การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ให้มีความหอม ต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง โดยใช้วิธีการผสมกลับ ร่วมกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก

วราวุฒิ โล๊ะสุข

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร
พฤษภาคม 2561
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ให้มีความหอม ต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง โดยใช้วิธีการผสมกลับ ร่วมกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก

วราวุฒิ โล๊ะสุข

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร
พฤษภาคม 2561
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ให้มีความหอม ต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง โดยใช้วิธีการผสมกลับร่วมกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก

ของ วราวุฒิ โล๊ะสุข

ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร
ของมหาวิทยาลัยพะเยา

.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์)

.....กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.มนัส ทิตย์วรรณ)

.....กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญฤทธิ์ สินค้างาม)

.....กรรมการ (ดร.ธีรยุทธ ตู้จินดา)

.....กรรมการ (ดร.ไวพจน์ กันจู)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์รัตนา อัตตปัญโญ)
คณบดีคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ
พฤษภาคม 2561

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณโครงการทุนสถานบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย จากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ สัญญาทุนเลขที่ TGIST 01–57–001 ที่ให้ทุนการศึกษา และค่าเล่าเรียนแก่ผู้วิจัย

ขอขอบพระคุณ ดร.ไวพจน์ กันจู อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้ให้ความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืชและการประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อการพัฒนาพันธุ์พืช ทักษะความรู้ในการปฏิบัติงาน และดูแลเอาใจใส่ตลอดเวลา ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.มนัส ทิตย์วรรณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญฤทธิ์ สินค้างาม กรรมการวิทยานิพนธ์ และ ดร.ภาวิณี จันทร์วิจิตร ที่ช่วยตรวจสอบความถูกต้องของวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ดร.ธีรยุทธ ตู้จินดา จากหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการวิทยานิพนธ์ และให้คำปรึกษา แนะนำ ติดตามงานวิจัย และอนุเคราะห์สถานที่ บุคลากร และทรัพยากรในการทดสอบโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้ง

ขอขอบคุณคุณศิริพร กออินทร์ศักดิ์ คุณศิริภา กออินทร์ศักดิ์ และเจ้าหน้าที่ จากหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าวทุกท่าน ที่กรุณาดูแลและให้คำแนะนำเกี่ยวกับการทดสอบโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้ง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการและแปลงปฏิบัติการสาขาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่อนุเคราะห์และให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือห้องปฏิบัติการ และดูแลงานแปลงต่าง ๆ จนสำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบคุณสมาชิกเกษตรศาสตร์รุ่น 11 แห่งมหาวิทยาลัยพะเยา เช่น คุณกิตติกร นามวงค์, คุณวีระพงษ์ กันแก้ว และท่านอื่น ๆ ที่คอยช่วยเหลืองานในด้านต่าง ๆ จนสำเร็จด้วยดีเสมอมา ขอขอบคุณรุ่นน้องเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยพะเยา ตั้งแต่รุ่น 12 – 17 เช่น คุณนิรุตติ์ โปทะปัญญา เป็นต้นที่ช่วยเหลืองานในด้านต่าง ๆ จนสำเร็จด้วยดีเสมอมา ขอขอบคุณบุคคลสำคัญ และเกษตรกรทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำช่วยเหลือด้านงานแปลง

ขอขอบคุณบิดามารดาที่ให้กำลังใจ และให้โอกาสแก่ข้าพเจ้าได้เล่าเรียน สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยพะเยา สถาบันการศึกษาที่ข้าพเจ้าเล่าเรียน ให้สถานที่ และทรัพยากรในการทำวิจัย

วราวุฒิ โล๊ะสุข

เรื่อง: การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ให้มีความหอม ต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง โดยใช้วิธีการผสมกลับร่วมกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก

ผู้วิจัย: วราวุฒิ โล๊ะสุข วิทยานิพนธ์: วท.ม. (วิทยาศาสตร์การเกษตร), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2561

ประธานที่ปรึกษา: ดร. ไวพจน์ กันจู, **กรรมการที่ปรึกษา:** ดร.ธีรยุทธ ตู้จินดา, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุญฤทธิ์ สินค้างาม

คำสำคัญ: ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1, การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก, ความหอม, โรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง

บทคัดย่อ

ข้าวสันป่าตอง 1 (SPT1) เป็นข้าวเหนียวไม่ไวต่อช่วงแสง และมีผลผลิตสูง เนื่องจากไม่มีความหอมและอ่อนแอต่อเชื้อโรคไหม้และโรคขอบใบแห้งบางไอโซเลท งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะปรับปรุงพันธุ์ข้าวสันป่าตอง 1 ให้มีความหอม ต้านทานต่อโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้งเพิ่มมากขึ้น โดยมียีนเป้าหมายที่ถ่ายทอดให้ข้าวสันป่าตอง 1 จำนวน 4 ยีน ได้แก่ *badh2, qBL11, xa5* และ *Xa21* และใช้วิธีการผสมกลับร่วมกับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก ผลการดำเนินการสามารถพัฒนาประชากรข้าวเหนียวถึงชั่วที่ F_3 pyramiding ที่มียีนเป้าหมายรวมตัวในรูปแบบต่าง ๆ จำนวน 7 รูปแบบ (36 สายพันธุ์) ในฐานพันธุกรรมสันป่าตอง 1 ในจำนวนนี้มีสายพันธุ์ที่มียีนเป้าหมายครบทั้ง 4 ยีน (*badh2* + *qBL11* + *xa5* + *Xa21*) จำนวน 2 สายพันธุ์ และเมื่อทำการประเมินความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในระยะต้นกล้า พบว่าข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ที่มียีน *xa5* และ *Xa21* หรืออย่างใดอย่างหนึ่ง มีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวสันป่าตอง 1 เมื่อประเมินความต้านทานต่อโรคไหม้ พบว่าความต้านทานไม่แตกต่างจากข้าวสันป่าตอง 1 เมื่อทำการทดสอบผลผลิตในสภาพน้ำสมบูรณ์ พบว่าข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่มีผลผลิตและลักษณะทางการเกษตรใกล้เคียงกับข้าวสันป่าตอง 1 และสายพันธุ์ที่มียีน *badh2* จะมีความหอม โดยข้าวเหนียวหอมสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ที่มีศักยภาพผลผลิตและมีความต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้งที่พัฒนาได้นี้ จะถูกคัดเลือกเพื่อนำไปปลูกทดสอบผลผลิตระหว่างสถานีต่อไป

Title: IMPROVEMENT OF SAN PAH TAWNG 1 RICE VARIETY FOR GRAIN FRAGRANCE AND RESISTANCE TO BLAST AND BACTERIAL BLIGHT DISEASES USING MARKER ASSISTED BACKCROSS BREEDING

Author: Waravut Losuk Thesis: M.S. (Agricultural Science), University of Phayao, 2018.

Advisor: Dr.Vaiphot Kanjoo**, Co-advisor:** Dr.Theerayut Toojinda, Assist. Prof. Dr.Bunyarit Sinkhangam,

Keywords: SPT1, Marker assisted selection, Fragrance, Blast, Bacterial blight

ABSTRACT

San Pah Tawng 1 (SPT1) is a non-photosensitive glutinous rice cultivar with high yield potential. However, this cultivar is a non-fragrant rice and susceptible to some isolates of blast (BL) and bacterial blight (BB). This research aims to improve SPT1 for fragrance and broad spectrum resistances to BL and BB diseases. All of 4 targeted genes including *badh2, qBL11*, *xa5* และ *Xa21* were introgressed into SPT1 rice by using marker assisted backcrossing breeding. Results showed that 36 lines of F_3 pyramiding glutinous rice in the genetic background of SPT1 classify as 8 different gene combinations were developed. Of these, two of pyramiding lines carrying all 4 targeted genes in a combination (*badh2*+*qBL11*+*xa5*+*Xa21*) were found. They were evaluated for BB and BL resistance at seedling stage. The improved lines carrying both of *xa5* and *Xa21* or either of them had higher level of BB resistance than SPT1. The resistance to BL were also evaluated and the results showed non-significant with SPT1. Yield and yield components were observed under irrigated condition, almost of pyramiding lines showed non-significant grain yield comparing with SPT1 and most of them have plant-type skew to SPT1. Lines containing *badh2* allele displayed fragrance. Thus the new improved fragrant glutinous rice for BL and BB resistances with high yield potential will be selected for testing an inter-stationary yield trials later.

สารบัญ

บทที่ **หน้า**

1 บทนำ..... 1

ที่มาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

ประโยชน์ที่คาดว่าได้รับจากงานวิจัย..... 3

ขอบเขตของงานวิจัย..... 4

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5

การเพาะปลูกข้าวในภาคเหนือตอนบน..... 5

ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 5

กลิ่นหอมในข้าว 6

โรคไหม้ 8

โรคขอบใบแห้ง 9

เครื่องหมายดีเอ็นเอกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าว 10

โครงการพัฒนาพันธุ์ข้าวสันป่าตอง 1 ให้มีความหอม ต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้งอย่างกว้าง..... 11

3 วิธีการดำเนินการวิจัย..... 13

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา..... 13

การสร้างประชากรข้าวสันป่าตอง 1 ให้มียีนความหอม ยีนต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง..... 14

การตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากรข้าวรุ่นลูกในแต่ละชั่ว..... 16

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

การประเมินความต้านทานต่อโรคไหม้..... 19

การประเมินความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง..... 21

การทดสอบผลผลิต..... 21

การตรวจสอบความหอม..... 22

การบันทึก และวิเคราะห์ข้อมูล..... 22

สถานที่ทำการทดลอง..... 23

ระยะเวลาการดำเนินการ..... 23

4 ผลการทดลอง..... 24

ผลการพัฒนาประชากรลูกผสมกลับสันป่าตอง 1 ให้มียีนความหอม QTL ต้านทานโรคไหม้และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง..... 24

ผลการพัฒนาประชากรลูกผสมกลับ (BILs) ชั่วที่ BC_2F_2 ในฐานพันธุกรรมข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ให้มียีนความหอม..... 24

ผลการพัฒนาประชากรลูกผสมกลับ (BILs) ชั่วที่ BC_2F_2 ในฐานพันธุกรรมข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ให้มี QTL ต้านทานโรคไหม้ และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง..... 25

ผลการรวมยีนความหอม QTL ต้านทานโรคไหม้ และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งเข้าสู่ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1..... 26

ผลการประเมินความต้านทานต่อโรคไหม้..... 30

ผลการประเมินความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง..... 37

ผลการทดสอบผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิต..... 41

ผลการทดสอบความหอม..... 46

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) ของความต้านทานโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้งร่วมกับน้ำหนักผลผลิตต่อไร่..... 49

5 บทสรุป..... 51

อภิปรายผลการทดลอง..... 51

สรุปผลการทดลอง..... 54

ข้อเสนอแนะ..... 54

บรรณานุกรม..... 55

ภาคผนวก..... 62

ภาคผนวก ก วิธีการสกัดดีเอนเอ วิธีการเตรียมเจล PAGE และ วิธีการย้อมเจล PAGE..... 63

ภาคผนวก ข รายชื่อเชื้อรา Pyricularia oryzae สาเหตุโรคไหม้ที่ใช้ในการทดลอง และระดับคะแนนเฉลี่ยของการเกิดโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง และน้ำหนักผลผลิตต่อไร่ของสายพันธุ์ ข้าวจำนวน 25 สายพันธุ์ ที่นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก..... 66

ประวัติผู้วิจัย..... 71

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

1 การสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ F_1 ที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างสันป่าตอง 1 x กข6 และสันป่าตอง 1 x RD6–BL–BB–No.15 และจำนวนต้นที่แสดงจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัสที่ตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอ Aromarker และ PB7–8..... 12

2 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากรข้าวเหนียวที่เกิดจากการผสมเพื่อการรวมยีนความหอม (*badh2*) QTL ต้านทานโรคไหม้ (*qBL11*) และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง (*xa5* และ *Xa21*) เข้าสู่ข้าวสันป่าตอง 1 17

3 องค์ประกอบของสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาPCR..... 18

4 สรุปผลการพัฒนาประชากรข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ให้มียีนความหอม (*badh2*) QTL ต้านทานโรคไหม้ (*qBL11*) และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง (*xa5* และ *Xa21*) ในชั่วต่าง ๆ..... 29

5 รูปแบบการรวมตัวของยีนเป้าหมายแบบต่าง ๆ จำนวน 7 รูปแบบที่เป็นโฮโมไซกัสในประชากรข้าวเหนียวชั่วที่ F_2 pyramiding..... 30

6 ข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ในชั่วที่ $F_{3:4}$ pyramiding จำนวน 32 สายพันธุ์ที่คัดเลือกเพื่อนำไปทดสอบความต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง..... 31

7 ผลการทดสอบความต้านทานต่อโรคไหม้ของประชากรข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ ที่เกิดจากการรวมยีนในชั่วที่ $F_{3:4}$ pyramiding จำนวน 32 สายพันธุ์..... 34

8 ระดับคะแนนเฉลี่ยของการเข้าทำลายของโรคไหม้จำนวน 6 กลุ่มเชื้อ ในข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่จำนวน 32 สายพันธุ์ ที่มีรูปแบบการรวมตัวของยีนที่แตกต่างกันจำนวน 7 รูปแบบ เปรียบเทียบกับพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อแม่... 36

9 ผลการทดสอบความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งของประชากรข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ที่เกิดจากการรวมยีนในชั่วที่ $F_{3:4}$ pyramiding จำนวน 32 สายพันธุ์..... 39

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง **หน้า**

10 ระดับคะแนนเฉลี่ยของการเข้าทำลายของโรคขอบใบแห้ง จำนวน 4 ไอโซเลทในข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่จำนวน 32 สายพันธุ์ ที่มีรูปแบบการรวมตัวของยีนที่แตกต่างกันจำนวน 7 รูปแบบ เปรียบเทียบกับพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อแม่และพันธุ์มาตรฐาน..... 41

11 ข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ชั่วที่ $F_{3:4}$ pyramiding จำนวน 24 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกเพื่อนำไปปลูกทดสอบผลผลิตในสภาพน้ำสมบูรณ์..... 45

12 ลักษณะผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตของข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่จำนวน 24 สายพันธุ์ ที่ปลูกทดสอบผลผลิตในสภาพน้ำสมบูรณ์ ของฤดูปลูกนาปี พ.ศ. 2560 ในพื้นที่จังหวัดพะเยา..... 47

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	โครงสร้างของยีน *badh2* บนโครโมโซม 8 ซึ่งควบคุมลักษณะความหอมในข้าว และตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน.....	8
2	แผนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ที่มียีนความหอม ยีนต้านทานโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้ง โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก.....	16
3	คะแนนความเสียหายของข้าวที่เกิดจากเชื้อโรคไหม้ ที่ประเมินในสภาพโรงเรือน	20
4	ประชากรข้าวเหนียวลูกผสมกลับชั่วที่ BC_1F_1 ถึง BC_2F_2 ที่พัฒนาพันธุ์มาจากข้าวสันป่าตอง 1 เพื่อให้มียีนความหอม (*badh2*) และมี QTL ต้านทานโรคไหม้และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง.....	25
5	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็น 5 เครื่องหมายในประชากรข้าวเหนียวที่เกิดจากการรวมยีนเป้าหมายในชั่วที่ F_2 pyramiding.....	27
6	ประชากรข้าวเหนียวชั่วที่ F_1 pyramiding, F_2 pyramiding และ F_3 pyramiding ที่พัฒนาสายพันธุ์มาจากข้าวสันป่าตอง 1 โดยการรวมยีน *badh2*, *qBL11*, *xa5* และ *Xa21* และโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก	28
7	ผลการประเมินความต้านทานโรคไหม้ในสภาพโรงเรือนในข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ที่พัฒนาพันธุ์มาจากข้าวสันป่าตอง 1.....	36
8	ผลการประเมินความต้านทานโรคขอบใบแห้งในสภาพโรงเรือนในข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ที่พัฒนาพันธุ์มาจากข้าวสันป่าตอง 1.....	38
9	ประชากรข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ จำนวน 24 สายพันธุ์ ที่ปลูกทดสอบผลผลิตในสภาพน้ำสมบูรณ์ของแปลงเกษตรกรในจังหวัดพะเยาในฤดูปลูกนาปี พ.ศ. 2560.....	45
10	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) โดยจัดเป็น 5 กลุ่มตามความต้านทานต่อโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้งร่วมกับน้ำหนักผลผลิตต่อไร่.....	50

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 (San Pah Tawng 1; SPT1) เป็นข้าวเหนียวไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นเตี้ย ลำต้นแข็งแรงทนทานต่อการหักล้ม สามารถปลูกได้ทั้งฤดูนาปีและนาปรัง ผลผลิตสูง เฉลี่ย 630 กิโลกรัมต่อไร่ จึงเป็นที่นิยมปลูกของเกษตรกรในพื้นที่นาชลประทานทางภาคเหนือตอนบนเช่น จังหวัดแพร่ ลำปาง เชียงใหม่ พะเยา และเชียงราย (กรมการข้าว, 2551) โดยได้รับความนิยมรองลงมาจากข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 แต่เนื่องจากข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 เป็นข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม จึงไม่เป็นที่นิยมของผู้บริโภคเท่ากับ กข6 การพัฒนาพันธุ์ข้าวสันป่าตอง 1 ให้มีความหอม และมีคุณภาพหุงต้มคล้ายกับ กข6 และมีความต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้งอย่างกว้าง จะทำให้มีข้าวเหนียวที่มีลักษณะดีเพิ่มขึ้น ตลอดจนเป็นการเพิ่มความความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวปลูกให้กับเกษตรกร ทั้งยังจะช่วยลดความเสี่ยงอันเนื่องมาจากการระบาดของโรคและแมลงที่ไม่สามารถคาดการณ์ได้ล่วงหน้า และยังทำให้คนไทยมีข้าวเหนียวหอมคุณภาพดีไว้บริโภคเพิ่มอีก 1 พันธุ์ เนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์ข้าวแบบดั้งเดิมใช้เวลานานมากกว่าจะประสบความสำเร็จ เช่น ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ใช้เวลาปรับปรุงพันธุ์ประมาณ 16 ปี จึงประกาศรับรองพันธุ์ (กรมการข้าว, 2551) ในปัจจุบันจึงได้มีการนำเทคโนโลยีด้านเครื่องหมายดีเอ็นเอเข้ามาช่วยในการคัดเลือกต้นพืชให้มีความแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น (สุรีพร เกตุงาม, 2546) จึงทำให้ระยะเวลาของการปรับปรุงพันธุ์ข้าวนั้นสั้นลง ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงได้นำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อลักษณะความหอม และลักษณะต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้งมาคัดเลือกต้นข้าวลูกผสมกลับสันป่าตอง 1 ที่ได้รับยีนดังกล่าวในขั้นตอนของการปรับปรุงพันธุ์

ลักษณะเป้าหมายที่ต้องการปรับปรุงในข้าวสันป่าตอง 1 มี 3 ลักษณะ ได้แก่ ความหอม ความต้านทานต่อโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง ซึ่งความหอมเป็นลักษณะหนึ่งที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เกิดจากสารหอม 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ถูกควบคุมด้วยยีน *betaine aldehyde dehydrogenase* (*badh2*) หรือ *amino aldehyde dehydrogenase* (*AMADH*) หรือ *Os2AP* ยีนนี้มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 8 ทำให้ข้าวสามารถสร้างสารหอมที่มีกลิ่นคล้ายใบเตย และทำให้ราคาจำหน่ายของข้าวหอมสูงขึ้น โรคไหม้ (blast) เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* เป็นโรคที่

พบการระบาดอย่างมากในข้าวนาน้ำฝนในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สามารถเข้าทำลายต้นกล้าในทุกระยะของการเจริญเติบและถ้าทำลายในระยะข้าวตั้งท้องถึงระยะออกรวงจะทำให้รวงข้าวลีบไม่ติดเมล็ดผลผลิตเสียหาย ถ้ามีการระบาดรุนแรงจะทำให้ผลผลิตลดลงถึง 60% (Surin, et al., 1989) หรือไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ กลุ่มยีนที่ให้ความต้านทานที่สำคัญ คือ QTL (quantitative trait locus) *qBL11* จากข้าวเจ้าหอมนิล ส่วนโรคขอบใบแห้ง (bacterial blight) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* เป็นโรคที่พบการระบาดในข้าวนาน้ำฝนและนาชลประทาน เข้าทำลายต้นข้าวได้ในระยะแตกกอ จนถึงออกรวง ทำให้ใบแห้ง ท่อน้ำท่ออาหารอุดตันหรือแห้งเฉาตาย การระบาดของโรคอาจทำให้ผลผลิตลดลง 20–30% ถ้ามีการระบาดรุนแรงอาจทำให้ผลผลิตลดลงถึง 50% (Fred, et al., 2016) มียีนต้านทานที่สำคัญ คือ *xa5* และ *Xa21* จะเห็นได้ว่าลักษณะทั้งสามนั้น ถูกควบคุมด้วยพันธุกรรมและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจอย่างมาก จึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงข้าวพันธุ์ปลูกที่มีศักยภาพผลผลิตสูง แต่ว่าขาดลักษณะทั้งสาม เพื่อเป็นการเพิ่มรายได้และลดต้นทุนการผลิตให้กับเกษตรกรต่อไป

ในปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีด้านเครื่องหมายดีเอ็นเอ หรือ DNA markers ที่จำเพาะต่อยีนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และถูกนำมาใช้ติดตามยีนเป้าหมายจากพันธุ์ให้ (donor parent) ที่ถูกถ่ายทอดมาให้พันธุ์รับ (recipient parent) เรียกว่าการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection; MAS) โดยจะใช้ร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบมาตรฐาน (conventional breeding) สามารถใช้ร่วมกับการผสมกลับ (marker assisted backcrossing method; MAB) และคู่ผสมเดี่ยว (single cross) ทำให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถคัดเลือกต้นพืชที่มีลักษณะที่ต้องการได้อย่างแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น เนื่องจากเป็นการคัดเลือกระดับยีน ทำให้โครงการปรับปรุงพันธุ์มีความก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว ตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่ประสบความสำเร็จจากการใช้ MAS เช่น กข51 (ขาวดอกมะลิ 105 ทนน้ำท่วมฉับพลัน) ธัญสิริน (กข6 ต้านทานโรคไหม้) (ธีรยุทธ ตู้จินดา, 2555) ซึ่งเป็นข้าวนาปีไวต่อช่วงแสง และข้าวปิ่นเกษตร 1 (ข้าวหอมผลผลิตสูงไม่ไวแสง) ซึ่งเป็นข้าวนาชลประทาน อายุหนัก ไม่ไวแสง ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมนำมาใช้คัดเลือกในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ส่วนใหญ่จะเป็น gene specific marker ซึ่งมีความจำเพาะต่อยีนที่ควบคุมลักษณะเป้าหมาย และเป็น functional marker สามารถใช้แยกต้นพืชที่มีลักษณะที่ต้องการแตกต่างกันอย่างชัดเจน เช่น Aromarker, 3In2AP marker ที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 8 ใช้จำแนกข้าวหอม/ไม่หอม (ไวพจน์ กันจู และคณะ, 2556; Vanavichit, et al., 2004; Myint, et al., 2012) PB7–8 จำเพาะต่อยีน *Xa21* บนโครโมโซม 11 (อยู่ใกล้กับ *qBL11*) และ PAxa5 จำเพาะต่อยีน *xa5* บนโครโมโซม 5 ใช้คัดเลือกข้าวที่มีความ

ต้านทานโรคขอบใบแห้ง (Korinsak, Sirithunya and Toojinda ,2014) ในบางลักษณะที่ยังไม่มีการค้นพบยีนที่ควบคุม มีเพียงแต่ข้อมูล QTL ที่ควบคุมลักษณะนั้น ๆ ก็จะใช้ DNA marker ชนิด SSR markers ที่มีตำแหน่งอยู่บนหรือใกล้กับ QTL ดังกล่าวเป็นตัวคัดเลือก เนื่องจาก SSR marker เป็น Co-dominant marker สามารถใช้แยกจีโนไทป์เฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ออกจากโฮโมไซกัส (homozygous) ได้ และมีความหลากหลายสูง (highly polymorphism) เช่น RM224 ที่มีตำแหน่งบนโครโมโซม 11 ใกล้เคียงกับ QTL ต้านทานโรคไหม้ (ศรีสวัสดิ์ ขันทอง, ธีรยุทธ ตู้จินดา และสุรีพร เกตุงาม, 2560)

โครงการวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะปรับปรุงพันธุ์ข้าวสันป่าตอง 1 ให้มีความหอม ต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง โดยใช้วิธีการผสมกลับร่วมกับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก โดยมียีนเป้าหมายจำนวน 4 ยีน ได้แก่ *badh2, xa5, Xa21* และ *qBL11* ที่ต้องการถ่ายทอดให้กับข้าวสันป่าตอง 1 และใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ Aromarker, PB7-8, PAxa5, RM144 และ RM224 เป็นตัวตรวจสอบจีโนไทป์และใช้คัดเลือกต้นข้าวในประชากรชั่วลูก เพื่อพัฒนาพันธุ์ข้าวสันป่าตอง 1 ให้เป็นข้าวเหนียวหอม ไม่ไวต่อช่วงแสง ต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง ซึ่งจะนำไปทดสอบผลผลิต และสามารถนำไปส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก เนื่องจากเป็นพันธุ์ข้าวที่มีผลผลิตสูง คุณภาพหุงต้มดี และต้านทานต่อโรคที่สำคัญ ทำให้ยกระดับเศรษฐกิจและชีวิตความเป็นอยู่ของชาวนาไทยให้สูงขึ้น ตลอดจนทำให้คนไทยได้บริโภคข้าวเหนียวที่มีความหอม น่ารับประทานมากขึ้นด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ให้มียีนความหอม และยีนต้านทานต่อโรคไหม้และโรคขอบใบแห้งแบบกว้าง (broad-spectrum resistance) โดยใช้วิธีการผสมกลับร่วมกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก

ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

1. ประโยชน์ต่อเกษตรกรและผู้บริโภค

ได้ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ที่มียีนความหอม และยีนต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้งที่มีความต้านทานแบบกว้าง มีผลผลิตสูง ต้นเตี้ย ไม่หักล้ม และไม่ไวต่อช่วงแสง สามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี เพื่อนำไปส่งเสริมให้เกษตรกรในพื้นที่นาชลประทานและนาน้ำฝนในเขตภาคเหนือตอนบนได้ปลูก ตลอดจนทำให้คนไทยได้บริโภคข้าวเหนียวที่มีความหอม และน่ารับประทานเพิ่มขึ้นอีก 1 พันธุ์

2. ประโยชน์ต่อนักปรับปรุงพันธุ์ข้าว

นักปรับปรุงพันธุ์ของกรมการข้าว และมหาวิทยาลัยต่าง ๆ หรือผู้สนใจสามารถใช้สันป่าตอง 1 สายพันธุ์ปรับปรุงใหม่เป็นเชื้อพันธุกรรม (genetic materials) สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป เนื่องจากว่าสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่มียีนความหอม QTL ต้านทานโรคไหม้ และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งแบบกว้าง และลักษณะเด่นอื่น ๆ ได้แก่ ผลผลิตสูง ต้นเตี้ย ลำต้นแข็งต้านทานการหักล้ม สามารถนำไปต่อยอดงานปรับปรุงพันธุ์ได้

ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการพัฒนาประชากรข้าวลูกผสมกลับ (backcross introgression lines: BILs)ถึงชั่วที่ BC_2F_2 จากคู่ผสม 2 คู่ ได้แก่ 1) สันป่าตอง 1 x กข6 ให้มียีนความหอม (*badh2*) และ 2) สันป่าตอง 1 x RD6-BL-BB-No.15 ให้มี QTL ต้านทานโรคไหม้ (*qBL11*) และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง (*xa5* และ*Xa21*) ในฐานพันธุกรรมข้าวสันป่าตอง 1 โดยใช้วิธีการผสมกลับร่วมกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 5 ตำแหน่งตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากรรุ่นลูกแต่ละชั่ว ได้แก่ Aromarker, PB7-8, PAxa5, RM144 และ RM224 หลังจากนั้นนำประชากรชั่วที่ BC_2F_2 จากคู่ผสมทั้ง 2 คู่ ที่มียีนเป้าหมายเป็นโฮโมไซกัสมาผสมข้ามเพื่อรวมยีนทั้ง 4 ยีนเข้าไปในต้นเดียวกัน คัดเลือกจนถึงชั่วที่ F_2 pyramiding หลังจากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ที่มียีนเป้าหมาย และแสดงจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัส ในรูปแบบการรวมตัวของยีนแบบต่าง ๆ (combination) มาประเมินความต้านทานต่อโรคไหม้และโรคขอบใบแห้งในสภาพโรงเรือน หลังจากนั้น และทำการทดสอบผลผลิตภายใต้สภาพน้ำสมบูรณ์เพื่อคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสำหรับนำไปทดสอบผลผลิตระหว่างสถานี (Inter-stationary yield trials) ต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเพาะปลูกข้าวในภาคเหนือตอนบน

พื้นที่ปลูกข้าวในภาคเหนือของไทย ส่วนใหญ่เป็นพื้นที่นาน้ำฝน พันธุ์ข้าวที่ใช้ปลูกส่วนใหญ่เป็นข้าวหอม ไวต่อช่วงแสง มีข้าวเจ้า 2 พันธุ์ ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) และ กข15 (RD15) ส่วนข้าวเหนียว 1 พันธุ์ ได้แก่ กข6 (RD6) เกษตรกรส่วนใหญ่จะปลูกข้าวเจ้าไว้ขาย ส่วนข้าวเหนียวจะปลูกไว้รับประทานเอง นอกจากนี้ยังมีพันธุ์ข้าวเหนียวอื่น ๆ ที่เกษตรกรในบางพื้นที่ปลูกด้วย เช่น สันป่าตอง 1 และ กข10 เป็นต้น เนื่องจากข้าวทั้งสองพันธุ์เป็นข้าวเหนียวไม่ไวต่อช่วงแสง มีผลผลิตสูง และลำต้นเตี้ย แต่ไม่หอม จึงไม่เป็นที่นิยมรับประทานของผู้บริโภค แต่จะปลูกไว้เพื่อจำหน่าย ส่วนฤดูนาปรังจะพบการทำนาเฉพาะในพื้นที่ที่มีระบบชลประทานเท่านั้น โดยจังหวัดในเขตภาคเหนือตอนบนที่มีพื้นที่การทำนาปรังมาก ได้แก่ เชียงราย ลำปาง และพะเยา จากรายงานการประชุมคณะอนุกรรมการติดตามกำกับดูแลการรับจำนำระดับจังหวัด จังหวัดพะเยา ครั้งที่ 5/2556 พบว่าในฤดูนาปรังปี 2555/2556 จังหวัดพะเยามีพื้นที่ปลูกข้าวนาปรังมากกว่า 30,000 ไร่ (สำนักงานการค้าภายในจังหวัดพะเยา, 2556) เกษตรกรส่วนใหญ่จะปลูกข้าวเจ้าที่มีแป้งอะไมโลสสูง เช่น พิษณุโลก 2 กข41 และ กข47 ซึ่งมีราคาต่ำกว่าข้าวเหนียวประมาณ 1,000 บาท/ตัน (สำนักงานการค้าภายในจังหวัดพะเยา, 2556) ดังนั้นถ้าเกษตรกรนำพันธุ์ข้าวเจ้าหรือข้าวเหนียวที่มีความหอม คุณภาพหุงต้มดี อ่อนนุ่ม ต้านทานโรคที่สำคัญ และปรับตัวได้ดีกับพื้นที่ไปปลูก จะทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มมากขึ้น และสามารถสร้างมูลค่าทางการเงินต่อพื้นที่ได้เพิ่มมากขึ้นด้วย

ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1

ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 (San Pah Tawng 1) ได้จากการผสมพันธุ์ข้าวสายพันธุ์ BKNLR75001 -B3-CNT-B4-RST-36-2 กับพันธุ์ กข2 รับรองพันธุ์เมื่อวันที่ 19 มกราคม 2543 โดยกรมวิชาการเกษตร เป็นข้าวเหนียว ไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นเตี้ย จึงไม่หักล้ม สามารถปลูกได้ทั้งฤดูนาปีและนาปรัง ผลผลิตค่อนข้างสูง ต้านทานโรคไหม้ระดับปานกลาง จึงเป็นที่นิยมปลูกของเกษตรกรในพื้นที่นาชลประทานภาคเหนือตอนบน และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดแพร่ ลำปาง เชียงใหม่ พะเยา และเชียงราย โดยได้รับความนิยมรองลงมาจากข้าวเหนียว กข6 แต่เนื่องจากข้าวสันป่าตอง 1 เป็นข้าวไม่หอม จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยมของผู้บริโภคเท่ากับ กข6 แต่

ว่าข้าวสันป่าตอง 1 เป็นข้าวเหนียวที่มีศักยภาพให้ผลผลิตสูง ถ้ามีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวสันป่าตอง 1 ให้มี ความหอม อ่อนนุ่ม เช่นเดียวกับ กข6 และมีต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้งมากขึ้น จะทำให้ข้าวสันป่าตอง 1 เป็นที่นิยมของเกษตรกรและผู้บริโภคได้เช่นกัน ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวสันป่าตอง 1 ตามข้อมูลของกรมการข้าวระบุว่า เป็นพันธุ์ข้าวเหนียวไม่ไวต่อช่วงแสง สามารถปลูกได้ตลอดปี สูงประมาณ 119 เซนติเมตร อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 130–135 วัน ทรงกอตั้ง ใบสีเขียว กาบใบสีเขียว ใบธงตั้งตรง รวงยาว ระแง้ถี่ รวงแน่น คอรวงสั้น ฟางแข็ง ใบแก่ช้า เมล็ดข้าวเปลือกสีฟาง ระยะพักตัวของเมล็ดประมาณ 8 สัปดาห์ เมล็ดข้าวกล้อง กว้าง x ยาว x หนา = 2.2 x 7.1 x 1.8 มิลลิเมตร ข้าวเหนียวสุกอ่อนนุ่ม และให้ผลผลิตสูง เฉลี่ยประมาณ 630 กิโลกรัมต่อไร่ (กรมการข้าว, 2551)

กลิ่นหอมในข้าว

ความหอมเป็นลักษณะหนึ่งที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ ทำให้ข้าวมีมูลค่าเพิ่มมากขึ้น ทำให้ข้าวหุงสุกน่ารับประทาน ข้าวหอมที่คนทั่วโลกรู้จักกันอย่างแพร่หลายมี 2 ชนิด คือ ข้าวหอมในกลุ่มบาสมาติ (basmati) และข้าวหอมในกลุ่มหอมมะลิ (jasmine rice) ปัจจุบันตลาดข้าวหอมโลกมีมูลค่าประมาณ 80,000– 100,000 ล้านบาท (IFAMA, 2013) ข้าวหอมมะลิไทยเป็นข้าวที่ได้รับความนิยมทั่วโลก เพราะมีคุณภาพดี ทำให้ข้าวสามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศไทยปีละกว่าหลายหมื่นล้านบาท ข้าวเจ้าหอมของไทยที่มีชื่อเสียง ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 และกข15 ส่วนข้าวเหนียวหอมที่มีคุณภาพดี ได้แก่ กข6 โดยข้าวหอมของไทยเป็นที่ต้องการของผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศ ราคาขายของข้าวหอมจะสูงกว่าข้าวไม่หอม ดังจะเห็นได้จากราคาข้าวหอมที่เข้าร่วมโครงการรับจำนำข้าวเปลือกของภาครัฐฯ ที่กำหนดให้ข้าวหอมมะลิ มีราคาสูงกว่าข้าวขาวทั่วไป โดยข้าวหอมมะลิที่มีพื้นที่ปลูกใน 23 จังหวัด (อยู่ในภาคเหนือ 3 จังหวัด ได้แก่ พะเยา เชียงราย และเชียงใหม่ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย 20 จังหวัด) จะมีราคาสูงกว่าข้าวหอมมะลิที่ปลูกจากภูมิภาคอื่น ๆ และต้องใช้ชื่อว่าข้าวหอมจังหวัดนั้น ๆ เนื่องจากว่าข้าวหอมมะลิที่ปลูกในพื้นที่ดังกล่าว จัดเป็นข้าวหอมมะลิคุณภาพดี มีกลิ่นหอมมากกว่าข้าวหอมจากภูมิภาคอื่น ๆ เนื่องจากปริมาณสารหอมในข้าวจะขึ้นอยู่กับพันธุกรรมแล้วยังขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในแหล่งที่ปลูกอีกด้วย (กมลวรรณ เรียบร้อย และคณะ, 2556)

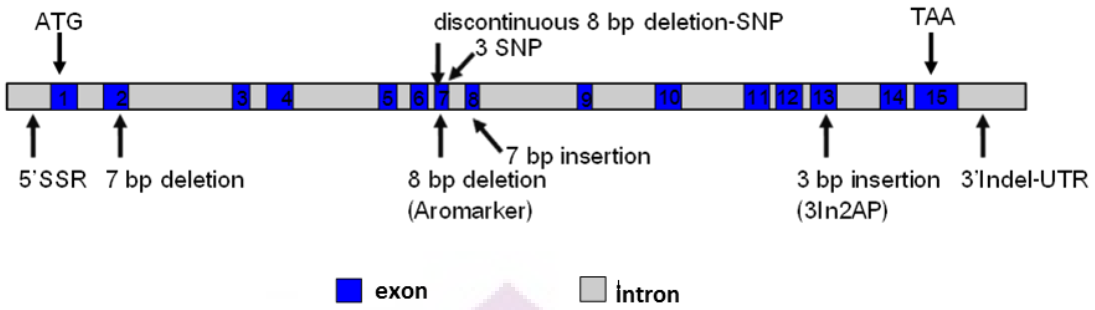
กลิ่นหอมของข้าวเกิดจากการผสมผสานของสารระเหยมากกว่า 100 ชนิด (Buttery, Ling and Juliano, 1983; Petrov, et al., 1996) แต่มีสารที่เป็นองค์ประกอบหลักคือสาร 2–Acetyl–1–pyrroline (2AP) เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน มีกลิ่นหอมคล้ายใบเตย ความหอมในข้าวจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับระดับปริมาณของสาร 2AP ในข้าวหอมมี

ปริมาณของสาร 2AP มากกว่าข้าวไม่หอมถึง 100 เท่า (Grosch and Schieberle, 1997) การตรวจสอบความหอมสามารถทำได้โดยใช้วิธีการสูดดม ซึ่งเป็นวิธีที่มีความคลาดเคลื่อนสูง หรืออาจทำได้โดยการวัดปริมาณสาร 2AP ในเมล็ดข้าวโดยใช้ gas–chromatography/mass–spectrometry (GC–MS) (Wongpornchai, et al., 2004) และเทคนิค GCxGC–TOFMS (สุปรีดา หอมกลิ่น, จิระนุช นิตยาธารีกุล และ สุกัญญา วงศ์พรชัย, 2555) ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะใช้ค่าใช้จ่ายสูงมากในการวิเคราะห์ และทั้งสองวิธีจะไม่สามารถใช้ตรวจสอบความหอมในเมล็ดข้าวที่สารหอมระเหยออกไปหมด เนื่องจากการเก็บเมล็ดข้าวไว้นาน ดังนั้นจึงทำให้การตรวจสอบข้าวหอมใช้เวลานานและต้องเก็บรักษาตัวอย่างที่จะใช้ไว้เป็นอย่างดี

ลักษณะความหอมในข้าวถูกควบคุมด้วยยีนหลัก (major gene) ที่ทำหน้าที่สร้างสารหอม 2AP ในข้าว ได้แก่ *betaine aldehyde dehydrogenase* (*badh2*) หรือ *amino aldehyde dehydrogenase* (*AMADH*) หรือมีอีกชื่อหนึ่งว่ายีน *Os2AP* ยีนนี้มีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซม 8 เป็นยีนด้อยทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ BADH2 ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม amino aldehyde dehydrogenase ยีน *badh2* ประกอบด้วย 15 exon 14 intron (ภาพ 1) กำหนดรหัสการสร้างโปรตีนที่มีจำนวนกรดอะมิโนจำนวน 503 ตัว ถ้าเกิดความผิดปกติของลำดับเบสในยีนนี้แล้วทำให้เอนไซม์ BADH2 ไม่สามารถทำงานได้ เช่น ตำแหน่ง 8 bp deletion (GATTAGGC) ที่ exon 7 ซึ่งเป็น common allele พบในข้าวหอมไทยและข้าวหอมส่วนใหญ่ของโลก (Vanavichit, et al., 2004) ซึ่งตำแหน่งนี้จะเรียกอีกอย่างว่า discontinuous 8 bp deletion (Amarawathi, et al., 2008) ตำแหน่ง 7 bp deletion (CGGGCGC) ที่ exon 2 (Shi, et al., 2008) ตำแหน่ง 3 bp insertion ที่ exon 13 ที่พบในข้าวหอมพื้นเมืองจากพม่า (Myint, et al., 2012) ตำแหน่ง 3 SNP ที่ exon7 (Bradbury, et al., 2005) และ ตำแหน่ง 7 bp insertion ที่ exon 8 (Amarawathi, et al., 2008) จะส่งผลให้โพรลีน (proline) เปลี่ยนไปเป็นสารหอม 2AP (Yoshihashi, Huong and Inatomi, 2002) ยีน *badh2* จะมีความเหมือนกับยีน *betaine aldehyde dehydrogenase* (*BADH*) บนโครโมโซม 4 ค่อนข้างมาก ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเป็น minor QTL ที่ควบคุมลักษณะความหอมในข้าวเช่นกัน (Lorieux, et al., 1996)

จากองค์ความรู้เกี่ยวกับยีนความหอมดังกล่าวจึงได้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อยีน *badh2* ที่สามารถใช้จำแนกข้าวหอมออกจากข้าวไม่หอมได้ ได้แก่ Aromarker ที่ใช้ตรวจสอบข้าวหอมไทยและข้าวหอมส่วนใหญ่จากทั่วโลก (Vanavichit, et al., 2004; Wanchana, et al., 2005) และ 3In2AP marker (Myint, et al., 2012) ที่ใช้ตรวจสอบข้าวหอมพื้นเมืองจากประเทศเมียนม่าร์ ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 2 ตำแหน่ง สามารถใช้คัดเลือกต้นข้าวที่มีความหอมออกจากข้าวไม่หอมได้อย่างรวดเร็วและมีความแม่นยำถึงระดับ

ยีน (ไวพจน์ กันจู และคณะ, 2556) เพื่อเป็นการลดระยะเวลาในการคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความหอมให้สั้นลงได้



ภาพ 1 โครงสร้างของยีน *badh2* บนโครโมโซม 8 ซึ่งควบคุมลักษณะความหอมในข้าว และตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน

ที่มา: ไวพจน์ กันจู, 2560

โรคไหม้

โรคไหม้ (blast) เป็นโรคที่พบการระบาดอย่างมากข้าวในนาน้ำฝนทั้งภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* หรือมีอีกชื่อหนึ่งว่า *Magnaporthe grisea* สามารถเข้าทำลายต้นกล้าในทุกระยะของการเจริญเติบโต และถ้าทำลายในระยะข้าวตั้งท้อง จะทำให้รวงข้าวลีบไม่ติดเมล็ด และผลผลิตเสียหาย ถ้ามีการระบาดรุนแรงจะทำให้ไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ ตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคไหม้มีตำแหน่งอยู่บนหลายโครโมโซม จากการศึกษาของ Noenplab, et al. (2006) โดยใช้ประชากรข้าวลูกผสมสายพันธุ์แท้ (recombinant inbred lines; RILs) จำนวน 587 สายพันธุ์ ที่ได้จากคู่ผสมระหว่างข้าวขาวดอกมะลิ 105 x ข้าวเจ้าหอมนิล ประเมินความต้านทานโดยใช้เชื้อราโรคไหม้ 3 ไอโซเลท พบว่า QTL ที่ควบคุมลักษณะโรคไหม้ จำนวน 14 QTL ที่วางตัวอยู่บนโครโมโซม 1, 2, 11 และ 12 และพบว่าข้าวเจ้าหอมนิลมี QTL บนโครโมโซม 1 (*qBL1*) และ 11 (*qBL11*) เป็นตัวให้ความต้านทานต่อเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท และ QTL บนโครโมโซม 12 มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อบางไอโซเลท และในบางเชื้อมีข้าวเจ้าหอมนิลเป็นตัวให้ความต้านทาน แต่บางเชื้อข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นตัวให้ความต้านทาน QTL ที่พบบนโครโมโซม 2 วางตัวอยู่ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM207 และ RM48 ส่วน QTL บนโครโมโซม 12 วางตัวอยู่ระหว่าง

เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM313 และ RM277 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Utami, et al. (2008) ที่ได้ประเมินความต้านทานต่อโรคไหม้ในประชากรข้าว Double haploid lines (DHLs) ที่ได้จากคู่ผสมระหว่าง IR64 x Azucena และพบว่ามี QTL ที่ควบคุมความต้านทานต่อโรคไหม้แบบกว้าง บนโครโมโซม 1, 2, 11 และ 12 เช่นกัน และจากการศึกษาของ Chaipanya, et al. (2017) ได้ศึกษาเกี่ยวกับยีนต้านทานโรคไหม้ใน QTL หลักจากข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิลพบว่า *qBL1* ที่อยู่บน โครโมโซม 1 นั้นมียีน *Pish–j* ให้ความต้านทานต่อโรคไหม้จากประเทศไทย และประเทศฟิลิปปินส์ เป็นบางเชื้อ ในขณะที่ *qBL11* ที่อยู่บนโครโมโซม 11 นั้นมียีน *Pi7–j* ซึ่งให้ความต้านทานแบบกว้างต่อโรคไหม้ในประเทศไทยและฟิลิปปินส์ เพราะฉะนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานต่อโรคไหม้ในประเทศไทยและฟิลิปปินส์นั้นจำเป็นต้องให้มียีน *Pi7–j* ซึ่งตรงกับการรายงานของ Wongsaprom, et al. (2010) พบว่า QTL ที่ทำหน้าที่เป็น QTL หลัก (major QTL) ที่ต้านทานต่อเชื้อแบบกว้าง ในประเทศไทย ได้แก่ *qBL11* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 11 ซึ่งมีตำแหน่งใกล้เคียงกับยีน *Xa21* ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคขอบใบแห้ง

โรคขอบใบแห้ง

โรคขอบใบแห้ง (bacterial blight) เป็นโรคที่พบการระบาดในข้าวนาน้ำฝน และนาชลประทาน เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) เข้าทำลายต้นกล้าได้ตั้งแต่ระยะแตกกอจนถึงออกรวง ทำให้ใบแห้ง ท่อน้ำท่ออาหารอุดตันแล้วแห้งเฉาตายในที่สุด การระบาดของโรคอาจทำให้ผลผลิตลดลง 20–30% ถ้ามีการระบาดรุนแรงอาจทำให้ผลผลิตลดลงถึง 50% (Fred, et al., 2016) ยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานมีการแสดงออกใน 2 รูปแบบ คือ 1) แสดงออกในลักษณะยีนเด่น (dominant genes) มี 18 ยีน (*Xa1, Xa2, Xa3, Xa4, Xa6, Xa7, Xa9, Xa10, Xa11, Xa12, Xa14, Xa16, Xa17, Xa18, Xa21, Xa20, Xa23* และ *Xa24*) และ 2) แสดงออกในลักษณะยีนด้อย (recessive gene) มี 6 ยีน (*xa5, xa8, xa13, xa15, xa19* และ *xa22*) (Khush and Kinoshita, 1991; Kameswara, Lakshminarasu and Jena, 2002) โดยยีน *Xa3, Xa4, Xa10* และ *Xa21* กระจุกรวมตัวกันอยู่บนโครโมโซม 11 ใกล้เคียงกับ QTL ต้านทานโรคไหม้ (*qBL11*) ในกลุ่มยีนต้านทานนี้ *xa5* เป็นยีนแรกที่ถูกวางตำแหน่งบนโครโมโซมในปัจจุบัน พบว่าในข้าวไทยจำเป็นต้องปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มียีน *xa5* บนโครโมโซม 5 ซึ่งเป็นยีนหลัก และถ้ามียีน *Xa21/qBB11* บนโครโมโซม 11 ก็จะทำให้ข้าวต้านทานต่อเชื้อในประเทศไทยเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ข้าวแถบประเทศอินเดียและพม่าจะมียีน *Xa21* เป็นยีนหลัก (Korinsak, Sirithunya and Toojinda, 2014.; Win, et al., 2013)

เครื่องหมายดีเอ็นเอกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าว

การปรับปรุงพันธุ์พืชแบบมาตรฐาน (conventional breeding) จะเป็นการคัดเลือกโดยพิจารณาจากลักษณะภายนอก (phenotypes) ที่แสดงออกมา ซึ่งอาจมีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมร่วมอยู่ด้วย อาจทำให้การคัดเลือกต้นพืชเป้าหมายผิดพลาดได้ และทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ค่อนข้างนาน ปัจจุบันนี้วิทยาการด้านอณูชีววิทยามีการพัฒนาและเจริญก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลลำดับเบส (nucleotides) ของยีนต่าง ๆ จำนวนมากของพืชหลายชนิด และได้มีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะต่อยีน (gene specific marker) หรือลักษณะที่สนใจขึ้นมาเพื่อใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ใช้สร้างลายพิมพ์ DNA และใช้สร้างแผนที่ยีน ถ้าเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้อยู่ใกล้กับยีน หรือมีตำแหน่งอยู่ในยีน และเป็น functional marker จะทำให้สามารถนำเครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้ มาใช้คัดเลือกต้นพืชที่มีลักษณะที่ต้องการ หรือที่เรียกว่า marker assisted selection (MAS) จะทำให้การคัดเลือกมีความแม่นยำมากขึ้น เนื่องจากเป็นการตรวจสอบที่ยีนโดยตรง และสามารถลดระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลง จะช่วยให้โครงการปรับปรุงพันธุ์มีประสิทธิภาพมากขึ้นและมีความก้าวหน้าอย่างรวดเร็วมากกว่าการคัดเลือกจากลักษณะที่ปรากฏ (phenotypic selection)

จากองค์ความรู้เกี่ยวกับยีนความหอมดังกล่าวจึงได้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อยีนต่าง ๆ เช่น Aromarker ที่จำเพาะต่อยีนความหอม *badh2* มีตำแหน่งบนโครโมโซม 8 (Vanavichit, et al., 2004; Wanchana, et al., 2005) สามารถใช้จำแนกข้าวหอมออกจากข้าวไม่หอมได้ PB7–8 จำเพาะต่อยีน *Xa21* บนโครโมโซม 11 (อยู่ใกล้เคียงกับ *qBL11*) และ PAxa5 จำเพาะต่อยีน *xa5* บนโครโมโซม 5 ที่ควบคุมความต้านทานโรคขอบใบแห้ง นอกจากนี้ ยังมีเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR marker ที่มีตำแหน่งใกล้เคียงกับยีน และสามารถใช้คัดเลือกต้นพืชที่มียีนดังกล่าวได้ค่อนข้างแม่นยำ เช่น RM122 และ RM153 มีตำแหน่งใกล้เคียงกับยีน *xa5* บนโครโมโซม 5 ที่ควบคุมความต้านทานโรคขอบใบแห้ง RM212 และ RM319 มีตำแหน่งใกล้เคียงกับ *qBL1* บนโครโมโซม 1 และ RM224, RM144 มีตำแหน่งใกล้เคียงกับ *qBL11* บนโครโมโซม 11 ที่ควบคุมความต้านทานโรคไหม้ ตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่ประสบความสำเร็จจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก ได้แก่ ข้าว กข51 (ขาวดอกมะลิ 105 ทนน้ำท่วมฉับพลัน) ข้าวพันธุ์ปิ่นเกษตร ข้าวหอมชลสิทธิ์ (ธีรยุทธ ตู้จินดา, 2554) และข้าวหอม Manawthukha ของพม่า (Yi, et al., 2009; Win, et al., 2013)

โครงการพัฒนาพันธุ์ข้าวสันป่าตอง 1 ให้มีความหอม ต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้งอย่างกว้าง

โครงการวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะปรับปรุงพันธุ์ข้าวสันป่าตอง 1 ให้มีความหอม ต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง โดยใช้วิธีการผสมกลับร่วมกับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก โดยมียีนเป้าหมายจำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ ยีนความหอม *badh2*, *xa5, Xa21* และ *qBL11* ที่ต้องการถ่ายทอดให้กับข้าวสันป่าตอง 1 ที่ใช้เป็นพันธุ์รับ (recipient parent) และใช้ข้าวเหนียว กข6 เป็นพันธุ์ให้ลักษณะความหอม (donor parent) และใช้ข้าวเหนียวสายพันธุ์ RGD07585-5-B-MAS-12-1-MAS-14 (RD6-BL-BB-No.15) เป็นพันธุ์ให้ลักษณะความต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง ที่พัฒนาสายพันธุ์โดยหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว (RGDU) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 5 ตำแหน่ง เป็นตัวตรวจสอบจีโนไทป์ ได้แก่ Aromarker, PAxa5, PB7-8, RM144 และ RM224 ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกจะทำให้การคัดเลือกต้นข้าวที่มีลักษณะเป้าหมายมีความแม่นยำสูงมาก และจะทำให้โครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวสามารถประสบความสำเร็จได้ภายในระยะเวลาอันสั้น รวดเร็วมากกว่าระยะเวลาที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอดีต

การพัฒนาประชากรลูกผสมชั่วที่ F_1 เริ่มทำการผสมครั้งแรกในปี พ.ศ. 2555 ที่มหาวิทยาลัยพะเยา โดยทำการพัฒนาประชากรลูกผสมชั่วที่ F_1 จากคู่ผสมจำนวน 2 คู่ ได้แก่ 1) สันป่าตอง 1 x กข6 และ 2) สันป่าตอง 1 x RD6-BL-BB-No.15 ได้จำนวน 10 และ 5 ต้น ตามลำดับ เมื่อนำไปตรวจจีโนไทป์ พบต้นลูกผสมชั่วที่ F_1 ที่แสดงจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัส จำนวน 7 และ 5 ต้น ตามลำดับ (ตาราง 1) โดยต้นข้าวลูกผสมชั่วที่ F_1 ที่เกิดจากคู่ผสมทั้ง 2 คู่ จะมีลักษณะต้นที่สูงกว่าสันป่าตอง 1 เพราะได้รับการถ่ายทอดลักษณะความสูงมาจากข้าวพันธุ์ให้ จากลักษณะความสูงที่แสดงออกมา แสดงให้เห็นว่าลักษณะความสูงเป็นลักษณะเด่น (dominant effect) เนื่องจากแสดงลักษณะความสูงในลูกผสมชั่วที่ F_1 ที่มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัส ซึ่งต้นลูกผสมชั่วที่ F_1 เหล่านี้จะนำไปผสมกลับเข้าหาข้าวสันป่าตอง 1 จนถึงชั่วที่ BC_2F_2 เพื่อผลิตประชากรลูกผสมกลับสายพันธุ์แท้ (BILs) หลังจากนั้นจะนำสายพันธุ์ข้าวชั่วที่ BC_2F_2 ที่มียีนเป้าหมายที่อยู่ในสภาพโฮโมไซกัส หรือที่เรียกว่าข้าวสันป่าตอง 1 plus I (มีลักษณะใหม่เพิ่มขึ้นมา 1 ลักษณะ) จากคู่ผสมทั้ง 2 คู่ มาผสมข้ามเพื่อรวมยีนเป้าหมายทั้ง 4 ยีน ไปอยู่ในข้าวต้นเดียวกันหรือที่เรียกว่า gene pyramiding หลังจากนั้นปล่อยให้ผสมตนเองและทำการคัดเลือกต้นที่แสดงจีโนไทป์โฮโมไซกัสของยีนเป้าหมายในรูปแบบการรวมตัวแบบต่าง ๆ มาทำการ

