รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวดอกพะยอมและกู้เมืองหลวงไม่ให้ไวแสงด้วยวิธีผสมกลับและคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ (ระยะที่ 2)

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

คณะนักวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.วัชรินทร์ ซุ้นสุวรรณ

รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี

นางสาวกันรบ เพ็งแก้ว

นายศักดา โชโต

นายณัฐพล จันทร์สว่าง

นายประมวล หน่อสกูล

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก งบประมาณแผ่นดิน

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2558-2559

รหัสโครงการ NAT582077S

ภาควิชาพืชศาสตร์ และศูนย์วิจัยระบบเกษตรทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม

คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

จังหวัดสงขลา

ชื่อโครงการเดี่ยว การปรับปรุงพันธุ์ข้าวดอกพะยอมและกู้เมืองหลวงไม่ให้ไวแสงด้วยวิธีผสมกลับและคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ (ระยะที่ 2)

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

คณะนักวิจัยและหน่วยงานต้นสังกัด

ชื่อผู้วิจัย รองศาสตราจารย์ ดร.วัชรินทร์ ชุ้นสุวรรณ[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
รายการรูป	3
กิตติกรรมประกาศ	4
บทคัดย่อ	5
Abstract	6
บทนำ	7
วัตถุประสงค์	7
การตรวจเอกสาร	7
วิธีการทดลอง	8
ผลการทดลองและวิจารณ์	12
สรุปผลการทดลอง	14
เอกสารอ้างอิง	15
ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป	16

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	ไพรเมอร์เอสเอสอาร์ที่ใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่ไม่ไวแสง	11
2.	ลักษณะทางการเกษตรของลูกผสมกลับ BC_2F_2 ที่ไม่ไวแสง	14

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	การสร้างและคัดเลือกประชากรผสมกลับ BC_2F_2 ที่ไม่ไวต่อช่วงแสง	8
2.	แปลงทดลองการสร้างประชากรผสมกลับ BC_2F_3 การเปรียบเทียบพันธุ์ และการให้แสง	9
3.	ต้นลูกผสมกลับ BC_2F_2 ที่ไม่ไวแสงและไวแสง	9
4.	การเก็บตัวอย่างใบ	9
5.	การสกัดดีเอ็นเอ	10
6.	การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ	11
7.	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์	12
8.	ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ RM 8225	13

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาพืชศาสตร์ และศูนย์วิจัยระบบเกษตรทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่สนับสนุนการทำวิจัย และโครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2558-2559

ข้าพเจ้าหวังว่ารายงานฉบับนี้ จะเป็นประโยชน์กับนักวิจัย และผู้สนใจทั่วไป

วัชรินทร์ ชุ้นสุวรรณ
หัวหน้าโครงการ
มิถุนายน 2561

บทคัดย่อ

การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ ทำให้การกระจายตัวของฝนไม่เป็นไปตามฤดูกาล นักปรับปรุงพันธุ์ข้าวไร่จึงปรับปรุงพันธุ์ข้าวไร่ที่ไม่ไวแสง เพื่อเสถียรภาพการผลิตข้าวไร่ ข้าวไร่พันธุ์ดีดอกพะยอมที่ไวแสง ได้รับการผสมเพื่อย้ายยีนที่ไม่ไวแสง (*hd1hd1*) จากพันธุ์ให้ Taichung 65 ไปสู่พันธุ์รับ และคัดเลือกยีนไม่ไวแสงในระยะต้นกล้า แล้วทำการผสมกลับไปยังพันธุ์ดอกพะยอม 2 ชั่ว พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ RM 8225 สามารถคัดเลือกยีนที่ไวแสงและไม่ไวแสงของลูกผสม F_1 ลูกผสมกลับ BC_1F_1, BC_2F_1 และ BC_2F_2 ในระยะต้นกล้า ลูกผสมกลับ BC_2F_2 ที่ไม่ไวแสงเมื่อคัดเลือกในสภาพวันยาวช่วงแสง 15 ชั่วโมง ซึ่งคัดเลือกได้จำนวน 31 ต้น การทดสอบการสอดคล้องพบว่าลักษณะไม่ไวแสงควบคุมด้วยยีนด้อย 1 คู่

