รหัสโครงการวิจัย มจ. 1-57-003

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การพัฒนาพันธุ์ข้าวเหนียวหอมจากข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 ด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้ เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการ คัดเลือก

Development of Aromatic Glutinous Rice from Non-glutinous Rice Varieties, Suphanburi 1 and Chinat 80 by Using Marker-assisted Backcrossing Selection

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2557
จำนวน 280,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นางสาววราภรณ์ แสงทอง
ผู้ร่วมโครงการ นายสุภักตร์ ปัญญา

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์
30 / 9 / 2558

คำนิยม

ขอขอบพระคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ทุนวิจัยแก่คณะผู้วิจัยในการทำการวิจัยในปีงบประมาณ 2557 และกรมการข้าว ที่มอบเมล็ดพันธุ์ข้าวเพื่อนำมาใช้ในโครงการวิจัย จนโครงการวิจัยนี้ประสบผลสำเร็จอย่างดียิ่ง

สารบัญ

	หน้า
คำนิยม	ก
สารบัญ	ข
สารบัญตาราง	ค
สารบัญภาพ	ง
บทคัดย่อ	1
ABSTRACT	2
คำนำ	5
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	7
ขอบเขตของโครงการวิจัย	7
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	8
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	11
การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก	11
การปรับปรุงพันธุ์ข้าว	13
วิธีการดำเนินการวิจัย	15
ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย	20
สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	21
ผลการวิจัย	21
สรุปผล	31
เอกสารอ้างอิง (References of Literature cited)	33

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงระยะเวลาที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวของประเทศไทย	6
ตารางที่ 2	แสดงจำนวนตำแหน่งของ background marker	22
ตารางที่ 3	น้ำหนักเมล็ดของสายพันธุ์ข้าว BC_3F_2 ของประชากร (ชัยนาท 80 x กข6) จำนวน 6 ประชากร และ (สุพรรณบุรี 1 x กข6) จำนวน 3 ประชากร	24
ตารางที่ 4	น้ำหนักเมล็ดของสายพันธุ์ข้าว BC_4F_2 ของประชากร (ชัยนาท 80 x กข6) จำนวน 4 ประชากร และ (สุพรรณบุรี 1 x กข6) จำนวน 3 ประชากร	25
ตารางที่ 5	น้ำหนักเมล็ดของสายพันธุ์ข้าว BC_5F_2 ของประชากร (ชัยนาท 80 x กข6) จำนวน 2 ประชากร และ (สุพรรณบุรี 1 x กข6) จำนวน 11 ประชากร	29
ตารางที่ 6	น้ำหนักเมล็ดของสายพันธุ์ข้าว BC_6F_2 ของประชากร (ชัยนาท 80 x กข6) จำนวน 3 ประชากร และ (สุพรรณบุรี 1 x กข6) จำนวน 5 ประชากร	30

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ภาพถ่ายเจลภายใต้แสง UV ของลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล Glu-23 ตรวจสอบยีโนไทป์ของต้นข้าว (M) คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (1) ต้นข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ที่มียีโนไทป์เป็น wxwx (2) ต้นข้าว F_1 ที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx และ (3) ต้นข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่มียีโนไทป์เป็น WxWx	9
ภาพที่ 2	ลักษณะเมล็ดข้าวสารของพันธุ์ข้าวในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ให้เป็นข้าวเหนียวด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (a) ข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ (b) ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ ส่วน (c) สายพันธุ์ข้าวเจ้า (WxWx) และ (d) สายพันธุ์ข้าวเหนียว (wxwx) ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์	9
ภาพที่ 3	แสดงขนาดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV เพื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอจากผลผลิต PCR เมื่อใช้ ESP, IFAP, INSP และ EAPA ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลยีนหอมของข้าว (fragrance gene) (Bradbury *et al.*, 2005) เป็นไพรเมอร์ และมีดีเอ็นเอแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ต่างๆ ถ้าข้าวพันธุ์ใดมีอัลลีลหอม *(fgr)* จะมีแถบดีเอ็นเอขนาด 257 bp แต่ถ้าข้าวที่ไม่มีอัลลีล หอม (*Fgr*) จะไม่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 257 bp	11
ภาพที่ 4	ภาพถ่ายเจลภายใต้แสง UV ของลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล *waxy* marker ตรวจสอบยีโนไทป์ของต้นข้าว (M) คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (1) ต้นข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 80 ที่มียีโนไทป์เป็น WxWx (2) ต้นข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ที่มียีโนไทป์เป็น wxwx และ (3-6) ต้นข้าว BC_4F_1 ที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx	26
ภาพที่ 5	ภาพถ่ายเจลภายใต้แสง UV ของลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล fragrance marker ตรวจสอบยีโนไทป์ของต้นข้าว (M) คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (1) ต้นข้าวเจ้าไม่หอมพันธุ์ชัยนาท 80 ที่มียีโนไทป์เป็น FgrFgr (2) ต้นข้าวเหนียวหอมพันธุ์ กข6 ที่มียีโนไทป์เป็น fgrfgr และ (3-6) ต้นข้าว BC_4F_1 ที่มียีโนไทป์เป็น Fgrfgr	26

หน้า

ภาพที่ 6 ภาพถ่ายเจลภายใต้แสง UV ของลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล *waxy* marker ตรวจสอบยีโนไทป์ของต้นข้าว (M) คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (1) ต้นข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ที่มียีโนไทป์เป็น WxWx (2) ต้นข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ที่มียีโนไทป์เป็น wxwx และ (3-5) ต้นข้าว BC_4F_1 ที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx 27

ภาพที่ 7 ภาพถ่ายเจลภายใต้แสง UV ของลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล fragrance marker ตรวจสอบยีโนไทป์ของต้นข้าว (M) คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (1) ต้นข้าวเจ้าไม่หอมพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ที่มียีโนไทป์เป็น FgrFgr (2) ต้นข้าวเหนียวหอมพันธุ์ กข6 ที่มียีโนไทป์เป็น fgrfgr และ (3-5) ต้นข้าว BC_4F_1 ที่มียีโนไทป์เป็น Fgrfgr 27

การพัฒนาพันธุ์ข้าวเหนียวหอมจากข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 ด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้ เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการ คัดเลือก

Development of Aromatic Glutinous Rice from Non-glutinous Rice Varieties, Suphanburi 1 and Chinat 80 by Using Marker-assisted Backcrossing Selection

วราภรณ์ แสงทอง[1] ประวิตร พุทธานนท์[2] และสุภักตร์ ปัญญา[2]

Varaporn Sangtong[1], Prawit Puddhanon[2], and Supak Phanya[2]

[1]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

[2]ภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290

[1]Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai 50290

[2]Agronomy Department, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai 50290

บทคัดย่อ

ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมด 57 ล้านไร่ เป็นพื้นที่ปลูกข้าวเหนียว 18 ล้านไร่ ซึ่งคิดเป็น 31 % ของพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมด. พันธุ์ข้าวเหนียวไม่ไวต่อช่วงแสงต้นเตี้ยที่ชาวนานิยมปลูกมีเพียง 3 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวเหนียวพันธุ์ สันป่าตอง 1 กข10 และแพร่ 1 ในขณะที่ข้าวเจ้าพันธุ์ดีมีมากมาย ดังนั้น โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำข้าวเจ้าพันธุ์ดีจำนวน 2 พันธุ์ คือ ข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 80 และสุพรรณบุรี 1 ซึ่งมีผลผลิตสูง ต้นเตี้ย ไม่ไวต่อช่วงแสง ต้านทานต่อโรคและแมลงที่สำคัญของข้าว มาเป็นพันธุ์รับ เพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้เป็นข้าวเหนียวหอมด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก ซึ่งเป็นการคัดเลือกในระดับยีโนไทป์หรือยีน ทำให้การคัดเลือกมีความถูกต้อง แม่นยำ และช่วยลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลง การทดลองเริ่มจากในฤดูแรก ผลิตเมล็ด F_1 โดยผสมข้ามข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 80 และสุพรรณบุรี 1 ซึ่งใช้เป็นพันธุ์รับกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ซึ่งใช้เป็นพันธุ์ให้ พบว่า ผลิตเมล็ด F_1 ของคู่ผสมระหว่างชัยนาท 80 กับ กข6 ได้จำนวน 19 เมล็ด ส่วนคู่ผสมระหว่างสุพรรณบุรี 1 กับ กข6 ได้จำนวน 82 เมล็ด ในฤดูที่ 2 ผลิตเมล็ด BC_1F_1 ของคู่ผสมข้าวเจ้าชัยนาท 80 กับข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ได้จำนวน57 เมล็ด และผลิตเมล็ด BC_1F_1 ของคู่ผสมข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 กับข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ได้จำนวน 147 เมล็ด ฤดูที่ 3 ผลิตเมล็ด BC_2F_1 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 ได้จำนวน 24 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6

จำนวน 97 เมล็ด และในฤดูที่ 4 ผลิตเมล็ด BC_3F_1 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 32 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 226 เมล็ด นอกจากนี้ พบว่า background markers จำนวน 8 ตำแหน่ง ที่สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 80 กับข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ได้ และ background markers จำนวน 7 ตำแหน่งที่สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 กับข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ได้

ต่อมาในฤดูที่ 5 ผลิตเมล็ด BC_4F_1 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 82 เมล็ด และเมล็ด BC_4F_1 ของคู่ผสมสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 61 เมล็ด รวมถึงเมล็ด BC_3F_2 (ชัยนาท 80 x กข6) จำนวน 6 ประชากร และเมล็ด BC_3F_2 (สุพรรณบุรี 1 x กข6) จำนวน 3 ประชากร ฤดูที่ 6 ผลิตเมล็ด BC_5F_1 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 11 เมล็ด และเมล็ด BC_4F_1 ของคู่ผสมสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 17 เมล็ด รวมถึงเมล็ด BC_4F_2 (ชัยนาท 80 x กข6) จำนวน 4 ประชากร และเมล็ด BC_4F_2 (สุพรรณบุรี 1 x กข6) จำนวน 3 ประชากร ฤดูที่ 7 เนื่องจากการคัดเลือกต้น BC_5F_1 (ชัยนาท 80 x กข6) พบต้นที่มียีโนไทป์เป็น heterozygous เพียง 1 ต้น และการคัดเลือกต้น BC_5F_1 (สุพรรณบุรี 1 x กข6) ไม่พบต้นที่มียีโนไทป์เป็น heterozygous ของยีนทั้ง 2 ตำแหน่ง จึงแก้ไขโดยการปลูกและคัดเลือกเมล็ด BC_4F_2 เพื่อผลิตเมล็ด BC_5F_1 ซึ่งได้เมล็ด BC_5F_1 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 19 เมล็ด และเมล็ด BC_5F_1 ของคู่ผสมสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 21 เมล็ด ฤดูที่ 8 ผลิตเมล็ด BC_6F_1 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 23 เมล็ด และเมล็ด BC_6F_1 ของคู่ผสมสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 40 เมล็ด รวมถึงเมล็ด BC_5F_2 (ชัยนาท 80 x กข6) จำนวน 2 ประชากร และเมล็ด BC_5F_2 (สุพรรณบุรี 1 x กข6) จำนวน 11 ประชากร และฤดูที่ 9 ผลิตเมล็ด BC_7F_1 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 40 เมล็ด และเมล็ด BC_7F_1 ของคู่ผสมสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 167 เมล็ด รวมถึงเมล็ด BC_6F_2 (ชัยนาท 80 x กข6) จำนวน 3 ประชากร และเมล็ด BC_6F_2 (สุพรรณบุรี 1 x กข6) จำนวน 5 ประชากร

คำสำคัญ: ข้าวเหนียว, ข้าวเจ้า, ผสมกลับ และเครื่องหมายโมเลกุล

ABSTRACT

Thailand has about 57 million rais of land grown to rice, 18 million rais of which have been planted to glutinous rice, comprising about 31% of the total area. There have only been about 3 rice varieties which farmers preferred to cultivate: San Pa Tong 1, RD6 and Phrae 1 among the many good varieties of non-glutinous rice varieties, This project aimed to use two good non-glutinous rice varieties (Chai Nat 80

and Suphan Buri 1) which are high yielding, dwarf, non-photoperiod sensitive and highly resistant to disease and pests (important characteristics of the rice plant) as receiver plants in order to develop the sweet glutinous rice varieties by molecular marker-assisted backcrossing to select genotypes or genes that would lead to proper selection of recurrent parents and at the same time, reduce the period of deverlopment. The research was started initially with the production of F_1 seeds by crossing Suphan Buri 1 and Chai Nat 80 which were used as donor parents with glutinous RD6 as recurrent parents. Results showed that Nineteen F_1 seeds were produced by the cross between Chai Nat 80 and RD6 while 82 seeds resulted from the cross between Suphan Buri 1 and RD6. In the second planting season, 57 BC_1F_1 seeds resulted from the cross between non-glutinous Chai Nat 80 and glutinous RD6 while 147 seeds were produced from the cross between non-glutinous Suphan Buri 1 and glutinous RD6.

