

โรคไหม้และการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก

Blast disease and rice breeding for blast disease resistance through marker-assisted selection

ศรีสวัสดิ์ ชันทอง¹ ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์² และ สุรีพร เกตุงาม^{1*}

¹ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34190

²ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

* Corresponding author: sureporn.k@ubu.ac.th

บทนำ

โรคไหม้ (blast disease) จัดเป็นปัญหาสำคัญของการผลิตข้าวทั่วโลก มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* Sacc. ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง มีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่ต่างกันได้ดี จึงพบการแพร่ระบาดของโรคอย่างแพร่หลายในหลายประเทศทั่วโลก สร้างความเสียหายต่อผลผลิตข้าวได้ตั้งแต่ 11 เปอร์เซ็นต์ จนถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (Zeigler *et al.*, 1994) เชื้อรา *P. grisea* สามารถเข้าทำลายต้นข้าวได้ในทุกระยะของการเจริญเติบโต ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง (ทัศนีย์, 2540; พูนศักดิ์ และคณะ, 2550) การป้องกันกำจัดโรคไหม้สามารถทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมที่สุดคือ การใช้พันธุ์ต้านทานเนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกสามารถประหยัดค่าใช้จ่าย และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

ปัจจุบันความรู้ทางด้านอนุพันธุศาสตร์ มีความก้าวหน้าเป็นอย่างมาก ส่งผลให้มีการค้นพบยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจต่างๆ มากมาย ยีนต้านทานโรคไหม้เป็นยีนหนึ่งที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง มีรายงาน

การค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้มากกว่า 70 ยีน (Koide *et al.*, 2009) เครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาจากยีนต้านทานโรคไหม้หรือมีตำแหน่งใกล้เคียงกับยีนต้านทานโรคไหม้ สามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นเครื่องมือช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection, MAS) ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพพบความถี่มีวัตถุประสงค์เพื่ออภิปรายถึงโรคไหม้และวิธีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการคัดเลือก

โรคไหม้

โรคไหม้ (blast disease) เป็นโรคที่มีความสำคัญและสร้างความเสียหายต่อผลผลิตข้าวทั่วโลก พบการแพร่กระจายของโรคมากกว่า 85 ประเทศ (Babujee and Gnanamanickam, 2000) โรคไหม้มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* (Figure 1a) ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ แต่เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมเชื้อราจะสร้างแอสโกสปอร์ ซึ่งเป็นการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และเรียกเชื้อราชนิดนี้ว่า *Magnaporthe grisea* เชื้อสาเหตุโรคไหม้มีจัดอยู่ใน

กลุ่ม ascomycete มีจำนวนโครโมโซม $2n=14$ ขนาดจีโนมประมาณ 40 เมกะเบสเป็นเชื้อราที่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่ต่างกันได้ดี มีความหลากหลายทางสายพันธุ์สูง (ชัชวาล และสุริพร, 2552) พูนศักดิ์และคณะ (2550) ได้รวบรวมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่พบในประเทศไทยระหว่างปี 2545-2548 พบเชื้อทั้งหมด 2,476 ไอโซเลท สามารถจำแนกเชื้อออกได้ 623 สายพันธุ์ และมีความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้สูงถึงร้อยละ 83

เชื้อ *P. grisea* สามารถเข้าทำลายต้นข้าวได้ในทุกระยะของการเจริญเติบโต โดยเชื้อจะเข้าทำลายต้นข้าวในส่วนที่อยู่เหนือดิน หากเชื้อเข้าทำลายบริเวณใบ จะเรียกว่า “โรคใบไหม้” (leaf blast) (Figure 1b) ลักษณะอาการจะเกิดบาดแผลคล้ายรูปดาบหรือรูปกระสวย ขอบแผลมีสีน้ำตาล ตรงกลางแผลมีสีเทา หากมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม แผลจะขยายใหญ่รวมกันเป็นแผลเดียว กรณีเกิดโรคขึ้นบริเวณรอยต่อระหว่างกาบใบและแผ่นใบ (collar) เรียกว่า “collar blast” จะทำให้แผ่นใบเสียหาย ถ้าเกิดขึ้นที่ข้อ เรียกว่า “node blast” (Figure 1c) จะทำให้ข้อลำต้นมีสีดำเปราะ และหักง่าย หากเชื้อเข้าทำลายที่บริเวณคอรวงข้าว เรียกว่า “โรคไหม้คอรวง” (neck blast) ซึ่งจะพบแผลสีน้ำตาลเทารอบๆ คอรวงข้าว หากเชื้อเข้าทำลายรวงข้าวก่อนระยะนํ้านมจะทำให้รวงข้าวเสียหายทั้งหมด แต่ถ้าเกิดหลังระยะนํ้านม จะทำให้เมล็ดข้าวไม่สมบูรณ์ และทำให้คุณภาพข้าวเสียหายได้ (ทัศนีย์, 2540; พูนศักดิ์ และคณะ, 2550; ชัชวาล และสุริพร, 2552) ในปี 2535 พบการระบาดของโรคไหม้ในระยะข้าวออกรวง บริเวณภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียง

ออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ทำให้พื้นที่ปลูกข้าวได้รับความเสียหายประมาณ 1.2 ล้านไร่ (Disthaporn, 1994) ต่อมา มีการรายงานการระบาดของโรคในปี 2544 มีพื้นที่ได้รับความเสียหายประมาณ 78,778 ไร่ (กรมวิชาการเกษตร, 2546) และในปี 2553 พบการระบาดในจังหวัดมหาสารคาม อุบลราชธานี และบุรีรัมย์ ช่วงเดือนกันยายน ถึงเดือนธันวาคม มีพื้นที่ได้รับความเสียหายมากกว่า 793,200 ไร่ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2553; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553)

การควบคุมและป้องกันโรคไหม้ เพื่อลดความเสียหายของผลผลิตข้าว สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้สารเคมี การใช้วิธีเขตกรรม และการใช้พันธุ์ต้านทาน เป็นต้น การใช้สารเคมีจะเป็นวิธีที่ง่าย และสามารถควบคุมการระบาดของโรคได้ในระดับหนึ่ง แต่การใช้สารเคมีทำให้เกิดสารตกค้างในสภาพแวดล้อม และเป็นอันตรายต่อผู้ใช้ อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตให้กับเกษตรกรอีกด้วย นอกจากนี้ยังสร้างแรงกดดันทำให้เชื้อมีการปรับตัวเพื่อการอยู่รอด (selection pressure) และทำให้ต้านทานต่อสารเคมี จนไม่สามารถควบคุมการระบาดของโรคได้ (ชาญณรงค์, 2553) ส่วนวิธีเขตกรรมเป็นวิธีที่มีความยุ่งยาก เกษตรกรต้องมีประสบการณ์ในการจัดการแปลง เช่น แปลงกล้าต้องเป็นพื้นที่ที่อากาศถ่ายเทได้ดี การใส่ปุ๋ยในโตรเจนไม่ควรใส่ในอัตราสูงเกินไป เป็นต้น การใช้พันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ เป็นวิธีการที่เหมาะสมในการป้องกันกำจัดโรคไหม้ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก และมีความปลอดภัยต่อเกษตรกรและผู้บริโภค (ทัศนีย์, 2540; พูนศักดิ์ และคณะ, 2550; Babujee and Gnanamanickam, 2000)

