การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ทนเค็มและมีคุณภาพการหุงต้มดี

Breeding Rice for Salt Tolerance and Good Cooking Quality

ดวงใจ สุริยาอรุณโรจน์[1)] อภิชาติ วรรณวิจิตร[2)] สมวงศ์ ตระกูลรุ่ง[2)] ธีรยุทธ์ ตู้จินดา[2)]

Duangjai Suriyaarunroj[1)] Apichart Vanavichit[2)] Somvong Tragoonrung[2)] Theerayut Toojinda[2)]

Abstract

Breeding for salt tolerant rice has been done for a decade. However, most of salt tolerant lines which have been released carry inferior cooking qualities compared to KDML105, an aroma good cooking quality rice of Thailand. To develop salt tolerant and good cooking quality rice, molecular marker assisted selection in backcross breeding program was initiated in 2001. Two RILs, FL496 and FL530 selected from mapping population of IR29 x Pokkali were used as salt tolerant donors. KDML105 as recipient was cross pollinated with these 2 donors to develop F_1 and cross back to KDML105 to develop BC_1F_1. Three markers ; RM140, B1.1-1 and B1.1-11 flanking salt tolerant QTLs spanning 33 cM and two markers; RM00 and 10L03FW for amylose content and aroma scent were used for selection to produce BC_2. Then BC_2F_1 and BC_2F_3 progenies were randomly selected and subjected to genome scan. Percentage of recipient genome recovery for BC_2F_1 ranged from 67.2-92.3% and for BC_2F_3 from 72.45-95.92%. The cooking quality of progenies were considerably similar to KDML105. Agronomic characters of progenies were observed and showed that 81 of 90 lines tested had higher seeds/panicle while 47 lines had higher 1000 grain weight and 74 lines had higher grain yield compared to KDML105. These results indicated that marker assisted backcross breeding technique is useful for selection of lines with acceptable traits while maintaining superior cooking quality.

Keywords: salt tolerant rice, molecular markers, cooking quality, yield

บทคัดย่อ

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ทนต่อสภาพดินเค็มในประเทศไทยได้มีการดำเนินการมานับสิบ ๆ ปี พันธุ์ที่ได้ถึงแม้จะมีความทนเค็มในระดับสูง แต่มักมีคุณภาพเมล็ดและการหุงต้มไม่ดี ในปี พ.ศ. 2544 จึงมีการริเริ่มปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่มีคุณภาพเมล็ดดี มีความหอม ให้ทนเค็ม โดยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ หรือโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการติดตาม เพื่อให้เกิดความแม่นยำในการคัดเลือกมากยิ่งขึ้น ดำเนินการผสมพันธุ์แบบการผสมกลับ (backcross) มีสายพันธุ์แท้ที่มีลักษณะความทนเค็มจากพันธุกรรมของพันธุ์พอคคาลี่ (Pokkali) ที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่าง IR29 และ Pokkali จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ FL496 และ FL530 เป็นพันธุ์ถ่ายทอดลักษณะความทนเค็ม และใช้พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์รับลักษณะความทนเค็ม เมื่อได้ลูกผสมชั่วที่ 1 ของคู่ผสมระหว่าง ขาวดอกมะลิ 105 x FL496 และ ขาวดอกมะลิ 105 x FL530 จึงผสมกลับไปยังขาวดอกมะลิ 105 ได้ลูกผสมกลับครั้งที่ 1 ชั่วที่ 1 (BC_1F_1) ใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก BC_1F_1 ในการผสมกลับครั้งที่ 2

1) ศูนย์วิจัยข้าวชุมแพ เลขที่ 95 ถนนมลิวรรณ ต. ไชยสอ อ. ชุมแพ จ. ขอนแก่น 40130 โทรศัพท์ 089-8448031

Chum Phae Rice Research Center, 95 Maliwan road, Amphoe Chum Phae, Changwat Khon Kaen 40130, Tel. 089-8448031

2) หน่วยค้นคว้าและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนยีชีวภาพทางการเกษตร สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Rice Gene Discovery Unit, Agricultural Genetic Engineering and Biotechnology Center, Research and Development Institute, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand

Bureau of Rice Research and Development

โมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ในการติดตามลักษณะความทนเค็ม ได้แก่ RM140, B1.1-1 และ B1.1-11 ซึ่งครอบคลุมตำแหน่งที่ควบคุมลักษณะทนเค็มบนโครโมโซม 1 เป็นระยะ 33 เซนติมอแกน (cM) และใช้โมเลกุลเครื่องหมาย RM00 และ 10L03FW สำหรับติดตามลักษณะความนุ่มและความหอม เมื่อได้ลูกผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 2 (BC_2F_2) และลูกผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 3 (BC_2F_3) นำไปตรวจสอบการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่าลูกผสม BC_2F_1 มีพันธุกรรมของขาวดอกมะลิ 105 67.2-92.3% และ BC_2F_3 มีพันธุกรรมของขาวดอกมะลิ 105 72.45-95.92% มีคุณภาพการหุงต้มเหมือนขาวดอกมะลิ 105 ส่วนลักษณะทางการเกษตรพบว่า 81 จาก 90 สายพันธุ์มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากกว่า 47 สายพันธุ์มีน้ำหนัก 1000 เมล็ดมากกว่า และ 74 สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงกว่าขาวดอกมะลิ 105 แสดงว่าวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพสามารถช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนเค็มให้มีลักษณะการหุงต้มที่ดีขึ้นได้

คำสำคัญ : ข้าวทนเค็ม โมเลกุลเครื่องหมาย คุณภาพการหุงต้ม ผลผลิต

คำนำ

ข้าวเป็นพืชที่มีการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่กว้างมาก จึงสามารถปลูกได้ในหลากหลายสิ่งแวดล้อม จากพื้นที่ที่มีน้ำมากจนถึงไม่มีน้ำขัง ปลูกได้ทั้งในดินเหนียวจัดและดินทราย อีกทั้งยังสามารถขึ้นได้ในสภาพแวดล้อมที่มีปัญหา เช่น ดินเปรี้ยว(กรด) และดินเค็ม เป็นต้น ถึงแม้จะมีพันธุ์ข้าวที่ปลูกติดต่อกันมาระยะหนึ่ง พันธุ์ข้าวเหล่านั้นมักเป็นพันธุ์ข้าวพื้นเมือง ให้ผลผลิตต่ำต้นสูง มีคุณภาพเมล็ดไม่ดี ดังนั้น เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการทำนาของเกษตรกรในพื้นที่ที่มีปัญหาด้านสภาพแวดล้อม การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ทนทานต่อสภาพปัญหาหนึ่งๆ ในพื้นที่นั้นๆ จะเป็นวิธีการที่ใช้ทุนน้อยที่สุดและได้ผลดี

ปัญหาดินเค็มที่มีต่อการปลูกข้าวมี 2 ประเภท คือ ดินเค็มชายฝั่งทะเล เป็นดินที่ได้รับผลกระทบโดยตรงจากน้ำทะเล พบบริเวณพื้นที่ไม่ไกลจากชายฝั่งทะเล และดินเค็มในทวีป เป็นดินเก่าที่มีการสะสมของเกลือ จากดินเกลือหรือหินเกลือใต้พื้นดิน ในระดับตื้นบ้าง ลึกบ้าง เมื่อดินเกิดความแห้งแล้ง น้ำใต้ดินจะนำพาอนุภาคของเกลือขึ้นสู่ผิวดิน มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งถ้าดินมีความเค็มในระดับสูง ต้นข้าวจะตายเป็นหย่อม ๆ ตามระดับความเค็มที่เกิดขึ้น

ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับผลของความเค็มต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวมานานกว่า 50 ปี (Kapp, 1974; Pearson, 1959) และมีความพยายามที่จะปรับปรุงให้ข้าวทนดินเค็ม จนกระทั่งในช่วงปี พ.ศ. 2513 (Akbar *et al.,* 1972) ก็ยังไม่สามารถหาพันธุ์ข้าวทนเค็ม ที่มีคุณภาพการหุงต้มดีได้ ทั้งนี้พบว่าคุณภาพการหุงต้มนั้นคัดเลือกได้ยากในการคัดเลือกในชั่วต้น ๆ (Yeo *et al.*, 1988) และพบว่าเป็นลักษณะที่ควบคุมโดยยีนด้อยคู่เดียว (Buttery *et al.*, 1983; Lorieux *et al.*, 1996) จากการผสมพันธุ์ระหว่าง IR29/Pokkali เป็นประชากรที่รับการถ่ายทอดลักษณะทนเค็ม พบว่า ลักษณะดังกล่าวควบคุมโดยยีน (salt tolerant QTLs) บนโครโมโซม 1, 3, 4, 10 และ 12 ซึ่งเกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิดกับ ความเข้มข้นของโซเดียม (Na^+ concentration) การดูดซับโซเดียม (Na absorption) และอัตราส่วนของโซเดียมต่อโพแทสเซียม (Na^+/K^+ absorption ratio) อย่างไรก็ตาม นักวิจัยได้ศึกษาลักษณะการถ่ายทอดความทนดินเค็มในข้าว พบว่า ยีนหลักอยู่บนโครโมโซม 1 (Gregorio *et al.*, 1997) ส่วนยีนที่ควบคุมลักษณะคุณภาพการหุงต้ม และความหอม จะอยู่บนโครโมโซม 8 (Ahn *et al.*, 1992; Garland *et al.*, 2002) สำหรับปริมาณอมิโลสถูกควบคุมโดยยีนบนโครโมโซม 3, 4, 6 และ 7 (Lanceras *et al.*, 2000) อนึ่ง การคัดเลือกทางพันธุกรรมนี้เป็นการคัดเลือกจากส่วนของโครโมโซมที่มียีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการ (QTLs) (Babu *et al.*, 2004; Stuber, 1995)

จากองค์ความรู้ด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่ได้เผยแพร่มาแล้วเหล่านี้ สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้มีความทนเค็มโดยที่ยังคงมีคุณสมบัติเหมือนเดิม คือมีคุณภาพการหุงต้มดีและมีความหอม ในการผสมพันธุ์แบบผสมกลับ สามารถใช้ถ่ายทอดพันธุกรรม (Allard, 1960) ความทนเค็มให้พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และใช้โมเลกุลเครื่องหมายเป็นเครื่องมือประกอบการคัดเลือก (Hospital *et al.*, 1992) ซึ่งคาดว่าจะประสบความสำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้คือ 1)

Bureau of Rice Research and Development

เพื่อให้ได้สายพันธุ์ข้าวทนดินเค็ม 2) สามารถพัฒนาพันธุ์ข้าวทนดินเค็มที่ให้เมล็ดที่มีคุณภาพการหุงต้มดี มีความหอม โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก และการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมพันธุ์แบบผสมกลับ

.

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พันธุ์และสายพันธุ์ข้าว

สายพันธุ์แท้ 16 สายพันธุ์ ที่ได้จากการคัดเลือกที่มีระดับความทนเค็มดี ประกอบด้วยสายพันธุ์ จากคู่ผสม IR29/Pokkali ได้แก่ IR66946-3R-58-1-1(FL358), IR66946-3R-67-1-1(FL367), IR66946-3R-111-1-1(FL411), IR66946-3R-116-1-1(FL116), IR66946-3R-134-1-1(FL434), IR66946-3R-143-1-1(FL443), IR66946-3R-178-1-1(FL478), IR66946-3R-196-1-1(FL496), IR66946-3R-223-1-1(FL523), IR66946-3R-230-1-1(FL530), IR66946-3R-263-1-1(FL563) พันธุ์พื้นเมือง ได้แก่ ขาวหมากแขก แดงดอกกก กข6 ขาวดอกมะลิ 105 และ Pokkali

2. การคัดพันธุ์ทนดินเค็ม (การคัดเลือกพันธุ์พ่อแม่)

การคัดพันธุ์ในระยะกล้า (Gregorio *et al*., 1997) ได้ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ทนเค็มในงานวิจัยนี้ โดยเริ่มจากการฆ่าเชื้อที่ติดมากับเมล็ดข้าวด้วย คลอรอกซ์ 10% (โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5.25% น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น นำเมล็ดเพาะในจานเพาะเมล็ด เป็นเวลา 5-7 วัน ที่อุณหภูมิ 35-38 °ซ. (อุณหภูมิห้อง) เมื่อครบกำหนดเลือกกล้าข้าวที่สมบูรณ์ 10 ต้น จากแต่ละสายพันธุ์ปลูกบนแผ่นโฟมที่มีรูกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม. และด้านล่างแผ่นโฟมมีตาข่ายไนล่อนรองเพื่อเป็นที่ยึดของเมล็ด วางแผ่นโฟมลงในภาชนะที่บรรจุสารละลายสูตร Yoshida และคณะ (1976) (Fig. 1) หลังจากนั้น 14 วัน จึงปรับระดับความเค็มของสารละลายเป็น (EC) 4 dSm^{-1} โดยเติมเกลือแกง (NaCl) และอีก 2 วันค่อยปรับเป็นระดับ 6 dSm^{-1} มีการตรวจสอบและปรับระดับความเป็นกรดด่างทุกวัน (โดยใช้ 1N NaOH หรือ HCl) ให้สารละลายมีระดับความเป็นกรดด่างที่ 5.5 เปลี่ยนสารละลายใหม่ทุก ๆ สัปดาห์ เมื่อครบ 16 วัน จึงให้คะแนนความทนเค็มของต้นข้าว ตามมาตรฐานของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (Standard Evaluation System for Rice, SES) (IRRI,1996) ดังแสดงใน Table 1 และ Fig. 2

จากนั้นนำต้นข้าวตัวอย่างจากการทดลองไปวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณโซเดียม (Na^+) และโพแทสเซียม (K^+) โดยนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 °ซ. เป็นเวลา 3 วัน จึงนำไปบดให้ละเอียด แล้วชั่งตัวอย่างจำนวน 0.3 กรัม นำไปสกัดด้วย 1N HCl ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สารละลายที่สกัดได้นำไปวัดปริมาณโซเดียม และโพแทสเซียม โดยใช้เครื่องมือ spectrophotometer

3. การหาปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบ (relative water content, RWC)

ตัดใบข้าวยาว 1 ซม. (ตรงส่วน 1/3 ของความยาวใบ จากปลายใบ) นำชิ้นส่วนของใบข้าว 2 ชิ้นไปชั่งน้ำหนักสด (FW) แล้วนำไปแช่ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 25 °ซ. เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักอีกครั้งเพื่อหาน้ำหนักเต่ง (TW) สุดท้ายนำไปอบที่ 80 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักแห้ง (DW) แล้วคำนวณหาปริมาณน้ำสัมพัทธ์ใน

Table 1 Standard evaluation system for rice (SES) of visual salt injury (IRRI, 1996)

Score	Observation	Tolerant level
1	Normal growth	Highly tolerant
3	Nearly normal growth ; leaf tips or few leaves whitish and rolled	Tolerant
5	Growth severely retarded ; most leaves rolled; only a few are elongating	Moderately tolerant
7	Complete cessation of growth ; most leaves dry ; some plants dying	Susceptible
9	Almost all plant dead or dying	Highly susceptible

Bureau of Rice Research and Development

ใบจากสูตร (Barr and Wetherley, 1962) ดังนี้

$$\%RWC = \frac{FW - DW}{TW - DW} \times 100$$

4. การพัฒนาลูกผสมจากการผสมกลับให้ได้ลูกผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 3