In the third planting season, produced BC_2F_1 seeds from the cross between Chai Nat 80 x RD6 and Suphan Buri 1 x RD6 result were 24 and 97 seeds respectively. Finally in the fourth planting season, 32 BC_3F_1 seeds resulted from the cross between non-glutinous Chai Nat 80 and glutinous RD6 while 226 seeds were produced from the cross between non-glutinous Suphan Buri 1 and glutinous RD6. Aside from these, results also showed that 8 background markers were located in loci which could indicate the genetic differences between non-glutinous Chai Nat 80 and glutinous RD6 and 7 background markers were able to show the genetic difference between non-glutinous Suphan Buri 1 and RD6.

In the fifth planting season, produced BC_4F_1 seeds from the cross between Chai Nat 80 x RD6 and Suphan Buri 1 x RD6 were 82 and 61 seeds, respectively. In addition, BC_3F_2 (Chai Nat 80 x RD6) seeds yielded had 6 populations and BC_3F_2 (Suphan Buri 1 x RD6) yielded had 3 populations

In the sixth planting season, 11 BC_5F_1 seeds resulted from the cross between non-glutinous Chai Nat 80 and glutinous RD6 while 17 seeds were produced from the cross between non-glutinous Suphan Buri 1 and glutinous RD6. In addition, BC_4F_2 (Chai Nat 80 x RD6) seeds yielded had 4 populations and BC_4F_2 (Suphan Buri 1 x RD6) yielded had 3 populations

In the seventh planting season, due to the selection of the BC_5F_1 plant from the cross between non-glutinous Chai Nat 80 and glutinous RD6 yielded only 1 plant with genotypes heterozygous and the BC_5F_1 plants from the cross between non-glutinous Suphan Buri 1 and glutinous RD6 did not have genotypes as heterozygous at 2 loci. The selection was modified by planting BC_4F_2 plant for producing BC_5F_1 seeds. Results showed that 19 BC_5F_1 seeds were produces from the cross between Chai Nat 80 and RD6 while 21 seeds resulted from the cross between Suphan Buri 1 and RD6.

In the eighth planting season, 23 BC_6F_1 seeds resulted from the cross between non-glutinous Chai Nat 80 and glutinous RD6 while 40 seeds were produced from the cross between non-glutinous Suphan Buri 1 and glutinous RD6. In addition, BC_5F_2 (Chai Nat 80 x RD6) seeds had 2 populations and BC_5F_2 (Suphan Buri 1 x RD6) yielded had 11 populations

In the ninth planting season, 40 BC_7F_1 seeds resulted from the cross between non-glutinous Chai Nat 80 and glutinous RD6 while 167 seeds were produced from the cross between non-glutinous Suphan Buri 1 and glutinous RD6. In addition, BC_6F_2 (Chai Nat 80 x RD6) seeds yielded had 3 populations and BC_6F_2 (Suphan Buri 1 x RD6) yielded had 5 populations

Key words: glutinous rice, non-glutinous rice backcross and molecular markers

คำนำ (Introduction)

ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมด 57 ล้านไร่ เป็นพื้นที่ปลูกข้าวเจ้า 39 ล้านไร่ คิดเป็น 69 % และเป็นพื้นที่ปลูกข้าวเหนียว 18 ล้านไร่ คิดเป็น 31 % ของพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมด พันธุ์ข้าวเจ้าที่มีพื้นที่ปลูกมากที่สุด คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวไวแสง มีพื้นที่ปลูก 18 ล้านไร่ คิดเป็น 31 % ของพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมด นอกจากนี้ ยังมีข้าวเจ้าพันธุ์ดีจำนวนมากที่มีผลผลิตสูง ไม่ไวต่อช่วงแสง จึงปลูกได้ทั้งนาปีและนาปรัง มีความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูข้าว เช่น ข้าวเจ้าพันธุ์ สุพรรณบุรี 1, สุพรรณบุรี 2, สุพรรณบุรี 3, สุพรรณบุรี 60, สุพรรณบุรี 90, ปทุมธานี 1, ปทุมธานี 60, ชัยนาท 1, ชัยนาท 80 และ กข39 ซึ่งพันธุ์ข้าวเจ้าเหล่านี้ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ และผ่านการทดสอบสายพันธุ์ตามหลักวิชาการจากกรมการข้าวมาเป็นอย่างดี จึงทำให้ชาวนาที่ปลูกข้าวเจ้ามีโอกาสที่จะเลือกพันธุ์ข้าวเจ้าที่จะปลูกให้เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ของตนได้ ส่วนพันธุ์ข้าวเหนียวที่มีพื้นที่ปลูกมากที่สุด คือ ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เป็นข้าวไวแสง มีพื้นที่ปลูก 15 ล้านไร่ คิดเป็น 83 % ของพื้นที่ปลูกข้าวเหนียวทั้งหมด และคิดเป็น 26 % ของพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมดของประเทศ ข้าวเหนียวที่มีพื้นที่ปลูกรองจากพันธุ์ กข6 คือ กข10 เป็นข้าวเหนียวไม่ไวแสง มีพื้นที่ปลูก 2 ล้านไร่ ซึ่งคิดเป็น 11 % ของพื้นที่ปลูกข้าวเหนียวทั้งหมด ส่วนข้าวเหนียวพันธุ์อื่นๆ มีพื้นที่ปลูกเพียงร้อยละ 6 ของพื้นที่ปลูกข้าวเหนียวทั้งหมด พันธุ์ข้าวเหนียวอื่นๆ ได้แก่ ข้าวเหนียวสันป่าตอง เป็นข้าวไวต่อช่วงแสง กข8 เป็นข้าวไวแสง ส่วนข้าวเหนียวแพร่ 1 และสันป่าตอง 1 เป็นพันธุ์ไม่ไวต่อช่วงแสง และพันธุ์พื้นเมืองเป็นข้าวไวต่อช่วงแสง (กรมวิชาการเกษตร, 2551)

ชาวนาส่วนใหญ่ในเขตภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะปลูกข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ไว้เพื่อบริโภค เนื่องจากเป็นพันธุ์ข้าวเหนียวที่มีข้าวสุกอ่อนนุ่ม และมีกลิ่นหอม แต่ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 เป็นข้าวที่ไวต่อช่วงแสง จึงปลูกได้เฉพาะฤดูนาปีเท่านั้น ไม่สามารถปลูกในฤดูนาปรังได้ นอกจากนี้ ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ไม่ต้านต่อโรคและแมลงส่วนใหญ่ของข้าว พันธุ์ข้าวเหนียวที่ไม่ไวต่อช่วงแสงที่ชาวนานิยมปลูกไว้ขายมีเพียง 3 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1, กข10 และแพร่ 1 ดังนั้น ชาวนาที่ปลูกข้าวเหนียวจึงขาดแคลนพันธุ์ข้าวเหนียวที่มีผลผลิตสูง ไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นเตี้ย และมีความต้านทานต่อโรคและแมลงของข้าว

ในอดีต มีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวหรือพัฒนาโดยการฉายรังสี เช่น นำเมล็ดข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ กข1 มาฉายรังสี เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และปลูกคัดเลือกจนได้ข้าวเหนียวพันธุ์ดี คือ กข 6 และ กข 10 ตามลำดับ ใช้ระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวเหล่านี้พันธุ์ละ 12 ปี จึงจะได้ข้าวเหนียวพันธุ์ดีออกมาสู่เกษตรกร ส่วนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์แพร่ 1 และสันป่าตอง 1 ใช้การปรับปรุงแบบดั้งเดิม ใช้เวลาปรับปรุงพันธุ์นานถึง 19 และ 16 ปี ตามลำดับ ดังนั้น การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวแต่ละพันธุ์ใช้เวลาเฉลี่ย 15 ปี (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงระยะเวลาที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวของประเทศไทย

พันธุ์	พ.ศ. ที่เริ่มปรับปรุง	พ.ศ.ที่รับรองพันธุ์	ระยะเวลาที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ (ปี)
กข6	2508	2520	12
กข10	2512	2524	12
แพร่ 1	2518	2537	19
สันป่าตอง 1	2527	2543	16
เฉลี่ย	-	-	15

แหล่งที่มา กรมการข้าว (2552)

เนื่องจากในปัจจุบัน การปรับปรุงพันธุ์ข้าวสามารถใช้ความรู้ทางพันธุศาสตร์โมเลกุล เช่น เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) มาช่วยในการคัดเลือก เป็นการคัดเลือกในระดับยีโนไทป์หรือยีน ไม่ใช่คัดเลือกฟีโนไทป์ที่มีผลจากสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องเหมือนการปรับปรุงพันธุ์อย่างดั้งเดิม การใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการคัดเลือกยีโนไทป์ทำให้การคัดเลือกมีความแม่นยำ และถูกต้องมากยิ่งขึ้น รวมทั้งยังเป็นการช่วยลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลง

โครงการวิจัยนี้ "การปรับปรุงข้าวพันธุ์เหนียวหอมจากข้าวเจ้าด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก" เลือกนำข้าวเจ้าพันธุ์ดีจำนวน 2 พันธุ์ คือ ข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 มาปรับปรุงพันธุ์ให้เป็นข้าวเหนียวหอม ด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการคัดเลือก สาเหตุที่เลือกข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 มาเป็นพันธุ์รับ เพื่อปรับปรุงหรือพัฒนาให้เป็นข้าวเหนียว เพราะข้าวเจ้าทั้ง 2 พันธุ์ มีผลผลิตสูง ต้นเตี้ย ไม่ไวต่อช่วงแสง และมีลักษณะที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง คือ ต้านทานต่อโรคและแมลงที่สำคัญของข้าว ซึ่งลักษณะต้านทานต่อโรคและแมลงนี้ มีความสำคัญมาก เพราะการปรับปรุงพันธุ์ในลักษณะนี้ทำได้ยาก ต้องใช้ระยะเวลานาน และในอนาคต ปัญหาโรคแมลงของข้าวก็จะกลายเป็นปัญหาสำคัญของการปลูกข้าว นอกจากนี้ ข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 80 เป็นข้าวที่มีอายุสั้นเพียง 99 วัน เมื่อปลูกในฤดูนาปรัง ซึ่งจะทำให้ได้พันธุ์ข้าวเหนียวที่มีอายุสั้น ซึ่งจะทำให้เกษตรกรสามารถปลูกข้าวหรือพืชอื่นในพื้นที่นาได้มากครั้งยิ่งขึ้น เมื่อพันธุ์ข้าวสุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 ถูกปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือก ก็จะยังคงลักษณะอื่นๆ ของพันธุ์เดิมไว้ยกเว้นเปลี่ยนจากข้าวเจ้าไม่หอม เป็นข้าวเหนียวหอม

สาเหตุที่เลือกวิธีปรับปรุงพันธุ์ข้าวเจ้าให้เป็นข้าวเหนียวหอมด้วยวิธีผสมกลับ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก เพราะวิธีนี้จะทำให้ได้สายพันธุ์ข้าวเหนียวที่มีพันธุกรรม

ทั้งหมดเหมือนกับพันธุ์ข้าวเจ้าพันธุ์เดิม (สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80) แสดงว่ายังคงรักษาลักษณะผลผลิตสูง ต้านทานต่อโรคและแมลงไว้ ยกเว้นเปลี่ยนเฉพาะยีโนไทป์ WxWx FgrFgr ที่มีฟีโนไทป์เป็นข้าวเจ้าไม่หอม กลายเป็นข้าวเหนียวหอมที่มียีโนไทป์เป็น wxwx fgrfgr นอกจากนี้การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกช่วยย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้ถึง 3-7 ปี ซึ่งถ้าโครงการนี้ประสบผลสำเร็จ จะเป็นแนวทางใหม่ที่สามารถใช้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ดี ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อชาวนาที่ปลูกข้าวเหนียว

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. สร้างสายพันธุ์ข้าวเหนียวหอมจำนวน 2 สายพันธุ์จากข้าวเจ้าพันธุ์ดี คือ พันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 ด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือก

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ขอบเขตการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 ให้เป็นข้าวเหนียวหอมด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือก ทำโดยใช้ข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 เป็นพันธุ์รับ (recurrent parent) และมีพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 เป็นพันธุ์ให้ (donor parent) อัลลีลด้อย *wx* ที่ควบคุมให้ข้าวเป็นข้าวเหนียว และอัลลีลด้อย *fgr* ที่ควบคุมให้ข้าวหอม target gene คือ อัลลีลด้อย *wx* และอัลลีลด้อย *fgr* เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้คัดเลือก *Wx/wx* คือ ไพรเมอร์ Glu-23 (Wanchana *et al.*, 2003) เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้คัดเลือก *Fgr/fgr* คือ ไพรเมอร์ ESP, IFAP, INSP และ EAPA (Bradbury *et al.*, 2005) ซึ่งไพรเมอร์ทั้ง 2 ตำแหน่ง มีเรียบร้อยแล้ว แต่ยังต้องหา flanking marker 1 และ 2 ที่ขนาบอยู่ทั้ง 2 ข้าง ของยีน *Wx/wx* และ *Fgr/fgr* เพื่อป้องกันไม่ให้ยีนอื่นๆ ที่ไม่ต้องการติดมากับ target gene และหา background marker เป็นชนิด SSR marker อีกประมาณ 60 ตำแหน่ง เฉลี่ย 5 ตำแหน่ง/โครโมโซม เพื่อใช้คัดเลือกหาต้น BC_nF_n ที่มีพันธุกรรมเหมือนพันธุ์รับมากที่สุด ขั้นตอนโดยย่อ เริ่มจากการผลิตเมล็ด F_1 ระหว่างข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 กับข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 และข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 1 กับข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 การคัดเลือกต้น F_1 ผลิตเมล็ด BC_1F_1 คัดเลือกต้น BC_1F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล ผลิตเมล็ด BC_2F_1 คัดเลือกต้น BC_2F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และ ผลิตเมล็ด BC_3F_1 ซึ่งในโครงการนี้จะหยุดลงในขั้นตอนนี้ และจะขอโครงต่อจนทำสำเร็จ