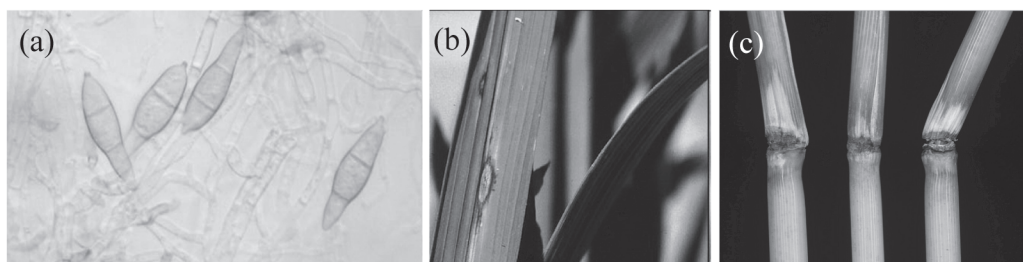


Figure 1 Cause of blast disease and blast symptom (a) *Pyricularia grisea* (b) leaf blast (c) node blast

ยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้

ลักษณะต้านทานต่อโรคไหม้ถูกควบคุมโดยยีนหลัก (major gene) และยีนรอง (minor gene) ลักษณะต้านทานโรคไหม้ที่ถูกควบคุมด้วยยีนหลักจะมีความต้านทานที่จำเพาะกับสายพันธุ์ของเชื้อรา *P. grisea* โดยยีนจะไปยับยั้งการแสดงออกของเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ (complete resistance) ทำให้พืชไม่แสดงอาการของโรค ส่วนลักษณะต้านทานโรคไหม้ที่ถูกควบคุมด้วยยีนรอง เป็นลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ หรือลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait loci: QTLs) ทำให้มีความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้แบบไม่จำเพาะ เรียกลักษณะความต้านทาน

แบบนี้ว่า “ลักษณะต้านทานแบบบางส่วน” (partial resistance) ซึ่งเป็นลักษณะต้านทานที่ไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้พืชมีความต้านทานต่อเชื้อในระดับต่ำจนถึงปานกลาง และลักษณะต้านทานโรคไหม้ที่ถูกควบคุมด้วยยีนดังกล่าว จะแปรเปลี่ยนไปตามอิทธิพลของสภาพแวดล้อม (Babujee and Gnanamanickam, 2000; Ballini *et al.*, 2008; Koide *et al.*, 2009)

จากความก้าวหน้าทางอนุพันธุศาสตร์ ทำให้มีการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ไม่ต่ำกว่า 70 ยีน (Table 1) และมีการวางตำแหน่ง QTLs ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคไหม้ไม่น้อยกว่า 347 ตำแหน่ง (Koide *et al.*, 2009) ยีนต้านทานโรคไหม้

Table 1 Summary of conventional DNA markers for the rice blast resistance genes (modified from Koide *et al.*, 2009).

Target gene	Donor	Chromosome	Distance	Marker
<i>Pi27(t)</i>	Q14	1	11.9	RM151
			9.7	RM259
<i>Pi35(t)</i>	Hokkai 188	1	3.5	RM1216
			3.5	RM1003
<i>Pid1</i>	Digu	2	14.5	RM262
<i>Pib</i>	Tohoku	2	0	RM208
			0	Pibdom
<i>pi21</i>	Owarihatamochi	4	0	P702D03#79
<i>Pigm(t)</i>	Gumei 4	6	2	C26348
<i>Pi36</i>	Q61	8	0.4	RM5647
			0	CRG3
<i>Pi5</i>	RIL125, RIL249	9	0	76B14f
			0	40N23r
<i>Pi38</i>	Tadukan	11	4	RM206
			16	RM21
<i>Pik</i>	Kusabue	11	0	k8823
			0	K8824
<i>Pik-m</i>	Tsuyake	11	0	K2167
<i>Pik-h</i>	Tetep	11	0	RM224
<i>Pik-s</i>	Shin2	11	0	RM224
			0	RM1233
<i>Pita</i>	Taducan	12	-	Pi-ta 440
			-	Pi-ta 1042
			-	Pi-ta 403
<i>Pi20(t)</i>	IR24	12	0	RM1337
				RM5364
<i>Pi39(t)</i>	Q15	12	0	39M6

ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นยืนเด่น ยกเว้นยืน *pi21* ที่เป็นยืนค้อย แหล่งพันธุกรรมของยืนด้านทานโรคใหม่ส่วนใหญ่ได้มาจากข้าวพื้นเมือง (landrace rice) มีเพียงยืนด้านทานโรคใหม่ *Pi9*, *Pi33* และ *Pi40(t)* ที่มีแหล่งกำเนิดมาจากข้าวป่า *Oryza minuta*, *O. rufipogon* และ *O. australiensis* ตามลำดับ (ัชชาวล และสุริพร, 2552; Koide et al., 2009) ยืนด้านทานโรคใหม่ส่วนใหญ่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6, 11 และ 12 (Figure 2) ปัจจุบันมีรายงานการโคลนยืนด้านทานโรคใหม่สำเร็จแล้ว 11 ยืน ได้แก่ *Pi2*, *Pi9*, *Pi36*, *Pi37*, *Pi-b*, *Pi-d2*, *Pi-k^h* (หรือ *Pi54*), *Pi-ta*, *Piz*, *Piz-t* และ *Pigm* (ัชชาวล และสุริพร, 2552; Wang et al., 1999; Jia et al., 2002; Deng et al., 2009; Koide et al., 2009)

ความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้
จำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ยีนต้านทานโรคไหม้แบบ
แคบ (narrow spectrum resistance gene) และ ยีน
ต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง (broad spectrum resistance
gene) โดยยีนต้านทานโรคไหม้แบบแคบ เป็นยีนที่มี
ความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้น้อยสายพันธุ์
ตัวอย่างเช่น ยีน *Pif*, *pi21*, *Pb1* และ *Pi34* (Ballini *et al.*, 2008) ส่วนยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง เป็น
ยีนที่มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุ
โรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์ (Ballini *et al.*, 2008)
ตัวอย่างเช่น ยีน *Pi2*, *Pi5(t)*, *Pi-z*, *Piz-5*, *Pi-ta*, *Pi-b*,

Pi54 (Pi-k^h), *Pigm*, *Pi1*, *Pi6*, *Pi9* และ *Pi33* (ซัชวาล และสุริพร, 2552; Deng et al., 2009; Fujita et al., 2009; Joshi et al., 2009; Sharma et al., 2010) Che et al. (1996; 1999) รายงานว่ายีน *Pi2* สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในประเทศฟิลิปปินส์ และประเทศจีนได้ 445 และ 792 ไอโซเลท ตามลำดับ ส่วนในประเทศไทย อัจฉราพร และพูนศักดิ์ (2552) รายงานว่ายีน *Pi-4a(t)* หรือ *Pi-ta*, *Pi-ta*² และ *Pi1* สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่พบในภาคเหนือตอนล่างจำนวน 80 ไอโซเลท ได้ร้อยละ 33.33, 31.15 และ 29.03 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ว่ายีนต้านทานโรคไหม้ จะสามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้เป็นจำนวนมาก และหลากหลายในพื้นที่ต่างๆ ได้ยาวนานหรือไม่ (Qu et al., 2006)

การใช้พันธุ์ต้านทานนับเป็นวิธีควบคุมโรคใหม่ที่มีประสิทธิภาพที่สุด โดยลดความเสียหายจากการระบาดของโรคได้เป็นอย่างดี แต่การใช้ยีนต้านทานโรคใหม่แบบแคบที่จำเพาะกับเชื้อเพียงไม่กี่สายพันธุ์จะส่งผลให้พันธุ์ข้าวสูญเสียความต้านทานต่อโรคได้ในระยะเวลาเพียงไม่กี่ปี เนื่องจากเชื้อมีการปรับตัวและมีวิวัฒนาการให้สามารถเข้าทำลายข้าวได้ (ชาตุนนรงค์, 2553; Sreewongchai *et al.*, 2010) ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคใหม่โดยใช้ยีนต้านทาน