จากการคัดพันธุ์ข้าวทนเค็ม 16 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ระดับความเค็ม 6 dS m^{-1} สามารถคัดพันธุ์แท้ได้ 2 สายพันธุ์ที่จะใช้เป็นพันธุ์ถ่ายทอดลักษณะความทนเค็ม คือ FL496 และ FL530 และใช้พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์รับลักษณะความทนเค็ม วางแผนให้ต้นข้าวแต่ละพันธุ์ออกดอกพร้อมกัน โดยใช้เทคนิคการควบคุมปริมาณแสงบังคับการออกดอก (short day treatment) ให้กล้าข้าวได้รับอิทธิพลแบบวันสั้น เริ่มเมื่อกล้าข้าวอายุ 15 วัน คลุมผ้าดำจากเวลา 16.30 น. ถึง 7.30 น. ของวันรุ่งขึ้น เป็นเวลา 25 วัน ข้าวเริ่มออกดอกจึงทำการผสมพันธุ์ การผสมกลับก็ดำเนินการเช่นเดียวกัน ดังแสดงใน Fig. 3

5. การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่มีพันธุกรรมทนเค็มโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย (marker-assisted selection, MAS)

จากการคัดเลือกสายพันธุ์แท้ 2 สายพันธุ์ คือ FL496 และ FL530 จากคู่ผสม IR29/Pokkali ที่มีระดับความทนเค็มสูง โดยการถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมความทนเค็มจากพันธุ์ Pokkali และจากการวิเคราะห์คุณภาพเมล็ดพบว่า ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีปริมาณอมิโลสสูงความคงตัวของแป้งสุกสูง อุณหภูมิแป้งสุกต่ำ และไม่หอม ดำเนินการผสมพันธุ์ข้าวสายพันธุ์แท้ 2 สายพันธุ์กับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 แล้วทำการผสมกลับกับขาวดอกมะลิ 105 จนได้ลูกผสมกลับครั้งที่ 1 ชั่วที่ 1 (BC_1F_1) ผสมกลับอีกครั้ง โดยใช้ 3 โมเลกุลเครื่องหมาย ได้แก่ RM140, B1.1-1 และ B1.1-11 ที่อยู่ในช่วงโครโมโซมบนตำแหน่งที่ควบคุมลักษณะความทนเค็ม (Fig. 4) ซึ่งมีความยาวครอบคลุมชิ้นส่วนของโครโมโซมในระยะ 33 cM เพื่อเลือกต้นที่มีพันธุกรรมทนเค็ม และอีก 2 โมเลกุลเครื่องหมาย คือ RM00 และ 10L03FW ช่วยในการคัดเลือกพันธุกรรมของลักษณะด้านปริมาณอมิโลสและความหอม (Fig. 5 และ Table 2) จนได้ลูกผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 1 (BC_2F_1) จึงทำการตรวจสอบพันธุกรรมที่มีลักษณะของขาวดอกมะลิ 105 แล้วคัดเลือกได้ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์เบอร์ 62, 221, 248, 1094, 1159 และ 1277 ที่มีลักษณะพันธุกรรมของขาวดอกมะลิ 105 มากกว่า 80% แล้วทำการปลูกต่อให้ผสมตัวเองจนได้ประชากรของลูกผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 2 (BC_2F_2) จำนวน 600 สายพันธุ์ ปลูกให้ผสมตัวเองต่อจนได้ลูกผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 3 (BC_2F_3) (Fig. 6) ทั้งนี้ในทุก ๆ ชั่วของการผสมพันธุ์ จะมีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีพันธุกรรมของลักษณะทนความเค็ม (salt tolerant QTLs) และคุณภาพโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายที่กล่าวข้างต้น

. นำลูกผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 3 (BC_2F_3) ที่มีลักษณะทางการเกษตรดี เช่น มีความสูงเหมาะสม วันออกดอกใกล้เคียงขาวดอกมะลิ 105 เมล็ดเรียวยาว ผลผลิตสูง เป็นต้น ซึ่งคัดเลือกได้จากคู่ผสม KDML105/ FL496 จำนวน 36 สายพันธุ์ และ KDML105/FL530 จำนวน 54 สายพันธุ์ นำไปประเมินลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ ความทนเค็มในสารละลายที่ระดับความเค็ม 12 dS m^{-1} โดยใช้ข้อมูล Na^+/K^+ ratio จำนวนวันที่ต้นกล้าอยู่รอดได้ในสารละลายที่มีความเค็ม (survival days of seedling, SDS) และปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบข้าว (RWC) เป็นเกณฑ์ในการประเมิน และประเมินคุณภาพการหุงต้ม (Juliano and Perdon, 1975; Juliano and Pascual, 1980) ประกอบด้วย ปริมาณอมิโลส ความหอม ความคงตัวของแป้งสุก (GC) และอุณหภูมิแป้งสุก (GT) รวมทั้งการประเมินลักษณะทางพันธุกรรมด้วย โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

6. การประเมินความทนเค็มในสารละลายธาตุอาหาร

ประเมินความทนเค็มของสายพันธุ์ข้าวที่ได้ในสารละลายธาตุอาหารที่มีระดับความเค็มสูง (12 dS m^{-1} equivalent to 130 mM NaCl) นำลูกผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 3 (BC_2F_3) จำนวน 90 สายพันธุ์ ไปประเมินความทนเค็มเปรียบเทียบกับพันธุ์ พ่อแม่ FL496, FL530 และ KDML105 ดังวิธีการเดียวกับที่ได้กล่าวมาแล้วใน (2) แต่ปรับระดับความเค็มครั้งแรกเป็น 8 dS m^{-1} และครั้งที่ 2 เป็น 12 dS m^{-1} การปรับระดับความเค็ม 2 ครั้งมีความจำเป็นมาก เพราะเป็นการป้องกันต้นกล้าข้าวเปลี่ยนระดับความเค็มอย่างทันที ซึ่งกล้าข้าวปรับตัวไม่ทันอาจตายได้ บันทึกข้อมูล คะแนนความทนเค็ม ปริมาณ Na^+

Bureau of Rice Research and Development

Fig. 1 Ten days after sowing in nutrient solution, rice plants were adopted to new source of nutrient

Fig. 2 Rice plants under severe stress (21 days after salinization)

