้าวเจ้าพันธุ์พื้นเมือง ไวต่อช่วงแสง ได้การรับรองพันธุ์ปี 2552 อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 135–165 วัน ผลผลิต 240 กก./ไร่ ทนแล้งได้ดี ต้านทานโรคไหม้ โรคใบจุดสีน้ำตาล และโรคใบขีดสีน้ำตาล เหมาะปลูกแซมยางพารา (กรมการข้าว, 2554)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการออกดอกที่ตอบสนองต่อช่วงแสงในข้าว

การตอบสนองต่อช่วงแสงสำหรับการออกดอก (photoperiodic flowering) ถูกควบคุมโดยกลุ่มยีน จึงจัดเป็นลักษณะปริมาณ มีการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอ เพื่อสร้างแผนที่ QTL เกี่ยวกับยีนที่ควบคุมการออกดอกในข้าวเช่น Yano และคณะ (2001) ทำการผสมข้าว Nipponbare (japonica type) และพันธุ์ Kasalath (indica type) และสามารถจำแนก QTL 14 ตำแหน่งที่ควบคุมการออกดอกของข้าว QTL 5 ตำแหน่ง ได้แก่ Hd1-Hd5 ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ประชากรชั่ว F_2 ส่วนอีก 3 ตำแหน่งคือ Hd7, Hd8 และ Hd11 สามารถตรวจสอบได้จากประชากร BC_1F_5 นอกจากนี้ Hd6, Hd9, Hd10, Hd12, Hd13 และ Hd14 สามารถตรวจสอบโดยใช้ประชากร BC_3F_2 และBC_4F_2 (Yamamoto *et al*., 1998; Yamamoto *et al*., 2000; Lin *et al*., 2002) อย่างไรก็ตามตำแหน่ง QTL หลักที่ตอบสนองต่อช่วงวันสั้นคือ Hd1 ภายใต้ช่วงวันยาว Hd1 จะยับยั้งการสร้างดอกในข้าว (Yano *et al*., 2001) นอกจากนี้ยีน Hd6 บนโครโมโซมแท่งที่ 3 จะยับยั้งการออกดอกในช่วง day neutral และช่วงวันยาว ส่วนยีน Hd3a ซึ่งตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 6 ยังมีความสำคัญต่อการกระตุ้นการออกดอกในช่วงวันสั้น

Lin และคณะ (2000) รายงานว่า อัลลีล hd1 ซึ่งเป็นยีนด้อย (มีตำแหน่งบนโครโมโซมแท่งที่ 6) ในข้าวพันธุ์ Taichung 65 ทำให้ข้าวพันธุ์นี้ไม่ไวแสงหรือไม่ตอบสนองต่อช่วงแสง เมื่อปลูกในช่วงแสงสั้นช่วง 11.05–11.79 ชั่วโมงต่อวัน มีอายุออกดอก 100 วัน (วราภรณ์, 2547) วราภรณ์ และคณะ (2551) พบเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ RM5963 RM8225 RM8226 และRM8250 ที่ใกล้ชิดกับ อัลลีล hd1 และได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวช่วยในการคัดเลือกลูกผสมกลับระหว่างพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ที่ไวแสงกับพันธุ์ Taichung 65 ที่ไม่ไวแสง เพื่อคัดเลือกลูกผสมกลับที่ไม่ไวแสงและคงลักษณะทางพืชไร่และคุณภาพของพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ไว้ดังเดิม (Sangtong, 2007)

เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายระดับโมเลกุล (molecular marker) ซึ่งเป็นการศึกษาระดับดีเอ็นเอ เพื่อเป็นเครื่องมือในการตรวจสอบในระดับของยีน จึงเป็นประโยชน์อย่างมากในการปรับปรุง สามารถกระทำได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของต้นพืช ไม่ทำลายต้นพืชและสามารถจำแนกลักษณะพันธุกรรมของยีนที่สนใจได้ (กัลยา และกรรณิการ์, 2554)