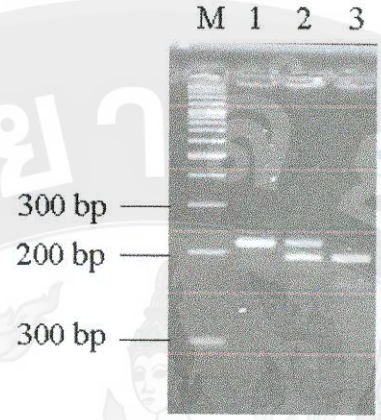
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ลักษณะความเป็นข้าวเจ้าและข้าวเหนียวถูกควบคุมด้วย waxy gene (*Wx/wx*) ซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 6 อัลลีลเด่น *Wx* ควบคุมความเป็นข้าวเจ้า และอัลลีลด้อย *wx* ควบคุมความเป็นข้าวเหนียว เนื่องจากมีความแตกต่างกันระหว่างอัลลีลเด่น *Wx* กับอัลลีลด้อย *wx* คือ ในอัลลีลด้อยพบมีการเพิ่มขึ้นของเบสจำนวน 23 bp อีก 1 ชุดในเอ็กซอนที่ 2 แต่ไม่พบการเพิ่มนี้ในอัลลีลเด่น จึงมีการออกแบบไพรเมอร์ Glu-23 ให้เฉพาะกับ 23-bp duplication นี้ ซึ่งสามารถใช้ไพรเมอร์นี้แยกความแตกต่างของอัลลีลด้อย *wx* ของข้าวเหนียว จากอัลลีลเด่น *Wx* ของข้าวเจ้าได้ (glutinous/non-glutinous alleles) (Wanchana *et al.*, 2003)

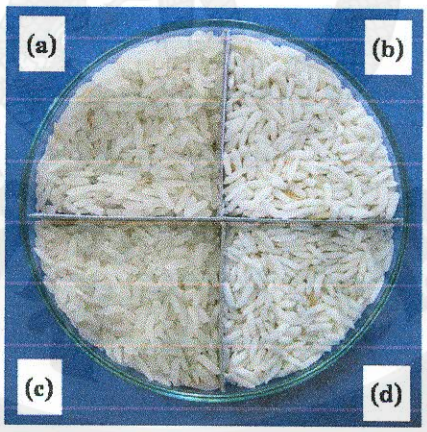
เจตศรัณย์ และคณะ (2549) ซึ่งเป็นนักศึกษาระดับปริญญาโทของคณะผู้วิจัย ศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะความเป็นข้าวเจ้าและข้าวเหนียว โดยศึกษาอัตราส่วนฟีโนไทป์และยีโนไทป์ในข้าวรุ่น F_2 ซึ่งเกิดจากการผสมกัน ระหว่างข้าวเหนียวกับข้าวเจ้า ได้แก่ คู่ผสมระหว่างข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 x ข้าวเจ้าพันธุ์ Taichung 65, ข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 x ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6, ข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 1 x ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 และข้าวเจ้าพันธุ์ปทุมธานี 1 x ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 พบว่า อัตราส่วนฟีโนไทป์ของเมล็ดข้าวรุ่น F_2 เท่ากับ 3/4 ข้าวเจ้า:1/4 ข้าวเหนียว และเมื่อศึกษาอัตราส่วนยีโนไทป์ของต้นข้าวรุ่น F_2 ของคู่ผสมข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 x ข้าวเจ้าพันธุ์ Taichung 65 ด้วยไพรเมอร์ Glu-23 ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างของอัลลีลเด่น *Wx* จากอัลลีลด้อย *wx* พบว่า อัตราส่วนยีโนไทป์ของต้นข้าวรุ่น F_2 เท่ากับ 1/4 WxWx : 2/4 Wxwx : 1/4 wxwx นอกจากนี้ เมื่อนำต้น F_2 จากคู่ผสมข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 x ข้าวเจ้าพันธุ์ Taichung 65 ที่มียีโนไทป์เป็น WxWx ผสมตัวเองได้เมล็ด F_3 เป็นข้าวเจ้าทุกเมล็ด เมื่อผสมตัวเองต้น F_2 ที่มียีโนไทป์เป็น wxwx ได้เมล็ด F_3 เป็นข้าวเหนียวทุกเมล็ด และเมื่อผสมตัวเองต้น F_2 ที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx ได้เมล็ด F_3 มีอัตราส่วนฟีโนไทป์เท่ากับ 3/4 ข้าวเจ้า : 1/4 ข้าวเหนียว ดังนั้น อัลลีลเด่น *Wx* ข่มอัลลีลด้อย *wx* อย่างสมบูรณ์ สรุปว่าการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะความเป็นข้าวเจ้าและข้าวเหนียวเป็นไปตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล ดังนั้น ลักษณะความเป็นข้าวเจ้าและข้าวเหนียวถูกควบคุมด้วยยีนเพียง 1 ตำแหน่ง

ต่อมา เจตศรัณย์ (2550) ทำการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ให้เป็นข้าวเหนียว ด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือก โดยใช้ไพรเมอร์ Glu-23 ช่วยในการคัดเลือก (ภาพที่ 1) ได้ข้าวเหนียวสายพันธุ์ (wxwx) ที่มีพันธุกรรมเหมือนข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ยกเว้นเปลี่ยนจากข้าวเจ้า (WxWx) มาเป็นข้าวเหนียว (wxwx) (ภาพที่ 2) และพบว่าผลผลิต และองค์ประกอบผลผลิตของข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เดิม กับสายพันธุ์ข้าวเหนียว (wxwx) ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ไม่แตกต่างกัน

ดังนั้น วิธีการนี้จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเจ้าพันธุ์ดี ที่มีอยู่อย่างมากมายของไทย ให้เป็นข้าวเหนียวพันธุ์ใหม่ได้



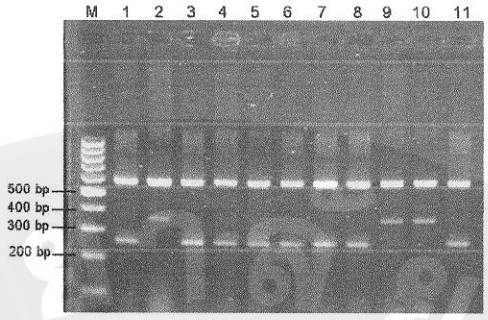
ภาพที่ 1 ภาพถ่ายเจลภายใต้แสง UV ของลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล Glu-23 ตรวจสอบยีโนไทป์ของต้นข้าว (M) คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (1) ต้นข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ที่มียีโนไทป์เป็น wxwx (2) ต้นข้าว F_1 ที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx และ (3) ต้นข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่มียีโนไทป์เป็น WxWx



ภาพที่ 2 ลักษณะเมล็ดข้าวสารของพันธุ์ข้าวในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ให้เป็นข้าวเหนียวด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (a) ข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ (b) ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ ส่วน (c) สายพันธุ์ข้าวเจ้า (WxWx) และ (d) สายพันธุ์ข้าวเหนียว (wxwx) ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์

เนื่องจากข้าวหอมเป็นที่นิยมบริโภคกันอย่างกว้างขวาง เช่น ข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงต้องการปรับปรุงให้พันธุ์ข้าวเหนียวที่จะได้จากโครงการวิจัยนี้มีความหอมอยู่ด้วย จากการตรวจเอกสาร พบว่า ยีนหอม (fragrance gene, *fgr*) เป็นรหัสพันธุกรรมของเอนไซม์ aldehyde dehydrogenase 2 (BAD2) และยีนนี้ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 8 ยีนนี้ทำให้เกิดความหอมในข้าว Jasmine และ Basmati พบว่า พันธุ์ข้าวไม่หอม (non-fragrant rice varieties) มีอัลลีลที่เป็นรหัสพันธุกรรมของ BAD2 ที่ทำงานได้ปกติ (functional allele) แต่พันธุ์ข้าวหอม (fragrant varieties) มีอัลลีลที่เป็นรหัสพันธุกรรมของ BAD2 ที่ไม่ทำงาน (non functional allele) เพราะเกิดการขาดหายของเบสจำนวน 8 bp (eight base pair deletion) และเกิด SNPs จำนวน 3 ตำแหน่ง ในเอ็กซอนที่ 7 ของอัลลีลดังกล่าว (three SNPs in exon 7) เป็นสาเหตุให้เกิด premature stop codon จึงทำให้เอนไซม์ BAD2 ไม่ทำงาน มีการออกแบบไพรเมอร์ ESP, IFAP, INSP และ EAPA ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างอัลลีลเด่น *Fgr* ที่ทำให้ข้าวไม่หอม จากอัลลีลด้อย *fgr* ที่ทำให้ข้าวหอม (Bradbury *et al.*, 2005)

คณะผู้วิจัยได้ใช้ไพรเมอร์ ESP, IFAP, INSP และ EAPA ในการทำ PCR เพื่อเป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจสอบสายพันธุ์ข้าว ที่ได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ กข6 ให้ไม่ไวต่อช่วงแสง และมีดีเอ็นเอแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ต่างๆ จากผลการศึกษา พบอัลลีลหอม *(fgr)* ในข้าวสายพันธุ์ BC_3F_1-51-501-6211 (เลนที่ 3), BC_4F_1-51-501-6211-2320 (เลนที่ 4), BC_5F_1-51-501-6211-2320-414 (เลนที่ 5), BC_3F_3-51-501-6211-1955 (hd1hd1) (เลนที่ 6), BC_3F_3-51-501-6211-2008 (เลนที่ 7) และ BC_3F_1-84-448-7237 (เลนที่ 8) เช่นเดียวกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 (เลนที่ 1) และข้าวเจ้าหอมพันธุ์ปทุมธานี 1 (เลนที่ 11) ก็มียีนหอม เพราะมีแถบดีเอ็นเอขนาด 257 bp แต่ข้าวเจ้าพันธุ์ Taichung 65 (เลนที่ 2), ข้าวเหนียวพันธุ์ กข10 (เลนที่ 9) และสันป่าตอง 1 (เลนที่ 10) ไม่พบอัลลีลหอม นอกจากนี้ เมื่อนำเอาเมล็ดข้าวกล้องของข้าวสายพันธุ์ BC_3F_3-51-501-6211-1955 (hd1hd1) (เลนที่ 6), BC_3F_3-51-501-6211-2008 (เลนที่ 7) ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารหอม (2-acetyl-1-pyrroline, 2AP) โดยวิธี gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบสารหอมในข้าว กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสงทั้ง 2 สายพันธุ์ ดังนั้น เครื่องหมายโมเลกุลนี้สามารถให้คัดเลือกต้นข้าวที่มีอัลลีลหอม (*fgr*) ได้



ภาพที่ 3 แสดงขนาดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV เพื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอจากผลผลิต PCR เมื่อใช้ ESP, IFAP, INSP และ EAPA ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลยีนหอมของข้าว (fragrance gene) (Bradbury *et al.*, 2005) เป็นไพรเมอร์ และมีดีเอ็นเอแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ต่างๆ ถ้าข้าวพันธุ์ใดมีอัลลีลหอม *(fgr)* จะมีแถบดีเอ็นเอขนาด 257 bp แต่ถ้าข้าวที่ไม่มีอัลลีลหอม (*Fgr*) จะไม่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 257 bp โดยที่ M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder พบว่า เลนที่ 1 คือแถบดีเอ็นเอของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6, เลนที่ 3 ข้าวสายพันธุ์ BC_3F_1-51-501-6211, เลนที่ 4 ข้าวสายพันธุ์ BC_4F_1-51-501-6211-2320, เลนที่ 5 ข้าวสายพันธุ์ BC_5F_1-51-501-6211-2320-414, เลนที่ 6 สายพันธุ์ BC_3F_3-51-501-6211-1955 (hd1hd1), เลนที่ 7 ข้าวสายพันธุ์ BC_3F_3-51-501-6211-2008, เลนที่ 8 ข้าวสายพันธุ์ BC_3F_1-84-448-7237 และเลนที่ 11 ข้าวเจ้าหอมพันธุ์ปทุมธานี 1 มีอัลลีลหอม *(fgr)* เพราะมีแถบดีเอ็นเอขนาด 257 bp แต่เลนที่ 2 คือข้าวพันธุ์ Taichung 65 เลนที่ 9 ข้าวเหนียวพันธุ์ กข10 และเลนที่ 10 ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ไม่มีอัลลีลหอม *(fgr)* จึงไม่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 257 bp