Bureau of Rice Research and Development

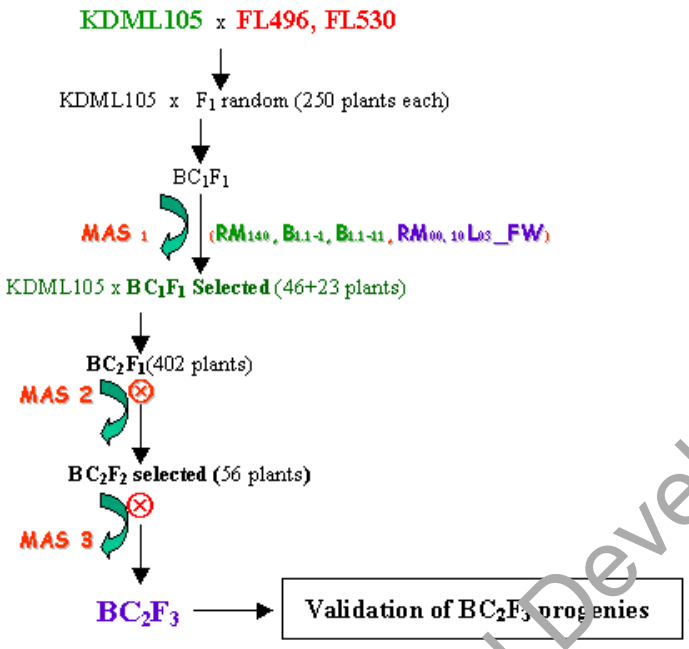

Fig. 3 Pathway for BC_2F_3 of KDML105/FL496 and KDML105/FL530 population

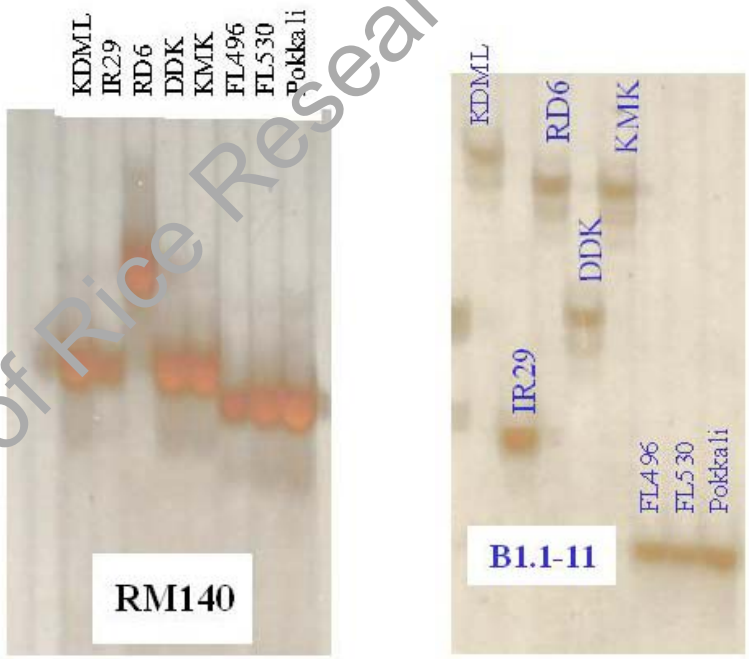

Fig. 4 Band pattern of parents using SSR markers : RM140 B1.1-11

Bureau of Rice Research and Development

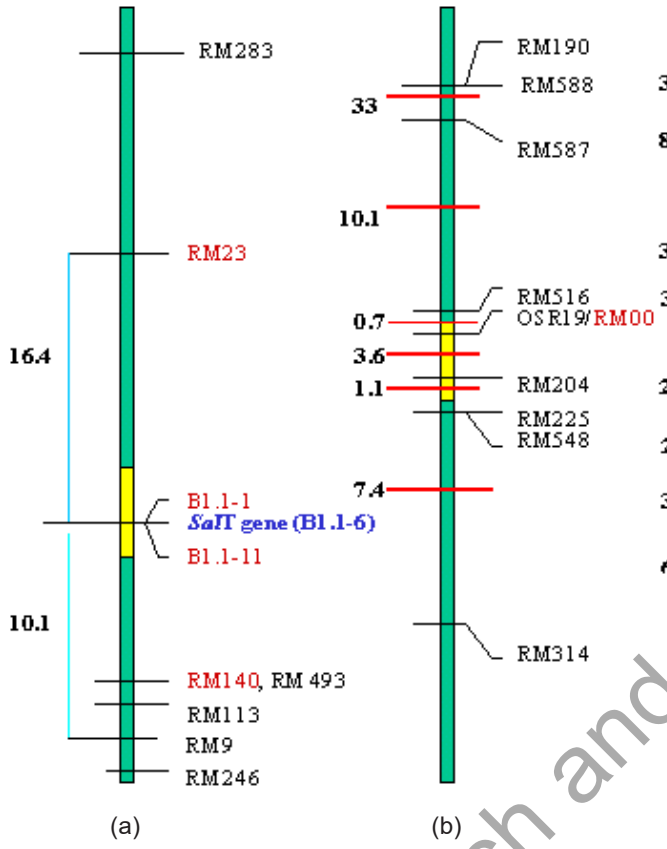

Fig. 5 (a) Map of marker flanking SalT gene region located on chromosome 1 (b) Map of marker flanking waxy gene region located on chromosome 6 (c) Map of marker flanking aroma gene region located on chromosome 8

Table 2 Characteristics of the 5 DNA markers flanking the QTLs of interested traits

Primers	Repeat sequence	Source
RM140	Fw: TGCCTCTTCCCTGGCTCCCCTG	Cornell University
	Rw: GGCATGCCGAATGAAATGCATG	
B1.1-1	Fw: TTGAGATGAAGACGGGGAGT	
	Rw: AATGGAAGGGGAAGAAGAGG	Rice Gene Discovery Unit
B1.1-11	Fw: TTTGGGGGAGATCACTAGAGG	
	Rw: TTTTTGGTGCTGGTCCAATC	
RM00	Fw: CTTTGTCTATCTCAAGACAC	Cornell University
	Rw: TTGCAGATGTTCTTCCTGATG	
10L03_FW	Fw: TGTAACTAAGCACAACGCAAGG	
	Rw: TCACTCTAATTGGCCTGGTGGTTTT	Rice Gene Discovery Unit
E03_92.0	Fw: GCCATGGCTAAGCTAGGATTC	
	Rw: ATCCGCGTACTCTCTCCTCA	

Bureau of Rice Research and Development

Fig. 6 Evaluation and selection of BC_2F_3 lines

และ K^+ (Asch *et al*., 2000; Zhu *et al*., 2001) ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบ และจำนวนวันที่ต้นกล้าอยู่รอดในสารละลายที่มีความเค็ม ขณะเดียวกันบันทึกอุณหภูมิเรือนทดลองทั้งกลางวันและกลางคืนตลอดการทดลองไว้ เพื่อใช้ในการร่วมพิจารณาในกรณีที่มีผลการทดลองบางอย่างไม่แน่นอนหรือไม่ชัดเจน

7. การประเมินคุณภาพการหุงต้ม

7.1 ปริมาณอมิโลส (AC)

ชั่งแป้งข้าวจากสายพันธุ์ที่ทดสอบ 0.1000 กรัม เติมเอทธานอล 95% จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลาย แล้วเติมสารละลาย 1N NaOH 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ต้มส่วนผสมที่ได้ในน้ำเดือด 10 นาที เพื่อให้แป้งสุก ต่อจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นจึงเทส่วนผสมใส่ในขวดขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรโดยใช้น้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร ดูดสารละลายน้ำแป้ง 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดขนาด 100 มิลลิลิตรอันใหม่ แล้วเติมสารละลายไอโอดีน (0.2% I2, 2% KI) 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดปริมาณอมิโลสโดยใช้ spectrophotometer ปรับ solution absorbance ที่ 620 nm (A_{620}) เปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐาน (Juliano and Pascual, 1980) กำหนดค่าปริมาณอมิโลสดังนี้คือ ปริมาณอมิโลส 10-20% เป็นระดับอมิโลสต่ำ 20-25% เป็นระดับอมิโลสปานกลาง และ 25-30% เป็นระดับอมิโลสสูง

7.2 อุณหภูมิแป้งสุก (GT)

นำเมล็ดข้าวสาร 10 เมล็ด แช่ในสารละลาย KOH 1.7% ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 23 ชั่วโมง ประเมินการกระจายตัวของแป้งโดยใช้ seven-point semi-quantitative rating scale ให้คะแนนดังนี้

1 - เมล็ดคงเดิมไม่ได้รับผลใดๆ
2 - เมล็ดพองตัวเล็กน้อย
3 - เมล็ดพองตัว และแป้งกระจายเล็กน้อยไม่รอบเมล็ด
4 - เมล็ดพองตัว แป้งกระจายรอบเมล็ดและกว้างขึ้น
5 - เมล็ดแตกแป้งกระจายรอบเมล็ดมากขึ้น
6 - เมล็ดแตกและกระจายรวมกับแป้งโดยรอบ
7 - เมล็ดแตกกระจายเป็นแป้งใสหมด ไม่เหลือส่วนที่เป็นเมล็ดขุ่น

การกระจายของแป้งในด่างนี้ จัดระดับอุณหภูมิแป้งสุกได้เป็น ที่คะแนน 1-3 มีอุณหภูมิแป้งสุกสูง 74.5-79 °ซ. คะแนน 4-5 มีอุณหภูมิแป้งสุกปานกลาง 70-74 °ซ. และคะแนน 6-7 มีอุณหภูมิแป้งสุกต่ำ คือต่ำกว่า 70 °ซ.