เครื่องหมายเอสเอสอาร์ หรือไมโครแซทเทลไลท์ หมายถึง ลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันเรียงอยู่ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ในจีโนม แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วยลำดับเบสซ้ำสั้นมากเพียง 1–4 คู่เบส หรือไม่เกิน 10 คู่เบส พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เนื่องจากไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นเบสซ้ำขนาดสั้นๆ ลำดับเบสแบบนี้มีการกระจายตัวทั้งจีโนม แต่การกระจายไม่สม่ำเสมอ หน้าที่สำคัญยังไม่ทราบแน่ชัด มีบางส่วนที่เป็นส่วนอนุรักษ์ (conserve) โดยพบอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันในสิ่งมีชีวิต เทคนิคเอสเอสอาร์เป็นการอาศัยความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่ตำแหน่งเดียวกันในแต่ละตัวอย่างไม่เท่ากัน ซึ่งจะตรวจสอบได้ทันทีเมื่อนำมาแยกขนาดได้โดยใช้ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis หรืออิเล็คโตรโฟริซีส ปัจจุบันมีการใช้เครื่องหมายดังกล่าวในการศึกษาแผนที่ยีน และแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2545)

การพัฒนาเครื่องหมายเอสเอสอาร์มีวิธีที่ยุ่งยาก และเสียค่าใช้จ่ายสูง แต่หลังจากพัฒนาเครื่องหมายได้แล้ว สามารถนำมาใช้ได้ง่าย เนื่องจากเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้การเพิ่มปริมาณโดยพีซีอาร์ จึงต้องการดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อย และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบก็มีขนาดเล็ก ไม่จำเป็นต้องใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีคุณภาพดีมากนัก ผลการตรวจสอบยังมีความแม่นยำ สามารถส่งข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์ เพื่อนำไปใช้ที่ห้องปฏิบัติการใดก็ได้ มีโพลิมอร์ฟิซึมสูง เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดซ้ำได้ง่าย นอกจากนี้ยังมีการข่มร่วม (codominance) จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกต และเฮเทอโรไซโกตได้ มีการกระจายตัวทั้งจีโนมเหมาะสำหรับใช้ในการทำแผนที่จีโนม ตรวจสอบเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ อีกมากมาย มีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกลักษณะต่าง ๆ ดังเช่นในข้าว (จิรพงศ์ และคณะ, 2554)

วิธีการทดลอง

1. การผสมกลับข้าวดอกพยอมและกู้เมืองหลวงไม่ให้ไวแสง

1.1 การสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1)

ทำการปลูกเมล็ดพันธุ์ Taichung 65 ดอกพยอมและกู้เมืองหลวง ลงในกระถางบรรจุดินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว แต่ละพันธุ์มีวันปลูกต่างกัน 6 วันปลูก แต่ละวันปลูกห่างกัน 6-10 วัน พันธุ์ละ 40 กระถาง ปลูก 3 ต้น/กระถาง ช่วงเดือนตุลาคม – พฤศจิกายน 2554 และช่วงเดือนมีนาคม – พฤษภาคม 2556 เพื่อผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ Taichung 65 ที่ไม่ไวแสงกับพันธุ์ดอกพยอมและกู้เมืองหลวงที่ไวแสงเพื่อสร้างลูกผสมชั่วที่ 1

1.2 การสร้างลูกผสมกลับ BC_1F_1

ทำการปลูกเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์ดอกพยอม x Taichung 65 และลูกผสมระหว่างพันธุ์กู้เมืองหลวง x Taichung 65 และพันธุ์ดอกพยอมและกู้เมืองหลวง เดือนพฤษภาคม 2556 ลงในแปลงเพาะกล้า แล้วทำการคัดเลือกต้นลูกผสมชั่วที่ 1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 4 ชนิดคือ RM5963 RM8225 RM8226 และ RM8250 และต้นข้าวพันธุ์ดอกพยอมและกู้เมืองหลวง ย้ายลงปลูกในกระถางบรรจุดินขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 นิ้ว ให้มีวันปลูกต่างกัน 4 วันปลูก แต่ละวันปลูกห่างกัน 10 วัน พันธุ์ละ 40 กระถาง ปลูก 3 ต้น/กระถาง ผสมพันธุ์ระหว่างต้นลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ (RM5963 RM8225 RM8226 และRM8250) กับพันธุ์ดอกพยอมและกู้เมืองหลวง เพื่อสร้างประชากรผสมกลับ BC_1F_1

1.3 การสร้างประชากรผสมกลับ BC_2F_1

ทำการเพาะเมล็ดประชากรผสมกลับ BC_1F_1 พันธุ์ดอกพยอม และกู้เมืองหลวง ลงในแปลงเพาะกล้า แล้วทำการคัดเลือกต้นลูกผสมกลับ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ (RM 5963 RM 8225 RM8226 และ RM8250) ต้นลูกผสมกลับที่มียีนไม่ไวแสง และต้นข้าวพันธุ์ดอกพยอมและกู้เมืองหลวง ย้ายลงปลูกในกระถางบรรจุดินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว ให้มีวันปลูกต่างกัน 8 วันปลูก แต่ละวันปลูกห่างกัน 5 วัน พันธุ์ละ 40 กระถาง ปลูก 3 ต้น/กระถาง ผสมพันธุ์ระหว่างต้น BC_1F_1 ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลกับพันธุ์ดอกพยอมและกู้เมืองหลวงที่ไวแสง เพื่อสร้างประชากรผสมกลับ BC_2F_1