ดังนั้น การปรับปรุงพันธุ์ให้ข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 ให้เป็นข้าวเหนียวหอมด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกจึงจะทำให้สำเร็จ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก

การปรับปรุงพันธุ์พืชแบบดั้งเดิม (conventional plant breeding) เน้นการคัดเลือกฟีโนไทป์ที่ดีที่สุดในประชากรที่มีการกระจายตัว ที่ได้มาจากการผสมข้ามพันธุ์ ซึ่งประสบปัญหาว่าเกิดปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมและสภาพแวดล้อม (genotype x environment

interaction; G x E) ประกอบกับการคัดเลือกและการทดสอบฟีโนไทป์ต้องใช้เงินจำนวนมาก และใช้เวลานาน การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยคัดเลือก (marker-assisted selection; MAS) เน้นการคัดเลือกที่ยีนไม่ใช่ฟีโนไทป์ ดังนั้น การคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม และสามารถคัดได้ในทุกช่วงอายุของพืช เนื่องจากการมี molecular marker และ genetic map เกิดขึ้น จึงทำให้การใช้ MAS มีความเป็นไปได้ทั้งลักษณะที่เป็นที่เชิงคุณภาพ (qualitative trait) และลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait loci) (Francia et al., 2005)

วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบผสมกลับแบบดั้งเดิม (conventional backcrossing) เป็นการถ่ายทอดยีนที่ต้องการจากพันธุ์ให้ (donor parent) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ที่มีลักษณะการเกษตรไม่ดีไปสู่พันธุ์รับ (recipient parent) ซึ่งเป็นพันธุ์ดี (elite variety) เริ่มโดยผสมข้ามพันธุ์รับกับพันธุ์ให้เพื่อผลิต F_1 ต่อจากนั้น นำ F_1 ผสมกลับไปหาพันธุ์รับ ต้องทำการผสมกลับไปหาพันธุ์รับถึง 6 ครั้ง จึงจะได้เปอร์เซ็นต์จีโนมของพันธุ์รับเท่ากับ 99.2 จึงจะอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ พันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับจะมีพันธุกรรมเหมือนกับพันธุ์รับ ยกเว้นยีนในตำแหน่งที่ต้องการ (target gene) ที่ได้มาจากพันธุ์ให้ (Allard, 1960)

สำหรับวิธีการผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted backcrossing; MAB) (Frisch *et al.*, 1999a) เมื่อเปรียบเทียบ MAB กับวิธีการผสมกลับแบบดั้งเดิม พบว่า การใช้ marker มาช่วยในการคัดเลือกจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีผสมกลับแบบดั้งเดิมได้ 3 ประการ (1) บางลักษณะการคัดเลือกด้วยฟีโนไทป์ทำได้ยาก การใช้ marker ที่เชื่อมโยงของ target gene ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ และความแม่นยำของการคัดเลือก (2) marker ช่วยคัดเลือกต้น backcross ที่มีปริมาณจีโนมของพันธุ์รับสูง และ marker ช่วยคัดเลือกต้นที่มี linkage drag ที่มีขนาดสั้นๆ และ (3) ในการถ่ายทอดยีนด้อย (recessive gene) ถ้าใช้วิธีผสมกลับแบบดั้งเดิมต้องทำการผสมตัวเองเพิ่มอีกหนึ่งชั่ว หลังจากการผสมกลับในแต่ละชั่ว แต่เมื่อใช้ marker ช่วยในการคัดเลือกไม่ต้องทำการผสมตัวเองในแต่ละชั่วของการผสมกลับอีก (Francia *et al.*, 2005) วิธีการผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกนั้น การคัดเลือกต้น BC_nF_1 ที่ต้องการด้วย marker มี 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรก ใช้ target marker คัดเลือกต้นที่มียีนที่ต้องการ (target gene) โดยคัดเลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น 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) ในจีโนม เพื่อคัดเลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น homozygous สำหรับอัลลีลของพันธุ์รับ ซึ่งจะทำให้ได้ต้นที่มียีโนไทป์เหมือนพันธุ์รับมากที่สุดได้เร็วขึ้น (Newbury, 2003) Frisch *et al.* (1999b)

รายงานว่าเมื่อ MAB ในกรณีที่มี target gene เพียงหนึ่งตำแหน่ง จะสามารถลดจำนวนครั้งของการผสมกลับลงถึง 2-4 ชั่ว

การปรับปรุงพันธุ์ข้าว

ประเทศ (2526) รายงานขั้นตอนการวิจัยให้ได้ข้าวพันธุ์ดีมีดังนี้

-การอนุรักษ์พันธุ์ข้าว (rice conservation) เพื่อเก็บรักษาข้าวพันธุ์ดี และข้าวพันธุ์พื้นเมือง รวมทั้งพันธุ์ข้าวที่นำมาจากประเทศอื่นๆ เก็บรักษาไว้ เพื่อใช้เป็นเชื้อพันธุกรรมสำหรับในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป

-การผสมข้ามพันธุ์ (hybridization) การชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรรมพันธุ์ (inducing mutation) และการคัดเลือก (selection) การผสมพันธุ์เป็นการผสมข้ามระหว่างข้าว 2 พันธุ์ หรือมากกว่า เพื่อรวมเอาลักษณะที่ต้องการเอามาไว้ในต้นเดียวกัน เมื่อผสมพันธุ์แล้ว จะได้เมล็ดชั่วแรก (F_1) นำไปปลูกเมื่อ F_1 ผสมตัวเองได้เมล็ด F_2 ต่อจากนั้น ปลูกเมล็ด F_2 แล้วทำการคัดเลือกแบบ bulk selection หรือ pedigree selection จะใช้แบบใดขึ้นกับลักษณะที่ต้องการคัดเลือก การคัดเลือกทำตั้งแต่ F_2-F_6 ซึ่งลักษณะที่ต้องคัดเลือกในชั่ว F_6 คือ รูปแบบของทรงต้น อายุเก็บเกี่ยว ความต้านทานต่อโรคแมลง และลักษณะเมล็ด

-การชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรรมพันธุ์ทำให้พันธุ์ข้าวที่ดีอยู่แล้วมีลักษณะที่ต้องการเพิ่มขึ้น โดยใช้รังสีหรือสารเคมี การคัดเลือกทำคล้ายกับการคัดเลือกข้าวลูกผสม

-การศึกษาพันธุ์ขั้นต้น (observation) สายพันธุ์ข้าว F_6 ที่คัดเลือกไว้ นำไปปลูกสายพันธุ์ละ 1-4 แถว และต้องปลูกพันธุ์มาตรฐานเป็นพันธุ์เปรียบเทียบ ลักษณะต่างๆ ที่ศึกษาคือ รูปแบบทรงต้น ความต้านทานโรคและแมลง อายุเก็บเกี่ยว และลักษณะเมล็ด คัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีไว้ทำการปลูกและคัดเลือกอีก 2 ครั้ง ใน F_7 และ F_8

-การเปรียบเทียบผลผลิตภายในสถานี (intra-station trial) นำสายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกขั้นต้นมาจัดเป็นกลุ่มตามอายุเก็บเกี่ยวและความสูง นำมาทำการปลูกเปรียบเทียบผลผลิตในสถานี โดยการทดลองหนึ่งๆ มีสายพันธุ์ข้าวประมาณ 15-25 สายพันธุ์ และต้องมีพันธุ์มาตรฐานด้วย ทำการศึกษาถึงผลผลิต ขนาด คุณภาพของเมล็ด คุณภาพหุงต้มและรับประทาน

-การเปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสถานี (inter-station trial) สายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกจากการเปรียบเทียบผลผลิตภายในสถานี นำมาจัดเป็นกลุ่มตามอายุเก็บเกี่ยวและความสูง แล้วนำไปปลูกเปรียบเทียบผลผลิตตามสถานีต่างๆ ในฤดูเดียวกัน ซึ่งได้ข้อมูลการปรับตัวของสายพันธุ์ข้าวเหล่านี้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน วิธีทดสอบทำเหมือนการเปรียบเทียบผลผลิตภายในสถานี

-การเปรียบเทียบผลผลิตท้องถิ่น (regional trial) สายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกจากการเปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสถานี นำมาจัดเป็นกลุ่มตามอายุเก็บเกี่ยวและความสูง แล้วนำไปปลูก

เปรียบเทียบผลผลิตในแปลงนาของเกษตรกรตามท้องถิ่นต่างๆ ซึ่งพันธุ์ที่ปลูกทดสอบในขั้นนี้ คาดว่าจะเป็นพันธุ์ใหม่ ซึ่งได้ข้อมูลการปรับตัวของสายพันธุ์ข้าวเหล่านี้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน วิธีทดสอบทำเหมือนการเปรียบเทียบผลผลิตภายในสถานี ข้อมูลสายพันธุ์ข้าวที่มีผลผลิตสูงและมีลักษณะที่ดี ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบผลผลิตระดับท้องถิ่น จะเสนอให้คณะกรรมการพิจารณาพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตร พิจารณาว่าสมควรจะเผยแพร่ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกหรือไม่

วิธีการดำเนินการวิจัย

พันธุ์รับ

โครงการวิจัยนี้เลือกข้าวเจ้าพันธุ์ดีจำนวน 2 พันธุ์ คือ ข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 80 และสุพรรณบุรี 1 เป็นพันธุ์รับในการปรับปรุงพันธุ์ เพราะข้าวทั้งสองพันธุ์มีลักษณะที่ดีดังต่อไปนี้ คือ

ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ลักษณะประจำพันธุ์ เป็นข้าวเจ้า สูงประมาณ 125 เซนติเมตร ไม่ไวต่อช่วงแสง อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 120 วัน เมล็ดข้าวเปลือกสีฟาง ระยะพักตัวของเมล็ดประมาณ 22 วัน เมล็ดข้าวกล้องกว้าง x ยาว x หนา = 2.2 x 7.3 x 1.8 มิลลิเมตร ปริมาณอมิโลส 29 % คุณภาพข้าวสุกร่วน แข็ง ผลผลิตประมาณ 806 กิโลกรัมต่อไร่ ลักษณะเด่นมีผลผลิตสูง ตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ย ต้านทานโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง โรคใบหงิก และโรคใบสีส้ม ในสภาพธรรมชาติ ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และเพลี้ยกระโดดหลังขาว (กรมการข้าว, 2552)

ข้าวพันธุ์ชัยนาท 80 (กข 29) ลักษณะประจำพันธุ์ เป็นข้าวเจ้าไม่ไวต่อช่วงแสง อายุเก็บเกี่ยว 103 วัน ในฤดูนาปี และ 99 วัน ในฤดูนาปรัง เมื่อปลูกโดยวิธีหว่านน้ำตม สูงเฉลี่ย 104 เซนติเมตร ข้าวกล้องสีขาว เป็นท้องไข่น้อย รูปร่างเรียว ยาว 7.34 มิลลิเมตร กว้าง 2.23 มิลลิเมตร หนา 1.80 มิลลิเมตร มีปริมาณอมิโลสสูง (26.6-29.4%) ผลผลิตเฉลี่ย 876 กิโลกรัมต่อไร่ ลักษณะเด่น อายุสั้น ผลผลิตสูง เฉลี่ย 876 กิโลกรัมต่อไร่ ค่อนข้างต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในภาคเหนือตอนล่าง และโรคขอบใบแห้ง มีปริมาณธาตุเหล็กในข้าวกล้อง 15.7 มิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัม ในข้าวสาร 6.7 มิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัม ข้อควรระวัง ไม่ควรปลูกในช่วงกลางกันยายนถึงปลายพฤศจิกายน ซึ่งมีอากาศเย็น ทำให้เมล็ดลีบมาก ผลผลิตต่ำ ชัยนาท 80 อ่อนแอต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ในเขตจังหวัดนครปฐม ปทุมธานี ราชบุรี และฉะเชิงเทรา (ศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวชลบุรี, 2552)

พันธุ์ให้

ในโครงการวิจัยนี้เลือกพันธุ์ให้ คือ ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เป็นข้าวเหนียวหอมที่มีคุณภาพหุงต้มเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค จึงทำให้ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มีพื้นที่ปลูกถึง 15 ล้านไร่ ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้อัลลีลด้อย *wx* ซึ่งควบคุมให้ข้าวเป็นข้าวเหนียว และนอกจากนี้ ให้อัลลีลด้อย *fgr* ซึ่งควบคุมให้ข้าวหอม รายละเอียดของพันธุ์ข้าว กข 6 มีดังนี้

ข้าวเหนียวพันธุ์กข6 ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ โดยนำข้าวขาวดอกมะลิ 105 อาบรังสีแกมมา ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ได้ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มีความสูงประมาณ 154 เซนติเมตร ไวต่อช่วงแสง อายุเก็บเกี่ยวได้ประมาณ 21 พฤศจิกายน เมล็ดข้าวกล้องกว้าง x ยาว x หนา = 2.2 x 7.2 x 1.7 มิลลิเมตร คุณภาพข้าวสุกเหนียวนุ่ม มีกลิ่นหอม ผลผลิตประมาณ 666 กิโลกรัมต่อไร่

ลักษณะเด่นมีคุณภาพการหุงต้มดี มีกลิ่นหอม ต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาล ข้อควรระวังไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้งและโรคใบไหม้ ไม่ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและแมลงบั่ว (กรมการข้าว, 2552)

ขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 ให้เป็นข้าวเหนียวหอมด้วยวิธีผสมกลับ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือก ทำโดยใช้ข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 เป็นพันธุ์รับ (recurrent parent) และมีพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 เป็นพันธุ์ให้ (donor parent) อัลลีลด้อย *wx* ที่ควบคุมให้ข้าวเป็นข้าวเหนียว และอัลลีลด้อย *fgr* ที่ควบคุมให้ข้าวหอม target gene คือ อัลลีลด้อย *wx* และ อัลลีลด้อย *fgr* โดยที่ *Wx/wx* อยู่บนโครโมโซมที่ 6 อัลลีลีเด่น *Wx* ควบคุมให้เป็นข้าวเจ้า และอัลลีลด้อย *wx* ควบคุมให้เป็นข้าวเหนียว เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้คัดเลือก *Wx/wx* คือไพรเมอร์ Glu-23 (Wanchana *et al.*, 2003) ซึ่งจะเรียกว่า waxy marker ส่วน *Fgr/ fgr* อยู่บนโครโมโซมที่ 8 อัลลีลเด่น *Fgr* ควบคุมให้ข้าวไม่หอม และอัลลีลด้อย *fgr* ควบคุมให้ข้าวหอม เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้คัดเลือก *Fgr/fgr* คือไพรเมอร์ ESP, IFAP, INSP และ EAPA (Bradbury *et al.*, 2005) ซึ่งจะเรียกว่า fragrance marker นอกจากนี้ มี flanking marker 1 และ 2 ที่ขนาบอยู่ทั้ง 2 ข้าง ของยีน *Wx/wx* และ *Fgr/fgr* เพื่อป้องกันไม่ให้ยีนอื่นๆ ที่ไม่ต้องการติดมากับ target gene นอกจากนี้ มี background marker เป็นชนิด SSR marker อีกประมาณ 60 ตำแหน่ง เฉลี่ย 5 ตำแหน่ง/โครโมโซม เพื่อใช้คัดเลือกหาต้น BC_nF_n ที่มีพันธุกรรมเหมือนพันธุ์รับมากที่สุด

ขั้นตอนโดยย่อ เริ่มจากการผลิตเมล็ด F_1 โดยการผสมข้ามระหว่างข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เป็นพันธุ์รับ กับข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 เป็นพันธุ์ให้ และข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 80 เป็นพันธุ์รับ กับข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 เป็นพันธุ์ให้ต่อจากนั้น ผสมกลับไปหาพันธุ์รับของแต่ละคู่ผสมจำนวน 6 ครั้ง แต่ละครั้งของการผสมกลับจะปลูกต้น BC_nF_1 (n=1-6) และคัดเลือกด้วย *wx* marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx และนำมาคัดเลือกต่อด้วย fragrance marker โดยเลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Fgrfgr ต่อจากนั้น จึงคัดเลือกด้วย flanking marker 1 และ 2 ของ *Wx/wx* ใน BC_1F_1 และ BC_2F_1 ตามลำดับ และคัดเลือกด้วย flanking marker 1 และ 2 ของ *Fgr/fgr* ในชั่ว BC_3F_1 และ BC_4F_1 ตามลำดับ สาเหตุที่ต้องคัดเลือกแต่ละ flanking maker ในชั่วของการผสมกลับต่างกัน เพื่อให้จำนวนต้นที่ต้องใช้ในการคัดเลือกจะไม่มีมากเกินไป ถ้าใช้ต้นจำนวนมากจะสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายอย่างมาก ส่วน background marker จะใช้คัดเลือกใน BC_6F_1 เพราะจะมีประสิทธิภาพสูงสุด เพราะต้นข้าวส่วนใหญ่มีพันธุกรรมเหมือนพันธุ์รับแล้ว ต่อจากนั้น ผสมตัวเองต้น BC_6F_1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_6F_2 แล้วปลูกให้ได้ต้น BC_6F_2 เพื่อคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล เพื่อหาต้นที่มียีโนไทป์ทั้งหมดเหมือนพันธุ์รับ ยกเว้นที่ตำแหน่ง *Wx/wx* มียีโนไทป์เป็น wxwx ซึ่งเป็นข้าวเหนียว และที่ตำแหน่ง *Fgr/fgr* มียีโนไทป์เป็น fgrfgr ซึ่งเป็นข้าวหอม ต่อจากนั้น จึงทำการศึกษาพันธุ์ 2 และ 4 แถว เพื่อคัดเลือกข้าว

สายพันธุ์ที่ดี แล้วจึงนำไปทดสอบในและระหว่างสถานีทดลอง รวมทั้งปลูกทดสอบในนาเกษตรกรต่อไป รายละเอียดของโครงการทั้งหมดมีดังต่อไปนี้

<u>ฤดูที่ 1</u> การผลิตเมล็ด F_1 และการหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่าง ๆ การผลิตเมล็ด F_1 (ดำเนินการแล้ว)

ผลิตเมล็ด F_1 จำนวน 2 คู่ผสม คู่ผสมแรก คือ ข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 x ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 คู่ผสมที่ 2 คือ ข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 80 x ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6

การหา target marker

เนื่องจากต้องการปรับปรุงข้าวเจ้าให้เป็นข้าวเหนียว และมีกลิ่นหอมด้วย ดังนั้น จึงต้องมี target marker จำนวน 2 ตำแหน่ง ตำแหน่งแรก คือ waxy gene (*Wx/wx*) อยู่บนโครโมโซมที่ 6 โดยที่อัลลีลเด่น *Wx* ควบคุมความเป็นข้าวเจ้า ส่วนอัลลีลด้อย *wx* ควบคุมความเป็นข้าวเหนียว ใช้ไพรเมอร์ชื่อ Glu-23 (Wanchana *et al.*, 2003) เป็น waxy marker เพื่อคัดเลือกหาต้นข้าวที่มีอัลลีลด้อย *wx* ของข้าวเหนียว ตำแหน่งที่ 2 คือ fragrance gene (*Fgr/fgr*) อยู่บนโครโมโซมที่ 8 โดยที่อัลลีลเด่น *Fgr* ควบคุมให้ข้าวไม่หอม ส่วนอัลลีลด้อย *wx* ควบคุมให้ข้าวหอม ใช้ไพรเมอร์ ESP, IFAP, INSP และ EAPA (Bradbury *et al.*, 2005) เป็น fragrance marker เพื่อคัดเลือกหาต้นข้าวที่มีอัลลีลด้อย *fgr* ที่ทำให้ข้าวหอม ซึ่งในขณะนี้ คณะผู้วิจัยมีทั้ง waxy และ fragrance marker อยู่เรียบร้อยแล้ว

การหา flanking marker 1 และ 2

การหา **flanking marker** ทำโดยเข้าไปค้นหาในเวปไซต์ http://www.gramene.org/ เลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ขนาบอยู่ทั้ง 2 ข้าง ของยีน *Wx/wx* และยีน *Fgr/fgr* สั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์ นำมาทำ PCR โดยมีดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1, ชัยนาท 80 และ กข6 เป็นแม่พิมพ์ คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแสดงความแตกต่าง ระหว่างข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 กับ กข6 และระหว่างชัยนาท 80 กับ กข6

การหา background marker

การหา background marker ทำโดยคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 200-300 ตำแหน่ง ที่กระจายอยู่บนโครโมโซมทั้ง 12 คู่ ของข้าว สั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์ นำมาทำ PCR โดยมีดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1, ชัยนาท 80 และ กข6 เป็นแม่พิมพ์ คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 กับ กข6 และ

ระหว่างชัยนาท 80 กับ กข6 เนื่องจากข้าวทั้ง 3 พันธุ์ เป็นข้าวอินดิกา ดังนั้น จึงต้องใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด 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 (ดำเนินการแล้ว)

ปลูกต้น F_1 ของคู่ผสมทั้ง 2 คู่ คือ สุพรรณบุรี 1 กับ กข6 และระหว่างชัยนาท 80 กับ กข6 แล้วคัดเลือกด้วย target marker เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นต้น F_1 จริง ต่อจากนั้น นำต้น F_1 ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์รับ เพื่อผลิตเมล็ด BC_1F_1

ฤดูที่ 3 การคัดเลือกต้น BC_1F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และการผลิตเมล็ด BC_2F_1 (ดำเนินการแล้ว)

ปลูกต้น BC_1F_1 คัดเลือกด้วย waxy marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx (heterozygous) แล้วจึงนำต้นเหล่านี้มาคัดเลือกต่อด้วย fragrance marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Fgrfgr (heterozygous) ต่อจากนั้น จึงนำต้นดังกล่าวมาคัดเลือกต่อด้วย flanking marker 1 ของ waxy gene เพื่อคัดเลือกหาต้นที่มียีโนไทป์เป็น homozygous ของอัลลีลพันธุ์รับ นำต้นที่คัดเลือกได้ผสมกลับไปหาพันธุ์รับ เพื่อผลิตเมล็ด BC_2F_1

ฤดูที่ 4 การคัดเลือกต้น BC_2F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลและการผลิตเมล็ด BC_3F_1 (ดำเนินการแล้ว)

ปลูกต้น BC_2F_1 คัดเลือกด้วย waxy marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx แล้วจึงนำต้นเหล่านี้มาคัดเลือกต่อด้วย fragrance marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Fgrfgr ต่อจากนั้น จึงนำต้นดังกล่าวมาคัดเลือกต่อ ด้วย flanking marker 2 ของ waxy gene เพื่อคัดเลือกหาต้นที่มียีโนไทป์เป็น homozygous ของอัลลีลพันธุ์รับ นำต้นที่คัดเลือกได้ผสมกลับไปหาพันธุ์รับเพื่อผลิตเมล็ด BC_3F_1

ฤดูที่ 5 การคัดเลือกต้น BC_3F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และการผลิตเมล็ด BC_4F_1

ปลูกต้น BC_3F_1 คัดเลือกด้วย waxy marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx แล้วจึงนำต้นเหล่านี้มาคัดเลือกต่อด้วย fragrance marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Fgrfgr ต่อจากนั้น จึงนำต้นดังกล่าวมาคัดเลือกต่อด้วย flanking marker 1 ของ fragrance gene เพื่อคัดเลือกหาต้นที่มียีโนไทป์เป็น homozygous ของ อัลลีลพันธุ์รับ นำต้นที่คัดเลือกได้ผสมกลับไปหาพันธุ์รับเพื่อผลิตเมล็ด BC_4F_1

ฤดูที่ 6 การคัดเลือกต้น BC_4F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และ การผลิตเมล็ด BC_5F_1

ปลูกต้น BC_4F_1 คัดเลือกด้วย waxy marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx แล้วจึงนำต้นเหล่านี้มาคัดเลือกต่อด้วย fragrance marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Fgrfgr ต่อจากนั้น จึงนำต้นดังกล่าวมาคัดเลือกต่อด้วย flanking marker 2 ของ fragrance gene เพื่อคัดเลือกหาต้นที่มียีโนไทป์เป็น homozygous ของอัลลีลพันธุ์รับ นำต้นที่คัดเลือกได้ผสมกลับไปหาพันธุ์รับเพื่อผลิตเมล็ด BC_5F_1

ฤดูที่ 7 การคัดเลือกต้น BC_5F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และ การผลิตเมล็ด BC_6F_1

ปลูกต้น BC_5F_1 คัดเลือกด้วย waxy marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx แล้วจึงนำต้นเหล่านี้มาคัดเลือกต่อด้วย fragrance marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Fgrfgr นำต้นที่คัดเลือกได้ผสมกลับไปหาพันธุ์รับเพื่อผลิตเมล็ด BC_6F_1

ฤดูที่ 8 การคัดเลือกต้น BC_6F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และการผลิตเมล็ด BC_6F_2

ปลูกต้น BC_6F_1 คัดเลือกด้วย waxy marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx แล้วจึงนำต้นเหล่านี้มาคัดเลือกต่อด้วย fragrance marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Fgrfgr ต่อจากนั้น จึงนำต้นดังกล่าวมาคัดเลือกต่อด้วย flanking marker 1 และ 2 ของทั้ง waxy marker และ fragrance gene เพื่อคัดเลือกหาต้นที่มียีโนไทป์เป็น homozygous ของอัลลีลพันธุ์รับ ต่อจากนั้น นำต้นที่คัดเลือกได้ไปคัดเลือกต่อด้วย background marker เพื่อคัดเลือกหาต้นที่มียีโนไทป์เป็น homozygous ของอัลลีลพันธุ์รับทุกตำแหน่ง ต่อจากนั้น ทำการผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด BC_6F_2

ฤดูที่ 9 การคัดเลือกต้น BC_6F_2 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และการผลิตเมล็ด BC_6F_3

ปลูกต้น BC_6F_2 คัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล waxy marker และ fragrance marker โดยคัดเลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น wxwx และ frgfrg ผสมตัวเองต้นที่คัดเลือกได้เพื่อผลิตเมล็ด BC_6F_3 ซึ่งจะได้สายพันธุ์ข้าวเหนียวที่มีพันธุกรรมเหมือนกับพันธุ์รับ คือ สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 ยกเว้นเป็นข้าวเหนียว และมีกลิ่นหอมเพราะมียีโนไทป์เป็น wxwx และ frgfrg

