

การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวปรับปรุง ราตุฮีเนติ/ขาวดอกมะลิ 105
และพันธุ์ชัยนาท 1 รุ่น BC₄F₁ ที่มียืนต้านทานเพลี้ยกระโดด
สีน้ำตาลแบบ *Bph3* โดยเทคนิคการคัดเลือก
ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย

Development of BC₄F₁ Rice Line of Rathu Heenati/KDML105
and Chai Nat 1 Carrying *Bph3* Resistant Gene Against
Brown Planthopper by Marker Assisted Selection

เจตน์ คชฤกษ์^{1/} วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ^{2/*} สุรเดช พลวิสุทธิ^{1/} และ ศิริพร กออินทร์ศักดิ์^{3/}
Jate Kotcharerk^{1/}, Weerathep Pongprasert^{2/*}, Suradet Palawisut^{1/} and Siriporn Korintsak^{3/}

Abstract: Currently, the researches on improvement of rice varieties to resist the infestation of brown plant hopper have been in many steps of progress such as resistant gene discovery, gene transformation to the rice target variety, screening process, certified process and the *Bph3* resistant gene transferred from Rathu Heenati/KDML105 to Chai Nat 1 was also in developing stage. F₁ lines from those parents carrying *Bph3* gene were already produced and the backcross process needed to be carried out to increase the original traits of Chai Nat 1 but *Bph3* resistant gene was still retained in the improved line. Therefore, the development of

^{1/}ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก อ. วังทอง จ. พิษณุโลก 65000

^{2/}ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000

^{3/}หน่วยค้นหาและใช้ประโยชน์จากยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

^{1/}Phitsanulok Rice Research Center, Wangtong, Phitsanulok 65000, Thailand

^{2/}Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment Naresuan University, Muang,
Phitsanulok 65000, Thailand

^{3/}Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology and Kasetsart University, Kamphaeng
Saen, Nakhon Pathom 73140, Thailand

* Corresponding author

BC₄F₁ line of Rathu Heenati/KDML105 and Chai Nat 1 carrying *Bph3* resistant gene against brown planthopper by marker assisted selection was carried out. The F₁ and backcross lines were backcrossed with Chai Nat 1 for 4 times to produce the series of backcross lines from BC₁F₁, BC₂F₁, BC₃F₁ and BC₄F₁. The genotype of the backcross lines produced in each time of backcrossing was screened by molecular markers RM170 and RM190 and also their phenotypes of those were evaluated by visualization. The BC₄F₁ improved lines carried heterozygous genotype of *Bph3* with the high amount of original traits of Chai Nat 1 (96.875% theoretically) were collected at 20 plants after the 4th backcrossing.

Keywords: Rice (*Oryza sativa indica*), brown planthopper, resistant gene, *Bph3*, backcrossing

บทคัดย่อ: การพัฒนาข้าวให้ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลนั้น มีการศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวาง ตั้งแต่การค้นหายีนต้านทาน การถ่ายโอนยีนเข้าสู่พืชเป้าหมาย และการคัดเลือกสายพันธุ์ลูกผสมที่เกิดขึ้นให้มีคุณลักษณะตรงตามต้องการ รวมถึงการรับรองสายพันธุ์ และกระบวนการอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง การพัฒนาข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ให้ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ดำเนินการถ่ายโอนยีนต้านทานชนิด *Bph3* จากข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงราตูลีเนติ/ขาวดอกมะลิ 105 สู่อข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 กำลังอยู่ในขั้นการพัฒนาเช่นกัน ข้าวลูกผสม F₁ ของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ซึ่งมียีน *Bph3* ได้รับการพัฒนาขึ้นสำเร็จ และกำลังเข้าสู่ขั้นตอนการดำเนินการปรับปรุงคุณภาพให้ใกล้เคียงกับพันธุ์ชัยนาท 1 พร้อมกับยังคงคุณลักษณะต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่เกิดจากยีน *Bph3* ไว้ โดยการใช้วิธีการปรับปรุงแบบผสมกลับและเทคนิคการใช้โมเลกุลเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือก โดยสร้างสายพันธุ์ปรับปรุงจำนวน 4 รุ่น คือ BC₁F₁, BC₂F₁, BC₃F₁ และ BC₄F₁ การคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมของยีน *Bph3* แบบ heterozygous ของลูกผสมสายพันธุ์ปรับปรุงที่เกิดขึ้นในแต่ละรุ่นโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุลด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย 2 ชนิด คือ RM170 และ RM190 ร่วมกับการคัดเลือกลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกับพันธุ์ชัยนาท 1 ด้วยสายตา จากการผสมกลับจำนวน 4 ครั้ง สามารถสร้างลูกผสมสายพันธุ์ปรับปรุงรุ่นที่ 4 (BC₄F₁) ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ heterozygous ของยีน *Bph3* และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกับพันธุ์ชัยนาท 1 ทางพหุสรีรวิทยา ร้อยละ 96.875 จำนวน 20 ต้น