1.4 การสร้างประชากรผสมกลับ BC_2F_2

ทำการเพาะเมล็ดประชากรผสมกลับ BC_2F_1 ลงในแปลงเพาะกล้า แล้วทำการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ (RM 8225 RM8226 RM 5963 และ RM8250) ต้น BC_2F_1 ที่มียีนไม่ไวแสง ย้ายไปปลูกในกระถางบรรจุดินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว ในสภาพโรงเรือน เพื่อสร้างเมล็ดผสมกลับ BC_2F_2 และคัดเลือกลักษณะอื่น ๆ ที่เหมือนกับพันธุ์ดอกพยอมและกู้เมืองหลวง

2. การปลูกและดูแลรักษา

ทำการปลูกเมล็ดข้าวพันธุ์พ่อแม่และลูกผสม ที่เรือนกระจก คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา ปลูกในกระถางใส่หน้าดินผสมปุ๋ยหมัก ¾ ของกระถาง ปลูกข้าว 3 ต้น/กระถาง ให้น้ำทุก 7 วัน อายุ 3 สัปดาห์ ใส่ปุ๋ยยูเรีย 100 กรัม/กระถาง และใส่ปุ๋ย 15-15-15 ทุก ๆ 2-4 สัปดาห์ ครั้งละ 100 กรัม/กระถาง

3. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ในการคัดเลือกลูกผสมกลับ

3.1 การเก็บตัวอย่างใบ

เก็บตัวอย่างใบอ่อนพ่อแม่ ลูกผสมชั่วที่ 1 หรือประชากรผสมกลับ BC1F1 และ BC2F1 อายุ 7-10 วัน จำนวน 5-6 ใบ เก็บใส่ถุงพลาสติควางแช่ไว้ในถังน้ำแข็ง ก่อนนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำชิ้นส่วนใบอ่อน ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในโกร่งที่แช่เย็น บดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วนำผงตัวอย่างใบใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายที่มี extraction buffer (PVP-40, NaCl, EDTA 0.5 M pH 8.0, CTAB 2%) ร่วมกับ β-mercaptoethanol เข้มข้น 2% ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสในเครื่อง water bath เป็นเวลา 15 นาที กลับหลอดเบา ๆ เติม Potasium acetate 300 ไมโครลิตร แช่ตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 30-60 นาที กลับหลอดเบา ๆ ทุก 10 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที เพื่อตกตะกอนของแข็ง ย้ายของเหลวส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม chloroform : isoamyl 24 : 1 700 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า 20 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 30 นาที ย้ายของเหลวส่วนใสใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนด้วย isopropanol 700 ไมโครลิตร แช่ตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 10 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70 % ethyl alcohol 500 ไมโครลิตร 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ผึ่งดีเอ็นเอให้แห้ง เติม TE buffer 20 ไมโครลิตร วัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส วิธีการดังกล่าวประยุกต์จากวิธีของ Agrawal และ คณะ (1992)

3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอแม่แบบความเข้มข้น 25 นาโนกรัม บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมล ไพรเมอร์เอสเอสอาร์ (SSR) ได้แก่ RM5963, RM8225, RM8226 และRM8250 (ตารางที่ 1) 0.2 ไมโครโมล แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมล ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล และเอนไซม์ Taq polymerase 1 ยูนิต รวมปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตั้งอุณหภูมิของระบบเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เริ่มกระบวนการที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 52 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 2 นาที 35 รอบ และสุดท้ายกระบวนการที่ 72 องศาเซลเซียส 8 นาที เก็บผลผลิตพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์เอสเอสอาร์ที่ใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่ไม่ไวแสง

No.	Primer	Repeat motif	5′ sequence	3′ sequence	TA (°C)
1	RM5963	$(CAG)_9$	CTGCCTAGCTTCCGTTTCTC	AGTTACGGGAAATGTGTGGC	55
2	RM8225	$(A)_{11}(AAG)_{14}$	ATGCGTGTTCAGAAATTAGG	TTGTTGTATACCTCATCGACAG	52
3	RM8226	$(AAG)_{14}$	TTAGGATACGGCTTCTAGGC	CGTAATTGTTGCATATGGTG	55
4	RM8250	$(AC)_{13}$	AACCTAAAGGGCAGTTTCC	GCGATAAGTTTCTTGTTGATG	55