ประเมินการเกิดโรคไหม้และโรคขอบใบแห้งในสภาพโรงเรือน ตลอดจนทดสอบผลผลิตในสภาพน้ำสมบูรณ์ เพื่อคัดเลือกหาสายพันธุ์ดีเด่นสำหรับนำไปปลูกทดสอบผลผลิตระหว่างสถานีต่อไป หลังจากสิ้นสุดโครงการนี้ ผู้วิจัยคาดว่าจะได้ จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ สันป่าตอง 1 ที่มีความหอม และ สันป่าตอง 1 ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้งอย่างกว้าง สุดท้ายจะได้ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ที่มีความหอม ต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้งอย่างกว้างภายในต้นเดียวกัน สามารถนำไปส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก เนื่องจากเป็นพันธุ์ข้าวที่มีผลผลิตสูง คุณภาพหุงต้มดี และต้านทานต่อโรคที่สำคัญ ทำให้ยกระดับเศรษฐกิจและชีวิตความเป็นอยู่ของชาวนาไทยให้สูงขึ้น ตลอดจนทำให้คนไทยได้บริโภคข้าวเหนียวที่มีความหอม น่ารับประทานมากขึ้นด้วย

ตาราง 1 การสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ F_1 ที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างสันป่าตอง 1 x กข6 และสันป่าตอง 1 x RD6-BL-BB-No.15 และจำนวนต้นที่แสดงจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัสที่ตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอ Aromarker และ PB7-8

คู่ผสม	จำนวนเมล็ดผสม	จำนวนต้นที่นำมาตรวจจีโนไทป์	จำนวนเฮเทอโรไซกัส
SPT x RD6	19	10	7
SPT x RD6-BL-BB-No.15	12	5	5
รวม	31	15	12

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา

1. พันธุ์ข้าวที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการพัฒนาประชากร

พันธุ์ข้าวที่ใช้เป็นต้นพ่อแม่ในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย 1) ข้าวสันป่าตอง 1 ที่ใช้เป็นพันธุ์รับและเป็นต้นแม่ ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวเชียงราย กรมการข้าว 2) ข้าวลูกผสมชั่วที่ F_1 ที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างสันป่าตอง 1 x กข6 (มียีนความหอม *badh2*) จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ PY012-001-7 และ PY012-001-8 ใช้เป็นต้นพ่อ และ 3) ข้าวลูกผสมชั่วที่ F_1 ที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างสันป่าตอง 1 x RD6-BL-BB-No.15 (มี *qBL11*, ยีน *xa5* และ *Xa21*) จำนวน 2 ต้น ได้แก่ PY012-003-4 และ PY012-003-5 ใช้เป็นต้นพ่อ

2. พันธุ์ข้าวมาตรฐานเปรียบเทียบสำหรับการประเมินความต้านทานโรคไหม้ในสภาพโรงเรือน ประกอบด้วยข้าวจำนวน 6 พันธุ์ ได้แก่

2.1 สันป่าตอง 1 เป็นพันธุ์รับ

2.2 เจ้าหอมนิล ใช้เป็นพันธุ์มาตรฐานต้านทาน มี QTL ต้านทาน คือ *qBL1* และ *qBL11*

2.3 Sariceltic ใช้เป็นพันธุ์มาตรฐานอ่อนแอ

2.4 กข6 ใช้เป็นพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบอ่อนแอ

2.5 RD6-BL-BB-No.15 มี QTL ต้านทานคือ *qBL1* และ *qBL11* เป็นใช้เป็นพันธุ์ให้ *qBL11*

2.6 ขาวดอกมะลิ 105 ใช้เป็นพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบอ่อนแอ

3. พันธุ์ข้าวมาตรฐานเปรียบเทียบสำหรับการประเมินความต้านทานโรคขอบใบแห้งในสภาพโรงเรือน ประกอบด้วยข้าวจำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่

3.1 สันป่าตอง 1 เป็นพันธุ์รับ

3.2 IR1188 เป็นพันธุ์มาตรฐานต้านทาน มียีน *Xa21 qBB1, qBB8, qBB11*

3.3 IRBB5 เป็นพันธุ์มาตรฐานต้านทาน มียีน *xa5*

3.4 กข6 เป็นพันธุ์มาตรฐานอ่อนแอ

3.5 RD6-BL-BB-No.15 ใช้เป็นพันธุ์ให้ยีนต้านทาน *xa5* และ *Xa21*

4. พันธุ์ข้าวมาตรฐานเปรียบเทียบสำหรับการทดสอบผลผลิตในสภาพน้ำสมบูรณ์ ประกอบด้วยข้าวจำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่

4.1 สันป่าตอง 1 เป็นข้าวเหนียว ไม่ไวต่อช่วงแสง มีผลผลิตสูง แต่ไม่หอม ได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์จากศูนย์วิจัยข้าวเชียงราย กรมการข้าว

4.2 กข6 เป็นข้าวเหนียวหอม ไวต่อช่วงแสง คุณภาพหุงต้มดี แต่อ่อนแอต่อโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง ได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ จากศูนย์วิจัยข้าวเชียงราย กรมการข้าว

4.3 RD6-BL-BB-No.15 เป็นข้าวเหนียว ไวต่อช่วงแสง ไม่มีความหอม มีQTL ต้านทานโรคไหม้ (*qBL11*) และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง (*xa5* และ *Xa21*) พัฒนาพันธุ์มาจากข้าวเหนียว กข6 ได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์มาจาก หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและ เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

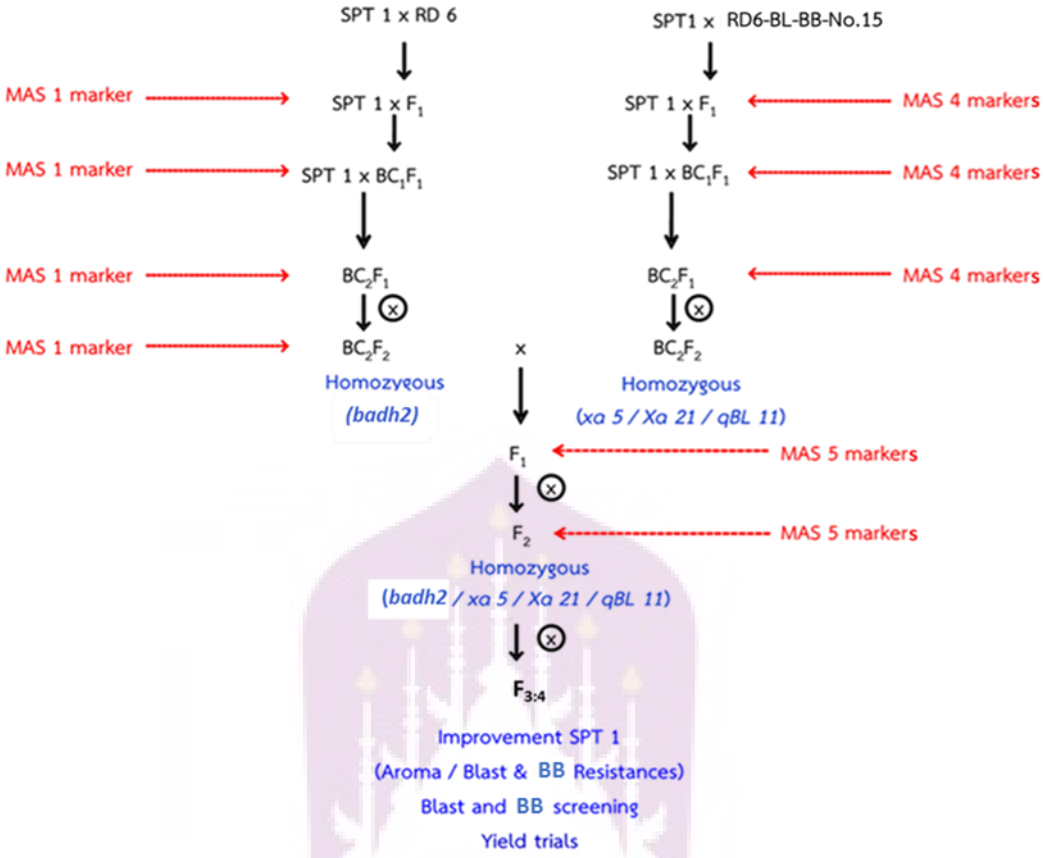
การสร้างประชากรข้าวสันป่าตอง 1 ให้มียีนความหอม ยีนต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง

การสร้างประชากรข้าวสันป่าตอง 1 ที่มียีนความหอม ยีนต้านทานโรคไหม้และยีนโรคขอบใบแห้ง ในโครงการวิจัยนี้จะดำเนินการที่มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา โดยแบ่งเป็น 2 ระยะ ได้แก่

ระยะที่ 1 การพัฒนาประชากรลูกผสมกลับ (BILs) ในชั่วที่ BC_1F_1 ถึงชั่วที่ BC_2F_2 ในฐานพันธุกรรมข้าวสันป่าตอง 1 โดยทำการสร้างประชากรลูกผสมกลับจากคู่ผสม จำนวน 2 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 1 ลูกผสมกลับของประชากรสันป่าตอง 1 x กข6 เพื่อสร้างประชากรข้าว SPT1+*badh2* และคู่ที่ 2 ลูกผสมกลับของประชากรสันป่าตอง 1 x RD6-BL-BB-No.15 เพื่อสร้างประชากรข้าว SPT1+*xa5*+*Xa21*+*qBL11* โดยจะเริ่มจากการนำต้นลูกผสมชั่วที่ F_1 ของแต่ละคู่ผสม ที่ถูกพัฒนาโดย เดโชพล กันทัพ (2556) ไปผสมกลับเข้าหาข้าวสันป่าตอง 1 จนถึงชั่วที่ BC_2F_2 โดยมีเป้าหมายจำนวนเมล็ดผสมจำนวน 100 เมล็ดต่อชั่ว หลังจากนั้นนำต้นข้าวจากประชากรลูกผสมกลับของคู่ผสมที่ 1 มาตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Aromarker และคู่ผสมที่ 2 จะใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM224, RM144, PAxa5, และ PB7-8 โดยในชั่วที่ BC_1F_1 ต้นที่แสดงจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัส ปรากฏแถบดีเอ็นเอเหมือนทั้งพ่อและแม่ที่เครื่องหมายดีเอ็นเอเป้าหมาย จำนวน 2-3 ต้น จะถูกคัดเลือกไปผสมกลับเข้าหาข้าวสันป่าตอง 1 เพื่อสร้างประชากรข้าวลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_1 ส่วนประชากรชั่วที่ BC_2F1 หลังจากการตรวจสอบจีโนไทป์

แล้ว จะคัดเลือกต้นที่แสดงจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัส และมีลักษณะทรงต้นคล้ายกับข้าวสันป่าตอง 1 จำนวน 2–3 สายพันธุ์ เพื่อนำเมล็ดไปปลูกต่อ เพื่อสร้างเป็นประชากรข้าวลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_2 สายพันธุ์ละ 400 ต้น แล้วทำการสุ่มต้นข้าวมาจำนวน 500 ต้น เพื่อนำไปตรวจสอบจีโนไทป์ และคัดเลือกต้นที่แสดงจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัส ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายดีเอ็นเอเป้าหมายเหมือนกับข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์ให้เท่านั้น เพื่อนำไปผสมข้ามกันเพื่อการรวมยีนเป้าหมายทั้ง 4 ยีนเข้าไปอยู่ในข้าวต้นเดียวกัน ซึ่งมีฐานพันธุกรรมคล้ายกับสันป่าตอง 1

ระยะที่ 2 การรวมยีนความหอม QTL ต้านทานโรคไหม้ และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งเข้าสู่ข้าวสันป่าตอง 1 ในระยะนี้จะนำต้นชั่วที่ BC_2F_2 ที่มียีน *badh2* เหมือน กข6 มาผสมกับต้นชั่วที่ BC_2F_2 ที่มียีน *xa5 Xa21* และ *qBL11* เหมือนกับ RD6–BL–BB–No.15 เพื่อให้ได้ประชากรลูกผสมชั่วที่ F_1 pyramiding จำนวนประมาณ 100 ต้น แล้วนำไปตรวจสอบจีโนไทป์ ต้นที่แสดงจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัสที่เครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 5 ตำแหน่ง จะถูกนำมาแยกหน่อและปลูกต่อเพื่อให้ได้จำนวนเมล็ดชั่วที่ F_2 pyramiding เพิ่มมากขึ้น หลังจากนั้นนำไปปลูกเพื่อสร้างประชากรข้าวชั่วที่ F_2 pyramiding จำนวนประมาณ 1,000 ต้น เมื่อต้นข้าวแตกกอ ทำการเก็บตัวอย่างใบจากต้นข้าวที่แข็งแรง มาจำนวน 561 ต้น เพื่อสกัดดีเอ็นเอและและนำมาตรวจสอบจีโนไทป์ด้วย เครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 5 ตำแหน่งที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมาย 4 ยีน ซึ่งคาดว่าจะได้ต้นที่มียีนครบทั้ง 4 ยีน อย่างน้อย 2 ต้น (ได้มาจาก $(1/4)^4$ ซึ่ง n=4 เนื่องจากว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอRM144 และ RM224 ที่มีตำแหน่งใกล้กับ *qBL11* จะอยู่ใกล้กันมาก จึงน่าจะถ่ายทอดไปสู่ลูกด้วยกัน ดังนั้น จึงมี fragment target จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ 1) Aromarker บนโครโมโซม 8 2) PAxa5 บนโครโมโซม 5 3) บนโครโมโซม 11 และ 4) RM144–RM224 บนโครโมโซม 11 หลังจากนั้นทำการคัดเลือกต้นข้าวชั่วที่ F_2 pyramiding ที่มียีนเป้าหมายในรูปแบบการรวมตัวของยีนแบบต่าง ๆ (combination) และแสดงจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสที่เครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 5 ตำแหน่ง มาปลูกและปล่อยให้ผสมตนเอง สายพันธุ์ละ 100 ต้น แล้วนำเมล็ดจากต้นดังกล่าวมาปลูกต่อ เพื่อสร้างประชากรชั่วที่ F_3 pyramiding เพื่อให้ได้เมล็ดมากพอที่จะนำไปทดสอบความต้านทานต่อโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง และทำการทดสอบผลผลิตแบบมีซ้ำในสภาพน้ำสมบูรณ์ต่อไป แผนการพัฒนาประชากรข้าวเหนียวหอม ต้านทานโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้ง ในฐานพันธุกรรมข้าวสันป่าตอง 1 แสดงในภาพ 2



ภาพ 2 แผนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ที่มียีนความหอมยีนต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก

การตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากรข้าวรุ่นลูกในแต่ละชั่ว

1. การสกัดดีเอ็นเอ

หลังจากผสมเกสรแล้ว 30 วัน ทำการเก็บเมล็ดผสมและเมล็ดที่เกิดจากการผสมตนเอง (BC_1F_1, BC_2F_1, BC_2F_2, F_1 pyramiding และ F_2 pyramiding) มาอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน เพื่อทำลายการพักตัวของเมล็ด แล้วนำไปเพาะให้งอก จากนั้นย้ายปลูกลงกระถาง เมื่อต้นกล้าอายุ 30 วัน ทำการย้ายปลูกลงแปลง หลังจากต้นกล้าเริ่มแตกกอ ทำการเก็บตัวอย่างใบอ่อนจากต้นกล้าลูกผสมกลับไปสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธี DNATrap® ของห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เพื่อตรวจสอบจีโนไทป์สำหรับการคัดเลือกต้นที่มียีนเป้าหมาย

2. การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นข้าวมาเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ (primer) ของเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 5 ตำแหน่ง (ตารางที่ 2) ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมายทั้ง 4 ยีน เพื่อตรวจสอบจีโนไทป์ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบจีโนไทป์มีดังนี้ ลูกผสมกลับชั่วที่ BC_1F_1, BC_2F_1 และ BC_2F_2 จากคู่ผสมที่ 1 (สันป่าตอง 1 x กข6) จะใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Aromarker

ลูกผสมกลับชั่วที่ BC_1F_1, BC_2F_1 และ BC_2F_2 จากคู่ผสมที่ 2 (สันป่าตอง 1 x RD6-BL-BB-No.15) จะใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ PAxa5, PB7-8, RM144 และ RM224

ลูกผสมจากการรวมยีนชั่วที่ F_1 pyramiding และ F_2 pyramiding ที่เกิดจากคู่ผสม BC_2F_2 (*badh2*) x BC_2F_2 (*xa5 Xa21* และ *qBL11*) จะใช้ Aromarker, PAxa5, PB7-8, RM144 และ RM224

องค์ประกอบของสารเคมีและสภาพปฏิกิริยา PCR จะใช้ตามวิธีของ Myint et al. (2012) ซึ่งแสดงในตาราง 3

ตาราง 2 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากรข้าวเหนียวที่เกิดจากการผสมเพื่อการรวมยีนความหอม (*badh2*) QTL ต้านทานโรคไหม้ (*qBL11*) และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง (*xa5* และ *Xa21*) เข้าสู่ข้าวสันป่าตอง 1

เครื่องหมายดีเอ็นเอ	โครโมโซม	ยีน	ลักษณะ	ขนาดผลผลิต PCR (bp)	อ้างอิง
Aromarker	8	*badh2*	Fragrance	320	Vanavichit et al. (2004); Wanchana et al. (2005); ไวพจน์ และคณะ (2556)
RM144	11	*qBL11*	BL resistance	225	Wongsaprom et al. (2010)
RM224	11	*qBL11*	BL resistance	159	Wongsaprom et al. (2010)
PAxa5	5	*xa5*	BB resistance	134	Korinsak et al. (2014)
PB7-8	11	*Xa21*	BB resistance	1,000	Chunwongse et al. (1993); Korinsak (2009)

ตาราง 3 องค์ประกอบของสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

สารองค์ประกอบ	ปริมาตร 1X (µl)
10X PCR buffer	1.00
dNTPs (10 mM)	0.20
$MgCl_2$ (25 mM)	0.80
forward primer (10 µmol)	0.50
reverse primer (10 µmol)	0.50
Taq polymerase	0.05
DNA	2.00
dH_2O	4.95
ปริมาตรรวม	10.00

สภาพปฏิกิริยา PCR เพื่อการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย

	94°C	5 min	
denaturation	94°C	30 sec	} 35 cycles
primer annealing	55°C	30 sec	
extension	72°C	2 min	
	72°C	5 min	
	4°C	∞	

3. การตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอและการอ่านผล

นำผลผลิต PCR มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้เจลสำหรับการตรวจสอบ 2 ชนิด ได้แก่

3.1 4.5% polyacrylamide gel electrophoresis (4.5% PAGE) มีความละเอียดสูง ใช้แยกความแตกต่างที่ 5 bp จะใช้กับ Aromarker, PAxa5, RM144 และ RM224แล้วย้อมเจลด้วยวิธี silver straining ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Caetano. (1997)

3.2 1% agarose gel electrophoresis มีความละเอียดค่อนข้างต่ำจะใช้กับ ผลผลิต PCR ที่มีขนาดใหญ่ และมีความแตกต่างมากกว่า 20 bp ขึ้นไป จะใช้กับเครื่องหมายดีเอ็นเอ PB7–8 และ PAxa5

หลังจากนั้นทำการอ่านผลรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ (band reading) โดยนำภาพเจลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ gel electrophoresis มาเปรียบเทียบขนาดกับแถบดีเอ็นเอของพ่อและแม่ โดยต้นลูกผสมกลับชั่วที่ BC_1F_1, BC_2F_1 และ F_1 pyramiding มีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ คือ แถบหนึ่งมาจากพันธุ์รับ และอีกแถบหนึ่งมาจากพันธุ์ให้ แสดงว่ามีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส ซึ่งจะถูกนำไปผสมกลับเข้าหาข้าวสันป่าตอง 1 ส่วนตัวอย่างใดก็ตามที่มีหนึ่งแถบเหมือนกับพันธุ์รับแสดงว่าเป็นต้นที่เกิดจากการผสมตนเอง ซึ่งจะถูกคัดทิ้ง ส่วนในชั่วที่ BC_2F_2 และ F_2 pyramiding นั้นจะคัดเลือกจากแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพันธุ์ให้ แสดงว่ามีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสได้รับการถ่ายทอดยีนที่ต้องการมาจากพันธุ์ให้

การประเมินความต้านทานต่อโรคไหม้

การประเมินความต้านทานต่อโรคไหม้จะทดสอบในสภาพห้องปฏิบัติการ ตามวิธีของหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว โดยการปลูกข้าวในถาดหลุมพลาสติกขนาด 53 x 27 x 4 ลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งบรรจุดินโคลนจากแปลงนา จำนวน 4 ต้นต่อหลุม เติมน้ำพอท่วมผิวดิน 0.5–1 เซนติเมตร ใส่ปุ๋ยยูเรีย 1 กรัมต่อถาด เมื่อข้าวอายุได้ 9 และ 13 วัน ส่วนการเตรียมเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 45 ไอโซเลท โดยจัดเป็น 6 กลุ่มเชื้อ โดยจะจำแนกกลุ่มเชื้อตาม phylogenetic tree ที่ได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ AFLP (Hutamekalin, et al., 2001) โดยเพิ่มปริมาณเชื้อราบนอาหารแข็ง (rice polish agar) ที่มีส่วนประกอบของรำข้าว 2% สารสกัดยีสต์ 0.2% และวุ้น 2% เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25$\pm$1 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 7 วัน ทำการขูดเส้นใยเชื้อราเพื่อกระตุ้นการสร้างสปอร์โดยใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมกดทับเส้นใยให้แบนราบไปกับผิวหน้าของอาหาร จากนั้นเปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อไว้ในตู้ที่ให้แสง black light นาน 2 วัน (วันละ 8–10 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อชักนำให้เกิดการสร้างสปอร์ เมื่อครบ 2 วัน ทำการเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อ โดยใส่น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้ท่วมผิวหน้าอาหาร ใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมขูดไปมาเบา ๆ บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการสร้างสปอร์ หลังจากนั้นทำการกรองและตรวจนับสปอร์เชื้อด้วย hemocytometer แล้วปรับความเข้มข้นเชื้อให้อยู่ในช่วง 5–50 x 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ใน 0.5% เจลาติน ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ต่อการฉีดพ่นต้นข้าว 1 ถาด ทำการฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์เชื้อลงบนต้นข้าวอายุ 14 วัน ให้ทั่ว โดยใช้หัวฉีดแรงดันอากาศ จากนั้นเลี้ยงข้าวไว้ที่อุณหภูมิ 25$\pm$1 องศาเซลเซียส ภายใต้ความชื้นสัมพัทธ์ 100% ข้ามคืน แล้วจึงย้ายไปไว้ในสภาพโรงเรือนต่อไป หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน จึงทำการประเมินอาการโรคไหม้ โดยให้คะแนนตั้งแต่ 0–6 (ภาพ 3) ตามวิธีของ Roumen, Levy and Nottegham. (1997)

คะแนน 0 = ไม่มีการติดเชื้อ

คะแนน 1 = มีจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กกว่า 0.5 มิลลิเมตร โดยไม่มีการสร้างสปอร์

คะแนน 2 = มีจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กกว่า 0.5–1 มิลลิเมตร โดยไม่มีการสร้างสปอร์

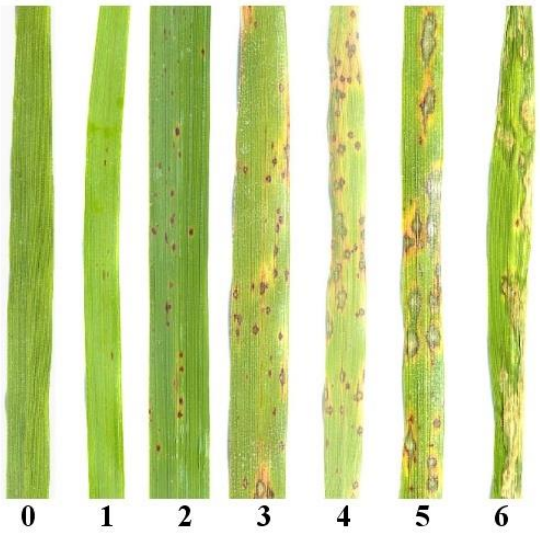
คะแนน 3 = มีจุดวงรีขนาดเล็กประมาณ 1–3 มิลลิเมตร บาดแผลจะมีสปอร์เชื้อราสีเทาอยู่ตรงกลาง

คะแนน 4 = มีจุดวงรีขนาดเล็กประมาณ 3 มิลลิเมตร หรือยาวมากกว่า บาดแผลจะมีสปอร์เชื้อราสีเทาอยู่ตรงกลางและขอบเข้ม

คะแนน 5 = จุดวงรีเริ่มขยายใหญ่มากขึ้น สปอร์เชื้อราสีเทาอยู่ตรงกลางเริ่มเชื่อมกันขอบเริ่มจางลง

คะแนน 6 = มีการสร้างสปอร์เชื้อราและขอบเริ่มหายไป

โดยระดับคะแนน 0–2 จัดอยู่ในระดับที่ต้านทาน (resistance; R) ระดับคะแนน 3–4 อยู่ในระดับต้านทานปานกลาง (moderate resistance; MR) และระดับคะแนน 5–6 นั้นอยู่ในระดับที่อ่อนแอ (susceptible; S)



ภาพ 3 คะแนนความเสียหายของข้าวที่เกิดจากเชื้อโรคไหม้ที่ประเมินในสภาพโรงเรือน

ที่มา: Roumen, Levy and Nottegham, 1997

การประเมินความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง

การประเมินความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งจะประเมินในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* จำนวน 4 ไอโซเลท จากจังหวัดเชียงราย (CRI–5) สุรินทร์ (TX058) ชัยนาท (CN1–3) และกำแพงเพชร (KDI–2) ที่เก็บรวบรวมไว้ที่หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว โดยทำการเพาะเมล็ดข้าวในถาดหลุมจำนวน 4 ต้นต่อหลุม ใส่ปุ๋ยยูเรีย (46–0–0) และปุ๋ยสูตร 15–15–15 สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และใส่ปุ๋ยยูเรียอีกครั้งก่อนทำการปลูกเชื้อ 3 วัน การเตรียมเชื้อแบคทีเรียจะเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร PSA (peptone sucrose agar) บ่มเชื้อไว้ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง จึงทำการปลูกเชื้อเมื่อข้าวอายุได้ 30 วัน (นับจากวันเพาะ) โดยขูดเชื้อผสมกับน้ำ (เชื้อ 1 petridish ผสมกับน้ำ 2 มิลลิลิตร) นับจำนวนโคโลนีของเชื้อด้วยวิธี standard plate count และปรับความเข้มข้นประมาณ 10^9 CFU/มิลลิลิตร การปลูกเชื้อใช้วิธีการตัดใบ (leaf clipping method) ของ Kauffman, et al. (1973) โดยใช้ปลายกรรไกรแตะเชื้อแล้วตัดปลายใบข้าวของยอดที่กางเต็มที่แล้วทุกใบของแต่ละต้น หลังจากปลูกเชื้อแล้ว บ่มเชื้อในโรงเรือนที่มีความชื้นนาน 14 วัน (ดูความยาวแผลของสายพันธุ์อ่อนแอมาตรฐานเป็นเกณฑ์ถ้ายาวตั้งแต่ 10 เซนติเมตร ขึ้นไป สามารถทำการวัดได้ หากยังไม่ถึง 14 วัน) จึงทำการวัดความยาวแผลซึ่งถ้าแผลมีความยาว 0.1–3.0 เซนติเมตร แสดงว่าต้านทาน (resistance; R), 3.1–6.0 เซนติเมตร แสดงว่าต้านทานปานกลาง (moderate resistance; MR) 6.1–9.0 เซนติเมตร แสดงว่าอ่อนแอปานกลาง (moderate susceptible; MS) ถ้าแผลมีความยาวมากกว่า 9 เซนติเมตร แสดงว่าอ่อนแอ (susceptible; S)