คำสำคัญ: ข้าว เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ยีนความต้านทานชนิด *Bph3* การผสมกลับ

บทนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญเป็นลำดับต้น ๆ ของประเทศ มีการปลูกครอบคลุมพื้นที่เกษตรกรรมส่วนใหญ่ของประเทศ พันธุ์ข้าวหลักที่สำคัญมีหลากหลายพันธุ์ และในจำนวนนั้น คือ ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์ที่นิยมปลูกของเกษตรกรในเขตภาคเหนือตอนล่างและภาคกลางโดยทั่วไป เนื่องจากมีคุณสมบัติตรงตามความต้องการของตลาด ให้ผลผลิตสูง และที่สำคัญคือ ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

(*Nilaparvata lugens* (Stål)) (= *Delphax oryzae*) (Homoptera: Delphacidae) ซึ่งแมลงศัตรูชนิดนี้จัดว่ามีความสำคัญต่อผลผลิตข้าวมากที่สุดในเอเชีย เนื่องจากเข้าทำลายข้าวโดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวทำให้ข้าวเหี่ยวแห้ง และเกิดอาการไหม้ตาย (hopperburn) และเป็นแมลงพาหะถ่ายทอดโรคเขียวเตี้ย และโรคใบหงิกซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสมาสู่ข้าว (Khush and Barar, 1991) ทำให้ผลผลิตข้าวลดลงไม่คุ้มค่าการลงทุน พบระบาดมากในพื้นที่ที่มีการชลประทานดี สามารถปลูกข้าวได้ตลอดทั้งปี เช่น พื้นที่ปลูกข้าวเขตที่ราบภาคเหนือ

ตอนล่าง และภาคกลาง แมลงสามารถอยู่ข้ามฤดูได้โดยอาศัยในวัชพืชที่เป็นเครือญาติกับข้าวเช่น ข้าวป่า และหญ้าไซ เป็นต้น (สุวัฒน์, 2544) แม้ว่าข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 มีคุณสมบัติที่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลซึ่งได้รับการถ่ายทอดลักษณะต้านทานมาจากข้าวพันธุ์ บาบาวี (Babawe) อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันคุณลักษณะดังกล่าวลดลงเป็นอย่างมาก ทั้งนี้เป็นผลมาจากการที่ข้าวพันธุ์นี้ได้รับความนิยมปลูกกันอย่างแพร่หลายต่อเนื่อง ครอบคลุมพื้นที่ส่วนใหญ่ของแหล่งพื้นที่ปลูกข้าวในเขตชลประทานของประเทศเป็นระยะเวลานาน ทำให้เกิดแรงกดดันต่อแมลงและส่งผลทำให้แมลงสามารถพัฒนาศักยภาพจนสามารถเข้าทำลายข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ได้ในที่สุด ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ให้มีคุณลักษณะต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น จึงเป็นแนวทางที่สามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ ประกอบกับปัจจุบันการค้นหายืนต้านทานต่อเพลี้ยดังกล่าวได้รับการพัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล ทำให้การวิเคราะห์ตำแหน่งของยีน และการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดต่าง ๆ มีความแม่นยำมากขึ้น (Morgante and Olivieri, 1993; Paran and Michelmore, 1993; Lafitte *et al.*, 2004; Pflieger *et al.*, 1999) สามารถใช้ในการติดตามผลการถ่ายทอดของยีนนั้น ๆ จากรุ่นสู่รุ่นของลูกผสมที่เกิดขึ้นในแต่ละขั้นตอนของการปรับปรุงพันธุ์ และสามารถลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลงได้เป็นอย่างมาก ซึ่งเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย (Vanavichit *et al.*, 2003; Yadav *et al.*, 1997; Xiao *et al.*, 1996; Rongwen *et al.*, 1995; Cho *et al.*, 1994)

ยืนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลแบบ *Bph3* พบในข้าวพันธุ์ราตูลีเนติ แสดงความต้านทานแบบ broad spectrum resistance และมีระดับความต้านทานสูงมากในทุกชีวิตของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ซึ่งได้รับการทดสอบในสภาพจริงในหลายประเทศในแถบเอเชีย เช่น อินเดีย พิลิปปินส์ เวียดนาม จีน บังคลาเทศ ลาว และไทย เป็นต้น (Jirin *et al.*, 2007) ส่งผลทำให้ยืนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลแบบ *Bph3* นี้มีบทบาทสำคัญมากต่อการพัฒนาพันธุ์ข้าวสายพันธุ์หลักในประเทศต่าง ๆ ให้มีระดับความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดด

สีน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการถ่ายทอดยีนดังกล่าวสู่ข้าวพันธุ์หลักของประเทศไทย เช่น ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เพื่อปรับปรุงข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ให้ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้สูงขึ้นและมีประสิทธิภาพมากขึ้น จากการสืบค้นหาโมเลกุลเครื่องหมายและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ระหว่างข้าวคู่ผสม PTB 33/กข 6 และ ราตูลีเนติ/ขาวดอกมะลิ 105 พบว่ายืนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Bph3* ตั้งอยู่บนโครโมโซม 6 (Jairin *et al.*, 2005) และมีความเกี่ยวพันกับยืนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิด *bph4* มาก (Kawakuchi *et al.*, 2001) และผลจากการคัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ Simple Sequence Repeat (SSR) ของยืนต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิด *Bph3* ของข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง ราตูลีเนติ/ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ชัยนาท 1 จำนวน 7 ชนิด พบว่ามีโมเลกุลเครื่องหมาย RM 170 และ RM 190 มีความเหมาะสมและมีศักยภาพในการจำแนกความแตกต่างของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ได้เป็นอย่างดี (สุรเดช และคณะ, 2548) ดังนั้นโมเลกุลเครื่องหมายดังกล่าวจึงมีความเหมาะสมในการติดตามการถ่ายยืนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิด *Bph3* จากข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง ราตูลีเนติ/ขาวดอกมะลิ 105 สู่ ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 จนถึงรุ่น backcross ที่ 4 ของลูกผสมชั่วที่ 1 (BC₄F₁) โดยเทคนิค Molecular Assisted Selection (MAS) เพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวชัยนาท 1 ให้มีคุณลักษณะที่ต้านทานสูงขึ้นต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าว

ข้าวสายพันธุ์ผู้ให้ที่มียืนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิด *Bph3* คือ ข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง BC₂F₃ ของราตูลีเนติ/ขาวดอกมะลิ 105 (Jairin *et al.*, 2005) แทนสายพันธุ์ ราตูลีเนติ ดังเดิม เพื่อลดขั้นตอนในการคัดเลือกลูกผสมที่เกิดขึ้น เนื่องจากพันธุ์ ราตูลีเนติ นั้นมีคุณลักษณะหลายชนิดที่ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด และสายพันธุ์ปรับปรุงที่เลือกนี้ได้รับการคัดเลือกและปรับปรุงให้มีความเหมาะสมและมีความใกล้ชิดกับข้าว

พันธุ์ข้าวดอกมะลิซึ่งเป็นต้นนิยมของตลาด และมียืนด้านทานชนิดดังกล่าวปรากฏอยู่ในสายพันธุ์แล้ว ทำให้สามารถลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ให้รวดเร็วขึ้น ส่วนข้าวสายพันธุ์ผู้รับคือ ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1

ดีเอ็นเอโมเลกุลเครื่องหมายสำหรับการวิเคราะห์และคัดเลือกลูกผสม

โมเลกุลเครื่องหมาย SSR ที่ใช้ในการติดตามการถ่ายยีนด้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิด *Bph3* ของลูกผสมที่เกิดขึ้นจากกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ระหว่างข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง ราตูลีเนติ/ข้าวดอกมะลิ 105 กับ ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ในการศึกษาครั้งนี้ คือ RM 170 และ RM 190 ซึ่งได้รับการตรวจสอบกับข้าวสายพันธุ์ผู้ให้ คือ ข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงราตูลีเนติ/ข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวสายพันธุ์ผู้รับ คือ ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 แล้วว่ามีขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphism) และสามารถนำมาใช้ใน MAS ได้ โดย RM 170 ตั้งอยู่ห่างจาก เซ็นโตเมียร์ของโครโมโซม 6 เท่ากับ 10.7-11.5 cM มีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ระหว่างข้าวผู้ให้และผู้รับเท่ากับ 115 และ 125 bp ตามลำดับ ส่วน RM190 ตั้งอยู่ห่างจาก เซ็นโตเมียร์ของโครโมโซม 6 เท่ากับ 8.2 cM มีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ระหว่างข้าวผู้ให้และผู้รับเท่ากับ 190 และ 180 bp ตามลำดับ (สุรเดชและคณะ, 2548)

การสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ระหว่าง ข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง ราตูลีเนติ/ข้าวดอกมะลิ 105 กับ ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และการสร้างลูกผสมของสายพันธุ์ปรับปรุงโดยการผสมกลับ (backcross)