TA = Temperature of amplification

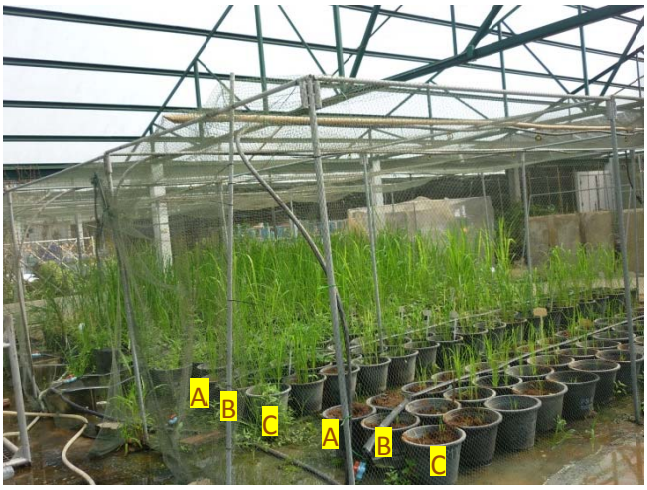
ที่มา: McCouch และคณะ (2002)

3.4 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่องอิเล็กโทรโพรีซีส

แยกขนาดผลผลิตพีซีอาร์ของพ่อแม่พันธุ์ และลูกผสม ด้วยเครื่องอิเล็กโทรโพรีซีสด้วยตัวกลางเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE 1X ย้อมแผ่นเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 10 นาที ส่องดูขนาดดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ตามวิธีการของ Bassam และคณะ (1991) เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่สัมพันธ์ใกล้ชิดกับลักษณะไม่ไวแสงในพ่อแม่พันธุ์ ลูกผสม และประชากรผสมกลับ

ผลการทดลองและวิจารณ์

งานวิจัยการปรับปรุงพันธุ์ข้าวดอกพยอมและกู้เมืองหลวงไม่ให้ไวแสงด้วยวิธีผสมกลับและคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ ระยะที่ 1 เป็นขั้นตอนการย้ายยีนที่ไม่ไวแสง (hd1hd1) จากพันธุ์ Taichung 65 ไปสู่พันธุ์ข้าวดอกพยอมและกู้เมืองหลวงที่ไวแสงด้วยวิธีการผสมพันธุ์ และคัดเลือกยีนที่ไม่ไวแสงด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ ภาพที่ 1 แสดงการปลูกพ่อแม่พันธุ์ได้แก่ พันธุ์กู้เมืองหลวง ดอกพยอม และ Taichung 65 เพื่อสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 และ การผสมพันธุ์เพื่อย้ายยีนที่ไม่ไวแสง (hd1hd1) จากพันธุ์ Taichung 65 ไปสู่พันธุ์ดอกพยอมและกู้เมืองหลวงที่ไวแสง หรือการผสมกลับเพื่อย้ายยีนอื่น ๆของพันธุ์รับไปยังต้นลูกผสมกลับ ดังภาพที่ 3 และภาพที่ 4 แสดงลูกผสมกลับดอกพยอม อายุ 70 วัน และกู้เมืองหลวง อายุ 90 วัน ที่ปลูกในสภาพโรงเรือน



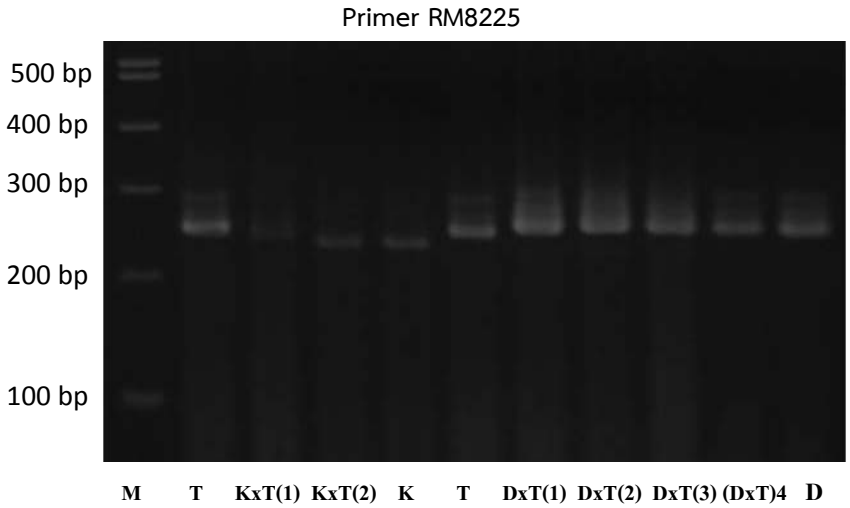
ภาพที่ 1 แปลงพ่อแม่พันธุ์ของแต่ละแถว ได้แก่ พันธุ์กู้เมืองหลวง (A) ดอกพยอม (B) และ Taichung 65 (C)