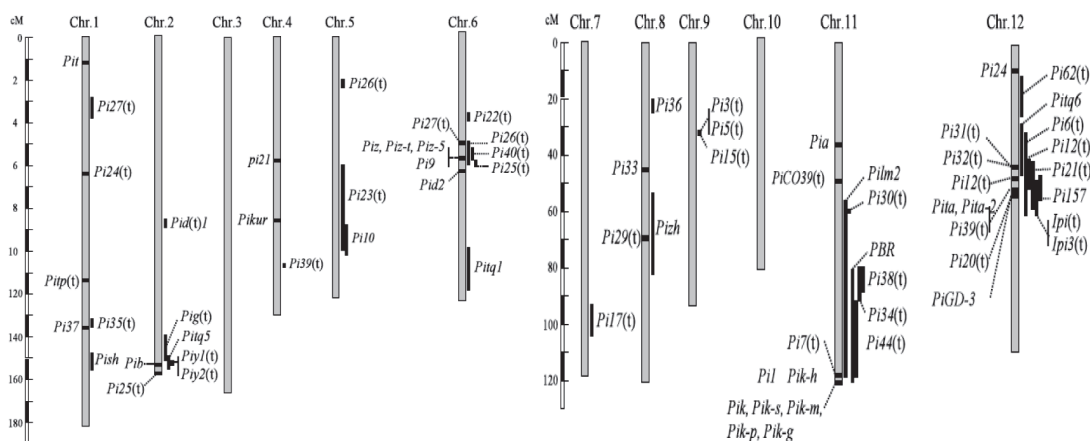


Figure 2 Putative location of the blast resistance genes reported by 2008 (Koide *et al.*, 2009).

แบบกว้าง หรือ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ โดยการรวมยีนต้านทานโรคไหม้หลายๆ ยีน (gene pyramiding) จึงเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ให้ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้อย่างยั่งยืน

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ในประเทศไทย

ประเทศไทยเริ่มมีการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ให้ต้านทานโรคไหม้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2502 และในปี 2513 ได้มีการรับรองพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้พันธุ์แรกคือ กข 7 ซึ่งมีความต้านทานโรคไหม้ได้ในระดับปานกลาง ต่อมา มีการรับรองพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้อีกหลายพันธุ์ เช่น พันธุ์ข้าวเจ้าสุพรรณบุรี 60, สุพรรณบุรี 90, ชัยนาท 1, ข้าวเหนียวแพร่ 1, สุพรรณบุรี 1 และ สุพรรณบุรี 2 เป็นต้น (ทัศนีย์, 2540) ในปี พ.ศ. 2550 กรมการข้าวได้รับรองพันธุ์ข้าวหอมอุบล 80 หรือ กข 33 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ที่ปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีมาตรฐาน (conventional breeding) ซึ่งปัจจุบันได้รับความนิยมจากเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ดวงกมล, 2550)

การใช้พันธุ์ต้านทานโรคไหม้ถึงแม้จะเป็นวิธีการป้องกันโรคไหม้ที่มีประสิทธิภาพ แต่ก็ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคไหม้มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง ทำให้มีโอกาสเกิดกลายพันธุ์ได้สายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีความรุนแรง สามารถเข้าทำลายพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้เดิมได้ โดยทั่วไปการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีมาตรฐาน หรือ วิธีดั้งเดิมจะใช้ระยะเวลาอันและที่สำคัญในขั้นตอนของการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคไหม้ (phenotype screening) ต้องใช้แรงงานและค่าใช้จ่ายสูงและต้องอาศัยสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เพื่อให้ยีนมีการแสดงออกของลักษณะต้านทานดังกล่าว ซึ่งในระยะเวลาเป็นปี อาจทำได้เพียงไม่กี่ครั้ง โดยทั่วไปจะใช้เวลาประมาณ 8 ปี จึงทำให้ไม่สามารถปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่ต้านทานโรคไหม้ได้ทันตามความต้องการของเกษตรกร ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์

โดยช่วยในการคัดเลือกลักษณะที่ซับซ้อน เช่น ลักษณะต้านทานโรคและแมลง โดยใช้แทนการคัดเลือกจากฟีโนไทป์ ซึ่งจะให้ผลที่แม่นยำเนื่องจากการคัดเลือกที่จีโนไทป์หรือยีนที่ควบคุมลักษณะดังกล่าวโดยตรง การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (MAS) จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่นักปรับปรุงพันธุ์นำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ (ธีรยุทธ, 2546; Babu *et al.*, 2004; Collard and Mackill, 2008)

การวางตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้

การสร้างแผนที่ยีนเพื่อค้นหาลำดับยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ จะทำในประชากรที่มีการกระจายตัวทางพันธุกรรมสูง (segregating population) เช่น ประชากรของลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2 population) ประชากรของลูกผสมกลับ (backcross population) และประชากร recombinant inbred line (RIL population) เป็นต้น จากนั้นตรวจสอบโดยใช้หลักการวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อจัดวางเครื่องหมายโมเลกุลบนแผนที่พันธุกรรมของข้าว โดยนำข้อมูลความต้านทานโรคไหม้ของประชากรแต่ละต้น มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้ มีการจัดวางไว้บนโครโมโซมต่างๆ บนแผนที่พันธุกรรม ตัวอย่างเช่น Prasad *et al.* (2009) รายงานการวางตำแหน่งยีน *Pi-1(t)* ในข้าวอินดิกา (*indica*) สายพันธุ์ Samba mahsuri โดยใช้ประชากร F_2 ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่าง ข้าวพันธุ์ C101LAC กับ Samba mahsuri และทดสอบความต้านทานโดยใช้เชื้อ *P. grisea* สายพันธุ์ DRR 001 พบว่า ยีน *Pi-1(t)* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 และอยู่ใกล้ชิดกับเครื่องหมายโมเลกุล RM224

ในประเทศไทย Noenplab *et al.* (2006) ได้รายงานการศึกษาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ของข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล โดยใช้ประชากร RIL ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวเจ้าหอมนิล และใช้เครื่องหมายโมเลกุล 111 เครื่องหมาย

ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุล และลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวเจ้าหอมนิล โดยทดสอบระดับความต้านทานต่อโรคไหม้คอร์วกับเชื้อ *P. grisea* จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ THL191, THL318 และ THL899 ในประชากร RIL จำนวน 587 ตัวอย่าง พบว่า ข้าวเจ้าหอมนิลมี QTLs ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้จำนวน 3 QTLs มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 1, 11 และ 12 โดยมีเครื่องหมายโมเลกุลที่ใกล้ชิดกับ QTLs ดังกล่าว 14 เครื่องหมาย ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวสามารถนำมาใช้เพื่อช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของไทยให้ต้านทานโรคไหม้ได้ต่อไป

ปัจจุบันมีรายงานการวางตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในจีโนมข้าวอย่างแพร่หลาย ตัวอย่างของตำแหน่งยีนดังกล่าวแสดงใน Table1 และ Figure 2 ซึ่งข้อมูลตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้เป็นข้อมูลที่ได้จากฐานข้อมูลสาธารณะ (Oryzabase และ Gramene) โดยพบการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้เกือบทุกโครโมโซม ยกเว้นโครโมโซมคู่ที่ 3 และ 10