ฤดูที่ 10 การศึกษาสายพันธุ์ 2 แถว (2-Row Observation) ของต้น BC_6F_3 ทำการคัดเลือก และผลิตเมล็ด BC_6F_4

ฤดูที่ 11 การศึกษาสายพันธุ์ 4 แถว (4-Row Observation) ของต้น BC_6F_4 ทำการคัดเลือก และผลิตเมล็ด BC_6F_5

ฤดูที่ 12-13 การเปรียบเทียบผลผลิตภายในสถานี (Intra-station Yield Trials) จำนวน 2 ฤดู และศึกษาคุณภาพหุงต้ม

ฤดูที่ 14-19 ร่วมมือกับกรมการข้าวเพื่อการเปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสถานี (Inter-station Yield Trials) และการทดสอบผลผลิตในนาเกษตรกร (Farmer Yield Trials or On-Farm Trials) ประมาณ 3-5 ปี

รวมเวลาปรับปรุงหรือพัฒนาพันธุ์ข้าวเหนียวหอมจากข้าวเจ้าพันธุ์ดี โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในวิธีผสมกลับ ใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 8-10 ปี

หมายเหตุ โครงการนี้จะขอทุนวิจัยในระยะเวลา 2 ปี คือ จากฤดูที่ 5-8 ต่อจากนั้น จึงขอทุนวิจัยต่อ คาดว่าจะใช้เวลาปรับปรุงพันธุ์ทั้งหมด 8-10 ปี น่าจะได้พันธุ์ใหม่ที่จะส่งเสริมให้ชาวนาปลูกได้ เมื่อเปรียบเทียบกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกอยู่ในปัจจุบัน เช่น กข6, กข10, แพร่ 1 และสันป่าตอง 1 ใช้เวลาปรับปรุงพันธุ์เฉลี่ยถึง 15 ปี (ตารางที่ 1) ซึ่งถ้าโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวหอม จากข้าวเจ้าพันธุ์ดีด้วยวิธีผสมกลับ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก ประสบผลสำเร็จ ก็สามารถเป็นแนวทางใหม่ที่จะใช้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียว ซึ่งจะลดระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ได้ประมาณ 3-7 ปี

ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

การวิจัยนี้จะเริ่มในวันที่ 1 ตุลาคม 2555 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2557 ซึ่งมีแผนดำเนินการวิจัย ดังนี้

แผนงาน	พ.ศ. 2555	พ.ศ. 2556				พ.ศ. 2557		
	เดือน 10-12	เดือน 1-3	เดือน 4-6	เดือน 7-9	เดือน 10-12	เดือน 1-3	เดือน 4-6	เดือน 7-9
5.1 การคัดเลือกต้น BC_3F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และการผลิตเมล็ด BC_4F_1	xxx	xxx						
5.2 การคัดเลือกต้น BC_4F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และการผลิตเมล็ด BC_5F_1			xxx	xxx				
5.3 การคัดเลือกต้น BC_5F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และการผลิตเมล็ด BC_6F_1					xxx	xxx		
5.4 การคัดเลือกต้น BC_6F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และการผลิตเมล็ด BC_6F_2							xxx	xx
สรุปผล								x

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ผลิตเมล็ด F_1, BC_1F_1 และ BC_3F_1 ที่เรือนกระจกของศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพของมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

การคัดเลือกโดยเครื่องหมายโมเลกุล และงานทางชีวโมเลกุล ทำที่ห้องปฏิบัติการทางโมเลกุลของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

ผลการวิจัย

1. ผลิตเมล็ด F_1 และการหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่างๆ

การผลิตเมล็ดพันธุ์ F_1 (ชัยนาท 80 x กข6 และสุพรรณบุรี 1 x กข6)

การปลูกข้าวเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ F_1 ได้เริ่มกระทำตั้งแต่ตุลาคม 2553 สิ้นสุดเมื่อมีนาคม 2554 เป็นเวลา 6 เดือน โดยทำการปลูกข้าวพันธุ์ชัยนาท 80 และสุพรรณบุรี 1 ซึ่งใช้เป็นต้นแม่ และพันธุ์ กข6 เป็นต้นพ่อ ทำการผสมพันธุ์ข้ามระหว่างพันธุ์สุพรรณบุรี 1 กับพันธุ์กข6 โดยการทำ emasculation คือ การกำจัดเกสรตัวผู้ของต้นแม่ ซึ่งมีวิธีการ นำรวงข้าวที่ยังติดอยู่กับต้นมาแช่ในน้ำอุ่นอุณหภูมิหรือประมาณ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วจะพบว่า ดอกข้าวมีเกสรตัวผู้โผล่ออกมาจากดอก ทำการตัดแต่งช่อดอก โดยตัดดอกที่ไม่มีเกสรตัวผู้โผล่ออกมาทิ้งทั้งหมด ให้เหลือเฉพาะดอกที่มีเกสรตัวผู้โผล่ออกมาจากดอกประมาณ 15-20 ดอก จากนั้น ทำการคีบเกสรตัวผู้ออกให้หมด แล้วนำถุงกระดาษมาคลุมช่อดอกไว้ ซึ่งบนถุงกระดาษจะต้องบันทึก วัน/เดือน/ปี ที่ทำการ emasculation, เวลา และชื่อพันธุ์ข้าว จากนั้น เมื่อต้นพ่อมีเกสรตัวผู้บาน จึงทำการผสมข้ามพันธุ์ข้าว โดยคีบเกสรตัวผู้จากต้นพ่อมาใส่ในดอกตัวเมียที่ทำการ emasculation จนครบทุกดอก แล้วใช้ถุงกระดาษคลุมไว้เหมือนเดิม แล้วบันทึกชื่อพันธุ์ข้าวที่ใช้เป็นพ่อพันธุ์ และเวลาที่ทำการผสมข้ามพันธุ์ จากนั้น ย้ายต้นข้าวไปวางไว้ในที่ที่มีความชื้นสูง เมื่อครบ 7 วัน แล้วจึงตรวจดูว่าผสมติดหรือไม่ ถ้าผสมติดจะทำการเก็บเกี่ยวได้หลังจากผสมติดไปแล้ว 25-30 วัน ซึ่งในฤดูที่ 1 ได้เมล็ดของคู่ผสมระหว่างชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 19 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 82 เมล็ด ซึ่งเมล็ดของคู่ผสมทั้งสองคู่นี้คือ เมล็ด F_1 ที่ต้องการให้มียีโนไทป์เป็น heterozygous ของยีน *Wxwx* และ *Fgrfgr* ซึ่งจะปลูกเป็นต้นพ่อต่อไป แล้วนำไปผสมกลับกับพันธุ์ชัยนาท 80 และสุพรรณบุรี 1 ซึ่งมีลักษณะพันธุ์ที่ดี เพื่อผลิตเมล็ด BC_1F_1 ในฤดูต่อไป

2. การหา background marker (ดังตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนตำแหน่งของ background marker

ลำดับ	ชื่อ marker	Chromosome	Position (cM)	ชัยนาท 80 x กข6	สุพรรณบุรี 1 x กข6
1	RM588	6	1,611,442 - 1,611,468	/	/
2	RM16626	4	12,778,457 - 12,778,480	/	-
3	RM589	6	1,380,931 - 1,380,978	/	/
4	RM6836	6	9,320,821 - 9,320,862	-	/
5	RM8225	6	9,320,821 - 9,320,862	/	-
6	RM19405	6	2,839,645 - 2,839,665	/	/
7	RM25526	10	16,496,356 - 16,496,376	-	/
8	RM20342	6	23,347,950 - 23,347,970	-	/
9	RM20348	6	23,506,887 - 23,506,907	/	-
10	RM7434	6	23,552,227 - 23,552,266	/	-
11	RM19414	6	2,941,468 - 2,941,491	/	-

- หมายถึง ไม่มี

3. การคัดเลือกต้น F_1 และการผลิตเมล็ด BC_1F_1

การปลูกข้าวเพื่อคัดเลือกต้น F_1 และการผลิตเมล็ด BC_1F_1 ได้เริ่มกระทำตั้งแต่เมษายน 2554 สิ้นสุดเมื่อกันยายน 2554 เป็นเวลา 6 เดือน มีขั้นตอนดังนี้

1. ปลูกเมล็ด F_1 ที่ผลิตได้ในฤดูที่แล้วในขวด หลังจากข้าวมีอายุ 2 – 4 สัปดาห์ ทำการสกัดดีเอ็นเอใบข้าวโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ของบริษัท Fermentas

2. จากนั้น เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) โดยใช้ primer ที่จำเพาะเจาะจงกับ *Wx* gene

4. ทำวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis) โดยอาศัยการเคลื่อนที่ผ่านวุ้นอะกาโรส (agarose) ในสารละลาย TBE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า และย้อมชิ้นส่วนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทิเดียมโบรมายด์ (ethidium bromide) เป็นเวลา 10 นาที ล้างสีย้อมส่วนที่เกินออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที บันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Doc 2000 (บริษัท BIO-RAD Laboratory) โดยใช้ซอฟท์แวร์ Quantity One (บริษัท BIO-RAD Laboratory)

5. คัดเลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น heterozygous ทุกตำแหน่งไปปลูกในกระถาง โดยสามารถคัดเลือกคู่ผสมระหว่างชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 6 ต้น และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 8 ต้น

6. นำต้นที่คัดเลือกได้ในข้อที่ 5 ไปใช้เป็นต้นพ่อ โดยนำต้น F_1 (ชัยนาท 80 x กข6) ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์ชัยนาท 80 และนำต้น F_1 (สุพรรณบุรี 1 x กข6) ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_1F_1 โดยมีขั้นตอนการผสมพันธุ์เหมือนกับการผลิตเมล็ด F_1

7. ในฤดูที่ 2 นี้ สามารถผลิตเมล็ด BC_1F_1 ของคู่ผสม ชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 57 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 147 เมล็ด

4. การคัดเลือกต้น BC_1F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และการผลิตเมล็ด BC_2F_1

การปลูกข้าวเพื่อคัดเลือกต้น BC_1F_1 และการผลิตเมล็ด BC_2F_1 ได้เริ่มกระทำตั้งแต่ตุลาคม 2554 และจะสิ้นสุดเมื่อถึงมีนาคม 2555 เป็นเวลา 6 เดือน โดยในการคัดเลือกต้น BC_1F_1 จะใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มขึ้นอีกหนึ่งเครื่องหมาย คือ เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะเจาะจงกับความหอม โดยดำเนินการดังนี้

1. การปลูกข้าวเพื่อคัดเลือกต้น BC_1F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่เฉพาะกับข้าวเจ้า/ข้าวเหนียว ข้าวไม่หอม/ข้าวหอม และผลิตเมล็ด BC_2F_1 มีวิธีการเหมือนกับการทดลองข้างต้น

2. คัดเลือกต้น BC_1F_1 ที่มียีโนไทป์เป็น heterozygous ทุกตำแหน่งไปปลูกในกระถาง นำต้นที่คัดเลือกได้ไปใช้เป็นต้นพ่อ โดยนำต้น BC_1F_1 (ชัยนาท 80 x กข6) ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์ชัยนาท 80 และนำต้น BC_1F_1 (สุพรรณบุรี 1 x กข6) ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_2F_1 โดยมีขั้นตอนการผสมพันธุ์เหมือนกับการผลิตเมล็ด F_1

3. ในฤดูนี้ สามารถผลิตเมล็ด BC_2F_1 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 24 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 97 เมล็ด

5. การคัดเลือกต้น BC_2F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และการผลิตเมล็ด BC_3F_1

การปลูกข้าวเพื่อคัดเลือกต้น BC_2F_1 และการผลิตเมล็ด BC_3F_1 ได้เริ่มกระทำตั้งแต่เดือนเมษายน 2555 และจะสิ้นสุดเมื่อถึง กันยายน 2555 เป็นเวลา 6 เดือน โดยดำเนินการดังนี้

1. การปลูกข้าวเพื่อคัดเลือกต้น BC_2F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่เฉพาะกับข้าวเจ้า/ข้าวเหนียว ข้าวไม่หอม/ข้าวหอม และผลิตเมล็ด BC_3F_1 มีวิธีการเหมือนกับการทดลองข้างต้น

2. คัดเลือกต้น BC_2F_1 ที่มียีโนไทป์เป็น heterozygous ทุกตำแหน่งไปปลูกในกระถาง นำต้นที่คัดเลือกได้ไปใช้เป็นต้นพ่อ โดยนำต้น BC_2F_1 (ชัยนาท 80 x กข6) ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์ชัยนาท 80 และนำต้น BC_2F_1 (สุพรรณบุรี 1 x กข6) ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_3F_1 โดยมีขั้นตอนการผสมพันธุ์เหมือนกับการผลิตเมล็ด F_1

3. ในฤดูนี้สามารถผลิตเมล็ด BC_3F_1 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 32 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 226 เมล็ด

6. การคัดเลือกต้น BC_3F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และการผลิตเมล็ด BC_4F_1 (54RGHกุ้ง)

