สำนักหอสมุด แม่โจ้ ๒๕๔๙ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาไม่ไวแสงชั่วที่ 1 โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลระบุตำแหน่งยีนในการคัดเลือก

Breeding of F_1 Hawm Gra Dang Ngah rice for photoperiod insensitivity by using molecular marker-assisted target

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2560
จำนวน 330,000.- บาท

หัวหน้าโครงการ นางสาวมัลลิกา จินดาซิงห์

ผู้ร่วมโครงการ นายสุทธิรักษ์ ผลเจริญ

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ MAEJO UNIVERSITY

189

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาไม่ไวแสงชั่วที่ 1 โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลระบุตำแหน่งยีนในการคัดเลือก

Breeding of F_1 Hawm Gra Dang Ngah rice for photoperiod insensitivity by using molecular marker-assisted target

มัลลิกา จินดาซิงห์[1] และ สุทธิรักษ์ ผลเจริญ[2]

[1,2]มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

ข้าวพันธุ์หอมกระดังงาเป็นพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีการปลูกในจังหวัดนราธิวาสมาอย่างยาวนาน จุดเด่นของข้าวพันธุ์นี้คือ จะมีกลิ่นหอมคล้ายดอกกระดังงาและยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูง แต่เป็นข้าวที่ไวต่อช่วงแสงทำให้ข้าวออกดอกไม่พร้อมกัน แตกกอน้อย ลำต้นสูง จึงเกิดแนวคิดในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาไม่ให้ไวต่อช่วงแสง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยคัดเลือกลักษณะความไม่ไวแสงของข้าว การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่ยึดติดกับยีนไม่ไวแสง Hd1 ในรุ่นที่ 1 ของคู่ผสมระหว่างข้าวไวแสงพันธุ์หอมกระดังงา เป็นพันธุ์รับและข้าวไม่ไวแสงพันธุ์ กข55 เป็นพันธุ์ให้ ผลการทดลองพบเครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์รับหอมกระดังงากับพันธุ์ให้ กข55 และเมื่อตรวจสอบจีโนไทป์ พบว่าเครื่องหมาย RM19776 เป็นตัวคัดเลือกความไม่ไวแสงของข้าวเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR Marker ที่เป็นยีนแฝงยึดติดกับยีนไม่ไวแสง Hd1 ที่แสดงแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างพันธุ์รับหอมกระดังงา กับพันธุ์ให้ กข55 ดังนั้น การใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับยีนไม่ไวแสง Hd1 สามารถใช้ประโยชน์ในการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาไม่ให้ไวแสงต่อไปได้

คำสำคัญ (keywords): ปรับปรุงพันธุ์, ข้าวหอมกระดังงา, ไม่ไวแสง, เครื่องหมายโมเลกุล

Breeding of F_1 Hawm Gra Dang Ngah rice for photoperiod insensitivity by using molecular marker-assisted target

Manlika Jindasing[1] and Suttirak Plonjarean[2]

[1,2]Maejo University – Chumphon, Maejo University Chiang Mai 50290

Abstract

Hawm Gra Dang Ngah rice is a native rice variety planted in Narathiwat Province for a long time. The highlight of this rice is Ylang ylang fragrance and it also has a high nutritional value. The rice is sensitive to light. Rice is not blooming simultaneously crack high stems. The concept of breeding Hawm Gra Dang Ngah rice is not sensitive to light by molecular markers to select the non-sensitivity light phenotype. This experiment was designed to investigate the relationship between molecular markers linked to Hd1 non-sensitivity light gene in F1 generation of the hybrid strain between Hawm Gra Dang Ngah and. RD55 variety. The results showed that the molecular markers exhibited different DNA strands between Hawm Gra Dang Ngah and RD 55. RM19776 was selected as a photoperiod insensitivity of rice as a marker of SSR Marker, a latent gene affixed to the non-Hd1 gene, showing different DNA bands between cultivars of Hawm Gra Dang Ngah and RD55. Therefore, the use of molecular markers related to photoperiod insensitivity Hd1 genes can be used to develop Hawm Gra Dang Ngah rice strains that are not sensitive to light.

Keyword: Breeding, Hawm Gra Dang Ngah rice, photoperiod insensitivity, molecular marker-assisted target

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาไม่ไวแสงชั่วที่ 1 โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลระบุตำแหน่งยีนในการคัดเลือก Breeding of F_1 Hawm Gra Dang Ngah rice for photoperiod insensitivity by using molecular marker-assisted target) ได้รับเงินสนับสนุนงานวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณที่ 2560 ด้วยงบประมาณทั้งสิ้น 330,000.- บาทถ้วน ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ที่เกี่ยวข้องทุกคนในการให้ความร่วมมือในการดำเนินโครงการจนแล้วเสร็จ รวมถึงการเสนอแนะและการแก้ปัญหาในการดำเนินงาน

บัดนี้การดำเนินโครงการวิจัยนี้ได้เสร็จสิ้นเป็นที่เรียบร้อยแล้ว จึงใคร่ขอนำเสนอโครงการวิจัยฉบับนี้ โดยหวังว่ารายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ ในการนี้คณะผู้จัดทำวิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร ที่สนับสนุนการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผู้วิจัย

มัลลิกา จินดาซิงห์

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ค
Abstract	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญภาพ	ช
สารบัญตาราง	ฌ
บทที่ 1 : บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตการวิจัย	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 : เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 : ระเบียบวิธีวิจัย	18
บทที่ 4 : ผลการวิจัย	18
บทที่ 5 : สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	35
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	38

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ภาพถ่ายเจลภายใต้แสง UV ของลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล fragrance marker ตรวจสอบยีโนไทป์ของต้นข้าว (MW) คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100+2000 bp ladder (1-39) ต้นข้าวเจ้าไม่ไวแสงพันธุ์ กข 55	32
2	ภาพที่ 2 ภาพถ่ายเจลภายใต้แสง UV ของลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล fragrance marker ตรวจสอบยีโนไทป์ของต้นข้าว (MW) คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100+2000 bp ladder (1-39) ต้นข้าวเจ้าไวแสงพันธุ์ หอมกระดังงา	32
3	ภาพถ่ายเจลภายใต้แสง UV ของลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล fragrance marker ตรวจสอบยีโนไทป์ของต้นข้าว (MW) คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100+2000 bp ladder (T1) ต้นข้าวเจ้าไวแสงพันธุ์ หอมกระดังงา ที่มียีโนไทป์เป็น Hd1 Hd1 (T2) ต้นข้าวเจ้าไม่ไวแสงพันธุ์ กข 55 ที่มียีโนไทป์เป็น hd1 hd1	32
4	แปลงพันธุ์แม่พันธุ์พ่อ ได้แก่ ข้าวหอมกระดังงา กับข้าวกข 55	33
5	การติดเมล็ดของข้าวระยะเวลาหลังจากการผสมพันธุ์แล้ว 7วัน	33
6	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าว	34
7	เมล็ดพันธุ์ข้าวหอมกระดังงา	39
8	เมล็ดพันธุ์ข้าว กข55	39
9	นำเมล็ดข้าวลงปลูกในกระถาง	40
10	จัดเรียงกระถางข้าว	40
11	การวัดความสูงของข้าว	41
12	อุปกรณ์ในการผสมข้าว	41
13	พันธุ์ข้าวพร้อมผสม	42
14	การตัดดอกข้าวหอมกระดังงาออก	42
15	การทำหมันเกสรตัวผู้ของข้าวหอมกระดังงา	43
16	การผสมพันธุ์	43
17	ติดป้ายแท็กเพื่อระบุสายพันธุ์และวันที่ผสม	44

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	เครื่อง PCR	44
19	เครื่องปั่นเหวี่ยง	45
20	ดีเอ็นเอที่สกัดได้	45
21	ทำเจลอิเล็คโตโฟรีซีส	46
22	ส่องเจล	46
23	การเพาะเมล็ดข้าว	47
24	การเตรียมแปลงปลูกข้าว	48
25	แปลงปลูกข้าว	49

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงความสูงของข้าวพันธุ์หอมกระดังงา และพันธุ์ กข 55 (อายุ 15 วัน)	23
2	แสดงความสูงของข้าวพันธุ์หอมกระดังงา และพันธุ์ กข 55 (อายุ 23 วัน)	23
3	แสดงการเปรียบเทียบปริมาณค่าเฉลี่ยของการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางด้านเคมีในดินครั้งที่ 2	26
4	แสดงการเปรียบเทียบปริมาณค่าเฉลี่ยของการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางด้านเคมีในดินครั้งที่ 3	26
5	แสดงการเปรียบเทียบปริมาณค่าเฉลี่ยของการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางด้านเคมีในดินครั้งที่ 4	26
6	แสดงการเปรียบเทียบปริมาณค่าเฉลี่ยของการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางด้านเคมีในดินครั้งที่ 5	27
7	แสดงการเปรียบเทียบปริมาณค่าเฉลี่ยของการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางด้านเคมีในดินครั้งที่ 6	27

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ข้าวเป็นธัญญาหารหลักของชาวโลกที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสามารถปลูกขึ้นได้ง่ายมีความทนทานต่อทุกสภาพภูมิประเทศ ในพื้นที่จังหวัดชายแดนภาคใต้เกษตรกรยังคงปลูกข้าวพันธุ์พื้นเมืองมากถึง 75% ของพันธุ์ข้าวที่ปลูกทั้งหมด (นิธิศและคณะ, 2555) และจังหวัดนราธิวาสก็เป็นจังหวัดหนึ่งที่เกษตรกรนิยมปลูกข้าวพันธุ์พื้นเมืองเป็นจำนวนมาก ข้าวพันธุ์หอมกระดังงาเป็นพันธุ์ข้าวที่เกษตรกรนิยมปลูกและมีความต้องการเมล็ดพันธุ์มากที่สุด โดยข้าวพันธุ์นี้มีการปลูกในจังหวัดนราธิวาสมาอย่างยาวนาน จุดเด่นของข้าวพันธุ์นี้นอกจากจะมีกลิ่นหอมเหมือนดอกกระดังงาซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะ แล้วยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูง แต่เป็นข้าวที่มีความไวต่อช่วงแสง แตกกอน้อย ลำต้นสูง จึงมีความพยายามในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวใหม่ให้ไม่ไวแสง โดยการนำข้าวพันธุ์กข55 ซึ่งมีลักษณะพันธุ์เป็นข้าวเจ้าที่ไม่ไวต่อช่วงแสงต้นแข็งไม่ล้มง่ายมาเป็นพันธุ์ให้ เนื่องจากอายุวันออกดอกเป็นลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญอย่างหนึ่งในข้าว โดยข้าวแต่ละพันธุ์สามารถปรับตัวให้ปลูกในพื้นที่ และฤดูกาลที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงหาเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้หรือยึดติดกับยีนไม่ไวแสง Hd1 เพื่อใช้ในการคัดเลือกต้นข้าวที่มียีนไม่ไวแสงจากพันธุ์ให้คือ กข55 แต่ให้มีลักษณะต่างๆ เหมือนกับพันธุ์รับคือหอมกระดังงาร่วมการผสมกลับเพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมกระดังงา ให้ไม่ไวต่อช่วงแสง และมีอายุวันออกกดอกที่เหมาะสมต่อไป

ดังนั้นหากสามารถปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาให้เป็นพันธุ์ไม่ไวแสง จะทำให้เกษตรกรสามารถปลูกข้าวหอมกระดังงาได้ตลอดปี

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาให้เป็นข้าวพันธุ์ที่ไม่ไวแสง
2. ได้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับยีนไม่ไวแสงในข้าวหอมกระดังงา

1.3 ขอบเขตการวิจัย

เพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาที่ไวแสงให้เป็นพันธุ์ข้าวที่ไม่ไวแสง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker-assisted) ช่วยในการคัดเลือกและคงลักษณะทางพืชไร่และคุณภาพของข้าวหอมกระดังงาที่ไวแสงไว้ในพันธุ์ข้าวใหม่ (ที่ผสมได้) ที่ไม่ไวแสง โดยระยะที่ 1

(ปีแรก) ทำการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ดอกหอมกระดังงา (พันธุ์ไวแสง) และพันธุ์กข 55 (ไม่ไวแสง) แล้วนำ F_1 ผสมกลับกับพันธุ์ หอมกระดังงา จนได้ประชากรผสมกลับ BC_3F_2 (ปีที่ 3-4)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับด้านวิชาการ ได้ข้าวหอมกระดังงาที่อยู่ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ชั่วที่ 1 จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker-assisted) โดยมีผลงานทางด้านวิชาการ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับด้านนโยบาย เพื่อเสริมสร้างฐานรากของครัวเรือนเกษตรกรให้เข้มแข็ง โดยการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะปลูก การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาการผลิตพืชเศรษฐกิจเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มและนำไปสู่การแข่งขันและการพึ่งพาตนเอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้าว (รวมถึงข้าวพื้นเมือง)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์ สามารถลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ทำให้ได้พันธุ์ข้าวใหม่ในระยะเวลาที่เร็วขึ้นตรงกับความต้องการ และสามารถปลูกข้าวหอมกระดังงาได้ทุกฤดูกาล จึงตอบสนองกับความต้องการทางการตลาด เนื่องจากข้าวหอมกระดังงา มีจุดเด่นด้านคุณค่าทางโภชนาการ โดย พบว่า มีปริมาณโปรตีน ธาตุเหล็ก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากในข้าวกล้อง ปริมาณไขมัน สังกะสี แคลเซียม สาร GABA และสารกลุ่มวิตามินอีมากในข้าวกล้องงอก ส่วนในข้าวสารพบปริมาณของคาร์โบไฮเดรตมาก ทำให้เป็นข้าวที่มีตลาดรองรับ และต้องการในปริมาณที่มาก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับด้านสังคม เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับเกษตรกรที่จะนำข้าวพันธุ์ใหม่มาใช้ ที่สามารถตอบสนองต่อความต้องการของเกษตรกรที่สามารถปลูกได้ตลอดปี มีผลผลิตสูง อายุสั้น ต้านทานต่อโรค และผู้บริโภคที่สามารถมีข้าวพันธุ์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงตรงกับความต้องการในปัจจุบัน

หน่วยงานวิจัยที่นำไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ กรมการข้าว กรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัย กรมส่งเสริมการเกษตร

บทที่ 2
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง นำเสนอรายละเอียดดังนี้

พันธุ์ข้าวหอมกระดังงาเป็นพันธุ์ข้าวยอดนิยมชายแดนใต้ และเป็นข้าวที่ประชากรในพื้นที่จังหวัดชายแดนภาคใต้นิยมบริโภค เกษตรกรจึงมีการปลูกกันอย่างกว้างขวางและมีผลให้เกิดการซื้อขายในตลาดท้องถิ่น ตลอดจนเป็นพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ ภูมิอากาศ และสภาพของดินในเขตจังหวัดชายแดนภาคใต้ ในแง่ของงานวิจัยข้าวอาจรวมความถึงพันธุ์ข้าวที่ให้ผลผลิตสูง ต้านทานต่อโรคและแมลง มีความเหมาะสมกับสภาพพื้นที่ปลูกและมีคุณภาพเมล็ดดีตรงกับรสนิยมของผู้บริโภค ซึ่งพันธุ์ข้าวยอดนิยมดังกล่าวอาจเป็นพันธุ์ส่งเสริมซึ่งได้รับการศึกษาวิจัยและแนะนำให้เกษตรกรปลูกอย่างกว้างขวางแล้ว หรือพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่ยังไม่ได้รับการศึกษาวิจัยและส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกมาก่อน ได้มีการสำรวจข้อมูลพื้นที่และความต้องการพันธุ์ข้าวของเกษตรกรด้วย ผลการสำรวจพบว่า เกษตรกรยังมีความต้องการใช้พันธุ์ข้าวพื้นเมืองถึง 75% และเป็นพันธุ์พื้นเมืองที่หลากหลายตามความเหมาะสมของพื้นที่ในแต่ละจังหวัด ศูนย์วิจัยข้าวปัตตานี พบว่า พันธุ์ข้าวหอมกระดังงานี้เกษตรกรนิยมปลูกกันอย่างกว้างขวางในพื้นที่จังหวัดนราธิวาสและปัตตานีบางส่วน ดังนั้นจึงจัดได้ว่า ข้าวพันธุ์หอมกระดังงา เป็นพันธุ์ข้าวยอดนิยมของจังหวัดชายแดนภาคใต้