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (MAS) ในการพัฒนาสายพันธุ์ เป็นวิธีการที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน โดยเป็นการคัดเลือกที่จีโนไทป์ของยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าว ทำให้มีความแม่นยำสูง ช่วยย่นระยะเวลาในการคัดเลือกสามารถคัดเลือกได้หลายลักษณะพร้อมกัน และลดโอกาสการได้ลักษณะที่ไม่ต้องการ ซึ่งติดมากับลักษณะที่ต้องการคัดเลือก (linkage drag) อย่างไรก็ตามความสำเร็จของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์นั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญ ได้แก่ จำนวนของยีนเป้าหมาย ระยะทางระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับยีนเป้าหมาย (ควรมากกว่า 5 cM) ขนาดประชากรที่ใช้ในการคัดเลือก ชนิดและ

เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างยีนกับสภาพแวดล้อม ความสัมพันธ์ของยีนในการทำงานร่วมกัน และจำนวนครั้งในการคัดเลือก (ธีรยุทธ, 2546; Collard and Mackill, 2008; Sreewongchai et al., 2010)

โดยทั่วไปการประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์พืชนั้น สามารถแบ่งได้ 3 รูปแบบ ได้แก่ (1) การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับ (marker assisted backcrossing, MAB) (2) การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการรวมยีน (marker assisted pyramiding) และ (3) การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกในลูกผสมชั่วแรกๆ (early generation marker assisted selection) (Collard and Mackill, 2008)

(1) การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับ (MAB)

การปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับ เป็นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะทางการเกษตรอื่นคืออยู่แล้วแต่ยังขาดลักษณะดีบางประการ เช่น ลักษณะต้านทานโรคไหม้ การปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับจะเป็นการผสมระหว่างสายพันธุ์ให้ (donor) กับสายพันธุ์รับ (recurrent) โดยข้าวสายพันธุ์ให้จะมียีนต้านทานโรคไหม้ และข้าวสายพันธุ์รับจะเป็นพันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรอื่นๆ ที่คืออยู่แล้ว และมีการปลูกกันแพร่หลาย แต่อ่อนแอต่อโรคไหม้ เช่น ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์ กข 6 เป็นต้น

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับ โดยทั่วไปการคัดเลือกจะแบ่งได้เป็น 3 ระดับ คือ ระดับแรกเป็นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลคัดเลือกตรงยีนเป้าหมาย (foreground selection) ที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ ซึ่งจะเป็นการคัดเลือกที่จีโนไทป์สามารถใช้แทนการคัดเลือกจากฟีโนไทป์ซึ่งต้องใช้แรงงานและค่าใช้จ่ายสูง (laborious phenotype screening) หรือ ใช้คัดเลือกลักษณะที่ถูกควบคุมด้วย

ยีนด้อย ซึ่งสามารถทำได้ง่าย (Hospital and Charcosset, 1997) ระดับที่สองเป็นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลคัดเลือกลูกผสมกลับ (BC progeny) ที่มียีนเป้าหมายซึ่งขนานข้างด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนดังกล่าว (tightly linked flanking markers) หรือเรียกว่า “recombinant selection” วัตถุประสงค์ของการคัดเลือกแบบนี้ เพื่อต้องการลดขนาดของชิ้นส่วนโครโมโซม ที่มียีนเป้าหมายจากสายพันธุ์ให้ (size of introgression) ซึ่งจะเป็นการลดปัญหาการเกิด linkage drag หรือ ลดโอกาสการได้ลักษณะที่ไม่ต้องการซึ่งติดมากับยีนเป้าหมาย (Hospital, 2005) โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่ขนานหัวท้ายของยีนเป้าหมาย ที่มีระยะทางน้อยกว่า 5 cM จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ และระดับสุดท้ายเป็นการคัดเลือกลูกผสมกลับที่ได้รับการคัดเลือกแล้วว่ามียีนเป้าหมาย ให้มีลักษณะคล้ายพันธุ์รับมากที่สุดด้วย “background marker” โดยเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวไม่มีการเชื่อมโยงกับยีนเป้าหมาย เรียกการคัดเลือกแบบนี้ว่า “background selection” (Hospital and Charcosset, 1997; Frisch *et al.*, 1999) ซึ่งจะเป็นการเร่งให้ได้ต้นที่มียีนเป้าหมาย และมีลักษณะต่างๆ คล้ายสายพันธุ์รับมากที่สุด โดยทั่วไปการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับด้วยวิธีมาตรฐานจะต้องใช้เวลาอย่างน้อยประมาณ 6ชั่วรุ่นขึ้นไป แต่การใช้เครื่องหมายโมเลกุลสามารถบรรลุวัตถุประสงค์ได้ด้วยการผสมกลับเพียง 4 (BC_4) หรือ 3 (BC_3) ชั่วรุ่น และ บางครั้งอาจใช้เพียง 2 (BC_2) ชั่วรุ่น เท่านั้น (Visscher *et al.*, 1996; Hospital and Charcosset 1997; Frisch *et al.*, 1999)

ตัวอย่างความสำเร็จของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ โดยวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับในประเทศไทย ได้แก่ การปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข 6 ให้ต้านทานโรคไหม้ Wongsaprom *et al.* (2010) ได้ผสมพันธุ์ข้าวระหว่างพันธุ์เจ้าหอมนิล ซึ่งมี QTLs ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ 2 ตำแหน่ง บนโครโมโซมคู่ที่ 1 และ 11 (qB11 และ qB111) กับ

ข้าวพันธุ์ กข 6 ซึ่งอ่อนแอต่อโรคไหม้ ได้ลูกผสม F_1 จากนั้นปล่อยให้ผสมตัวเองได้ลูก F_2 แล้วใช้เครื่องหมายโมเลกุล RM212/RM319 และ RM224/RM144 ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่ขนานข้างหัวท้ายของ QTLs ที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมคู่ที่ 1 และ 11 ตามลำดับ (qB11 และ qB111) (Table 2) เป็นตัวช่วยในการคัดเลือก ได้ต้น F_2 ที่มี qB11 และ qB111 ที่เป็นฮอโมไซกัส (F_2 No. 334) ซึ่งนำมาใช้เป็นสายพันธุ์ให้ QTLs ด้านทานโรคไหม้ (qB11 และ qB111) ในการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับอีกต่อหนึ่ง โดยผสมกลับทั้งหมด 4 ครั้ง ในแต่ละรุ่นผสมกลับ จะคัดเลือกแบบ foreground selection เพื่อให้ได้ยีนเป้าหมาย (qB11 และ qB111) จนได้ลูกผสมกลับ BC_4F_1 จากนั้นคัดเลือกแบบ background selection ในข้าว BC_4F_1 และ BC_4F_2 เพื่อให้ได้จีโนมของข้าวพันธุ์ กข 6 มาอยู่ในข้าวสายพันธุ์คู่แฝดของ กข 6 ที่มี qB11 และ qB111 มากที่สุด โดยใช้เครื่องหมาย SSR จำนวน 45 เครื่องหมายพบว่าสามารถคัดเลือกข้าวสายพันธุ์คู่แฝด BC_4F_2 ที่มี qB11 และ qB111 และมีลักษณะเหมือนข้าวพันธุ์ กข 6 ได้ถึงร้อยละ 98 จากนั้นแบ่งกลุ่มประชากร BC_4F_2 ออกเป็น 4 กลุ่มตามจำนวนของ QTLs ที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ แล้วนำมาทดสอบความต้านทานโรคไหม้ โดยใช้เชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่เป็นตัวแทนจากกลุ่มเชื้อที่พบในนาข้าวที่ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจำนวน 10 ไอโซเลทพบว่าสายพันธุ์ข้าวที่มี QTLs ด้านทานโรคไหม้ทั้ง 2 ตำแหน่ง (qB11 และ qB111) มีความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ดีกว่าประชากร BC_4F_2 กลุ่มอื่นๆ ที่มี qB11 หรือ qB111 เพียงตำแหน่งเดียว จากนั้นจึงประเมินลักษณะสำคัญทางการเกษตรที่แปลงทดลองมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พบว่าลักษณะทางการเกษตรทั่วไป และคุณภาพทางกายภาพของข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงนั้นมีลักษณะคล้ายพันธุ์ กข 6 อย่างไรก็ตามข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงดังกล่าวยังมีลักษณะทางการเกษตรบางลักษณะ เช่น ความสูงต้น จำนวนหน่อ จำนวนเมล็ดต่อรวง ผลผลิต และเปอร์เซ็นต์ของข้าวที่

