การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และมีคุณภาพเมล็ดเหมือนขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย

Development of Rice Introgression Lines with Brown Planthopper Resistance and KDML105 Grain Quality Characteristics through Marker-assisted Selection

จิรพงศ์ ใจรินทร์[1)] วราภรณ์ วงศ์บุญ[1)] กิจติพงษ์ เพ็งรัตน์[2)] สงวน เทียงดีฤทธิ์[1)]
พิกุล ลีลากุด[1)] กัลยา สานเสน[1)]
Jirapong Jairin[1)] Waraporn Wongboon[1)] Kittiphong Phengrat[2)] Sa-nguan Teangdeerith[1)]
Phikul Leelagud[1)] Kalaya Sansen[1)]

Bureau of Rice Research and Development

Abstract

In this study, a simple sequence repeat (SSR) analysis was performed to identify and localize the *Bph3* gene derived from cv. Rathu Heenati. For mapping of the *Bph3* locus, the backcross population, BC_3F_2, from a cross of Rathu Heenati x KDML105 was developed and evaluated this for BPH resistance. Thirty-six polymorphic SSR markers on chromosomes 4, 6 and 10 were used to survey 15 resistant and 15 susceptible individuals from the backcross population. One SSR marker, RM190, on chromosome 6 was associated with resistance and susceptibility in the backcross population. Additional SSR markers surrounding the RM190 locus were examined to define the location of *Bph3*. Based on the linkage analysis of 333 BC_3F_2 individuals, it could be able to map the *Bph3* locus between two flanking SSR markers, RM588 and RM589, on the short arm of chromosome 6. The tightly linked SSR markers were further used to develop introgression lines (ILs) with essential grain quality traits and BPH resistance. The linkage drag between *Bph3* and Wx^a alleles was successfully broken by phenotypic selection integrated with marker-assisted selection. All fifty-one selected ILs developed in this study showed a broad spectrum resistance against BPH populations in Thailand and had KDML105 grain quality standards. Finally this study was revealed that the ILs can be directly developed into BPH resistance varieties or can be used as genetic resources of BPH resistance to improve rice varieties with the Wx^b allele in rice breeding programs.

Keywords : brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, marker-assisted selection, SSR, allele, KDML105

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้ใช้โมเลกุลเครื่องหมาย simple sequence repeats (SSR) วิเคราะห์หาตำแหน่งยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Bph3* จากพันธุ์ข้าว Rathu Heenati โดยการพัฒนาประชากรข้าวผสมกลับ BC_3F_2 จากคู่ผสม Rathu Heenati x ขาวดอกมะลิ 105 เพื่อใช้ทดสอบความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และสร้างแผนที่พันธุกรรมคัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อ-แม่ จำนวน 36 ไพร์เมอร์ บนโครโมโซม 4 6 และ 10 วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ จำนวนกลุ่มละ 15 สายพันธุ์ พบว่า

1) ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ตู้ ปณ. 65 อ.เมือง จ.อุบลราชธานี 34000 โทรศัพท์ 0-4534-4103-4 ต่อ 122
Ubon Ratchathani Rice Research Center, P.O. Box 65, Mueang, Ubon Ratchathani 34000 Tel. 0-4534-4103-4 ext. 122
2) ศูนย์วิจัยข้าวสุรินทร์ อ.เมือง จ.สุรินทร์ 32000 โทรศัพท์ 0-4451-1394
Surin Rice Research Center, Mueang, Surin 32000 Tel. 0-4451-1394

มีเพียงโมเลกุลเครื่องหมาย RM190 ที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานและอ่อนแอ คัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมายเพิ่มเติมที่มีตำแหน่งใกล้กับ RM190 เพื่อวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนต้านทานที่แน่นอนบนโครโมโซม จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์และจีโนไทป์ของประชากรผสมกลับ BC_3F_2 จำนวน 333 สายพันธุ์ พบว่า ยีนต้านทาน *Bph3* มีตำแหน่งอยู่ระหว่างโมเลกุลเครื่องหมาย RM588 และ RM589 บนโครโมโซม 6 นำโมเลกุลเครื่องหมายที่มีตำแหน่งใกล้กับยีนต้านทาน ไปใช้พัฒนาสายพันธุ์ข้าวต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและมีคุณภาพเมล็ดดี สามารถแยก linkage drag ระหว่างอัลลีล *Bph3* และ Wx^a ออกจากกัน โดยการคัดเลือกฟีโนไทป์และการใช้โมเลกุลเครื่องหมายร่วมกัน สายพันธุ์ข้าวที่พัฒนาจากการวิจัยครั้งนี้แสดงความต้านทานต่อความหลากหลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่พบในประเทศไทย และมีคุณภาพเมล็ดเหมือนพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สายพันธุ์ข้าวดังกล่าวสามารถพัฒนาเป็นพันธุ์ต้านทาน หรือใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมเพื่อพัฒนาพันธุ์ข้าวต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่มี Wx^b อัลลีล ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป

คำสำคัญ : เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Nilaparvata lugens* การคัดเลือกโดยโมเลกุลเครื่องหมาย SSR อัลลีล ขาวดอกมะลิ 105

คำนำ

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål)) เป็นแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญในพื้นที่ปลูกข้าวภาคกลางและภาคเหนือตอนล่าง ปัจจุบันพบความเสียหายจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลระบาดทำลายข้าวร่วมกับเพลี้ยกระโดดหลังขาว ในพื้นที่นาน้ำฝนภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นประจำทุกปี เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสามารถทำลายข้าวได้ทุกระยะการเจริญเติบโต โดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าว ทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตในต้นข้าวลดลง ส่งผลให้อัตราการสังเคราะห์แสง การเจริญเติบโต และการให้ผลผลิตของข้าวลดลงตามไปด้วย (Ramesh and Murugan, 1996; Sogawa, 1982; Watanabe and Kitagawa, 2000) ถ้าเกิดการระบาดรุนแรงข้าวจะแห้งตายในลักษณะที่เรียกว่า "hopperburn" (Dyck and Thomas, 1979; Pathak and Khan, 1994) นอกจากนี้ยังเป็นพาหะนำเชื้อที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคใบหงิก (ragged stunt) และโรคเขียวเตี้ย (grassy stunt) ในข้าว มีรายงานการระบาดทำลายข้าวของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในประเทศไทย ตั้งแต่ปี 2518 ในระหว่างปี 2533-2534 พื้นที่ปลูกข้าวภาคกลางและภาคเหนือมากกว่าหนึ่งล้านไร่เสียหายจากการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและโรคใบหงิก และในช่วงปี 2541-2544 เกิดการระบาดรุนแรงอีกครั้งในพื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

การใช้พันธุ์ข้าวต้านทานสามารถลดความเสียหายจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ลดการใช้สารฆ่าแมลง และลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกร ดังนั้น ในสภาวะปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ได้พันธุ์ต้านทานจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง สิ่งสำคัญของการพัฒนาพันธุ์/สายพันธุ์ต้านทาน คือ การเลือกใช้แหล่งพันธุกรรมหรือยีนต้านทานที่ดี ที่สามารถต้านทานครอบคลุมความหลากหลายของประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่พบในประเทศไทย มีความคงทนของลักษณะความต้านทาน (durable resistance) ต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรของแมลง และสามารถต้านทานได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าว เนื่องจากข้าวบางพันธุ์ไม่สามารถที่จะต้านทานได้ทุกระยะการเจริญเติบโต

ในประเทศไทยได้เริ่มศึกษาพันธุกรรมความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในพันธุ์ข้าว W1252, W1259 และ W1263 ตั้งแต่ปี 2518 โดยการผสมกับพันธุ์ข้าวของไทย พบว่าพันธุ์ข้าวทั้งสามมียีนเด่น (single dominant gene) ควบคุมลักษณะการต้านทาน และต่อมาพันธุ์ W1252 ได้ถูกนำมาใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมต้านทานต่อแมลงบั่วและเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในพันธุ์ กข4 (Pongprasert and Weerapat, 1979) พันธุ์ กข9 ได้ยีนต้านทานจากพันธุ์ W1256 มีการแนะนำและส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกในปี 2518 ในปี 2524 พันธุ์ข้าว กข21 ได้แนะนำและส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเพื่อแก้ปัญหาการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในภาคกลาง พันธุ์ข้าว กข21 มียีนต้านทาน *Bph1* จากพันธุ์ IR26 (TKM6) ต่อมาในปี 2524 พันธุ์ กข23 ซึ่งมียีนต้านทาน *bph2* จากพันธุ์

Bureau of Rice Research and Development

IR32 (PTB18 และ PTB21) ได้รับรองพันธุ์และส่งเสริมให้เกษตรกร พันธุ์สุพรรณบุรี 60 ซึ่งต้านทานระดับปานกลาง มียีนต้านทาน *bph2* จาก IR48 รับรองพันธุ์ปี 2530 เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่มีคุณภาพค่อนข้างดี เกษตรกรจึงนิยมปลูกกันอย่างแพร่หลาย และในปี 2532 ข้าวสุพรรณบุรี 60 ก็ถูกเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเข้าทำลาย พันธุ์สุพรรณบุรี 90 ได้รับการแนะนำทดแทนเพื่อแก้ปัญหา นอกจากนี้ยังมีพันธุ์ข้าวต้านทานอื่นๆ ที่แนะนำเพื่อแก้ไขปัญหาและลดความเสียหายจากการเข้าทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เช่น ชัยนาท 1 สุพรรณบุรี 1 สุพรรณบุรี 2 เป็นต้น