สร้างลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ระหว่าง ข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง ราตูลีเนติ/ข้าวดอกมะลิ 105 กับ ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และทำการคัดเลือกลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยสายตา นำลูกผสมชั่วที่หนึ่งที่ได้รับนี้เป็นผู้ให้เพื่อผสมกลับ (backcross) กับข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ซึ่งเป็นผู้รับได้ลูกผสมที่เป็นสายพันธุ์ปรับปรุง BC_1F_1 คัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเป็น heterozygous

โดยเทคนิค MAS และทำการคัดเลือกลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยสายตา ดำเนินการผสมกลับและคัดเลือกเช่นนี้จนถึง BC_4F_1 (ภาพที่ 1)

การติดตามและคัดเลือกสายพันธุ์ปรับปรุงโดย MAS technique

เพาะเมล็ดข้าวพันธุ์ปรับปรุง เมื่อข้าวอายุได้ 7 วัน เก็บตัวอย่างสด และนำมาสกัด ดีเอ็นเอ จนเข้าสู่ระยะต้นกล้า โดยใช้ ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (DNA Traps Kits, หน่วยค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, <http://dnatec.kps.ku.ac.th> ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้โดย spectrophotometer และ agarose gel-electrophoresis จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเครื่องหมาย โดย polymerase chain reaction, PCR ด้วยเครื่อง thermocycler, MJ Research (PTC 100) ส่วนผสมของ PCR ในแต่ละปฏิกิริยาที่มีปริมาตร 10 μ L ประกอบด้วย ดีเอ็นเอข้าวแต่ละสายพันธุ์ 40 ng; dNTP (Bio 101) 200 μ M, primer ทั้ง forward และ reverse ของดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละชนิดที่คัดเลือกแล้วข้างต้นสายละ 0.2 μ M; $MgCl_2$ 3 mM, Taq DNA polymerase 0.2 Unit และ 1X PCR buffer นำส่วนผสมที่ได้ใส่เครื่องเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ โดยมีรายละเอียดของอุณหภูมิและระยะเวลาในแต่ละรอบดังนี้ เริ่มต้นด้วยอุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที และตามด้วยรอบของอุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที, อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที เป็นจำนวน 35 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ได้ด้วย 4.5% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ใน 1X TBE buffer และย้อมแผ่นเจลด้วย silver nitrate นับจำนวนของดีเอ็นเอเครื่องหมาย SSR ที่เกิดขึ้นทำการคัดเลือกลูกผสมกลับ (backcross progeny) ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะ heterozygous

