การคัดเลือกดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ SSR ของยีนต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิด *Bph3* จากข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง และพันธุ์ชัยนาท 1

Screening SSR Markers for Brown Planthopper Resistant Genes, *Bph3*, on Rice (*Oryza indica* L.) Introgression Lines and Chai Nat 1

สุรเดช ปาละวิสุทธิ์[1] วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ[2*] ศิริพร กออินทร์ศักดิ์[3] และ ธานี ศรีวงศ์ชัย[3]

Suradet Palawisut[1] Weerathep Pongprasert[2] Siriporn Korintrsak[3] and Thanee Srivongchai[3]*

Abstract: Currently molecular markers used to determine any resistant gene of brown planthopper (*Nilaparvata lugens* (Stål), Delphacidae, Homoptera) were developed rapidly and variously available which provided different results depended on the varieties of rice. Therefore, the screening suitable SSR markers to determine brown planthopper resistant genes, *Bph3*, on rice (*Oryza indica* L.) introgresion lines of Rathu Heenati/KDML 105 and Chai Nat 1 was carried out in order to use for improvement of brown planthopper resistant trait of Chai Nat 1. Seven potential SSR markers located on chromosome 6 closed to *Bph3* resistant gene were used to determine *Bph3* resistant gene composed of RM 170, RM 190, RM 586, RM 587, RM 588, RM 589, and RM 597. However, only RM 170, RM 190, and RM 586 were presented the best evident of

[1]ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก อ. วังทอง จ. พิษณุโลก 65000

Phitsanulok Rice Research Center, Wangtong, Phitsanulok 65000

[2]ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยนเรศวร อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000

Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment

Naresuan University, Muang, Phitsanulok 65000

[3]หน่วยค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Rice Gene Discovery Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology

Kasetsart Univeristy, Kamphangsaen, Nakorn Pathom 73140

polymorphism result with 10-15 nucleotide bases differences between both target rice varieties and clearly enough to use for following and evaluation on the existence of *Bph3* resistant gene in the process of Chai Nat 1 improvement in the future.

Keywords: rice (*Oryza indica*), brown planthopper, resistant gene, *Bph3*, SSR markers

บทคัดย่อ: ปัจจุบันโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ในการตรวจสอบยีนต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens* (Stål), Delphacidae, Homoptera) แต่ละชนิดได้รับการพัฒนาอย่างรวดเร็ว และมีหลากหลายชนิดให้เลือก ซึ่งแต่ละชนิดต่างก็แสดงผลการตรวจสอบแตกต่างไปตามชนิดของพันธุ์ข้าว ดังนั้น จึงได้ดำเนินการศึกษาเพื่อคัดเลือกโมเลกุล ดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ SSR ของยีนต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ชนิด *Bph3* ที่เหมาะสม เพื่อตรวจสอบและติดตามการถ่ายทอดยีนต้านทานดังกล่าวของข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง Rathu Heenati/ขาวดอกมะลิ105 (KDML 105) และข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ในกระบวนการปรับปรุงคุณลักษณะความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ให้มีระดับที่สูงขึ้น โมเลกุลเครื่องหมายที่มีศักยภาพในการตรวจสอบยีนต้านทานดังกล่าวที่พบในข้าวประกอบด้วย 7 ชนิด คือ RM 170, RM 190, RM 586, RM 587, RM 588, RM 589, และ RM 597 ซึ่งเป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่ตั้งอยู่บนโครโมโซม 6 และใกล้กับตำแหน่งที่ตั้งของยีนต้านทาน ชนิด *Bph3* ผลการตรวจสอบความจำเพาะและความเหมาะสมของโมเลกุลเครื่องหมายด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่า มีเพียง RM 170, RM 190, และ RM 586 เท่านั้นที่ให้ผลเป็น polymorphism ที่มีความแตกต่างกันประมาณ 10-15 คู่เบส ระหว่างข้าวพันธุ์เป้าหมายทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งมีความชัดเจนเพียงพอสำหรับการนำมาใช้ติดตามและตรวจสอบการถ่ายทอดยีนควบคุมลักษณะความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิด *Bph3* ในการปรับปรุงข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ได้ในอนาคต