ข้าวพันธุ์หอมกระดังงา (PTNC09002-59) ได้เก็บรวบรวมพันธุ์ในปี 2552 นำมาปลูกเพื่อศึกษาคัดเลือกพันธุ์ ในฤดูนาปี 2552 และส่งตัวอย่างข้าวไปศึกษาวิเคราะห์คุณภาพเมล็ดที่ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานีในปี 2553 พบว่า ต้นสูง 159 ซม. ออกดอกประมาณ 15 กุมภาพันธ์ ทรงกอตั้ง จำนวนรวง 10 รวง/กอ ยอดดอกสีม่วง กลีบรองดอกสีม่วง ยอดเกสรตัวเมียสีขาว ข้าวเปลือกสีฟาง ยาว 8.97 มม. เป็นข้าวกล้องสีแดง ยาว 6.20 มม. ปริมาณอมิโลสปริมาณอมิโลสปานกลาง 22.69 % มีกลิ่น ความคงตัวของแป้งสุกแข็ง อุณหภูมิแป้งสุกปานกลาง ข้าวสุกมีลักษณะร่วนแต่ไม่แข็ง และมีกลิ่นหอมเป็นเอกลักษณ์ ลักษณะเด่นที่กล่าวมาจึงเป็นพันธุ์ข้าวที่นิยมปลูกในจังหวัดนราธิวาสและมีการผลิต เป็นสินค้าจำหน่ายแล้ว ยังมีจุดเด่นด้านคุณค่าทางโภชนาการ โดยพบว่า มีปริมาณโปรตีน ธาตุเหล็ก และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากในข้าวกล้อง ปริมาณไขมัน สังกะสี แคลเซียม สาร GABA และสารกลุ่มวิตามินอีมากในข้าวกล้องงอก ส่วนในข้าวสารพบปริมาณของคาร์โบไฮเดรตมาก แต่จุดอ่อนของข้าวพันธุ์หอมกระดังงานี้ คือ เป็นข้าวเจ้าสีแดงที่ไวต่อช่วงแสง

ข้าวหอมกระดังงา

ข้าวหอมกระดังงา เป็นข้าวพื้นเมืองดั้งเดิมของชาวนราธิวาส โดยข้าวพันธุ์นี้มีการปลูกในจังหวัดนราธิวาสมาอย่างยาวนาน พื้นที่ปลูกส่วนใหญ่อยู่ที่บ้านโคกอิฐ-โคกใน ตำบลพร่อน อำเภอตากใบ จังหวัดนราธิวาส มีพื้นที่ปลูกประมาณ 3,000 ไร่ จุดเด่นของข้าวพันธุ์นี้นอกจากจะมีกลิ่นหอมเหมือนดอกกระดังงาซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะแล้ว ยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูงรักษาโรคภัยไข้เจ็บได้เมื่อบริโภคในรูปแบบข้าวกล้องและข้าวซ้อมมือ ภาษามาเลย์เรียกว่า ซีบูกันตัง ตอนแรกผลผลิตต่อไร่ไม่สูงนัก เฉลี่ยอยู่ที่ 300-450 กิโลกรัมต่อไร่ เนื่องจากสภาพปัญหาดินเปรี้ยว แต่หลังจากศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทองอันเนื่องมาจากพระราชดำริ ประสบความสำเร็จในการแก้ปัญหาดินเปรี้ยวตามแนวพระราชดำริจึงได้นำมาขยายผลในพื้นที่ดังกล่าวทำให้ปัจจุบันผลผลิตข้าวหอมกระดังงาเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 650-700 กิโลกรัมต่อไร่ (สมบูรณ์, 2551)

ข้าวหอมกระดังงา อยู่ในกลุ่มข้าวอินดิกา (Indica) หรือข้าวเจ้า เป็นข้าวที่มีลักษณะเมล็ดเรียวยาวรี ลำต้นสูง ตั้งชื่อมาจากแหล่งที่ค้นพบครั้งแรกในประเทศอินเดีย เป็นข้าวที่นิยมเพาะปลูกในทวีปเอเชียเขตมรสุม ตั้งแต่ จีน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ไทย อินโดนีเซีย ไปจนถึงอินเดียและศรีลังกา และแพร่กระจายไปทั่งเขตอุษาอาคเนย์ตั้งแต่หลัง พ.ศ.1000 ทั่งเขตลุ่มน้ำอิระวดี และแพร่ขยายเพาะปลูกในทวีปอเมริกา ในเมืองไทย ข้าวอินดิกานิยมเพาะปลูก ในบริเวณที่ราบลุ่มตอนใต้ของแม่น้ำเจ้าพระยา เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วแทนข้าวเหนียวที่เคยปลูก ซึ่งคนไทยสมัยนั้นเรียกข้าวอินดิกาที่มาจากต่างประเทศ ว่า "ข้าวของเจ้า" แล้วเรียกกันสั้นลงเหลือเพียง " ข้าวเจ้า" มาถึงทุกวันนี้ (ปิยะนันท์, 2543)

ลักษณะประจำพันธุ์

ข้าวหอมกระดังงาเป็นพันธุ์ข้าวประเภทไวต่อช่วงแสง ใช้วิธีการปลูกแบบปักดำมีลักษณะทรงกอตั้ง

ลำต้น ความสูงของลำต้น 159 เซนติเมตร ปล้องเป็นสีเขียวมีเส้นม่วง ลำต้นค่อนข้างแข็ง

ใบ แผ่นใบสีเขียวกาบใบสีเขียวมุมปลายใบตั้งตรงมีขนบนแผ่นใบบ้าง ความยาวของใบ 59.2 เซนติเมตร กว้าง 1.40 เซนติเมตร การแก่ของใบปานกลาง ลิ้นใบสีขาว รูปร่างมี 2 ยอด ยาว 2.10 มิลลิเมตรหูใบสีเขียวอ่อนข้อต่อใบสีเขียวอ่อน ใบธงมีมุมเป็นแนวนอนความยาว 59.2 เซนติเมตร กว้าง 1.40 เซนติเมตร

รวง รวงมีความยาว 28.0 เซนติเมตรลักษณะรวงค่อนข้างแน่นการแตกระแง้ถี่การยืดของคอรวงยาวจำนวนเมล็ดดีต่อรวง 213 เมล็ด ติดเมล็ดดี (มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์) การร่วงของเมล็ดน้อย การนวดปานกลาง

ดอก ยอดเกสรตัวเมียมีสีขาว ปลายยอดดอกสีม่วงกลีบดอกสีม่วงเมล็ดไม่มีหางข้าว สีของหางข้าวไม่มีสีของยอดเมล็ดสีฟาง ขนบนเปลือกเมล็ดสั้นความยาวกลีบรองดอก 2.00 มิลลิเมตร สีของกลีบรองดอกสีฟางน้ำหนักข้าวเปลือก 1,000 กรัม เมล็ด 20.8 กรัม

คุณภาพเมล็ด

เปลือกเมล็ดของข้าวหอมกระดังงามีลักษณะสีฟาง ข้าวกล้องมีสีแดง การเป็นท้องไข่น้อย (0.12) ขนาดของเมล็ดข้าวเปลือกยาว 9.13 มิลลิเมตร กว้าง 2.75 มิลลิเมตรหนา 1.97 มิลลิเมตร ขนาดของเมล็ดข้าวกล้อง ยาว 6.41 มิลลิเมตร กว้าง 2.33 มิลลิเมตร หนา 1.83 มิลลิเมตร อัตราส่วนความยาวและความกว้าง 2.75 มิลลิเมตร มีรูปร่างป้านกลาง ขนาดของเมล็ดข้าวขาว ยาว 6.21 มิลลิเมตร กว้าง 2.22 มิลลิเมตร หนา 1.75 มิลลิเมตร

คุณภาพการสี

ข้าวเต็มเมล็ดและต้นข้าวมีปริมาตร 32.0 เปอร์เซ็นต์ แกลบ 23.4 เปอร์เซ็นต์ รำ 11.2 เปอร์เซ็นต์

คุณภาพเมล็ดทางเคมี

มีอะมิโลสในเมล็ดข้าวหอมกระดังงาปริมาณปานกลาง (22.7 + 0.35 เปอร์เซ็นต์) โปรตีนในข้าวกล้องปริมาณ 8.50 + 0.23 เปอร์เซ็นต์ ความคงตัวของแป้งสุกมีลักษณะแข็ง (370+4.07 มิลลิเมตร) มีค่าการสลายเมล็ดในด่าง (1.7 เปอร์เซ็นต์ KOH) 6.00 อุณหภูมิแป้งสุก (ประเมินจากค่าการสลายเมล็ดในด่าง) ต่ำ อัตราการยืดตัวของข้าวสุก 1.61 เท่า

ลักษณะเด่น

1. เป็นพันธุ์ข้าวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีแดง ข้าวกล้องเมื่อหุงสุกนุ่มเล็กน้อย ส่วนข้าวซ้อมมือเมื่อหุงสุกมีความนุ่ม

2. มีปริมาณธาตุแคลเซียมในข้าวกล้องสูงกว่าข้าวสายพันธุ์อื่น และมีปริมาณไฟเตทต่ำกว่าข้าวหลายสายพันธุ์

พื้นที่แนะนำ

สภาพนาสวนนาน้ำฝนในพื้นที่ 5 จังหวัดชายแดนภาคใต้

ข้อควรระวังหรือข้อจำกัด

ควรหลีกเลี่ยงการปลูกในพื้นที่และช่วงเวลาปลูกที่มีการระบาดของโรคไหม้และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เนื่องจากเป็นพันธุ์ข้าวที่ไม่ต้านทานต่อศัตรูข้าวดังกล่าว

ข้าวกข 55

ข้าว กข 55 ได้จากการผสมแบบ 3 ทาง ระหว่าง กข 23/เล็บนกปัตตานี/ชัยนาท 1 ที่ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง ปี 2543 ต่อมาปี 2545 ถึงปี 2547 คัดเลือกข้าวพันธุ์ผสม ตั้งแต่ชั่วที่ 2 ถึงชั่วที่ 6 ได้สายพันธุ์ PTL00042-B-B-18-2-1 ปี 2548 ถึงปี 2550 ทำการปลูกศึกษาพันธุ์ขั้นต้นและขั้นสูงและคัดเลือกต่อจนได้สายพันธุ์ PTL00042-B-B-18-2-1-1-2 เปรียบเทียบผลผลิตภายในสถานี ปี 2551 เปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสถานีและปี 2552 ถึง ปี 2554 เปรียบเทียบผลผลิตในนาราษฎร์ จังหวัดพัทลุง สงขลา ปัตตานี กระบี่ และนครศรีธรรมราชทดสอบเสถียรภาพการให้ผลผลิต และทดสอบในนาเกษตรกร ที่จังหวัดพัทลุง และนครศรีธรรมราช ปี 2553 ถึงปี 2554 (นาปีและนาปรัง)

ลักษณะประจำพันธุ์

- เป็นข้าวเจ้า ไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นสูงประมาณ 91 เซนติเมตร
- อายุเก็บเกี่ยว 117 วัน เมื่อปลูกโดยวิธีปักดำ และ 104 วัน เมื่อปลูกโดยวิธีหว่านน้ำตม
- ทรงกอตั้ง ต้นแข็งไม่ล้มง่าย ใบสีเขียว กาบใบสีเขียว ใบธงตั้ง คอรวงยาว
- เมล็ดข้าวเปลือกสีฟาง ข้าวกล้องสีขาว เป็นท้องไข่น้อย
- เมล็ดข้าวเปลือก ยาว x กว้าง x หนา = 10.50 x 2.33 x 1.86 มิลลิเมตร
- เมล็ดข้าวกล้อง ยาว x กว้าง x หนา = 7.53 x 2.02 x 1.70 มิลลิเมตร
- เมล็ดข้าวขาว ยาว x กว้าง x หนา = 7.20 x 2.01 x 1.65 มิลลิเมตร
- คุณภาพการสี ได้ข้าวเต็มเมล็ดและต้นข้าว ร้อยละ 51.3
- ปริมาณอะมิโลสปานกลาง (23.8%)
- คุณภาพข้าวสุกมีลักษณะไม่เหนียว ไม่ร่วน และค่อนข้างนุ่ม ไม่มีกลิ่นหอม
- ระยะพักตัวของเมล็ดประมาณ 7 สัปดาห์
- ผลผลิตเฉลี่ย 712 กิโลกรัม/ไร่ (ผลผลิตมีศักยภาพสูงถึง 825 กิโลกรัม/ไร่)

ลักษณะเด่น

- พันธุ์ข้าว กข55 ให้ผลผลิตมีศักยภาพสูง
- ต้านทานโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง และโรคใบจุดสีน้ำตาล

ข้อควรระวังหรือข้อจำกัด

ไม่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ควรหลีกเลี่ยงพื้นที่ที่มีการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เป็นประจำ

การปรับปรุงพันธุ์ข้าว

พันธุ์ข้าวที่ดีจะให้ผลิตผลสูง และมีคุณภาพดีกว่าพันธุ์ข้าวที่ไม่ดี และเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่า พันธุ์ข้าวที่ดีเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ สำหรับการเกษตรแผนใหม่ ซึ่งการเกษตรแผนใหม่มีจุดประสงค์ที่จะปลูกพืชที่ตลาดต้องการ ให้ได้ผลิตผลสูง และทำรายได้ที่คุ้มค่าให้กับเกษตรกรผู้ปลูก การเกษตรแผนใหม่ มีองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้

- ปลูกพืชพันธุ์ดี และเหมาะสมกับท้องถิ่น
- การใส่ปุ๋ยบำรุงดิน
- การปราบวัชพืช
- การป้องกันกำจัดโรค และแมลงศัตรูพืช
- ชลประทาน เพื่อให้มีน้ำเพียงพอกับความต้องการของพืช

โดยเหตุนี้การปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้ข้าวพันธุ์ดี จึงมีความสำคัญยิ่ง และการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้มีมาตั้งแต่สมัยโบราณ เพราะมนุษย์มีนิสัยอยากจะได้ของที่ดียิ่งๆ ขึ้นไป อย่างไรก็ตาม วิธีการปรับปรุงพันธุ์ในสมัยก่อน และในสมัยปัจจุบันนั้น มีความแตกต่างกันมากมาย เพราะมนุษย์ในปัจจุบันได้เรียนรู้ถึงวิชาการต่างๆ มากกว่าในสมัยก่อน ฉะนั้นวิธีการปรับพันธุ์ข้าวในปัจจุบัน จึงดีกว่าสมัยก่อน สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เป็นผู้ดำเนินงาน ซึ่งวิธีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวพอสรุปได้ดังนี้

1. การเอาพันธุ์ข้าวจากท้องที่ต่างๆ

เข้ามาปลูกเป็นที่ทราบกันว่า พันธุ์ข้าวที่ปลูกในท้องที่ต่างๆ ภายในประเทศ หรือพันธุ์ข้าวที่ปลูกในประเทศต่างๆ นั้น มีความแตกต่างกัน ทั้งลักษณะภายนอกและพันธุกรรม จึงสมควรเอามาปลูกเพื่อศึกษาลักษณะต่างๆ ของมัน จากการศึกษาพบว่า พันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ ซึ่งเอามาจากท้องที่อำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา ซึ่งอยู่ในภาคกลาง เมื่อเอาไปปลูกในท้องที่จังหวัดสุรินทร์ จะให้ผลิตผลสูง และคุณภาพเมล็ดได้มาตรฐาน เหมาะกับสภาพของท้องถิ่น จนกระทั่งบัดนี้พันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ ได้มีการปลูกกันอย่างแพร่หลาย ในจังหวัดต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในทำนองเดียวกันพันธุ์ข้าวเหนียวสันป่าตอง จากอำเภอ สันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ เมื่อเอาไปปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือก็ให้ผลิตผลสูงและคุณภาพเมล็ดได้มาตรฐาน นี่คือผลดีของการเอาพันธุ์ข้าวจากท้องที่หนึ่ง ไปทดลองปลูกเพื่อศึกษาในอีกท้องที่หนึ่ง ซึ่งเป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์

