

การเปรียบเทียบพันธุ์กรรมความต้านทานต่อแมลงบั่วในข้าวพันธุ์พื้นเมืองเหมยหนอง 62 เอ็ม และข้าวพันธุ์ปลูก กข22

Comparison of genetic resistance to rice gall midge in landrace rice Muey Nawng 62M and cultivated rice RD22

มาริส อิมเพ็ง¹, วรารุณ โล๊ะสุข², พันนิภา ยาใจ³, บุญฤทธิ์ สิ้นค่างาม¹, ภาวินี จันทรวิจิตร⁴, พรประภา แสนหลวง⁵, ภาวิช วิจารัตน์⁶ และ ไวกจน์ กันจู^{4*}

Marisa Impeng¹, Warawut Losuk², Pannipa Yajai³, Bunyarit Sinkangam¹, Pavinee Chanvichit⁴, Pornprapa Sanlaung⁵, Parwat Wijarat⁶ and Vaiphot Kanjoo^{4*}

¹ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา อ.เมือง จ.พะเยา 56000

¹ Program of Agricultural Science, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao 56000

² สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา น่าน อ.ภูเพียง จ.น่าน 55000

² Program of Plant Science, Faculty of Science and Agricultural Technology, Rajamangala University of Technology Lanna, Phu Phiang, Nan 56000

³ ศูนย์วิจัยข้าวแพร่ กรมการข้าว อ.เมือง จ.แพร่ 56000

³ Phrae Rice Research Center, Rice Department, Phrae 56000

⁴ สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา อ.เมือง จ.พะเยา 56000

⁴ Program of Agriculture, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao 56000

⁵ โรงเรียนสาธิตมหาวิทยาลัยพะเยา อ.เมือง จ.พะเยา 56000

⁵ Demonstration School University of Phayao, Phayao 56000

⁶ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000

⁶ Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Pitsanulok 65000

บทคัดย่อ: แมลงบั่ว (*Orseolia oryzae*; Asian rice gall midge) เป็นแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญในเอเชีย ทำให้ผลผลิตข้าวลดลง งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาพันธุ์กรรมความต้านทานต่อแมลงบั่วในข้าวพันธุ์ปลูก กข22 เปรียบเทียบกับข้าวพื้นเมืองเหมยหนอง 62 เอ็ม จากการประเมินปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วในประชากรข้าวช่วงที่ F₂ จำนวน 2 ประชากร ที่เกิดจากคู่ผสมระหว่าง PYO16-001-3-24B กับเหมยหนอง 62 เอ็ม และ PYO16-001-3-24B กับ กข22 ในสภาพโรงเรือน โดยใช้ประชากรแมลงบั่วจังหวัดแพร่ และทดสอบอัตราส่วนการกระจายตัวของประชากรรุ่นลูกที่แสดงความอ่อนแอต่อความต้านทาน ด้วยวิธีการทดสอบไคสแควร์ พบว่า มีอัตราส่วนสอดคล้องกับ 9:7 แสดงว่าเหมยหนอง 62 เอ็ม และ กข22 มียีนด้อยที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อแมลงบั่ว จำนวน 2 ยีน และมีปฏิกิริยาการข่มของยีนต่างตำแหน่งแบบดิวพลีเกท รีเซสซีฟ (duplicate recessive gene) และเมื่อตรวจสอบจีโนมกับด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR ที่อยู่ในบริเวณ *gm12* พบว่า RM3340 มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อแมลงบั่วในข้าวเหมยหนอง 62 เอ็ม และเมื่อนำข้าวสายพันธุ์ช่วงที่ F₄ จำนวน 15 สายพันธุ์ ที่ได้รับ *gm12* มาจากเหมยหนอง จำนวน 3 สายพันธุ์ และ กข22 จำนวน 12 สายพันธุ์ มาทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วจำนวน 3 ประชากร ได้แก่ แมลงบั่วจากจังหวัดเชียงราย น่าน และแพร่ พบว่า มีสายพันธุ์ที่แสดงความต้านทาน (R) หรือค่อนข้างต้านทาน (MR) ต่อแมลงบั่วทั้ง 3 ประชากร มีจำนวน 4 สายพันธุ์ แสดงว่า กข22 มี *gm12* ที่ควบคุมความต้านทานต่อแมลงบั่ว ซึ่งอาจได้รับมาจากข้าวเหมยหนอง 62 เอ็ม ที่เป็นบรรพบุรุษของ กข22 จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า กข22 สามารถใช้เป็นแหล่งพันธุ์กรรม

* Corresponding author: vaiphot.ka@up.ac.th

Received: date; October 17, 2024 Revised: date; February 20, 2025

Accepted: date; February 20, 2025 Published: date; May 30, 2025

ความต้านทาน สำหรับการพัฒนาข้าวพันธุ์อื่น ๆ ให้ต้านทานต่อแมลงข้าว โดยการถ่ายทอด *gm12* เข้าสู่ข้าวพันธุ์รับ และใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกได้

คำสำคัญ: ข้าว; ตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณ; การคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ABSTRACT: The Asian rice gall midge (*Orseolia oryzae*; GM) is a significant pest of rice crops across Asia, causing substantial reductions in rice yield. This study investigates the genetic resistance to the GM in the cultivated rice variety RD22, compared to the landrace variety Muey Nawng 62M (MN62M). The research evaluated the interactions of two F_2 rice populations with the GM. These populations were derived from crosses between PYO16-001-3-24B x MN62M, and PYO16-001-3-24B x RD22. The experiments were conducted in greenhouse conditions using a GM population from Phrae province. The segregation ratios for susceptibility and resistance traits in the progeny were analyzed using a chi-square test. The results showed a 9:7 ratio, indicating that both MN62M and RD22 possess two recessive genes that control resistance to the GM. This resistance pattern follows a duplicate recessive gene interaction. Genotyping with the SSR markers in the *gm12* region revealed that the RM3340 marker is associated with GM resistance in MN62M. Further testing was performed on fifteen F_4 progeny lines that carry the *gm12* region, including three lines obtained from MN62M and twelve lines obtained from RD22. These progenies were evaluated for their interactions with three GM populations from Chiangrai, Nan and Phrae provinces. Four lines exhibited resistance (R) or moderate resistance (MR) across all three GM populations, suggesting that RD22 carries the *gm12* region, which likely originated from MN62M, an ancestor of RD22. These results demonstrate that RD22 can be utilized as a valuable genetic resource for developing other rice varieties resistant to the GM by inheriting the segment of *gm12* through marker-assisted selection.

Keywords: rice gall midge; quantitative trait loci; marker-assisted selection

บทนำ

แมลงข้าว (*Orseolia oryzae*) หรือ Asian rice gall midge (RGM) เป็นแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญ เข้าทำลายต้นข้าวในระยะกล้าจนถึงระยะแตกกอสูงสุด โดยตัวหนอนจะเข้ากัดกินเนื้อเยื่อเจริญของตายอดต้นข้าวหรือหน่ออ่อน และปล่อยสารประกอบทางเคมีที่เรียกว่า cecidogen ออกมากับน้ำลาย ทำให้ใบเหี่ยวพัฒนา กาบใบข้าวหรือหน่ออ่อนเจริญออกมาผิดปกติ และเกิดเป็นหลอดกลมเรียกว่า หลอดข้าว (silver shoot หรือ gall) (Mathur and Rajamani, 1984; Sahu et al., 2023) และไม่ออกรวง ส่งผลให้ข้าวมีผลผลิตลดลง ถ้าเกิดการระบาดรุนแรง จะทำให้ไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้ การระบาดของแมลงข้าวในพื้นที่ภาคเหนือ ส่วนใหญ่จะพบในฤดูปลูกนาปี ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย แพร่ น่าน และพะเยา ส่วนภาคเหนือตอนล่างและภาคกลาง ส่วนใหญ่จะพบการระบาดในฤดูปลูกนาปรัง เช่น จังหวัดพิษณุโลก พิจิตร และชัยนาท ในปี พ.ศ. 2560 พบว่ามีพื้นที่ระบาดของแมลงข้าวในพื้นที่ภาคกลาง จำนวน 41,817 ไร่ (กรมการข้าว, 2560) และยังคงมีการระบาดอย่างต่อเนื่อง โดยปี พ.ศ. 2566 พบการระบาดในพื้นที่จังหวัดอุทัยธานี และเลย จำนวน 1,680 ไร่ (ศูนย์ติดตามและแก้ไขปัญหาภัยพิบัติด้านการเกษตร, 2566) เนื่องจากวงจรชีวิตของแมลงข้าวในระยะตัวหนอนและระยะดักแด้จะอยู่ภายในต้นข้าวหรือพืชอาศัย ส่วนตัวเต็มวัยและไข่จะอยู่ภายนอกต้นข้าว จึงทำให้การใช้สารเคมีเพื่อป้องกันกำจัดและควบคุมทำได้ยาก และไม่มีประสิทธิภาพ (วันทนา, 2560; Ukwungwu et al., 1999) การใช้ข้าวพันธุ์ต้านทานเป็นแนวทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพช่วยป้องกันการเข้าทำลายที่จะก่อให้เกิดความเสียหายของผลผลิตข้าวได้ แต่พันธุ์ข้าวที่ปลูกเชิงพาณิชย์ที่สำคัญที่เกษตรกรนิยมปลูกในแต่ละพื้นที่ ส่วนใหญ่จะอ่อนแอต่อแมลงข้าว ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเชิงพาณิชย์ให้มีความต้านทานต่อแมลงข้าวจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ควรเร่งดำเนินการ