คำสำคัญ: ข้าว (*Oryza indica*), เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล, ยีนความต้านทานชนิด *Bph3*, โมเลกุลเครื่องหมายแบบ SSR

คำนำ

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens* (Stål)) (=*Delphax oryzae*) (Homoptera: Delphacidae) จัดว่าเป็นศัตรูข้าวที่มีความสำคัญที่สุดในเอเชีย การทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลทำให้ต้นข้าวเหี่ยว และเกิดอาการไหม้ (hopperburn) และยังเป็นแมลงพาหะถ่ายทอดโรคเขียวเตี้ย และโรคใบหงิกซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสมาสู่ข้าว ทำให้ข้าวเป็นโรค มีอาการแห้งไหม้ตาย ไม่สามารถออกรวง และส่งผลให้ผลผลิตข้าวลดลงไม่คุ้มค่าการลงทุน เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลนี้มักพบระบาดในพื้นที่ที่มีการชลประทานดี สามารถปลูกข้าวได้ตลอดทั้งปี เช่น พื้นที่ปลูกข้าวเขตที่ราบภาคเหนือตอนล่าง และภาคกลาง แมลงสามารถอยู่ข้ามฤดูได้โดยอาศัยในวัชพืชที่เป็นญาติกับข้าวเช่น ข้าวป่า และหญ้าไซ เป็นต้น (สุวัฒน์, 2544) การควบคุมนั้นมักนิยมใช้สารเคมีฆ่าแมลงเป็นหลัก (สำนวน และวีรเทพ, 2548) ซึ่งส่งผลกระทบต่อธรรมชาติเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งศัตรูธรรมชาติซึ่งมีหลากหลายชนิดทั้งที่เป็นตัวห้ำและตัวเบียน เช่น มวนเขียวดูดไข่ (*Cyrtorhinus lividipennis* Reuter), แตนเบียนไข่ *Paracentrobia andoi* (Ishii), ด้วงดิน *Ophionea ishii* (Habu), ด้วงเต่า *Micraspis crocea* (Mulsant) ฯลฯ การควบคุมโดยใช้ข้าวพันธุ์ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัดแมลงที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก และเป็นวิธีการที่ปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม

ในช่วง 3 ทศวรรษ ที่ผ่านมาได้มีการวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวต้านทานชนิดต่าง ๆ มากมาย ที่สำคัญและเป็นที่นิยมปลูกในเขตภาคเหนือตอนล่างและภาคกลาง คือพันธุ์ ชัยนาท 1 ซึ่งมีคุณสมบัติต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้เป็นอย่างดี เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่ได้รับการคัดและปรับปรุงคุณสมบัติต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสี

น้ำตาลซึ่งถ่ายทอดมาจากข้าวพันธุ์ บาบาวี (Babawe) อย่างไรก็ตาม คุณลักษณะต้านทานของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เริ่มลดลงหลังจากได้ความนิยมและมีการปลูกกันอย่างแพร่หลายติดต่อกันอย่างต่อเนื่อง ปัจจุบันอาจกล่าวได้ว่ามีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้น้อยมาก แต่เนื่องจากข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 จัดเป็นข้าวคุณภาพดีและเป็นที่ต้องการของตลาดมาก ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้มีคุณลักษณะต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น จึงเป็นแนวทางที่จะสามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ ประกอบกับปัจจุบันการค้นหายีนต้านทานต่อเพลี้ยดังกล่าวสามารถกระทำได้ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล ซึ่งสามารถลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลงได้และมีความแม่นยำมากในการติดตามผลของการผสมพันธุ์จากลูกผสมที่เกิดขึ้นในแต่ละขั้นตอนของการปรับปรุงพันธุ์ ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายซึ่งได้รับการพัฒนาขึ้นจากเทคนิคต่าง ๆ ทางชีวโมเลกุล ที่มีพื้นฐานจากกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย polymerase chain reaction, PCR เช่น SSR, RFLPs, AFLPs ฯลฯ และสามารถนำมาใช้ตรวจสอบลักษณะที่แตกต่างทางจีโนไทน์ระหว่างข้าวสายพันธุ์ให้ (donor parent) ที่มียีนต้านทานที่ต้องการกับสายพันธุ์รับ (recipient parent) ที่ต้องการปรับปรุงได้ เพื่อคัดเลือกดีเอ็นเอเครื่องหมายที่เหมาะสม สำหรับนำไปตรวจสอบติดตาม และคัดเลือกข้าวลูกผสมที่มียีนต้านทานที่เกิดขึ้นในแต่ละขั้นตอนของการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาและคัดเลือกดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ SSR ที่เหมาะสมและมีลักษณะทำให้เกิด polymorphism ระหว่างข้าวพันธุ์ Rathu Heenati ที่มียีนต้านทาน เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลไบโอไทป์ต่าง ๆ ชนิด *Bph3* ในระดับสูงมาก (Jirapong *et al*., 2005) กับข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้ติดตาม และคัดเลือกพันธุ์ปรับปรุงที่มียีนต้านทาน *Bph3* ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พันธุ์ข้าวผู้รับ (recipient) คือ พันธุ์ชัยนาท 1 ส่วนผู้ให้ (donor) นั้น ในที่นี้ใช้ข้าวพันธุ์ปรับปรุง BC_2-F_3 ระหว่าง Rathu Heenati กับ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML 105) แทนพันธุ์ Rathu Heenati ดั้งเดิม เพื่อลดขั้นตอนในการคัดเลือกลูกผสมที่เกิดขึ้น เนื่องจากพันธุ์ Rathu Heenati นั้นมีคุณลักษณะหลายชนิดที่ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด และข้าวพันธุ์ปรับปรุงที่เลือกนี้ได้รับการคัดเลือกและปรับปรุงให้มีความเหมาะสมและมีความใกล้ชิดกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นที่นิยมของตลาดแล้ว ทำให้สามารถลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ได้

2. ทำการคัดเลือกดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด SSR ที่มีความใกล้ชิด (flanking หรือ linkage) กับตำแหน่งยีนต้านทาน *Bph3* บนโครโมโซมที่ 6 ของข้าวสายพันธุ์ Rathu Heenati จากแผนที่พันธุกรรม (genetic map) (www.gramene.org)

3. ทำการสกัดดีเอ็นเอ จากใบของกล้าข้าว อายุ 7 วัน ทั้งสามสายพันธุ์ คือ ชัยนาท 1, ขาวดอกมะลิ 105 และ สายพันธุ์ข้าวพันธุ์ปรับปรุง BC_2-F_3 ของ Rathu Heenati กับ ขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ (DNA Traps Kits, หน่วยค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, http://dnatec.kps.ku.ac.th) ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้โดย spectrophotometer และ agarose gel-electrophoresis

4. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเครื่องหมาย โดย polymerase chain reaction, PCR ด้วยเครื่อง thermocycler, MJ Research (PTC 100) ส่วนผสมของ PCR ในแต่ละปฏิกิริยาที่มีปริมาตร 10 µL ประกอบด้วย 40 ng ดีเอ็นเอข้าวแต่ละสายพันธุ์; 200 µM ของ dNTP (Bio 101), primer ที่เป็นทั้ง forward และ reverse ของ SSR marker สายละ 0.2 µM ของดีเอ็นเอเครื่องหมายละชนิดที่คัดเลือกจาก ข้อ 2, 3 mM $MgCl_2$, 0.2 Unit ของ Taq DNA polymerase และ 1X ของ PCR buffer นำส่วนผสมที่ได้ใส่เครื่องเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ โดยมีรายละเอียดของอุณหภูมิและระยะเวลาในแต่ละรอบดังนี้ เริ่มต้นด้วยอุณหภูมิ 94 ºC เป็นเวลา 3 นาที และตามด้วยรอบของอุณหภูมิ 94 ºC เป็นเวลา 30 วินาที, อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ อุณหภูมิ 72 ºC เป็นเวลา 2 นาที เป็นจำนวน 35 รอบ ปิดท้ายด้วยอุณหภูมิ 72 ºC เป็นเวลา 5 นาที และรักษาอุณหภูมิไว้ที่ 4 ºC

5. ทำการตรวจสอบดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ได้ด้วย 4.5% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ใน 1X TBE buffer และย้อมแผ่นเจลด้วย silver nitrate นับจำนวนและตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ SSR ที่เกิดขึ้น

6. ทำการคัดเลือกดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างสายพันธุ์ข้าวพันธุ์ปรับปรุง BC_2-F_3 ของ Rathu Heenati/KDML 105 กับชัยนาท 1 เพื่อนำไปตรวจสอบและติดตามยีนต้านทานดังกล่าวในข้าวลูกผสมที่เกิดขึ้นในแต่ละขั้นตอนของการปรับปรุงพันธุ์ข้าวระหว่างทั้งสองพันธุ์ดังกล่าวต่อไป

ผลและวิจารณ์

การคัดเลือกดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีความใกล้ชิดกับยีนต้านทาน *Bph3*

ในปัจจุบัน มีรายงานการค้นพบยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากข้าวพันธุ์ปลูกในกลุ่ม *indica* ทั้งหมด 14 ยีนแล้ว (Hirabayachi and Ogawa, 1995; Huang *et al*., 1997; Jeon *et al*., 1999; Mei *et al*., 1996; and Kawakuchi *et al*., 2001) และหลายยีนได้รับการวิเคราะห์จนสามารถระบุตำแหน่งบนโครโมโซมของข้าว (Yang *et al*., 2002) ในกรณีของยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิด *Bph3* นั้น มีรายงานคาดการณ์ตำแหน่งที่ตั้งบนโครโมโซมว่าอยู่ในหลายตำแหน่งแตกต่างกันไป ทั้งโครโมโซม 4, 7 และ10 แต่ยังไม่มีการยืนยันที่ชัดเจน อย่างไรก็ตาม จากการสืบค้นหาโมเลกุลเครื่องหมายและวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Bph3* จากข้าวคู่ผสม PTB 33/กข 6 และ Rathu Heenati/ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าไม่มีโมเลกุลเครื่องหมายบนโครโมโซม 4, 7 และ 10 ที่สัมพันธ์กับกลุ่มต้านทานและอ่อนแอต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิดนี้ แต่พบว่าโมเลกุลเครื่องหมาย RM 190 บนโครโมโซม 6 มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานและตั้งอยู่ใกล้กับยีนต้านทานมาก (Jirapong *et al*., 2005) ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Kawakuchi *et al*. (2001) ที่พบว่ายีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Bph3* ตั้งอยู่บนโครโมโซม 6 และมีความเกี่ยวพันกับยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิด *bph4* มาก นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ตำแหน่งยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในข้าวพันธุ์ PTB 33 พบว่าโมเลกุลเครื่องหมาย RM 588 และ RM 589 ตั้งอยู่ใกล้กับยีนต้านทานดังกล่าวมาก และมีศักยภาพในการนำไปตรวจสอบหรือติดตามยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในข้าวสายพันธุ์อื่น ๆ ได้ (จิระพงศ์ และคณะ, 2548) เมื่อนำข้อมูลพิจารณาร่วมกับ genetic map ของโครโมโซม 6 จาก Rice Cornell SSR 2001 (http://www.grammene.org) เพื่อกำหนดขอบเขตที่ตั้งของตำแหน่งของยีนให้แคบลงและชัดเจนมากขึ้น (narrow down) พบว่า โมเลกุลเครื่องหมาย RM 586, RM 587, RM 597 และ RM 170 น่าจะมีความใกล้ชิดกับยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลดังกล่าวมาก และมีแนวโน้มการนำมาใช้ตรวจสอบลักษณะ polymorphisms ของโมเลกุลเครื่องหมายในข้าวพันธุ์เป้าหมายทั้งสองได้ ดังนั้น โมเลกุลเครื่องหมายที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้จึงประกอบด้วย 7 ชนิด คือ RM 170, RM 190, RM 586, RM 587, RM 588, RM 589 และ RM 597 (ภาพที่ 1)