สีได้ แตกต่างจากพันธุ์ข้าว กข 6 ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากการเกิด linkage drag ระหว่าง qB11 หรือ qB111 ที่ควบคุมลักษณะดังกล่าว เมื่อนำข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงไปทดสอบผลผลิตในแหล่งปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 4 จังหวัด ได้แก่ สกลนคร หนองคาย อุบลราชธานี และขอนแก่น โดยทั่วไปพบว่า ข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงกลุ่มเผด กข 6 ด้านทานโรคไหม้สามารถปรับตัวได้ดีในนาข้าวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยโดยให้ผลผลิตโดยเฉลี่ยสูงกว่าพันธุ์ กข 6 จากนั้นได้มีการนำข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงกลุ่มเผด กข 6 ด้านทานโรคไหม้ไปปลูกทดสอบในแปลงเกษตรกรในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ในปี พ.ศ. 2550 พบว่า มีข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงกลุ่มเผด กข 6 ด้านทานโรคไหม้จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้รับการยอมรับจากเกษตรกรและมีการปลูกแทนข้าวพันธุ์ กข 6 ในแหล่งที่มีการระบาดของโรคไหม้

(2) การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการรวมยีนด้านทานโรคไหม้

การรวมยีนด้านทานโรคไหม้หลายๆ ยีนมาไว้ในข้าวพันธุ์เดียวเป็นแนวทางหนึ่งที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ด้านทานโรคไหม้อย่างยั่งยืน (durable resistance) เนื่องจากยีนด้านทานโรคไหม้แต่ละยีน มีความจำเพาะในการต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่แตกต่างกัน หากมีการรวมยีนด้านทานโรคไหม้หลายๆ

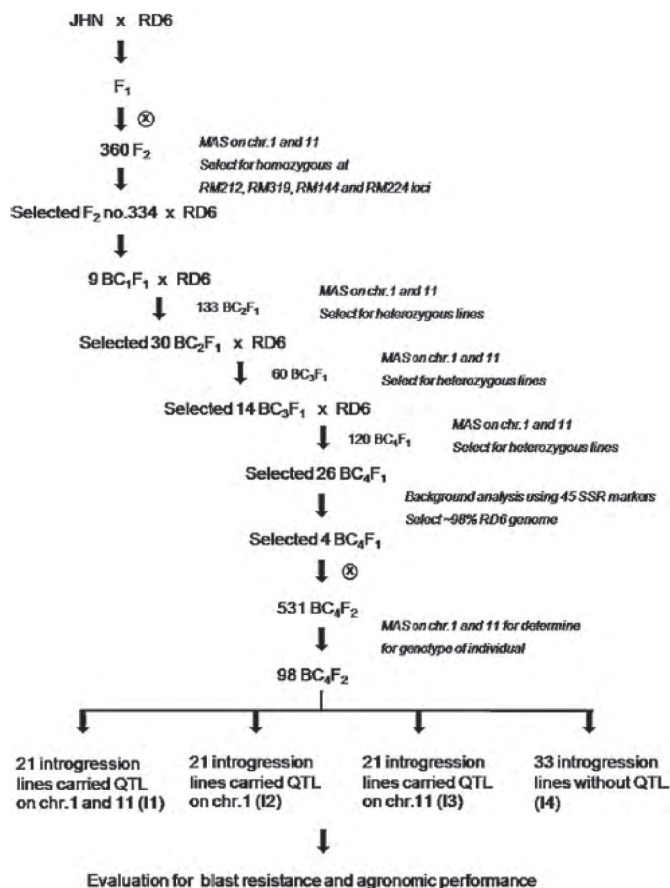


Figure 3 Marker-assisted backcross scheme showing the development of backcross-introgression lines, F₂ #334 was chosen as donor. MAS was applied to F₂, BC₂F₁, BC₃F₁, BC₄F₁ and BC₄F₂ progenies. The selected BC₄F₂ were self-pollinated and used for the QTL validation (Wongsaprom *et al.*, 2010)

ยีนจะทำให้ข้าวแสดงความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้เพิ่มขึ้นอันเป็นผลเนื่องมาจากการแสดงออกของยีนที่เสริมกัน (additive) (Koide *et al.*, 2010) นอกจากนี้พบว่าพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานมากกว่าสองยีนนั้น เชื่อที่จะเข้าทำลายมีการปรับตัวให้เข้าทำลายได้น้อยกว่าพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเพียงยีนเดียว ที่ผ่านมานี้ในอดีตนั้น พบว่าเป็นการยากที่จะรวมยีนต้านทานโรคหลายๆ ยีนโดยการปรับปรุงพันธุ์ข้าวแบบมาตรฐาน เนื่องจากข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงมีการแสดงฟีโนไทป์เหมือนกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบรุ่นลูก ว่าสายพันธุ์ใดมียีนต้านทานมากกว่าหนึ่งยีน ซึ่งการปฏิบัติมีความยุ่งยาก ต้องใช้แรงงานและค่าใช้จ่ายสูงและการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคไหม้ต้องอาศัยสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เพื่อให้ยีนดังกล่าวมีการแสดงออกของลักษณะต้านทาน และหากปัจจัยสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม ก็อาจทำให้นักปรับปรุงพันธุ์ตัดสินใจคัดเลือกผิดพลาดได้ ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ โดยการรวมยีนต้านทานโรคไหม้หลายๆยีนนั้นจะต้องใช้เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพ และมีความแม่นยำมาช่วยในการคัดเลือก

การนำเครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการรวมยีนต้านทานโรคไหม้ (pyramiding blast resistance genes) เป็นวิธีการช่วยในการคัดเลือกตรงตำแหน่งของยีน หรือ QTLs ที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ ทำให้สามารถคัดเลือกหลายๆ ยีนได้พร้อมกัน ในระยะที่ต้นข้าวยังเล็กอยู่ ซึ่งทำให้การปรับปรุงพันธุ์มีความรวดเร็วขึ้นต่อความสำเร็จของการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้โดยการรวมยีน ได้แก่ Hittamari *et al.* (2000) ได้รวมยีนต้านทานโรคไหม้ (gene pyramiding) จำนวน 3 ยีน ได้แก่ ยีน *Pi1*, *Piz-5* และ *Pita* ซึ่งเป็นยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง และมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 11, 6 และ 12 ตามลำดับ มาไว้ในสายพันธุ์ข้าวเพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ โดยมีข้าวสายพันธุ์คู่แฝด (near isogenic lines: NILs) ของ CO39 ที่มียีน

ต้านทานโรคไหม้ *Pi1*, *Piz-5* และ *Pita* ได้แก่ พันธุ์ C101LAC, C101A51 และ C101PKT ตามลำดับ เป็นแหล่งพันธุกรรม (donor parent) และใช้เครื่องหมาย RFLP ช่วยในการคัดเลือดยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ดังกล่าว โดยใช้คู่ผสมสองคู่ คือ C101LAC × C101A51 และ C101LAC × C101PKT และปล่อยให้ผสมตัวเองจนถึงประชากร F_2 แล้วคัดเลือกต้นข้าว (homozygous plant) ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ทั้งสองยีนคือ *Pi1*, *Piz-5* และ *Pi1*, *Pita* ตามลำดับจากนั้นนำประชากรที่ผ่านการคัดเลือกจากทั้งสองคู่มาผสมกัน แล้วปล่อยให้ผสมตัวเองจนได้ประชากร F_2 และคัดเลือกต้นข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ทั้งสามยีนแบบฮอโมไซกัส โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าว จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศฟิลิปปินส์ จำนวน 6 ไอโซเลต พบว่าสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ทั้ง 3 ยีน แสดงความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์