คำสำคัญ: การผสมกลับ ข้าวไร่ ยีนที่ไม่ไวแสง เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

Abstract

Rice breeders improve the non-photoperiod sensitive upland rice varieties for rice production stability because of climate change such as abnormal rainfall distribution. Breeding of the upland rice cv. Dawk Pa-yawm for non-photoperiod sensitivity can be selected by using SSR marker-assisted backcrossing. The donor parent was non-photoperiod sensitivity Taichung 65 (*hd1hd1*). The RM 8225 marker was used to identify non-photoperiod and photoperiod sensitivity genes of F_1, BC_1F_1, BC_2F_1 and BC_2F_2 plants in seedling stage. The BC_2F_2 plants were exposed to 15 hours of light every day for selecting the non-photoperiod sensitivity plants. The 31 non-photoperiod sensitivity BC_2F_2 plants were selected. The multinomial chi-square test showed that the non-photoperiod sensitivity plant is controlled by a single recessive gene.

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 โดยเฉพาะข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมที่เกษตรกรนิยมปลูกในภาคใต้ ดังนั้นเพื่อให้เกษตรกรสามารถปลูกข้าวไร่ได้ทั้งปี จึงจำเป็นต้องปรับปรุงข้าวไร่พันธุ์ดอกพะยอมไม่ให้ไวต่อช่วงแสง

วัตถุประสงค์

เพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวดอกพะยอมไม่ให้ไวแสงโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

การตรวจเอกสาร

พันธุ์ข้าวไร่พื้นเมืองภาคใต้

ดอกพะยอม เป็นพันธุ์ข้าวไร่ ข้าวเจ้าพันธุ์พื้นเมือง ไวต่อช่วงแสงอย่างอ่อน ได้การรับรองพันธุ์ปี 2552 อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 145–150 วัน ผลผลิต 250 กก./ไร่ 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 RM 5963 RM 8225 RM 8226 และRM 8250 ที่ใกล้ชิดกับ อัลลีล *hd1* และได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวช่วยในการคัดเลือกลูกผสมกลับระหว่างพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ที่ไวแสงกับพันธุ์ Taichung 65 ที่ไม่ไวแสง เพื่อคัดเลือกลูกผสมกลับที่ไม่ไวแสงและคงลักษณะทางพืชไร่และคุณภาพของพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ไว้ดังเดิม (Sangtong และคณะ, 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

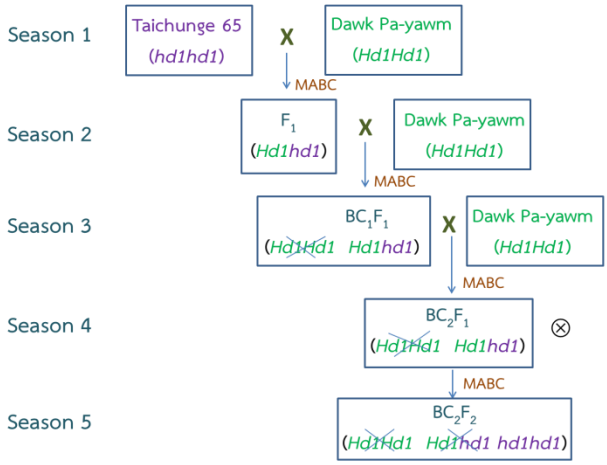
เนื่องจากไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นเบสซ้ำขนาดสั้นๆ ลำดับเบสแบบนี้มีการกระจายตัวทั้งจีโนม แต่การกระจายไม่สม่ำเสมอ หน้าที่สำคัญยังไม่ทราบแน่ชัด มีบางส่วนที่เป็นส่วนอนุรักษ์ (conserve) โดยพบอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันในสิ่งมีชีวิต เทคนิคเอสเอสอาร์เป็นการอาศัยความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่ตำแหน่งเดียวกันในแต่ละตัวอย่างไม่เท่ากัน 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. การสร้างประชากรผสมกลับ BC_2F_3