การทดสอบผลผลิต

ทำการปลูกทดสอบผลผลิตของประชากรข้าวเหนียวในชั่วที่ F_4 pyramiding ที่เกิดจากการรวมยีนในรูปแบบต่าง ๆ ภายใต้สภาพน้ำสมบูรณ์ ในพื้นที่แปลงเกษตรกร ตำบลแม่กา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา ในฤดูนาปี พ.ศ. 2560 โดยใช้วิธีปักดำ ใช้ต้นกล้าอายุประมาณ 30 วัน จำนวน 1 ต้นต่อกอ ระยะปลูก 25 x 25 เซนติเมตร ขนาดแปลงย่อย ขนาดแปลงย่อย 14 ตารางเมตร (8 ต้น x 7 แถว) วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (randomized complete block designs; RCBD) จำนวน 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ จำนวน 3 พันธุ์ หลังจากปักดำแล้ว 3 วัน ทำการซ่อมกล้าที่ตาย จำนวน 2 ครั้ง ห่างกัน 3 วัน ทำการใส่ปุ๋ย 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ใส่ปุ๋ยรองพื้นก่อนปักดำ อัตรา 6–6–6 กก. $N–P_2O_5–K_2O$ ต่อไร่ และครั้งที่ 2 ใส่ปุ๋ยแต่งหน้า อัตรา 6–0–0 กก. $N–P_2O_5–K_2O$ ต่อไร่ ที่ระยะแตกกอสูงสุด หรือประมาณ 45 วัน หลังจากปักดำ ทำการเก็บข้อมูลผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตจากข้าวในแต่ละแปลงย่อย

ตามวิธีการของ Witcombe, Parr and Atlin (2002); Kanjoo, et al. (2012) ดังนี้คือ เมื่อข้าวเริ่มออกรวง ทำการบันทึกวันออกดอก 50% (days to flowering; DF) โดยการประเมินด้วยสายตา เมื่อข้าวเริ่มสุกแก่ ก่อนการเก็บเกี่ยวทำการเก็บข้อมูลความสูง (plant high; PH), จำนวนต้นต่อกอ (tiller number per hill; TN) และจำนวนรวงต่อกอ (panicle number per hill; PN) โดยสุ่มเก็บข้อมูลจากต้นข้าวจำนวน 3 กอที่อยู่ภายในแปลงย่อย โดยจะไม่เก็บกอที่อยู่ในแถวริม หลังจากนั้นทำการเก็บข้อมูลผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตจำนวน 4 ลักษณะ ได้แก่ ข้อมูลจำนวนเมล็ดดีต่อรวง (filled grain number per panicle; FGN), จำนวนเมล็ดลีบต่อรวง (unfilled grain number per panicle; UFGN) และ อัตราการติดเมล็ด (seed setting rate; SSR) จะหาได้จากจำนวนเมล็ดดีและเมล็ดลีบที่นับจากช่อข้าวจำนวน 5 ช่อ โดยแต่ละช่อสุ่มเก็บมาจากกอที่ต่างกันภายในแปลงย่อยเดียวกัน หลังจากนั้นเก็บข้อมูลผลผลิตต่อไร่ (grain yield; GY) โดยทำการเกี่ยวข้าวที่อยู่แถวริมรอบนอกของแต่ละแปลงย่อยออกไปก่อน แล้วทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตข้าวที่อยู่ภายในแปลงย่อยทั้งหมดใส่ถุงตาข่าย นำมาตากแดดให้แห้ง ทำการนวดเอาฟางออก ทำความสะอาดเมล็ดข้าวด้วยเครื่องทำความสะอาดเมล็ดพันธุ์ข้าว นำเมล็ดข้าวไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน หรือให้ความชื้นในเมล็ดข้าวลดลงเหลือประมาณ 14% และทำการชั่งน้ำหนักเมล็ดต่อแปลงย่อย แล้วคำนวณเป็นน้ำหนักผลผลิตต่อไร่

การตรวจสอบความหอม

นำเมล็ดข้าวจากประชากรข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ที่ได้จากแปลงทดสอบผลผลิตมาประเมินความหอม โดยใช้วิธีการสูดดม ตามวิธีของ Yi, et al. (2009) โดยนำเมล็ดข้าวกล้องมาตัดครึ่งตัวอย่างข้าวสายพันธุ์ละ 5 เมล็ด จำนวน 3 ซ้ำ ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำมาทำการทดสอบหาสายพันธุ์ที่หอม โดยใช้ผู้ทดสอบการดมจำนวน 3 คน

การบันทึกและวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลจำนวนต้นที่คัดเลือกเพื่อนำไปปลูกในแต่ละชั่ว จะคัดเฉพาะต้นที่มียีนที่ต้องการ ซึ่งมาจากผลของจีโนไทป์ ข้อมูลต้นที่คัดเลือกนั้นจะถูกบันทึกเป็นชื่อสายพันธุ์ตามพันธุ์ประวัติของต้นนั้น ๆ ส่วนข้อมูลทางจีโนไทป์จะเก็บเป็นภาพเจลที่มีดีเอ็นเอของตัวอย่างข้าวที่ได้รับการตรวจ และบันทึกลงในตารางสรุปผลของทุกยีนที่ตรวจ ข้อมูลการทดสอบความหอมจะวางแผนการทดลองแบบ CRD บันทึกเป็นคะแนนของระดับความหอม แล้วนำข้อมูลคะแนนที่ได้วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ตาราง ANOVA ส่วนการประเมินลักษณะความต้านทานต่อเชื้อ

โรคไหม้และโรคขอบใบแห้งจะวางแผนการทดลองแบบ RCBD บันทึกข้อมูลเป็นคะแนนของการเกิดโรค และความยาวของบาดแผลที่เกิดจากโรค ตามลำดับ และนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ตาราง ANOVA ทุกการทดลองจะเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) จากนั้นจะทำการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principle component analysis; PCA) โดยใช้ค่าเฉลี่ยของผลการต้านทานโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้งร่วมกับน้ำหนักผลผลิตต่อไร่ ซึ่งการวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดจะวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม R stat 3.4.3 (R Core team, 2017)

สถานที่ทำการทดลอง

ทำการพัฒนาประชากรลูกผสมกลับ และพัฒนาประชากรสันป่าตอง 1 ให้มีความหอม ต้านทานโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้งในพื้นที่ปฏิบัติการสาขาเกษตรศาสตร์ การตรวจสอบจีโนไทป์ และความหอม ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการด้านพืช สาขาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา ทำการทดสอบผลผลิตในแปลงเกษตรกร ตำบลแม่กา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา การประเมินความต้านทานต่อโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง ทำการทดลองที่หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว (RGDU) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาการดำเนินงาน

มิถุนายน 2557 – ธันวาคม 2560

บทที่ 4

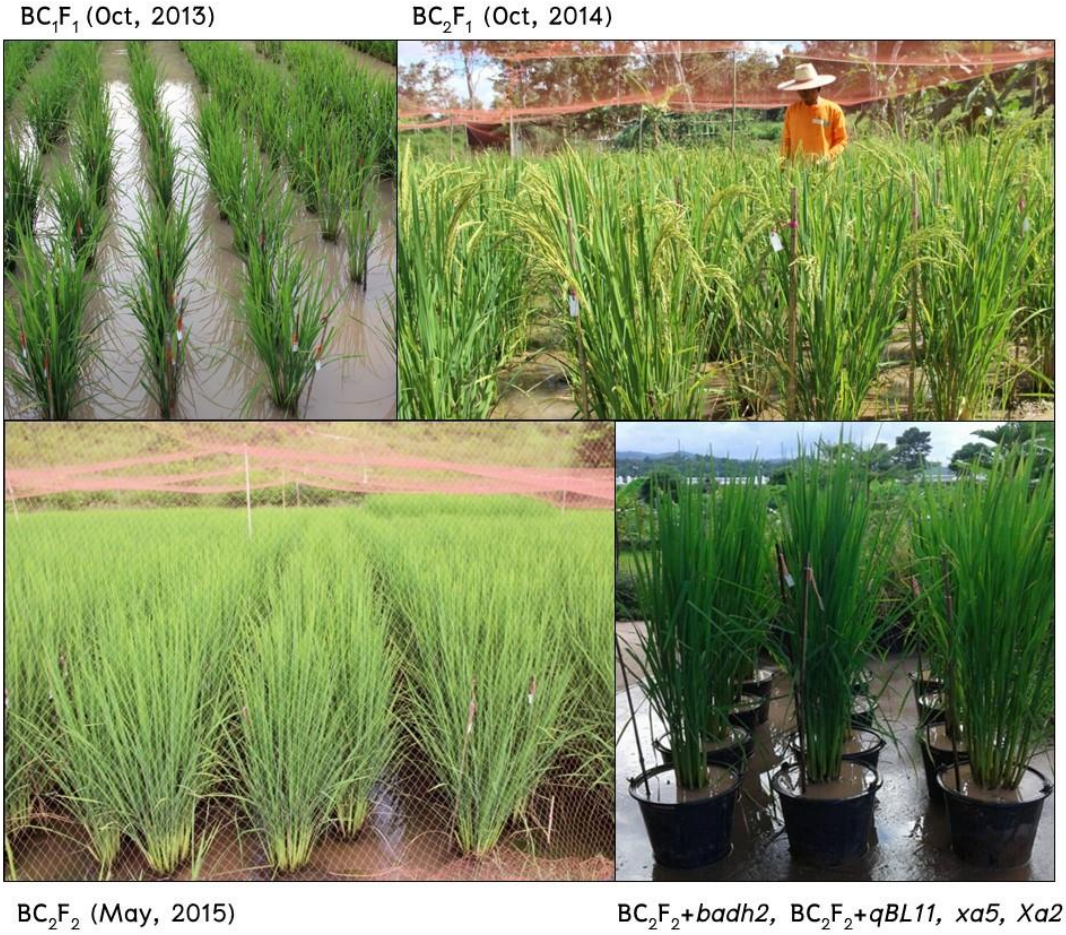
ผลการทดลอง

ผลการพัฒนาประชากรลูกผสมกลับสันป่าตอง 1 ให้มียีนความหอม QTL ต้านทานโรคไหม้ และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง

ผลการพัฒนาประชากรลูกผสมกลับสันป่าตอง 1 จะแบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้

1. ผลการพัฒนาประชากรลูกผสมกลับ (BILs) ชั่วที่ BC_2F_2 ในฐานพันธุกรรมข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ให้มียีนความหอม

จากการผสมกลับระหว่างข้าวลูกผสมชั่วที่ F_1 จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ PY012-001-7 และ PY012-001-8 ที่ได้จากคู่ผสมระหว่างสันป่าตอง 1 x กข6 กับข้าวสันป่าตอง 1 สามารถผลิตประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_1F_1 ได้เมล็ดจากการผสมจำนวน 69 เมล็ด เมื่อนำต้นข้าวดังกล่าวจำนวน 25 ต้น มาตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Aromarker พบต้นที่แสดงจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัส จำนวน 10 ต้น ในจำนวนนี้ได้ทำการคัดเลือกต้นที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี ได้จำนวน 4 ต้น ได้แก่ สายพันธุ์ PY013-006-1, PY013-007-2, PY013-007-12 และ PY013-007-17 สำหรับนำไปผสมกลับเข้าหาข้าวสันป่าตอง 1 เพื่อสร้างประชากรชั่วที่ BC_2F_1 ผลการผสมสามารถผลิตเมล็ดผสมกลับชั่วที่ BC_2F_1 ได้จำนวน 61 เมล็ดเมื่อนำไปปลูก และคัดเลือกต้นที่แข็งแรงมาจำนวน 30 ต้น เพื่อตรวจสอบจีโนไทป์ พบต้นที่แสดงจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัส จำนวน 6 ต้น ในจำนวนนี้ ได้คัดเลือกต้นชั่วที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี จำนวน 1 ต้น คือ สายพันธุ์ PY013-034-12 เพื่อนำเมล็ดมาปลูกและสร้างเป็นประชากรชั่วที่ BC_2F_2 โดยจะปลูกสายพันธุ์ละ 300 ต้น ในชั่วนี้ได้คัดเลือกต้นที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีจำนวน 50 ต้น มาตรวจจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมาย Aromarker พบต้นที่แสดงจีโนไทป์แบบ โฮโมไซกัสในตำแหน่งดังกล่าวจำนวน 4 ต้น ได้แก่สายพันธุ์ PY013-034-12-16, PY013-034-12-20, PY013-034-12-33 และ PY013-034-12-39 สายพันธุ์เหล่านี้มีลักษณะเหมือนพันธุ์สันป่าตอง 1 พันธุ์แม่ คือลำต้นเตี้ย ตั้งตรงแข็งแรง ใบธงตั้ง รวงยาว และเปลือกเมล็ดสีเหลืองฟาง โดยจะใช้สำหรับเป็นสายพันธุ์แม่สำหรับการรวมยีนความหอม ยีนต้านทานโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้งไว้ในต้นเดียวกัน หรือที่เรียกว่าการรวมยีน (gene pyramiding) (ภาพ 4)



ภาพ 4 ประชากรข้าวเหนียวลูกผสมกลับชั่วที่ BC_1F_1 ถึง BC_2F_2 ที่พัฒนาพันธุ์มาจากข้าวสันป่าตอง 1 เพื่อให้มียีนความหอม (*badh2*) QTL ต้านทานโรคไหม้ และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง

2. ผลการพัฒนาประชากรลูกผสมกลับ (BILs) ชั่วที่ BC_2F_2 ในฐานพันธุกรรมข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ให้มี QTL ต้านทานโรคไหม้ และยีนต้านทานโรค ขอบใบแห้ง

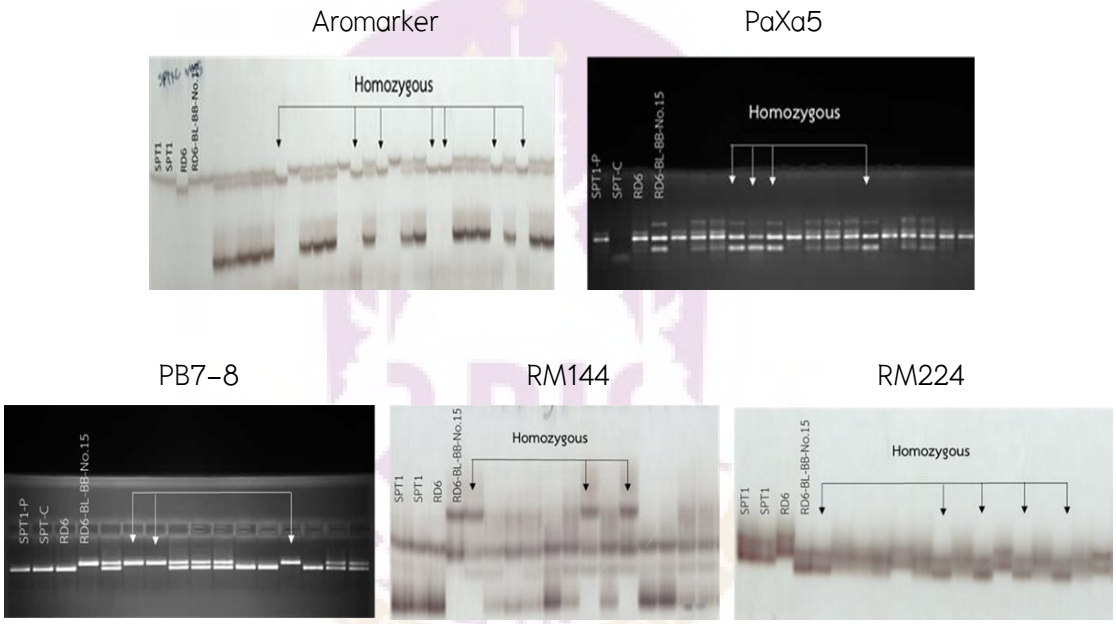
จากการนำข้าวเหนียวลูกผสมชั่วที่ F_1 จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ PYO12-003-4 และ PYO12-003-5 ที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างสันป่าตอง 1 x RD6-BL-BB-No.15 มาผสมกลับเข้าหาสันป่าตอง 1 สามารถผลิตเมล็ดลูกผสมกลับชั่วที่ BC_1F_1 ได้จำนวน 57 เมล็ด นำเมล็ดมาปลูก ได้ต้นกล้าที่แข็งแรงจำนวน 28 ต้น เมื่อนำมาตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ RM144, RM224, PAxa5, และ PB7-8 พบต้นที่แสดงจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัสครบทั้ง 4 ตำแหน่ง จำนวน 4 ต้น และได้คัดเลือกต้นที่มีลักษณะทางการเกษตรที่

เหมือนกับพันธุ์สันป่าตอง 1 มาจำนวน 2 ต้น ได้แก่ สายพันธุ์ PY013-015-9 และ PY013-015-10 เพื่อนำไปผสมกลับเข้าหาสันป่าตอง 1 สามารถผลิตเมล็ดผสมกลับชั่วที่ BC_2F_1 ได้จำนวน 40 เมล็ด เมื่อนำเมล็ดเหล่านี้มาปลูก สามารถคัดเลือกต้นข้าวที่สมบูรณ์และนำมาตรวจจีโนไทป์ จำนวน 29 ต้น ผลการตรวจสอบพบต้นที่แสดงจีโนไทป์เป็น เฮเทอโรไซกัสครบทั้ง 4 ตำแหน่ง จำนวน 1 ต้น ได้แก่ สายพันธุ์ PY013-040-5 ซึ่งมียีนเป้าหมายครบทั้ง 3 ยีน คือ *qBL11*, *xa5* และ *Xa21* หลังจากนั้นปล่อยให้ผสมตนเองเพื่อให้เข้าสู่สายพันธุ์แท้ และนำเมล็ดมาปลูกต่อ เพื่อสร้างประชากรข้าวลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_2 โดยทำการปลูกจำนวน 500 ต้น จากนั้นทำการคัดเลือกต้นที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีจำนวน 300 ต้น มาตรวจจีโนไทป์ พบต้นที่มียีนครบทั้ง 3 ยีน จำนวน 1 ต้น ได้แก่ สายพันธุ์ PY013-040-5-134 ซึ่งแสดงรูปแบบจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสครบทั้ง 4 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (ตาราง4) ซึ่งข้าวสายพันธุ์นี้มีลักษณะทรงต้นคล้ายกับข้าวสันป่าตอง 1 ที่ใช้เป็นพันธุ์รับ โดยข้าวสายพันธุ์นี้ใช้เป็นต้นพ่อ สำหรับการผสมข้ามเพื่อการรวมยีนเป้าหมายทั้ง 4 ยีนเข้าไปอยู่ในข้าวต้นเดียวกัน (ภาพ 5)

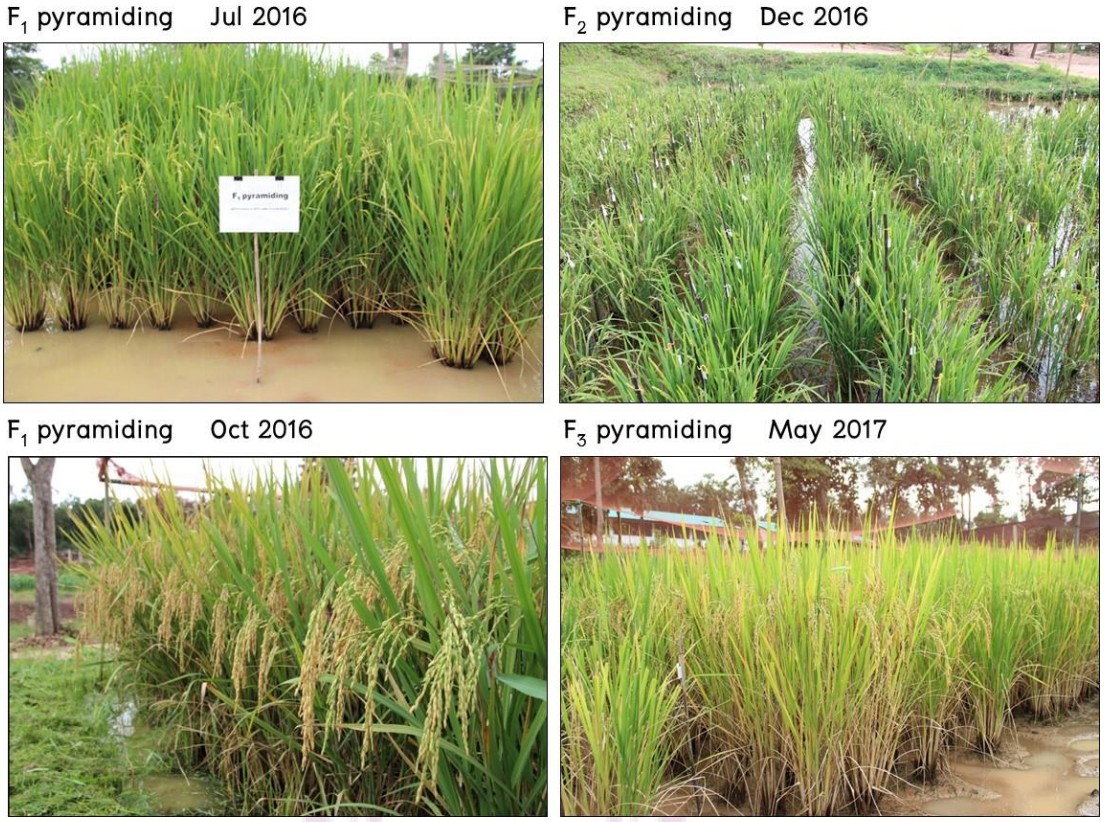
3. ผลการรวมยีนความหอม QTL ต้านทานโรคไหม้ และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งเข้าสู่ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1

จากการผสมข้ามระหว่างข้าวลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_2 สายพันธุ์ที่มียีนความหอม *badh2* จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ PY013-034-12-16, PY013-034-12-20, PY013-034-12-33 และ PY013-034-12-39 กับสายพันธุ์ที่มียีน *qBL11*, ยีน*xa5* และ *Xa21* จำนวน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ PY013-040-5-134 สามารถผลิตเมล็ดข้าวลูกผสมชั่วที่ F_1 ที่เกิดจากการรวมยีน (F_1 pyramiding) ได้จำนวน 2,477 เมล็ด แบ่งมาเพาะเมล็ดจำนวน 500 เมล็ด และทำการย้ายปลูกลงแปลง ทำการคัดเลือกต้นที่แข็งแรงได้ 215 ต้น เพื่อนำมาตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ Aromarker, RM224, RM144, PAxa5 และ PB7-8 ผลการตรวจสอบจีโนไทป์พบต้นที่แสดงจีโนไทป์แบบเฮเทอไซกัสทั้ง 5 ตำแหน่ง จำนวน 191 ต้น ในจำนวนนี้ได้คัดเลือกต้นที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีที่สุดจำนวน 3 ต้น ได้แก่ สายพันธุ์ PY016-001-3, PY016-001-7 และ PY016-001-9 นำเมล็ดจากต้นดังกล่าวมาปลูกต่อ เพื่อสร้างประชากรชั่วที่ F_2 pyramiding ทำการคัดเลือกต้นที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีจำนวน 561 ต้น มาตรวจสอบจีโนไทป์ (ภาพที่ 6) พบต้นที่มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสของยีนแบบต่าง ๆ จำนวน 36 ต้น จำแนกเป็น 7 รูปแบบการรวมตัวของยีน (combination) ในจำนวนนี้พบต้นที่มียีนเป้าหมายครบทั้ง 4 ยีน แสดงจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัสที่เครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 5 ตำแหน่ง จำนวน 2 ต้น ได้แก่ สายพันธุ์ PY016-001-3-24 และ PY016-001-3-162 (ตาราง 4 และ 5) หลังจากนั้นนำเมล็ดข้าวไปปลูกต่อ เพื่อสร้างประชากรชั่วที่ F_3 pyramiding

สายพันธุ์ละ 100 ต้น เพื่อเก็บเมล็ดชั่วที่ $F_{3:4}$ สำหรับนำไปประเมินความต้านทานต่อโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง และทดสอบผลผลิตต่อไป โดยการปลูกขยายเมล็ดพันธุ์ครั้งนี้ สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวสำหรับนำไปทดสอบความต้านทานต่อโรคไหม้และโรคขอบใบแห้งได้จำนวน 32 สายพันธุ์ และทดสอบผลผลิตจำนวน 24 สายพันธุ์ จากการพิจารณาลักษณะภายนอกของประชากรข้าวชั่วที่ F_3 pyramiding พบว่าจะมีลักษณะใกล้เคียงกับสันป่าตอง 1 ค่อนข้างมาก เช่น ลำต้นเตี้ย ลำต้นแข็งแรง ใบธงตั้ง ทรงต้นคล้ายกับสันป่าตอง 1 เมล็ดข้าวเปลือกสีเหลืองฟาง แต่พบว่ามีความแตกต่างของวันออกดอก โดยพบว่าบางสายพันธุ์จะมีวันออกดอก 50% ที่มากกว่าสันป่าตอง 1 ภาพของประชากรข้าวเหนียวที่เกิดจากการรวมยีน แสดงในภาพ 6



ภาพ 5 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ 5 เครื่องหมายในประชากรข้าวเหนียวที่เกิดจากการรวมยีนเป้าหมายในชั่วที่ F_2 pyramiding



ภาพ 6 ประชากรข้าวเหนียวชั่วที่ F_1 pyramiding, F_2 pyramiding และ F_3 pyramiding ที่พัฒนาสายพันธุ์มาจากข้าวสันป่าตอง 1 โดยการรวมยีน *badh2*, *qBL11*, *xa5* และ *Xa21* และโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก

ตาราง 4 สรุปผลการพัฒนาประชากรข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ให้มียีนความหอม (*badh2*) QTL ต้านทานโรคไหม้ (*qBL11*) และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง (*xa5* และ *Xa21*) ในชั่วต่าง ๆ

ชั่วที่	ประชากร	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	จำนวนเมล็ดผสม	จำนวนต้นที่ตรวจ MAS	จำนวนต้นที่มียีน
F_1	SPT1 x RD6	Aromarker	19	10	5 (heterozygous)
	SPT1 x RD6-BL-BB-No.15	RM224, RM144, PAxa5, PB7-8	12	7	5 (heterozygous)
BC_1F_1	SPT1 x RD6	Aromarker	69	25	10 (heterozygous)
	SPT1 x RD6-BL-BB-No.15	RM224, RM144, PAxa5, PB7-8	57	28	4 (heterozygous)
BC_2F_1	SPT1 x RD6	Aromarker	61	30	6 (heterozygous)
	SPT1 x RD6-BL-BB-No.15	RM224, RM144, PAxa5, PB7-8	40	29	1 (heterozygous)
BC_2F_2	SPT1 x RD6	Aromarker	-	50	4 (homozygous)
	SPT1 x RD6-BL-BB-No.15	RM224, RM144, PAxa5, PB7-8	-	300	1 (homozygous)
F_1 pyramiding	(SPT1 x RD6) x (SPT1 x RGD No.15)	Aromarker, RM144, RM224, PAxa5, PB7-8	2,477	215	191 (heterozygous)
F_2 pyramiding	(SPT1 x RD6) x (SPT1 x RGD No.15)	Aromarker, RM144, RM244, PAxa5, PB7-8	-	561	2 (homozygous)