แมลงข้าวในประเทศไทยมีความหลากหลายของไบโอไทป์ (biotype) สามารถเข้าทำลายข้าวได้หลากหลายและแตกต่างกัน (จิรพงศ์ และคณะ, 2552; พิกุล และคณะ, 2563) กลไกการต้านทานต่อแมลงข้าวในข้าว พบว่า มีทั้งที่เป็นแบบ antixenosis และ/หรือ antibiosis (Sahu et al., 2023) ในปัจจุบันมีรายงานการค้นพบ Quantitative Trait Locus (QTL) ที่ควบคุมความต้านทานต่อแมลงข้าวในข้าวพันธุ์ต้านทานต่าง ๆ มีทั้งที่มีรูปแบบการแสดงออกของยีนแบบเด่น (dominant gene) ได้แก่ *Gm1*, *Gm2*, *Gm4*, *Gm5*, *Gm6*, *Gm7*, *Gm8*, *Gm9*, *Gm10* และ *Gm11* และแบบด้อย (recessive gene) ได้แก่ *gm3* โดยส่วนใหญ่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 4 8 9 และ 12 (Lu et al., 2013; Bentur et al., 2016; Sahu et al., 2023) ส่วนในข้าวไทยมีรายงานว่า ข้าวพื้นเมืองพันธุ์เหมยนอง

62 เอ็ม มี *gm12* ที่ตำแหน่งบนโครโมโซม 2 ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อแมลงบั่ว (Leelagud et al., 2020) แต่ว่าการใช้ข้าวพื้นเมืองเป็นพ่อแม่พันธุ์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อแมลงบั่ว จะมีข้อจำกัดด้านการถ่ายทอดลักษณะที่ไม่พึงประสงค์มาสู่รุ่นลูกค่อนข้างมาก ทำให้การคัดเลือกข้าวรุ่นลูกที่มีลักษณะทรงต้นดีและเป็นที่ยอมรับของเกษตรกรใช้ระยะเวลานาน ดังนั้นการเลือกใช้ข้าวพันธุ์ปลูกที่มีความต้านทานเป็นแหล่งพันธุ์กรรมความต้านทาน เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเชิงพาณิชย์ให้ต้านทานต่อแมลงบั่ว จะทำให้ขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวสะดวกและรวดเร็วมากขึ้น ในปัจจุบัน ข้าวพันธุ์ปลูกของไทยที่มีความต้านทานต่อแมลงบั่ว ได้แก่ กข22 และ กข53 (วันทนา, 2560) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่พัฒนาสำหรับพื้นที่นาข้าวและพื้นที่นาข้าวเพื่อการบริโภค ยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับยีนหรือ QTL ที่ควบคุมความต้านทานต่อแมลงบั่ว ตลอดจนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับยีนต้านทานดังกล่าว ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายที่จะศึกษาพันธุ์กรรมความต้านทานต่อแมลงบั่วในข้าวพันธุ์ปลูก กข22 ตลอดจนประเมินการเชื่อมโยงของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับ *gm12* ซึ่งเป็น QTL ที่ควบคุมความต้านทานต่อแมลงบั่ว ซึ่งพบในข้าวเหนียว 62 เอ็ม ที่มีในรายงานก่อนหน้านี้ (พิกุล และคณะ, 2563; Leelagud et al., 2020) ว่ามีในข้าวพันธุ์ กข22 หรือไม่ เพื่อที่จะได้นำมาใช้เป็นข้าวพันธุ์พ่อแม่ สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเชิงพาณิชย์อื่น ๆ ให้ต้านทานต่อแมลงบั่ว โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection; MAS) ต่อไป

วิธีการศึกษา

การพัฒนาประชากรข้าวที่ใช้ทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่ว

ประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2) ที่มีการกระจายตัวของลักษณะความต้านทานบั่ว

สร้างประชากรข้าวชั่วที่ F_2 จำนวน 2 ประชากร จากคู่ผสมจำนวน 2 คู่ ได้แก่ คู่ผสมที่ 1) ข้าวสายพันธุ์ PYO16-001-3-24B x เหมยทอง 62 เอ็ม และ คู่ผสมที่ 2) PYO16-001-3-24B x กข22 โดยข้าวสายพันธุ์ PYO16-001-3-24B เป็นข้าวเหนียวหอม และไม่ไวต่อช่วงแสง ที่พัฒนาขึ้นจากข้าวสันป่าตอง 1 ที่มหาวิทยาลัยพะเยา มีความอ่อนแอต่อแมลงบั่ว (ไวพจน์ และคณะ, 2564) ส่วนข้าวพื้นเมืองพันธุ์เหนียว 62 เอ็ม และข้าวพันธุ์ปลูก กข22 เป็นข้าวพันธุ์ต้านทานต่อแมลงบั่ว ได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์มาจากศูนย์วิจัยข้าวแพร่ กรมการข้าว โดยประชากรข้าวชั่วที่ F_2 ทั้งสองประชากร จะนำไปทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่ว และตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งอยู่ในบริเวณ *gm12*

ประชากรข้าวชั่วที่ 4 (F_4) ที่มี QTL ด้านต้านทานต่อแมลงบั่ว (*gm12*)

เพื่อประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับ *gm12* ที่ควบคุมความต้านทานต่อแมลงบั่ว จากข้าวเหนียว 62 เอ็ม และ กข22 จึงได้ทำการสร้างประชากรข้าวชั่วที่ F_4 จำนวน 4 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 1) PYO13-001-3-7-3-4B x กข22, คู่ที่ 2) PYO13-034-12-65-2-2-1B x กข22, คู่ที่ 3) PYO16-012-140-4-7B x กข22 และ คู่ที่ 4) PYO16-012-140-4-7B x เหมยทอง 62 เอ็ม ในแต่ละชั่วจะปลูกคัดเลือกต้นที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี และนำมาตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งอยู่ในบริเวณ *gm12* (Leelagud et al., 2020) และแสดงความแตกต่างระหว่างข้าวที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในแต่ละคู่ผสม (polymorphism) จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ RM6800, RM3340, RM110 และ RM279 สำหรับต้นข้าวที่มาจากคู่ผสมที่ใช้ข้าวเหนียว 62 เอ็ม เป็นพันธุ์ให้ และจำนวน 3 ตำแหน่ง (RM3340, RM110 และ RM279) สำหรับต้นข้าวที่มาจากคู่ผสมที่ใช้ข้าว กข22 เป็นพันธุ์ให้ และ Aromarker ที่จำเพาะต่อยีน *badh2* ที่ควบคุมลักษณะความหอมในข้าว (Vanavichit et al., 2004) ต้นข้าวที่ได้รับ *gm12* จากข้าวเหนียว 62 เอ็ม หรือ กข22 และเป็นข้าวหอม จะนำมาทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วในสภาพโรงเรือนทดลองต่อไป

การทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่ว

การทดสอบในประชากรชั่วที่ F_2

ทำปลูกทดสอบในสภาพโรงเรือนที่ศูนย์วิจัยข้าวแพร่ จังหวัดแพร่ ด้วยวิธีการของพนนิภา และคณะ (2558) โดยใช้ประชากรแมลงบั่วในพื้นที่จังหวัดแพร่ โดยนำเมล็ดข้าวชั่วที่ F_2 จำนวน 200 เมล็ดต่อคู่ผสม มาเพาะให้งอกประมาณ 3 วัน หลังจากนั้น นำเมล็ดมาปลูกลงบนดินในถาดเป็นแถว แถวละ 20 ต้น จำนวน 10 แถวต่อประชากร โดยพบต้นกล้าที่แข็งแรงจากคู่ผสมที่ 1 และ 2 จำนวน 95 และ 193 ต้น ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์/พันธุ์เปรียบเทียบ ได้แก่ PYO16-001-3-24B, เหมยทอง 62 เอ็ม และ กข22 จะปลูกสายพันธุ์/พันธุ์ละ 100 ต้น จากนั้นย้ายเข้าทรงเลี้ยง จนต้นกล้าอายุ 7 วันหลังจากย้ายปลูก ทำการปล่อยแมลงบั่วเพศเมียในอัตราส่วนต้นกล้า 10