ทำการปลูกเมล็ดประชากรผสมกลับ BC_2F_2 (รูปที่ 1) ลงในกระถางบรรจุดินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร จำนวน 200 กระถาง ปลูก 1 ต้นต่อกระถาง หรือจำนวน 200 ต้น ให้แสงมากกว่า 12 ชั่วโมงต่อวัน โดยใช้หลอดไส้ 100 วัตต์ จำนวน 6 หลอด เปิดเวลา 18.00-21.00 น. เมื่อข้าวอายุ 1 เดือนจนกระทั่งออกดอก ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ – กรกฎาคม 2560 เพื่อคัดเลือกเมล็ดผสมกลับ BC_2F_3 ที่ไม่ไวแสง (รูปที่ 2 และ 3)



รูปที่ 1 การสร้างและคัดเลือกประชากรผสมกลับ BC_2F_2 ที่ไม่ไวต่อช่วงแสง

รูปที่ 2 แปลงทดลองการสร้างประชากรผสมกลับ BC_2F_3 การเปรียบเทียบพันธุ์ และการให้แสง

รูปที่ 3 ต้นลูกผสมกลับ BC_2F_2 ที่ไม่ไวแสงและไวแสง

2. การสกัดดีเอ็นเอ

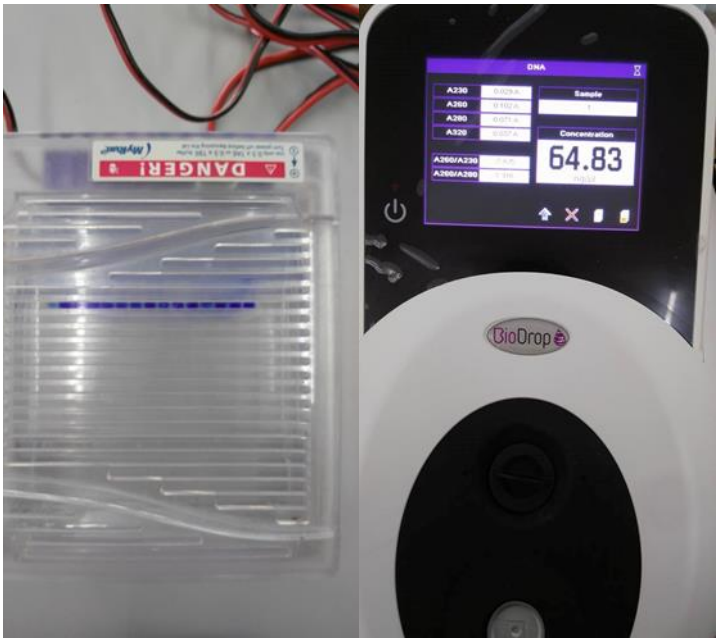
เก็บตัวอย่างใบอ่อนของพ่อแม่ ลูกผสมชั่วที่ 1 และลูกผสมกลับ BC_2F_2 จำนวน 2-3 ใบ ใส่ถุงพลาสติก (รูปที่ 4) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

รูปที่ 4 การเก็บตัวอย่างใบ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าว โดยใช้สารละลาย Cetyl Trimethyl Ammonium Bronide (CTAB) นำใบข้าว 200 มิลลิกรัมน้ำหนักสด มาล้างทำความสะอาด ซับให้แห้ง ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในโกร่งที่แช่เย็น บดให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว ใส่ CTAB buffer (ประกอบด้วย PVP-40 เข้มข้น 1 %, NaCl เข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์, Na2EDTA เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 8, CTAB เข้มข้น 2 %) ร่วมกับ β-Mercaptoethanol เข้มข้น 2 % ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24 : 1) 700 ไมโครลิตร เขย่าเป็นเวลา 20 นาที ปั่นเหวี่ยงใช้ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanol 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา เทสารละลายทิ้ง ระวังไม่ให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุดออกมาด้วย ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย Ethanol ความเข้มข้น 70 % 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer 30 ไมโครลิตร เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ (รูปที่ 5)