7.3 ความคงตัวของแป้งสุก (GC)

ชั่งแป้งข้าว 0.1000 กรัม ใส่หลอดแก้วขนาด 11x100 มิลลิเมตร เติมเอทธานอล 95% ที่มีส่วนผสม 0.025% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของไธมอลบลู จำนวน 0.2

Bureau of Rice Research and Development

มิลลิลิตร เติม 0.2 N KOH ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง ปิดหลอดด้วยลูกแก้วแล้วนำลงต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 8 นาที จากนั้นนำหลอดแก้วขึ้นจากน้ำเดือดและปั่นผสมของเหลวในหลอดอีกครั้ง แล้วแช่ในน้ำที่แช่น้ำแข็งจนเย็นจัดเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นวางหลอดแก้วในแนวนอนบนกระดาษกราฟที่มีช่องแบ่งละเอียดถึง 1 มิลลิเมตร วางไว้เป็นเวลา 30 นาที อ่านระยะทางที่แป้งสุกไหลโดยเทียบกับกราฟแบ่งประเภทข้าวโดยการให้คะแนนตามระยะทางที่แป้งไหลดังนี้ ระยะ 25-40 มิลลิเมตร เป็นแป้งแข็ง ระยะ 41-60 มิลลิเมตร เป็นแป้งปานกลาง และระยะ 61-100 มิลลิเมตร เป็นแป้งอ่อน

7.4 ความหอม

ชั่งข้าวสาร 2 กรัม ใส่หลอดแก้วขนาด 12x100 มิลลิเมตร เติมสารละลาย NaCl 10% จำนวน 2 มิลลิลิตร อบที่อุณหภูมิ 50 °ซ. เป็นเวลา 30 นาที ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วดม ให้คะแนนดังนี้ 0 - เป็นไม่หอม 1 - เป็นหอมปานกลาง และ 2 - เป็นหอม โดยเปรียบเทียบกับขาวดอกมะลิ 105 ที่มีระดับความหอม = 2 ขาวดอกมะลิ 105 ผสมข้าวธรรมดามีระดับความหอม = 1 และข้าวธรรมดามีระดับความหอม = 0

8. การประเมินลักษณะทางการเกษตรและผลผลิต

ปลูกข้าวจำนวน 90 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกจากคู่ผสม KDML105 x FL496 และ KDML105 x FL530 เพื่อประเมินลักษณะในแปลงทดลองที่ไม่มีผลกระทบจากความเค็ม ในศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 3 ซ้ำ ในฤดูแล้งระหว่างเดือนมกราคมถึงพฤษภาคม 2547 ซึ่งสภาพแปลงในขณะที่ข้าวอยู่ในแปลงทดลอง มีผลกระทบจากการทำลายของโรคและแมลง เช่น โรคไหม้ แมลงบั่ว และพบการทำลายของปูและหนู ทำให้ข้อมูลที่ได้อาจไม่ถูกต้องดังเช่นสภาพปกติ ลักษณะที่ทำการศึกษาและบันทึก ได้แก่ ความสูง การแตกกอ องค์ประกอบผลผลิต (จำนวนเมล็ดต่อรวง น้ำหนัก 1,000 เมล็ด จำนวนรวงต่อกอ จำนวนเมล็ดลีบและเต็มเมล็ด) วันออกดอก และผลผลิต

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดพันธุ์ทนเค็ม (คัดเลือกพ่อแม่)

จากการคัดพันธุ์ข้าวทั้งหมด 16 พันธุ์/สายพันธุ์ เพื่อเป็นพันธุ์ถ่ายทอดลักษณะทนเค็ม พบว่า 4 สายพันธุ์แท้ที่ได้จากคู่ผสมระหว่าง IR29 และ Pokkali คือ FL416, FL478, FL496 และ FL530 ได้รับผลจากความเค็มน้อยที่สุด คือมีคะแนน 3.3, 3.0, 3.0 และ 3.7 ตามลำดับ และมีปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบสูง (91.96, 94.16, 94.28 และ 93.91% ตามลำดับ) ให้ผลเช่นเดียวกับพันธุ์ที่มีความทนเค็ม เช่น ขาวหมากแขก แดงดอกกก และ Pokkali ซึ่งมีปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบสูงระหว่าง 90-97% ลักษณะเช่นนี้พบในอ้อยที่ทนเค็มด้วย (Wahid, 2004) และยังพบว่า RWC จะลดลงในช่วงที่ข้าวได้รับผลกระทบจากความเค็ม ดังแสดงใน Table 3 โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ได้รับผลกระทบมากจะเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ทนเค็ม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในข้าวฟ่าง (Netondo *et al*., 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์ แสดงค่า Na^+/K^+ ratio ต่ำ คือ 0.169, 0.183, 1.158 และ 0.126 ตามลำดับ และยังพบลักษณะดังกล่าวในข้าวพันธุ์พื้นเมือง 2 พันธุ์ที่ศึกษาด้วย คือ ขาวหมากแขก และ แดงดอกกก ซึ่งมีคะแนนทนเค็มในระดับปานกลาง คือ 4.3 มีค่า RWC สูงที่ 91.08 และ 92.00% ตามลำดับ และมี ค่า Na^+/K^+ ratio ต่ำ (0.209 และ 0.233 ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ที่กล่าวอาจทนดินเค็มดีกว่าพันธุ์พื้นเมืองทั้ง 2 พันธุ์ ค่าของ Na^+/K^+ ratio สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดเพื่อยืนยันความทนเค็มอีกค่าหนึ่ง นอกจากนั้นยังพบว่า เปอร์เซ็นต์ RWC และ Na^+/K^+ ratio มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยในทางลบ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าค่า RWC สูงก็สามารถใช้เป็นตัวชี้นำความทนเค็มเช่นเดียวกัน (Suriyaarunroj *et al*., 2004)

จากงานทดลองนี้ ข้าว 4 สายพันธุ์มีคะแนนทนเค็มระหว่าง 3.0 - 4.3 (Table 3) ซึ่งสัมพันธ์กับระบบการให้คะแนนของ SES (IRRI,1996) ที่พันธุ์ข้าวทนเค็มจะมีคะแนนความทนเค็มอยู่ในช่วง 1-4 ขณะที่ขาวดอกมะลิ 105 และ Pokkali มีคะแนน 6 และ 3 ตามลำดับ ค่า Na^+/K^+ ratio ของข้าว 4 สายพันธุ์อยู่ในช่วง 0.126 - 0.233 และ RWC อยู่ระหว่าง 91-94% อย่างไรก็ตาม ได้คัดเลือกพันธุ์ข้าว 2 สายพันธุ์สำหรับการผสมพันธุ์กับขาวดอกมะลิ 105

Bureau of Rice Research and Development

Table 3 Physiological traits contributing to salinity tolerance in 16 rice accessions grown at salinity level of 6 dS m^{-1}

Lines/ cultivars	At EC 6 dS m^{-1}					At normal concentration(0.82 dS m^{-1})			
	Tolerant grouping	Salt tolerant scoring*	Relative water content(%)* Midday	Predawn	Na+/K+ ratio*	Salt tolerant scoring*	Relative water content(%)* Midday	Predawn	Na+/K+ ratio*
FL358	MT	5.7 b	85.80 bc	84.28 de	0.346 b	1	87.87 b	95.05 a	.391 a
FL367	MT	5.0 bcd	86.98 abc	87.35 b-e	0.266 bc	1	90.39 ab	95.64 a	.356 a
FL411	MT	5.7 b	87.94 abc	91.61 a-d	0.241 bc	1	87.67 b	95.91 a	.318 a
FL416	T	3.3 de	91.96 ab	94.11 ab	0.169 bc	1	95.13 ab	99.11 a	.244 a
FL434	MT	5.3 bc	88.50 ab	86.73 b-e	0.382 b	1	91.92 ab	96.53 a	.4[illegible] a
FL443	MT	5.3 bc	88.90 ab	85.04 cde	0.232 bc	1	92.46 ab	96.73 a	.303 a
FL478	T	3.0 e	94.16 a	97.93 a	0.183 bc	1	93.69 ab	97.73 a	.264 a
FL496	T	3.0 e	94.28 a	96.68 a	0.158 c	1	96.01 a	98.68 a	.237 a
FL523	MT	4.7 b-e	91.06 ab	92.51 abc	0.200 bc	1	92.05 ab	96.09 a	.294 a
FL530	T	3.7 cde	93.91 a	96.39 a	0.126 c	1	92.56 ab	97.84 a	.271 a
FL563	MT	5.0 bcd	86.04 bc	90.75 a-d	0.318 b	1	93.27 ab	97.91 a	.395 a
KMK	T	4.3 b-e	91.08 ab	90.34 a-d	0.209 bc	1	94.43 ab	97.78 a	.481 a
DDG	T	4.3 b-e	92.00 ab	90.18 a-d	0.233 bc	1	94.84 ab	97.66 a	.364 a
RD6	S	7.7 a	81.35 c	82.06 e	0.729 a	1	89.70 ab	97.71 a	.402 a
KDML105	S	7.7 a	75.00 d	81.80 e	0.668 a	1	94.78 ab	96.84 a	.508 a
Pokkali	T	3.0 e	93.27 a	94.12 ab	0.236 bc	1	92.21 ab	95.71 a	.252 a
CV(%)		32.3	4.2	4.5	71.8	32.3	4.2	4.5	71.8