ต้นต่อแมลงบัวเพศเมีย 1 ตัว ลงในกรงที่ทำการทดลอง โดยมีการให้ละอองน้ำเพื่อเป็นการเพิ่มความชื้นและลดอุณหภูมิ หลังจากนั้น 7 วัน ทำการประเมินการเข้าทำลายของแมลงบัวในประชากรข้าวที่ปลูกทดสอบเป็นรายต้น โดยจะนับจำนวนต้นปกติ ต้นแคระแกรนไม่เกิดหลอดบัว และต้นเกิดหลอดบัว (Figure 1) หลังจากนั้นทดสอบการกระจายตัวของลักษณะในข้าวทั้งสองประชากร เพื่อหาจำนวนยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อแมลงบัวในข้าวพันธุ์หมยนอง 62 เอ็ม และ กข22 ด้วยวิธีการทดสอบไคสแควร์ ในขณะเดียวกันทำการให้คะแนนต้นปกติหรือต้นแคระแกรนไม่เกิดหลอดบัว เท่ากับ 0 และต้นเกิดหลอดบัว เท่ากับ 1 เพื่อนำไปใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์กับผลจีโนไทป์ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

การประเมินการเข้าทำลายในข้าวพันธุ์เปรียบเทียบ ทั้ง 3 สายพันธุ์/พันธุ์ จะทำการนับจำนวนหลอดบัวแต่ละต้น แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การทำลาย (พันนิภา และคณะ, 2558) ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การทำลาย (\%)} = \frac{\text{ผลรวมจำนวนต้นที่เกิดหลอด} \times 100}{\text{ผลรวม (จำนวนต้นที่เกิดหลอดบัว + จำนวนต้นแคระแกรน + จำนวนต้นปกติ)}}$$

ให้ระดับคะแนนตามมาตรฐานของ standard evaluation system for rice (SES) (IRRI, 2002) และแปลผลปฏิกิริยาต่อแมลงบัวสำหรับการทดสอบในสภาพโรงเรือนทดลองตามวิธีของพันนิภา และคณะ (2558) ดังนี้

คะแนน	การทำลาย (%)	ปฏิกิริยา
0	มีเปอร์เซ็นต์การทำลาย 0%	ต้านทานสูง (HR)
1	มีเปอร์เซ็นต์การทำลาย 0-5%	ต้านทาน (R)
3	มีเปอร์เซ็นต์การทำลาย 6-10%	ค่อนข้างต้านทาน (MR)
5	มีเปอร์เซ็นต์การทำลาย 11-20%	ค่อนข้างอ่อนแอ (MS)
7	มีเปอร์เซ็นต์การทำลาย 21-50%	อ่อนแอ (S)
9	มีเปอร์เซ็นต์การทำลายมากกว่า 50%	อ่อนแอมาก (HS)

การทดสอบในประชากรข้าวที่ F₄

การทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบัวในประชากรข้าวสายพันธุ์ข้าวที่ F₄ จำนวน 15 สายพันธุ์ จากกลุ่มผสมทั้ง 4 คู่ แบ่งเป็น 3 สายพันธุ์ ที่ได้รับการถ่ายทอด *gm12* จากหมยนอง 62 เอ็ม และ 12 สายพันธุ์ ที่ได้รับการถ่ายทอด *gm12* จาก กข22 ซึ่งจะแสดงจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัสที่เครื่องหมายดีเอ็นเอบน *gm12* เหมือนกับข้าวพันธุ์ให้ เปรียบเทียบกับข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์รับ จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ PYO13-001-3-7-3-4B, PYO13-034-12-65-2-2-1B และ PYO16-012-140-4-7B ส่วนข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์มาตรฐานต้านทาน มีจำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ หมยนอง 62 เอ็ม และ กข22 โดยใช้ประชากรแมลงบัว จำนวน 3 แหล่ง ได้แก่ จังหวัดเชียงราย น่าน และแพร่ อัตราการปล่อยแมลงบัวและวิธีการทดสอบจะดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีการทดสอบในประชากรข้าวที่ F₂ ทำการประเมินการทำลายของแมลงบัวในข้าวแต่ละต้น คำนวณเปอร์เซ็นต์การทำลาย และแปลผลปฏิกิริยาต่อแมลงบัวเช่นเดียวกับวิธีการคำนวณในข้าวสายพันธุ์/พันธุ์มาตรฐานที่ทดสอบพร้อมกับประชากรข้าวที่ F₂

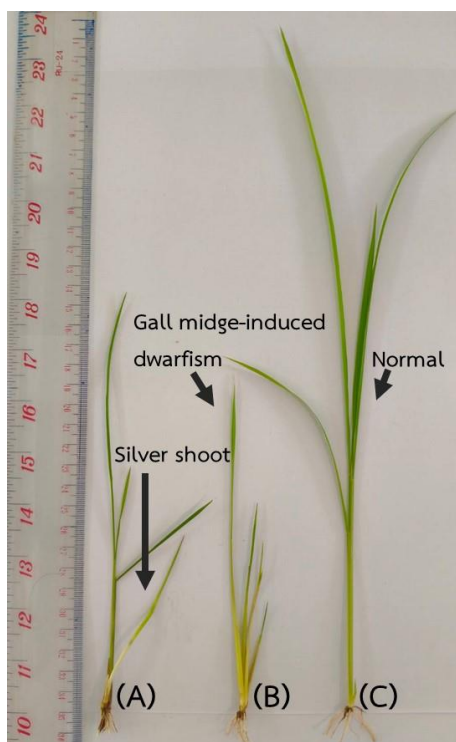


Figure 1 Symptom of rice gall midge infestation, where the affected plants exhibit a characteristic silver-shoot (A) and gall midge-induced dwarfism (B) comparing with normal plant (C).

การวิเคราะห์ความเชื่อมโยงของเครื่องหมายดีเอ็นเอต่อลักษณะความต้านทานต่อแมลงบั่ว

การคัดกรองเครื่องหมายดีเอ็นเอ

ทำการคัดกรองเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งอยู่ในบริเวณ *gm12* ซึ่งเป็น QTL ที่ควบคุมความต้านทานต่อแมลงบั่ว พบในข้าวเหนียว 62 เอ็ม (Leelagud et al., 2020) จำนวน 9 เครื่องหมาย (**Table 1**) ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ในแต่ละคู่ผสมได้ องค์ประกอบของสารเคมีและสภาพปฏิกิริยา PCR จะใช้ตามวิธีของ Myint et al. (2012) จากนั้นนำผลผลิต PCR มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าเพื่อตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยใช้เจลโพลีอะครีลาไมด์ ชนิด denaturing polyacrylamide gel ความเข้มข้น 4.5% แล้วย้อมเจลด้วยเทคนิคซิลเวอร์ (silver staining) (Caetano, 1997) ทำการอ่านแถบดีเอ็นเอ และคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันระหว่างข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ในแต่ละคู่ผสม และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน เพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากรชั่วที่ F_2 จากคู่ผสมทั้ง 2 คู่

Table 1 SSR primers used to narrow down in region the *gm12* locus

Marker name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Amplicon size (bp)
RM109	GCCGCCGAGAGGGAGAGAGAG	CCCCGACGGGATCTCCATCGTC	97
RM6800	GTCCACGAGATGGACTCCTC	TTCTGAAGGCCAGGCCAG	158
RM3340	TCTTGGCAAGCTCTCCTCTC	CCATCATCTCGATCTTGACG	117
RM6938	CTCCGCGGAGTCGATTTTA	AACCAACCACTGATTATTCCAAT	206
RM110	TCGAAGCCATCCACCAACGAAG	TCCGTACGCCGACGAGGTCGAG	156
OSR14	AAATCCACGCACATTTGCG	AGGTAAACGAGCTTGAGGTG	167
RM211	CCGATCTCATCAACCAACTG	CTTCACGAGGATCTCAAAGG	161
RM233	CCAAATGAACCTACATGTTG	GCATTGCAGACAGCTATTGA	162
RM279	GCGGGAGAGGGATCTCCT	GGCTAGGAGTTAACCTCGCG	174

Note: The nucleotide sequences of the primers were obtained from the Gramene database

(<https://archive.gramene.org/markers/>).

การตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากรชั่วที่ F₂

หลังจากประเมินการเข้าทำลายของแมลงบั่วแล้ว ทำการตัดต้นข้าวชั่วที่ F₂ แต่ละต้น มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการ DNATrap® ของห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน แล้วทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งอยู่ในบริเวณ *gm12* ซึ่งเป็น QTL ที่ควบคุมความต้านทานต่อแมลงบั่วพบในข้าวเหนียว 62 เอ็ม และแยกความแตกต่างระหว่างข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ในแต่ละคู่ผสมได้ (polymorphic markers) โดยประชากรชั่วที่ F₂ ที่มาจากคู่ผสมระหว่าง PYO16-001-3-24B x เหนียว 62 เอ็ม จะใช้จำนวน 4 เครื่องหมาย ได้แก่ RM3340 RM110, RM233 และ RM279 และประชากรชั่วที่ F₂ ที่มาจากคู่ผสมระหว่าง PYO16-001-3-24B x กข22 จะใช้จำนวน 1 เครื่องหมาย ได้แก่ RM279 องค์ประกอบของสารเคมี สภาพปฏิกิริยา PCR และวิธีการตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จะทำเช่นเดียวกับขั้นตอนการคัดกรองเครื่องหมายดีเอ็นเอ ทำการอ่านแถบดีเอ็นเอในประชากรข้าวชั่วที่ F₂ แต่ละต้นของแต่ละคู่ผสม เปรียบเทียบกับข้าวที่ใช้เป็นพ่อแม่ ข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้จะนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับข้อมูลฟีโนไทป์ที่ได้จากการทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วต่อไป

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับความต้านทานต่อแมลงบั่ว

ประชากรชั่วที่ F₂

เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับความต้านทานต่อแมลงบั่ว ทำได้โดยวิเคราะห์ค่าการถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย (simple linear regression) และความแปรปรวน (ANOVA) ระหว่างข้อมูลจีโนไทป์ของประชากรข้าวชั่วที่ F₂ ของแต่ละคู่ผสม ที่ได้จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งอยู่ในบริเวณ *gm12* กับข้อมูลฟีโนไทป์ที่ได้จากการทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่ว ด้วยโปรแกรม R version 4.2.1 เพื่อหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับความต้านทานต่อแมลงบั่วที่ถ่ายทอดมาจากข้าวพันธุ์ให้ทั้ง 2 พันธุ์ โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงค่า P-value น้อยกว่า 0.05 แสดงว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับความต้านทานต่อแมลงบั่วที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากข้าวพันธุ์ให้

ประชากรชั่วที่ F₄

เพื่อเป็นการยืนยันประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอกับความต้านทานต่อแมลงบั่วที่ถ่ายทอดมาจากข้าวเหนียว 62 เอ็ม และ กข22 จะนำข้อมูลการทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วของประชากรชั่วที่ F₄ จำนวน 15 สายพันธุ์ จากคู่ผสมทั้ง 4 คู่ ที่มีชิ้น *gm12* ที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากข้าวเหนียว 62 เอ็ม หรือ กข22 ที่แสดงจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัสของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งอยู่ใน

บริเวณ *gm12* นำมาหาค่าเฉลี่ย คำนวณเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย และแปลผลเพื่อหาระดับความต้านทานต่อแมลงศัตรูตามมาตรฐานของ SES (IRRI, 2002)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การกระจายตัวของลักษณะพันธุกรรมความต้านทานต่อแมลงศัตรู

ผลการทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงศัตรูประชากรจังหวัดแพร่ พบว่า ประชากรข้าวช่วงที่ F_2 จากคู่ผสมที่ 1) PYO16-001-3-24B x เหมยทอง 62 เอ็ม จำนวน 95 ต้น พบต้นปกติไม่เกิดหลอดบัว จำนวน 3 ต้น ต้นผิดปกติแสดงลักษณะแคระแกรน แต่ไม่เกิดหลอดบัว จำนวน 30 ต้น รวมจำนวนต้นที่แสดงลักษณะต้านทาน เท่ากับ 33 ต้น และพบต้นที่เกิดหลอดบัว จำนวน 62 ต้น ซึ่งจัดเป็นต้นที่อ่อนแอต่อแมลงศัตรู จากผลดังกล่าวพบว่า มีต้นแสดงลักษณะต้านทาน เท่ากับ 34.7% เมื่อหาอัตราส่วนการกระจายตัวของลักษณะอ่อนแอต่อลักษณะต้านทาน พบว่า มีอัตราส่วนเท่ากับ 9:7 ($\chi^2=3.14$, $P<0.05$) แสดงให้เห็นว่า ข้าวเหนยทอง 62 เอ็ม มียีนต้านทาน จำนวน 2 ยีน และมีปฏิกิริยาการข่มของยีนต่างตำแหน่ง (epistasis) แบบแสดงออกแบบดิวพลิกเท รีเซสซีฟ (duplicate recessive gene) ส่วนการกระจายตัวในประชากรข้าวช่วงที่ F_2 จากคู่ผสมที่ 2) PYO16-001-3-24B x กข22 จำนวน 193 ต้น พบต้นปกติที่ไม่เกิดหลอดบัว จำนวน 3 ต้น ต้นผิดปกติที่ลักษณะแคระแกรน แต่ไม่เกิดหลอดบัว จำนวน 69 ต้น รวมจำนวนต้นที่แสดงลักษณะต้านทาน เท่ากับ 72 ต้น และพบต้นอ่อนแอที่เกิดหลอดบัว จำนวน 121 ต้น คิดเป็นต้นที่แสดงลักษณะต้านทาน เท่ากับ 37.3% สอดคล้องกับอัตราส่วน 9:7 แสดงให้เห็นว่า กข22 มียีนต้านทาน จำนวน 2 ยีน และมีแสดงออกแบบดิวพลิกเท รีเซสซีฟ เช่นเดียวกับเหนยทอง 62 เอ็ม ในขณะที่ผลการทดสอบในพันธุ์มาตรฐานต้านทานและใช้เป็นพันธุ์ให้ พบว่า เหมยทอง 62 เอ็ม ไม่พบการเกิดหลอดบัว แสดงว่ามีความต้านทานมาก (HR) และ กข22 พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การทำลาย 1.0% แสดงว่า มีความต้านทาน (R) ส่วนข้าวพันธุ์รับ PYO16-001-3-24B พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การทำลาย 26.0% ซึ่งแสดงความอ่อนแอ (S) ต่อแมลงศัตรูประชากรจังหวัดแพร่ จากผลดังกล่าว จะเห็นได้ว่ากราฟการกระจายตัวของลักษณะความต้านทานและอ่อนแอต่อแมลงศัตรู ในประชากรข้าวช่วงที่ F_2 ทั้ง 2 ประชากร จะมีจำนวนต้นที่แสดงลักษณะอ่อนแอกว่าต้นต้านทาน (Figure 2; Table 2) แสดงให้เห็นว่าลักษณะความต้านทานต่อแมลงศัตรูในข้าวเหนยทอง 62 เอ็ม และ กข 22 จะถูกควบคุมด้วยยีนด้อย จำนวน 2 ยีน เนื่องจากอัตราส่วนต้นอ่อนแอต่อต้นต้านทาน เท่ากับ 9:7 ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Leelagud et al. (2020) ที่พบว่า มี QTL ที่ควบคุมความต้านทานต่อแมลงศัตรูในข้าวเหนยทอง 62 เอ็ม เพียงหนึ่ง QTL ได้แก่ *gm12* ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 2 เท่านั้น

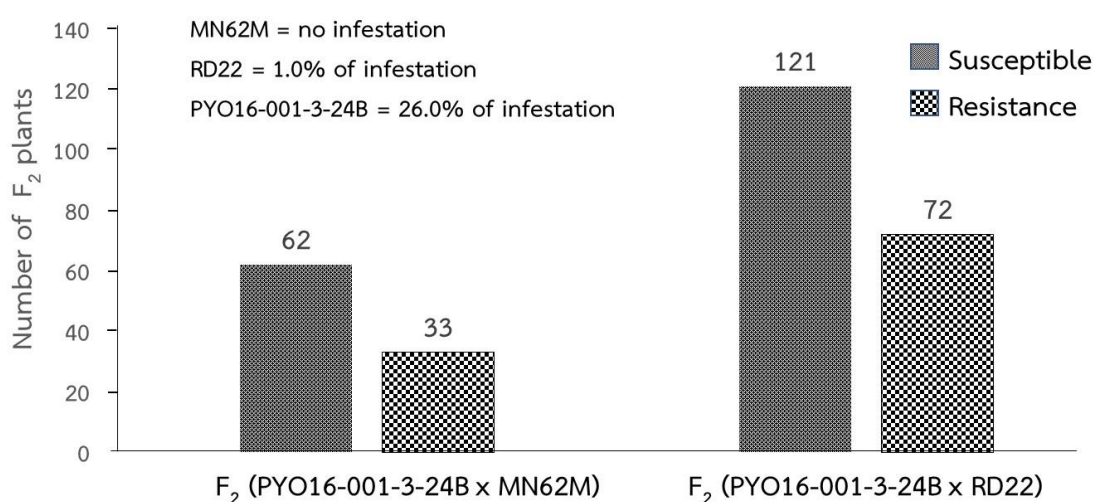


Figure 2 The distribution of the occurrence of silver shoot caused by gall midges from Phrae Province in the F_2 rice population derived from the crosses between rice varieties PYO16-001-3-24B x MN 62 M and PYO16-001-3-24B x RD22, evaluated under greenhouse conditions.