ตาราง 5 รูปแบบการรวมตัวของยีนเป้าหมายแบบต่าง ๆ จำนวน 7 รูปแบบที่เป็นโฮโมไซกัสในประชากรข้าวเหนียวชั่วที่ F_2 pyramiding

รูปแบบการรวมตัวของยีน	จำนวนต้น	สายพันธุ์
badh2	5	PY016-001-3-15, PY016-001-7-48, PY016-001-9-142, PY016-001-9-205, PY016-001-9-215
badh2 + xa5	4	PY016-001-3-96, PY016-001-9-59, PY016-001-9-77, PY016-001-9-161
qBL11 + xa5 + Xa21	9	PY016-001-3-118, PY016-001-7-53, PY016-001-9-3, PY016-001-9-41, PY016-001-9-81, PY016-001-9-94, PY016-001-9-104, PY016-001-9-123, PY016-001-9-141
badh2 + qBL11 + Xa21	2	PY016-001-7-59, PY016-001-9-52
badh2 + qBL11 + xa5 + Xa21	2	PY016-001-3-24, PY016-001-3-162
xa5	6	PY016-001-3-43, PY016-001-7-11, PY016-001-7-42, PY016-001-7-118, PY016-001-9-29, PY016-001-9-181
qBL11 + Xa21	8	PY016-001-3-125, PY016-001-3-130, PY016-001-7-23, PY016-001-7-56, PY016-001-7-64, PY016-001-7-90, PY016-001-7-146, PY016-001-9-6
รวม 7	36	36

ผลการประเมินความต้านทานต่อโรคไหม้

จากการประเมินความต้านทานต่อโรคไหม้ของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 สายพันธุ์ปรับปรุงชุดรวมยีนในประชากรชั่วที่ $F_{3:4}$ pyramiding จำนวน 32 สายพันธุ์ (ตาราง 6) โดยใช้เชื้อสาเหตุการก่อโรคไหม้ (*Pyricularia oryzae*) ที่เก็บรวบรวมจากทั่วประเทศจำนวนทั้งสิ้น 45 ไอโซเลท โดยจัดเป็น 6 กลุ่มเชื้อ

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ประชากรข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ มีระดับความต้านทานต่อโรคไหม้ ทั้ง 5 กลุ่มเชื้อ ไม่แตกต่างจากสันป่าตอง 1 พันธุ์เดิมมากนัก แต่มีแนวโน้มแสดงความต้านทานต่อเชื้อบางกลุ่มเพิ่มมากขึ้น โดยผลการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ในแต่ละกลุ่มเชื้อมีดังนี้ (ตาราง 7 และ 8)

ตาราง 6 ข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ในชั่วที่ $F_{3:4}$ pyramiding จำนวน 32 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกเพื่อนำไปทดสอบความต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง

รูปแบบการรวมตัวของยีน	จำนวนต้น (homozygous)	สายพันธุ์
badh2	5	PY016-001-3-15, PY016-001-7-48, PY016-001-9-142, PY016-001-9-205, PY016-001-9-215
badh2 + xa5	2	PY016-001-3-96, PY016-001-9-161
qBL11 + xa5 + Xa21	8	PY016-001-3-118, PY016-001-7-53, PY016-001-9-3, PY016-001-9-41, PY016-001-9-81, PY016-001-9-94, PY016-001-9-104, PY016-001-9-123
badh2 + qBL11 + Xa21	2	PY016-001-7-59, PY016-001-9-52
badh2 + qBL11 + xa5 + Xa21	2	PY016-001-3-24, PY016-001-3-162
xa5	6	PY016-001-3-43, PY016-001-7-11, PY016-001-7-42, PY016-001-7-118, PY016-001-9-29, PY016-001-9-181
qBL11 + Xa21	7	PY016-001-3-130, PY016-001-7-23, PY016-001-7-64, PY016-001-7-90, PY016-001-7-146, PY016-001-9-6, PY016-001-7-56
รวม 7	32	32

ในกลุ่มเชื้อที่ 1 ผลการทดลองพบว่า ระดับคะแนนการเข้าทำลายของเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 0.97 คะแนน โดยข้าวที่มีความต้านทานต่อเชื้อกลุ่มนี้มากที่สุดคือพันธุ์เจ้าหอมนิล ส่วนสายพันธุ์ปรับปรุงที่เกิดจากการรวมยีนมีระดับคะแนนการเข้าทำลายอยู่ระหว่าง 0-1 ซึ่งถือว่ามีความต้านทานต่อกลุ่มเชื้อที่ 1 ในขณะที่ กข6 และขาวดอกมะลิ 105 มีระดับคะแนนการเข้าทำลายเท่ากับ 5 และพันธุ์ Sariceltic มีระดับคะแนนการเข้าทำลายเท่ากับ 6 ซึ่งถือว่าอ่อนแอ ส่วนสายพันธุ์ RD6-BL-BB-No.15 นั้นมีระดับคะแนนการเข้าทำลายเท่ากับ 3 ซึ่งถือว่าต้านทานปานกลาง ส่วนข้าวสันป่าตอง 1 มีระดับคะแนนการเข้าทำลายเท่ากับ 2 ซึ่งถือว่ามีความต้านทาน แสดงให้เห็นว่าข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ มีระดับความต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้

อยู่ในข้าวสายพันธุ์ RD6-BL-BB-No.15 นั้นให้ความต้านทานปานกลางต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในกลุ่มนี้ ส่วนพันธุ์เจ้าหอมนิลที่มีทั้ง *qBL11* และยีนที่ให้ความต้านทานต่อโรคไหม้ในตำแหน่งอื่น ๆ นั้นจะต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในกลุ่มนี้ได้ดีกว่า ขณะที่พันธุ์สันป่าตอง 1 และสายพันธุ์ที่เกิดจากการรวมยีนโดยส่วนใหญ่มีความต้านทานต่อเชื้อกลุ่มนี้ไม่แตกต่างจากพันธุ์เจ้าหอมนิล เพราะว่าพันธุ์สันป่าตอง 1 อาจมียีนที่ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้กลุ่มนี้ที่ไม่ใช่ *qBL11* ส่วนสายพันธุ์ที่เกิดจากการรวมยีนนั้นเมื่อได้รับการถ่ายทอด *qBL11* เข้าไปทำให้สามรถต้านทานได้ระดับหนึ่งประกอบกับอยู่ในฐานพันธุกรรมของสันป่าตอง 1 จึงทำให้ได้รับยีนต้านทานจากสันป่าตอง 1 ด้วยเช่นกัน ด้วยเหตุนี้จึงต้านทานกว่าสายพันธุ์ RD6-BL-BB-No.15 ที่มีเฉพาะ *qBL11*

ในกลุ่มเชื้อที่ 2 ผลการทดลองพบว่า ระดับคะแนนการเข้าทำลายเฉลี่ยของทุกสายพันธุ์เท่ากับ 0.55 โดยข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงที่เกิดจากการรวมยีนนั้น ส่วนใหญ่มีระดับคะแนนการเข้าทำลายระหว่าง 0-1 ซึ่งถือว่าเป็นระดับต้านทาน เช่นเดียวกับพันธุ์สันป่าตอง 1, กข6, RD6-BL-BB-No.15 และเจ้าหอมนิล แต่แตกต่างจากขาวดอกมะลิ 105 และ Sariceltic ซึ่งมีระดับคะแนนการเข้าทำลายอยู่ในช่วง 5-6 ซึ่งจัดอยู่ในระดับที่อ่อนแอ

ในกลุ่มเชื้อที่ 3 ผลการทดลองพบว่า มีระดับคะแนนการเข้าทำลายเฉลี่ยเท่ากับ 3.6 ในกลุ่มข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ที่เกิดจากการรวมยีน มีคะแนนการเข้าทำลายอยู่ในช่วง 1-6 โดยส่วนใหญ่แล้วจะมีระดับการเข้าทำลายที่ 3-4 คะแนนซึ่งจัดอยู่ในระดับต้านทานปานกลาง นอกจากนี้มีกลุ่มสายพันธุ์ต้านทานที่มีระดับคะแนนการเข้าทำลายตั้งแต่ 0-2 ซึ่งถือว่าต้านทานจำนวน 6 สายพันธุ์ เช่นเดียวกับพันธุ์เจ้าหอมนิล และ RD6-BL-BB-No.15 ได้แก่ PY016-001-7-64, PY016-001-9-3, PY016-001-9-41, PY016-001-9-52, PY016-001-9-81, PY016-001-9-94 และ PY016-001-9-104 ซึ่งสายพันธุ์เหล่านี้จะมี *qBL11* ส่วนสันป่าตอง 1, กข6, ขาวดอกมะลิ 105 และ Sariceltic มีระดับคะแนนการเข้าทำลาย 5-6 ซึ่งจัดอยู่ในระดับอ่อนแอ แสดงว่า *qBl11* มีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในกลุ่มนี้ได้ดีจึงทำให้สายพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายทอด QTL ดังกล่าวมีความต้านทานเพิ่มขึ้นส่วนพันธุ์สันป่าตอง 1 ถึงแม้ว่ามีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในกลุ่มที่ 1 และ 2 แต่ในกลุ่มเชื้อที่ 3 นี้กลับอ่อนแอแสดงว่ายีนต้านทานที่มีอยู่ในพันธุ์สันป่าตอง 1 นั้นอ่อนแอต่อเชื้อก่อโรคไหม้ในกลุ่มที่ 3

ในกลุ่มเชื้อที่ 4 พบว่ามีระดับคะแนนการเข้าทำลายเฉลี่ยเท่ากับ 5.4 โดยข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ มีระดับคะแนนการเข้าทำลายอยู่ระหว่าง 5-6 จัดอยู่ในระดับอ่อนแอเช่นเดียวกับสันป่าตอง 1, กข6 และขาวดอกมะลิ 105 แต่พบว่ามีสายพันธุ์ที่ความต้านทานปานกลางที่ระดับคะแนนระหว่าง 3-4 จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ PY016-001-7-53,

PY016-001-7-56, PY016-001-7-59, PY016-001-7-64, PY016-001-7-90 และ PY016-001-9-41 เช่นเดียวกับสายพันธุ์ RD6-BL-BB-No.15 ส่วนพันธุ์เจ้าหอมนิล มีระดับความต้านทานมากที่สุดที่ระดับคะแนนการเข้าทำลายเท่ากับ 2 จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า เชื้อในกลุ่มนี้มีความรุนแรงค่อนข้างมาก สามารถเข้าทำลายข้าวสันป่าตอง 1 ข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ได้ และพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบต้านทานบางสายพันธุ์ได้ แต่ในขณะที่เจ้าหอมนิลยังคงแสดงความต้านทานต่อเชื้อในกลุ่มนี้ได้ดี แสดงให้เห็นว่าเจ้าหอมนิลยังมียีนรอง (minor gene) อื่น ๆ นอกจาก *qBL1* และ *qBL11* ที่ควบคุมความต้านทานต่อโรคไหม้อีก เนื่องจากว่าข้าว RD6-BL-BB-No.15 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ในโครงการวิจัยนี้ มี *qBL1* และ *qBL11* ที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากเจ้าหอมนิล แต่ว่าเชื้อในกลุ่มนี้ยังสามารถเข้าทำลายได้

ในกลุ่มเชื้อที่ 5 พบว่ามีระดับคะแนนการเข้าทำลายอยู่ในช่วง 1-6 เฉลี่ยเท่ากับ 3.1 โดยสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ ส่วนใหญ่จะมีระดับความต้านทานปานกลางจนถึงต้านทาน เช่นเดียวกับพันธุ์สันป่าตอง 1 และ RD6-BL-BB-No.15 ส่วนพันธุ์ กข6, ขาวดอกมะลิ 105 และ Sariceltic ส่วนพันธุ์เจ้าหอมนิลอยู่ในระดับต้านทาน มีระดับคะแนนการเข้าทำลายเท่ากับ 1

ในกลุ่มเชื้อที่ 6 พบว่ามีระดับคะแนนการเข้าทำลายอยู่ในช่วง 0-6 เฉลี่ยเท่ากับ 3.1 โดยข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ที่เกิดจากการรวมยีน ส่วนใหญ่มีระดับคะแนนการเข้าทำลายอยู่ในช่วง 0-2 คะแนน โดยมีทั้งหมด 12 สายพันธุ์ ซึ่งมีระดับความต้านทานเช่นเดียวกับพันธุ์สันป่าตอง 1, RD6-BL-BB-No.15 และเจ้าหอมนิล สายพันธุ์ที่ต้านทานในระดับปานกลางที่มีระดับคะแนนการเข้าทำลาย 3-4 มีทั้งหมด 13 สายพันธุ์ ส่วนสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อเชื้อในกลุ่มนี้ ที่มีระดับคะแนนการเข้าทำลาย 5-6 มีทั้งหมด 7 สายพันธุ์ เช่นเดียวกับพันธุ์ กข6, ขาวดอกมะลิ 105 และ Sariceltic เมื่อพิจารณาถึงสายพันธุ์ปรับปรุงที่มีความอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุก่อโรคไหม้กลุ่มนี้แล้ว พบว่าสายพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายทอด *qBL11* นั้นจะมีความต้านทานที่ต่ำแตกต่างจากสายพันธุ์ที่ไม่มี *qBL11* แสดงว่า *qBL11* ไม่สามารถต้านทานต่อเชื้อกลุ่มนี้ได้ ซึ่งภาพการประเมินความต้านทานแสดงในภาพ 7

ตาราง 7 ผลการทดสอบความต้านทานต่อโรคไหม้ของประชากรข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ ที่เกิดจากการรวมยีนในชั่วที่ $F_{3:4}$ pyramiding จำนวน 32 สายพันธุ์

ลำดับ	พันธุประวัติ	ระดับคะแนนการเข้าทำลายของกลุ่มเชื้อ *Pyricularia oryzae*					
		M1	M2	M3	M4	M5	M6
1	PY016-001-3-24	0 ef	0 ef	5 a-d	6 a	1 f	3 c-h
2	PY016-001-3-43	0 ef	0 ef	3 d-h	6 a	1 f	1 j-l
3	PY016-001-3-96	1 ef	1 de	5 a-d	6 a	4 a-d	2 h-l
4	PY016-001-3-118	0 ef	0 ef	5 a-d	6 a	4 a-d	3 c-h
5	PY016-001-3-130	1 de	0 ef	4 b-f	6 a	2 d-f	5 a-d
6	PY016-001-3-162	1 ef	0 ef	5 a-d	6 a	3 d-f	4 a-e
7	PY016-001-7-11	1 ef	1 cd	4 b-f	6 a	4 a-e	2 f-k
8	PY016-001-7-23	1 de	0 ef	4 c-g	6 a	4 b-e	5 a-d
9	PY016-001-7-42	0 ef	1 cd	4 b-f	6 a	4 b-e	1 kl
10	PY016-001-7-48	1 ef	1 c	4 b-f	6 a	3 d-f	1 i-l
11	PY016-001-7-53	1 de	0 ef	6 a	5 cd	1 f	4 b-g
12	PY016-001-7-56	1 ef	0 ef	5 a-d	4 de	2 ef	3 e-j
13	PY016-001-7-59	0 ef	0 ef	4 c-g	3 e	1 f	4 b-g
14	PY016-001-7-64	0 ef	0 ef	2 f-i	4 de	1 f	4 b-f
15	PY016-001-7-90	1 ef	0 ef	4 c-g	3 e	2 d-f	5 a-d
16	PY016-001-7-118	0 ef	1 cd	3 e-i	6 a	3 d-f	3 d-i
17	PY016-001-7-146	1 ef	0 ef	4 c-g	5 a-c	2 ef	5 a-d
18	PY016-001-9-3	0 ef	0 ef	2 hi	6 ab	2 d-f	3 c-h
19	PY016-001-9-6	2 cd	0 ef	1 i	6 a	2 ef	3 c-h
20	PY016-001-9-29	0 ef	1 c	4 a-e	6 a	4 a-e	1 i-l
21	PY016-001-9-41	0 ef	0 ef	2 hi	4 de	3 c-f	4 a-e
22	PY016-001-9-52	1 ef	0 ef	2 g-i	5 a-c	4 a-e	5 ab

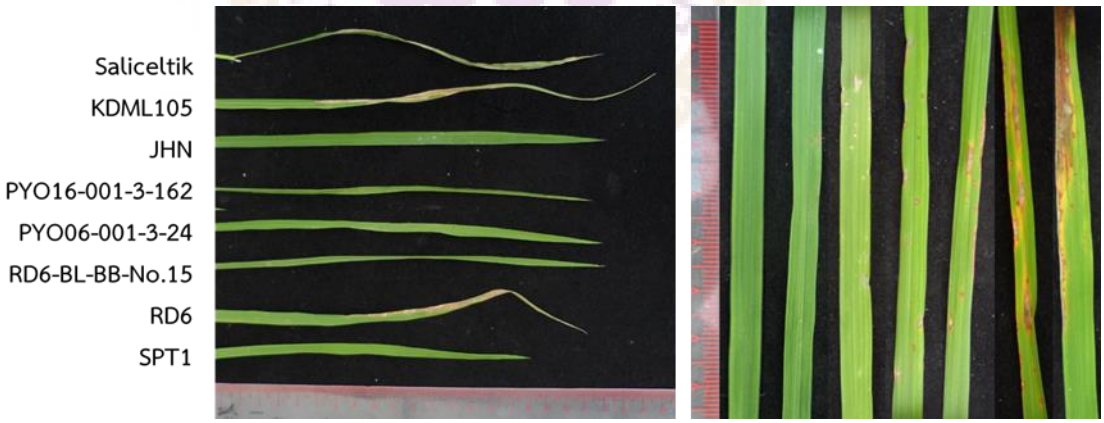
ตาราง 7 (ต่อ)

ลำดับ	พันธุประวัติ	ระดับคะแนนการเข้าทำลายของกลุ่มเชื้อ *Pyricularia oryzae*					
		M1	M2	M3	M4	M5	M6
23	PYO16-001-9-81	0 ef	0 ef	2 g-i	6 a	5 a-c	4 b-f
24	PYO16-001-9-94	0 ef	0 ef	1 i	6 ab	5 a-c	5 a-d
25	PYO16-001-9-104	1 ef	0 ef	2 hi	6 ab	4 b-e	4 b-f
26	PYO16-001-9-123	1 ef	0 ef	4 b-f	6 ab	2 d-f	5 a-c
27	PYO16-001-9-142	0 ef	1 c	3 d-h	6 a	3 c-f	2 g-l
28	PYO16-001-9-161	0 ef	0 ef	3 d-h	6 a	3 d-f	2 g-l
29	PYO16-001-9-181	1 ef	0 ef	3 d-h	6 a	3 c-f	1 j-l
30	PYO16-001-9-205	0 ef	0 ef	5 a-c	6 a	3 c-f	1 kl
31	PYO16-001-9-215	0 ef	1 de	3 d-h	5 cd	4 a-e	0 l
32	PYO16-001-3-15	0 ef	0 ef	4 a-e	5 bc	3 d-f	1 i-l
33	SPT1	2 de	1 cd	5 a-d	6 a	4 b-e	2 f-k
34	RD6	5 b	1 cd	6 ab	6 a	6 ab	6 a
35	RD6-BL-BB-No.15	3 c	0 ef	2 f-i	4 e	4 a-e	2 g-l
36	KDML105	5 ab	5 b	6 a	6 a	6 a	5 a-d
37	JHN	0 f	0 f	1 i	2 f	1 f	1 j-l
38	Sariceltic	6 a	6 a	6 a	6 a	6 a	6 a
	Alpha (0.05)	*	*	*	*	*	*
	Mean	1	1	4	5	3	3
	Max	6	6	6	6	6	6
	Min	0	0	1	2	1	0
	LSD	1.26	0.56	1.74	0.99	2.31	1.75
	EMS	0.60	0.12	1.15	0.37	2.01	1.16
	CV (%)	79.70	61.89	29.49	11.23	45.03	34.62

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตาราง 8 ระดับคะแนนเฉลี่ยของการเข้าทำลายของโรคไหม้จำนวน 6 กลุ่มเชื้อ ในข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่จำนวน 32 สายพันธุ์ ที่มีรูปแบบการรวมตัวของยีนที่แตกต่างกันจำนวน 7 รูปแบบ เปรียบเทียบกับพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อแม่

ลำดับ	Gene combination	จำนวนสายพันธุ์	ระดับคะแนนการเข้าทำลายของกลุ่มเชื้อ *Pyricularia oryzae*					
			M1	M2	M3	M4	M5	M6
1	*badh2*	5	0	1	4	6	3	1
2	*badh2* + *xa5*	2	1	1	4	6	4	2
3	*qBL11* + *xa5* + *Xa21*	8	0	0	3	6	3	4
4	*badh2* + *qBL11* + *Xa21*	2	1	0	3	4	3	5
5	*badh2* + *qBL11* + *xa5* + *Xa21*	2	1	0	5	6	2	4
6	*xa5*	6	0	1	4	6	3	2
7	*qBL11* + *Xa21*	7	1	0	3	5	2	4
	SPT1		2	1	5	6	4	2
	RD6		5	1	6	6	6	6
	RD6-BL-BB-No.15		3	0	2	4	4	2
	JHN		0	0	1	2	1	1



ภาพ 7 การประเมินความต้านทานโรคไหม้ในสภาพโรงเรือนในข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ที่พัฒนาพันธุ์มาจากข้าวสันป่าตอง 1

ผลการประเมินความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง

จากการประเมินความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในประชากรชั่วที่ $F_{3:4}$ pyramiding จำนวน 32 สายพันธุ์โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* ที่สามารถเข้าทำลายข้าวพันธุ์สันป่าตอง 1 ได้จำนวน 4 ไอโซเลท (ภาพ 8) ผลการทดลองมีดังนี้ (ตาราง 9 และ 10)

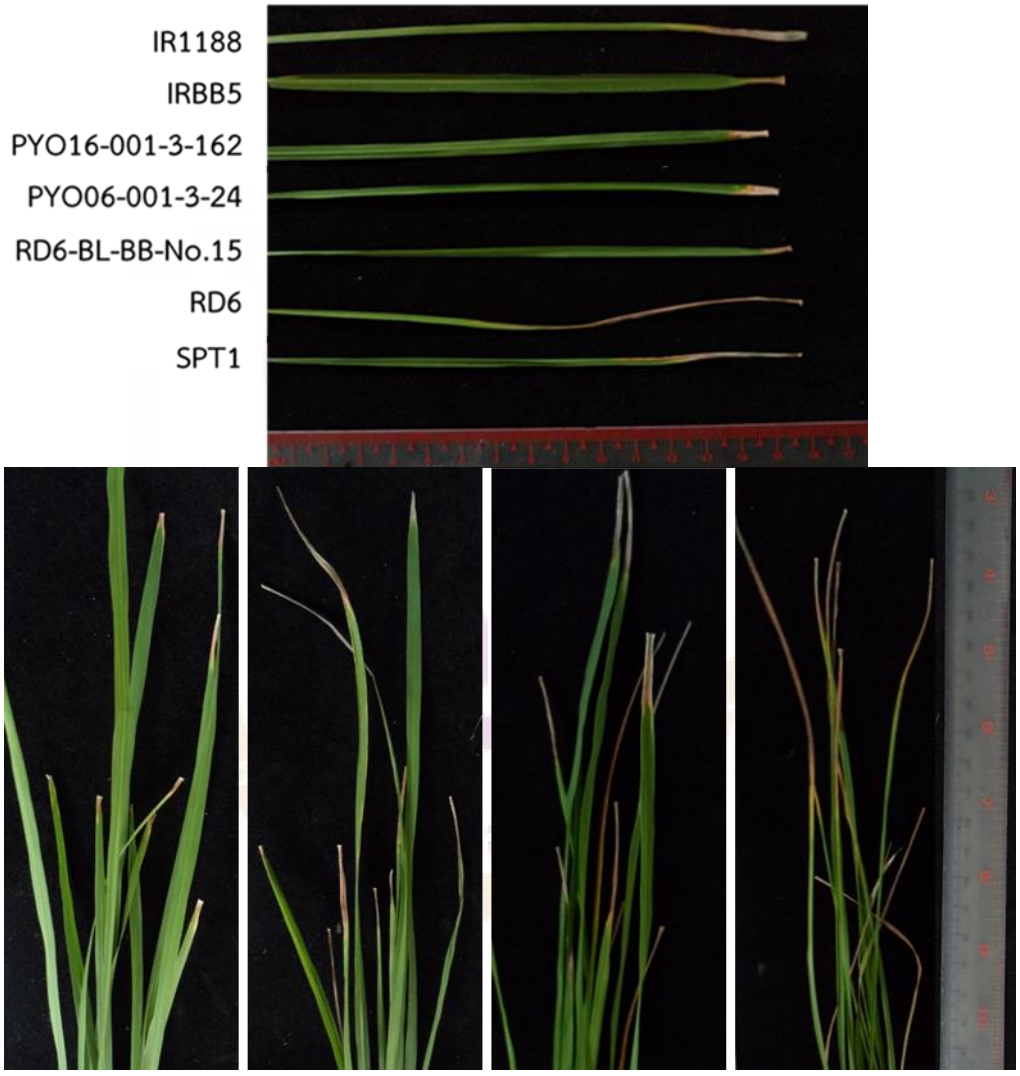
เมื่อประเมินความต้านทานต่อเชื้อไอโซเลทที่ 1 (CN1-3) พบว่าข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่มีความยาวแผลที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้ออยู่ในช่วง 0.8 – 13.9 เซนติเมตร เฉลี่ยเท่ากับ 3.83 เซนติเมตร โดยพบว่าข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ส่วนใหญ่จะมีความต้านทานถึง 17 สายพันธุ์ ซึ่งมีระดับความต้านทานเช่นเดียวกับ RD6-BL-BB-No.1 และ IRBB5 สายพันธุ์ที่มีความต้านทานปานกลางมีทั้งหมด 9 สายพันธุ์ อ่อนแอปานกลาง 4 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่อ่อนแอมีจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ PY016-001-9-205 และ PY016-001-9-215 เช่นเดียวกับพันธุ์สันป่าตอง 1 และ กข6

เมื่อประเมินความต้านทานต่อเชื้อไอโซเลทที่ 2 (KDI-2) พบว่าข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่มีความยาวแผลเฉลี่ยเท่ากับ 3.7 เซนติเมตร โดยพบว่าส่วนใหญ่จะมีความต้านทานต่อเชื้อไอโซเลทนี้ถึง 20 สายพันธุ์ เช่นเดียวกับ RD6-BL-BB-No.15 และ IRBB5 สายพันธุ์ที่มีความต้านทานปานกลาง มีจำนวน 9 สายพันธุ์ ส่วนสายพันธุ์ที่อ่อนแอมีจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ PY016-001-7-48, PY016-001-9-142 และ PY016-001-9-205 เช่นเดียวกับพันธุ์ กข6 ส่วนพันธุ์สันป่าตอง 1 นั้นมีความยาวแผลเท่ากับ 6.2 เซนติเมตร ซึ่งถือว่าอ่อนแอปานกลาง