* The data were collected at 16 days after salinization

T = tolerance, MT = moderately tolerance, S = susceptible

Means in the same column followed by a common letter are not significantly different at 5% level by DMRT

Table 4 Summary of percent recipient in each line from the cross KDML105/ IR66946 (BC_2F_1)

Cross	% recipient	Cross	% recipient
KDML105/FL496		**KDML105/FL530**	
Line No 1023	70.83	Line No 54	71.43
Line No 1034	87.04	Line No 62	83.33
Line No 1159	92.31	Line No 72	79.31
Line No 1166	70.37	Line No 169	73.21
Line No 1248	70.37	Line No 173	75.00
Line No 1269	77.78	Line No 190	77.78
Line No 1277	80.36	Line No 221	90.74
Line No 1295	69.64	Line No 241	70.69
		Line No 248	84.48
		Line No 296	67.24
		Line No 315	79.63
		Line No 324	75.93

Bureau of Rice Research and Development

2. การพัฒนาประชากรลูกผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 3 โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายในการคัดเลือก

ผลการตรวจสอบพันธุกรรมของการผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 1 (BC_2F_1) ดังแสดงใน Table 4 พบว่า การถ่ายทอดลักษณะจากขาวดอกมะลิ 105 ไปยังลูกผสมขาวดอกมะลิ 105/FL496 อยู่ในช่วงระหว่าง 69.64-92.31% และลูกผสมขาวดอกมะลิ 105/FL530 อยู่ในช่วงระหว่าง 67.24-90.74% ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของขาวดอกมะลิ 105 สูงกว่า 80% สำหรับผลิตลูกผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 2 (BC_2F_2) โดยใช้ 3 โมเลกุลเครื่องหมายที่ติดตามลักษณะทนเค็ม และ 2 โมเลกุลเครื่องหมายที่ติดตามลักษณะคุณภาพการหุงต้ม คัดเลือก BC_2F_2 เพื่อปลูกให้ได้ BC_2F_3 ตรวจสอบพันธุกรรมของ BC_2F_3 พบว่า มีพันธุกรรมของขาวดอกมะลิ 105 เฉลี่ย 83.05% (72.45-95.92%) ดังแสดงใน Table 5 ซึ่งต่ำกว่าค่าที่ควรจะเป็นในทางทฤษฎีของการผสมกลับ BC_2 คือ 87.25% อย่างไรก็ตาม คุณภาพการหุงต้มที่พบในสายพันธุ์ดังกล่าวมีค่าใกล้เคียงกับขาวดอกมะลิ 105 แต่ทนเค็มกว่า ทั้งนี้สายพันธุ์ทั้งหมดจะได้รับการพัฒนาเป็นสายพันธุ์แท้ที่ทนเค็ม และอาจเสนอเป็นพันธุ์ข้าวคุณภาพดี มีความหอม และทนเค็มต่อไป

Table 5 Percentage of recovery of recurrent genome for BC_2F_3 of KDML105/IR66946

Cross	% recipient
KDML105/FL496	
Line No 1094	78.57-95.92
Line No 1159	79.59-90.82
Line No 1277	78.14-89.58
KDML105/FL530	
Line No 62	76.53-89.58
Line No 221	72.45-84.69
Line No 248	81.25-91.67

3. ผลการประเมินความทนเค็มของสายพันธุ์ข้าวในสารละลายธาตุอาหาร

3.1 จำนวนวันที่ต้นกล้าอยู่รอด (SDS)

ต้นกล้าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกในสารละลายที่มีความเค็มระดับ 12 dS m^{-1} สามารถอยู่รอดได้ถึง 40 วัน ขณะที่พันธุ์ทนเค็มที่เป็นตัวให้พันธุกรรมความทนเค็มคือ FL496 และ FL530 ที่ปลูกในสภาพเดียวกันมีจำนวนวันที่อยู่รอดยาวกว่า คือ 53 และ 52 วัน ตามลำดับ (Table 6) ส่วนสายพันธุ์ผสมกลับของทั้ง 2 คู่ผสม KDML105/FL496 และ KDML105/FL530 มีความแตกต่างกัน โดยที่สายพันธุ์ที่มีพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะทนเค็มมีจำนวนวันที่ต้นกล้าอยู่รอดตั้งแต่ 34-56 วัน และ สายพันธุ์ที่ไม่มีพันธุกรรมควบคุมลักษณะความเค็มมีจำนวนวันที่ต้นกล้าอยู่รอด 31-44 วัน

3.2 อัตราส่วนของ Na^+/K^+

สายพันธุ์ข้าวที่มีพันธุกรรมควบคุมลักษณะความทนเค็ม ปลูกในสารละลายที่มีระดับความเค็ม 12 dS m^{-1} (120 mmol NaCl) พบว่า ค่าอัตราส่วนของ Na^+/K^+ เฉลี่ย 0.98 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงของสายพันธุ์ทนเค็มที่ใช้ถ่ายทอดลักษณะทนดินเค็ม คือ FL496 (0.96) และ FL530 (1.01)

3.3 คะแนนความทนเค็ม

การให้คะแนนความทนเค็ม ด้วยการสังเกตความผิดปกติของการเจริญเติบโตของต้นข้าว พบว่า สายพันธุ์

Table 6 Some physiological traits of parents and progenies of KDML105/IR66946 crosses (BC_2F_3) grown in 12 dS m^{-1} nutrient solution at Ubon Ratchathani Rice Research Center (2004)

Cultivar & lines	Parents			BC_2F_3 progenies	
	KDML105	FL496	FL530	Carry QTLs	No QTLs
SDS(days)	40	53	52	34-56	31-44
Na+/K+ ratio	1.64	0.96	1.01	0.98	1.18
Salt injury score	4.5	3.3	3.8	4.0	4.3
%RWC	90.68	92.93	91.91	89.87	89.88

Bureau of Rice Research and Development

ที่ได้รับและมีพันธุกรรมทนเค็มแล้ว จะมีคะแนนต่ำกว่าสายพันธุ์ข้าวที่ไม่มีพันธุกรรมทนเค็มเล็กน้อย ผลการทดลองนี้ยังไม่สามารถชี้ชัดอย่างเที่ยงตรงในความแตกต่างของทั้ง 2 กลุ่มสายพันธุ์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในการเก็บตัวอย่าง ต้นข้าวอยู่ในระยะที่ได้รับความเค็มสั้นเกินไป อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ข้าวที่ได้รับพันธุกรรมความทนเค็มก็สามารถแสดงความทนเค็มได้เหนือกว่าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

3.4 ปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบ

การประเมินปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบของสายพันธุ์ลูกผสม พบว่า กลุ่มที่มีพันธุกรรมทนความเค็มมีค่าปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบสูงกว่า กลุ่มที่ไม่มีพันธุกรรมทนความเค็ม ขณะที่พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบ (90.68%) ใกล้เคียงกับพ่อแม่ที่เป็นพันธุ์ถ่ายทอดพันธุกรรมทนความเค็ม คือ 92.93% สำหรับ FL496 และ 91.91% สำหรับ FL530 (Table 6)