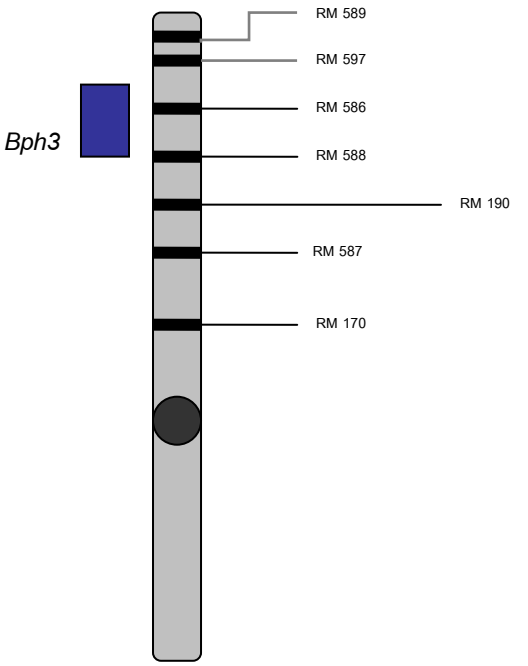

Figure 1 Location of *Bph3* resistant gene on chromosome 6 of rice (*Oryza indica*) and SSR linkage or flanking markers used to determine *Bph3* resistant gene of rice introgression line (Rathu Heenati/KDML 105), Chai Nat 1, and KDML 105.

ผลการทดสอบลักษณะ polymorphism ของโมเลกุลเครื่องหมายทั้งหมดจำนวน 7 ชนิด พบว่า ลักษณะของแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้รับมีความแตกต่างไปตามชนิดของโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ และสามารถจัดจำแนกผลลัพธ์ได้ออกเป็น 6 กลุ่มดังนี้คือ กลุ่มที่ให้แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลายชิ้นต่อเนื่อง (multiple bands) ที่มีลักษณะบาง (light) และไม่ชัดเจน (unclear) ได้แก่ RM 597 กลุ่มที่ให้แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ที่ศึกษาทั้ง 3 พันธุ์ที่มีขนาดแตกต่างกันอย่างชัดเจน ได้แก่ RM 170 และ RM 589 กลุ่มที่ให้แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ที่ศึกษาทั้ง 3 พันธุ์ที่มีขนาดเท่ากันหมด ได้แก่ RM 587 กลุ่มที่ให้แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง Rathu Heenati/KDML 105 มีขนาดเท่ากับที่พบในพันธุ์ ชัยนาท 1 ได้แก่ RM 588 กลุ่มที่ให้แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง Rathu Heenati/KDML 105 มีขนาดเท่ากับที่พบในพันธุ์ KDML 105 ได้แก่ RM 190 และ กลุ่มที่ให้แถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ที่มีขนาดเท่ากับที่พบในพันธุ์ KDML 105 ได้แก่ RM 586 (ตารางที่ 1)

Table 1 Show size of DNA polymorphic bands among rice introgression line (Rathu Heenati/KDML 105), Chai Nat 1, and KDML 105 produced by various SSR markers.

Variety line	Size of DNA band products (bp)						
	RM 170	RM 190	RM 586	RM 587	RM 588	RM 589	RM 597
Rathu Heenati/ KDML 105	115	190	390	280	120	265	No band
ชัยนาท 1	125	180	400	280	120	260	result
KDML 105	120	190	400	280	130	257	