เมื่อประเมินความต้านทานต่อเชื้อไอโซเลทที่ 3 (CR1-5) พบว่ามีความยาวแผลเฉลี่ยเท่ากับ 3.1 เซนติเมตร โดยข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่จำนวน 24 สายพันธุ์ มีความต้านทานต่อเชื้อไอไซเลทที่ 3 มีความยาวแผลอยู่ในช่วง 0.0–3.0 เซนติเมตร เช่นเดียวกับ RD6-BL-BB-No.15, IRBB5 และ IR1188 สายพันธุ์ที่มีระดับต้านทานปานกลาง จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ PY016-001-3-96, PY016-001-3-130 และ PY016-001-9-6 มีความยาวแผลระหว่าง 3.1-6.0 เซนติเมตร และสายพันธุ์ที่อ่อนแอปานกลางที่มีความยาวแผลตั้งแต่ 3.1 – 6.0 เซนติเมตร มีจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ PY016-001-7-48, PY016-001-9-142, PY016-001-9-205, PY016-001-9-215, PY016-001-3-15 ส่วนพันธุ์ กข6 นั้นมีความยาวแผลเฉลี่ยเท่ากับ 11.4 เซนติเมตร ซึ่งอ่อนแอต่อเชื้อก่อโรคขอบใบแห้งในไอโซเลทนี้

เมื่อประเมินความต้านทานต่อเชื้อไอโซเลทที่ 4 (TX085) พบว่าข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ จำนวน 28 สายพันธุ์ แสดงความต้านทานต่อเชื้อในไอโซเลทนี้ มีความยาวแผลที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อเฉลี่ย 2.2 เซนติเมตร เช่นเดียวกับ IRBB5 และ IR1188 สายพันธุ์

ที่มีความต้านทานปานกลางจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ PYO16-001-7-48, PYO16-001-9-142, PYO16-001-9-205 และ PYO16-001-9-215 เช่นเดียวกับสันป่าตอง 1 และ RD6-BL-BB-No.15 ส่วนพันธุ์ กข6 แสดงความอ่อนแอต่อเชื้อ โดยมีความยาวแผลเฉลี่ยเท่ากับ 7.7 เซนติเมตร



ภาพ 8 การประเมินความต้านทานโรคขอบใบแห้งในสภาพโรงเรือนในข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ที่พัฒนาพันธุ์มาจากข้าวสันป่าตอง 1

ตาราง 9 ผลการทดสอบความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งของประชากรข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ที่เกิดจากการรวมยีนในชั่วที่ $F_{3:4}$ pyramiding จำนวน 32 สายพันธุ์

ลำดับ	พันธุประวัติ	ความยาวแผลที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* จำนวน 4 ไอโซเลท (เซนติเมตร)			
		CN1-3	KDI-2	CR1-5	TX085
1	PY016-001-3-24	1.2 ^{hi}	1.2^{jk}	1.1 ^{ij}	1.1 ^{ij}
2	PY016-001-3-43	1.3 ^{hi}	1.4 ^{jk}	1.1 $^{h-j}$	1.0 ^{j}
3	PY016-001-3-96	6.6 $^{c-e}$	5.4 $^{e-g}$	4.1 ^{d}	3.0 $^{d-g}$
4	PY016-001-3-118	1.3 ^{hi}	1.7 $^{h-k}$	1.0 ^{j}	1.1 ^{ij}
5	PY016-001-3-130	4.9 $^{d-f}$	3.9 $^{f-j}$	2.7 $^{d-g}$	1.9 $^{g-j}$
6	PY016-001-3-162	1.0 ^{hi}	1.1 ^{jk}	1.0 ^{j}	1.1 ^{ij}
7	PY016-001-7-11	1.3 ^{hi}	1.3 ^{jk}	1.0 ^{j}	1.3 $^{h-j}$
8	PY016-001-7-23	4.1 ^{fg}	3.2 $^{g-k}$	2.7 $^{d-f}$	2.4 $^{f-i}$
9	PY016-001-7-42	0.8^{i}	1.2 ^{jk}	1.2 $^{g-j}$	1.3 $^{h-j}$
10	PY016-001-7-48	7.3 ^{c}	9.4^{bc}	7.0 ^{c}	3.8 $^{c-e}$
11	PY016-001-7-53	1.0 ^{hi}	2.5 $^{h-k}$	0.9 ^{j}	1.0 ^{ij}
12	PY016-001-7-56	4.4^{fg}	3.9 $^{f-j}$	2.0 $^{e-j}$	2.2 $^{f-j}$
13	PY016-001-7-59	4.3^{fg}	1.8 $^{h-k}$	2.2 $^{e-j}$	1.5 $^{h-j}$
14	PY016-001-7-64	4.7 $^{d-f}$	3.4 $^{f-k}$	2.6 $^{e-h}$	2.3 $^{f-j}$
15	PY016-001-7-90	5.0 $^{d-f}$	3.9 $^{f-j}$	3.2 ^{de}	2.2 $^{f-j}$
16	PY016-001-7-118	1.3 ^{hi}	1.2 ^{jk}	1.3 $^{f-j}$	0.9 ^{j}
17	PY016-001-7-146	5 $^{d-f}$	4.4 $^{f-h}$	3.0 ^{de}	1.7 $^{g-j}$
18	PY016-001-9-3	1.6 ^{hi}	1.8 $^{h-k}$	1.1 $^{h-j}$	1.3 $^{h-j}$
19	PY016-001-9-6	4.0 ^{fg}	3.2 $^{g-k}$	3.4 ^{de}	2.2 $^{f-j}$
20	PY016-001-9-29	1.1 ^{hi}	1.3 ^{jk}	1.3 $^{f-j}$	1.1^{ij}
21	PY016-001-9-41	1.4 ^{hi}	0.8 ^{k}	0.8 ^{j}	0.9 ^{j}
22	PY016-001-9-52	4.5 $^{e-g}$	3.4 $^{f-k}$	2.5 $^{e-i}$	2.0 $^{g-j}$
23	PY016-001-9-81	0.8 ^{i}	1.5 $^{i-k}$	1.0 ^{j}	1.2 $^{h-j}$
24	PY016-001-9-94	1.3 ^{hi}	1.3 ^{jk}	0.8 ^{j}	0.9 ^{j}
25	PY016-001-9-104	2.4 $^{g-i}$	2.5 $^{h-k}$	1.9 $^{e-j}$	1.7 $^{g-j}$
26	PY016-001-9-123	1.3 ^{hi}	1.4 ^{jk}	1.3 $^{f-j}$	0.9 ^{j}

ตาราง 9 (ต่อ)

ลำดับ	พันธุประวัติ	ความยาวแผลที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Xanthomonas oryzae* จำนวน 4 ไอโซเลท (เซนติเมตร)			
		CN1-3	KDI-2	CR1-5	TX085
27	PYO16-001-9-142	6.8 ^{cd}	12.0 ^{ab}	8.0^{bc}	4.6 ^{bc}
28	PYO16-001-9-161	1.3 ^{hi}	1.2 ^{jk}	1.4 $^{f-j}$	1.2 $^{h-j}$
29	PYO16-001-9-181	1.6 ^{hi}	1.3^{jk}	1.0 ^{j}	1.4 $^{h-j}$
30	PYO16-001-9-205	10.6 ^{b}	11.4 ^{b}	8.7 ^{b}	4.2 $^{b-d}$
31	PYO16-001-9-215	10.6 ^{b}	7.3 $^{c-e}$	8.6 ^{b}	4.6^{bc}
32	PYO16-001-3-15	8.6 ^{bc}	8.3 ^{cd}	8.5 ^{b}	2.5 $^{e-h}$
33	SPT1	9.8 ^{b}	6.2 $^{d-f}$	8.7 ^{b}	5.3 ^{b}
34	RD6	13.9 ^{a}	14.7 ^{a}	11.4 ^{a}	7.7 ^{a}
35	RD6-BL-BB-No.15	1.3 ^{hi}	2.0 $^{h-k}$	1.4 $^{f-j}$	3.5 $^{c-f}$
36	IRBB5	1.4 ^{hi}	1.5 $^{i-k}$	0.9 ^{j}	1.4 $^{h-j}$
37	IR1188	3.1 $^{f-h}$	4.3 $^{f-i}$	2.6 $^{e-g}$	2.3 $^{f-j}$
	Alpha (0.05)	*	*	*	*
	Mean	3.8	3.7	3.1	2.2
	Max	13.9	14.7	11.4	7.7
	Min	0.8	0.8	0.8	0.9
	LSD	2.20	2.83	1.47	1.67
	EMS	1.18	1.95	0.52	0.45
	CV (%)	28.35	37.35	23.52	30.86

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากผลการประเมินความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งโดยใช้เชื้อ *Xanthomonas oryzae* จำนวน 4 ไอโซเลท พบว่าข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ที่พัฒนาพันธุ์มาจากข้าวสันป่าตอง 1 ที่ได้รับการถ่ายทอดยีนต้านทาน *xa5* และ *Xa21* มีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวสันป่าตอง 1 พันธุ์เดิม โดยสายพันธุ์ที่มียีน *xa5* และ *Xa21* จะมีความต้านทานมากที่สุด ส่วนสายพันธุ์ที่มียีน *xa5* อย่างเดียว จะแสดงความต้านทานต่อโรคมากกว่าสายพันธุ์ที่มียีน *Xa21* เพียงอย่างเดียว (ตาราง 10) แสดงให้เห็นว่ายีน *xa5* และ *Xa21* ที่ได้รับการถ่ายทอดจากข้าวสายพันธุ์ต้านทาน RD6-BL-BB-No.15 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ สามารถสร้างความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งได้จริง โดยยีน *xa5* จะเป็นยีนต้านทานหลัก (major gene)

ต่อเชื้อโรคขอบใบแห้งในประเทศไทย และมียีน *Xa21* เป็นยีนต้านทานรอง (minor gene) ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Win et al. (2012)

ตาราง 10 ระดับคะแนนเฉลี่ยของการเข้าทำลายของโรคขอบใบแห้ง จำนวน 4 ไอโซเลท ในข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่จำนวน 32 สายพันธุ์ ที่มีรูปแบบการรวมตัวของยีนที่แตกต่างกันจำนวน 7 รูปแบบ เปรียบเทียบกับ พันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อแม่และพันธุ์มาตรฐาน

ลำดับ	Gene combination	*จำนวนสายพันธุ์*	ความยาวแผลที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Xoo.* จำนวน 4 ไอไซเลท (ซม.)			
			CN1-3	KDI 2	CR1-5	TXO 85
1	*badh2*	5	8.5	9.6	8.2	3.9
2	*badh2* + *xa5*	2	4.0	3.3	2.8	2.1
3	*qBL11* + *xa5* + *Xa21*	8	1.4	1.7	1.1	1.1
4	*badh2* + *qBL11* + *Xa21*	2	4.4	2.6	2.4	1.8
5	*badh2* + *qBL11* + *xa5* + *Xa21*	2	1.1	1.2	1.1	1.1
6	*xa5*	6	1.2	1.3	1.2	1.2
7	*qBL11* + *Xa21*	7	4.6	3.7	2.8	2.1
	SPT1		9.8	6.2	8.7	5.3
	RD6 *(badh2)*		13.9	14.7	11.4	7.7
	RD6-BL-BB-No.15 (*qBL11*, *xa5*, *Xa21*)		1.3	2.0	1.4	3.5
	IRBB5 (*xa5*)		1.4	1.5	0.9	1.4
	IR1188 (*Xa21 qBB1*, *qBB8*, *qBB11*)		3.1	4.3	2.6	2.3

ผลการทดสอบผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิต

จากการทดสอบผลผลิตของประชากรข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุง ที่เกิดจากการรวมยีนในชั่วที่ $F_{3:4}$ pyramiding จำนวน 24 สายพันธุ์ (ตาราง 11) ในสภาพน้ำสมบูรณ์ ฤดูปลูกนาปี พ.ศ. 2560 โดยมีพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ สันป่าตอง 1, กข6 และ RD6-BL-BB-No.15 ผลการทดลองมีดังนี้ (ตาราง 12)

1.วันออกดอก 50% (DF 50%)

ประชากรข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่มีอายุวันออกดอก 50%ประมาณ 118 วัน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสันป่าตองที่มีอายุวันออกดอก 115 วัน ในขณะที่วันออกดอกของข้าว

เหนียว กข6 และ RD6-BL-BB-No.15 ซึ่งเป็นข้าวไวต่อช่วงแสงนั้น มีวันออกดอกเฉลี่ยเท่ากับ 119 วัน จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า วันออกดอกของประชากรข้าวเหนียวสายพันธุ์ที่พัฒนาพันธุ์มาจากข้าวสันป่าตอง 1 มีอายุปลูกถึงเก็บเกี่ยวประมาณ 150 วัน ซึ่งมากกว่าข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ตามที่กรมการข้าวระบุไว้ คือ 130-135 วัน (กรมการข้าว, 2551) จากผลการทดลองดังกล่าวอาจเป็นเพราะมีหน่อข้าวที่แตกขึ้นมาใหม่ในระยะใกล้ออกรวง จึงทำให้ออกดอกช้า ทำให้มีระยะเวลาวันออกดอก 50% ที่ยาวนานขึ้น ซึ่งการแตกหน่อใหม่ภายในกอนั้นเป็นผลมาจากการเข้าทำลายของแมลงบั่ว (*Orseolia oryzae*) จากการประเมินการเข้าทำลายด้วยสายตา พบว่ามีระดับการเข้าทำลายประมาณ 50-80% ในแต่ละแปลงย่อย ทำให้มีการแตกหน่อขึ้นใหม่ หลังการฟื้นตัว จึงทำให้วันออกดอกยาวนานกว่าปกติ

2. ความสูงของลำต้น (PH)

ค่าเฉลี่ยความสูงของข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ที่นำมาปลูกทดสอบ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 116.66 เซนติเมตร สายพันธุ์ที่มีความสูงน้อยที่สุดคือ PY016-001-3-125 มีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 107.22 เซนติเมตร สายพันธุ์ที่มีความสูงมากที่สุดคือ PY016-001-9-6 มีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 120.34 เซนติเมตร ซึ่งใกล้เคียงกับพันธุ์สันป่าตอง 1 พันธุ์เดิม ที่มีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 118.22 เซนติเมตร ส่วนพันธุ์ กข6 นั้น มีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 166.67 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์ข้าวอื่น ๆ อย่างมีระดับนัยสำคัญ (P=0.01) จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าลักษณะความสูงของข้าวเหนียวสายพันธุ์ที่พัฒนาพันธุ์มาจากข้าวสันป่าตอง 1 มีความสูงและลักษณะทรงต้นใกล้เคียงกับข้าวสันป่าตอง 1 คือ กอตั้งไม่แบะ ใบธงตั้ง ลำต้นแข็งแรง ต้านทานต่อการหักล้มได้ดี

3. จำนวนต้นต่อกอ (TN)

ข้าวเหนียวสายพันธุ์ที่ปรับปรุงพันธุ์ขึ้นใหม่ มีค่าเฉลี่ยจำนวนต้นต่อกอเท่ากับ 9 ต้นต่อกอ สายพันธุ์ที่มีจำนวนต้นต่อกอมากที่สุดคือ PY016-001-9-142 มีจำนวนเฉลี่ยเท่ากับ 12 ต้นต่อกอ สายพันธุ์ที่มีจำนวนต้นต่อกอน้อยที่สุดคือ PY016-001-3-15, PY016-001-3-24, PY016-001-9-6, PY016-001-3-43, PY016-001-7-42 และ PY016-001-7-118 มีจำนวนต้นต่อกอเฉลี่ยเท่ากับ 8 ต้นต่อกอ ส่วนพันธุ์ กข6 และสันป่าตอง 1 นั้นมีจำนวนต้นต่อกอเฉลี่ยเท่ากับ 9 ต้นต่อกอ ในขณะที่ RD6-BL-BB-No.15 มีจำนวนต้นต่อกอเฉลี่ยเท่ากับ 10 ต้นต่อกอ จากการวิเคราะห์ทางสถิติปรากฏว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่มีการแตกกอค่อนข้างมากใกล้เคียงกับข้าวสันป่าตอง 1 พันธุ์เดิม แต่ส่วนใหญ่จะเป็นหน่อใหม่ที่แตกขึ้นมา

หลังจากการฟื้นตัวหลังจากการเข้าทำลายของแมลงบั่ว ซึ่งจะส่งผลต่อขนาดของรวงที่เล็กลงด้วย

4. จำนวนรวงต่อกอ (PN)

จำนวนรวงต่อกอในข้าวเหนียวสายพันธุ์ที่พัฒนาขึ้นใหม่ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9 รวงต่อกอสอดคล้องกับจำนวนต้นต่อกอ สายพันธุ์ที่มีจำนวนรวงต่อกอมากที่สุดคือ PY016-001-7-59 มีจำนวน 11 รวงต่อกอ สายพันธุ์ที่มีจำนวนรวงต่อกอน้อยที่สุดคือ PY016-001-3-15, PY016-001-3-24, PY016-001-9-6, PY016-001-3-43 และ PY016-001-7-42 มีจำนวน 7 รวงต่อกอส่วนพันธุ์ กข 6, สันป่าตอง 1 และ RD6-BL-BB-No.15 มีจำนวน 9 รวงต่อกอ ซึ่งทุกสายพันธุ์มีจำนวนรวงต่อกอไม่แตกต่างต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (P=0.05)

5. จำนวนเมล็ดดีต่อรวง (FGN)

ลักษณะจำนวนเมล็ดดีต่อรวงของข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่และพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ มีจำนวนเมล็ดดีต่อรวง เฉลี่ยเท่ากับ 166 เมล็ด สายพันธุ์ที่เกิดจากการรวมยีนที่มีจำนวนเมล็ดดีต่อรวงมากที่สุดคือ PY016-001-9-6 มีจำนวนเมล็ดดีต่อรวงเท่ากับ 189 เมล็ด สายพันธุ์ที่มีจำนวนเมล็ดดีต่อรวงน้อยที่สุดคือ PY016-001-7-118 มีจำนวนเมล็ดดีต่อรวงเฉลี่ยเท่ากับ 141 เมล็ด ส่วนพันธุ์สันป่าตอง 1 และ RD6-BL-BB-No.15 นั้นมีจำนวนเมล็ดดีต่อรวงเฉลี่ยเท่ากับ 178 และ 173 เมล็ดตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับข้าวเหนียวสายพันธุ์ที่ปรับปรุงพันธุ์ขึ้นใหม่ ในขณะที่พันธุ์ กข6 มีจำนวนเมล็ดดีต่อรวงเฉลี่ยเท่ากับ 220 เมล็ด ซึ่งมากที่สุด และแตกต่างจากสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ มีจำนวนเมล็ดดีต่อรวงไม่แตกต่างจากข้าวสันป่าตอง 1 อาจทำให้มีผลผลิตต่อไรใกล้เคียงกัน แต่พบว่าข้าวเหนียว กข6 มีจำนวนเมล็ดดีต่อรวงสูงกว่าซึ่งอาจทำให้ กข6 มีผลผลิตต่อไร่สูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ ที่นำมาปลูกทดสอบผลผลิตในการทดลองครั้งนี้

6. จำนวนเมล็ดลีบต่อรวง (UFGN)

ค่าเฉลี่ยของจำนวนเมล็ดลีบต่อรวงในข้าวสายพันธุ์ที่นำมาปลูกทดสอบมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 24 เมล็ดต่อรวง สายพันธุ์ที่มีจำนวนเมล็ดลีบต่อรวงมากที่สุดคือ PY016-001-9-215 มีจำนวนเฉลี่ยเท่ากับ 46 เมล็ดต่อรวง สายพันธุ์ที่มีจำนวนเมล็ดลีบต่อรวงน้อยที่สุดคือ PY016-001-7-118 มีจำนวนเฉลี่ยเท่ากับ 12 เมล็ดต่อรวง ซึ่งใกล้เคียงกับพันธุ์สันป่าตอง 1 และ RD6-BL-BB-No.15 ที่มีจำนวนเมล็ดลีบต่อรวงเฉลี่ยเท่ากับ 16 และ 13 เมล็ดต่อรวง ตามลำดับ โดยข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่โดยส่วนใหญ่ จะมีจำนวนเมล็ดลีบต่อรวงใกล้เคียงกับพันธุ์

สันป่าตอง 1 และ RD6-BL-BB-No.15 เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของสายพันธุ์ทั้งหมด พบว่ามีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.01

7. อัตราการติดเมล็ด (SSR)

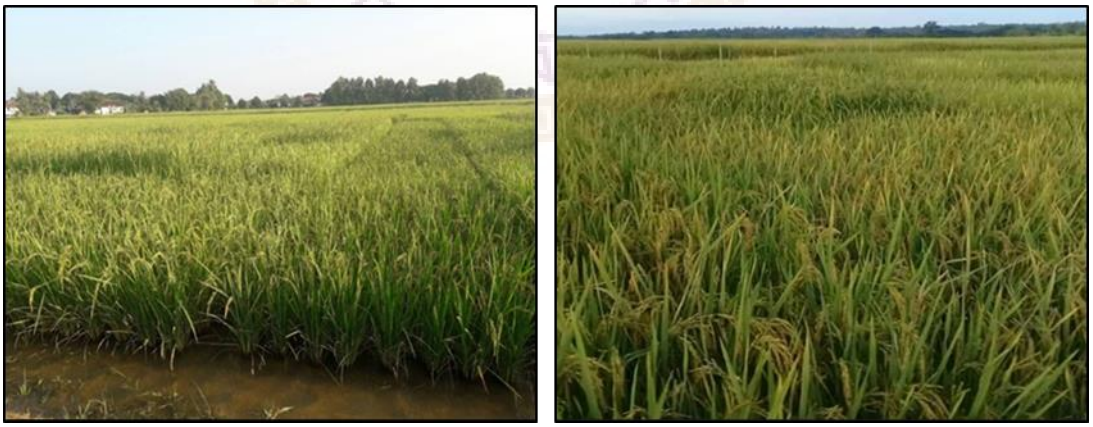
เมื่อนำค่าเฉลี่ยจำนวนเมล็ดดีและจำนวนเมล็ดทั้งหมดต่อรวง มาคำนวณหาอัตราการติดเมล็ด พบว่าข้าวที่นำมาปลูกทดสอบมีค่าเฉลี่ยอัตราการติดเมล็ดแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 87.45% สายพันธุ์ที่มีอัตราการติดเมล็ดสูงที่สุดคือ PY016-001-3-118 อัตราการติดเมล็ดเท่ากับ 92.55% ใกล้เคียงกับพันธุ์สันป่าตอง 1, กข6 และ RD6-BL-BB-No.15 ซึ่งมีอัตราการติดเมล็ดเฉลี่ยเท่ากับ 91.62, 91.58 และ 92.96% ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ที่มีอัตราการติดเมล็ดต่ำที่สุดคือ PY016-001-9-215 มีอัตราการติดเมล็ดเฉลี่ยเท่ากับ 75.72%

8. ผลผลิตต่อไร่ (GY)

ในการเปรียบเทียบผลผลิตพบว่า ค่าเฉลี่ยผลผลิตต่อไร่ของข้าวที่นำมาปลูกทดสอบมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 747.74 กิโลกรัมต่อไร่ สายพันธุ์ที่มีผลผลิตสูงที่สุดคือ PY016-001-3-24, PY016-001-9-142 และ PY016-001-3-43 มีผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 826.74, 814.04 และ 824.09 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากพันธุ์สันป่าตอง 1 และ กข6 ที่มีน้ำหนักผลผลิตต่อไร่เฉลี่ยเท่ากับ 814.39 และ 809.74 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ที่มีผลผลิตต่อไร่ต่ำที่สุดคือ PY016-001-9-215 มีน้ำหนักผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 598.31 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อพิจารณาลักษณะของเมล็ดพบว่าเมล็ดข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่มีขนาดเมล็ดใหญ่คล้ายกับสันป่าตอง 1 ซึ่งจะมีขนาดใหญ่กว่าข้าวเหนียว กข6 จึงทำให้ข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่เหล่านี้มีผลผลิตใกล้เคียงกับ กข 6 ถึงแม้ว่าจะมีจำนวนเมล็ดดีต่อรวงน้อยกว่า กข6 ก็ตาม แต่ตามข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ของกรมการข้าว ที่ระบุว่าค่าเฉลี่ยผลผลิตต่อไร่ของสันป่าตอง 1 มีค่าเฉลี่ยประมาณ 630 กิโลกรัมต่อไร่ (กรมการข้าว, 2551) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยต่ำกว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ อาจเป็นเพราะว่าขนาดของแปลงย่อยเล็กเกินไป อาจทำให้ค่าเฉลี่ยผลผลิตที่ได้เบี่ยงเบนไปจากค่าเฉลี่ยของกรมการข้าว ตลอดจนการเข้าทำลายของแมลงบั่ว ทำให้ไม่สามารถเห็นศักยภาพผลผลิตของพันธุ์ได้จริง จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ามีข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่บางสายพันธุ์ที่มีแนวโน้มให้ผลผลิตที่สูงกว่าข้าวสันป่าตอง 1 แต่ว่าไม่แตกต่างจากสันป่าตอง 1 และข้าวเหล่านี้เป็นข้าวเหนียวหอม และมีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นน่าจะทำการคัดเลือกข้าวเหนียวหอมสายพันธุ์ดีเด่นได้จากประชากรนี้ ภาพแปลงทดสอบผลผลิตแสดงในภาพ 9

ตาราง 11 ข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ชั่วที่ $F_{3:4}$ pyramiding จำนวน 24 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกเพื่อนำไปปลูกทดสอบผลผลิตในสภาพน้ำสมบูรณ์

รูปแบบการรวมตัวของยีน	จำนวนต้น (homozygous)	สายพันธุ์
badh2	4	PY016-001-3-15, PY016-001-9-142, PY016-001-9-205, PY016-001-9-215
badh2 + xa5	3	PY016-001-3-96, PY016-001-9-161, PY016-001-9-59
qBL11 + xa5 + Xa21	6	PY016-001-3-118, PY016-001-9-3, PY016-001-9-41, PY016-001-9-94, PY016-001-9-104, PY016-001-9-123
badh2 + qBL11 + Xa21	2	PY016-001-7-59, PY016-001-9-52
badh2 + qBL11 + xa5 + Xa21	2	PY016-001-3-24, PY016-001-3-162
xa5	4	PY016-001-3-43, PY016-001-7-11, PY016-001-7-42, PY016-001-7-118
qBL11 + Xa21	3	PY016-001-3-125, PY016-001-7-56, PY016-001-9-6
รวม	24	



ภาพ 9 ประชากรข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ จำนวน 24 สายพันธุ์ ที่ปลูกทดสอบผลผลิตในสภาพน้ำสมบูรณ์ของแปลงเกษตรกรในจังหวัดพะเยาในฤดูปลูกนาปี พ.ศ. 2560

9. ผลการทดสอบความหอม

จากผลการทดสอบความหอมในเมล็ดข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่จำนวน 24 สายพันธุ์ (ตาราง 11) และพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ 3 พันธุ์ ที่เก็บมาจากแปลงทดสอบผลผลิต โดยใช้วิธีการดม พบว่าข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ที่มีความหอมจำนวน 13 สายพันธุ์ เช่นเดียวกับพันธุ์ กข6 ในขณะที่ข้าวสันป่าตอง 1 ไม่มีความหอม ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลจีโนไทป์ที่แสดงว่าสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่เหล่านี้มียีน *badh2* ที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากข้าวเหนียว กข6 จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ Aromarker ที่จำเพาะต่อตำแหน่ง 8 bp deletion ที่ exon 8 ของยีน *badh2* สามารถใช้ติดตามยีนความหอมและสามารถใช้คัดเลือกต้นข้าวที่มีลักษณะความหอมได้จริง

ตาราง 12 ลักษณะผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตของข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ จำนวน 24 สายพันธุ์ ที่ปลูกทดสอบผลผลิตในสภาพน้ำสมบูรณ์ ของฤดูปลูกนาปี พ.ศ. 2560 ในพื้นที่จังหวัดพะเยา