ภาพที่ 2 ต้นพ่อแม่พันธุ์ ได้แก่ ดอกพยอม อายุ 110 วัน (A) พันธุ์กู้เมืองหลวง อายุ 120 วัน (B) และ Taichung 65 อายุ 60 วัน (C) ที่ปลูกในสภาพโรงเรือน

ภาพที่ 3 การผสมพันธุ์เพื่อย้ายยีนที่ไม่ไวแสง (hd1hd1) จากพันธุ์Taichung 65 ไปสู่พันธุ์ดอกพยอมและกู้เมืองหลวงที่ไวแสง หรือการผสมกลับเพื่อย้ายยีนอื่น ๆของพันธุ์รับไปยังต้นลูกผสมกลับ

ภาพที่ 4 ต้นลูกผสมกลับ ได้แก่ ลูกผสมกลับดอกพยอม อายุ 70 วัน (A) และกู้เมืองหลวง อายุ 90 วัน (B) ที่ปลูกในสภาพโรงเรือน

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ในการคัดเลือกลูกผสมกลับจำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ RM5963, RM8225, RM8226 และ RM8250 พบว่า ไพรเมอร์ RM8225 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์กู้เมืองหลวงที่ไวแสงและ Taichung 65 ที่ไม่ไวแสง ต่างกับการทดลองของวราภรณ์ และคณะ (2551) ที่พบว่า ไพรเมอร์ RM5963, RM8225, RM8226 และ RM8250 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์กข 6 ที่ไวแสงและTaichung 65 ที่ไม่ไวแสง แต่ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ดอกพยอมที่ไวแสงน้อยและTaichung 65 ที่ไม่ไวแสง (ภาพที่ 5) แสดงว่า ยีนที่ควบคุมความไวแสงน้อยของพันธุ์ดอกพยอม อาจจะเป็นยีนตัวเดียวกับยีนที่ควบคุมความไม่ไวแสงของพันธุ์ Taichung 65 หรือเป็นยีนคนละตัวที่อยู่ตำแหน่งใกล้เคียงกัน ซึ่งอยู่ติดกับตำแหน่งของไพรเมอร์ RM8225 หรือเทคนิคเอสเอสอาร์ที่ใช้ยังไม่เหมาะสม แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏยังไม่ชัดเจน จำเป็นต้องกระทำซ้ำอีก



ภาพที่ 5 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ Taichung 65 (T) กู้เมืองหลวง (K) ดอกพยอม (D) และลูกผสมระหว่างพันธุ์กู้เมืองหลวง x Taichung 65 (K x T) และดอกพยอม x Taichung 65 (D x T)

สรุปผลการทดลอง

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวดอกพยอมและกู้เมืองหลวงไม่ให้ไวแสงด้วยวิธีผสมกลับและคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ RM8225 จะช่วยในการคัดเลือกยีนที่ไม่ไวแสงในระยะต้นกล้า ทำให้ได้ต้นผสมกลับพันธุ์ดอกพยอมและกู้เมืองหลวงที่ไม่ไวแสง

เอกสารอ้างอิง

กรมการข้าว. 2554. พันธุ์ข้าวไร่ไวต่อช่วงแสง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. http://www.brrd.in.th/rkb/data_002/rice_xx2-02_New_index.html. (สืบค้นเมื่อ 19 สิงหาคม 2554).

กัลยา ประพาน และ กรรณิการ์ ธีระวัฒนสุข. 2554. การใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการเพิ่มประสิทธิภาพการปรับปรุงพันธุ์ยาง. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการยางพารา ครั้งที่1 ประจำปี 2554 สถาบันวิจัยยาง กรมวิชาการเกษตร ณ โรงแรมเชียงใหม่ฮิลล์ อ.เมือง จ.เชียงใหม่. วันที่ 20 - 22 กุมภาพันธ์ 2544. หน้า 38 - 54.