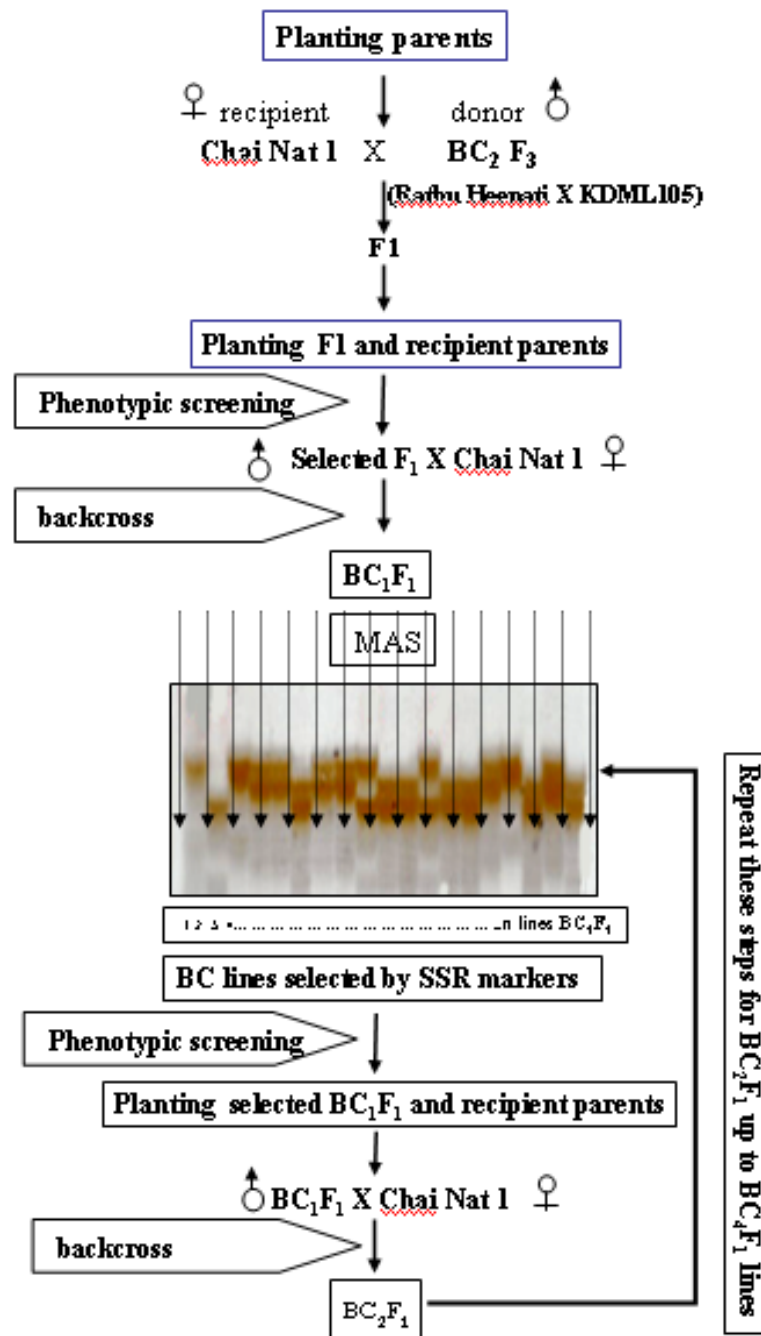


Figure 1 Scheme of development of BC₄F₁ rice line of RathuHeenati/ KDML105 and Chai Nat 1 carrying *Bph3* resistant gene against brown planthopper by marker assisted selection and phenotypic screening

ผลการทดลอง

ข้าวลูกผสม F_1 ที่เกิดจากสายพันธุ์พ่อคือข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง ราตุนีเนติ/ขาวดอกมะลิ 105 กับสายพันธุ์แม่ คือ ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 มีจำนวนทั้งสิ้น 35 เมล็ด ซึ่งทั้งหมดได้รับการคัดเลือกลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้ ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เป็นเกณฑ์ ได้ต้นข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง จำนวน 35 ต้น สำหรับใช้เป็นข้าวผู้ให้ (donor) เพื่อใช้ในการผสมกลับ กับข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ในการผลิตข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง BC_1F_1

ผลการผสมกลับครั้งที่หนึ่ง ได้ข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง BC_1F_1 จำนวนทั้งสิ้น 72 เมล็ดแต่สามารถเพาะเมล็ดและงอกเป็นต้นกล้าได้ 17 เมล็ด และผลการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของต้นกล้าทั้ง 17 ต้นโดยวิธี MAS ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย RM 170 และ RM190 พบ จำนวนต้นข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง BC_1F_1 ที่แสดงผลของแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอแบบ heterozygous จากโมเลกุลเครื่องหมายทั้งสองชนิดในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกันมาก คือเท่ากับ 9:7 ต้น อย่างไรก็ตาม มีต้นกล้าที่แสดงผลของแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากโมเลกุลเครื่องหมายทั้งสองชนิดสอดคล้องกันจำนวน 7 ต้น คิดเป็นร้อยละ 41.2 หรือคิดเป็นสัดส่วน เท่ากับ 7:10 (ตารางที่ 1) และจากผลการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวลูกผสม BC_1F_1 ที่ได้รับการคัดเลือกด้วยลักษณะทางพันธุกรรม ทั้ง 7 ต้น นั้นพบว่า มีข้าวเพียง 3 ต้น เท่านั้นที่แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาสอดคล้องกับข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ต้องการ และนำมาใช้ในการผสมกลับครั้งที่ 2 กับข้าวผู้รับ คือพันธุ์ชัยนาท 1 ได้เมล็ดข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง BC_2F_1 จำนวน 103 เมล็ด ซึ่งเจริญเป็นต้นกล้าสมบูรณ์ได้จำนวน 101 ต้น

เมื่อทำการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของข้าวจำนวนทั้งหมดดังกล่าวด้วยวิธี MAS โดยใช้ โมเลกุลเครื่องหมายชุดเดิม RM170 และ RM190 พบว่า จำนวนต้นข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง BC_2F_1 ที่แสดงผลของแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอแบบ heterozygous จากโมเลกุลเครื่องหมายทั้งสองชนิดในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกันมาก คือเท่ากับ 42:40 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดยมีจำนวนต้นกล้าที่แสดงผลของลักษณะทางพันธุกรรมเป็น heterozygote ทั้ง RM170 และ RM190 เท่ากับ 38 ต้น คิดเป็นร้อยละ

37.6 หรือ เป็นสัดส่วน 38:63 และจากผลการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวลูกผสม BC_2F_1 ที่ได้รับการคัดเลือกทั้ง 38 ต้น พบว่ามีต้นข้าวเพียง 19 ต้น เท่านั้นที่แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาสอดคล้องกับข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และนำมาใช้ในการผสมกลับครั้งที่ 3 กับข้าวพันธุ์ผู้รับ คือชัยนาท 1 ได้เมล็ดข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง BC_3F_1 จำนวน 430 เมล็ด ซึ่งเจริญเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์และเหมาะสมสำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพียง 89 ต้น

ผลการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรม โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายชุดเดิม RM170 และ RM190 พบว่า จำนวนต้นข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง BC_3F_1 ที่แสดงผลของแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอแบบ heterozygous จากโมเลกุลเครื่องหมายทั้งสองชนิดในสัดส่วนที่แตกต่างกันมาก คือเท่ากับ 43:29 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดยมีจำนวนต้นกล้าที่แสดงผลของลักษณะทางพันธุกรรมเป็น heterozygote ทั้ง RM170 และ RM190 สอดคล้องกันมีจำนวน 26 ต้น คิดเป็นร้อยละ 29.2 หรือ คิดเป็นสัดส่วน 26:63 เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวลูกผสม BC_3F_1 ทั้ง 26 ต้นพบว่า มีข้าวเพียง 17 ต้น เท่านั้นที่แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาสอดคล้องกับข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ต้องการ และในการผสมกลับครั้งที่ 4 ของข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง BC_3F_1 ดังกล่าวกับข้าวพันธุ์ผู้รับ คือ ชัยนาท 1 ได้เมล็ดข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง BC_4F_1 จำนวน 432 เมล็ดซึ่งเจริญเป็นต้นกล้าได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตาม มีต้นกล้าที่สมบูรณ์และเหมาะสมสำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพียง 127 ต้น

ผลตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรม โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายชุดเดิม RM170 และ RM190 พบว่า จำนวนต้นข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง BC_4F_1 ที่แสดงผลของแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอแบบ heterozygous จากโมเลกุลเครื่องหมายทั้งสองชนิดในสัดส่วนที่แตกต่างกันมาก คือเท่ากับ 52:32 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดยมีจำนวนต้นกล้าที่แสดงผลของลักษณะทางพันธุกรรมเป็น heterozygote ทั้ง RM170 และ RM190 สอดคล้องกันมีจำนวน 29 ต้น คิดเป็นร้อยละ 29.2 หรือ คิดเป็นสัดส่วน 29:98 เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวลูกผสม BC_4F_1 ทั้ง 29 ต้นพบว่า มีข้าวเพียง 20 ต้น เท่านั้นที่แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาสอดคล้องกับข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่ต้องการ

Table 1 Number of seeds obtained, survived seedlings and heterozygous plants detected by RM 170 and RM190 SSR markers in four backcross generations of cross derived from Rathu Heenati/KDML 105 (as donor) and Chai Nat 1 (as recurrent) parents

generation	Total number of seeds collected	Total number of seedling survived	Total number of heterozygotes as detected by			Observed number of Heterozygous: homozygous	Chi- square value ^{1/}	Selected Heterozygotes at both RM107 & RM109 based on Chai Nat 1 phenotype
			RM170	RM190	RM170&RM190			
BC ₁ F ₁	72	17	9	7	7	7:10	0.53*	3
BC ₂ F ₁	103	101	42	40	38	38:63	6.19*	19
BC ₃ F ₁	430	89	43	29	26	26:63	15.38*	17
BC ₄ F ₁	432	127	52	32	29	29:98	37.49*	20

^{1/}Chi-square test on heterozygous:homozygous ratio between observed value and expected value, based on Mendel's theory

*significant difference (P-value ≤ 0.05)

วิจารณ์

ตามทฤษฎีของเมนเดล ยีน *Bph3* เป็นยีนเด่น การถ่ายทอดของยีนเพียงยีนเดียวจากลูกผสม F₁ ซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมแบบพันทาง คือ Aa ไปสู่รุ่นลูก ด้วยการผสมกลับกับรุ่นแม่หรือพ่อ (parent) ซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ aa นั้น ลูกที่ได้ประกอบด้วย Aa และ aa ในสัดส่วน 50: 50 (Griffiths *et al.*, 1996) แต่ในการสร้างลูกผสมทั้ง 4 ครั้งกลับพบว่าสัดส่วนของ heterozygous ที่ได้ใน BC₁F₁, BC₂F₁, BC₃F₁ และ BC₄F₁ เท่ากับ 41.2, 37.6, 29.2 และ 29.98 ซึ่งไม่เป็นไปตามกฎเกณฑ์ของเมนเดล ทั้งนี้เป็นผลจากกลไกการสร้าง ความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งที่มีชีวิตโดยการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซม (crossing over) ในขั้นตอนของกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์โดยการแบ่งเซลล์แบบ ไมโอซิส การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมดังกล่าวทำให้เกิดการสับเปลี่ยนของยีนต้านทาน *Bph3* และโมเลกุลเครื่องหมายทั้ง 2 ชนิด ทั้งชิ้นส่วนหรือบางส่วนขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของโมเลกุล

เครื่องหมายทั้งสองชนิด ซึ่งแม้ตั้งอยู่บนโครโมโซมเดียวกัน แต่เป็นโมเลกุลเครื่องหมายแบบ linkage ที่มีตำแหน่งที่ตั้งอยู่ใกล้หรือติดกับยีนเป้าหมาย จึงทำให้มีระยะห่างเพียงพอที่สามารถเกิดการสับเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมขึ้นได้ (สุรเดช และคณะ, 2548) ดังนั้นเมื่อทำการผสมพันธุ์ข้าวเพื่อสร้างลูกผสมแบบผสมกลับ ต้นข้าวลูกผสมที่ได้จึงมีโมเลกุลเครื่องหมายทั้งสองพร้อมกันน้อยกว่าร้อยละ 50 ได้

การผสมกลับนั้นมีผลต่อสัดส่วนของยีนรวมของลูกผสมที่ได้รับ โดยลูกผสมที่เกิดขึ้นมีสัดส่วนของสารพันธุกรรมของแม่เพิ่มขึ้นในขณะที่ยีนสัดส่วนของสารพันธุกรรมจากพ่อลดลงตามลำดับตามจำนวนครั้งที่ทำการผสมกลับ ดังนั้นหากต้องการลักษณะเด่นโดยรวมของสายพันธุ์ที่ต้องการมาก ๆ ต้องใช้สายพันธุ์หลัก (parent) ที่เป็นแม่และใช้ลูกผสมที่มียีนที่ต้องการเป็นพ่อโดยทั่วไป ลูกผสมที่เกิดขึ้นจากการผสมแต่ละครั้งต้องมีสารพันธุกรรมโดยรวมจากพ่อและแม่แหล่งละครึ่งเสมอ ดังนั้นจากลูกผสม F₁ ซึ่งมีสารพันธุกรรมโดยรวมของพ่อเท่ากับร้อยละ 50 ด้วยวิธีการผสมกลับข้าวต้นลูกผสมที่

เกิดขึ้นในการผสมกลับครั้งที่หนึ่งจึงมีส่วนของสารพันธุกรรมโดยรวมของพ่อคงเหลือคิดเป็นร้อยละ 25 และลดลงเป็นร้อยละ 12.5, 6.25 และ 3.125 ในลูกผสมที่เกิดจากการผสมกลับในลักษณะดังกล่าวในครั้งที่ สอง สาม สี่ ตามลำดับ ส่งผลทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกผสมที่เกิดขึ้นมีความเหมือนกับแม่มากขึ้นเรื่อย ๆ (Allard, 1960) และในขณะเดียวกันยีนที่ต้องการก็ยังคงอยู่ในพันธุกรรมของลูกผสมในแต่ละรุ่น เนื่องจากมีกลไกการตรวจสอบและคัดเลือกลูกผสมที่ได้รับในแต่ละครั้งโดยการใช้ MAS ซึ่งมีความละเอียดถึงระดับของสายพันธุกรรม (McCouch *et al.*, 1997) ในการผสมกลับของข้าวลูกผสมในการศึกษานี้ดำเนินการ 4 ครั้ง ลูกผสมที่ได้รับ จึงมีส่วนของสารพันธุกรรมโดยรวมทางทฤษฎีของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เท่ากับ ร้อยละ 96.875 ร่วมกับการคัดเลือกลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำให้ได้ลูกผสมที่มีคุณลักษณะใกล้เคียงกับชัยนาท 1 มาก และในขณะเดียวกันยังคงมียีน *Bph3* ในพันธุกรรมซึ่งยืนยันโดยผลการคัดเลือกด้วยวิธี MAS