ที่เรียกว่า อินโทรดักชัน (introduction) นอกจากนี้เรายังได้พบพันธุ์ข้าวไออาร์ 8 (IR8) จากสถาบันวิจัยข้าวระหว่างชาติ ณ ประเทศ ฟิลิปปินส์ ซึ่งมีความต้านทานต่อโรคใบสีส้ม ต้นเตี้ย ให้ผลิตผลสูงเมื่อใส่ปุ๋ยมากขึ้น เมื่อเอาพันธุ์นี้ผสมกับพันธุ์ไทยชื่อเหลืองทอง ซึ่งมีลำต้นสูง ไม่ต้านทาน โรคใบสีส้ม คุณภาพเมล็ดได้มาตรฐาน จะให้ลูกผสมที่ดี จนสามารถคัดเลือกได้สายพันธุ์ดีที่ให้ผลิตผลสูง ต้าน ทานโรคใบสีส้ม คุณภาพเมล็ดได้มาตรฐาน และตอบสนองต่อปุ๋ยสูง ซึ่งสายพันธุ์ดีนี้ต่อมาได้ออกขยายให้ ชาวนาปลูก ชื่อ กข1 ขณะนี้ชาวนาโดยเฉพาะผู้ปลูกข้าวนาปรัง ได้รู้จักข้าว กข1 เป็นอย่างดี ฉะนั้นพันธุ์ข้าวที่เอามาจากท้องที่ต่างๆ ทั้งภายในและภายนอกประเทศนั้นอาจใช้เป็นพันธุ์ดีสำหรับปลูกหรือใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ในการผสมพันธุ์ก็ได้

2. การคัดเลือกพันธุ์

ปกติพันธุ์ข้าวที่เอามาจากท้องถิ่นต่างๆ นั้น มีจำนวนมาก จนไม่สามารถคัดเลือกได้ทันทีว่าพันธุ์ใดดี พันธุ์ใดไม่ดี ด้วยเหตุนี้จึงต้องเอาพันธุ์เหล่านั้นมาปลูก ทดสอบและเปรียบเทียบเพื่อคัดเลือก ซึ่งการคัดเลือกก็มีหลายวิธีด้วยกันดังนี้

2.1 การคัดเลือกพันธุ์หมู่ (mass selection) โดยเอา เมล็ดพันธุ์ของแต่ละพันธุ์มาปลูก เพื่อคัดเลือกหาต้นที่ มีลักษณะดีและเหมือนกันไว้เป็นจำนวนมาก แล้วเก็บ เกี่ยวเมล็ดจากต้นเหล่านี้รวมกัน เพื่อปลูกเปรียบเทียบ และทดสอบหาพันธุ์ที่ดีที่สุด เช่น ให้ผลิตผลสูง คุณภาพ เมล็ดได้มาตรฐาน ต้านทานต่อโรคและแมลงที่สำคัญๆ

2.2 การคัดเลือกพันธุ์แท้ (pure line selection) พันธุ์แท้ หมายถึง กลุ่มของต้นลูกที่เกิดจากการผสมตัว เองในต้นเดียวกัน และต่างก็มีลักษณะเหมือนต้นเดิม ฉะนั้น การคัดเลือกแบบนี้จึงเป็นการคัดเลือกหาต้นที่ มีลักษณะดี แต่ละต้นที่คัดเลือกเก็บเกี่ยวเมล็ดแยกกัน เพื่อเอาไปปลูกทดสอบเป็นสายพันธุ์ต่างๆ และสายพันธุ์ที่ดีเท่านั้น จะได้รับการคัดเลือก เช่น สายพันธุ์ที่ให้ผลิตผลสูง คุณภาพเมล็ดได้มาตรฐาน ต้านทานต่อโรคและแมลงที่สำคัญๆ และทุกต้นในสายพันธุ์มีลักษณะเหมือนกัน

3. การผสมพันธุ์

พันธุ์ข้าวที่ได้มาจากท้องถิ่นต่างๆ ทั้งภายในและภายนอกประเทศ ส่วนใหญ่จะเป็นพันธุ์ที่มีลักษณะดี เพียงลักษณะหนึ่งลักษณะใดเท่านั้น พันธุ์เหล่านี้จึงไม่ดีพอที่จะขยายพันธุ์ให้ชาวนาปลูกได้ เช่น พันธุ์ที่ต้าน ทานโรคมักจะให้ผลิตผลต่ำหรือคุณภาพเมล็ดไม่ได้มาตรฐาน หรือพันธุ์ที่ให้ผลิตผลสูงก็มักจะไม่ต้านทานโรคฉะนั้นต้องเอาพันธุ์ที่มีลักษณะดีคนละอย่างมาผสมกัน เพื่อจะได้รวมเอาลักษณะดีต่างๆ ไว้ในต้นหรือพันธุ์เดียวกัน ซึ่งจะได้เป็นพันธุ์ที่ให้ผลิตผลสูง คุณภาพเมล็ดได้มาตรฐานและต้านทานโรค แต่ต้นข้าวเป็นพืชพวกผสมตัวเองและเมื่อผสมกันแล้ว ต้นลูกในชั่วที่ 2 จะมีการกระจายตัวมาก และการกระจายตัวนี้จะลดน้อยลงเรื่อยๆ จนถึงชั่วที่ 5 ซึ่งจะมีการ

กระจายตัวน้อยที่สุด สมมุติเอาพันธุ์ต้านทานโรคผสมกับพันธุ์ไม่ต้านทานโรค ต้นลูกผสมชั่วที่ 1 ทุกต้นจะมีลักษณะเหมือนกัน คือ ทุกต้นต้านทานโรคหรือทุกต้น ไม่ต้านทานโรค เมื่อเอาเมล็ดจากต้นเหล่านี้ไปปลูกเป็น ชั่วที่ 2 มันก็จะกระจายตัวออกเป็นต้นที่ต้านทานโรค และต้นที่ไม่ต้านทานโรค และเมื่อเอาต้นที่ต้านทานไป ปลูกชั่วที่ 3 มันก็จะกระจายตัวออกเป็นต้นต้านทานและ ต้นไม่ต้านทาน ซึ่งการกระจายตัวนี้น้อยกว่าในชั่ว ที่ 2 และเมื่อคัดเลือกเอาเฉพาะต้นที่ต้านทานไว้ปลูก ในทุกชั่วของข้าวลูกผสม ก็จะได้เป็นพันธุ์แท้ที่ต้านทานในชั่วที่ 5 หรือชั่วที่ 6 ซึ่งไม่มีการกระจายตัวเหลืออยู่อีกเลย ดังนั้นการปลูกคัดเลือกข้าวลูกผสม จึงมี 2 วิธี ดังนี้

3.1 การคัดเลือกแบบหมู่ (bulk method) หมายถึง การเอาข้าวลูกผสมมาปลูก โดยไม่มีการคัดเลือกใน ชั่วที่ 2, 3 และ 4ทั้งนี้เพราะข้าวลูกผสมมีการกระจาย ตัวมากในระหว่างนี้ แต่จะทำการคัดเลือกในชั่วที่ 5 หรือชั่วที่ 6 ซึ่งเป็นชั่วที่มีการกระจายตัวน้อยหรือไม่มี การกระจายตัวเลย แล้วเอาต้นที่คัดเลือกไปปลูกเป็น สายพันธุ์ เพื่อทดสอบและเปรียบเทียบหาสายพันธุ์ดีต่อไป

3.2 การคัดเลือกแบบสืบตระกูล (pedigree method) การเอาข้าวลูกผสมมาปลูกโดยมีการคัดเลือกต้นตั้งแต่ชั่วที่ 2,3 และ 5 โดยคัดเลือกเอาต้นที่มีลักษณะดีไปปลูกเป็นสายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกหาสายพันธุ์ ดีและต้นที่ดีในสายพันธุ์ดีต่อไปเรื่อยๆ จนถึงชั่วที่ 5 หรือ 6 ซึ่งในที่สุดก็จะได้สายพันธุ์ดีที่ไม่มีการกระจายตัว การคัดเลือกแบบนี้ได้ผลดีมาก แต่สิ้นเปลืองแรงงานมากกว่าวิธีแรก

4. การชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม โดยใช้สารเคมีหรือกัมมันตภาพรังสี

เนื่องจากสารเคมีบางจำพวก เช่น เอทีลีนไอมีน (ethylene imine EI) และเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate, EMS) และกัมมันตภาพรังสี เช่น เอกซเรย์ (X-rays) แกมมาเรย์ (gamma-rays) สามารถทำให้ส่วนประกอบของโครโมโซมเปลี่ยนแปลง ไปจากเดิม จนมีผลให้ต้นพืชนั้นมีพันธุกรรมผิดไปจากเดิม จึงแสดงออกเป็นลักษณะใหม่ที่ไม่เคยมีในพันธุ์นั้น มาก่อนเลย เพื่อเปิดโอกาสให้นักบำรุงพันธุ์พืชได้คัดเลือกเอาลักษณะใหม่ที่ดีไว้ ลักษณะใหม่ที่ได้นี้อาจไม่ เคยมีในโลกนี้มาก่อนก็ได้

วิธีการผสมพันธุ์ข้าว

การผสมพันธุ์ข้าวเป็นวิธีการสร้างข้าวพันธุ์ใหม่ที่รวมลักษณะเด่นต่างๆ ไว้ในพันธุ์เดียวกัน หลักสำคัญของการผสมพันธุ์คือ การสร้างความผันแปรที่เกิดจากการจับคู่ใหม่ของยีน ซึ่งจะทำให้เกิดลักษณะแตกต่างกันจำนวนมากมายในรุ่นลูกรุ่นหลาน ลักษณะความแตกต่างดังกล่าวจะมีทั้งลักษณะดีกว่าหรือด้อยกว่าพ่อแม่ ซึ่งสามารถคัดเลือกแยกออกจากกันได้โดยการนำข้าวลูกผสมที่ได้มาปลูกคัดเลือกหาพันธุ์ข้าวที่มีคุณสมบัติหรือคุณลักษณะที่ต้องการปลูกคัดเลือกประมาณ 6-8 รุ่น ทั้งนี้เพื่อความนิ่งทางสายพันธุ์ ขณะเดียวกันจำเป็นต้องมีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ด คุณภาพการ

หุงต้มไปพร้อมกัน หลังจากผ่านขั้นตอนการตรวจสอบ รับรองพันธุ์แล้วจึงจะได้ข้าวพันธุ์ใหม่ตามที่ต้องการ

ขั้นตอนการปฏิบัติการผสมพันธุ์ข้าว

1. การเตรียมพ่อแม่พันธุ์ข้าว

ขั้นตอนการเตรียมพ่อแม่พันธุ์ข้าวประกอบด้วยขั้นตอนตั้งแต่ การรวบรวมพันธุ์ การกำหนดวัตถุประสงค์หรือเป้าหมายในการผสมพันธุ์ การเตรียมพ่อแม่พันธุ์ และการปลูกพ่อแม่พันธุ์ ในแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้

1.1 การรวบรวมพันธุ์

ต้องมีการรวบรวมพันธุ์และนำมาปลูกทดสอบเพื่อศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ข้าวแต่ละพันธุ์ การให้ผลผลิต ความสามารถในการต้านทานโรคแมลงซึ่งสามารถนำข้อมูลประกอบในการคัดเลือกเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ต่อไป

1.2 การกำหนดวัตถุประสงค์หรือเป้าหมายในการผสมพันธุ์

คือการกำหนดความต้องการพันธุ์ข้าวในอุดมคติ หรือพันธุ์ข้าวในฝันนั่นเอง หลักเกณฑ์ทั่วไปในการกำหนดวัตถุประสงค์เพื่อให้ตอบสนองต่อระบบการผลิต เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ปลูก การให้ผลผลิตดี คุณภาพเมล็ด คุณภาพการหุงต้มรสชาติดี สามารถต้านทานโรคและแมลง สามารถปลูกได้ไม่จำกัดฤดูกาล เป็นต้น

1.3 การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์

หัวใจสำคัญของการผสมพันธุ์ข้าวคือ จะต้องทราบข้อมูลลักษณะประจำพันธุ์ ข้อดี ข้อด้อยของข้าวแต่ละพันธุ์ เพื่อใช้ในการคัดเลือกเป็นพ่อแม่พันธุ์ และการกำหนดคู่ผสมให้ตรงตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้ เช่น ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวชนิดข้าวเจ้า ปลูกได้ปีละครั้ง คุณภาพเมล็ดดี การหุงต้มมีกลิ่นหอมรสชาติดี ต้นสูง ล้มง่าย ผลผลิตต่ำ ไม่ตอบสนองต่อปุ๋ยเคมี การคัดเลือกพันธุ์ที่จะใช้เป็นคู่ผสมจะต้องเพิ่มเติมข้อด้อยของพันธุ์ดังกล่าว เช่น ลำต้นแข็งแรงไม่ล้มง่าย ผลผลิตดี สามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี เป็นต้น

1.4 การปลูกพ่อแม่พันธุ์

หลังผ่านการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์แล้ว นำเมล็ดที่ได้มาปลูกในแปลงนาหรือในกระถาง การปลูกแต่ละพันธุ์ควรปลูกหลายรุ่น แต่ละรุ่นทิ้งช่วงห่างประมาณ 2 สัปดาห์ ทั้งนี้เพื่อป้องกันหรือลดความเสี่ยงในคู่ผสมที่ออกรวงไม่พร้อมกัน และให้สามารถผสมซ้ำในกรณีผสมไม่ติด กรณีที่ปลูกในแปลงนาควรย้ายปลูกลงกระถางก่อนข้าวออกรวงเพื่อความสะดวกในการปฏิบัติงาน

2. การผสมพันธุ์ข้าว

ขั้นตอนการผสมพันธุ์ข้าวต้องมีการเตรียมเครื่องมือ อุปกรณ์สำหรับการผสมพันธุ์ข้าว หลังจากนั้นจึงจะทำการตอนกำจัดเกสรตัวผู้ การผสมพันธุ์หรือการถ่ายละอองเกสร และการเก็บเกี่ยว มีรายละเอียดดังนี้

2.1 การเตรียมเครื่องมือ อุปกรณ์ ประกอบด้วย ดังนี้

1.กรรไกร
2.ปากคีบ
3.กระดาษแก้ว
4.คลิป
5.แผ่นป้ายพลาสติก
6.ดินสอดำ
7.แว่นขยาย

2.2 การกำจัดเกสรตัวผู้

เนื่องจากข้าวเป็นพืชผสมตัวเอง การที่จะผสมกับข้าวพันธุ์อื่นจำเป็นจะต้องกำจัดเกสรตัวผู้ออกก่อน เสร็จแล้วจึงนำเกสรตัวผู้จากพันธุ์อื่นมาผสม ต้นหรือรวงที่ถูกกำจัดเกสรตัวผู้ออกไปแล้วเรียกว่าต้นแม่พันธุ์วิธีการตอนกำจัดเกสรตัวผู้ เลือกรวงที่โผล่พ้นกาบใบธงประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ เลือกตัดดอกข้าวที่คาดว่าจะบานในวันรุ่งขึ้นโดยใช้กรรไกรตัดดอกประมาณ 1 ใน 3 ส่วนของเมล็ด จากนั้นใช้ปากคีบ เขี่ยเกสรตัวผู้ทั้ง 6 อันออกให้หมด ในหนึ่งรวงเลือกตอนประมาณ 20-30 ดอก หลังตอนเสร็จใช้ถุงกระดาษแก้วคลุมรวงไว้ใช้คลิปหนีบถุงอีกครั้ง อาจใช้ไม้ไผ่ทำหลักประคองเพื่อป้องกันไม่ให้รวงหัก

2.3 การผสมพันธุ์หรือการถ่ายละอองเกสร

ปกติดอกข้าวจะบานและมีการถ่ายละอองเกสรช่วงเวลาประมาณ 8.00-12.00 น.ซึ่งจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์ อุณหภูมิแสงแดด ดอกข้าวจะไม่บานในวันที่อากาศหนาวเย็นหรือวันที่มีฟ้ามืดครึ้ม