เกษตรแผ่นดินทอง. 2554. ข้าวพันธุ์พื้นเมือง-ข้าวไร่พันธุ์ดอกขาม. รักบ้านเกิด.คอม. http://www.rakbankerd.com/agriculture/open.php?id=581&s=tblrice (สืบค้นเมื่อ 19 สิงหาคม 2554).

จิรพงศ์ ใจรินทร์, วราภรณ์ วงศ์บุญ, กิจติพงษ์ เพ็งรัตน์, สงวน เทียงดีฤทธิ์, พิกุล ลีลากุด และ กัลยา สานเสน. 2554. การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและมีคุณภาพเมล็ดเหมือนขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย. http://www.brrd.in.th/main/document/Pattaya52%20report/15.pdf (สืบค้นเมื่อ 6 มิถุนายน 2554).

วราภรณ์ แสงทอง. 2547. การคัดเลือกพันธุ์ให้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ให้มีลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสงโดยการใช้ molecular marker ในการคัดเลือกลูกผสมกลับ. ว.เกษตรพระจอมเกล้า 21: 27-34.

วราภรณ์ แสงทอง, ศุภางค์ ทิพย์พิทักษ์, วิลาวรรณ ศิริพูนวิวัฒน์, ประทีป พิณตานนท์, สมเกียรติ วัฒกวิกรานต์ และ นลินี รุ่งเรืองศรี. 2551. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก. ว. เกษตรพระจอมเกล้า 26: 96-110.

สำนักงานชลประทานที่ 16. 2554. กราฟน้ำฝนเปรียบเทียบจังหวัดสงขลา. กรมชลประทาน http://irrigation.rid.go.th/rid16/sip/stity/stity.html. (สืบค้นเมื่อ 19 สิงหาคม 2554).

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Agrawal, G.K., R.N. Pandey and V.P. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from *Choerospondias asllaris* leave. Biotech. Biodiv. Lett. 2: 19-24.

Bassam, B.J., G. Caetano-Anollés and P.M. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 196: 80-83.

Hayama, R. and G. Coupland. 2004. The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of arabidopsis and rice. Plant Physiology 135: 677-684.

Lin, H.X., T. Yamamoto, T. Sasaki and M. Yano. 2000. Characterization and detection of epistatic interactions of 3 QTLs, *Hd1*, *Hd2*, and *Hd3*, controlling heading date in rice using nearly isogenic lines. Theor. Appl. Genet. 101: 1021–1028.

Lin, H.X., M. Ashikari, U. Yamanouchi, T. Sasaki and M. Yano. 2002. Identification and characterization of a quantitative trait locus, Hd9, controlling heading date in rice. Breed. Sci. 52: 35–41.

Liu, B.H. 1998. Statistic genomics: linkage, mapping, and QTL analysis. CRC Press LLC, New York.

McCouch, S.R., L. Teytelman, Y. Xu *et al.* 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). DNA Research 9: 199–207.

Sangtong, V., J. Khonkaent, W. Siripoonwiwat, P. Pintanont, S. Watanakawikrant, N. Roongruangsree and U. Roongruangsree. 2007. Inheritance of major gene, *Hd1/hd1*, in controlling photoperiod sensitivity of BC_2F_2 and BC_2F_3 rice plants. Proceeding of the 2nd International Conference on Rice for the Future, Bangkok, Thailand, 5-9 November 2007, pp. 413-419.

Yamamoto, T., Y. Kuboki, S.Y. Lin, T. Sasaki and M. Yano. 1998. Fine mapping of quantitative trait loci *Hd-1*, *Hd-2* and *Hd-3*, controlling heading date of rice, as single Mendelian factors. Theor. Appl. Genet. 97: 37-44.

Yamamoto, T., H.X. Lin, T. Sasaki and M. Yano. 2000. Identification of heading date quantitative trait locus *Hd6* and characterization of its epistatic interactions with *Hd2* in rice using advanced backcross progeny. Genetics 154: 885-891.

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

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

เนื่องจากเป็นงานวิจัยต่อเนื่อง ในระยะที่ 2 เป็นการคัดเลือกต้นผสมกลับครั้งที่ 2 ที่ผสมตัวเองครั้งที่ 3-5 เพื่อนำไปทดสอบการไม่ไวแสง ผลผลิตและคุณภาพ และลักษณะทางการเกษตรอื่น ๆ ที่เหมือนกับพันธุ์ดอกพยอมและกู้เมืองหลวง ปี 2559-2560