รูปที่ 5 การสกัดดีเอ็นเอ

การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (แลมดาดีเอ็นเอ) โดยการทำอิเล็คโตรโฟรีซิสอะกาโรส (LE Agarose, Promega, USA) เข้มข้น 0.75% แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE buffer (Tris Base, Glacial acetic acid, EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8.0) เป็นเวลา 20 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ ด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ จากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel documentation และตรวจสอบด้วยเครื่อง Biodrop (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

3. การวิเคราะห์เอสเอสอาร์

ทำการทดสอบไพรเมอร์ ได้แก่ RM 5963 RM 8225 RM 8226 และRM 8250 (ตารางที่ 1) นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากปริมาณรวม 10 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 20 นาโนกรัม คู่ไพรเมอร์แต่ละชนิดเข้มข้น 0.2 ไมโครโมลาร์ เอ็นไซม์ Taq polymerase เข้มข้น 0.7 ยูนิต 10X Taq buffer 2 ไมโครลิตร dNTP เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้คือ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 3 นาที ทำจำนวน 1 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 1 นาที ตามด้วยการทำ annealing อุณหภูมิตามแต่ละไพเมอร์ และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 1 นาที ทำจำนวน 30 รอบ รอบสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 5 นาที ทำจำนวน 1 รอบ (รูปที่ 7)

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)

รูปที่ 7 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์

หลังทำพีซีอาร์ นำสารละลายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้ว จำนวน 10 ไมโครลิตร มาตรวจสอบรูปแบบชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนแผ่นวุ้น LE agarose ที่ความเข้มข้น 3.5% ละลายใน TBE buffer (Tris Base, Boric acid, Na2EDTA 0.5 โมลาร์ ; pH 8.0) ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ 60 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที ล้างน้ำ 15 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง gel documentation ใช้เครื่องหมายเอสเอสอาร์คัดเลือกต้นที่มียีน *hd1*

4. การศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของลูกผสมกลับที่ไม่ไวแสง

การปลูกและดูแลรักษา ทำการปลูกข้าว ที่เรือนกระจก คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา ปลูกข้าวในกระถางใส่หน้าดินผสมปุ๋ยหมัก ¾ ของกระถาง ปลูกข้าว 1 ต้น/กระถาง ให้น้ำทุกวัน อายุ 3 สัปดาห์ ใส่ปุ๋ยยูเรีย 100 กรัม/กระถาง และใส่ปุ๋ย 15-15-15 ทุก ๆ 2-4 สัปดาห์ ครั้งละ 100 กรัม/กระถาง ปลูกลูกผสมกลับ BC_2F_2 ในกระถาง 1 ต้น/กระถาง จำนวน 100 กระถาง ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ – กรกฎาคม 2560 และให้แสงมากกว่า 12 ชั่วโมงต่อวัน โดยใช้หลอดไส้ 100 วัตต์จำนวน 6 หลอด เปิดเวลา 18.00-21.00 น. เมื่อข้าวอายุ 1 เดือนจนกระทั่งออกดอก ปลูกเปรียบกับพันธุ์ดอกพะยอม และพันธุ์ Taichung 65 จำนวน 10 กระถาง

การบันทึกข้อมูลลักษณะทางเกษตร

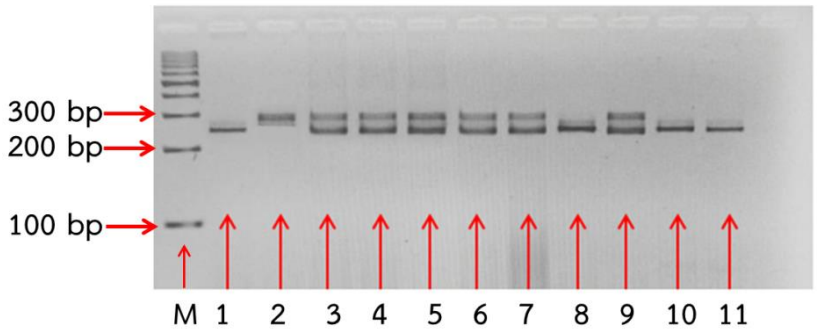
(1) ความสูง วัดจากระดับพื้นดินถึงส่วนสูงสุดของต้นพืชในระยะเก็บเกี่ยว
(2) อายุวันออกดอก นับอายุตั้งแต่วันที่ข้าวงอกจนถึงวันที่ข้าวแทงช่อดอก
(3) อายุวันแก่เก็บเกี่ยว นับอายุตั้งแต่วันที่ข้าวงอกจนถึงวันที่ข้าวสุกแก่พร้อมเก็บเกี่ยว
(4) ความยาวใบธง วัดส่วนที่ยาวที่สุดของใบธงในระยะก่อนสุกแก่
(5) ความกว้างใบธง วัดส่วนที่กว้างที่สุดของใบธงในระยะก่อนสุกแก่
(6) จำนวนหน่อต่อกอ นับจำนวนหน่อทั้งหมดจากลำต้นหลัก
(7) น้ำหนัก 100 เมล็ด ชั่งน้ำหนักเมล็ดดีทั้งหมด แล้วนำมาคำนวณเป็นน้ำหนัก 100 เมล็ด
(8) ผลผลิตของข้าวต่อต้น ชั่งน้ำหนักเมล็ดดีทั้งหมดต่อต้น