นอกจากนี้ Koide *et al.* (2010) ได้รายงานการรวมยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง *Pish* และ *Pib* ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 1 และ 2 ตามลำดับ จากข้าวสายพันธุ์คู่แฝด (NILs) ของข้าวพันธุ์ CO39 ได้แก่ สายพันธุ์ IRBLsh-S[CO] และ IRBLb-W[CO] ตามลำดับ โดยนำข้าวทั้งสองสายพันธุ์มาผสมกัน แล้วปล่อยให้ผสมตัวเองจนถึงประชากร F_3 จากนั้นใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกต้นข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ทั้งสองยีนแบบฮอโมไซกัส แล้วทดสอบความต้านทานโดยการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่พบในประเทศฟิลิปปินส์จำนวน 16 ไอโซเลต พบว่าสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ทั้ง 2 ยีน สามารถต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้ดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่และแม่

สำหรับในประเทศไทย Suwannal *et al.* (2009) ได้รวมยีนต้านทานโรคไหม้จากข้าวสายพันธุ์คู่แฝด 6 (RD6-NILs) ที่มี QTLs ต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมที่ 1 และ 11 (กข 6 × เจ้าหอมนิล) กับ ข้าว

สายพันธุ์คู่แฝด กข 6 (RD6-NILs) ที่มี QTLs ด้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมที่ 2 และ 12 (กข 6 × P0489) ได้ประชากร F_1 จากนั้นผสมกลับไปยัง กข 6 จำนวน 2 ครั้ง และผสมตัวเองอีก 2 ครั้ง จนได้ประชากร $BC_2F_{2:3}$ ในแต่ละรุ่นของการผสมกลับ (ประชากร BC_1F_1 , BC_2F_1 และ BC_2F_2) แล้วใช้เครื่องหมายโมเลกุลซึ่งอยู่ใกล้ชิดกับ QTLs ควบคุมลักษณะด้านทานโรคไหม้ดังกล่าวมาช่วยในการคัดเลือก (Table 2) จนได้ลูกผสม $BC_2F_{2:3}$ ที่มี QTLs ควบคุมลักษณะด้านทานโรคไหม้ทั้ง 4 ตำแหน่ง (qB11, qB11.1, qB12 และ qB12.2) จากนั้นทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ในข้าวสายพันธุ์คู่แฝด กข 6 ที่มีการรวมยีนดังกล่าว โดยใช้วิธี artificial inoculation ใช้เชื้อที่เก็บรวบรวมจากแหล่งปลูกข้าวที่มีการระบาดของโรคไหม้ในประเทศไทย มาทดสอบทั้งหมด 8 ไอโซเลต พบว่าสายพันธุ์ $BC_2F_{2:3}$ ที่มีการรวม QTLs ด้านทานโรคไหม้ทั้งสี่ตำแหน่งนี้ มีระดับความต้านทานโรคไหม้สูงกว่าข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิลและ P0489 ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์ให้ในการผสมแต่ละคู่ แสดงให้เห็นว่าข้าวสายพันธุ์คู่แฝด กข 6 ที่มี QTLs ควบคุมลักษณะด้านทานโรคไหม้นี้มีประสิทธิภาพในการต้านทานโรคไหม้ได้ดีกว่าข้าวพันธุ์ กข 6

จากตัวอย่างงานวิจัยดังกล่าว แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการรวมยีนด้านทานโรคไหม้ เพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานแบบกว้างและยั่งยืน เพิ่มความแม่นยำของการคัดเลือก สามารถคัดเลือกลักษณะด้านทานโรคจากเชื้อสาเหตุที่หลากหลายได้พร้อมกัน ขณะที่ต้นยังเล็กอยู่ และลดค่าใช้จ่ายและแรงงานในการทดสอบความสามารถในการต้านทานเชื้อสาเหตุโรคไหม้

(3) การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกในลูกผสมชั่วแรกๆ

การนำเครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการคัดเลือกนั้น สามารถทำได้ในทุกๆระยะของการปรับปรุงพันธุ์ แต่ที่ให้ประโยชน์สูงสุด คือ การช่วยคัดเลือก

ในลูกผสมชั่วแรกๆ (F_2 และ F_3) เพราะสามารถกำจัดต้นที่มีลักษณะที่ไม่ต้องการ ให้เหลือเฉพาะต้นที่มียีนเป้าหมายเพียงไม่กี่สายพันธุ์ ซึ่งช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์สามารถดูแลสายพันธุ์ดังกล่าวได้ใกล้ชิดในรุ่นต่อไป นอกจากนี้ยังช่วยให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการประเมินลักษณะอื่นๆ (โดยเฉพาะการใช้พื้นที่แปลงทดสอบ) โดยนักปรับปรุงพันธุ์สามารถมุ่งเน้นเฉพาะสายพันธุ์ปรับปรุงเพียงไม่กี่สายพันธุ์ (few breeding lines) เท่านั้น

ตัวอย่างการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกในลูกผสมชั่วแรกๆ ได้แก่ การพัฒนา

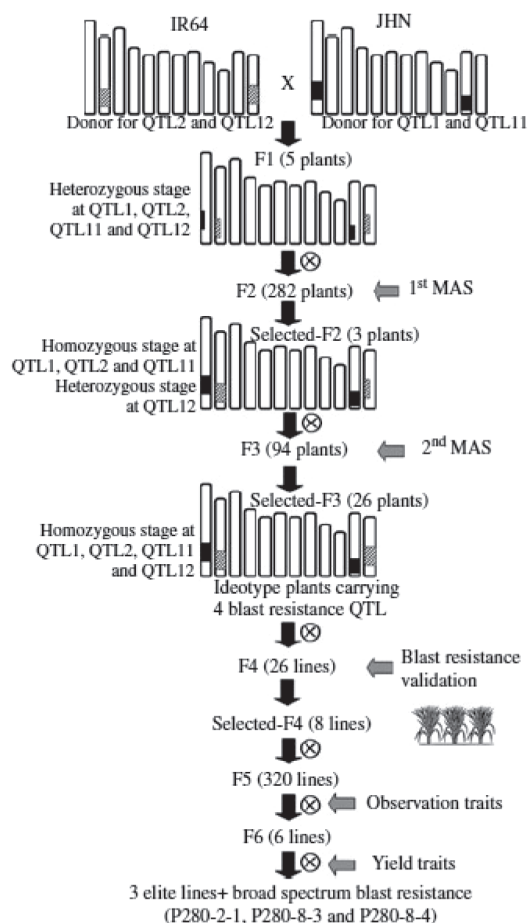


Figure 4 The breeding scheme for pyramiding 4 targets blast resistance QTLs from IR64 and JHN rice varieties (Sreewongchai et al., 2010)