4. การประเมินคุณภาพการหุงต้ม

4.1 ปริมาณอมิโลส (AC)

จากการวิเคราะห์ข้าวของ 2 คู่ผสม พบว่า ปริมาณอมิโลสของลูกผสม สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มอย่างเด่นชัด กลุ่มแรกประมาณร้อยละ 25 ของจำนวนพันธุ์ข้าวที่ทดลอง มีปริมาณอมิโลสเฉลี่ย 14.6% ส่วนกลุ่มที่ 2 ประมาณ 34% มีปริมาณอมิโลสเฉลี่ย 16.4% ซึ่งจัดเป็นข้าวที่มีอมิโลสต่ำ ขณะที่ขาวดอกมะลิ 105, FL496 และ FL530 มีปริมาณอมิโลส 15.3, 22.8 และ 25.3% ตามลำดับ สายพันธุ์ที่มีพันธุกรรมทนเค็มส่วนใหญ่ มีปริมาณอมิโลสต่ำปานกลาง มีเพียงส่วนน้อยที่มีค่าสูง เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ที่มีพันธุกรรมทนเค็มและไม่มีพันธุกรรมทนเค็ม พบว่ามีปริมาณอมิโลสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Table 7 และ Fig. 7)

4.2 ความหอม

ความหอมของข้าวสายพันธุ์ผสมกลับครั้งที่ 2 มีความแปรปรวน อยู่ในช่วงระดับ 0-2 ชี้ให้เห็นว่า บางส่วนมีกลิ่นหอมและบางส่วนไม่หอม อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ส่วนใหญ่ของคู่ผสม KDML105/FL496 และ KDML105/FL530 มีความหอมปานกลาง 38% และ หอม 61% มีเพียง 1.3% ที่ไม่หอม (Table 7)

4.3 ความคงตัวของแป้งสุก (GC) และอุณหภูมิแป้งสุก (GT)

การศึกษาแป้งสุกของข้าว 2 คู่ผสม พบว่า ไม่มีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ทดสอบ สำหรับความคงตัวของแป้งสุก และ อุณหภูมิแป้งสุก สายพันธุ์ข้าวส่วนใหญ่มีลักษณะทั้งสองคล้ายกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยมีประมาณร้อยละ 1 ที่มีความแตกต่างจากพันธุ์ข้าวที่ทดสอบทั้งหมด (Table 7)

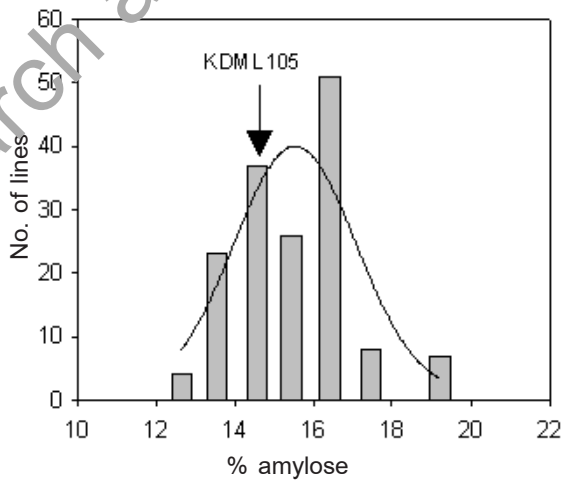

Fig. 7 Amylose content of BC_2F_2 progenies of KDML105/FL496 and KDML105/FL530 compared to KDML105

Table 7 Cooking quality of parents and progenies of KDML105/IR66946 crosses (BC_2F_2) grown in non-saline paddy field

Cultivar & lines	Parents			BC_2F_2 progenies	
	KDML105	FL496	FL530	Carry QTLs	No QTLs
Amylose content (%)	15.3	22.8	25.3	12.34 -19.22	14.77-16.5
Aroma	2	0	0	0 - 2	0 - 2
Gel consistency	89.4	53.8	53.9	82.5-95	87.5-92.5
Gelatinization temperature	6.8	5.3	5.3	4.8-7	5.0 - 7

Bureau of Rice Research and Development

Table 8 Agronomic characters (mean) of 6 salt tolerant lines grown in non-saline paddy field

Cultivar & lines	Plant height (cm)	Flowering date	Panicle/hill (no.)	1,000 seed wt. (g)	Grain yield (g/m^2)
KDML105	98	91	12	25.69	118.6
F3-1094	112	96	11	25.80	120.3
F3-1159	110	95	12	25.9	123.2
F3-1277	115	100	11	27.4	164.8
F3-62	134	104	10	25.70	183.3
F3-221	92	96	12	23.4	168.7
F3-248	122	101	11	27.8	176.1
CV (%)	7.5	4.0	18.45	3.64	41.3

5. การประเมินลักษณะทางการเกษตรและผลผลิต

5.1 ความสูง

สายพันธุ์ที่ทดสอบทั้งหมดของทั้งสองคู่ผสมสามารถแบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม คือ คู่ผสมขาวดอกมะลิ 105/FL496 แบ่งเป็น 3 กลุ่มประกอบด้วย F_3-1094, F_3-1159 และ F_3-1277 และคู่ผสมขาวดอกมะลิ 105/FL530 แบ่งเป็นอีก 3 กลุ่มประกอบด้วย F_3-62, F_3-221 และ F_3-248 สายพันธุ์ข้าวใน 6 กลุ่มนี้ส่วนใหญ่มีความสูงมากกว่าขาวดอกมะลิ 105 ยกเว้น กลุ่ม F_3-221 สูงเฉลี่ยเพียง 92 เซนติเมตร กลุ่ม F_3-62 มีความสูงมากที่สุด และสูงกว่าขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งสูง 98 เซนติเมตร (Table 8) ซึ่งอาจเป็นเพราะมีช่วงการเจริญเติบโตสั้นในฤดูแล้ง และอาจเป็นผลกระทบจากการทำลายของโรคและแมลง

5.2 วันออกดอก

จำนวนวันจากวันปลูกถึงวันออกดอกของสายพันธุ์ข้าวทดลองมีแนวโน้มเช่นเดียวกับความสูง กล่าวคือ สายพันธุ์ส่วนใหญ่มีจำนวนวันออกดอกของข้าวมากกว่าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (91 วัน) (Table 8) และกลุ่ม F_3-62 มีจำนวนวันออกดอกสูงสุด ขณะที่ กลุ่ม F_3-1159 มีจำนวนวันออกดอกสั้นที่สุด คือ 95 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ทดสอบ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการปลูกในฤดูแล้ง สายพันธุ์ต่าง ๆ น่าจะได้รับพันธุกรรมการไวต่อช่วงแสงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไวต่อช่วงแสง จึงทำให้อายุสั้นลงกว่าปกติ (ที่ปลูกในฤดูฝน)

5.3 จำนวนรวงต่อกอ

จากผลการทดลองพบว่าขาวดอกมะลิ 105 มีจำนวนรวงต่อกอต่ำ คือ 12 รวงต่อกอ อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ส่วนใหญ่ของทั้งสองคู่ผสมก็ยังให้จำนวนรวงต่อกอต่ำกว่าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (Table 8)

5.4 น้ำหนัก 1,000 เมล็ด

สายพันธุ์ข้าวที่ทดลองทั้งหมด มีน้ำหนัก 1,000 เมล็ด สูงกว่าน้ำหนักของพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เล็ก

Table 9 Phenotypic correlation among grain yield ($g\ m^{-2}$) and days to flowering, plant height (cm), and yield components (panicle number $hill^{-1}$, seed number $panicle^{-1}$ and 1,000 grain weight (g)) of KDML105 salinity tolerant improved population

	FLW	GW	GY	HT	PAN	1,000 g wt.
FLW	1					
GW	0.144239ns	1				
GY	0.466634**	0.131228ns	1			
HT	0.468021**	0.542604**	0.290582**	1		
PAN	- 0.02739ns	-0.43528**	0.052975ns	-0.3107**	1	
1,000 g wt.	0.456382*	0.096241ns	0.511439**	0.536515**	-0.19413ns	1