ตั้งแต่ปี 2518 จนถึงปัจจุบัน กรมการข้าวได้ผลิตพันธุ์ข้าวต้านทานและส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกไม่น้อยกว่า 10 พันธุ์ แต่มีพันธุ์ข้าวเพียงไม่กี่พันธุ์ที่ยังคงต้านทานต่อประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลส่วนใหญ่ที่พบในประเทศไทย เช่น ปทุมธานี 1 พิษณุโลก 2 ซึ่งคาดว่าได้รับยีนต้านทานมาจาก IR36 และ IR56 ตามลำดับ เนื่องจากประชากรแมลงที่พบมีการอพยพเคลื่อนย้าย และปรับเปลี่ยนประชากรอยู่ตลอดเวลา จึงมีความจำเป็นที่ต้องพัฒนาพันธุ์ข้าวให้ต้านทาน ควบคู่ไปกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวคุณภาพเมล็ดดีและให้ผลผลิตสูง การใช้เทคโนโลยีชีวภาพโดยเฉพาะการใช้โมเลกุลเครื่องหมายเพื่อช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่นำพายีนควบคุมลักษณะความต้านทาน เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดระยะเวลาและเพิ่มความแม่นยำในการพัฒนาพันธุ์ข้าว

ปัจจุบัน มีรายงานการค้นพบตำแหน่งของยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลบนโครโมโซมข้าวไม่น้อยกว่า 20 ยีน (Zhang, 2007) ในจำนวนนี้มียีนต้านทาน *Bph1*, *bph2, bph5, bph7, bph8* และ *Bph9* ที่แมลงส่วนใหญ่ที่พบในประเทศไทยสามารถเข้าทำลายได้ พันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทาน *bph4, Bph6* และ *Bph10* สามารถต้านทานต่อแมลงบางประชากร มีเพียงไม่กี่ยีนที่ต้านทานต่อแมลงส่วนใหญ่ ได้แก่ *Bph3, Bph11, bph12, Bph14* และ *Bph15* และยังมีพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานบางยีน เช่น *Bph13, bph16, Bph17, Bph18*, *bph19* ที่ยังไม่ได้นำมาศึกษาและทดสอบกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในประเทศไทย นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานที่ควบคุมโดย QTL (quantitative trait loci) กระจายทั่วทั้ง 12 โครโมโซมของข้าว (Alam and Cohen, 1998; Jairin *et al.*, 2005; Soundararajan *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002)

การปรับปรุงพันธุ์ต้านทานในประเทศไทย ได้มีการพัฒนาพันธุ์ข้าวต้านทานจากยีน *Bph1, bph2, Bph3* และ *bph4* ต่อมาพบว่าเพลี้ยกระโดดส่วนใหญ่สามารถเข้าทำลายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทาน *Bph1* และ *bph2* แต่ยังมีพันธุ์ข้าวที่มียีน *bph4* ยังคงต้านทานต่อแมลงบางประชากร และพบว่าพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทาน *Bph3* ยังสามารถต้านทานได้ดีต่อประชากรแมลงส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตาม เริ่มพบว่าระดับความต้านทานของพันธุ์ข้าวดังกล่าวลดลง เมื่อทดสอบกับแมลงบางประชากร

จากการศึกษาพบว่าพันธุ์ข้าว Rathu Heenati ที่มียีนต้านทาน *Bph3* (Angeles *et al.*, 1986; Lakshminarayana and Khush, 1977) แสดงลักษณะต้านทานต่อประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่เก็บจากจังหวัดกาญจนบุรี กาฬสินธุ์ ฉะเชิงเทรา ชัยนาท ชัยภูมิ เชียงราย นครนายก นครปฐม นครพนม นครราชสีมา นครศรีธรรมราช นครสวรรค์ น่าน บุรีรัมย์ ปทุมธานี พิษณุโลก แพร่ มุกดาหาร ยโสธร ร้อยเอ็ด ราชบุรี ลพบุรี ลำปาง ศรีสะเกษ สระแก้ว สุพรรณบุรี สุรินทร์ หนองคาย อ่างทอง อุดรธานี และอุบลราชธานี (Jairin *et al.*, 2007a) และจากการทดสอบการปรับตัวของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่เลี้ยงบนพันธุ์ต้านทาน Rathu Heenati พบว่าประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่เก็บจากจังหวัดอุบลราชธานี และขอนแก่น ไม่สามารถปรับตัวบนข้าวทั้งสองพันธุ์ได้ (Jairin, 2008)