วิธีการผสม

นำกระถางข้าวพ่อพันธุ์ที่ดอกกำลังบานหรือตัดช่อดอกพ่อพันธุ์ใส่ขวดแช่น้ำเตรียมรอไว้ เมื่อดอกข้าวเริ่มบานเกสรตัวผู้ทั้ง 6 อันจะเริ่มโผล่ชูอับละอองเกสรที่อยู่ส่วนบนก้านเกสรตัวผู้พร้อมที่จะแตก ซึ่งจะสังเกตลักษณะเป็นผงฝุ่นละอองสีเหลือง จากนั้นเปิดถุงคลุมรวงต้นแม่พันธุ์ออก แล้วนำช่อดอกตัวผู้ที่กำลังบานมาเคาะให้ฝุ่นละอองสีเหลืองตกใส่ดอกแม่พันธุ์ หรืออาจใช้ปากคีบคีบดอกข้าวพ่อพันธุ์ที่กำลังบานนำมาเคาะใส่ในดอกต้นแม่พันธุ์ที่กำลังบาน การตรวจสอบหากสังเกตเห็นฝุ่นละอองสีเหลืองเกาะบนยอดเกสรตัวเมียของต้นแม่พันธุ์แสดงว่าการถ่ายละอองในครั้งนั้นเสร็จแล้ว หลังจากนั้นใช้ถุงกระดาษครอบรวงไว้เหมือนเดิม ผูกป้ายชื่อ พ่อแม่พันธุ์คู่ผสม วัน เดือน ปี ที่ทำการผสม หากเกสรตัวผู้ไม่เพียงพออาจผสมซ้ำอีก 1-2 วัน หลังการผสมแล้ว 1 สัปดาห์

สามารถตรวจสอบความสำเร็จได้ หากผสมติดรังไข่จะพัฒนาเป็นเมล็ดข้าว หลังจากนั้น 25-30 วัน สามารถเก็บเกี่ยวได้ตามปกติ

2.4 การเก็บเกี่ยว

2.4.1 ก่อนเก็บเกี่ยวควรตรวจสอบ ป้ายชื่อ พันธุ์ว่าอยู่ครบหรือไม่

2.4.2 เก็บเกี่ยวใส่ถุงกระดาษ นำไปผึ่งแดดให้แห้งประมาณ 1-2 แดด

2.4.3 แช่ตู้เย็นไว้ประมาณ 2 สัปดาห์เพื่อทำลายการพักตัวของเมล็ดข้าว

การปรับปรุงพันธุ์เป็นกระบวนการเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีตรงตามความต้องการ เช่น ผลผลิตสูง ผลผลิตมีคุณภาพ ต้านทานต่อโรคและแมลง เป็นต้น โดยการประเมินลักษณะและการคัดเลือกสายพันธุ์มักใช้วิธีสังเกตลักษณะสัณฐานวิทยา (morphological character) หรือลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ซึ่งลักษณะที่ปรากฏเป็นผลจากการแสดงออกของจีโนไทป์ (genotype) และมีผลกระทบของสภาพแวดล้อมที่สิ่งมีชีวิตเจริญเติบโตในช่วงเวลานั้น (จรัสศรี, 2548) ดังนั้น การใช้ลักษณะที่ปรากฏจำแนกสิ่งมีชีวิตจึงอาจไม่เพียงพอในการคัดเลือกหรือระบุสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตให้ถูกต้องแม่นยำได้นอกจากนั้น กระบวนการปรับปรุงพันธุ์ยังต้องอาศัยระยะเวลานานและใช้แรงงานจำนวนมากอีกด้วย (กรมวิชาการเกษตร, 2543)

ปัจจุบัน เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หรือเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ได้เข้ามามีบทบาทในงานด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมาก เนื่องจากการจัดกลุ่มหรือการจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาทำได้ยาก โดยเฉพาะพืชซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน (สรพงศ์, 2554) จึงทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์พืชบางชนิดที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุ์พืช (varietal identification) ได้เข้ามาช่วยให้การจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น (สุรีพร, 2546) และยังเป็นข้อมูลสำคัญในการจดสิทธิบัตรพันธุ์พืช (plant patent) (Paterson *et al*., 1991) นอกจากนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอยังได้รับความนิยมอย่างมากในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (genetic diversity) อีกด้วย (Mondini *et al*., 2009)

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์ส่วนใหญ่มีจุดประสงค์เพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีตามที่ต้องการ เรียกว่า การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection, MAS) ซึ่งเป็นวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าการคัดเลือกจากฟีโนไทป์ เนื่องจากเป็นการคัดเลือกจากจีโนไทป์โดยตรง (สุรีพร, 2546) เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถตรวจสอบได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต จึงมีส่วนช่วยประหยัดเวลา ลดแรงงาน ลดต้นทุน และพื้นที่ในการเพาะปลูกได้ ดังนั้น งานปรับปรุงพันธุ์พืชซึ่งถือเป็นหัวใจ

สำคัญในการสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ให้ได้ผลผลิตสูง และเป็นที่ต้องการของเกษตรกร จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้เครื่องมือที่มีความแม่นยำในการคัดเลือกและแยกความแตกต่างของลักษณะเหล่านั้น จึงทำให้เครื่องหมายดีเอ็นเอหรือเครื่องหมายโมเลกุลเข้ามามีบทบาทและเพิ่มความสำคัญมากขึ้น (สรพงศ์, 2554) บทความนี้ได้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของเครื่องหมายดีเอ็นเอ และการประยุกต์ใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตและการนำมาใช้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึง ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายติดตามหน่วยพันธุกรรมหรือยีนของสิ่งมีชีวิตและสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกหลานได้ พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์และมีความแตกต่าง (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลดีเอ็นเอ จึงทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอมีหลายประเภท เช่น RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), STS (Sequence Tagged Sites), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), SSR (Simple Sequence Repeats) หรือ microsatellites และ SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) เป็นต้น การเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละประเภท เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR และ AFLP เป็นที่ได้รับความนิยมใช้กันมากในปัจจุบัน เช่น การใช้เครื่องหมาย SSR ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) ที่มีความทนทานต่อความเค็มระดับต่างๆ (Seetharam *et al*., 2009; Kanawapee *et al*., 2011) และในสายพันธุ์ข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) (Salem *et al*., 2008)

การค้นหายีนและการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือก (Gene tagging and marker-assisted selection)

การพัฒนาด้านเครื่องหมายดีเอ็นเอมีบทบาทอย่างมากต่อการค้นหายีน (gene tagging) ที่ควบคุมลักษณะที่ดีต่างๆ ในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ เช่น ข้าว ข้าวสาลี และข้าวโพด เป็นต้น นอกจากประโยชน์เพื่อใช้ในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อหาตำแหน่งยีน การโคลนยีน การศึกษาวิวัฒนาการของพันธุ์พืชต่างๆ แล้วนั้น นักปรับปรุงพันธุ์ได้นำมาใช้ประโยชน์โดยตรง คือ การใช้เพื่อจำแนกและคัดเลือกสายพันธุ์พืช เช่น การระบุเครื่องหมาย sequence characterized amplified region (SCAR) ซึ่งพัฒนาจากเครื่องหมาย RAPD เพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (Saengprajak, 2012) และการใช้เครื่องหมาย SSR เพื่อระบุ

อัลลีล (allele) ที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ข้าวในอินเดีย (Upadhyay *et al*., 2011) อีกทั้งยังมีการผนวกรวมยีนที่ควบคุมลักษณะดีต่างๆ เข้าด้วยกันในพืชต้นเดียวกัน (gene pyramiding) เช่น การผนวกยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง โรคไหม้ และแมลงบั่วในข้าว เป็นต้น (กรมวิชาการเกษตร, 2543)

ปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นเป็นจำนวนมากและได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในการศึกษาความหลายหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต การระบุสายพันธุ์หรือความบริสุทธิ์ของพันธุ์ และในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช นอกจากนั้นยังมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อติดตามยีนที่ควบคุมลักษณะที่ดีต่างๆ ซึ่งสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการได้อย่างแม่นยำเป็นวิธีการที่สะดวกรวดเร็ว สามารถคัดเลือกได้ในทุกระยะการเติบโตของพืช และไม่มีผลกระทบจากสิ่งแวดล้อม เป็นต้น นอกจากนั้น เครื่องหมายดีเอ็นยังใช้เป็นข้อมูลสำหรับวิเคราะห์ตำแหน่งยีนและการสร้างแผนที่ยีน (gene mapping) ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญที่ช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์ทราบถึงจำนวน ตำแหน่ง และอิทธิพลของยีนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพื่อเป็นแนวทางในการผนวกรวมยีนเหล่านั้นมาสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ได้อย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตาม การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวก็ไม่สามารถเข้ามาแทนที่วิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional breeding) ได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอจึงเป็นเครื่องมือสำคัญที่สามารถใช้เพื่อช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์ได้ทราบถึงจำนวน ตำแหน่ง และอิทธิพลของยีนที่ควบคุมลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจต่างๆ สามารถใช้เป็นแนวทางในการผนวกรวมยีนดีเด่นเหล่านั้นมาสร้างพืชพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ต้องการได้อย่างรวดเร็ว อันเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในโครงการปรับปรุงพันธุ์และเป็นการพัฒนาพันธุ์เพื่อให้ได้สายพันธุ์ในอุดมคติต่อไป

การปรับปรุงพันธุ์พืชแบบดั้งเดิม (conventional plant breeding) เน้นการคัดเลือกฟีโนไทป์ที่ดีที่สุดในประชากรที่มีการกระจายตัวที่ได้มาจากการผสมพันธุ์ ซึ่งประสบปัญหาว่าเกิดปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมและสภาพแวดล้อม (genotype x environment interaction ; G x E) ประกอบกับการคัดเลือก และการทดสอบฟี โนไทป์ ต้องใช้เงินจำนวนมาก และใช้เวลานาน การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยคัดเลือก (marker-assisted selection; MAS) เน้นการคัดเลือกที่ยีนไม่ใช่ฟีโนไทป์ ดังนั้นการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม และสามารถคัดเลือกได้ในทุกช่วงอายุของพืช เนื่องจากการมี molecular marker และ genetic map เกิดขึ้นจึงทำให้การใช้ MAS มีความเป็นไปได้ทั้งลักษณะที่เป็นเชิงคุณภาพ (qualitative trait) และลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait loci) (Francia *et al*., 2005)

วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบผสมกลับแบบดั้งเดิม (conventional backcrossing) เป็นการถ่ายทอดยีนที่ต้องการจากพันธุ์ให้ (donor parent) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ที่มีลักษณะการเกษตรไม่ดีไปสู่พันธุ์รับ (recipient parent) ซึ่งเป็นพันธุ์ดี (elite variety) เริ่มโดยผสมพันธุ์รับกับพันธุ์ให้เพื่อ

ผลิต F_1 ต่อจากนั้นนำ F_1 ผสมกลับไปหาพันธุ์รับ ต้องทำการผสมกลับไปหาพันธุ์รับถึง 6 ครั้ง จึงจะได้เปอร์เซ็นต์จีโนมของพันธุ์รับเท่ากับ 99.2 ซึ่งจะอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ พันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับจะมีพันธุกรรมเหมือนกับพันธุ์รับยกเว้นยีนในตำแหน่งที่ต้องการ (target gene) ที่ได้มาจากพันธุ์ให้ (Allard, 1960)

สำหรับวิธีการผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted backcrossing; MAB) (Frisch *et al*., 1999) เมื่อเปรียบเทียบ MAB กับวิธีการผสมกลับแบบดั้งเดิม พบว่า การใช้ marker มาช่วยในการคัดเลือกจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีผสมกลับแบบดั้งเดิมได้ 3 ประการ

(1) บางลักษณะการคัดเลือกด้วยฟีโนไทป์ทำได้ยาก การใช้ marker ที่ลิงค์กับ target gene ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ และความแม่นยำของการคัดเลือก

(2) marker ช่วยคัดเลือกต้นผสมกลับที่มีปริมาณจีโนมของพันธุ์รับสูง และ marker ช่วยคัดเลือกต้นที่มี linkage drag ที่มีขนาดสั้นๆ

(3) ในการถ่ายทอดยีนด้อย (recessive gene) ถ้าใช้วิธีผสมกลับแบบดั้งเดิมต้องทำการผสมตัวเองเพิ่มอีกหนึ่งชั่วหลังจากการผสมกลับในแต่ละชั่ว แต่เมื่อใช้ marker ช่วยในการคัดเลือกไม่ต้องทำการผสมตัวเองในแต่ละชั่วของการผสมกลับอีก (Francia *et al*., 2005)

วิธีการผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกนั้น การคัดเลือกต้น BC_nF1 ที่ต้องการด้วย marker มี 3 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรก ใช้ target marker คัดเลือกต้นที่มียีนที่ต้องการ (target gene) โดยคัดเลือกต้นที่มียีโนไทป์ เป็น heterozygous สำหรับอัลลีลของพันธุ์รับ และอัลลีลของพันธุ์ให้ ขั้นตอนที่ 2 ทำการลดจำนวนของยีนที่ไม่ต้องการที่ติดมาจากพันธุ์ให้ (linkage drag) โดยใช้ flanking marker จำนวน 2 ตำแหน่ง ซึ่งขนาบอยู่ทั้งสองข้างของยีนที่ต้องการ โดยคัดเลือกให้ marker ทั้งสองตำแหน่งเป็น homozygous สำหรับอัลลีลของพันธุ์รับ ขั้นตอนที่ 3 ใช้ background marker ซึ่งกระจายอยู่ในตำแหน่งต่างๆ (non target loci) ในจีโนมเพื่อคัดเลือกต้นที่มียีโนไทป์ เป็น homozygous สำหรับอัลลีลของพันธุ์รับซึ่งจะทำให้ได้ต้นที่มียีโนไทป์ เหมือนพันธุ์รับมากที่สุดได้เร็วขึ้น (Newbury, 2003)

ยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการออกดอกที่ตอบสนองต่อช่วงแสงในข้าว

การตอบสนองต่อช่วงแสงสำหรับการออกดอก (photoperiodic flowering) ถูกควบคุมโดยกลุ่มยีน จึงจัดเป็นลักษณะปริมาณ มีการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอ เพื่อสร้างแผนที่ QTL เกี่ยวกับยีนที่ควบคุมการออกดอกในข้าว เช่น Yano และคณะ (2001) ทำการผสมข้าว Nipponbare (japonica type) และพันธุ์ Kasalath (indica type) และสามารถจำแนก QTL 14 ตำแหน่งที่ควบคุมการออกดอก

ของข้าว QTL 5 ตำแหน่ง ได้แก่ Hd1-Hd5 ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้ประชากรชั่ว F2 ส่วนอีก 3 ตำแหน่งคือ Hd7, Hd8 และ Hd11 สามารถตรวจสอบได้จากประชากร BC_1F_5 นอกจากนี้ Hd6, Hd9, Hd10, Hd12, Hd13 และ Hd14 สามารถตรวจสอบโดยใช้ประชากร BC3F2 และ BC4F2 (Yamamoto et al., 1998; Yamamoto *et al*., 2000; Lin *et al*., 2002) อย่างไรก็ตามตำแหน่ง QTL หลักที่ตอบสนองต่อช่วงวันสั้นคือ Hd1 ภายใต้ช่วงวันยาว Hd1 จะยับยั้งการสร้างดอกในข้าว (Yano *et al*., 2001) นอกจากนี้ยีน Hd6 บนโครโมโซมแท่งที่ 3 จะยับยั้งการออกดอก ในช่วง day neutral และช่วงวันยาว ส่วนยีน Hd3a ซึ่งตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 6 ยังมีความสำคัญต่อการกระตุ้นการออก ดอกในช่วงวันสั้น Lin และคณะ (2000) รายงานว่า อัลลีล hd1 ซึ่งเป็นยีนด้อย (มีตำแหน่งบนโครโมโซมแท่งที่ 6) ในข้าวพันธุ์ Taichung 65 ทำให้ข้าวพันธุ์นี้ไม่ไวแสงหรือไม่ตอบสนองต่อช่วงแสง เมื่อปลูกในช่วงแสงสั้นช่วง 11.05–11.79 ชั่วโมงต่อวัน มี อายุออกดอก 100 วัน (วราภรณ์, 2547) วราภรณ์ และคณะ (2551) พบเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ RM5963 RM8225 RM8226 และRM8250 ที่ใกล้ชิดกับ อัลลีล hd1 และได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวช่วยในการคัดเลือกลูกผสมกลับ ระหว่างพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ที่ไวแสงกับพันธุ์ Taichung 65 ที่ไม่ไวแสง เพื่อคัดเลือกลูกผสมกลับที่ไม่ไวแสงและคงลักษณะทางพืชไร่และคุณภาพของพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ไว้ดังเดิม (Sangtong, 2007)

เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายระดับโมเลกุล (molecular marker) ซึ่งเป็นการศึกษาระดับดีเอ็นเอ เพื่อเป็นเครื่องมือในการตรวจสอบในระดับของยีน จึงเป็นประโยชน์อย่างมากในการปรับปรุงพันธุ์ สามารถกระทำได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของต้นพืช ไม่ทำลายต้นพืชและสามารถจำแนกลักษณะพันธุกรรมของยีนที่สนใจได้ (กัลยา และกรรณิการ์, 2554) เครื่องหมายเอสเอสอาร์ หรือไมโครแซทเทลไลท์ หมายถึง ลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันเรียงอยู่ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่ง หนึ่งๆ ในจีโนม แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วยลำดับเบสซ้ำสั้นมากเพียง 1–4 คู่เบส หรือไม่เกิน 10 คู่เบส พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เนื่องจากไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นเบสซ้ำขนาดสั้นๆ ลำดับเบสแบบนี้มีการกระจายตัวทั้งจีโนม แต่การกระจาย ไม่สม่ำเสมอ หน้าที่สำคัญยังไม่ทราบแน่ชัด มีบางส่วนที่เป็นส่วนอนุรักษ์ (conserve)โดยพบอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันในสิ่งมีชีวิต เทคนิคเอสเอสอาร์เป็นการอาศัยความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่ตำแหน่งเดียวกันใน แต่ละตัวอย่างไม่เท่ากัน ซึ่งจะตรวจสอบได้ทันทีเมื่อนำมาแยกขนาดได้โดยใช้ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis หรืออิเล็คโตรโฟริซีส ปัจจุบันมีการใช้เครื่องหมายดังกล่าวในการศึกษาแผนที่ยีน และแยกความแตกต่าง ของสิ่งมีชีวิตโดยวิเคราะห์ลาย

พิมพ์ดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2545) การพัฒนาเครื่องหมายเอสเอสอาร์มีวิธีที่ยุ่งยาก และเสียค่าใช้จ่ายสูง แต่หลังจากพัฒนาเครื่องหมายได้แล้ว สามารถ นำมาใช้ได้ง่าย เนื่องจากเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้การเพิ่มปริมาณโดยพีซีอาร์ จึงต้องการดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อย และ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบก็มีขนาดเล็ก ไม่จำเป็นต้องใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีคุณภาพดีมากนัก ผลการตรวจสอบยังมีความแม่นยำ สามารถส่งข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์ เพื่อนำไปใช้ที่ห้องปฏิบัติการใดก็ได้ มีโพลิมอร์ฟิซึมสูง เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนชุดซ้ำได้ง่าย นอกจากนี้ยังมีการข่มร่วม (codominance) จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกต และเฮเทอโรไซโกตได้ มีการกระจายตัวทั้งจีโนมเหมาะสำหรับใช้ในการทำแผนที่จีโนม ตรวจสอบเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ อีกมากมาย มีการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกลักษณะต่าง ๆ ดังเช่นในข้าว (จิรพงศ์ และคณะ, 2554)

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

วิธีการดำเนินงาน

1. การสร้างลูก รุ่นที่ 1 จากข้าวหอมกระดังงาและข้าว กข 55

ทำการปลูกเมล็ดพันธุ์ข้าวหอมกระดังงา และข้าว กข 55 ลงในกระถางบรรจุดินเหนียว แต่ละพันธุ์มีวันปลูกต่างกัน 4 วันปลูก แต่ละวันปลูกห่างกัน 7 วัน พันธุ์ละ 20 กระถาง ปลูก 1 ต้น/กระถาง ช่วงเดือนมิถุนายน–พฤศจิกายน 2560 เพื่อผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ข้าวหอมกระดังงาที่ไวต่อช่วงแสงกับข้าว กข 55 ไม่ไวต่อช่วงแสงเพื่อสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 และคัดเลือกต้นที่ต้องการ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM19776

2.การปลูกและดูแลรักษา

ทำการปลูกเมล็ดข้าวพันธุ์พ่อแม่ ที่หลังห้องปฏิบัติการทางจุลินทรีย์และเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้–ชุมพร ปลูกในกระถางใส่ดินเหนียว ¾ ของกระถาง ปลูกข้าว 1 ต้น/กระถาง ให้น้ำทุกวัน อายุ 3 สัปดาห์ ใส่ปุ๋ยยูเรีย 100 กรัม/กระถาง และใส่ปุ๋ย 15-15-15 ทุก 2-4 สัปดาห์ ครั้งละ 100 กรัม/กระถาง

3. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือก

3.1 การเก็บตัวอย่างใบ

เก็บตัวอย่างใบอ่อนพ่อแม่ อายุ 7-10 วัน จำนวน 5-6 ใบ เก็บใส่ถุงซิบพลาสติก ก่อนนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 ตรวจสอบความแตกต่างโดยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM19776

(Forword;5'- ACCTGCTCCATCCATCTCTAGGG-3')

(Reverse; 5'- AGCAACGTGGTACAGATTACAGAAGC-3')

ในพันธุ์ให้ (กข 55) และพันธุ์รับ (ข้าวหอมกระดังงา)

3.3 การสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างใบอ่อนของข้าวมาล้างด้วยน้ำแล้วซับให้แห้ง นำใบอ่อนให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่โกร่งแล้วบดให้ละเอียด เติม 2X CTAB ปริมาตร 750 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง แล้วเทตัวอย่างที่บดลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทุกๆ 10 นาที เขย่าหลอดเบาๆ จากนั้นเติม chloroform isoamyl alcohol ให้

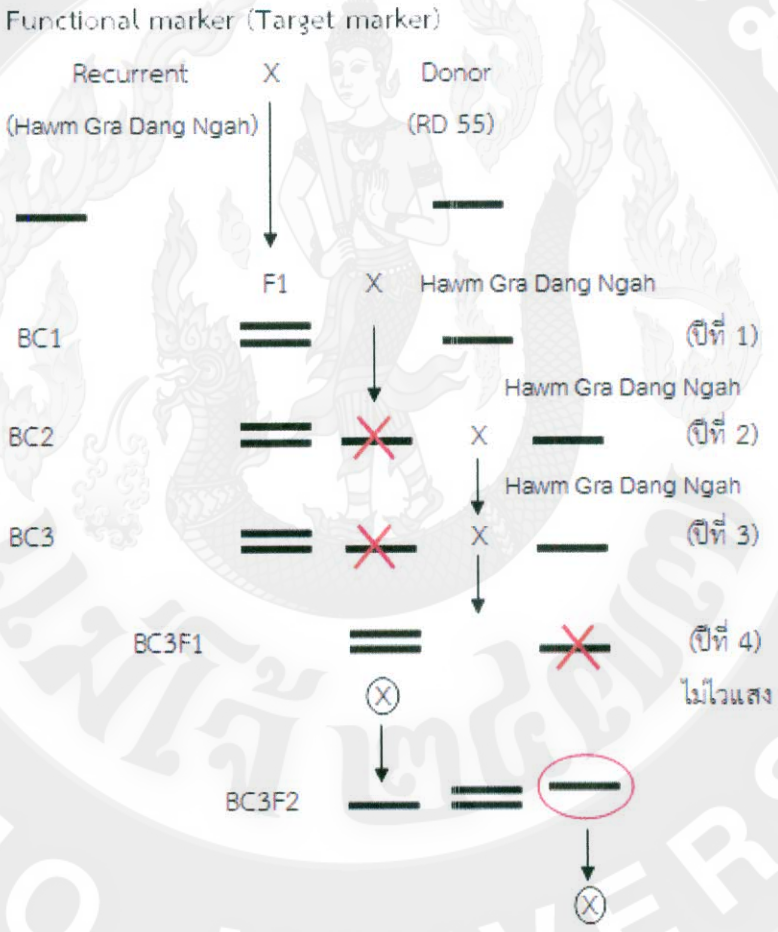
เต็มหลอดทดลอง กลับหลอดเบาๆ ด้วยมือประมาณ 2–3 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุด 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายที่ใสส่วนบนของหลอดทดลองใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร โดยใช้ micropipette (P-1000) แล้วเขย่าหลอดทดลอง โดยการคว่ำ และหงายอย่างช้าๆหลายครั้งจะเห็นดีเอ็นเอเป็นเส้นแขวนลอยอยู่ นำไปแช่ตู้แช่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเพียงเล็กน้อยดีเอ็นเอก็จะตกตะกอนที่อยู่ก้นหลอดทดลอง แล้วเทสารละลายออก ผึ่งดีเอ็นเอให้แห้งโดยคว่ำหลอดทดลองไว้กับตะแกรงทิ้งไว้ 30 นาที แล้วเติม 75%ethanol+10mM ammoniam acetate ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เขย่าหลอดทดลองเบาๆ หลายๆ ครั้ง ใช้นิ้วดีดหลอดเบาๆ เพื่อให้ดีเอ็นเอที่ตกตะกอนเข้ากันได้ดีกับสารละลายตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงเพียงเล็กน้อย เทสารละลายออกเหลือแต่ดีเอ็นเอ แล้วผึ่งดีเอ็นเอให้แห้งโดยคว่ำหลอดไว้กับตะแกรง ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นเทสารละลายออกหมดแล้วเติม 75% ethanol ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เขย่าหลายครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุด (15,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายออก แล้วคว่ำหลอดทดลองไว้กับตะแกรงให้ดีเอ็นเอแห้ง โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าดีเอ็นเอจะละลายหมด เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4 องค์ประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยการเตรียมสารละลายในหลอดทดลองปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยมีส่วน ประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (25 นาโนกรัม) 10x PCR buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร dNTPs ปริมาตร 4 ไมโครลิตร $MgCl_2$ ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร 5uM Primer F ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร 5uM Primer R ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 8.4 ไมโครลิตร

3.5 ปฏิกิริยาพีซีอาร์ มีดังนี้ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing 66 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เพิ่มปริมาณ 35 รอบ และ final-extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์มาแยกในอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 3% เพื่อตรวจสอบความแตกต่าง

3.6 การเตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 3% ในสารละลาย 0.5xTAE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 60 โวลล์ เป็นเวลา 90 นาที นำแผ่นเจลอะกาโรสไปแช่ในสารละลายที่เติมเอธิเดียมโบรไมด์ ไว้ 30 นาที แช่ในน้ำกลั่นนาน 30 นาที บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องบันทึกภาพ Gel Documentation

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมกระดังงา ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี molecular marker-assisted backcrossing มีพันธุ์รับ (recipient parent) คือข้าวหอมกระดังงา ซึ่งเป็นข้าวเจ้าที่ไวต่อช่วงแสง และมี ยีโนไทป์เป็น Hd1Hd1 ส่วนพันธุ์ให้ (donor parent) คือข้าวพันธุ์ กข 55 ซึ่งเป็นข้าวเจ้าไม่ไวต่อช่วงแสง และมียีโนไทป์เป็น hd1hd1 โดยที่ target gene คือ อัลลีลด้อย hd1 โครงการนี้เป็นโครงการต่อเนื่องที่ต้องทำการผสมกลับ 3 ชั่ว และผสมตัวเองจำนวนหนึ่งครั้งจึงได้ต้น BC_3F_2 ที่มียีโนไทป์เป็น hd1hd1 ส่วน flanking marker จำนวน 2 ตำแหน่ง และ background marker ที่มียีโนไทป์เป็น homozygous



การคัดเลือกข้าวพันธุ์ให้ และรับ เพื่อการสร้างประชากรเพื่อใช้ในการศึกษา

ฤดูที่ 1 การผลิตเมล็ด F_1 และ การหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่างๆ

การผลิตเมล็ด F_1 การผลิตเมล็ด F_1 คือ ข้าวหอมกระดังงา x ข้าวกข 55

- **การหา target marker**

Functional marker (Target marker) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่บนยีน เพื่อใช้คัดเลือกต้นที่มียีนควบคุมที่สนใจ เนื่องจากต้องการปรับปรุงข้าวเจ้าไวแสงให้เป็นข้าวเจ้าไม่ไวแสง ดังนั้นจึงต้องมี target marker จำนวน 1 ตำแหน่ง

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมกระดังงา ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี molecular marker-assisted backcrossing มีพันธุ์รับ (recipient parent) คือข้าวพันธุ์หอมกระดังงา ซึ่งเป็นข้าวเจ้าที่ไวต่อช่วงแสง และมียีโนไทป์เป็น Hd1Hd1 ส่วนพันธุ์ให้ (donor parent) คือข้าวพันธุ์ กข 55 ซึ่งเป็นข้าวเจ้าไม่ไวต่อช่วงแสง และมียีโนไทป์เป็น hd1hd1 โดยที่ target gene คือ อัลลีลด้อย hd1 อยู่บนโครโมโซมที่ 6 ที่ 54.1 cM อัลลีลด้อย hd1 ทำหน้าที่ควบคุมข้าวให้ออกดอกโดยไม่ตอบสนองต่อช่วงแสงซึ่งอัลลีลด้อย hd1 ได้มาจากข้าวพันธุ์ กข 55 โครงการนี้ทำการผสมกลับ 3 ชั่ว และผสมตัวเองจำนวนหนึ่งครั้งจึงได้ต้น BC_3F_2

- **การหา flanking marker 1 และ 2**

การหา flanking marker เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ขนาบข้างหรือยึดติดกับยีน จำนวน 2 ตำแหน่ง คือ Franking marker 1 และ Franking marker 2 เพื่อใช้คัดเลือกต้นข้าวที่มีพันธุกรรมเหมือนกับพันธุ์ที่ให้ ทำโดยเข้าไปใน http://www.gramene.org/ เลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ขนาบอยู่ทั้ง 2 ข้างของยีน hd1 สั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์นำมาทำ PCR โดยมีดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์หอมกระดังงา และกข 55 เป็นแม่พิมพ์ คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์หอมกระดังงา และกข 55

- **การหา background marker**

เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่กระจายอยู่บนจีโนมข้าว เพื่อใช้คัดเลือกพันธุกรรมเหมือนกับข้าวพันธุ์รับ การหา background marker ทำโดย คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 200-300 ตำแหน่งที่กระจายอยู่บนโครโมโซมทั้ง 12 คู่ของข้าว สั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์ นำมาทำ PCR โดยมีดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์หอมกระดังงา และ กข 55 เป็นแม่พิมพ์ คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์หอมกระดังงา และ กข 55 เนื่องจากข้าวทั้ง 2 พันธุ์เป็นข้าว อินดิกา ดังนั้นจึงต้องใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวนมากถึง 20-25 ตำแหน่ง/โครโมโซม จึงได้ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวอินดิกา 2 พันธุ์ ประมาณ 4-6 ตำแหน่ง/โครโมโซม

ฤดูที่ 2 การคัดเลือกต้น F_1 และการผลิตเมล็ด BC_1F_1

ปลูก ต้น F_1 ของคู่ผสม หอมกระดังงา x กข 55 แล้วคัดเลือกด้วย target marker เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นต้น F_1 จริง ต่อจากนั้นนำต้น F_1 ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์รับ เพื่อผลิตเมล็ด BC_1F_1

ฤดูที่ 3 การคัดเลือกต้น BC_1F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และ การผลิตเมล็ด BC_2F_1

ปลูกต้น BC1F1 คัดเลือกด้วย *hd1* marker แล้วจึงนำต้นเหล่านี้มาคัดเลือกต่อด้วย fragrance marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์ เป็น Hdhd (heterozygous) ต่อจากนั้นจึงนำต้นดังกล่าวมาคัดเลือกต่อด้วย flanking marker 1 ของ *hd1* gene เพื่อคัดเลือกหาต้นที่มียีโนไทป์เป็น homozygous ของอัลลีลพันธุ์รับ นำต้นที่คัดเลือกได้ผสมกลับไปหาพันธุ์รับ เพื่อผลิตเมล็ด BC_2F_1 แล้วจึงนำต้นเหล่านี้มาผสมกลับไปหาพันธุ์รับ เพื่อผลิตเมล็ด BC_2F_1