Entry	Pedigree	DF 50 % (days)	PH (cm)	PN (panicle/hill)	TN (tiller/hill)	FGN (spikelet/panicle)	UFGN (spikelet/panicle)	SSR (%)	GY (kg/rai)
1	PY016-001-3-15	118 $^{c-g}$	120.11 ^{bc}	7^{bc}	8 ^{b}	166 $^{b-g}$	35 $^{a-c}$	82.73 $^{g-i}$	759.33 $^{a-d}$
2	PY016-001-9-142	113 $^{g-i}$	115.67 ^{c}	9 $^{a-c}$	12 ^{a}	157 $^{c-g}$	24 $^{c-h}$	86.94 $^{b-h}$	814.04 ^{a}
3	PY016-001-9-205	116 $^{d-h}$	118.22 ^{bc}	8 $^{a-c}$	9 ^{ab}	164 $^{b-g}$	25 $^{c-g}$	86.72 $^{c-h}$	715.63 $^{a-e}$
4	PY016-001-9-215	120 $^{c-e}$	109.00 ^{c}	10 $^{a-c}$	10 ^{ab}	146 $^{d-g}$	46 ^{a}	75.72 ^{j}	598.31 ^{f}
5	PY016-001-3-24	116 $^{d-i}$	119.00 ^{bc}	7 ^{c}	8 ^{ab}	156 $^{c-g}$	24 $^{c-h}$	87.06 $^{a-h}$	826.74 ^{a}
6	PY016-001-3-162	121 $^{b-e}$	112.78 ^{c}	8 $^{a-c}$	9 ^{ab}	149 $^{c-g}$	24 $^{c-h}$	86.37 $^{d-h}$	790.38 $^{a-c}$
7	PY016-001-7-59	113 $^{g-i}$	114.11 ^{c}	11 ^{a}	11 ^{ab}	149 $^{c-g}$	17 $^{f-h}$	90.00 $^{a-e}$	721.04 $^{a-d}$
8	PY016-001-9-52	126 ^{ab}	115.44 ^{c}	9 $^{a-c}$	10 ^{ab}	168 $^{b-f}$	34 $^{a-d}$	83.32 $^{g-i}$	698.32 $^{b-f}$
9	PY016-001-3-96	123 $^{a-c}$	110.45 ^{c}	9 $^{a-c}$	10 ^{ab}	166 $^{b-g}$	37 $^{a-c}$	81.98 ^{hi}	681.52 $^{b-f}$
10	PY016-001-9-59	120 $^{c-e}$	111.67 ^{c}	9 $^{a-c}$	10 ^{ab}	148 $^{d-g}$	42 ^{ab}	77.92 ^{ij}	611.53 ^{ef}
11	PY016-001-9-161	118 $^{c-g}$	112.67 ^{c}	9 $^{a-c}$	11 ^{ab}	171 $^{b-f}$	33 $^{b-e}$	83.51 $^{f-i}$	720.00 $^{a-d}$
12	PY016-001-3-118	120 $^{c-e}$	110.56 ^{c}	9 $^{a-c}$	9 ^{ab}	156 $^{c-g}$	13 $^{g-h}$	92.55 ^{ab}	689.28 $^{b-f}$
13	PY016-001-9-3	121 $^{b-d}$	110.22 ^{c}	10 $^{a-c}$	10 ^{ab}	177 ^{bc}	19 $^{d-h}$	90.58 $^{a-e}$	761.34 $^{a-d}$
14	PY016-001-9-41	118 $^{c-g}$	110.44 ^{c}	8 $^{a-c}$	9 ^{ab}	157 $^{c-g}$	26 $^{c-f}$	85.86 $^{d-h}$	742.40 $^{a-d}$
15	PY016-001-9-94	121 $^{b-d}$	112.44 ^{c}	10 ^{ab}	10 ^{ab}	168 $^{b-g}$	14 $^{f-h}$	92.35 $^{a-c}$	748.90 $^{a-d}$
16	PY016-001-9-104	119 $^{c-f}$	114.89 ^{c}	9 $^{a-c}$	10 ^{ab}	157 $^{c-g}$	28 $^{c-f}$	85.00 $^{e-h}$	789.00 $^{a-c}$
17	PY016-001-9-123	127 ^{a}	113.78 ^{c}	10 $^{a-c}$	10 ^{ab}	175 $^{b-d}$	16 $^{f-h}$	91.72 $^{a-d}$	726.93 $^{a-d}$
18	PY016-001-3-125	120 $^{c-e}$	107.22 ^{c}	9 $^{a-c}$	10 ^{ab}	170 $^{b-f}$	26 $^{c-f}$	86.99 $^{b-h}$	785.16 $^{a-d}$
19	PY016-001-7-56	112 ^{hi}	114.89 ^{c}	9 $^{a-c}$	9 ^{ab}	159 $^{c-g}$	25 $^{c-g}$	86.39 $^{d-h}$	779.54 $^{a-d}$

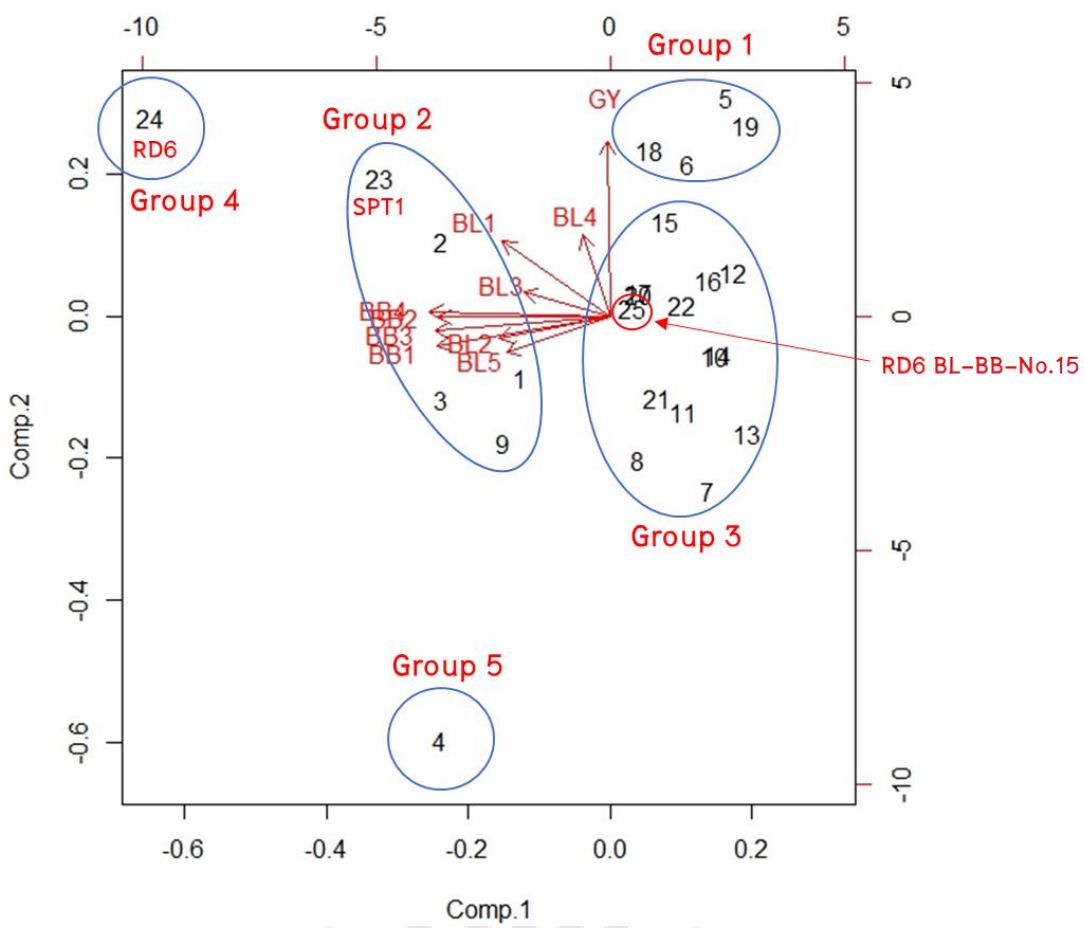
ตาราง 12 (ต่อ)

Entry	Pedigree	DF 50 % (days)	PH (cm)	PN (panicle/hill)	TN (tiller/hill)	FGN (spikelet/panicle)	UFGN (spikelet/panicle)	SSR (%)	GY (kg/rai)
20	PY016-001-9-6	118 $^{c-g}$	120.34^{bc}	7 ^{c}	8 ^{b}	189 ^{b}	20 $^{d-h}$	90.20 $^{a-e}$	799.67 $^{a-c}$
21	PY016-001-3-43	114 $^{f-i}$	119.33^{bc}	7 ^{c}	8 ^{b}	174 $^{b-e}$	19 $^{d-h}$	89.90 $^{a-f}$	824.09 ^{a}
22	PY016-001-7-11	111 ^{hi}	114.00 ^{c}	10 $^{a-c}$	11 ^{ab}	165 $^{b-g}$	19 $^{d-h}$	90.17 $^{a-e}$	749.72 $^{a-d}$
23	PY016-001-7-42	111^{i}	108.33 ^{c}	7 ^{bc}	8 ^{ab}	171 $^{b-f}$	22 $^{d-h}$	88.55 $^{a-g}$	714.33 $^{a-f}$
24	PY016-001-7-118	111 ^{hi}	114.00 ^{c}	8 $^{a-c}$	8 ^{ab}	141 ^{g}	12 ^{h}	92.48 $^{a-c}$	760.67 $^{a-d}$
25	SPT1	115 $^{e-i}$	118.22 ^{bc}	9 $^{a-c}$	9 ^{ab}	178 ^{bc}	16 $^{f-h}$	91.62 $^{a-d}$	814.39 ^{a}
26	RD6	119 $^{c-f}$	166.67 ^{a}	9 $^{a-c}$	9 ^{ab}	220 ^{a}	20 $^{d-h}$	91.58 $^{a-d}$	809.74 ^{ab}
27	RD6-BL-BB-No.15	119 $^{c-g}$	135.44 ^{b}	9 $^{a-c}$	10 ^{ab}	173 $^{b-f}$	13 $^{g-h}$	92.96 ^{a}	756.95 $^{a-d}$
	Alpha (0.05)	*	*	ns	ns	*	*	*	*
	mean	117.75	116.66	8.74	9.48	165.56	24.04	87.45	747.74
	max	127	166.67	11	12	220	46	92.96	826.74
	min	111	107.22	7	8	141	12	75.72	598.31
	LSD	5.64	18.21	2.90	3.58	27.02	12.83	5.80	106.76
	EMS	11.85	123.70	3.12	4.77	271.30	61.15	12.50	4234.00
	CV (%)	2.92	9.53	20.20	23.03	9.95	32.53	4.04	8.70

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

10. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) ของความต้านทานโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้งร่วมกับน้ำหนักผลผลิตต่อไร่

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของประชากรข้าวที่เกิดจากการรวมยีน จำนวน 22 สายพันธุ์ ตามตาราง 11 (แต่ไม่รวมสายพันธุ์ PY016-001-9-59 และ PY016-001-3-125 เพราะไม่ได้นำไปประเมินความต้านทานโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้ง) โดยใช้ค่าเฉลี่ยของคะแนนการเข้าทำลายจากโรคไหม้จำนวน 5 กลุ่มเชื้อ ได้แก่ M1, M2, M3, M4 และ M5 ส่วน M6 นั้นไม่นำมาวิเคราะห์เนื่องจาก สายพันธุ์ที่เกิดจากการรวมยีนนั้นมีความต้านทานต่อโรคไหม้ในเชื้อในกลุ่มนี้ต่ำกว่าพันธุ์สันป่าตอง 1 ซึ่งขัดแย้งกับกลุ่มอื่น ใช้ค่าเฉลี่ยความยาวบาดแผลที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งจำนวน 4 ไอโซเลท และค่าเฉลี่ยผลผลิตต่อไร่ สามารถจำแนกกลุ่มของสายพันธุ์ข้าวที่เกิดจากการรวมยีนได้เป็น 5 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ข้าวจำนวน 4 สายพันธุ์ เป็นกลุ่มที่มียีน *xa5* และ *qBL11* มีความต้านทานต่อโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้ง และมีผลผลิตสูงกว่าพันธุ์สันป่าตอง 1 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยข้าวจำนวน 5 สายพันธุ์ รวมถึงพันธุ์สันป่าตอง 1 โดยสายพันธุ์ที่เกิดจากการรวมยีนในกลุ่มนี้โดยส่วนใหญ่แล้วมีเฉพาะยีน *badh2* ที่ควบคุมลักษณะความหอมแต่ไม่มียีน *xa5, Xa21* และ *qBL11* จึงอ่อนแอต่อโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้ง เช่นเดียวกับพันธุ์สันป่าตอง 1 และสายพันธุ์เหล่านี้ยังมีผลผลิตต่ำกว่าพันธุ์สันป่าตอง 1 และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยข้าวจำนวน 13 สายพันธุ์ เป็นกลุ่มที่มียีน *xa5, Xa21* และ *qBL11* โดยส่วนใหญ่แล้วจึงต้านทานต่อโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้งเช่นเดียวกับข้าวพันธุ์ต้านทานโรคไหม และโรคขอบใบแห้งสายพันธุ์ RD6-BL-BB-No.15 แต่มีผลผลิตที่ต่ำกว่าพันธุ์สันป่าตอง 1 กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยพันธุ์ กข6 เพียงพันธุ์เดียวเนื่องจากมีผลผลิตต่อไร่สูง แต่มีความต้านทานต่อโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้งน้อยที่สุด และกลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยสายพันธุ์ PY016-001-9-215 เพียงสายพันธุ์เดียวเช่นกัน เนื่องจากมีความต้านทานโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้งแต่ มีผลผลิตต่อไรต่ำที่สุด



ภาพ 10 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) โดยจัดเป็น 5 กลุ่ม ตามความต้านทานต่อโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้งร่วมกับน้ำหนักผลผลิตต่อไร่

บทที่ 5

บทสรุป

อภิปรายผลการทดลอง

จากการคัดเลือกจำนวนประชากรของข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ที่ถูกพัฒนาให้มียีนความหอม (*badh2*) QTL ต้านทานโรคไหม้ (*qBl11*) และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง (*xa5* และ *Xa21*) ตั้งแต่ชั่วที่ F_1 จนถึงชั่วที่ BC_2F_2 จะเห็นได้ว่าในลูกผสมกลับชั่วที่ BC_1F_1 และ BC_2F_1 ได้คัดเลือกประชากรเพื่อนำมาตรวจจีโนไทป์ในจำนวนที่น้อย เนื่องจากต้นที่เกิดจากการผสมข้าม (ลูกผสม) จะมียีนทุกตำแหน่งเป็นแบบเฮเทอโรไซกัส ซึ่งในจำนวนนี้ถือว่าเพียงพอต่อการนำไปผสมเพื่อพัฒนาประชากรในชั่วต่อไป แต่เนื่องจากว่าในการผสมข้ามของข้าวนั้น อาจเกิดการผสมตัวเองได้เนื่องจากมีเกสรเพศผู้เหลืออยู่ในดอก จึงต้องทำการตรวจจีโนไทป์ในชั่วนี้ เพื่อให้มั่นใจว่าต้นที่นำไปผสมกลับ หรือนำไปพัฒนาประชากรในชั่วต่อไปนั้น มียีนเป้าหมายอยู่จริง แตกต่างจากการคัดเลือกในชั่วที่ F_2 ซึ่งจำเป็นต้องคัดเลือกประชากรเพื่อนำมาตรวจจีโนไทป์จำนวนมากเนื่องจากว่าในชั่วนี้จะมีการกระจายตัวของจีโนไทป์ของยีนแท้เป็น 1/4 ต่อ 1 ยีน ตามสัดส่วน $1/4^n$ เมื่อ n คือจำนวนยีนเป้าหมาย ในชั่วที่ F_2 ที่เกิดจากการรวมยีนเป้าหมาย 4 ยีน ใช้เครื่องหมายโมเลกุล 5 ตำแหน่ง สัดส่วนที่จะพบต้นที่มียีนเป้าหมายครบจึงมีเท่ากับ 1/1,024 ต้น แต่เนื่องจาก *qBL11* และยีน *Xa21* เป็นยีนที่อยู่ใกล้กันจึงมักถ่ายทอดไปด้วยกัน จึงมีโอกาสที่จะพบต้นที่มียีนเป้าหมายครบเท่ากับ 1/256 ต้น จากการคัดเลือกประชากรที่เกิดจาการรวมยีนในชั่วที่ F_2 pyramiding จำนวน 561 ต้น พบต้นที่มียีนเป้าหมายครบทั้ง 4 ยีน จำนวน 2 ต้น ซึ่งเป็นไปตามสัดส่วนข้างต้น (χ^2= 7.03) ที่ระดับ $p \leq 0.05$ (χ^2= 3.84) แต่ถ้ามีการเพิ่มจำนวนประชากรที่ใช้ตรวจจีโนไทป์ให้มากขึ้นจะทำให้พบต้นที่มียีนเป้าหมายครบมากขึ้น และเพิ่มโอกาสการคัดเลือกลักษณะทางการเกษตรที่ดีอื่น ๆ เพิ่มขึ้นด้วย

ในส่วนของการทดสอบโรคไหม้ พบว่า ข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรังปรุงใหม่ที่พัฒนาพันธุ์มาจากสันป่าตอง 1 และได้รับการถ่ายทอดยีน *qBL11* จากข้าวพันธุ์ RD6-BL-BB-No.15 มีระดับความต้านทานโรคไหม้ในบางกลุ่มเชื้อ ไม่แตกต่างจากข้าวสันป่าตอง 1 แต่ในบางกลุ่มเชื้อพบว่าข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่มีความต้านทานมากกว่าข้าวสันป่าตอง 1 จากผลการทดลองดังกล่าวอาจเป็นไปได้ว่าข้าวสันป่าตอง 1 มียีนต้านทานต่อโรคไหม้ที่ไม่ใช่ *qBL11* อยู่แล้ว เมื่อถ่ายทอดยีน *qBL11* เข้าไปในสันป่าตอง 1 โดยวิธีการผสมกลับ จึงทำให้ลูกผสมกลับที่ได้มีความต้านทานต่อเชื้อบางกลุ่มเท่ากับสันป่าตอง 1 แต่มีความต้านทานต่อเชื้อบางกลุ่มที่

เข้าทำลายสันป่าตอง 1 ได้เพิ่มมากขึ้น ส่วนพันธุ์เจ้าหอมนิลซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานนั้นจะต้านทานต่อเชื้อก่อโรคไหม้ได้มากกว่าสายพันธุ์อื่น เนื่องจากว่ามียีนหลัก *qBL11* และมียีนรอง (minor gene) เช่น *qBL1* และยีนอื่น ๆ ที่ควบคุมความต้านทานต่อโรคไหม้ได้ จึงทำให้ข้าวเจ้าหอมนิลมีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้อย่างกว้าง (broad spectrum resistance) (Wongsaprom, et al., 2010) ในขณะที่ข้าวเหนียว RD6-BL-BB-No.15 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ มี QTL ที่ให้ความต้านทานคือ *qBL11* และ *qBL1* เท่านั้น จึงมีความต้านทานที่ต่ำกว่าข้าวเจ้าหอมนิลซึ่งเป็นแหล่งของยีนต้านทานโรคไหม้ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ในการพัฒนาพันธุ์ข้าวเหนียว RD6-BL-BB-No.15 (ธีรยุทธ ตู้จินดา และคณะ, 2555)

ความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในประชากรข้าวเหนียวที่พัฒนาพันธุ์มาจากข้าวสันป่าตอง 1 มีระดับความต้านทานเพิ่มมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับสันป่าตอง 1 พันธุ์เดิม โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่มียีน *xa5* และ *Xa21* ซึ่งจะมีระดับความต้านทานต่อเชื้อได้เท่ากับข้าวเหนียว RD6-BL-BB-No.15 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ ในขณะที่พันธุ์ IRBB5 ซึ่งมียีน *xa5* นั้นจะมีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งมากกว่าพันธุ์ IR1188 ที่มียีน *Xa21* ซึ่งสอดคล้องกับระดับความต้านทานในข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ที่มีเฉพาะยีน *xa5* จะมีความต้านทานมากกว่าสายพันธุ์ที่มีเฉพาะยีน *Xa21* อย่างไรก็ตามพันธุ์ IR1188 หรือสายพันธุ์ที่มีเฉพาะยีน *xa5* นั้นยังคงมีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งมากกว่าพันธุ์สันป่าตอง 1 และ กข6 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Win et al. (2013) ที่ได้ทำการถ่ายทอดยีน *xa5, Xa21* และ *Xa33* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Manawthukha แล้วทำให้มีระดับความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งเพิ่มมากขึ้น

ในด้านของการทดสอบผลผลิต และองค์ประกอบของผลผลิตนั้นพบว่าองค์ประกอบผลผลิตของข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ โดยส่วนใหญ่มีผลผลิตและลักษณะทางการเกษตรคล้ายกับ สันป่าตอง 1 พันธุ์เดิม เนื่องจากว่าสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่เหล่านี้มีการผสมกลับไปหาสันป่าตอง 1 ถึงชั่วที่ BC_2F_2 จึงน่าจะมีฐานพันธุกรรมเหมือนกับสันป่าตอง 1 ประมาณ 87.5% ประกอบกับในขั้นตอนของการผสมกลับ จะมีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มียีนเป้าหมายและลักษณะทรงต้นที่คล้ายกับสันป่าตอง 1 ด้วย จึงทำให้ประชากรลูกผสมกลับและลูกผสมที่เกิดจากการรวมยีน มีลักษณะคล้ายกับสันป่าตอง 1 ค่อนข้างมาก ส่วนสายพันธุ์ที่มียีนเป้าหมายครบทั้ง 4 ยีน นอกจากมีผลผลิตที่ไม่แตกต่างจากพันธุ์สันป่าตอง 1 แล้วยังมีลักษณะอื่น ๆ ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจเพิ่มขึ้นมา ได้แก่ เป็นข้าวเหนียวหอม และต้านทานโรคขอบใบแห้งเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามข้อมูลผลผลิตที่ได้จากการทดสอบผลผลิตในโครงการวิจัยนี้ ถือว่าไม่เต็มศักยภาพของพันธุ์ เนื่องจากเกิดผลกระทบจากการเข้าทำลายของแมลงบั่ว (rice gall midge) ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Orseolia oryzae* โดยได้เข้าทำลายในระยะแตกกอ ทำให้หน่อใหม่ที่เกิดขึ้น

กลายเป็นหลอดบั่ว ส่งผลให้ต้นข้าวนั้นไม่ออกรวง จากการประเมินด้วยสายตา พบว่าการเข้าทำลายของแมลงบั่วในแต่ละแปลงย่อยมีประมาณ 50–80% จึงทำให้มีรวงข้าวที่เกิดจากหน่อเดิมภายในกอมีน้อยมาก และเมื่อเข้าสู่ระยะข้าวตั้งท้อง พบว่าข้าวส่วนใหญ่จะแตกหน่อขึ้นมาใหม่ และรีบออกรวง ทำให้รวงใหม่ที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็ก และส่งผลให้มีจำนวนเมล็ดต่อรวงน้อยตามไปด้วย จึงทำให้ผลผลิตของข้าวแต่ละสายพันธุ์มีระดับต่ำกว่าศักยภาพของสายพันธุ์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการทดสอบผลผลิตซ้ำในฤดูต่อไป

เมื่อนำค่าเฉลี่ยของผลการทดสอบความต้านทานโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง และน้ำหนักผลผลิตต่อไร่ของข้าวที่เกิดจากการรวมยีนจำนวน 22 สายพันธุ์ และพันธุ์เปรียบเทียบได้แก่ พันธุ์สันป่าตอง 1, กข6 และ RD6–BL–BB–No.15 มาวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) ร่วมกัน พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 มีความต้านทานต่อโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้ง และมีผลผลิตใกล้เคียงกับพันธุ์สันป่าตอง 1 กลุ่มที่ 2 อ่อนแอต่อโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้ง เช่นเดียวกับพันธุ์สันป่าตอง 1 และผลผลิตต่ำกว่าพันธุ์สันป่าตอง 1 และกลุ่มที่ 3 จึงต้านทานต่อโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้ง เช่นเดียวกับสายพันธุ์ RD6–BL–BB–No.15 แต่มีผลผลิตที่ต่ำกว่าพันธุ์สันป่าตอง 1 และ กข6 ส่วนพันธุ์ กข6 นั้นมีผลผลิตที่สูงแต่อ่อนแอต่อโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้งมากที่สุด

จากผลการทดลองที่รายงานมาแล้ว แสดงให้เห็นว่าการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก หรือที่เรียกว่า marker assisted selection (MAS) ทำให้ได้ข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ได้อย่างรวดเร็ว และมีลักษณะที่ต้องการครบ ถึงแม้ว่ายีนเป้าหมายจะมีหลายยีนก็ตาม ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐาน หรือ conventional breeding จะทำได้ค่อนข้างยาก และใช้ระยะเวลาที่ยาวนานกว่า ตลอดจนการใช้ MAS ทำให้สามารถคัดเลือกต้นที่มียีนเป้าหมายได้ตั้งแต่ชั่วแรก ๆ เช่น F_1 , BC_1F_1 และ BC_2F_1 ทำให้คัดเลือกต้นที่มียีนเป้าหมายผสมกลับเข้าหาพันธุ์รับได้อย่างถูกต้อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้ายีนเป้าหมายมีการควบคุมแบบยีนด้อย ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐานจะทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากยีนนี้จะไม่แสดงออกเมื่ออยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัส การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวนั้นสามารถพัฒนาพันธุ์ข้าวจนประสบความสำเร็จมาแล้วเช่น พันธุ์ กข51 (ขาวดอกมะลิ 105 ทนน้ำท่วมฉับพลัน), ปิ่นเกษตร , หอมชลสิทธิ์ (ธีรยุทธ ตู้จินดา และคณะ, 2555), กข–แม่โจ้ 2 (กข6 ไม่ไวแสง) (วราภรณ์ แสงทอง, ประวิตร พุทธานนท์ และสุภักตร์ ปัญญา, 2555) และข้าวหอม Manawthukha ของประเทศเมียนมาร์ (Yi, et al., 2009)

สรุปผลการทดลอง

จากการพัฒนาประชากรข้าวเหนียวที่พัฒนาพันธุ์มาจากข้าวสันป่าตอง 1 โดยใช้วิธีการผสมกลับ และการผสมเพื่อการรวมยีน และใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมาย 4 ยีน สามารถสร้างประชากรชั่วที่ $F_{3:4}$ pyramiding ที่มียีนความหอม *(badh2)* QTL ต้านทานโรคไหม้ (*qBL11*) และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง (*xa5* และ *Xa21*) ในรูปแบบการรวมตัวของยีนแบบ ต่าง ๆ จำนวน 8 รูปแบบ มีทั้งหมด 36 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่มียีนเป้าหมายครบทั้ง 4 ยีน(*badh2*, *qBL11*, *xa5* และ *Xa21*) จำนวน 2 สายพันธุ์ ซึ่งได้นำมาปลูกขยายเมล็ดและคัดเลือกสายพันธุ์ให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น สายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือกมาประเมินความต้านทานต่อโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง พบว่ามีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ความต้านทานต่อโรคไหม้ไม่แตกต่างจากสันป่าตอง 1 พันธุ์เดิม และสายพันธุ์เหล่านี้มีผลผลิตไม่แตกต่างจากสันป่าตอง 1 ประกอบกับมีลักษณะทรงต้นคล้ายกับสันป่าตอง 1 ค่อนข้างมาก ซึ่งสายพันธุ์เหล่านี้จะถูกคัดเลือกเพื่อนำไปทดสอบผลผลิตระหว่างสถานี (inter–stationary yields) ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ในการคัดเลือกประชากรในชั่วที่ F_2 หรือ ชั่วที่ต้องการให้ยีนเป้าหมายเป็นโฮโมไซกัสนั้น จะต้องใช้ประชากรข้าวที่มีจำนวนมาก เพื่อเพิ่มโอกาสในการได้ต้นที่มียีนครบเพิ่มมากขึ้น และสามารถคัดเลือกต้นที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดีได้มากกว่า ในการตรวจจีโนไทป์เมื่อตัวอย่างที่ใช้ตรวจมีจำนวนมาก จึงจำเป็นต้องใช้วิธีที่รวดเร็ว เช่น ใช้ระบบการตรวจสอบด้วยระบบ *Taq*Man หรือ KASP ที่จะทำให้ทราบผลจีโนไทป์เร็วขึ้น สามารถที่จะทำการผสมต่อได้ทันก่อนที่ข้าวจะออกดอกก่อน ในขั้นตอนของการทดสอบผลผลิตในฤดูนาปีนั้น ควรทำการทดลองให้พร้อมกับการทำนาของเกษตรกรมากที่สุด เพราะจะช่วยลดความเสี่ยงจากโรคหรือแมลงศัตรูพืชได้ นอกจากนี้ภัยธรรมชาติยังเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้งานวิจัยเสียหายจึงต้องควรศึกษาวิธีการป้องกัน และใช้ประสบการณ์ในการเตรียมพร้อมกับสถานการณ์ที่อาจเกิดขึ้นเหนือความคาดหมาย

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กมลวรรณ เรียบร้อย, ศรีสวัสดิ์ ขันทอง, ธีรยุทธ ตู้จินดา และสุรีพร เกตุงาม. (2546). ยีนความหอม และลักษณะพื้นฐานทางอณูพันธุศาสตร์ของข้าวหอม. **Thai Journal of Genetics**, 6(2), 93–114.