พันธุ์/สายพันธุ์ข้าวต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่พัฒนาขึ้นมา ทั้งในและต่างประเทศที่ได้รับยีนต้านทาน *Bph3* พบว่า ปริมาณแอมิโลสในเมล็ดของพันธุ์/สายพันธุ์เหล่านั้นค่อนข้างสูง ทั้งนี้เนื่องจากยีนต้านทานในพันธุ์ข้าวดังกล่าววางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมการสร้างแอมิโลสบนโครโมโซม 6 (Jairin *et al.*, 2009) การพัฒนาพันธุ์ข้าวต้านทานและมีปริมาณแอมิโลสต่ำจึงทำได้ไม่ง่ายนักโดยใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบปกติ การใช้โมเลกุลเครื่องหมายจึงเพิ่มโอกาสให้นักปรับปรุงพันธุ์สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อสืบหาโมเลกุลเครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับยีนต้านทาน *Bph3* และเพื่อถ่ายทอดลักษณะต้านทานดังกล่าวเข้าสู่พันธุ์ขาวดอกมะลิ

Bureau of Rice Research and Development

105 และพัฒนาเป็นสายพันธุ์ข้าวต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ที่มีคุณภาพเมล็ดทางกายภาพและการหุงต้มดี โดยการใช้โมเลกุลเครื่องหมาย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การพัฒนาประชากรข้าว

สร้างประชากรผสมกลับ BC_3F_2 ระหว่างพันธุ์ต้านทาน Rathu Heenati (acc. no. 11730) กับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เพื่อใช้ในการสืบหายีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล กำจัด linkage drag และพัฒนาสายพันธุ์ข้าวต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และมีคุณภาพทางกายภาพและการหุงต้มดี โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกในแต่ละชั่วอายุ ดังแสดงใน Fig. 1 คัดเลือกได้ BC_3F_3 จำนวน 2 ต้น จาก BC_3F_2 จำนวน 2,343 ต้น ที่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และแยกอัลลีลควบคุมการสร้างแอมิโลสในเมล็ดจาก donor ออกจากยีนต้านทาน *Bph3* คัดเลือกสายพันธุ์จากประชากร BC_3F_4 เพื่อใช้วิเคราะห์พื้นฐานทางพันธุกรรม (genetic background) ปลูกประเมินลักษณะทางการเกษตร ผลผลิต และลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของเมล็ดจนได้ประชากร BC_3F_6 จำนวน 51 สายพันธุ์