สรุป

การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวปรับปรุง ราตุนีเนติ/ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ชัยนาท 1 รุ่น BC₄F₁ ที่มียีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลแบบ *Bph3* โดยการผสมกลับกับข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 จำนวน 4 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งให้ลูกผสมที่ได้เป็นสายพันธุ์พ่อหรือผู้ให้ และพันธุ์ชัยนาท 1 เป็นสายพันธุ์แม่ หรือผู้รับ และใช้เทคนิคดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ MAS ติดตามการถ่ายทอดของยีน *Bph3* ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อคัดเลือกลูกผสมที่มีคุณลักษณะของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ได้ข้าวลูกผสมที่มีคุณลักษณะตรงตามต้องการจำนวน 26 ต้น เพื่อใช้ในการสร้างสายพันธุ์ที่มีลักษณะของยีน *Bph3* แบบ homozygous สำหรับดำเนินการทดสอบความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (trait validation) และ gene scan รวมทั้งการทดสอบในสภาพแปลงทดลองและแปลงเกษตรกรต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Rockefeller Foundation ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และมหาวิทยาลัยนเรศวร รวมทั้ง รศ. ดร. อภิชาติ วรรณวิจิตร ดร. ธีรยุทธ ตูจินดา และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน จากหน่วยค้นหาและใช้ประโยชน์จากยีนข้าว และ ดร. สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน จากห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยเป็นอย่างดีทั้งในส่วนของ งบประมาณ เครื่องมือ ข้อมูล และอุปกรณ์ ตลอดจนคำแนะนำต่าง ๆ

เอกสารอ้างอิง

- สุรเดช ปาละวิสุทธิ วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ ศิริพร กออินทร์ ศักดิ์ และ ธาณี ศรีวงศ์ชัย. 2548. การคัดเลือกดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ SSR ของยีนต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิด *Bph3* จากข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง และพันธุ์ชัยนาท 1. วารสารเกษตร 21(3): 269-276.
- สุวัฒน์ รวยอารีย์. 2544. เรียนรู้การจัดการศัตรูข้าวโดยวิธีผสมผสาน. เอกสารวิชาการ กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- Allard, R.W. 1960. Principles of Plant Breeding. John Wiley & Sons Inc., New York. 485 pp.
- Cho, Y.G., M. Y. Eun, S. R. McCouch and Y. A. Chae. 1994. The semi-dwarf gene, *sd-1*, of rice (*Oryza sativa* L.). II. Molecular mapping and marker-assisted selection. Theor. Appl. Genet., 89: 59-59.
- Griffiths, A. J. F., J. H. Miller, D. T. Suzuki, R. C. Lewontin and W. M. Gelbart. 1996. An Introduction to Genetic Analysis. 6th ed. W. H. Freeman and Company, New York. 915 pp.

- Jairin, J., T. Toojinda, S. Tragoonrung, S. Tayapat and A. Vanavichit. 2005. Multiple genes determining brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance in backcross introgressed lines of Thai Jasmine Rice 'KDML105'. *ScienceAsia* 31: 129-135.
- Jairin, J., K. Phengrat, S. teangdeerith, A. Vanavichit and T. Toojinda. 2007. Mapping of a broad-spectrum brown planthopper resistance gene, *Bph3*, on rice chromosome 6. *Mol. Breeding* 19: 35-44.
- Kawaguchi, M., K. Murata, T. Ishii, S. Takumi, N. Mori and C. Nakamura. 2001. Assignment of a brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance gene *bph4* to the rice chromosome 6. *Breeding Sci.* 51: 13-18.
- Khush, G.S. and D.S. Brar. 1991. Genetics of resistance to insects in crop plants. *Advances in Agronomy* 45: 224-228.
- Lafitte, R.H., A. H. Price and B. Courtois. 2004. Yield response to water deficit in an upland rice mapping population: associations among traits and genetic markers. *Theor. Appl. Genet.* 109: 1237-1246.
- McCouch, S. R., X. Chen, O. Panaud, S. Temnykh, Y. Xu, Y. G. Cho, N. Huang, T. Tshii and M. Blair. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol. Bio.* 35: 89-99.
- Morgante, M. and A. M. Olivieri. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3: 175-182.
- Paran, I. and R. W. Michelmore, 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistant genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85: 985-993.
- Pflieger, S., V. Lefebvre, C. Caranta, A. Blattes, B. Goffinet and A. Palloix. 1999. Disease resistant gene analogs as candidates for QTLs involved in pepper-pathogen interactions. *Genome* 42: 1100-1110.
- Rongwen, J., M. S. Akkaya, A. A. Bhagwat, U. Lavi and P. B. Cregan. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.* 90: 43-48.
- Vanavichit, A., S. Tragoonrung and T. Toojinda. 2003. Biotechnology and rice varieties improvement. pp. 79-121. *In*: S. Lorlowhakarn (ed.). *Science and Technology with Thai Rice*. National Science and Technology Development Agency, Bangkok, Thailand.
- Xiao, J. H., S. N. Grandillo, S. N. Ahn, S. R. McCouch, S. D. Tanksley, J. M. Li and L. P. Yuan. 1996. Genes from wild rice improve yield. *Nature* 384: 223-224.
- Yadav, R., B. Courtios, N. Huang and G. McLaren. 1997. Mapping genes controlling root morphology and root distribution in a double-haploid population of rice. *Theor. Appl. Genet.* 94: 619-632.
-