สายพันธุ์ข้าวต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยแบบกว้างโดย Sreewongchai *et al.* (2010) โดยการผสมพันธุ์ข้าว IR64 และ เจ้าหอมนิล ซึ่งมี QTLs ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมที่ 2 และ 12 และโครโมโซมที่ 1 และ 11 ตามลำดับ โดยใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบสืบประวัติ (pedigree method) และใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้ชิดกับตำแหน่ง QTLs ดังกล่าวมาช่วยในการคัดเลือกในประชากร F_2 และ F_3 (Table 2) จากประชากร F_2 จำนวน 282 ต้น สามารถคัดเลือกต้นที่มี QTLs ดังกล่าว ได้จำนวน 94 ต้น จากนั้นนำต้นที่ผ่านการคัดเลือกมาปลูกต่อเป็นประชากร F_3 แล้วคัดเลือก QTLs ดังกล่าวอีกครั้ง จนได้ประชากร F_4 ต้นที่เป็นฮอโมไซกัส และมี QTLs ทั้ง 4 ตำแหน่ง จำนวน 26 ต้น นำมาประเมินความต้านทานโรคไหม้ โดยใช้เชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่รวบรวมได้จากที่ต่างๆ ในประเทศไทย จำนวน 11 ไอโซเลต แบ่งเป็น เชื้อที่ทำให้ข้าวเจ้า

หอมนิลเป็นโรคจำนวน 1 ไอโซเลต (B1-2) เชื้อที่ทำให้ IR64 เป็นโรคจำนวน 3 ไอโซเลต (THL84, THL949 และ THL1003) เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอย่างรุนแรงในข้าวขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 5 ไอโซเลต (THL191, THL212, THL653, THL699 และ THL838) และเชื้อที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในข้าวขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 2 ไอโซเลต (TH12 และ TH16) พบว่า สายพันธุ์ข้าว family P280 ในประชากร F_4 จำนวน 8 สายพันธุ์ (subfamily) มี QTLs ด้านทานโรคไหม้จากพันธุ์ IR64 (qB12 และ qB112) และพันธุ์เจ้าหอมนิล (qB11 และ qB111) สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้ทั้ง 11 ไอโซเลต จากนั้นปล่อยให้ผสมตัวเองได้ประชากร F_5 แล้วประเมินลักษณะการเกษตร สามารถคัดเลือกได้ 6 สายพันธุ์ แล้วปล่อยให้ผสมตัวเองได้ประชากร F_6 และนำไปทดสอบผลผลิตโดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ IR64, เจ้าหอมนิล, ชัยนาท 1, ปทุมธานี 1 และสุพรรณบุรี 1 พบว่ามีข้าวพันธุ์ปรับปรุงจำนวน 3

Table 2 Example of marker assisted selection for rice blast improvement

Gene	Donor	Chromosome	Markers	Crosses	References
<i>Pi1</i>	C101LAC	11	Npb181, RZ536	C101LAC / C101A51 //	Hittalmari
<i>Piz-5</i>	C101A51	6	RZ64, RZ612, RG456, RG64-SAP	C101LAC / C101PKT	<i>et al.</i> , 2000
<i>Pi-ta</i>	C101PKT	12	RG869, RZ397, RG241		
<i>Pish</i>	IRBLsh-S [CO]	1	RM7419, RM1268, RM6648, RM5811	IRBLsh-S[CO] / IRBLb-W[CO]	Koide <i>et al.</i> , 2010
<i>Pib</i>	IRBLb-W[CO]	2	RM208, Pibdom		
QTLs	IR64	2	RM208	IR64 / Jao Hom Nin	Sreewongchai <i>et al.</i> , 2010
		12	RM179		
QTLs	Jao Hom Nin	1	RM212, RM319		
		11	RM144, RM139		
QTLs	Jao Hom Nin	1	RM319, RM212	RD6/Jao Hom Nin	Wongsaprom <i>et al.</i> , 2010
		11	RM224, RM114		
QTLs	RD6 / P0489	2	RM48, RM207	RD6 / P0489 //	Suwannual <i>et al.</i> , 2009
		12	RM313, RM277	RD6/ Jao Hom Nin	
QTLs	RD6/ Jao Hom Nin	1	RM319, RM212		
		11	RM224, RM114		

สายพันธุ์ ที่ให้ผลผลิตสูงกว่าข้าวพันธุ์ตรวจสอบ ได้แก่ P280-2-1, P280-8-3 และ P280-8-4

จากตัวอย่างข้างต้นแสดงให้เห็นถึงความสำเร็จของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดสำคัญในการยอมรับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในงานปรับปรุงพันธุ์พืช คือ ค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง ซึ่งการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกในการผสมกลับในระยะต้นนั้นพบว่า ค่าใช้จ่ายเริ่มต้นในการใช้เครื่องหมายโมเลกุลจะสูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐาน แต่การใช้เครื่องหมายโมเลกุลจะช่วยลดระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ ทำให้ได้พันธุ์ใหม่เร็วขึ้น และได้ผลประโยชน์ตอบแทนที่มากกว่าในระยะยาว นอกจากนี้ ความน่าเชื่อถือของเครื่องหมายโมเลกุลที่ควบคุมลักษณะเป้าหมาย ก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จ ของการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ ดังนั้น จึงควรมีการตรวจสอบความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าว ก่อนที่จะนำมาใช้ช่วยในการพัฒนาสายพันธุ์ข้าว

สรุป

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้เป็นวิธีการป้องกันกำจัดโรคไหม้ที่มีประสิทธิภาพที่สุด การนำเครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการคัดเลือก (MAS) นั้น นับว่าเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพ มีความแม่นยำสูง ช่วยย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ และลดโอกาสการได้ลักษณะที่ไม่ต้องการซึ่งติดมากับลักษณะที่ต้องการคัดเลือก (linkage drag) การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้อย่างมีประสิทธิภาพ ควรมีการรวมยีนต้านทานโรคไหม้หลายๆ ยีน และ/หรือ ยีนต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่หลากหลายสายพันธุ์ ทั้งนี้เพื่อให้ข้าวพันธุ์ปรับปรุงดังกล่าวมีความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ได้อย่างยั่งยืน

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2546. ข้าวและธัญพืชเมืองหนาว พันธุ์ดี. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, ชุมชน การเกษตรและสหกรณ์แห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.
- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2553. สรุปข่าวประจำวัน ที่ 24 กันยายน 2553. <http://pr.agritech.doae.go.th/summarynew/Sep2010/summarynews24-09-53.pdf> (29 พฤศจิกายน 2553).
- ชาญณรงค์ ดวงสะอาด. 2553. การได้ตอบทาง นิเวศวิทยา. ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวิน ทรีย์แห่งชาติ. <http://www.thaibiocontrol.org/main.php?filename=topic1> (17 กันยายน 2553).
- ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ และสุริพร เกตุงาม. 2552. โรคไหม้ในข้าวและสถานการณ์ปัจจุบันของ งานวิจัยด้านยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าว. *แก่น เกษตร*. 37: 69-78.
- ทัศนีย์ สงวนสง. 2540. เอกสารวิชาการ บทบาทของ พันธุกรรมต้านทานโรคและแมลงกับการปรับปรุง พันธุ์ข้าวของไทย. ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก, สถาบันวิจัยข้าว, กรมวิชาการเกษตร.
- ดวงกมล เริ่มตระกูล. 2550. ข้าว กข33 (หอมอุบล 80). <http://www.riceproduct.org/index.php?option=com> (25 สิงหาคม 2553).
- ธีรยุทธ คูจินดา. 2546. การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้ เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ. ใน: *สัมมนาวิชาการ พันธุศาสตร์ ครั้งที่ 13*. วันที่ 5-7 มิถุนายน 2546. มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก. หน้า 25-27.
- พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ พะยอม โคเบลล์ อัจฉรา พร ณ ลำปาง เนินพลับ ถนอมจิตร ฤทธิมนตรี กุลชนา เกศสุวรรณ ชนสิริน กลิ่นมณี และสงวน เทียงติฤทธิ์. 2550. การตรวจสอบความหลากหลาย ของสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ของข้าวใน ประเทศไทย. *วารสารวิชาการข้าว*. 1: 52-63.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. เดือนเกษตรกร ะวังโรคไหม้ควรระวังระบาดช่วงหน้าหนาว.