Table 2 Testing the genetic inheritance of resistance to gall midge using the chi-square (χ^2) test was conducted in the F_2 rice populations derived from the crosses between the rice varieties PYO16-001-3-24B x MN62M and PYO16-001-3-24B x RD22, evaluated using gall midges from Phrae Province under greenhouse conditions

	Parents			F ₂ (PYO16-001-3-24B x MN62M)					F ₂ (PYO16-001-3-24B x RD22)				
				Observed	Expected				Observed	Expected			
	PYO16-001-3-24B	MN62M	RD22		3:1	15:1	9:7	13:3		3:1	15:1	9:7	13:3
Susceptible	26	0	1	62	71.25	89.06	53.44	77.19	121	144.75	180.94	108.56	156.81
Resistance	74	100	99	33	23.75	5.94	41.56	17.81	72	48.25	12.06	84.44	36.19
Total	100	100	100	95	95	95	95	95	193	193	193	193	193
$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$					4.80	131.57	3.14	13.93		15.59	317.68	3.25	43.62
					*	**	ns	**		**	**	ns	**

If df = 1, the value of χ^2 at 0.05 = 3.84 and the value of χ^2 at 0.01 = 6.63

Note: * indicates that the observed value significantly differs from the expected genetic inheritance ratio at $p < 0.05$, ** indicates that the observed value significantly differs from the expected genetic inheritance ratio at $p \leq 0.01$ and ns indicates that the observed value does not differ from the expected genetic inheritance ratio.

ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอในบริเวณ *gm12* กับความต้านทานต่อแมลงข้าว

จากการคัดกรองเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบจีโนไทป์อย่างละเอียดในประชากรข้าวข้าวที่ F_2 โดยการตรวจสอบจีโนไทป์ของข้าวที่ใช้เป็นพ่อแม่ทั้ง 6 พันธุ์/สายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิด SSR จำนวน 9 เครื่องหมาย ที่มีตำแหน่งอยู่บน *gm12* (Table 1) พบว่า มีเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง PYO16-001-3-24B กับ เหมยนอง 62 เอ็ม จำนวน 8 เครื่องหมาย ได้แก่ RM109, RM3340, RM6938, RM110, OSR14, RM211, RM233 และ RM279 ในจำนวนนี้มีเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงแถบดีเอ็นเอและแยกจีโนไทป์ได้ชัดเจน จำนวน 4 เครื่องหมาย ได้แก่ RM3340, RM110, RM233 และ RM279 ซึ่งจะนำไปตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากรข้าวข้าวที่ F_2 ต่อไป ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง PYO16-001-3-24B กับ กข22 ได้ มีจำนวน 3 เครื่องหมาย ได้แก่ RM3340, RM233 และ RM279 (Table 3) แต่เมื่อนำไปตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากรข้าวข้าวที่ F_2 จากกลุ่มผสมทั้งสอง พบว่า ในประชากรที่มาจากกลุ่มระหว่าง PYO16-001-3-24B x กข22 มีเพียงเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM279 ที่สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอของต้นที่มีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัสได้ชัดเจน ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM3340 และ RM233 แสดงแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน จึงไม่นำมาใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ประชากรข้าวที่ F_2 ที่มาจากกลุ่มผสม PYO16-001-3-24B x กข22

Table 3 Genotyping results of six rice parents were analyzed using 9 SSR markers in the *gm12* region

Parents	Genotypes								
	RM10	RM680	RM334	RM693	RM11	OSR1	RM21	RM23	RM27
	9	0	0	8	0	4	1	3	9
PYO16-001-3-24B	a	a	b	a	b	b	a	b	c
RD22	a	a	b	a	b	b	a	a	b
MN62M	b	a	a	b	a	a	b	a	a
PYO13-001-3-7-3-4B	b	b	c	c	a	b	a	b	c
PYO13-034-12-65-2-2-1B	b	b	c	b	b	b	a	a	c
PYO16-012-140-4-7B	-	b	c	-	a	-	-	-	-

Note: The same English letters in the same column indicate the same genotype and - = no band.

จากการตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากรข้าวข้าวที่ F_2 ทั้งสองประชากร และนำข้อมูลจีโนไทป์ดังกล่าวมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับข้อมูลความต้านทานต่อแมลงข้าว โดยวิเคราะห์ค่าการถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย พบว่า ในกลุ่มผสม PYO16-001-3-24B x เหมยนอง 62 เอ็ม เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM3340 กับลักษณะความต้านทานต่อแมลงข้าว มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 แสดงให้เห็นว่า ยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อแมลงข้าวที่พบในข้าวเหนยนอง 62 เอ็ม มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM3340 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Leelagud et al. (2020) ที่รายงานว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM3340, RM6800 และ RM110 เชื่อมโยงกับความต้านทานต่อแมลงข้าว และพบในข้าวพันธุ์เหนยนอง 62 เอ็ม ซึ่งเรียกว่า *gm12* แต่การทดลองนี้ พบว่า RM110 ไม่เชื่อมโยงกับต้านทานต่อแมลงข้าว (Table 4) ดังนั้นสามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM3340 คัดเลือกต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายทอด *gm12* มาจากข้าวเหนยนอง 62 เอ็ม ได้ ส่วนผลการวิเคราะห์ในประชากรข้าวที่ F_2 ที่มาจากกลุ่มระหว่าง PYO16-001-3-24B x กข22 พบว่า RM279 ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อแมลงข้าว (Table 4) เช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์จากกลุ่มผสม PYO16-001-3-24B x เหมยนอง 62 เอ็ม

จากผลการทดลองดังกล่าว ไม่สามารถยืนยันถึงความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ในบริเวณ *gm12* ในข้าวพันธุ์ปลูก กข22 ได้ เนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบจีโนมไทป์อย่างละเอียดในการทดลองนี้ ที่แสดงความแตกต่างระหว่างข้าว กข22 กับข้าว PYO16-001-3-24B มีจำนวนน้อยมาก เนื่องจากว่าข้าวทั้ง 2 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ใช้เป็นข้าวพันธุ์พ่อแม่เป็นข้าวพันธุ์ปลูกทั้งคู่ อาจมีพันธุกรรมใกล้เคียงกัน จึงทำให้จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่เป็น polymorphic markers มีจำนวนน้อย การเลือกใช้ข้าวพันธุ์พ่อแม่ที่มีลักษณะที่ต้องการศึกษาแตกต่างกันแล้ว ควรจะมีพันธุกรรมแตกต่างกันพอสมควร จึงเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการค้นหายีนหรือ QTL ด้วยวิธีวางแผนที่ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR เพราะจะทำให้มีจำนวน polymorphic markers เพิ่มขึ้น และเพียงพอสำหรับการนำไปตรวจสอบจีโนมไทป์ส่วนการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ร่วมกับฟีโนไทป์ ทำให้เพิ่มโอกาสที่จะพบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับยีน หรือ QTL ที่ควบคุมลักษณะเป้าหมายมากขึ้นด้วย (Tanksley, 1993; Varshney et al., 2005) แต่ถ้ายีนในประชากรที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างพ่อแม่ที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกันหรือมีความหลากหลายน้อย การหาลำดับเบสทั้งจีโนม (whole genome sequencing) แล้วนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เพื่อหา SNPs ที่สัมพันธ์กับลักษณะเป้าหมายจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมมากกว่า (Huang et al., 2010)

การทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วในประชากรข้าวข้าวที่ F_4 ที่ได้รับ *gm12* จากข้าว เหมยนอง 62 เอ็ม และ กข22

ผลการทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วทั้ง 3 ประชากร พบว่า สายพันธุ์ข้าวข้าว F_4 ที่ได้รับ *gm12* มาจากข้าว กข22 แสดงความต้านทาน (R) หรือค่อนข้างต้านทาน (MR) ต่อแมลงบั่วทั้ง 3 ประชากร มีจำนวน 4 สายพันธุ์ และมีสายพันธุ์ที่แสดงความอ่อนแอ (S) หรือค่อนข้างอ่อนแอ (MS) มีจำนวน 8 สายพันธุ์ ในขณะที่สายพันธุ์ที่ได้รับ *gm12* จากข้าวเหมยนอง 62 เอ็ม ที่แสดงความต้านทาน (R) ต่อแมลงบั่ว จำนวน 1 สายพันธุ์ และมีสายพันธุ์ที่แสดงความอ่อนแอ (S) หรือค่อนข้างอ่อนแอ (MS) จำนวน 2 สายพันธุ์ เมื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การทำลายในข้าวพันธุ์/สายพันธุ์พ่อแม่ พบว่า ข้าวเหมยนอง 62 เอ็ม แสดงปฏิกิริยาค่อนข้างต้านทาน (MR) โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การทำลาย เท่ากับ 5.9% ส่วนข้าว กข22 แสดงปฏิกิริยาค่อนข้างอ่อนแอ (MS) โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การทำลาย เท่ากับ 11.2% ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์แม่ทั้ง 3 สายพันธุ์ แสดงปฏิกิริยาอ่อนแอ (S) ถึงอ่อนแอมาก (HS) มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การทำลาย เท่ากับ 49.1 50.5 และ 37.2% ตามลำดับ โดยประชากรแมลงบั่วจากจังหวัดน่านจะมีความสามารถในการเข้าทำลายมากที่สุด (Table 5)

จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า ข้าว กข22 มี *gm12* ที่ควบคุมความต้านทานต่อแมลงบั่ว เช่นเดียวกับข้าวเหมยนอง 62 เอ็ม เนื่องจากว่าข้าวสายพันธุ์ข้าวที่ F_4 ที่ได้รับการถ่ายทอด *gm12* จาก กข22 แสดงปฏิกิริยาค่อนข้างต้านทานต่อแมลงบั่ว แต่ว่าอาจมีอิทธิพลน้อยกว่า *gm12* ที่ได้รับจากข้าวเหมยนอง 62 เอ็ม ซึ่งเป็น QTL หลัก หรือที่เรียกว่า major QTL (Leelagud et al., 2020) เมื่อตรวจสอบพันธุ์ประวัติของข้าว กข22 พบว่า มีบรรพบุรุษมาจากข้าวเหมยนอง 62 เอ็ม (สมใจ และคณะ, 2560) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า กข22 ได้รับ *gm12* มาจากข้าวเหมยนอง 62 เอ็ม จึงทำให้มีความต้านทานต่อแมลงบั่ว ส่วนสายพันธุ์ที่มี *gm12* แต่แสดงความอ่อนแอต่อแมลงบั่ว อาจเป็นเพราะว่ายีนที่ควบคุมความต้านทานที่มีตำแหน่งอยู่ในบริเวณ *gm12* สูญหาย เนื่องจากการเกิด crossing ประกอบกับจำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบการคงอยู่ของ *gm12* มีเพียง 2 ตำแหน่ง ได้แก่ RM3340 และ RM279 เท่านั้น ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM6800 และ RM110 ไม่สามารถแยกความแตกต่างของจีโนมไทป์ในประชากรลูกได้ชัดเจน ดังนั้นอาจทำให้สายพันธุ์ข้าวดังกล่าวไม่ได้รับยีนต้านทานมาจากข้าว กข22 จึงแสดงลักษณะอ่อนแอต่อแมลงบั่ว

นอกจากนี้ยังพบว่า ลูกข้าวที่ F_4 บางสายพันธุ์ที่ได้รับ *gm12* จากข้าว กข22 หรือ เหมยนอง 62 เอ็ม แสดงระดับความต้านทาน (R) ถึงความต้านทานมาก (HR) ต่อแมลงบั่วบางประชากร และมากกว่าข้าวพันธุ์ให้ จึงเป็นไปได้ว่ายีนที่ควบคุมความต้านทานต่อแมลงบั่ว มี 2 ยีน และยีนทั้งสองมีการแสดงออกแบบยีนด้อย มีปฏิกิริยาการข่มกันแบบดิวลิเกท รีเซสสียีน โดยยีนที่อยู่ในบริเวณ *gm12* ทำหน้าที่เป็นยีนหลัก (major gene) ดังจะเห็นได้จากสัดส่วนลูกข้าวที่ F_2 ที่แสดงความต้านทานมีจำนวนน้อย ทำให้อัตราส่วนลูกที่แสดงความต้านทานต่ออ่อนแอสอดคล้องกับอัตราส่วน 7:9 และเมื่อถ่ายทอด *gm12* ให้กับข้าวสายพันธุ์รับที่อ่อนแอบางสายพันธุ์ เช่น PYO16-012-140-4-7B ซึ่งอาจมียีนที่ควบคุมความต้านทาน แต่ทำหน้าที่เป็นยีน

รอง (minor gene) และถ้ามีการแสดงออกของยีนแบบดิวลิเกท รีเซสสียีน จะทำให้แสดงลักษณะอ่อนแอต่อแมลงบ้าง แต่เมื่อได้รับยีนหลักที่อยู่บริเวณ *gm12* จากข้าวพันธุ์ให้ จึงทำให้ยีนทั้งสองมีการแสดงออกแบบส่งเสริมกัน จึงทำให้ข้าวสายพันธุ์ ข้าวที่ F_4 แสดงลักษณะต้านทานมาก (HR) ได้ ซึ่งการกระจายตัวของลักษณะที่เกิดจากปฏิกริยาการข้ามของยีนต่างตำแหน่ง แบบอีพิสเตซิส จะเห็นได้จากการทดลองของ Lee et al. (2003) ที่ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง (bacterial blight) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ในข้าว พบว่า มีการกระจายตัวของ ลักษณะอ่อนแอออกมาจากประชากรข้าวข้าว F_2 ที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ต้านทานทั้งคู่ ได้แก่ IRBB5 x Lota Sail และ IRBB8 x Lota Sail ซึ่งผลดังกล่าวเป็นผลมาจากปฏิกริยาการข้ามของยีนต่างตำแหน่งที่ถ่ายทอดมาจากข้าวที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ แล้วมารวมกันอยู่ในรุ่นลูก

ในปัจจุบันมีการศึกษากลไกการต้านทานในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า มีทั้งแบบ antixenosis โดยต้นข้าวจะมีโครงสร้างที่เป็นสิ่งกีดขวางหรือสร้างสารเคมีที่แมลงไม่ชอบ ขัดขวางการอยู่อาศัยและการวางไข่ และ antibiosis โดยต้นข้าวจะสร้างสารชีวเคมีที่ส่งผลต่อการพัฒนาของตัวหนอนแมลงบ้าง หรือยับยั้งการเกิดหลอดบ้าง เช่น สารประกอบจำพวกฟีนอล แร็ก ฟลาโวนอยด์ และกรดอะมิโนอิสระ โดยข้าวพันธุ์ต้านทานบางพันธุ์มีทั้ง 2 กลไกต้านทาน (Sardesai et al., 2001; Sahu et al. 2023) โดยกลไกการต้านทานจะพบจะได้ทั้งที่เกี่ยวข้องและไม่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองแบบ hypersensitive response (HR) ที่ทำให้เซลล์พืชที่อยู่รอบตัวหนอนจะเกิดการตายแบบ apoptosis ส่งผลเกิดการตายของตัวหนอนที่อยู่ภายในต้นข้าว

ในปัจจุบันมีการค้นหายีน หรือ QTL ที่ควบคุมต้านทานต่อแมลงบ้างในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ จำนวนมาก เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุ์กรรมความต้านทานสำหรับนำมาปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานอย่างกว้างต่อแมลงบ้างหลายไปโอโทป์ หรือที่เรียกว่า broad-spectrum resistance ตลอดจนค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์หรืออยู่ในบริเวณ QTL ที่ควบคุมความต้านทานดังกล่าว ซึ่งวางตัวอยู่บนหลายโครโมโซม เช่น RM6800, RM3340 และ RM110 บนโครโมโซม 2 (Leelagud et al., 2020) ที่พบในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์เหมยนาต 62 เอ็ม GM3DEL3 (Sama et al., 2012) และ RM17480 (Sahu et al., 2023) บนโครโมโซม 4 GM4DEL (Divya et al., 2015) GM8DEL (Divya et al., 2018), RM22709 (Sama et al., 2012) บนโครโมโซม 8 RM235 RM28574 และ RM28564 บนโครโมโซม 12 (Himabindu et al., 2010) ซึ่งสามารถนำมาใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์กับความต้านทานต่อแมลงบ้างในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้าวพันธุ์ปลูกที่มีความต้านทาน ซึ่งอาจทำให้ค้นพบยีนต้านทานใหม่ ๆ ทั้งที่เป็นยีนหลักและยีนรองได้ และใช้เป็นแหล่งพันธุ์กรรมความต้านทาน เพื่อการพัฒนาพันธุ์ข้าวปลูกให้มียีนต้านทานหลาย ๆ ยีน ด้วยวิธีการรวมยีน (gene pyramiding) เพื่อให้มีความต้านทานอย่างกว้างมากขึ้น ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานในข้าวพันธุ์ดังกล่าว จะทำให้สามารถนำไปใช้คัดเลือกและติดตามการถ่ายทอดยีนต้านทานไปสู่รุ่นลูกได้ จากการศึกษาของ Leelagud et al. (2020) เกี่ยวกับจำนวนยีนที่อยู่ในบริเวณ *gm12* พบว่า มีจำนวน 10 ยีน และบางยีนเกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อความเครียดจากสิ่งมีชีวิต (biotic stresses) เช่น ยีนที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีน pentatricopeptide repeat protein (LOC_Os02g01610) และ F-box domain และ LRR-containing protein (LOC_Os02g01550) (Yasala et al., 2012) นอกจากนี้ยังมียีน *ribosomal protein-coding gene* ซึ่งถ้ายีนนี้ไม่ทำงาน จะส่งผลต่อกระบวนการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเนื้อเยื่อที่มีสารอาหารสำหรับการเจริญเติบโตและการพัฒนาของตัวหนอนแมลงบ้าง (Zhao et al., 2019) โดยยีนดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองแบบ HR ดังที่กล่าวมาก่อนหน้านี้