ฤดูที่ 4 การคัดเลือกต้น BC_2F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และ การผลิตเมล็ด BC_3F_1

ปลูกต้น BC_2F_1 คัดเลือกด้วย *hd1* marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Hdhd แล้วจึงนำต้นเหล่านี้มาคัดเลือกต่อด้วย fragrance marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์ เป็น Hdhd ต่อจากนั้นจึงนำต้นดังกล่าวมาคัดเลือกต่อ ด้วย flanking marker 2 ของ *hd1* gene เพื่อคัดเลือกหาต้นที่มียีโนไทป์เป็น homozygous ของอัลลีลพันธุ์รับ นำต้นที่คัดเลือกได้ผสมกลับไปหาพันธุ์รับเพื่อผลิตเมล็ด BC_3F_1

ฤดูที่ 5 การคัดเลือกต้น BC_3F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และ การผลิตเมล็ด BC_3F_2

ในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยทั่วไปจะใช้ระยะเวลาในเวลาปรับปรุงประมาณ 8-9 ปี แต่การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection) ในวิธีผสมกลับ จะช่วยลดระยะเวลาในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ลงเหลือ 3-5 ปี ซึ่งในโครงการวิจัยนี้ต้องใช้ทุนวิจัยต่อเนื่อง โดยเริ่มต้นในปีแรกก่อน จากนั้นจึงขอทุนวิจัยต่อ

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (ความสูง) ของพันธุ์พ่อและแม่

การศึกษาความสูงของข้าวพันธุ์หอมกระดังงาเมื่ออายุ 15 วัน พบว่ามีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 28.38 เซนติเมตร ส่วนพันธุ์ กข 55 มีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 26.96 เซนติเมตร

ตารางที่ 1 แสดงความสูงของข้าวพันธุ์หอมกระดังงา และพันธุ์ กข 55 (อายุ 15 วัน)

พันธุ์	ความสูง (เซนติเมตร)				
	R1	**R2**	**R3**	**รวม**	**เฉลี่ย**
หอมกระดังงา	28.64	31.10	25.40	85.14	28.38
กข 55	27.40	30.70	22.80	80.90	26.96

การศึกษาความสูงของข้าวพันธุ์หอมกระดังงาเมื่ออายุ 23 วัน พบว่ามีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 35.13 เซนติเมตร ส่วนพันธุ์ กข 55 มีความสูงเฉลี่ยเท่ากับ 38.80 เซนติเมตร

ตารางที่ 2 แสดงความสูงของข้าวพันธุ์หอมกระดังงา และพันธุ์ กข 55 (อายุ 23 วัน)

พันธุ์	ความสูง (เซนติเมตร)				
	R1	**R2**	**R3**	**รวม**	**เฉลี่ย**
หอมกระดังงา	37.10	38.70	29.60	105.40	35.13
กข 55	39.60	41.60	35.20	116.40	38.80

ฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทป์ (Nucleotide Sequence Database)

ในการสืบค้นจากฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ใน Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) ของยีน Hd1

Tetra Arms

Tetra Arms คือการออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิด Co-dominant marker โดยอาศัยหลักการออกแบบไพรเมอร์เข้าไปจับกับยีนเป้าหมายหรือ Funtional marker ในข้าวที่หอมและไม่มีหอม เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของลำดับเบสหรือ nucleotide polymorphism ที่เกิดในปฏิกิริยาพีซีอาร์เดียวกัน (Multiplex PCR) ประกอบด้วยไพรเมอร์ 4 ชนิด ได้แก่ ไพรเมอร์ Outer-F Outer-R Inner-F และ Inner-R การตรวจสอบด้วยวิธี Tetra Arms อาศัยหลักการดังนี้ ไพรเมอร์ Inner-F ออกแบบให้เฉพาะกับข้าวพันธุ์ไม่หอม โดยไพรเมอร์เข้าจับลำดับเบสคู่สมกับข้าวพันธุ์ไม่หอม ส่วน Inner-R ออกแบบให้เฉพาะกับข้าวพันธุ์หอม โดยไพรเมอร์เข้าจับลำดับเบสคู่สมกับข้าวพันธุ์หอม

ลำดับนิวคลีโอไทป์ ยีน Hd1

Non Fragrance

> AB041837-ไวแสง

AAAGCAAAGATGAACAGAGGTGGACTGTTCTCCTTACAAATTTATTGCAAAAAAAAAAGTAG
ATTCTCTA
TGGAGAGGCATATTTAACGTTATAGCAGGGCTATAATAAGAAACAGATGGCTCAAAGAAAAT
GATAAGCA
ACAAATAACCCATAAAGGACCCATGTCATATATAGATAGGCCTTGCAAACAAACAAAAAAAA
GGTATGCA
AGGAAATAATAGTTCCTTCAGCAGTTGAGAAATCATATAACAGAAGAAAAAAAACACATTGG
TAATAATT
TGACTTCTCCACTAGAATAGATATTTTTGGATGAGGGAGGCCGGCAAAGAAACTATTTAGTG
ACATGGCA
GGCCGCTTTGGAACTTTTCTCATGTATCTGCACTGGCTACCTCACACCGGAGGTTCGTAAAG
GCGGAACG
GCTAAGGGGGAGTGCCAATGACTGGCACAAAACCGCATGCTTTGGAATCCCAGAGAACCCAA
CCCTCCCT
TTCTCTTTTGCAAAAGAATGTGCATAAAGAGAGAGGCAGCATCTTTCCTCTGCTCTTTTTT
TGTTTTTC
CCTTTATTTGTACATCATCACAGTGGCTTCCAATTCTCCCCCTTTGGGCTTAGTTCCATCTA
AGAGATGT
CCATTGAATTGTTTAGGGACAATCCTAGGAATGCATATGGGAGGATTCTATTGATCCCTGTA
AAATCTCT

TTAGGGACAGTCCTAAGTTAAAATGGAACATGATTACGACAAAAGAGAATCAGTGTACTCAT
CACTAAAA
TGCAAAGCTTTTTTGCGCAAAAGCGCGATTGCTTTGGCTTAAAAGGTATTGACATCAGTTCA
GGTTAGAT
ACTTAGATTTAGCTCAAGGGCGCCAATTCTCCATAGGACCCGCCAAAGTGCACAAAATCTTT
ATCTGAAA
ACGACCCCTCCATTGAGGATTGGCATCAGGGGGTGAGAAGAGAAACGCTGAAGCAGCAAACA
TCCAAAGG
CAACCACAAGACAGGCATTGCAGCCGCCGCTCGCCCCCCCCCCCCCCCCCCCGGGGATCGC
GCCAAGTG
TCAATCGCTGGATTCGACTTGACACCCCCTTACTATTAGTATACTCTACACTCAAACTCCCC
AGGACAAA
AACACCGTGACTTTCCCCTCCCTAGCTCCTTCCAAAAAACACTCACAAAATTCCACAAGAGC
CATGCGAG
GTAGAGGAACAGGAGAAGACGCATACACACACGACACATAGAGAGAGAGGACAAACACAATA
GCTTGGAT
CGATAGACTTGTCCATGTGGTGCAAGCTAAAGCTACTACTACCACAAGCAAGGCTACTTCGT
TCATGAAT
TATAATTTTGGTGGCAACGTGTTCGACCAGGAGGTTGGAGTTGGAGGCGAAGGAGGAGGAGG
AGGAGAGG
GGAGCGGCTGCCCATGGGCGCGGCCGTGCGACGGGTGCCGCGCGGCGCCGAGCGTGGTGTAC
TGCCGCGC
GGACGCGGCGTACCTGTGCGCGTCGTGCGACGCGCGGGTGCACGCGGCCAACCGCGTGGCGT
CCCGCCAC
GAGCGCGTGCGGGTGTGCGAGGCCTGCGAGCGCGCCCCGGCCGCGCTCGCGTGCCGCGCCGA
CGCCGCCG
CGCTGTGCGTGGCGTGCGACGTGCAGGTGCACTCCGCGAACCCGCTCCCGGCCATCACCATC
CCGGCCAC
CTCCGTCCTCGCTGAGGCGGTGGTGGCCACCGCCACCGTCCTCGGCGACAAGGACGAGGAGG
TGGACTCT
TGGCTTCTCCTCTCCAAAGATTCCGACAACAACAACAACAATAACAACAACAACGACAACGA
CAATAACG
ACAACAACAACAGCAACAGCAGCAACAACGGCATGTATTTTGGTGAAGTCGATGAGTACTTT
GATCTTGT
CGGGTACAATTCGTACTACGACAACCGCATCGAAAACAACCAAGATCGGCAGTATGGGATGC
ATGAACAG
CAAGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGGAGATGCAAAAGGAGTTTGCAGAGAAGGAAGGGAGCGA
GTGTGTGG
TACCTTCACAGATCACAATGCTGAGTGAGCAGCAGCATAGTGGTTATGGAGTTGTGGGAGCA
GACCAGGC
CGCCTCCATGACCGCCGGCGTCAGTGCTTACACAGATTCCATCAGCAACAGCGTGAGTTCAT
CTATTACT
AGCTGCAACTATTTTTTTTTCAGAGAATGAACATCTATTACTGTTGTTAGTTAGTTGTTACT
ACATGCCA
CGTTGTCAATGTTTTAGAGTTCATACTAGTACTTTTGAGTGGAAAAACATTCTCCAAACAAA
AGCTACTG
TCTAACAAAATGAAGGGATAAATAAACAGATCTCAACAAGAAAACAAAGATACTTTTCTACT
TCCAAGCT
GCGATCTTTAGGCTGATTAAATGGAACCGATAAAAAAAATACTTTAAAGAAAAGTACACAAT
TGATCTTT
AGGCAGACCAGTTGACTACTTCCTGTATTTCTAAGCATATACGATCCATGCTAACTCACTAA
TTGAAAAG

Exon I

AAGTGAGTTTGTTAACCTTTTATGTACACAGCAATCACCACACGAAAGACCTCATGAAAAGT
AGGATAAG
TGTAAGTGTAATTCATATTTTATCCCAGTGCATAAATTTAAAATATCTTACTTTTGCGACAG
TAAAAAAG
ATATTGGAAGTTTTTCTTATGTATGTAAAATTAAATTAAGCCCATCTATATATCATTGCAGG
GTCTCTGA
CACCTGCAATCTCCTTATGATTCGCATATTTCAGTGACCATTTGCCGATTCCATCTCAGATA
TCTTTCTC
ATCAATGCAGGCGGGTATAGTACCAGACAGCACGGTGATAGATATGCCAAATTCCAGAATCC
TGACACCT
GCTGGAGCAATCAATCTCTTCTCAGGTCCCTCCCTTCAGATGTCCCTTCACTTCAGCTCCAT
GGACAGGG
AGGCCAGGCTGCTCAGGTACAGGGAGAAGAAGAAGGCCAGGAAGTTTGAGAAGACAATACGT
TATGAAAC
AAGAAAGGCTATGCAGAGGCACGACCCCGGATCAAGGGCCGTTTCGCCAAGAGATCAGATG
TGCAGATC
GAAGTGGACCAGATGTTCTCCACTGCAGCTCTATCTGACGGTAGCTATGGTACTGTTCCATG
GTTCTGAT
GGGACTCATGAGACGCTATCTTATAGGCATATATATGGGGACTTACTGAGTAGCAATAACAT
CGATCCAG
TGGGAGTAGTTCTAGACAATCTGTGTTATGAATAATAGTGTGTTGTTTGCGACTTAAAATTG
ATCAAGTA
CCTTAGCTTTTTAAAGTTTTGCTTTGTAATTTCCGGATAGCAGATATATATTGTTGGTACTT
GCTCAGTA
GCTTTAAGTTTTTGAAGTAAGCAAAGAGCAGTGATGAGATGAAATGAGTATGTGTATAACTG
TATATAGA
TAATTCTAGGGTACCTTGGCCAACAATCACAGTAGCAACAATGCTTTAGGGGTTTAGGTGAC
GAATTGGG
GGTTTAGTTGTTTACTATGAAGTAGCACCAAAATGGTGGAACATATATATTCCTATTTTCGT
TCCATCAT
GACATATAACTGCTGTCTAACCAGCCTATGTTGACTGAAAACAAAGCTCGTTTCATTACAAA
ATAAAAGA
TGGAACCCTGATTAAGTGTGTCCACTGGCCAGATAGTATCATAGTAGTATAATAATGAACTG
GAGTTCAA
GTCTTTTATATTCCACTTGGATCTCGGTGCCATTTTCTTAATGATGTATCTTAGTGATGGGC
TATCATTG
TATCCGGTTGGAATTTCAGCAGAGGTGAAGGTGATGGTGTTCACTCAGCTTTTAAATATCCA
TTATTCTT
ACAGCCCTCCAGATCATTCTGGATGAAAAGAAAAGCAGTGACAAAGAATTTACTGTTGCTTT
AACCATGA
GAATCATATCTTTCCAGCACGGCCTATCTTCTCACTAAACCATGAGCTATCGGTGATCAGTA
ACTCGAAT
GATAGTTGTAGGGAATATAGGAACATTGCCTGATACTGATAGGTACACCATTGTGGTTGGGT
GATATAAG
TACAACAAACTCACAGAAAAGTTTCCCTATTATTTTGTGAATCAAGAGAGCATAAATAAGGA
AGCTCTTT
CTCATTCTCAGTGCATTCCTCTTCCCTTTCACTAGCAACTAGTGGCATGGATCTTATTGCCT
TTTGTTTT
GAGATGGAGCATTCACCAAATATCTAAGGCATCTCAGGGCACCAACCGCATATACAGGAATA
CAGGATAC
ATCTAATCGTTTTTGGCTAAGCTTGACTGTATCGGTTAGATATTGCACAAAAAACAGAGTTA
GGAATTAA

OUT-F

Exon II

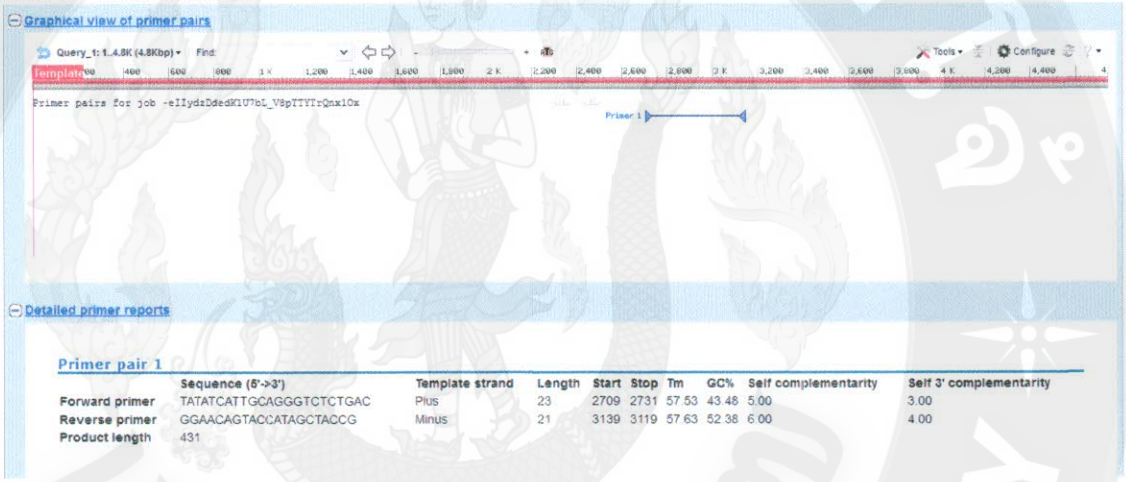
In-F

OUT-R

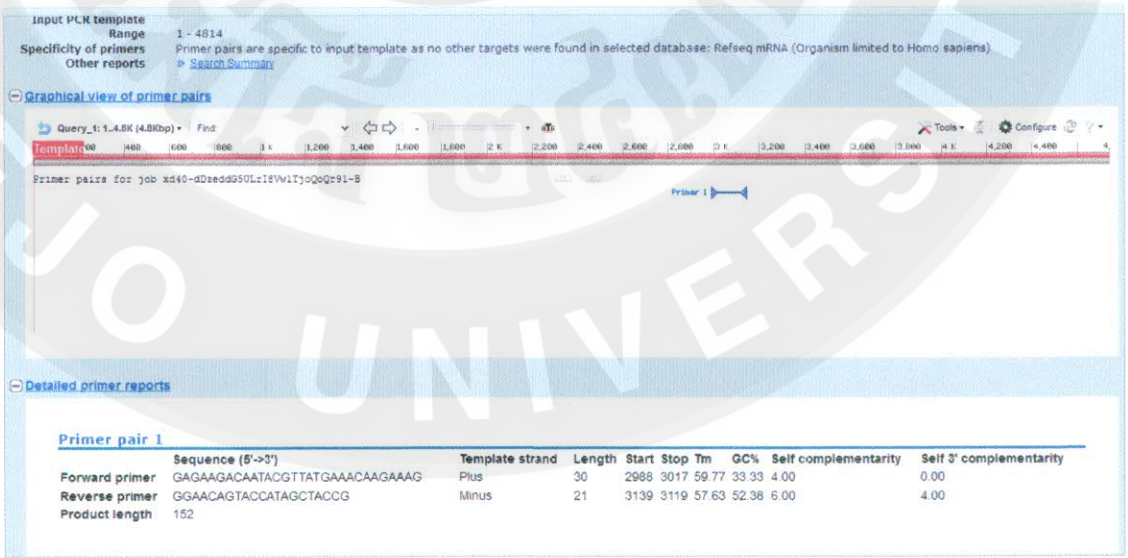
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