Bureau of Rice Research and Development

น้อย โดยอยู่ในช่วง 25.7 - 27.8 กรัม นอกจากกลุ่ม F_3-221 ที่มีน้ำหนัก 1,000 เมล็ดต่ำ เพียง 23.4 กรัม (Table 8)

5.5 ผลผลิต

สายพันธุ์ที่พัฒนาจากคู่ผสม KDML105/FL496 และ KDML105/FL530 ให้ผลผลิตสูงกว่าขาวดอกมะลิ 105 (Table 8) ถึงแม้ว่าจำนวนรวงต่อกอของขาวดอกมะลิ 105 จะสูงกว่า และยังพบว่า จำนวนรวงต่อกอไม่มีความสัมพันธ์กับผลผลิต แต่น้ำหนัก 1,000 เมล็ดมีผลต่อผลผลิตอย่างมีนัยสำคัญ และพบความสัมพันธ์ในทางบวกระหว่างน้ำหนัก 1,000 เมล็ด กับผลผลิต (Table 9)

สรุปผลการทดลอง

พันธุ์ข้าวทนเค็ม 2 สายพันธุ์ที่คัดเลือกเป็นพันธุ์ให้พันธุกรรมทนเค็ม คือ FL496 และ FL530 มีระดับความทนเค็ม 3.0 และ 3.7 มีปริมาณน้ำสัมพัทธ์ในใบ 94.28 และ 93.91% มีค่าอัตราส่วนของโซเดียมต่อโพแทสเซียม 0.158 และ 0.126 ตามลำดับ เมื่อผสมพันธุ์กับขาวดอกมะลิ 105 ได้ลูกผสม นำมาศึกษาลักษณะต่าง ๆ พบว่าลูกผสม BC_2F_1 มีพันธุกรรมของขาวดอกมะลิ 105 อยู่ระหว่าง 67.2-92.3% และ BC_2F_3 มีพันธุกรรมของขาวดอกมะลิ 105 อยู่ระหว่าง 72.45-95.92% มีคุณภาพการหุงต้มเหมือนขาวดอกมะลิ 105 ส่วนลักษณะทางการเกษตรพบว่าสายพันธุ์จำนวน 81 จาก 90 สายพันธุ์ มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมากกว่าขาวดอกมะลิ 105 ในขณะที่ 47 สายพันธุ์มีน้ำหนัก 1,000 เมล็ดหนักกว่าและ 74 สายพันธุ์ให้ผลผลิตสูงกว่าขาวดอกมะลิ 105 จึงมีความมั่นใจว่าวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพนี้ สามารถช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนเค็มให้มีลักษณะการหุงต้มที่ดีขึ้นได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณมูลนิธิร็อกกี้เฟลเลอร์ ที่สนับสนุนทุนงานวิจัยนี้ ขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์พื้นที่และห้องปฏิบัติการทดลองในระหว่างปี พ.ศ. 2545-2547 ขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ในหน่วยค้นคว้าและใช้ประโยชน์ยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนยีชีวภาพทางการเกษตร สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม ที่ช่วยให้ผลงานวิจัยนี้สำเร็จด้วยดี และขอขอบคุณสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) และศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานีที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์ข้าวทนดินเค็ม

เอกสารอ้างอิง

Ahn, S.N., C.N. Bollich and S.D. Tanksley. 1992. RFLP tagging of a gene for aroma in rice. Theor. Appl. Genet. 84 : 825-828.

Akbar, M., T. Yabuno and S. Nakao 1972. Breeding for saline - resistant varieties of rice. 1 Variability for salt tolerance among some rice varieties. Japanese Journal of Breeding 22 : 277-284.

Allard, R.W. 1960. Principles of Plant Breeding. Wiley, New York. 150 p.

Asch, F., M. Dingkuhn, K. Dorffling and K. Miezan. 2000. Leaf K/Na ratio predicts salinity induced yield loss in irrigated rice. Euphytica 113 : 109-118.

Babu, R., S.K. Nair, B.M. Prasanna and H.S. Gupta. 2004. Integrating marker assisted selection in crop breeding-prospects and challenges. Current Science 87(5) : 607-619.

Barr, H.D. and P.E. Weatherley. 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. Aust. J. Biol. Sci. 15 : 413-428.

Buttery, R.G., L.C. Ling, B.O. Juliano and J.G. Turnbaugh. 1983. Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. J. Agric. Food Chem. 31 : 823-826.

Garland, S., L. Lewin, A. Blakeney and R. Reinke. 2002. PCR-based molecular markers for the fragrance gene in rice *(Oryza sativa* L.) Theor. Appl. Genet. 101 : 364-371.

Gregorio, G.B., D. Senadhira and R.D.Mendoza. 1997. Screening rice for salinity tolerance. pp. 2-23. *In*: IRRI Discussion Paper Series No. 22, International Rice Research Institute, Manila, P.O. Box 933, 1099, Philippines.

Hospital, F., C. Chevalet and P. Mulsant. 1992. Using markers in gene introgression breeding programs. Genetics 132 : 1119-1210.

IRRI. 1996. Standard Evaluation System for Rice. 4th edition. International Rice Research Institute, Manila, P.O. Box 933, 1099, Philippines. 35 p.

Juliano, B.O. and A.A. Perdon. 1975. Gel and molecular properties of nonwaxy rice, Starch-Starke. 27 : 115-120.

Juliano, B.O. and C.G. Pascual. 1980. Quality characteristics

Bureau of Rice Research and Development

of milled rice grown in different countries. International Rice Research Institute. Los Banos, Laguna, Philippines. Paper Series No. 48. 25 pp.

Kapp, L.C. 1974. The effect of common salt on rice production. Arkansas Experimental Station Bulletin 465 : 3-7.

Lanceras, J.C., Z.L. Huang, O. Naivikul, A. Vanavichit, V. Ruanjaichon and S. Tragoonrung. 2000. Mapping of genes for cooking and eating qualities in Thai jasmine rice (KDML105). DNA Research 7 : 93-101.

Lorieux, M., M. Petrov, N. Huang, E. Guiderdoni and A. Ghesquiere. 1996. Aroma in rice : genetic analysis of a quantitative trait. Theor. Appl. Genet. 93 : 1145-1151.

Netondo, G.W., J.C. Onyango and E. Beck. 2004. Sorghum and salinity : I. Response of growth, water relations and ion accumulation to NaCl salinity. Crop Sci. 44 : 797-805.

Pearson, G.A. 1959. Factors influencing salinity of submerged soils and growth of Caloro rice. Soil Sci. 87 : 198-206.

Stuber, C.W. 1995. Mapping and manipulating quantitative trait in Maize. Trends Genetics 11 : 477-481.

Suriyaarunroj, D., N. Supapoj, T. Toojinda and A. Vanavichit. 2004. Relative leaf water content as an efficient method for evaluating rice cultivars for tolerance to salt stress. Science Asia 30 : 411 - 415.

Wahid, A. 2004. Analysis of toxic and osmotic effects of sodium chloride on leaf growth and agronomic yield of sugarcane. Bot Bull. Acad. Sin. 45 : 133-141.

Yeo, A.R., M.E. Flower and T.J. Flower. 1988. Selection of lines with high and low sodium transport from within varieties of an inbreeding species : rice (*Oryza sativa*). New Phytologist 110 : 13-19.

Yoshida, S., D.A. Forno, J.H. Cock and K.A. Gomez. 1976. Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. 3rd ed. International Rice Research Institute, Manila, P.O. Box 933, 1099, Philippines. pp. 61-66.

Zhu, G.Y., J.M. Kinet and S. Lutts. 2001. Characterisation of rice (*Oriza sativa* L.) F_3 populations selected for salt resistance. I. Physiological behaviour during vegetative growth. Euphytica 121 : 25-263.

Bureau of Rice Research and Development