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ การทดสอบการสอดคล้องตามวิธีการของ Dowdy และคณะ (2004)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ในการคัดเลือกลูกผสมกลับจำนวน 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ RM 5963 RM 8225 RM 8226 และ RM 8250 พบว่า ไพรเมอร์ RM 8225 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ดอกพะยอมที่ไวแสงน้อย

ลูกผสมกลับที่ไวแสงและไม่ไวแสง และพันธุ์Taichung 65 ที่ไม่ไวแสง (รูปที่ 8) แสดงถึงยีนที่ควบคุมความไวแสงน้อยของพันธุ์ดอกพะยอม กับยีนที่ควบคุมความไม่ไวแสงของพันธุ์ Taichung 65 เป็นยีน 1 ตำแหน่งและควบคุมด้วยยีนด้อย 1 คู่ ซึ่งอยู่ใกล้ชิดกับตำแหน่งของไพรเมอร์ RM 8225 การทดลองของวราภรณ์ และคณะ (2551) พบว่า ไพรเมอร์ RM 5963 RM 8225 RM 8226 และ RM 8250 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์กข 6 ที่ไวแสงและTaichung 65 ที่ไม่ไวแสง



รูปที่ 8 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ RM 8225: M = DNA Ladder แถบ 1 = พันธุ์ Taichung 65 (*hd1hd1*) แถบ 2 = พันธุ์ดอกพะยอม (*Hd1Hd1*) แถบ 3-7 = ลูกผสมชั่วที่ 1(F_1: *Hd1hd1*) แถบ 8 และ10-11 = ลูกผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 2 (BC_2F_2: *hd1hd1*) และแถบ 9 = ลูกผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 2 (BC_2F_2: *Hd1hd1*)

การคัดเลือกต้นลูกผสมกลับ BC_2F_2 ที่ไม่ไวแสง พบว่า ลูกผสมกลับ BC_2F_2 จำนวน 200 ต้น เมื่อปลูกในช่วงวันยาว ลูกผสมกลับ BC_2F_2 จำนวน 53 ต้น ออกดอกหรือไม่ไวแสง การทดสอบการสอดคล้องกับอัตราส่วน 3 : 1 ที่แสดงว่าลักษณะไม่ไวแสงควบคุมด้วยยีนด้อย 1 คู่ พบว่า ไค-สแควร์ที่คำนวณ = 0.17 น้อยกว่าค่าจากตาราง 6.63 ที่ df = 1 ระดับความเชื่อมั่น 0.01 แสดงว่าว่าลักษณะไม่ไวแสงควบคุมด้วยยีนด้อย 1 คู่ เช่นเดียวกับรายงานของ Sangtong และคณะ (2007) ที่พบการกระจายตัวตามอัตราส่วน 3 : 1