GCCCTAAGAGATGGTAATTGGAAACTGGAAAGTGAACTTTTCATTTCAAATATCAACAAAGA
GAGGTCAA
AAAAGTAAAGTGAAATAAAGCACACGGGAGATACAGATCCATATTTTGACCGAAACTGACGA
CATATACC
ACTCTAGTATGGATAGAGAGAACAAATCAAAGTTCTGCAGAAGATAAAACTAGACATAGTTG
ACTAGTAA
CAGAAGAGATTCCTGAACTTTCTCACTGAAACTATCAAGCAAATAGATAAAACTCGTGGTGA
TATTTCAT
CCACATCAGCACTGAGAACAGAACAGCAAGCAAGCAGTTTGATTGTGATGGAGGGAGCTCCT
AGCACATC
ATCATATTATGAAGTAATATTTAATAATCATGGAAGTATGATGAAGGTATTTTTCTGGCAAC
AGTTCTTG
TTTGATGCATCAGAATACCTGATTAACGTGGAATTAATCAAGCATCAGAATCCA

Out-F and Out-R



In-F and Out-R



> AB041837-ไม่ไวแสง

AAAGCAAAGATGAACAGAGGTGGACTGTTCTCCTTACAAATTTATTGCAAAAAAAAAAGTAG
ATTCTCTA
TGGAGAGGCATATTTAACGTTATAGCAGGGCTATAATAAGAAACAGATGGCTCAAAGAAAAT
GATAAGCA
ACAAATAACCCATAAAGGACCCATGTCATATATAGATAGGCCTTGCAAACAAACAAAAAAAA
GGTATGCA
AGGAAATAATAGTTCCTTCAGCAGTTGAGAAATCATATAACAGAAGAAAAAAAACACATTGG
TAATAATT
TGACTTCTCCACTAGAATAGATATTTTTGGATGAGGGAGGCCGGCAAAGAAACTATTTAGTG
ACATGGCA
GGCCGCTTTGGAACTTTTCTCATGTATCTGCACTGGCTACCTCACACCGGAGGTTCGTAAAG
GCGGAACG
GCTAAGGGGGAGTGCCAATGACTGGCACAAAACCGCATGCTTTGGAATCCCAGAGAACCCAA
CCCTCCCT
TTCTCTTTTGCAAAAGAATGTGCATAAAGAGAGAGAGGCAGCATCTTTCCTCTGCTCTTTTT
TGTTTTTC
CCTTTATTTGTACATCATCACAGTGGCTTCCAATTCTCCCCCTTTGGGCTTAGTTCCATCTA
AGAGATGT
CCATTGAATTGTTTAGGGACAATCCTAGGAATGCATATGGGAGGATTCTATTGATCCCTGTA
AAATCTCT
TTAGGGACAGTCCTAAGTTAAAATGGAACATGATTACGACAAAAGAGAATCAGTGTACTCAT
CACTAAAA
TGCAAAGCTTTTTTGCGCAAAAGCGCGATTGCTTTGGCTTAAAAGGTATTGACATCAGTTCA
GGTTAGAT
ACTTAGATTTAGCTCAAGGGCGCCAATTCTCCATAGGACCCGCCAAAGTGCACAAAATCTTT
ATCTGAAA
ACGACCCCTCCATTGAGGATTGGCATCAGGGGGTGAGAAGAGAAACGCTGAAGCAGCAAACA
TCCAAAGG
CAACCACAAGACAGGCATTGCAGCCGCCGCTCGCCCCCCCCCCCCCCCCCCCGGGGATCGC
GCCAAGTG
TCAATCGCTGGATTCGACTTGACACCCCCTTACTATTAGTATACTCTACACTCAAACTCCCC
AGGACAAA
AACACCGTGACTTTCCCCTCCCTAGCTCCTTCCAAAAAACACTCACAAAATTCCACAAGAGC
CATGCGAG
GTAGAGGAACAGGAGAAGACGCATACACACACGACACATAGAGAGAGAGGACAAACACAATA
GCTTGGAT
CGATAGACTTGTCCATGTGGTGCAAGCTAAAGCTACTACTACCACAAGCAAGGCTACTTCGT
TCATGAAT
TATAATTTTGGTGGCAACGTGTTCGACCAGGAGGTTGGAGTTGGAGGCGAAGGAGGAGGAGG
AGGAGAGG
GGAGCGGCTGCCCATGGGCGCGGCCGTGCGACGGGTGCCGCGCGGCGCCGAGCGTGGTGTAC
TGCCGCGC
GGACGCGGCGTACCTGTGCGCGTCGTGCGACGCGCGGGTGCACGCGGCCAACCGCGTGGCGT
CCCGCCAC
GAGCGCGTGCGGGTGTGCGAGGCCTGCGAGCGCGCCCCGGCCGCGCTCGCGTGCCGCGCCGA
CGCCGCCG
CGCTGTGCGTGGCGTGCGACGTGCAGGTGCACTCCGCGAACCCGCTCCCGGCCATCACCATC
CCGGCCAC
CTCCGTCCTCGCTGAGGCGGTGGTGGCCACCGCCACCGTCCTCGGCGACAAGGACGAGGAGG
TGGACTCT

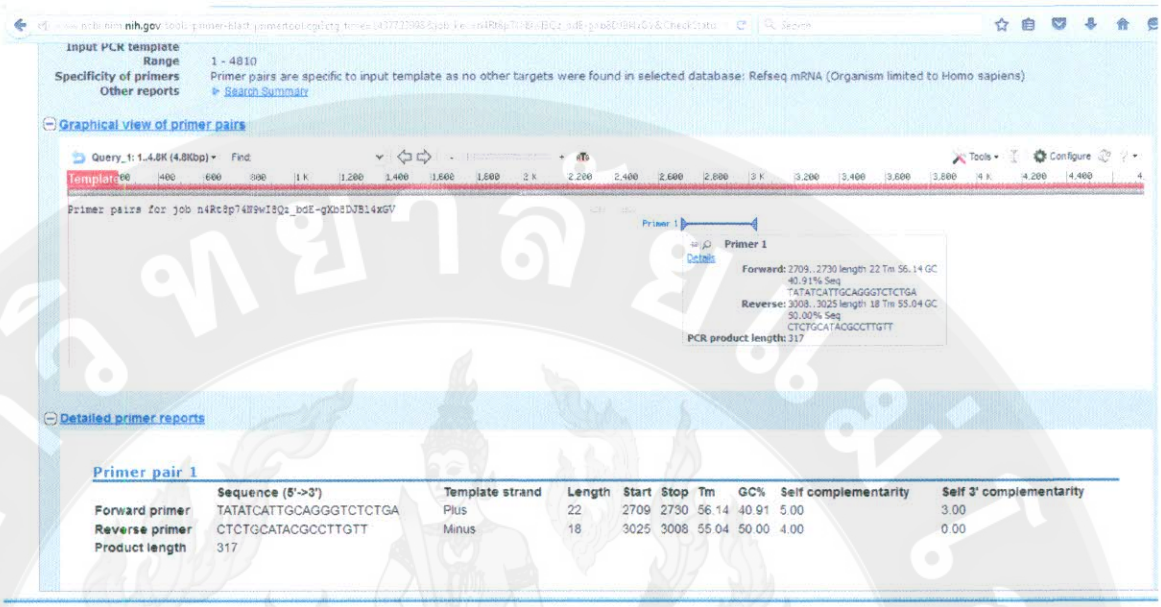
Exon I

TGGCTTCTCCTCTCCAAAGATTCCGACAACAACAACAACAATAACAACAACAACGACAACGA
CAATAACG
ACAACAACAACAGCAACAGCAGCAACAACGGCATGTATTTTGGTGAAGTCGATGAGTACTTT
GATCTTGT
CGGGTACAATTCGTACTACGACAACCGCATCGAAAACAACCAAGATCGGCAGTATGGGATGC
ATGAACAG
CAAGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGGAGATGCAAAAGGAGTTTGCAGAGAAGGAAGGGAGCGA
GTGTGTGG
TACCTTCACAGATCACAATGCTGAGTGAGCAGCAGCATAGTGGTTATGGAGTTGTGGGAGCA
GACCAGGC
CGCCTCCATGACCGCCGGCGTCAGTGCTTACACAGATTCCATCAGCAACAGCGTGAGTTCAT
CTATTACT
AGCTGCAACTATTTTTTTTTCAGAGAATGAACATCTATTACTGTTGTTAGTTAGTTGTTACT
ACATGCCA
CGTTGTCAATGTTTTAGAGTTCATACTAGTACTTTTGAGTGGAAAAACATTCTCCAAACAAA
AGCTACTG
TCTAACAAAATGAAGGGATAAATAAACAGATCTCAACAAGAAAACAAAGATACTTTTCTACT
TCCAAGCT
GCGATCTTTAGGCTGATTAAATGGAACCGATAAAAAAAATACTTTAAAGAAAAGTACACAAT
TGATCTTT
AGGCAGACCAGTTGACTACTTCCTGTATTTCTAAGCATATACGATCCATGCTAACTCACTAA
TTGAAAAG
AAGTGAGTTTGTTAACCTTTTATGTACACAGCAATCACCACACGAAAGACCTCATGAAAAGT
AGGATAAG
TGTAAGTGTAATTCATATTTTATCCCAGTGCATAAATTTAAAATATCTTACTTTTGCGACAG
TAAAAAAG
ATATTGGAAGTTTTTCTTATGTATGTAAAATTAAATTAAGCCCATCTATATATCATTGCAGG
GTCTCTGA
CACCTGCAATCTCCTTATGATTCGCATATTTCAGTGACCATTTGCCGATTCCATCTCAGATA
TCTTTCTC
ATCAATGGAGGCGGGTATAGTACCAGACAGCACGGTGATAGATATGCCAAATTCCAGAATCC
TGACACCT
GCTGGAGCAATCAATCTCTTCTCAGGTCCCTCGCTTCAGATGTCCCTTCACTTCAGCTCCAT
GGACAGGG
AGGCCAGGGTGCTCAGGTACAGGGAGAAGAAGAAGGCCAGGAAGTTTGAGAAGACAATACGT
TATGAAAC
A----
AGGCGTATGCAGAGGCACGACCCCGGATCAAGGGCCGTTTCGCCAAGACATCAGATGTGCAG
ATC
GAAGTGGACCAGATGTTCTCCACTGCAGCTCTATCTGACGGTAGCTATCGTACTGTTCCATG
GTTCTGAT
GGGACTCATGAGACGCTATCTTATAGGCATATATATGGGGACTTACTGAGTAGCAATAACAT
CGATCCAG
TGGGAGTAGTTCTAGACAATCTGTGTTATGAATAATAGTGTGTTGTTTGCGACTTAAAATTG
ATCAAGTA
CCTTAGCTTTTTAAAGTTTTGCTTTGTAATTTCCGGATAGCAGATATATATTGTTGGTACTT
GCTCAGTA
GCTTTAAGTTTTTGAAGTAAGCAAAGAGCAGTGATGAGATGAAATGAGTATGTGTATAACTG
TATATAGA
TAATTCTAGGGTACCTTGGCCAACAATCACAGTAGCAACAATGCTTTAGGGGTTTAGGTGAC
GAATTGGG
GGTTTAGTTGTTTACTATGAAGTAGCACCAAAATGGTGGAACATATATATTCCTATTTTCGT
TCCATCAT

Exon II

In-R

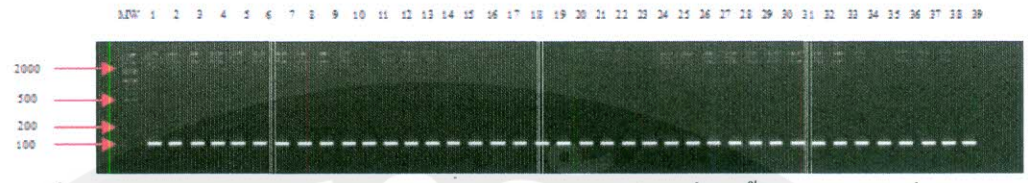
GACATATAACTGCTGTCTAACCAGCCTATGTTGACTGAAAACAAAGCTCGTTTCATTACAAA
ATAAAAGA
TGGAACCCTGATTAAGTGTGTCCACTGGCCAGATAGTATCATAGTAGTATAATAATGAACTG
GAGTTCAA
GTCTTTTATATTCCACTTGGATCTCGGTGCCATTTTCTTAATGATGTATCTTAGTGATGGGC
TATCATTG
TATCCGGTTGGAATTTCAGCAGAGGTGAAGGTGATGGTGTTCACTCAGCTTTTAAATATCCA
TTATTCTT
ACAGCCCTCCAGATCATTCTGGATGAAAAGAAAAGCAGTGACAAAGAATTTACTGTTGCTTT
AACCATGA
GAATCATATCTTTCCAGCACGGCCTATCTTCTCACTAAACCATGAGCTATCGGTGATCAGTA
ACTCGAAT
GATAGTTGTAGGGAATATAGGAACATTGCCTGATACTGATAGGTACACCATTGTGGTTGGGT
GATATAAG
TACAACAAACTCACAGAAAAGTTTCCCTATTATTTTGTGAATCAAGAGAGCATAAATAAGGA
AGCTCTTT
CTCATTCTCAGTGCATTCCTCTTCCCTTTCACTAGCAACTAGTGGCATGGATCTTATTGCCT
TTTGTTTT
GAGATGGAGCATTCACCAAATATCTAAGGCATCTCAGGGCACCAACCGCATATACAGGAATA
CAGGATAC
ATCTAATCGTTTTTGGCTAAGCTTGACTGTATCGGTTAGATATTGCACAAAAAACAGAGTTA
GGAATTAA
GCCCTAAGAGATGGTAATTGGAAACTGGAAAGTGAACTTTTCATTTCAAATATCAACAAAGA
GAGGTCAA
AAAAGTAAAGTGAAATAAAGCACACGGGAGATACAGATCCATATTTTGACCGAAACTGACGA
CATATACC
ACTCTAGTATGGATAGAGAGAACAAATCAAAGTTCTGCAGAAGATAAAACTAGACATAGTTG
ACTAGTAA
CAGAAGAGATTCCTGAACTTTCTCACTGAAACTATCAAGCAAATAGATAAAACTCGTGGTGA
TATTTCAT
CCACATCAGCACTGAGAACAGAACAGCAAGCAAGCAGTTTGATTGTGATGGAGGGAGCTCCT
AGCACATC
ATCATATTATGAAGTAATATTTAATAATCATGGAAGTATGATGAAGGTATTTTTCTGGCAAC
AGTTCTTG
TTTGATGCATCAGAATACCTGATTAACGTGGAATTAATCAAGCATCAGAATCCA