Table 4 Phenotype – genotype association analysis using ANOVA and simple linear regression analysis in the F₂ populations from the cross between PYO16-001-3-24B x MN62M and PYO16-001-3-24B x RD22

Marker	Mean of RGM scores									
	PYO16-001-3-24B x MN62M					PYO16-001-3-24B x RD22				
	PYO16-001-3-24B allele	Hetero.	MN62M allele	P-value	R ²	PYO16-001-3-24B allele	Hetero.	RD22 allele	P-value	R ²
RM3340	0.734	0.588	0.357	**	0.006	0.07970	-	-	-	-
RM110	0.720	0.474	0.500	ns	0.065	0.00379	-	-	-	-
RM233	0.633	0.650	0.500	ns	0.507	0.01917	-	-	-	-
RM279	0.689	0.650	0.500	ns	0.481	0.01830	0.760	0.600	0.679	ns 0.185 0.00391

Note: ** indicates that the DNA marker is highly significantly associated with rice gall midge resistance, while ns indicates that the DNA marker is not associated with rice gall midge resistance.

Table 5 Mean percentage of infestation and resistance reactions in F_4 rice lines with *gm12* from MN62M and RD22 against three populations of RGM tested under greenhouse conditions

Entry	Lines/varieties	Crossing	Genotyping (homozygous)				Percent of infestation in greenhouse test (%)									Mean of infestation (%)	Resistance reactions
							Phare RGM			Nan RGM			Chiangrai RGM				
			RM6800	RM3340	RM110	RM279	mean	s.e.	reaction	mean	s.e.	reaction	mean	s.e.	reaction		
1	PYO21-001-8-4-2	PYO12-001-8-6-3-7-4B x RD22	b	a	b	b	8.6	1.9	MR	8.4	0.7	MR	7.2	3.9	MR	8.1	MR
2	PYO21-001-8-5-5	PYO12-001-8-6-3-7-4B x RD22	b	a	b	b	43.2	0.8	S	34.8	3.3	S	42.7	10.7	S	40.2	S
3	PYO21-002-5-2-8	PYO13-034-12-65-2-2-1B x RD22	b	a	b	b	8.4	1.5	MR	9.7	5.7	MR	1.4	1.4	R	6.5	MR
4	PYO21-002-18-1-1	PYO13-034-12-65-2-2-1B x RD22	b	a	b	b	33.3	2.4	S	42.9	14.3	S	30.9	0.3	S	35.7	S
5	PYO21-002-18-1-2	PYO13-034-12-65-2-2-1B x RD22	b	a	b	b	35.1	2.2	S	60.1	1.8	HS	51.9	8.1	HS	49.0	S
6	PYO21-002-18-7-2	PYO13-034-12-65-2-2-1B x RD22	b	a	b	b	26.8	2.4	S	32.6	13.6	S	43.2	0.3	S	34.2	S
7	PYO21-002-18-7-3	PYO13-034-12-65-2-2-1B x RD22	b	a	b	b	17.9	2.1	MS	34.1	0.7	S	33.0	11.8	S	28.3	S
8	PYO21-002-18-7-4	PYO13-034-12-65-2-2-1B x RD22	b	a	b	b	15.1	4.7	MS	7.7	3.8	MR	0.0	0.0	HR	7.6	MR
9	PYO21-002-18-7-5	PYO13-034-12-65-2-2-1B x RD22	b	a	b	b	14.7	2.9	MS	14.3	4.3	MS	7.3	5.2	MR	12.1	MS
10	PYO21-002-18-7-6	PYO13-034-12-65-2-2-1B x RD22	b	a	b	b	28.4	7.2	S	33.0	14.8	S	32.1	9.2	S	31.2	S
11	PYO21-005-6-5-2	PYO16-012-140-4-7B x RD22	b	a	b	b	21.0	5.4	S	26.7	2.9	S	28.5	2.9	S	25.4	S
12	PYO21-005-6-5-5	PYO16-012-140-4-7B x RD22	b	a	b	b	3.6	1.9	R	2.2	2.2	R	0.0	0.0	HR	1.9	R
13	PYO21-020-6-5-3	PYO16-012-140-4-7B x MN62M	a	a	a	a	14.3	1.8	MS	27.8	4.0	S	15.3	0.4	MS	19.1	MS
14	PYO21-020-6-5-6	PYO16-012-140-4-7B x MN62M	a	a	a	a	4.2	2.8	R	0.0	0.0	HR	0.0	0.0	HR	1.4	R
15	PYO21-020-6-5-7	PYO16-012-140-4-7B x MN62M	a	a	a	a	27.7	2.0	S	16.3	0.3	MS	21.7	4.3	S	21.9	S
16	PYO12-001-8-6-3-7-4B	Parent	b	b	b	c	36.2	2.0	S	62.4	5.8	HS	48.6	9.5	S	49.1	S
17	PYO13-034-12-65-2-2-1B	Parent	b	b	b	c	44.6	5.4	S	60.4	10.4	HS	46.4	3.6	S	50.5	HS
18	PYO16-012-140-4-7B	Parent	b	b	b	c	32.1	4.4	S	42.3	7.7	S	37.3	3.2	S	37.2	S
19	MN62M	Donor for RGM resistance	a	a	a	a	5.6	2.8	MR	10.7	2.7	MS	1.6	1.6	R	5.9	MR
20	RD22	Donor for RGM resistance	a	a	b	b	6.8	0.5	MR	16.0	8.0	MS	10.6	8.1	MS	11.2	MS

Note: HR (Highly resistant), R (Resistant), MR (Moderately resistant), MS (Moderately susceptible), S (Susceptible), HS (Highly susceptible).

สรุป

ข้าวเหนียว 62 เอ็ม และ กข22 มียีนที่ควบคุมความต้านทานต่อแมลงบั่ว จำนวน 2 ยีน โดยข้าวทั้งสองใช้ยีนที่อยู่ในบริเวณ *gm12* ที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 2 เป็นยีนหลักที่ควบคุมความต้านทานต่อแมลงบั่ว โดยยีนต้านทานทั้งสองมีการแสดงออกแบบยีนด้อย และมีปฏิกริยาการข้ามของยีนต่างตำแหน่งแบบดิวพลีเกท รีเซสซีฟ (duplicate recessive gene) และสามารถใช้ข้าวเหนียว 62 เอ็ม และ กข22 เป็นพันธุ์ให้ลักษณะความต้านทานต่อแมลงบั่ว โดยการถ่ายทอด *gm12* ซึ่งเป็น QTL ควบคุมความต้านทาน และใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM6800, RM3340 และ RM110 ในการตรวจสอบจีโนไทป์และติดตามการถ่ายทอด *gm12* ไปสู่ประชากรรุ่นลูกได้

การอนุญาตวิจัยในสัตว์

การทดลองนี้ได้รับอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ตามเอกสารอนุญาตเลขที่ 1-029-66

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นุจิรา ทาตัน ที่เป็นผู้ให้คำปรึกษาด้านการดำเนินการทดลองที่เกี่ยวข้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์ และขอขอบคุณศูนย์วิจัยข้าวแพร่ กรมการข้าว ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่สำหรับทำการประเมินความต้านทานต่อแมลงบั่ว