การปลูกข้าวเพื่อคัดเลือกต้น BC_3F_1 และการผลิตเมล็ด BC_4F_1 ได้เริ่มกระทำตั้งแต่ตุลาคม 2555 และจะสิ้นสุดเมื่อถึงมีนาคม 2556 เป็นเวลา 6 เดือน โดยดำเนินการดังนี้

1. การปลูกข้าวเพื่อคัดเลือกต้น BC_3F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่เฉพาะกับข้าวเจ้า/ข้าวเหนียว ข้าวไม่หอม/ข้าวหอม และผลิตเมล็ด BC_4F_1 มีวิธีการเหมือนกับการทดลองข้างต้น

2. คัดเลือกต้น BC_3F_1 ที่มียีโนไทป์เป็น heterozygous ทุกตำแหน่งไปปลูกในกระถาง นำต้นที่คัดเลือกได้ไปใช้เป็นต้นพ่อ โดยนำต้น BC_3F_1 (ชัยนาท 80 x กข6) ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์ชัยนาท 80 และนำต้น BC_3F_1 (สุพรรณบุรี 1 x กข6) ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_4F_1 โดยมีขั้นตอนการผสมพันธุ์เหมือนกับการผลิตเมล็ด F_1

3. ในฤดูนี้ สามารถผลิตเมล็ด BC_4F_1 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 82 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 61 เมล็ด ในขณะเดียวกันต้น BC_3F_1 ก็ผสมตัวเองได้เมล็ด BC_3F_2 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 6 ประชากร และคู่ผสมสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 3 ประชากร ซึ่งมีน้ำหนักเมล็ด ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 น้ำหนักเมล็ดของสายพันธุ์ข้าว BC_3F_2 ของประชากร (ชัยนาท 80 x กข6) จำนวน 6 ประชากร และ (สุพรรณบุรี 1 x กข6) จำนวน 3 ประชากร

Plot no.	Season	Pedigree	น้ำหนัก (กรัม)
3614	54RGHกุ้ง	52Rกระต่าย ชัยนาท80wxfgr [Rชัยนาท80 Dกข6]BC_3F_2- 3592-2893-3614-	44.35
3620	54RGHกุ้ง	52Rกระต่าย ชัยนาท80wxfgr [Rชัยนาท80 Dกข6]BC_3F_1- 3592-2893-3620-	38.04
3625	54RGHกุ้ง	52Rกระต่าย ชัยนาท80wxfgr [Rชัยนาท80 Dกข6]BC_3F_2- 3592-2893-3625-	14.45
3628	54RGHกุ้ง	52Rกระต่าย ชัยนาท80wxfgr [Rชัยนาท80 Dกข6]BC_3F_2-3588-2883-3628	9.29
3643	54RGHกุ้ง	52Rกระต่าย ชัยนาท80wxfgr [Rชัยนาท80 Dกข6]BC_3F_2-3592-2893-3643-	17.27
3644	54RGHกุ้ง	52Rกระต่าย ชัยนาท80wxfgr [Rชัยนาท80 Dกข6]BC_3F_2-3588-2883-3644	22.88
3647	54RGHกุ้ง	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1 wxfgr [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_3F_2-k7-2931-3647-	5.13
3651	54RGHกุ้ง	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1 wxfgr [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_3F_2-k7-2931-3651	14.31
3666	54RGHกุ้ง	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1wxfgr [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_3F_2-k7-2931-3666-	18.83

7. การคัดเลือกต้น BC_4F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และการผลิตเมล็ด BC_5F_1 (55DGHกุ้ง+มิน)

การปลูกข้าวเพื่อคัดเลือกต้น BC_4F_1 และการผลิตเมล็ด BC_5F_1 ได้เริ่มกระทำตั้งแต่เมษายน 2556 และจะสิ้นสุดเมื่อถึงกันยายน 2556 เป็นเวลา 6 เดือน โดยดำเนินการดังนี้

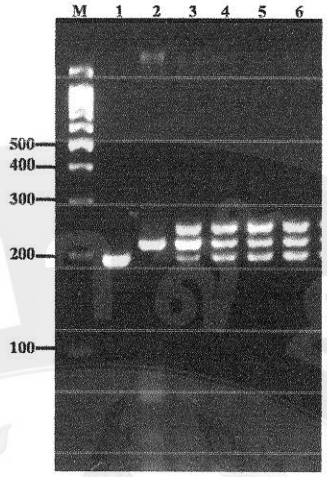
1. การปลูกข้าวเพื่อคัดเลือกต้น BC_4F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่เฉพาะกับข้าวเจ้า/ข้าวเหนียว ข้าวไม่หอม/ข้าวหอม และผลิตเมล็ด BC_5F_1 มีวิธีการเหมือนกับการทดลองข้างต้น

2. คัดเลือกต้น BC_4F_1 ที่มียีโนไทป์เป็น heterozygous ทุกตำแหน่ง (ภาพ 4-7) ไปปลูกในกระถางนำต้นที่คัดเลือกได้ไปใช้เป็นต้นพ่อ โดยนำต้น BC_4F_1 (ชัยนาท 80 x กข6) ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์ชัยนาท 80 และนำต้น BC_4F_1 (สุพรรณบุรี 1 x กข6) ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_5F_1 โดยมีขั้นตอนการผสมพันธุ์เหมือนกับการผลิตเมล็ด F_1

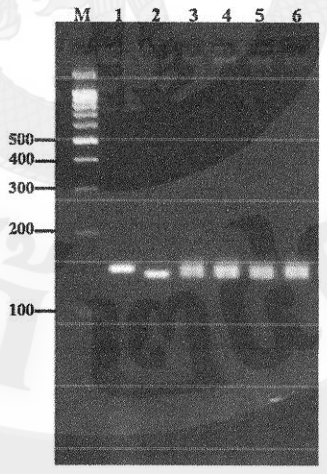
3. ในฤดูนี้ สามารถผลิตเมล็ด BC_5F_1 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 11 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 17 เมล็ด ในขณะเดียวกันต้น BC_4F_1 ก็ผสมตัวเองได้เมล็ด BC_4F_2 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 4 ประชากร และคู่ผสมสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 3 ประชากร ซึ่งมีน้ำหนักเมล็ด ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 น้ำหนักเมล็ดของสายพันธุ์ข้าว BC_4F_2 ของประชากร (ชัยนาท 80 x กข6) จำนวน 4 ประชากร และ (สุพรรณบุรี 1 x กข6) จำนวน 3 ประชากร

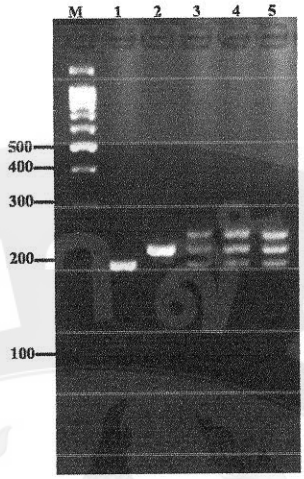
Plot no.	Season	Pedigree	น้ำหนัก (กรัม)
7997	55DGH กุ้ง+มิน	52Rกระต่าย ชัยนาท80wxfgr [Rชัยนาท80 Dกข6]BC_4F_2-3592-2893-3620-7997-	27.63
7999	55DGH กุ้ง+มิน	52Rกระต่าย ชัยนาท80wxfgr [Rชัยนาท80 Dกข6]BC_4F_2- 3592-2893-3620-7999-	11.38
8000	55DGH กุ้ง+มิน	52Rกระต่าย ชัยนาท80wxfgr [Rชัยนาท80 Dกข6]BC_4F_2- 3592-2893-3620-8000-	5.15
8039	55DGH กุ้ง+มิน	52Rกระต่าย ชัยนาท80wxfgr [Rชัยนาท80 Dกข6]BC_4F_2- 3592-2893-3620-8039-	4.34
8087	55DGH กุ้ง+มิน	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1wxfgr [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_4F_2-k7-2931-3651-8087-	7.02
8089	55DGH กุ้ง+มิน	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1wxfgr [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_4F_2-k7-2931-3651-8089-	8.85
8094	55DGH กุ้ง+มิน	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1wxfgr [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_4F_2-k7-2931-3651-8094-	14.82



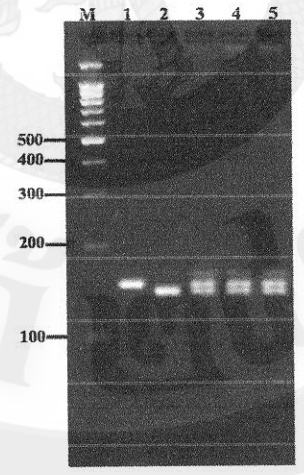
ภาพที่ 4 ภาพถ่ายเจลภายใต้แสง UV ของลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล waxy marker ตรวจสอบยีโนไทป์ของต้นข้าว (M) คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (1) ต้นข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 80 ที่มียีโนไทป์เป็น WxWx (2) ต้นข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ที่มียีโนไทป์เป็น wxwx และ (3-6) ต้นข้าว BC_4F_1 ที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx



ภาพที่ 5 ภาพถ่ายเจลภายใต้แสง UV ของลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล fragrance marker ตรวจสอบยีโนไทป์ของต้นข้าว (M) คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (1) ต้นข้าวเจ้าไม่หอมพันธุ์ชัยนาท 80 ที่มียีโนไทป์เป็น FgrFgr (2) ต้นข้าวเหนียวหอมพันธุ์ กข6 ที่มียีโนไทป์เป็น fgrfgr และ (3-6) ต้นข้าว BC_4F_1 ที่มียีโนไทป์เป็น Fgrfgr



ภาพที่ 6 ภาพถ่ายเจลภายใต้แสง UV ของลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล waxy marker ตรวจสอบยีโนไทป์ของต้นข้าว (M) คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (1) ต้นข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ที่มียีโนไทป์เป็น WxWx (2) ต้นข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ที่มียีโนไทป์เป็น wxwx และ (3-5) ต้นข้าว BC_4F_1 ที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx



ภาพที่ 7 ภาพถ่ายเจลภายใต้แสง UV ของลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล fragrance marker ตรวจสอบยีโนไทป์ของต้นข้าว (M) คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (1) ต้นข้าวเจ้าไม่หอมพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ที่มียีโนไทป์เป็น FgrFgr (2) ต้น ข้าวเหนียวหอมพันธุ์ กข6 ที่มียีโนไทป์เป็น fgrfgr และ (3-5) ต้นข้าว BC_4F_1 ที่มียีโนไทป์เป็น Fgrfgr

8. การคัดเลือกต้น BC_5F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และการผลิตเมล็ด BC_6F_1 (55RGHมิน)

การปลูกข้าวเพื่อคัดเลือกต้น BC_5F_1 และการผลิตเมล็ด BC_6F_1 ได้เริ่มกระทำตั้งแต่ตุลาคม 2556 และจะสิ้นสุดเมื่อถึงมีนาคม 2557 เป็นเวลา 6 เดือน โดยดำเนินการดังนี้

1. การปลูกข้าวเพื่อคัดเลือกต้น BC_5F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่เฉพาะกับข้าวเจ้า/ข้าวเหนียว ข้าวไม่หอม/ข้าวหอม และผลิตเมล็ด BC_4F_1 มีวิธีการเหมือนกับการทดลองข้างต้น

2. หลังจากคัดเลือกต้น BC_5F_1 (ชัยนาท 80 x กข6) พบต้นที่มียีโนไทป์เป็น heterozygous เพียง 1 ต้น และการคัดเลือกต้น BC_5F_1 (สุพรรณบุรี 1 x กข6) ไม่พบต้นที่มียีโนไทป์เป็น heterozygous ของยีนทั้ง 2 ตำแหน่ง จึงแก้ไขโดยการปลูกเมล็ด BC_4F_2 (ชัยนาท 80 x กข6) และ BC_4F_2 (สุพรรณบุรี 1 x กข6) เพิ่มเติม แล้วคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่เฉพาะกับข้าวเจ้า/ข้าวเหนียว ข้าวไม่หอม/ข้าวหอม จากนั้น นำต้น BC_4F_2 ที่มียีโนไทป์เป็น heterozygous ทุกตำแหน่งไปปลูกในกระถาง นำต้นที่คัดเลือกได้ไปใช้เป็นต้นพ่อ โดยนำต้น BC_4F_2 (ชัยนาท 80 x กข6) ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์ชัยนาท 80 และนำต้น BC_4F_2 (สุพรรณบุรี 1 x กข6) ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_5F_1 ใหม่ โดยมีขั้นตอนการผสมพันธุ์เหมือนกับการผลิตเมล็ด F_1

3. ในฤดูนี้ สามารถผลิตเมล็ด BC_5F_1 ของคู่ผสม ชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 19 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 21 เมล็ด

9. การคัดเลือกต้น BC_5F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และการผลิตเมล็ด BC_6F_1 (56DGHแนน)

การปลูกข้าวเพื่อคัดเลือกต้น BC_5F_1 และการผลิตเมล็ด BC_6F_1 ได้เริ่มกระทำตั้งแต่เดือนเมษายน 2557 และจะสิ้นสุดเมื่อถึงเดือน กันยายน 2557 เป็นเวลา 6 เดือน โดยดำเนินการดังนี้