ลักษณะทางการเกษตรของลูกผสมกลับ BC_2F_2 ที่คัดเลือกไว้จำนวน 31 ต้น จากตารางที่ 2 มีค่าความแปรปรวนของลักษณะความสูงต่ำสุด – สูงสุด 54 – 100 เซนติเมตร เฉลี่ย 80 เซนติเมตร อายุวันออกดอกต่ำสุด – สูงสุด 86-104 วัน เฉลี่ย 93 วัน อายุแก่เก็บเกี่ยวต่ำสุด – สูงสุด 119 - 137 วัน เฉลี่ย 126 วัน ความยาวใบธงต่ำสุด – สูงสุด 20 – 48 เซนติเมตร เฉลี่ย 32 เซนติเมตร ความกว้างใบธงต่ำสุด – สูงสุด 0.8 – 1.9 เซนติเมตร เฉลี่ย 1.3 เซนติเมตร จำนวนหน่อต่อกอต่ำสุด – สูงสุด 5 - 27 หน่อต่อกอ เฉลี่ย 14 หน่อต่อกอ น้ำหนัก 1,000 เมล็ดต่ำสุด – สูงสุด 12.50 – 26.67 เฉลี่ย 19.59 กรัม และผลผลิตต่อต้นต่ำสุด – สูงสุด 0.04 – 2.63 กรัม เฉลี่ย 1.00 กรัม แสดงว่าแต่ละต้นมีความแตกต่างกันหรือมีความแปรปรวนในประชากรต้นลูกผสมกลับ BC_2F_2 ดังนั้นประชากรดังกล่าวต้องนำไปปลูกเพื่อผสมตัวเองและคัดเลือกภายในแต่ละตระกูลก่อนที่จะนำมาเปรียบเทียบระหว่างตระกูลลูกผสมกลับในชั่วหลัง ๆ ที่ไม่มีการกระจายตัวแล้ว ผลผลิตต่อต้นที่ต่ำเนื่องจากในช่วงออกดอกพบการระบาดของโรคไหม้อย่างรุนแรงในทุกต้น เมื่อเทียบกับพันธุ์ดอกพะยอมความสูงเฉลี่ย 131 เซนติเมตร อายุวันออกดอกเฉลี่ย 108 วัน อายุแก่เก็บเกี่ยวเฉลี่ย 135 วัน ความยาวใบธงเฉลี่ย 29.15 เซนติเมตร ความกว้างใบธงเฉลี่ย 1.41 เซนติเมตร จำนวนหน่อต่อกอเฉลี่ย 6 หน่อต่อกอ น้ำหนัก 1,000 เมล็ดเฉลี่ย 26.30 กรัม และผลผลิตต่อต้นเฉลี่ย 31.00 กรัม (วัชรินทร์, 2560 ไม่ตีพิมพ์) ส่วนพันธุ์ Taichung 65 ความสูงเฉลี่ย 119 เซนติเมตร อายุวันออกดอกเฉลี่ย 70 วัน อายุแก่เก็บเกี่ยวเฉลี่ย 100 วัน ความยาวใบธงเฉลี่ย 22.89 เซนติเมตร ความกว้างใบธงเฉลี่ย 1.15 เซนติเมตร จำนวนหน่อต่อกอเฉลี่ย 8 หน่อต่อกอ น้ำหนัก 1,000 เมล็ดเฉลี่ย 26.99 กรัม และผลผลิตต่อต้นเฉลี่ย 24.01 กรัม Hasan และคณะ (2015) รายงานว่าการใช้เครื่องหมายโมเลกุลคัดเลือกยีนที่ต้องการจากพันธุ์ให้ร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุลของพันธุ์รับจะช่วยให้ลูกผสมกลับมีลักษณะเหมือนพันธุ์รับเร็วกว่าการผสมกลับแบบปกติ 2 – 3 ชั่ว ซึ่งการผสมกลับปกติลักษณะลูกผสมกลับเหมือนตัวรับ 99% เมื่อผสมกลับ 6 ชั่ว แต่การใช้เครื่องหมายโมเลกุลใช้เวลาในการผสมกลับ 4 ชั่ว

สรุปผลการทดลอง

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวดอกพะยอมไม่ให้ไวแสงด้วยวิธีผสมกลับ และคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ RM 8225 จะช่วยในการคัดเลือกยีนที่ไม่ไวแสงในระยะต้นกล้า ทำให้ได้ต้นผสมกลับที่ไม่ไวแสง