เอกสารอ้างอิง

- กรมการข้าว. 2560. ประกาศกรมการข้าว เรื่องเตือนภัยการระบาดของแมลงบั่ว วันที่ 7 มีนาคม 2560. แหล่งข้อมูล: <https://oictc.ricethailand.go.th/web/images/pdf/22.03.60/01.pdf>. ค้นเมื่อ 10 ตุลาคม 2567.
- จิรพงศ์ ไกรจันทร์, กัลยา สานแสน, สงวน เทียงติฤทธิ์, พิกุล ลีลาฤกษ์, รุ่งนภา กาวิชัย, วันทนา ศรีรัตนศักดิ์ และนรีณี เจียงวรรณ. 2552. ความหลากหลายทางพันธุกรรมและชีวชนิดของแมลงบั่วในประเทศไทย. วารสารวิชาการข้าว. 3: 39-47.
- พนินา ยาใจ, อัญชลี ตาคำ และกุลชญา เกศสุวรรณ. 2558. ประเมินความเสียหายและระดับเศรษฐกิจของแมลงบั่วที่เข้าทำลายข้าวพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ. น. 185-195. ใน: สัมมนาวิชาการข้าว กลุ่มศูนย์วิจัยข้าวภาคเหนือตอนบนและภาคเหนือตอนล่าง ครั้งที่ 8 ประจำปี 2558. กองวิจัยและพัฒนาข้าว, กรมการข้าว.
- พิกุล ลีลาฤกษ์, ศักดา คงสิลา, พันธุ์ชิตา เวชสาร, กุลชญา ดาร์เวล, ยศวิศ พันธุ์เสนี, อริสรา สุตันตังใจ, ชนิตา อุปรัง, พนินา ยาใจ, กัลยา บุญสง่า, วราพงษ์ ชมาฤกษ์ และจิรพงศ์ ไกรจันทร์. 2563. การค้นพบยีนต้านทานแมลงบั่ว GM12 ในข้าวพันธุ์เหนียว 62 เอ็ม. น.69-72. ใน: เอกสารประกอบการประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว. วันที่ 18-20 กุมภาพันธ์ 2563, ขอนแก่น, กรมการข้าว.
- วันทนา ศรีรัตนศักดิ์. 2560. แมลงบั่ว: ศัตรูข้าวที่ต้องจัดการการระบาด. วารสารวิชาการข้าว. 8: 84-108.
- ไวพจน์ กันจู, พายัพเบศวร์ มากกุล, พนินา ยาใจ, เฉลิมขวัญ ฉิมวัย, ศิริพร กออินทร์ศักดิ์, วราวุฒิ โส๊ะสุข, นิรุติ์ โปะทะปัญญา และธีรยุทธ ตูจินดา. 2564. การพัฒนาพันธุ์ข้าวเหนียวหอมมาลประทานโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก: การประเมินผลผลิตและคุณภาพเมล็ดของสายพันธุ์ข้าวเหนียวหอม ไม่ไวต่อช่วงแสง ที่พัฒนาจากข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 (ปีที่ 2). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์, สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร.
- ศูนย์ติดตามและแก้ไขปัญหาภัยพิบัติด้านการเกษตร. 2566. รายงานสถานการณ์ภัยพิบัติด้านการเกษตร วันที่ 4 มกราคม 2566. แหล่งข้อมูล: <https://www.moac.go.th/warning-preview-451891791974>. ค้นเมื่อ 10 ตุลาคม 2567.
- สมใจ สาสิทธิ์, นันทิดา สีนสายไทย, นกสร แก้ววิเศษ, เรณู จำปาเกตุ, พุทธชาติ ศรีพนม, ชลธิภา นวลทอง, ชะเอม เกษมรัตน์, ชรินทร์ แก้วคำแจ้ง, รุ่งฤดี พันธ์ะรักษ์, ชัยนุชา บุคตาบุญ, ชนะ ศรีสมการ, ปัญญา คำแสนพันธ์, เอกสิทธิ์ สุกุลคุ, วีระศักดิ์ หอมสมบัติ, อรสา วงษ์เกษม, พยอม โคเบลล์, สุกัญญา กรานโต, พัชรภรณ์ รักชุม, อังคณา กันทาจันทร์ และยุพดี รัตนพันธ์. 2560. ข้าวเหนียวพันธุ์ กข22. วารสารวิชาการข้าว. 8: 25-43.

- Bentur, J. S., N. Rawat, D. Divya, D. K. Sinha, R. Agarwal, I. Atray, and S. Nair. 2016. Rice-gall midge interactions: battle for survival. *Journal of Insect Physiology*. 84: 40–49.
- Caetano, A. 1997. Resolving DNA amplification products using polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining. pp.119-134. In Micheli, R. M., and R. Bova. *Fingerprinting methods based on PCR*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Divya, D., K. Himabindu, N. Sahu, S. Nair, and J. S. Bentur. 2015. Cloning of a gene encoding LRR protein and its validation as candidate gall midge resistance gene, Gm4 in rice. *Euphytica*. 203: 185–195.
- Divya, D., N. Sahu, S. Nair, and J. S. Bentur. 2018. Map-based cloning and validation of a gall midge resistance gene, Gm8, encoding a proline-rich protein in the rice variety Aganni. *Molecular Biology Reports*. 45: 2075–2086.
- Himabindu, K., K. Suneetha, V. S. A. K. Sama, and J. S. Bentur. 2010. A new rice gall midge resistance gene in the breeding line CR57-MR1523, mapping with flanking markers and development of NILs. *Euphytica*. 174: 179–187.
- Huang, X., X. Wei, T. Sang, Q. Zhao, Q. Feng, Y. Zhao, C. Li, C. Zhu, T. Lu, Z. Zhang, M. Li, D. Fan, Y. Guo, A. Wang, L. Wang, L. Deng, W. Li, Y. Lu, Q. Weng, K. Liu, T. Huang, T. Zhou, Y. Jing, W. Li, Z. Lin, E. S. Buckler, Q. Qian, Q. F. Zhang, J. Li, and B. Han. 2010. Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. *Nature Genetics*. 42: 961-967.
- IRRI. 2002. Standard Evaluation system for rice (SES). International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.
- Lee, K. S., S. Rasabandith, E. R. Angeles, and G. S. Khush. 2003. Inheritance of resistance to bacterial blight in 21 cultivars of rice. *Phytopathology*. 93: 147-152.
- Leelagud, P., S. Kongsila, P. Vejchasarn, K. Darwell, Y. Phansenee, A. Suthanthangjai, C. Uparang, R. Kawichi, P. Yajai, K. Boonsa-nga, V. Chamarek, and J. Jairin. 2020. Genetic diversity of Asian rice gall midge based on mtCOI gene sequences and identification of a novel resistance locus gm12 in rice cultivar MN62M. *Molecular Biology Reports*. 47: 4273-4283.
- Lu, J., L. He, J. Xu, C. Xu, C. Li, S. Wei, and J. Su. 2013. Identification and genetic analysis of gall midge resistance in rice germplasm 91-1A2. *Rice Science*. 20: 73-78.
- Mathur, K. C., and S. Rajamani. 1984. *Orseolia* and rice: Cecidogenous interactions. *Proceedings: Animal Sciences*. 93: 283-292.
- Myint, K. M., S. Arikat, S. Wanchana, T. Yoshihashi, K. Choowongkamon, and A. Vanavichit. 2012. A PCR-based marker for a locus conferring the aroma in Myanmar rice (*Oryza sativa* L.). *Theory Applied Genetics*. 125: 887-896.
- Sahu, N., B. G. Gadratagi, L. K. Rath, A. Chandrappa, R. P. Sah, L. Mandal, G. P. P. Govindharaj, N. B. Patil, T. Adak, A. Mahendiran, and P. C. Rath. 2023. Marker-trait association analysis for gall midge (*Orseolia oryzae*) resistance in a diverse rice population. *Annals Applied Biology*. 182: 361-370.
- Sama, V. S. A. K., K. Himabindu, S. B. Naik, R. M. Sundaram, B. C. Viraktamath, and J. S. Bentur. 2012. Mapping and MAS breeding of an allelic gene to the Gm8 for resistance to Asian rice gall midge. *Euphytica*. 187: 393–400.

- Sardesai, N., K. R. Rajyashri, S. K. Behura, S. Nair, and M. Mohan. 2001. Genetic, physiological and molecular interactions of rice and its major dipteran pest, gall midge. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 64: 115–131.
- Tanksley, S. D. 1993. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics*. 27: 205-233.
- Ukwungwu, M. N., C. T. Williams, and O. Okhldlevble. 1999. Screening of African rice, *Oryza glaberrima* Steud, for resistance to rice gall midge, *Orseolia oryzivora* Harris and Gagné. *Journal of Food Technology in Africa*. 4: 108–110.
- Vanavichit, A., T. Yoshihashi, S. Wanchana, S. Areekit, D. Saengsraku, W. Kamolsukyonyong, J. Lanceras, T. Toojinda, and S. Tragoonrung. 2004. Positional cloning of Os2AP, the aromatic gene controlling the biosynthetic switch of 2-acetyl-1-pyrroline and gamma aminobutyric acid (GABA) in rice. In *Proceedings of the 1st International Conference on Rice for the Future*. 31 August– 3 September 2004, Bangkok.
- Varshney, R. K., A. Graner, and M. E. Sorrells. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*. 23: 48-55.
- Yasala, A. K., N. Rawat, V. S. A. K. Sama, H. B. Kudapa, R. M. Sundaram, and J. S. Bentur. 2012. *In silico* analysis for gene content in rice genomic regions mapped for the gall midge resistance genes. *Plant Omics Journal*. 5: 405–413.
- Zhao, C., C. Rispe, and P. D. Nabity. 2019. Secretory RING finger proteins function as effectors in a grapevine galling insect. *BMC Genomics*. 20: article ID 923.