Remarks: Numbers are means ± standard deviation

ในการใช้ประโยชน์โมเลกุลเครื่องหมายเพื่อตรวจสอบและติดตามยีนควบคุมลักษณะความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิด *Bph3* นั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้โมเลกุลเครื่องหมายที่ให้ผลของขนาดแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดที่แตกต่างกัน (polymorphism) ระหว่างพ่อและแม่ ดังนั้นโมเลกุลเครื่องหมายที่แสดงผลในลักษณะดังกล่าวจึงมีเพียง RM 170, RM 190, RM 586, และ RM 589 เท่านั้น ที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ประโยชน์ในการติดตามและตรวจสอบยีนควบคุมลักษณะความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิด *Bph3* โดยมีความแตกต่างกันประมาณ 10-15 คู่เบส ซึ่งการตรวจสอบจำเป็นต้องอาศัยการกระจายตัวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจากโมเลกุลเครื่องหมายเหล่านี้ด้วยวิธีการ polyacrylamide gel electrophoresis เท่านั้น

อย่างไรก็ตาม ในการใช้โมเลกุลเครื่องหมายเพื่อตรวจสอบและติดตามยีนเป้าหมายใด ๆ ก็ตาม จำเป็นอย่างยิ่งต้องมีการตรวจสอบโมเลกุลเครื่องหมายเหล่านั้นก่อนทุกครั้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากมีการเปลี่ยนแปลงพันธุ์ที่เป็นพ่อและแม่ ทั้งนี้เพราะผลที่เป็น polymorphism ที่เกิดขึ้นจากโมเลกุลเครื่องหมายชนิดหนึ่งในพ่อแม่ชุดหนึ่งอาจให้ผลที่ตรงข้ามได้ในพ่อแม่อีกชุดหนึ่ง เช่น กรณีของโมเลกุลเครื่องหมาย RM 588 RM 589 และ RM 190 ที่ให้ผลเป็น polymorphism ในการศึกษาของข้าวคู่ผสม PTB 33/กข 6 และ Rathu Heenati/ขาวดอกมะลิ 105 (จิระพงศ์ และคณะ, 2548) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ RM 589 และ RM 190 ให้ผลในลักษณะที่สอดคล้องกับการศึกษาข้างต้น แต่ RM 588 แสดงผลที่แตกต่าง เป็นต้น

เมื่อพิจารณาผลที่ได้รับร่วมกับตำแหน่งที่ตั้งของยีนและตำแหน่งที่ตั้งของโมเลกุลเครื่องหมายบนโครโมโซม พบว่า โมเลกุลเครื่องหมายที่มีความเหมาะสมมากที่สุดในการติดตามและตรวจสอบยีนต้านทานเพลี้ยระโดดสีน้ำตาลชนิด *Bph3* นั้น ควรประกอบด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย 3 ชนิด คือ RM 170 และ RM 586 ซึ่งเป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่เกี่ยวพัน (linkage markers) กับยีนต้านทาน และตั้งอยู่บนโครโมโซมบริเวณที่ติดกับส่วนบนและล่างของยีนตามลำดับ ส่วนโมเลกุลเครื่องหมายสุดท้ายคือ RM 190 จัดเป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่ตั้งอยู่ภายในบริเวณของยีนต้านทาน การใช้โมเลกุลเครื่องหมายทั้งสามร่วมกันสามารถเพิ่มศักยภาพและความแม่นยำในการตรวจสอบและติดตามยีนดังกล่าวได้เป็นอย่างดี รวมทั้งช่วยในการค้นหารายละเอียดเพิ่มเติมเพื่อค้นหาโมเลกุลเครื่องหมายอื่นๆ ที่ตั้งอยู่ใกล้กับยีนมากขึ้น (narrow down) และช่วยในการค้นหาลำดับเบสของยีนดังกล่าวได้สะดวกมากยิ่งขึ้นในอนาคต ส่วนโมเลกุลเครื่องหมาย RM 586 นั้น แม้พบว่ามีความแตกต่างของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ระหว่างสายพันธุ์ข้าวเป้าหมาย แต่เนื่องจากความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้รับมีเพียง 5 คู่เบสเท่านั้น ซึ่งน้อยเกินไป และอาจให้ผลของความแตกต่างที่ไม่ชัดเจนได้ในกรณีที่ต้องแยกความแตกต่างของตัวอย่างเป็นจำนวนมากและก่อให้เกิดความสับสนได้ง่าย