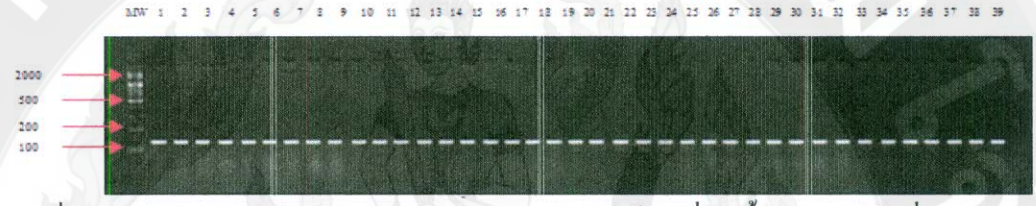
Primer Name (Max 20 characters)	Sequence (5' - 3')	Length in bases
Out-F_Hd1	TATATCATTGCAGGGTCTCTGAC	23
In-F_Hd1	GAGAAGACAATACGTTATGAAACAAGAAAG	30
Out-R_Hd1	GGAACAGTACCATAGCTACCG	21
In-R_Hd1	GGAACAGTACCATAGCTACCG	21

การหา target marker การหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่างๆ

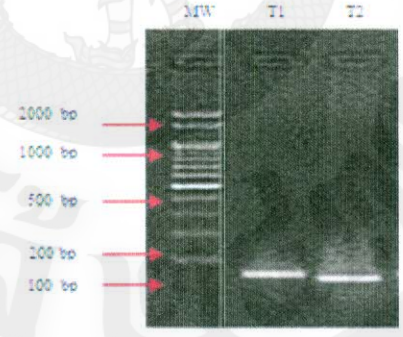
การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเจ้าพันธุ์หอมกระดังงา ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี molecular marker-assisted backcrossing มีพันธุ์รับ (recipient parent) คือข้าวเจ้าพันธุ์ หอมกระดังงา ซึ่งเป็นข้าวเจ้าไวต่อช่วงแสง และมียีโนไทป์เป็น Hd1Hd1 ส่วนพันธุ์ให้ (donor parent) คือข้าวพันธุ์ กข55 ซึ่งเป็นข้าวเจ้าไม่ไวต่อช่วงแสง และมียีโนไทป์เป็น hd1hd1 โดยที่ target gene คือ อัลลีลด้อย hd1 อยู่บนโครโมโซมที่ 6 ที่ 54.1 cM อัลลีลด้อย hd1 ทำหน้าที่ควบคุมข้าวให้ออกดอกโดยไม่ตอบสนองต่อช่วงแสงซึ่งอัลลีลด้อย hd1 ได้มาจากข้าวพันธุ์ กข55 ผลการทดลอง พบว่า การใช้ molecular marker ตรวจสอบสายพันธุ์พ่อแม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมของทั้ง 2 สายพันธุ์ทั้งพันธุ์รับและพันธุ์ให้ ดังภาพที่ 1-3



ภาพที่ 1 ภาพถ่ายเจลภายใต้แสง UV ของลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล fragrance marker ตรวจสอบยีโนไทป์ของต้นข้าว (MW) คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100+2000 bp ladder (1-39) ต้นข้าวเจ้าไม่ไวแสงพันธุ์ กข 55

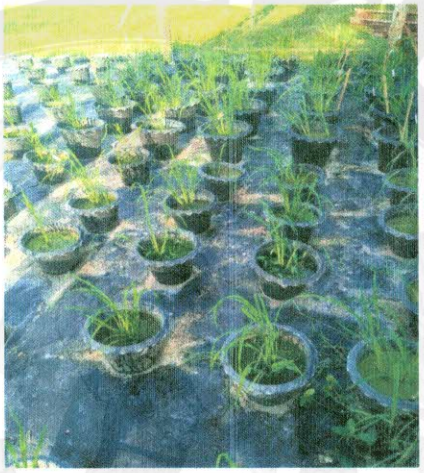


ภาพที่ 2 ภาพถ่ายเจลภายใต้แสง UV ของลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล fragrance marker ตรวจสอบยีโนไทป์ของต้นข้าว (MW) คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100+2000 bp ladder (1-39) ต้นข้าวเจ้าไวแสงพันธุ์ หอมกระดังงา



ภาพที่ 3 ภาพถ่ายเจลภายใต้แสง UV ของลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล fragrance marker ตรวจสอบยีโนไทป์ของต้นข้าว (MW) คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100+2000 bp ladder (T1) ต้นข้าวเจ้าไวแสงพันธุ์ หอมกระดังงา ที่มียีโนไทป์เป็น Hd1 Hd1 (T2) ต้นข้าวเจ้าไม่ไวแสงพันธุ์ กข 55 ที่มียีโนไทป์เป็น hd1 hd1

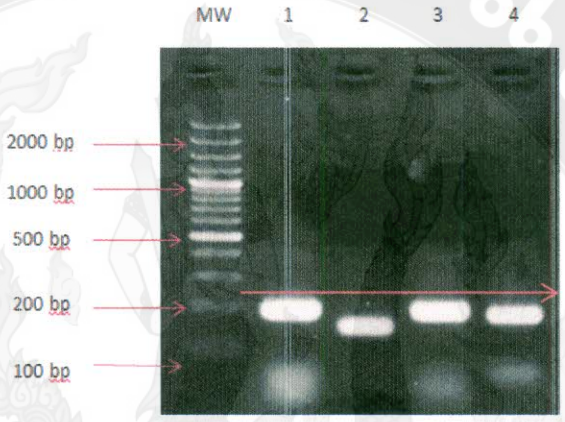
จากการศึกษาวิจัยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการระบุยีนที่มีความสัมพันธ์กับยีนไม่ไวแสง Hd1 ในคู่ผสมข้าวหอมกระดังงากับข้าวกข55 เป็นขั้นตอนการย้ายยีนไม่ไวแสง จากข้าวกข55 ไปสู่ข้าวหอมกระดังงาที่ไวแสงด้วยวิธีการผสมพันธุ์และคัดเลือกยีนไม่ไวแสงHd1ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล เพื่อสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 ลูกผสมที่ได้มีจำนวนทั้งสิ้น 10 เมล็ด



ภาพที่ 4 แปลงพันธุ์แม่พันธุ์พ่อ ได้แก่ ข้าวหอมกระดังงา กับข้าวกข 55

ภาพที่ 5 การติดเมล็ดของข้าวระยะเวลาหลังจากการผสมพันธุ์แล้ว 7วัน

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกตรวจสอบพันธุ์หอมกระดังงากับพันธุ์กข55 พบว่าไพรเมอร์ RM19776 ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์หอมกระดังงา ที่ไวแสงและกข55 ที่ไม่ไวแสงได้ไม่ชัดเจนแสดงว่ายีนที่ควบคุมความไม่ไวแสงของข้าวพันธุ์ กข55 อาจเป็นยีนที่อยู่ตำแหน่งใกล้เคียงกัน ซึ่งอยู่ติดกับตำแหน่งของไพรเมอร์ RM19776 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจึงยังไม่ชัดเจน



ภาพที่ 6 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าว

ช่องที่ 1 ข้าวหอมกระดังงา

ช่องที่ 2 ข้าวปทุมธานี

ช่องที่ 3 ข้าวกข 55

ช่องที่ 4 ข้าว Rathu

ปัญหาและอุปสรรคในการดำเนินงาน

ในช่วงเดือนมกราคมเกิดปัญหาน้ำท่วมในภาคใต้ และท่วมในพื้นที่วิจัยถึง 2 รอบ จึงส่งผลทำลายต้นข้าวทำให้ต้นข้าวที่ปลูกไว้ในการดำเนินการวิจัยและทดลองตาย ดังนั้นจึงต้องดำเนินการเตรียมพื้นที่และปลูกข้าวใหม่ การทำงานจึงไม่เป็นไปตามแผนการทดลองที่ได้วางไว้ และส่งผลต่องบประมาณในโครงการวิจัย เพราะต้องดำเนินการและเสียค่าใช้จ่ายเตรียมพื้นที่ปลูก การปลูก และการดูแลรักษาต้นข้าวใหม่ถึง 2 รอบ ดังนั้นจึงต้องรีบดำเนินการเพราะจะเกิดปัญหาในเรื่องของระยะเวลาที่ล่าช้าออกไปและไม่เป็นไปตามแผนที่ได้วางไว้

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการระบุยีนที่มีความสัมพันธ์กับยีนไม่ไวแสง Hd1 ในคู่ผสมข้าวหอมกระดังงากับข้าวกข55 โดยการทำควบคู่ไป 2 อย่างคือ การปลูกข้าวเพื่อผสมระหว่างข้าวหอมกระดังงา กับข้าวกข 55 โดยได้ลูกผสมจำนวน 10 เมล็ด

การตรวจสอบหายีนที่มีความสัมพันธ์กับยีนไม่ไวแสง Hd1 ในพันธุ์รับข้าวหอมกระดังงาและพันธุ์ให้กข55 ซึ่งผลที่ได้พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM19776 เป็นเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีนไม่ไวแสง Hd1 โดยสังเกตได้จากแถบดีเอ็นเอที่ขึ้นจะอยู่ในระนาบที่ต่างกันแต่แถบที่ขึ้นความแตกต่างระหว่างระนาบอาจจะยังเห็นได้ไม่ชัดมากนัก เป็นเพราะเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM19776 เป็นแค่ยีนแฝงของยีน Hd1 ที่ยังไม่สามารถแยกให้เห็นได้ชัดเจน

จากการศึกษาการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการระบุยีนที่มีความสัมพันธ์กับยีนไม่ไวแสง Hd1 ในคู่ผสมข้าวหอมกระดังงากับข้าวกข55 พบว่า ยีนไม่ไวแสง Hd1 เป็นยีนข้างเคียง (Flanking gene) ซึ่งจากงานวิจัยมีการรายงานว่ายีน Hd1 เป็นยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการตอบ สนองต่อช่วงแสงในข้าว ถ้าข้าวมียีน Hd1 จะสามารถออกดอกได้ตลอดทั้งปี

การศึกษาครั้งนี้ผลที่ได้สอดคล้องกับ วราภรณ์ (2551) การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียว พันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วย ในการคัดเลือก ผลของการทดลองสามารถหา Flanking gene ที่สัมพันธ์กับยีน Hd1 ที่หาได้สามารถใช้คัดเลือกหาต้น BC_nF_1 ที่เป็น heterozygous สำหรับ Hd1 ของ กข 6 กับอัลลีล hd1 ของ Taichung 65 ส่วน flanking marker 1 ที่คัดเลือกไว้ได้

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2543. การพัฒนาการเกษตรไทยยุคเทคโนโลยีชีวภาพ. สำนักงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ. กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ.

จรัสศรี นวลศรี. 2548. เอกสารคำสอนการปรับปรุงพันธุ์พืชสวน. ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

ฉวีวรรณ วุฒิญาโณ. 2543. เอกสารวิชาการ พันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทย. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

วราภรณ์ แสงทอง และคณะ. 2554. รายงานการวิจัยการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวหอมจากข้าวเจ้าด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก.

สรพงศ์ เบญจศรี. 2554. เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 39:350-363.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 5:37-59.

Allard RW. 1960. Principles of plant breeding. Wiley, New York. 485 p.

Francia E, Tacconi G, Crosatti C, Barabaschi D, Bulgarelli D, Dall'Aglio E, and Vale G. 2005. Marker assisted selection in crop plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 82: 317–342.

Frisch M, Bohn M and AE Melchinger. 1999a. Minimum sample size and optimum positioning offlanking markers in marker-assisted backcrossing for transfer of a target gene. Crop Sci 39:967-975.

Kanawapee, N., J. Sanitchon, P. Srihaban, and P. Theerakulpisut. 2011. Genetic diversity analysis of rice cultivars (*Oryza sativa* L.) differing in salinity tolerance based on RAPD and SSR markers. Electron. J. Biotechnol. 14:1-17.

Mondini, L., A. Noorani, and M.A. Pagnotta. 2009. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. Diversity. 1:19-35.

Newbury HJ. 2003. Marker-assisted breeding. Plant Molecular Breeding. 320 p.

Paterson, A.H., S.D. Tankslay, and M.E. Sorrells. 1991. DNA markers in plant improvement. Adv. Agron. 46:39-90.

Salem, K.F.M., A.M. El-Zanaty, and R.M. Esmail. 2008. Assessing wheat (*Triticum aestivum* L.) genetic diversity using morphological characters and microsatallite markers. J. Agric. Sci. 4:538-544.

Seetharam, K., S. Thirumeni, and K. Paramasivam. 2009. Estimation of genetic diversity in rice (*Oryza sativa L.*) genotypes using SSR markers and morphological characters. Afr. J. Biotechnol. 8:2050-2059.

Upadhyay, P., V.K. Singh, and C.N. Neeraja. 2011. Identification of genotype specific alleles and molecular diversity assessment of popular rice *(Oryza sativa* L.) varieties of India. Int. J. Plant Breed. Genet. 5:130-140.

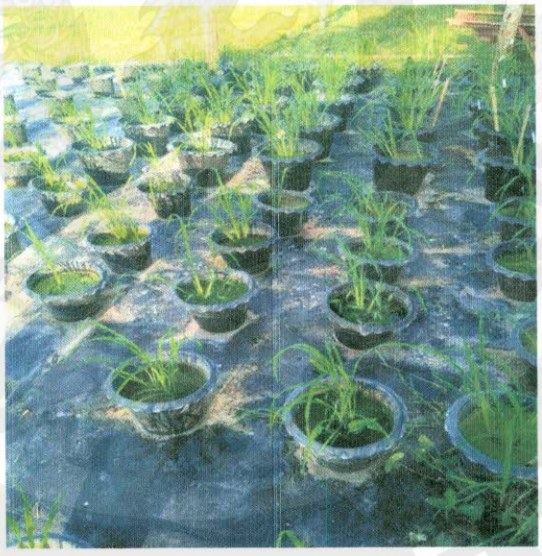
ภาคผนวก

ภาพการดำเนินโครงการวิจัย

ภาพที่ 7 เมล็ดพันธุ์ข้าวหอมกระดังงา

ภาพที่ 8 เมล็ดพันธุ์ข้าว กข55

ภาพที่ 9 นำเมล็ดข้าวลงปลูกในกระถาง



ภาพที่ 10 จัดเรียงกระถางข้าว

ภาพที่ 11 การวัดความสูงของข้าว

ภาพที่ 12 อุปกรณ์ในการผสมข้าว

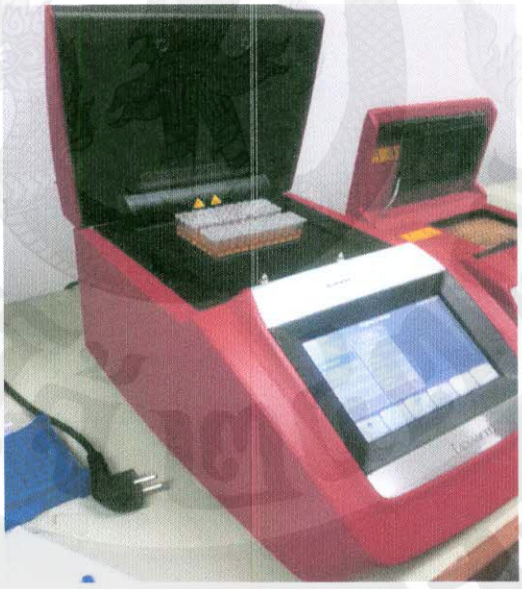
ภาพที่ 13 พันธุ์ข้าวพร้อมผสม

ภาพที่ 14 การตัดดอกข้าวหอมกระดังงาออก

ภาพที่ 15 การทำหมันเกสรตัวผู้ของข้าวหอมกระดังงา

ภาพที่ 16 การผสมพันธุ์

ภาพที่ 17 ติดป้ายแท็กเพื่อระบุสายพันธุ์และวันที่ผสม



ภาพที่ 18 เครื่อง PCR

ภาพที่ 19 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

ภาพที่ 20 ดีเอ็นเอที่สกัดได้

ภาพที่ 21 ทำเจลอิเล็คโตโฟรีซีส

ภาพที่ 22 ส่องเจล

ภาพที่ 23 การเพาะเมล็ดข้าว

ภาพที่ 24 การเตรียมแปลงปลูกข้าว

ภาพที่ 25 แปลงปลูกข้าว