กรมการข้าว. (2551). องค์ความรู้เรื่องข้าว. **กรมการข้าว**. สืบค้นเมื่อ 28 กรกฎาคม พ.ศ 2556, จาก http://www.brrd.in.th/rkb/postharvest/index.phpfile=content.php&id=6.htm

เดโชพล กันทัพ. (2556). **การพัฒนาประชากรข้าวเหนียวสันป่าตอง 1 ลูกผสมกลับให้มียีนที่ควบคุมลักษณะความหอม ต้านทานโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้ง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก**. ปัญหาพิเศษ วท.บ., มหาวิทยาลัยพะเยา, พะเยา.

ธีรยุทธ ตู้จินดา. (2554). การพัฒนาพันธุ์ข้าวทนน้ำท่วมฉับพลันในประเทศไทย. **ข่าวสารเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร,** 3(4), 13–16.

ธีรยุทธ ตู้จินดา. (2555). รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวนาน้ำฝนโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพภายใต้ความร่วมมือระหว่างสถาบันวิจัยข้าวกับศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. **ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ**. สืบค้นเมื่อ 1 สิงหาคม พ.ศ. 2558, จาก https://www.researchgate.net

วราภรณ์ แสงทอง, ประวิตร พุทธานนท์ และสุภักตร์ ปัญญา. (2555). การปรับปรุงพันธ์ข้าวเหนียวหอมจากข้าวเจ้าด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก. **มหาวิทยาลัยแม่โจ้.** สืบค้นเมื่อ 18 มีนาคม พ.ศ.2560, จาก http://researchex.rae.mju.ac.th/dbplant/index.php/research-plant/item/glutinous-rice

ไวพจน์ กันจู, สุกัญญา เรืองขำ, สุมน ห้อยมาลา, อนุชา พลับพลา, อภิชาต วรรณวิจิตร และธีรยุทธ ตู้จินดา. (2556.) การตรวจสอบความหอมในเชื้อพันธุกรรมข้าวไร่ไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน Os2AP และการวิเคราะห์คุณภาพหุงต้มและความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ด. **Thai J. Genetics**, 6, 11–24.

ไวพจน์ กันจู. (2560). **เอกสารประกอบการสอนรายวิชาพันธุศาสตร์เกษตร** พะเยา: สาขาเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา.

ศรีสวัสดิ์ ขันทอง, ธีรยุทธ ตู้จินดา และสุรีพร เกตุงาม. (2560). การคัดกรองเครื่องหมายดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวเหนียวหอม ต้านทานโรคไหม้และทนทานน้ำท่วมฉับพลัน. **KKU Sci. J**, 45(3), 605–617

สุปรีดา หอมกลิ่น, จิระนุช นิตยาธารีกุล และสุกัญญา วงศ์พรชัย (ผู้อภิปราย). (21–23 ธันวาคม 2555). การวิเคราะห์องค์ประกอบที่ระเหยได้ในเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) ด้วยเทคนิดGCxGC–TOFMS. ใน **การประชุมวิชาการข้าวแห่งชาติ ครั้งที่ 2 มิติใหม่วิจัยข้าวไทยพร้อมรับการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศและการเปิดตลาดเสรีอาเซียน** (หน้า 543–546). กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

สุรีพร เกตุงาม. (2546). เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช**. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**, 5(2), 37–59.

สำนักงานการค้าภายในจังหวัดพะเยา (ผู้อภิปราย). (12 มิถุนายน 2556).โครงการรับจำนำข้าวเปลือกนาปรังปี 2555/2556. ใน **รายงานการประชุมคณะอนุกรรมการติดตามกำกับดูแลการรับจำนำข้าวระดับจังหวัด จังหวัดพะเยา.** พะเยา: ศาลากลางจังหวัดพะเยา.

Amarawathi, Y., Singh, R., Singh, A. K., Singh, V. P., Mohapatra, T. and Sharma, T. R. (2008). Mapping of quantitative trait loci for basmati quality traits in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular Breeding**, 21(1), 49–65.

Bradbury, L.M.T., Fitzgerald, T.L., Henry, R.J., Jin, Q.S. and Waters, D.L.E. (2005). The gene for fragrance in rice. **Plant Biotechnology Journal**, 3(3), 363–370.

Buttery, R.G., Ling, L.C. and Juliano, B.O. (1983). Cooked rice aroma and 2–Acetyl–1–pyrroline. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 31(4), 823–826.

Caetano, A. (1997). Resolving DNA amplification products using polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining. In Micheli, M. R. and Bova, R. (Eds.), **Fingerprinting methods based on arbitrarily primed PCR** (pp. 119–134). New York: verlag berlin heidelberg.

Chaipanya, C., Telebanco–Yanoria, M. J., Quime, B., Longya, A., Korinsak, S., Korinsak, S., et al. (2017). Dissection of broad–spectrum resistance of the Thai rice variety Jao Hom Nin conferred by two resistance genes against rice blast. **Rice**, 2017, 1–11.

Fred, A. K., Kiswara, G., Yi, G. and Kim, K. M. (2016). Screening rice cultivars for resistance to bacterial leaf blight. **Microbiol. Biotechnol**, 26(5), 938–945.

Grosch, W. and Schieberle, P. (1997). Flavor of cereal products: a review. **Cereal Chem.**, 1997(258), 74–91.

Hutamekalin, P., Veerapraditsin, T., Pimpisitthavorn, S., Sriwongchai, T. and Sirithunya, P. (2001). Functional Genomics of rice and seed biotechnology AFLP analysis of blast pathogen diversity of Thailand. In Jamratlertluk, S. and Jindamanee, V. (Eds), **Functional genomics of rice and seed biotechnology** (pp. 42–48). Bangkok: Queen Sirikit national convention center.

International food and agribusiness management association (IFAMA). (2013). The world market of fragrant rice. **International food and agribusiness management review**, 16(2), 1–20.

Kameswara, R.K., Lakshminarasu, M. and Jena, K.K. (2002). DNA markers and marker–assisted breeding for durable resistance to bacterial blight disease in rice. **Biotechnology Advances**, 20(1), 33–47.

Kanjoo, V., Punyawaew, K., Siangliw, J. L., Jearakongman, S., Vanavichit, A. and Toojinda, T. (2012). Evaluation of agronomic traits in chromosome segment substitution lines of KDML105 containing drought tolerance QTL under drought stress. **Rice Science**, 19(2), 117–124.

Kauffman, H.E., Reddy, A.P.K., Hsieh, S.P.Y. and Merca, S.D. (1973). An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. **Plant Disease**, 57(6), 537–541.

Khush, G.S. and Kinoshita, T. (1991). **Rice biotechnology**. Oxford: The Alden press.

Kinishita, T. (1995). Report of committee on gene symbolization. **Gramene**. Retrieved March 18, 2018, from http://archive.gramene.org/newsletters/rice_genetics/rgn3/v3C.html groups.

Korinsak, S. (2009). **Marker–assisted pyramiding bacterial blight resistance genes (xa5, Xa21, xa33(t), Xa34(t) and qBB11) in rice**. Master thesis M.S., Kasetsart University, Nakhon Pathom.

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 journal Genetic**, 7(3), 164–172.

Lorieux, M., Petrov, M., Huang, N., Guiderdoni, E. and Ghesquiere, A. (1996). Aroma in rice genetic analysis of a quantitative trait. **Theoretical and Applied Genetics**, 93(7), 1145–1151.

Myint, K.M., Arikit, S., Wanchana, S., Yoshihashi, T., Choowongkomon, K. and Vanavichit, A. (2012). A PCR–based marker for a locus conferring the aroma in Myanmar rice (*Oryza sativa* L.). **Theor Appl Genet**, 125(5), 887–896.

Noenplab, A., Vanavichit, A., Toojinda, T., Sirithunya, P., Tragoonrunge, S., Sriprakhon, S., et al. (2006). QTL Mapping for leaf and neck blast resistance in Khao Dawk Mali 105 and Jao Hom Nin recombinant inbred lines. **Science Asia**, 2006(32), 133–142.

Parr, L.B. and Atlin, G.N. (Eds.) (2002). **Breeding rain fed rice for drought–prone environment: integrating conventional and participatory plant breeding in South and Southeast Asia**. UK.: Center for Arid zone studies.

Petrov, M., Danzart, M., Giampaoli, P., Faure, J. and Richard, H. (1996). Rice aroma analysis discrimination between a scented and a non–scented rice. **Sciences des Aliments**, 16(4), 347–360.

R Core team. [Pseudonym]. (2017). **R 3.4.3 released**. Retrieved 14 March 2018, from www. www.r–statistics.com.

Roumen, E., Levy, M. and Nottegham, J.L. (1997). Characterization of the European pathogen population of *Magnaporthe grisea* by DNA fingerprinting and pathotype analysis. **Eur. J. Plant Pathol**, 103(4), 363–371.

Shi, W., Yang, Y., Chen, S. and Xu, M. (2008). Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties. **Molecular Breeding**, 22(2), 185–192.

Surin, A., Arunyanart, P., Dhitikiattipong, R., Rodjanahusdin, W., Soontrajarn, K., Munkong, S., et al. (1989). Yield loss due to rice blast (BI) disease at different crop stages. **International Rice Research Newsletter**, 14(4), 34–35.

Utami, D.W., Moeljopawiro, S., Aswidinnoor, H., Setiawan, A. and Hanaridaa, I. (2008). Blast resistance genes in wild rice *Oryzarufipogon* and rice cultivar IR64. **Indonesian Journal of Agriculture,** 1(2), 71–76.

Vanavichit, A., Yoshihashi, T., Wanchana, S., Areekit, S., Saengsraku, D., Kamolsukyunyong, W., et al. (2004). Positional cloning of Os2AP, the aromatic gene controlling the biosynthetic switch of 2–acetyl–1–pyrroline and gamma amino butyric acid (GABA) in rice. In **Proceedings of the 1st international conference on rice for the future** (pp.71–80). Bangkok: Kasetsart University.

Wanchana, S., Kamolsukyunyong, W., Ruengphayak, S., Toojinda, T., Tragoonrung, S. and Vanavichit, A. (2005). A rapid construction of a physical contig across a 4.5 cM region for rice grain aroma facilitates marker enrichment for positional cloning. **Science Asia**, 31(3), 299–306

Win, K.M., Korinsak, S., Jantaboon, J., Siangliw, M., Lanceras–Siangliw, J., Sirithunya, P., et al. (2012). Breeding the Thai jasmine rice variety KDML105 for non–age–related broad–spectrum resistance to bacterial blight disease based on combined marker–assisted and phenotypic selection. **Field Crops Research**, 2012(137), 186–194.

Win, K.M., Korinsak, S., Sirithunya, P., Lanceras–Siangliw, J., Jamboonsri, W., Da, T., et al. (2013). Marker assisted introgression of multiple genes for bacterial blight resistance into aromatic Myanmar rice MK–75. **Field Crops Res**, (2013)154, 164–171.

Wongpornchai, S., Dumri, K., Jongkaewwattana, S. and Siri, B. (2004). Effects of drying methods and storage time on the aroma and milling quality of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Khao Dawk Mali 105. **Food chemistry**, 87(3), 407–414.

Wongsaprom, C., Sirithunya, P., Vanavichit, A., Pantuwan, G., Jongdee, B., Sidhiwong, N., 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(2), 245-251.

Yi, M., Nwe, K.T., Vanavichit, A., Chai-arree, W. and Toojinda, T. (2009). Marker assisted backcross breeding to improve cooking quality traits in Myanmar rice cultivar Manawthukha. **Field Crops Res**, 113(2), 178-186.

Yoshihashi, T., Huong, N.T.T. and Inatomi, H. (2002). Precursors of 2-acetyl-1-pyrroline, a potent flavour compound of an aromatic rice variety. **Agric. Food Chem**, 50(7), 2001-2004.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก วิธีการสกัดดีเอนเอ วิธีการเตรียมเจล PAGE และ วิธีการย้อมเจล PAGE

วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี DNATrap® ของห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

เก็บตัวอย่างใบข้าวอ่อนจากต้นที่ต้องการตรวจสอบจีโนไทป์จำนวน 3 ใบต่อต้น ใส่ถุงพลาสติกแช่เย็น

นำใบข้าวมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาณ 1 กรัม เติมไนโตรเจนเหลว ทำการบดให้ละเอียดอย่างรวดเร็วด้วย blue tip

เติมเอกแทรคชั่นบัพเฟอร์ (extraction buffer) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดตัวอย่างเขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 1 ชั่วโมง

เมื่อครบเวลาแล้วนำออกจากตู้อบ นำมาแช่น้ำแข็งทันทีเป็นระยะเวลา 5 นาที

เติมนิวทราไลเซอร์ (neutralizer)100 µl เขย่าให้เข้ากันแล้วแช่น้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuqe) ที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 10 นาที อุณหภูมิ 4°C

ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติมแทรปปิงค์บัพเฟอร์ (trapping buffer) จำนวน 500 µl แล้วกลับหลอดไปมาเบา ๆ

จากนั้นนำหลอดดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,000 rpm นาน 1 นาที ทำการเทน้ำส่วนที่ใสทิ้ง

เติมวอชชิ่งบัพเฟอร์วัน (washing buffer I) 500 µl นำไปวอร์เท็กซ์ (vortex) ให้ตะกอนแตกละเอียด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,000 rpm นาน 1 นาที ทำการเทน้ำส่วนที่ใสทิ้ง

เติมวอชชิ่งบัพเฟอร์ทู (washing buffer II) 500 µl เขย่าให้ตะกอนแตกละเอียด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 2 นาที ทำการเทน้ำส่วนที่ใสทิ้ง

นำตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 65°C นาน 30 นาที หรือจนกว่าจะแห้ง

เติมอีลูชั่นบัพเฟอร์ (elution buffer) จำนวน 100 µl เขย่าเบา ๆ อบที่อุณหภูมิ 65°C นาน 30 นาที

จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 2 นาที ทำการดูดน้ำใสซึ่งมีดีเอ็นเอใส่หลอดใหม่ แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำ PCR ต่อไป

วิธีการเตรียมเจล PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)

เช็ดกระจกที่ใช้เป็น chamber และแผ่นที่ต้องการให้เจลติด ด้วย 95% เอทานอลให้สะอาด โดยเช็ดทำความสะอาดประมาณ 3 ครั้ง

เช็ดกระจกแผ่นที่ใช้เป็น chamber ด้วยน้ำยาเคลือบกระจก (clear view solution) โดยใช้กระดาษทิชชู่จนแห้งสนิท แล้วเช็ดด้วย 95% เอทานอลจนแห้งสนิทอีกครั้ง

เตรียมสารละลาย bind silane 700 ul (bind silane 3 µl + 0.5% acetic acid 5 ul+ 95% EtOH 995 ul) แล้วเช็ดลงบนกระจกแผ่นที่ต้องการให้เจลติด โดยเกลี่ยสารละลายดังกล่าวให้ทั่วแผ่นกระจกอย่างรวดเร็ว

เช็ดกระจกอีกครั้งด้วย 95% เอทานอลเพื่อเกลี่ยสารละลาย bind silane ให้ทั่วกระจก เช็ดจนแห้งสนิท

ประกอบกระจกทั้ง 2 แผ่นเข้าด้วยกันเพื่อใช้สำหรับการเตรียมเจล โดยใช้ spacer กั้น

เตรียมสารละลายเจล acrylamide ประมาณ 50 ml ต่อกระจกขนาดประมาณ 30x35 ซม. โดยมีส่วนผสมของสารละลายดังนี้

4.5% acrylamide gel	50 ml (แช่เย็น)
TEMED	70 µl
10% APS	350 µl (แช่เย็น)

เทสารละลายทั้งหมดใส่ขวดพลาสติก เขย่าเบา ๆ เพื่อให้ส่วนผสมเข้ากัน ห้ามเขย่าแรงเพราะจะทำให้เกิดฟองอากาศเข้าไปในกระจก แล้วค่อย ๆ เทเจลเข้าไปในแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ แล้วเสียบหวีเข้าไปด้านบนเพื่อใช้เป็นช่องสำหรับการหยอดผลผลิต PCR ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เจลแข็งตัวดี

นำชุดกระจกเจลไปติดตั้งกับเครื่อง vertical PAGE แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 1XTBE ลงไปให้ท่วมเจล แล้วทำการ pre-run ด้วยกระแสไฟฟ้ากำลัง 50 W จนอุณหภูมิของแผ่นกระจกประมาณ 50°C

นำผลผลิต PCR ที่เติมสารละลายสีที่มี formamide มา denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันทีนาน 5 นาที หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ดังกล่าวมาหยอดลงไปในแผ่นเจล แล้ว run ด้วยกระแสไฟฟ้าประมาณ 60 W จะสีเคลื่อนที่ลงมาประมาณ 15–20 ซม. จึงหยุดการ run แล้วนำแผ่นกระจกเจลไปย้อมด้วยวิธี silver staining ต่อไป

วิธีการย้อมเจล PAGE ด้วยเทคนิค silver staining ตามวิธีการของ Caetano (1997)

นำแผ่นกระจกเจลออกมาแช่ในสารละลายกรด acetic acid ความเข้มข้น 10% เขย่าเบา ๆ นาน 30 นาที

เทกรดออก แล้วเขย่าด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ รอบละ 5 นาที

หลังจากเทน้ำกลั่นทิ้ง เติมสารละลาย silver nitrate ความเข้มข้น 0.1% เขย่าในที่มืดนาน 30 นาที

เทสารละลาย silver nitrate ออก ล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว ประมาณ 3 วินาที แล้วทำการเทน้ำกลั่นทิ้ง

เติมสารละลาย developer (Na_2CO_3 30 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร) เขย่าจนแถบดีเอ็นเอเริ่มปรากฏให้เห็นชัดแล้ว จึงเท developer ทิ้ง แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยเติม acetic acid มีความเข้มข้น 10% เขย่าเป็นเวลา10 นาที

เท acetic acid ออก ล้างโดยน้ำเปล่า 2 รอบ รอบละ 5 นาที

วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ย้อมเจล

1. prepare 1 liter of fix stop solution:

acetic acid	100 ml
dH_2O	900 ml

2. silver stain 1 liter

silver nitrate	1 g
dH_2O	1000 ml
37% formaldehyde	1.5 ml

3. developer 1 liter

Na_2CO_3	30 g
dH_2O	1000 ml
37% formaldehyde	1.5 ml
sodium thiosulphate	200 µl (10 mg/ml)

ภาคผนวก ข รายชื่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ที่ใช้ในการทดลอง และระดับคะแนนเฉลี่ยของการเกิดโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง และน้ำหนักผลผลิตต่อไร่ ของสายพันธุ์ข้าวจำนวน 25 สายพันธุ์ ที่นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก

ตาราง 1 รายชื่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* สาเหตุโรคไหม้ที่ใช้ในการทดลอง จำนวน 45 ไอโซเลท โดยจัดเป็น 6 กลุ่ม

No.	Mixed gr.	Isolate	AFLP gr.	Provience	mixed
1	1	THL211	1	Ching Mai	1
2	1	THL137	2	Ching Mai	1
3	1	THL759	4	Mae Hong Son	1
4	1	THL831	4	Mae Hong Son	1
5	1	THL832	4	Mae Hong Son	1
6	1	THL234	8	Phathum Thani	1
			รวม		6
7	2	THL710	9	Mae Hong Son	2
8	2	THL279	10	Phare	2
9	2	THL906	12	Yala	2
10	2	THL881	13	Chumpon	2
11	2	THL757	14	Mae Hong Son	2
			รวม		5
12	3	THL191	3	Phitsanulok	3
13	3	THL266	3	Lampang	3
14	3	THL653	3	Ching Mai	3
15	3	THL658	3	Ching Rai	3
16	3	THL730	3	Mae Hong Son	3
17	3	THL734	3	Mae Hong Son	3
18	4	THL374	3	Nakorn ratchasima	3
19	4	THL456	3	Sakon Nakon	3
20	4	THL810	3	Ubon Ratchatani	3

ตาราง 1 (ต่อ)

No.	Mixed gr.	Isolate	AFLP gr.	Provience	mixed
21	4	THL838	3	Sri saket	3
22	4	THL967	3	Surin	3
23	4	THL985	3	Nongkai	3
			รวม		12
24	5	THL144	6	Ching Mai	4
25	5	THL284	6	Nan	4
26	5	THL364	6	Nakorn ratchasima	4
27	5	THL690	6	Lamphun	4
28	5	THL1023	6	Phayao	4
29	6	THL041	7	Phitsanulok	4
30	6	THL855	7	Phachin Buri	4
31	6	THL949	7	Suphan Buri	4
32	6	THL1003	7	Bangkok	4
33	6	THL1009	7	Sra kaew	4
			รวม		10
34	8	THL186	UN	Phitsanulok	5
35	8	THL190	UN	Tak	5
36	8	THL486	UN	Lampang	5
37	8	THL634	UN	Sri saket	5
38	8	THL868	UN		5
			รวม		5
39	9	TH196031	IRBLkp-K60	Indicator plant (No.23) ศวข.อบ.	6
40	9	TH196036	IRBLkp-K60	Indicator plant (No.23) ศวข.อบ.	6
41	11	TRG1			6

ตาราง 1 (ต่อ)

No.	Mixed gr.	Isolate	AFLP gr.	Provience	mixed
42	11	TRG2			6
43	11	TRG17			6
44	11	Blast4			6
45	11				6
			รวม		7

ตาราง 2 ระดับคะแนนเฉลี่ยของการเกิดโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง และน้ำหนักผลผลิตต่อไร่ของสายพันธุ์ข้าวจำนวน 25 สายพันธุ์ ที่นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA)

No.	Code	Gene	GY/rai	BB1 (cm.)	BB2 (cm.)	BB3 (cm.)	BB4 (cm.)	BL1	BL2	BL3	BL4	BL5	BL6
1	PY016-001-3-15	*badh2*	759	8.6	8.3	8.5	2.5	0	0	4	5	3	1
2	PY016-001-9-142	*badh2*	814	6.8	12.0	8.0	4.6	0	1	3	6	3	2
3	PY016-001-9-205	*badh2*	716	10.0	11.4	8.7	4.2	0	0	5	6	3	1
4	PY016-001-9-215	*badh2*	598	10.0	7.3	8.6	4.6	0	1	3	5	4	0
5	PY016-001-3-24	*badh2, qBL11, xa5, Xa21*	827	1.2	1.2	1.1	1.1	0	0	5	6	1	3
6	PY016-001-3-162	*badh2, qBL11, xa5, Xa21*	790	1.0	1.1	1.0	1.1	1	0	5	6	3	4
7	PY016-001-7-59	*badh2, qBL11, Xa21*	721	4.3	1.8	2.2	1.5	0	0	4	3	1	4
8	PY016-001-9-52	*badh2, qBL11, Xa21*	698	4.5	3.4	2.5	2.0	1	0	2	5	4	5
9	PY016-001-3-96	*badh2, xa5*	682	6.6	5.4	4.1	3.0	1	1	5	6	4	2
10	PY016-001-9-161	*badh2, xa5*	720	1.3	1.2	1.4	1.2	0	0	3	6	3	2
11	PY016-001-3-118	*qBL11, xa5, Xa21*	689	1.3	1.7	1.0	1.1	0	0	5	6	4	3
12	PY016-001-9-3	*qBL11, xa5, Xa21*	761	1.6	1.8	1.1	1.3	0	0	2	6	2	3
13	PY016-001-9-41	*qBL11, xa5, Xa21*	742	1.4	0.8	0.8	0.9	0	0	2	4	3	4
14	PY016-001-9-94	*qBL11, xa5, Xa21*	749	1.3	1.3	0.8	0.9	0	0	1	6	5	5
15	PY016-001-9-104	*qBL11, xa5, Xa21*	789	2.4	2.5	1.9	1.7	1	0	2	6	4	4
16	PY016-001-9-123	*qBL11, xa5, Xa21*	727	1.3	1.4	1.3	0.9	1	0	4	6	2	5
17	PY016-001-7-56	*qBL11, Xa21*	780	4.4	3.9	2.0	2.2	1	0	5	4	2	3
18	PY016-001-9-6	*qBL11, Xa21*	800	4.0	3.2	3.4	2.2	2	0	1	6	2	3
19	PY016-001-3-43	*xa5*	824	1.3	1.4	1.1	1.0	0	0	3	6	1	1

ตาราง 2 (ต่อ)

No.	Code	Gene	GY/rai	BB1 (cm.)	BB2 (cm.)	BB3 (cm.)	BB4 (cm.)	BL1	BL2	BL3	BL4	BL5	BL6
20	PY016-001-7-11	*xa5*	750	1.3	1.3	1.0	1.3	1	1	4	6	4	2
21	PY016-001-7-42	*xa5*	714	0.8	1.2	1.2	1.3	0	1	4	6	4	1
22	PY016-001-7-118	*xa5*	761	1.3	1.2	1.3	0.9	0	1	3	6	3	3
23	SPT1		814	9.8	6.2	8.7	5.3	2	1	5	6	4	2
24	RD6		810	13.0	14.7	11.4	7.7	5	1	6	6	6	6
25	RD6-BL-BB-No.15	*qBL11, xa5, Xa21*	757	1.3	2.0	1.4	3.5	3	0	2	4	4	2

หมายเหตุ: BB1-BB4 คือเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งไอโซเลทที่ 1-4 และ BL1-BL6 คือเชื้อสาเหตุการก่อโรคไหม้ทั้ง 6 กลุ่ม

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ นามสกุล วราวุฒิ โล๊ะสุข

วัน เดือน ปี เกิด 15 ตุลาคม 2534

ที่อยู่ปัจจุบัน 87/1 หมู่ 4 ตำบลวังเงิน อำเภอแม่ทะ จังหวัดลำปาง

ที่ทำงานปัจจุบัน –

ตำแหน่งหน้าที่ปัจจุบัน –

ประสบการณ์การทำงาน –

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2556 วท.บ. (เกษตรศาสตร์), มหาวิทยาลัยพะเยา, จังหวัดพะเยา

ผลงานตีพิมพ์

ที่เกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์

วราวุฒิ โล๊ะสุข, ศิริพร กออินทร์ศักดิ์, ธีรยุทธ ตู้จินดา และ ไวพจน์ กันจู. (2561) การรวมยีนความหอม ยีนต้านทานโรคไหม้ และโรคขอบใบแห้ง เข้าสู่ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก. **แก่นเกษตร**, 2561(ฉบับพิเศษ 1), 69–75.

ผลงานตีพิมพ์อื่น ๆ –