สรุป

การคัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมายดีเอ็นเอ แบบ SSR ของยีนต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิด *Bph3* ของข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง Rathu Heenati/KDML 105 และพันธุ์ชัยนาท 1 จากจำนวน 7 ชนิด มีเพียง 3 ชนิดเท่านั้น คือ RM 170, RM 190 และ RM 586 ที่มีความเหมาะสมและมีศักยภาพมากที่สุดในการจำแนกความแตกต่างของข้าวทั้งสองสายพันธุ์ โดยโมเลกุลเครื่องหมายที่ได้รับการคัดเลือกทั้งสามชนิดนี้จะถูกนำไปใช้ในการติดตามการถ่ายยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิด *Bph3* จากข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง Rathu Heenati/KDML 105 สู่ ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 เพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวชัยนาท 1 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่เกษตรกรนิยมปลูกอย่างแพร่หลายและกำลังประสบปัญหาเรื่องระดับความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลลดลงอย่างรวดเร็ว ให้มีคุณลักษณะที่ต้านทานที่สูงขึ้นต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของ Regional Workshop on Molecular Breeding in Rice for Mekong Region: Line Conversion using Marker Aided Selection ซึ่งได้รับการสนับสนุนโดย Rockefeller Foundation และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และคณะผู้วิจัยของขอบคุณ ผศ.ดร. อภิชาต วรรณวิจิตร ดร. ธีรยุทธ ตู้จินดา และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน จากหน่วยค้นหาและใช้ประโยชน์จากยีนข้าว และ ดร. สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน จากห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยเป็นอย่างดียิ่งทั้งในส่วนของเครื่องมือ ข้อมูล และอุปกรณ์ตลอดจนคำแนะนำต่าง ๆ

เอกสารอ้างอิง

จิระพงศ์ ใจรินทร์, กิจติพงษ์ เพ็งรัตน์, สงวน เทียงดีฤทธิ์, กฤษณา สุดทสาร, จรัญจิต เพ็งรัตน์ และอุไรวรรณ คชสถิตย์. 2548. การสืบหาโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล. รายงานการประชุมวิชาการ ข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2548. วันที่ 7-8 มีนาคม 2548, ณ โรงแรม รอแยลฮิลส์ รีสอร์ท, จ. นครนายก.

สำนวน ฉิมพกา และวีรเทพ พงษ์ประเสริฐ. 2548. ปัจจัยที่มีผลต่อการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูข้าวของเกษตรกร อำเภอตะพานหิน จังหวัดพิจิตร. วารสารเกษตรนเรศวร 8(1): 77-94.

สุวัฒน์ รวยอารีย์. 2544. เรียนรู้การจัดการศัตรูข้าวโดยวิธีผสมผสาน. เอกสารวิชาการ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

Hirabayashi, H. and T. Ogawa. 1995. RFLP mapping of *Bph-1* (Brown planthopper resistance gene) in rice. Breeding Sci. 45: 369-371.

Huang, N., A. Parco, T. Mew, G. Magpantay, S. R. McCouch, E. Guiderdoni, J. Xu, P. Subudhi, E. R. Angeles, G. S. Khuih and J. C. XU. 1997. RFLP mapping of isozymes, RAPD and QTLs for grain shape, brown planthopper resistance in a doubled haploid rice population. Mol. Breed. 3:105-113.

Jeon, Y. H., S. N. Ahn, H. C. Choi, T. R. Hahn and H. P. Moon. 1999. Identification of a RAPD marker linked to a brown planthopper resistance gene in rice. Euphytica 107: 23-28.

Jirapong, 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.

Kawaguchi, M., K. Mulata, 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.

Mei, M., C. Zhuang, R. Wan, J. Wu and G. Kochert. 1996. Genetic analysis and tagging of gene for brown planthopper resistant in *indica* rice. pp 590-595. *In*: G. S. khush, (ed.) Rice Genetics III. Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium. IRRI, Manila, Philippines.

Yang, H., X. Ren, Q. Weng, L. Zhu and G. He. 2002. Molecular mapping and genetic analysis of a rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance gene. Hereditas 136: 39-43.