ตารางที่ 2 ลักษณะทางการเกษตรของลูกผสมกลับ BC_2F_2 ที่ไม่ไวแสง

Genotype	Plant Height (cm)	Days to flowering	Days to maturing	Flag leaf length (cm)	Flag leaf width (cm)	No tillers per hill	1000 grain weight (g)	Yield per plant (g)
BC_2F_2-1	70	96	129	31	1.9	26	23.13	0.74
BC_2F_2-2	73	101	134	24	1.1	10	12.50	0.35
BC_2F_2-3	74	86	119	28	1.0	8	18.02	1.46
BC_2F_2-4	97	97	130	39	1.5	19	21.31	1.30
BC_2F_2-5	80	97	130	20	0.8	5	16.11	0.29
BC_2F_2-6	100	101	134	42	1.7	19	16.00	0.56
BC_2F_2-7	87	91	124	29	1.2	13	17.86	1.00
BC_2F_2-8	81	96	129	36	1.5	19	16.67	0.95
BC_2F_2-9	54	91	124	21	1.2	11	16.58	0.63
BC_2F_2-10	80	96	129	37	1.5	20	19.37	2.46
BC_2F_2-11	91	86	119	40	1.5	23	35.59	2.10
BC_2F_2-12	82	86	119	41	1.0	16	15.83	0.57
BC_2F_2-13	77	91	124	31	0.8	8	26.67	0.64
BC_2F_2-14	89	99	132	21	1.5	20	15.31	0.98
BC_2F_2-15	75	99	132	31	1.2	17	26.28	1.13
BC_2F_2-16	79	93	126	35	1.5	6	15.38	0.20
BC_2F_2-17	88	104	137	33	1.4	10	20.00	0.24
BC_2F_2-18	74	91	124	21	0.8	15	19.75	1.60
BC_2F_2-19	72	96	129	28	1.5	9	14.17	0.17
BC_2F_2-20	74	96	129	26	0.9	7	28.00	0.56
BC_2F_2-21	52	91	124	27	1.4	17	22.14	2.28
BC_2F_2-22	84	91	124	33	1.3	11	24.29	1.36
BC_2F_2-23	82	91	124	43	1.5	7	13.75	0.11
BC_2F_2-24	74	91	124	24	1.0	19	-	2.15
BC_2F_2-25	74	93	126	28	1.0	21	18.11	0.96
BC_2F_2-26	90	91	124	36	1.0	7	22.38	0.47
BC_2F_2-27	79	96	129	48	1.0	5	18.16	0.69
BC_2F_2-28	74	96	129	24	1.5	7	-	0.04
BC_2F_2-29	98	93	126	39	1.6	27	20.55	2.63
BC_2F_2-30	83	86	119	24	1.5	16	17.75	1.81
BC_2F_2-31	82	86	119	40	1.0	12	16.43	0.46
sd	10.45	4.72	4.72	7.47	0.29	6.26	4.93	0.73
mean	80	93	126	32	1.3	14	19.59	1.00

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.

Dowdy, S., S. Weardon and D. Chilko. 2003. Statistics for Research. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Hasan, M.M., M.Y. Rafii, M.R. Ismail, M. Mahmood, H.A. Rahim, Md.A. Alam, S. Ashkani, Md. A. Malek and M.A. Latif. 2015. Marker-assisted backcrossing: a useful method for rice improvement. Biotechnology & Biotechnological Equipment 29(2): 237-254.

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

ทำการทดสอบลูกผสมกลับที่ไม่ไวแสงในแปลงทดลอง หากลูกผสมกลับไม่ดีเด่น ควรทำการผสมกลับกับพันธุ์ดอกพะยอมอีก 2-3 ครั้ง หรือผสมกับพันธุ์อื่น ๆ เพื่อสร้างพันธุ์ใหม่ที่ไม่ไวแสง หากลูกผสมกลับดีเด่น คัดเลือกลูกผสมกลับที่ดีเด่นเพื่อนำไปปลูกทดสอบในแปลงพืชแซมยางพาราหรือปาล์มน้ำมันของเกษตรกร ทำการประเมินลักษณะต่าง ๆ ของลูกผสมกลับที่ดีเด่นร่วมกับเกษตรกรต่อไป