1. การปลูกข้าวเพื่อคัดเลือกต้น BC_5F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่เฉพาะกับข้าวเจ้า/ข้าวเหนียว ข้าวไม่หอม/ข้าวหอม และผลิตเมล็ด BC_6F_1 มีวิธีการเหมือนกับการทดลองข้างต้น

2. คัดเลือกต้น BC_5F_1 ที่มียีโนไทป์เป็น heterozygous ทุกตำแหน่งไปปลูกในกระถาง นำต้นที่คัดเลือกได้ไปใช้เป็นต้นพ่อ โดยนำต้น BC_5F_1 (ชัยนาท 80 x กข6) ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์ชัยนาท 80 และนำต้น BC_5F_1 (สุพรรณบุรี 1 x กข6) ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_6F_1 โดยมีขั้นตอนการผสมพันธุ์เหมือนกับการผลิตเมล็ด F_1

3. การทดลองในฤดูนี้สามารถผลิตเมล็ด BC_6F_1 ของคู่ผสม ชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 23 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 40 เมล็ด เมล็ด ในขณะเดียวกันต้น BC_5F_1 ก็ผสมตัวเองได้เมล็ด BC_5F_2 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 2 ประชากร และคู่ผสมสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 11 ประชากร ซึ่งมีน้ำหนักเมล็ด ตารางที่ 5

ตารางที่ 5 น้ำหนักเมล็ดของสายพันธุ์ข้าว BC_5F_2 ของประชากร (ชัยนาท 80 x กข6) จำนวน 2 ประชากร และ (สุพรรณบุรี 1 x กข6) จำนวน 11 ประชากร

Plot no.	Season	Pedigree	น้ำหนัก (กรัม)
12207	56DGH แนน	52Rกระต่าย ชัยนาท80 wxfgrRM3 [Rชัยนาท80 Dกข6]BC_5F_2-3592-2893-3620-8000-12844-12207-	11.15
12209	56DGH แนน	52Rกระต่าย ชัยนาท80 wxfgrRM3 [Rชัยนาท80 Dกข6]BC_5F_2-3592-2893-3620-8000-12844-12209-	10.13
12250	56DGH แนน	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1 wxfgrRM3 [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_5F_2-k7-2931-3651-8087-12866-12250-	13.17
12253	56DGH แนน	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1 wxfgrRM3 [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_5F_2-k7-2931-3651-8087-12866-12253-	16.09
12254	56DGH แนน	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1 wxfgrRM3 [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_5F_2-k7-2931-3651-8087-12866-12254-	15.04
12255	56DGH แนน	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1 wxfgrRM3 [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_5F_2-k7-2931-3651-8087-12866-12255-	17.00
12259	56DGH แนน	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1 wxfgrRM3 [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_5F_2-k7-2931-3651-8087-12866-12259-	17.47
12261	56DGH แนน	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1 wxfgrRM3 [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_5F_2-k7-2931-3651-8089-12891-12261-	23.97
12263	56DGH แนน	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1 wxfgrRM3 [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_5F_2-k7-2931-3651-8089-12891-12263-	6.56
12264	56DGH แนน	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1 wxfgrRM3 [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_5F_2-k7-2931-3651-8089-12891-12264-	8.11
12266	56DGH แนน	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1 wxfgrRM3 [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_5F_2-k7-2931-3651-8089-12891-12266-	16.35
12267	56DGH แนน	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1 wxfgrRM3 [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_5F_2-k7-2931-3651-8089-12891-12267-	12.02
12268	56DGH แนน	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1 wxfgrRM3 [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_5F_2-k7-2931-3651-8089-12891-12268-	9.30

10. การคัดเลือกต้น BC_6F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และการผลิตเมล็ด BC_7F_1 (56RGHยุ้ย)

การปลูกข้าวเพื่อคัดเลือกต้น BC_6F_1 และการผลิตเมล็ด BC_7F_1 ได้เริ่มกระทำตั้งแต่เดือนตุลาคม 2557 และจะสิ้นสุดเมื่อถึงเดือน มีนาคม 2558 เป็นเวลา 6 เดือน

1. การปลูกข้าวเพื่อคัดเลือกต้น BC_6F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่เฉพาะกับข้าวเจ้า/ข้าวเหนียว ข้าวไม่หอม/ข้าวหอม และผลิตเมล็ด BC_7F_1 มีวิธีการเหมือนกับการทดลองข้างต้น

2. คัดเลือกต้น BC_6F_1 ที่มียีโนไทป์เป็น heterozygous ทุกตำแหน่ง (ภาพ 4, 5, 6 และ 7) ไปปลูกในกระถาง นำต้นที่คัดเลือกได้ไปใช้เป็นต้นพ่อ โดยนำต้น BC_6F_1 (ชัยนาท 80 x กข6) ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์ชัยนาท 80 และนำต้น BC_6F_1(สุพรรณบุรี 1 x กข6) ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_7F_1 โดยมีขั้นตอนการผสมพันธุ์เหมือนกับการผลิตเมล็ด F_1

3. การทดลองในฤดูนี้สามารถผลิตเมล็ด BC_7F_1 ของคู่ผสม ชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 40 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 167 เมล็ด ในขณะเดียวกันต้น BC_6F_1 ก็ผสมตัวเองได้เมล็ด BC_6F_2 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 3 ประชากร และคู่ผสมสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 5 ประชากร ซึ่งมีน้ำหนักเมล็ด ตารางที่ 6

ตารางที่ 6 น้ำหนักเมล็ดของสายพันธุ์ข้าว BC_6F_2 ของประชากร (ชัยนาท 80 x กข6) จำนวน 3 ประชากร และ (สุพรรณบุรี 1 x กข6) จำนวน 5 ประชากร

Plot no.	Season	Pedigree	น้ำหนัก (กรัม)
11459	56RGHยุ้ย	52Rกระต่าย ชัยนาท80 wxfgrRM3 [Rชัยนาท80 Dกข6]BC_6F_2- 3592-2893-3620-8000-12844-12207-11459-	11.42
11463	56RGHยุ้ย	52Rกระต่าย ชัยนาท80 wxfgrRM3 [Rชัยนาท80 Dกข6]BC_6F_2- 3592-2893-3620-8000-12844-12207-11463-	5.57
11465	56RGHยุ้ย	52Rกระต่าย ชัยนาท80 wxfgrRM3 [Rชัยนาท80 Dกข6]BC_6F_2- 3592-2893-3620-8000-12844-12207-11463-	5.58
11479	56RGHยุ้ย	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1 wxfgrRM3 [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_6F_2-k7-2931-3651-8087-12866-12255-11479-	53.34
11498	56RGHยุ้ย	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1 wxfgrRM3 [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_6F_2-k7-2931-3651-8089-12891-12268-11498-	39.78
11507	56RGHยุ้ย	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1 wxfgrRM3 [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_6F_2-k7-2931-3651-8089-12891-12268-11507-	38.26
11508	56RGHยุ้ย	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1 wxfgrRM3 [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_6F_2-k7-2931-3651-8089-12891-12268-11508-	47.17
11515	56RGHยุ้ย	52Rกระต่าย สุพรรณบุรี1 wxfgrRM3 [Rสุพรรณบุรี1 D(BC_5F_1-414/BC_4F_1-358)F_3]BC_6F_2-k7-2931-3651-8089-12891-12268-11515-	38.46

สรุปผล

การปรับปรุงหรือพัฒนาพันธุ์ข้าวเหนียวหอมจากข้าวเจ้า ด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก โดยมีข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 80 และสุพรรณบุรี 1 เป็นพันธุ์รับ และข้าวเหนียวสายพันธุ์ กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสงเป็นพันธุ์ให้ ทำการผสมข้ามพันธุ์เพื่อผลิตเมล็ด F_1 และคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล จากนั้น ทำการผสมกลับไปหาพันธุ์รับทั้ง 2 พันธุ์ พบว่า

สามารถผลิตเมล็ด F_1 ของคู่ผสมระหว่างชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 19 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 82 เมล็ด

เมล็ด BC_1F_1 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน57 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 147 เมล็ด

เมล็ด BC_2F_1 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 24 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 97 เมล็ด

เมล็ด BC_3F_1 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 32 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 226 เมล็ด

จากการหา background marker ทั้งหมด 11 ตำแหน่ง พบว่า เครื่องหมายโมเลกุล RM588, RM16626, RM589, RM8225, RM19405, RM20348, RM7434 และ RM19414 ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 6 สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 80 กับข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ได้ และเครื่องหมายโมเลกุล RM588, RM589, RM6836, RM19405, RM20342, RM20348 ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 6 เครื่องหมายโมเลกุล RM25526 ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 10 สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 กับข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ได้

สามารถผลิตเมล็ด BC_4F_1 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 82 เมล็ด และ สุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 61 เมล็ด รวมถึงเมล็ด BC_3F_2 (ชัยนาท 80 x กข6) จำนวน 6 ประชากร และเมล็ด BC_3F_2 (สุพรรณบุรี 1 x กข6) จำนวน 3 ประชากร

ผลิตเมล็ด BC_5F_1 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 11 เมล็ด และ สุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 17 เมล็ด รวมถึงเมล็ด BC_4F_2 (ชัยนาท 80 x กข6) จำนวน 4 ประชากร และเมล็ด BC_4F_2 (สุพรรณบุรี 1 x กข6) จำนวน 3 ประชากร

เนื่องจากการคัดเลือกต้น BC_5F_1 (ชัยนาท 80 x กข6) พบต้นที่มียีโนไทป์เป็น heterozygous เพียง 1 ต้น และการคัดเลือกต้น BC_5F_1 (สุพรรณบุรี 1 x กข6) ไม่พบต้นที่มียีโนไทป์เป็น heterozygous ของยีนทั้ง 2 ตำแหน่ง จึงแก้ไขโดยการปลูกและคัดเลือกเมล็ด BC_4F_2 เพื่อผลิตเมล็ด BC_5F_1 ซึ่งได้เมล็ด BC_5F_1 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 19 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 21 เมล็ด

ผลิตเมล็ด BC_6F_1 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 23 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 40 เมล็ด รวมถึงเมล็ด BC_5F_2 (ชัยนาท 80 x กข6) จำนวน 2 ประชากร และเมล็ด BC_5F_2 (สุพรรณบุรี 1 x กข6) จำนวน 11 ประชากร

ผลิตเมล็ด BC_7F_1 ของคู่ผสมชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 40 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 167 เมล็ด รวมถึงเมล็ด BC_6F_2 (ชัยนาท 80 x กข6) จำนวน 3 ประชากร และเมล็ด BC_6F_2 (สุพรรณบุรี 1 x กข6) จำนวน 5 ประชากร

เอกสารอ้างอิง (References of Literature cited)

กรมการข้าว. 2552. ข้าวพันธุ์กข6. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www. brrd.in.th/rkb/varieties/index.php-file=content.php&id= 11.htm (25 มีนาคม 2552)

กรมการข้าว. 2552. ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www. brrd.in.th/rkb/varieties/index.php-file=content.php&id=76.htm (25 มีนาคม 2552)

กรมวิชาการเกษตร. 2551. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา :http://www.doa .go.th/ germplasm /rice9.htm (25 เมษายน 2551)

กรมวิชาการเกษตร. 2546. **สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2544/45**. เอกสารวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวพันธุ์ดี.

เจตศรัณย์ สุวรรณธานี ณัฐดนัย ทรัพย์สมบูรณ์ วราภรณ์ แสงทอง ประวิตร พุทธานนท์ และประทีป พิณตานนท์. 2549. **การถ่ายทอดพันธุกรรมของลักษณะความเป็นข้าวเจ้าและข้าวเหนียวโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล**. เอกสารประกอบการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 7 วันที่ 25-26 พฤษภาคม 2549. ณ ศูนย์การศึกษาและฝึกอบรมนานาชาติ มหาวิทยาลัย แม่โจ้ เชียงใหม่. หน้า 35-42.

เจตศรัณย์ สุวรรณธานี. 2550. **การศึกษาผลของยีน *Wx* และ *wx* ต่อผลผลิตของข้าว**. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 131 หน้า.

ศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวชลบุรี. 2552. ข้าวพันธุ์ชัยนาท 80. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://cbr-rsc.ricethailand.go.th/Chai%20Nat%2080.htm. (20 กรกฎาคม 2552)

ประเทศ สิทธิยศ. 2526. **ขั้นตอนการวิจัยเพื่อให้ได้ข้าวพันธุ์ดี**. ว. วิทย. กษ. 16 (5): 423-427.

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

Bradbury LMT, Henry RJ, Jin Q, Reinke RF, Waters DLE. 2005. **A perfect marker for fragrance genotyping in rice**. Molecular Breeding 16: 279–283.

Francia E, Tacconi G, Crosatti C, Barabaschi D, Bulgarelli D, Dall'Aglio E and G Vale. 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 of flanking markers in marker-assisted backcrossing for transfer of a target gene**. Crop Sci 39: 967-975.

Frisch M, Bohn M and AE Melchinger. 1999b. **Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene**. Crop Sci 39: 1295-1301.

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

Wanchana S, Toojinda T, Tragoonrung S, Vanavichit A. 2003. **Duplicated coding sequence in the waxy allele of tropical glutinuous rice (*Oryza sativa* L.)**. Plant Science 165: 1193–1199.