- http://www.oae.go.th/ewt_news.php?nid=9407&filename=news (20 ธันวาคม 2553).
- อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ และพูนศักดิ์ เมฆวัฒนา กาญจน์. 2552. ความหลากหลายของ pathotype ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว ในปี 2550/51 และยืนต้นทานกว้างขวางที่เป็นประโยชน์ในภาคเหนือตอนล่าง. ใน: *การประชุมข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2552 ณ โรงแรม ซิปรีทจอมเทียน*. ชลบุรี. หน้า 208-219.
- Babu, R., Nair, S.K., Prasanna, B.M. and Gupta, H.S. 2004. Integrating marker-assisted selection in crop breeding—prospects and challenges. *Curr Sci* 87: 607-612.
- Babujee, L. and Gnanamanickam, S.S. 2000. Molecular tools for characterization of rice blast pathogen (*Magnaporthe grisea*) population and molecular marker-assisted breeding for disease resistance. *Curr Sci* 78: 248-257.
- Ballini, E., Morel, J.B., Droc, G., Price, A., Courtois, B., Notteghem, J.L. and Tharreau, D. 2008. A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 859-868.
- Chen, D., Zeigler, R.S., Ahn, S.W., and Nelson, R.J. 1996. Phenotypic characterization of the rice blast resistance gene *Pi2(t)*. *Rice Plant Dis* 80: 52-56.
- Chen, D.H., Vina, M., Inukai, T., Mackill, D.J., Ronald, P.C., and Nelson, R.J. 1999. Molecular mapping of the blast resistance gene, *Pi44(t)*, in a line derived from a durably resistant rice cultivar. *Theor Appl Genet* 98: 1046-1053.
- Collard, B.C.Y. and Mackill, D.J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil Trans R Soc B* 363: 557-572.
- Deng, Y., Zhu, X., Xu, J., Chen, H. and He, Z. 2009. Map-based cloning and breeding application of a broad-spectrum resistance gene *Pigm* to rice blast. In: G. L. Wang and B. Valent (eds) *Advance in Genetic, Genomic and Control of Rice Blast Disease*. Springer, New York. pp.161-171.
- Disthaporn, S. 1994. Current rice blast epidemics and their management in Thailand. In: R.S. Zeigler, S.A. Leong, and P.S. Teng (eds) *Rice Blast Disease*. CAB Int., Wallingford, U.K. pp. 333-442.
- Frisch, M., Bohn, M. and Melchinger, A.E. 1999. Minimum sample size and optimal positioning of flanking markers in marker-assisted backcrossing for transfer of a target gene. *Crop Sci* 39: 967-975.
- Fujita, D., Ebron, L.A., Kobayashi, N. and Fukuta, Y. 2009. DNA marker analysis of blast resistance genes *Pi-b* and *Pi-ta* in IRRI-bred rice varieties comparing with gene estimation by a differential system. In: G.L. Wang and B. Valent (eds) *Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease*. Springer, New York. pp. 315-324.
- Hayashi, K., Yoshida, H. and Ashikawa, I. 2006. Development of PCR-based allele specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance gene. *Theor Appl Genet* 113: 251-260.
- Hittamari, S., Parco, A., Mew, T.V., Zeigler, R.S. and Huang, N. 2000. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice. *Theor Appl Genet* 100: 1121-1128.
- Hospital, F. and Charcosset, A. 1997. Marker-assisted introgression of quantitative trait loci. *Genetics* 147: 1469-1485.
- Hospital, F. 2005. Selection in backcross programmes. *Phil Trans R Soc B* 360: 1503-1511.
- Jia, Y., Wang, Z. and Singh, P. 2002 Development

- of dominant rice blast *Pi-ta* resistance gene markers. *Crop Sci* 42: 2145-2149.
- Joshi, B.K., Bimb, H.P., Parajuli, G. and Chaudhary, B. 2009. Molecular tagging, allele mining and marker aided breeding for blast resistance in rice. *BSN E-Bulletin* 1: 1-23.
- Koide, Y., Kobayashi, N., Xu, D. and Fukuta, Y. 2009. Resistance gene and selection DNA marker for blast disease in rice (*Oryza sativa* L.). *Jpn Agr Res Q* 43: 255-280.
- Koide, Y., Kawasaki, A., Yanoria, M. J. T., Hairmansis, A., Nguyet, N. T. M., Bigirimana, J., Fujita, D., Kobayashi, N. and Fukuta, Y. 2010. Development of pyramided lines with two resistance genes, *Pish* and *Pib*, for blast disease (*Magnaporthe oryzae* B. Couch) in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Breeding* 129: 670-675.
- Liu, G., Lu, G., Zen, L., and Wang, G.L. 2002. Two broad-spectrum blast resistance genes, *Pi9(t)* and *Pi2(t)*, are physically linked on rice chromosome 6. *Mol Genet Genomics* 267: 472-480.
- Noenplab, A., Vanavichit, A., Toojinda, T., Sirithunya, P., Tragoonrung, S., Sriprakhon, S. and Vongsaprom, C. 2006. QTL mapping for leaf and neck blast resistance in Khao Dawk Mali 105 and Jao Hom Nin recombinant inbred lines. *Sci Asia* 32: 133-142.
- Prasad, M.S., Kanthi, B.A., Balachandran, S.M., Seshumadhav, M., Mohan, K.M. and Viraktamath, B.C. 2009. Molecular mapping of rice blast resistance gene *Pi-1(t)* in the elite indica variety Samba mahsuri. *World J Microbiol Biotechnol* 25: 1765-1769.
- Qu, S., Liu, G., Zhou, B., Bellizzi, M., Zeng, L., Dai, L., Han, B. and Wang, G.L. 2006. The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice. *Genetics* 172: 1901-1914.
- Sharma, T.R., Rai, A.K., Gupta, S.K., and Singh, N.K. 2010. Broad-spectrum blast resistance gene *Pi-k^h* cloned from rice line tetep designated as *Pi54*. *J Plant Biochem Biotechnol* 19: 87-89.
- Sreewongchai T., Toojinda, T., Thanintorn, N., Kosawang, C., Vanavichit, A., Tharreau, D. and Sirithunya, P. 2010. Development of elite indica rice lines with wide spectrum of resistance to Thai blast isolates by pyramiding multiple resistance QTLs. *Plant Breeding* 129: 176-180.
- Suwannat T., Saksirirat W., Toojinda T., Sirithunya P., and Sanitchon J. 2009. Gene pyramiding through marker assisted selection for increasing blast resistance in the rice cultivar RD6. In: 35th Congress on Science and Technology of Thailand. 15-17 October 2009. Burapha University, Chonburi, Thailand. pp 1-6.
- Visscher, P.M., Haley, C.S., and Thompson, R. 1996. Marker-assisted introgression in backcross breeding program. *Genetics* 144: 1923-1932.
- Wang, Z.X., Yano, M., Yamanouchi, U., Iwamoto, M., Monna, L., Hayasaka, H., Katayose, Y. and Sasaki, T. 1999. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J* 19: 55-66.
- Wongsaprom, C., Sirithunya, P., Vanavichit, A., Pantuwan, G., Jongdee, B., Sidhiwong, N., Siangliw, J.L., and Toojinda, T. 2010. Two introgressed quantitative trait loci confer a broad-spectrum resistance to blast disease in the genetic back ground of the cultivar RD6, a Thai glutinous jasmine rice. *Field Crop Res* 119: 245-251.
- Zeigler, R.S., Leong, S.A., and Teng, P.S., 1994. *Rice Blast Disease*. Cab Int., Wallingford, U.K.