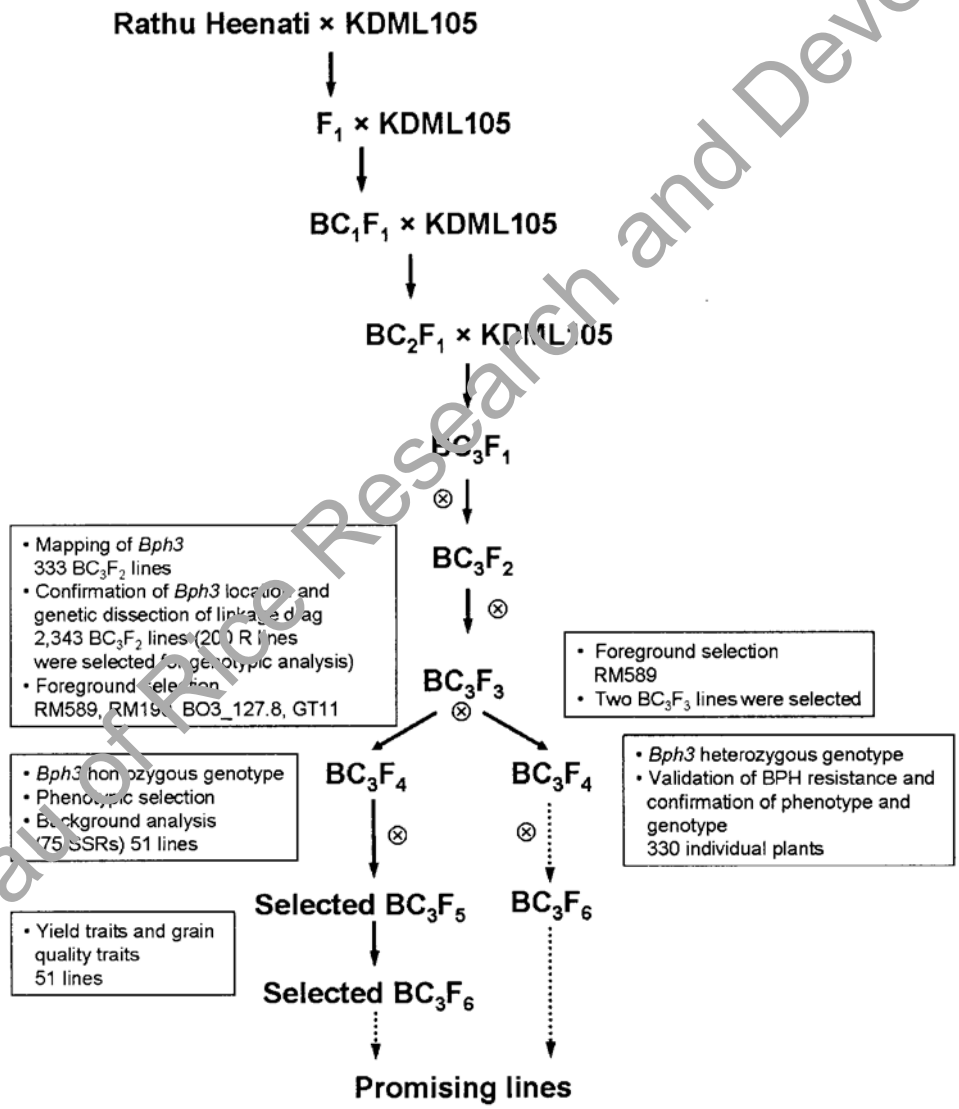

Fig. 1 Scheme for the development of BPH resistance introgression lines with details of markers used for foreground and background selection

Bureau of Rice Research and Development

2. การประเมินความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ประเมินความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของพันธุ์ข้าวในระยะกล้า (standard seedbox screening, SSBS) และในระยะข้าวแตกกอ (modified mass tillers screening, MMTS) และทดสอบความชอบของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลต่อพันธุ์ข้าว ตามวิธีการของ Jairin และคณะ (2007b) ทดสอบความต้านทานของพ่อ-แม่ และประชากร BC_3F_2 จากคู่ผสม Rathu Heenati x ขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้พันธุ์ข้าว TN1 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบอ่อนแอ ดำเนินการที่โรงเรือนทดสอบแมลงของศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี

3. การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่

สกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวโดยวิธี CTAB (cetyltri - methyl ammonium bromide) ตามวิธีการของ Chen และ Ronald (1999) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ (polymerase chain reaction, PCR) (10 µl) องค์ประกอบของพีซีอาร์ ดังนี้ Taq master mix 5 µl, dH_2O 3.5 µl, Primer F (10 µM) 0.25 µl, Primer R (10 µM) 0.25 µl และ Template DNA (25 ng) 1 µl ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเครื่องพีซีอาร์ ประกอบด้วย initial denaturation 94 °C นาน 3 นาที denaturation 94 °C นาน 30 วินาที annealing 55 °C นาน 30 วินาที extension 72 °C นาน 2 นาที final extension 72 °C นาน 10 นาที จำนวน 35 รอบ และแยกความแตกต่างขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดย polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6% และย้อมด้วย silver nitrate

4. การสืบหาตำแหน่งยีนต้านทาน *Bph3* บนจีโนมข้าว

สืบหาโมเลกุลเครื่องหมายที่มีตำแหน่งใกล้กับยีนต้านทาน โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSR คัดเลือกสายพันธุ์ข้าวกลุ่มที่ต้านทานและอ่อนแอจากประชากรข้าว BC_3F_2 จำนวนกลุ่มละ 15 ต้น สำรวจหาตำแหน่งของยีนต้านทานโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSR (McCouch *et al*., 2002) จำนวน 36 คู่ไพร์เมอร์ ซึ่งเป็นบริเวณตำแหน่งที่มีความเป็นได้ว่าอยู่ใกล้กับยีนต้านทาน *Bph3* จากการรายงานก่อนหน้านี้ (Ikeda and Kaneda, 1981; Kawaguchi *et al*., 2001; Sun *et al*., 2005 ; Yan *et al*., 2002) ประกอบด้วย 13 คู่ไพร์เมอร์ ครอบคลุมระยะทางบนโครโมโซม 4 ตั้งแต่ 5.4-151.1 cM 14 คู่ไพร์เมอร์ ครอบคลุมระยะทางบนโครโมโซม 6 ตั้งแต่ 2.3-105.1 cM และ 9 คู่ไพร์เมอร์ ครอบคลุมระยะทางบนโครโมโซม 10 ตั้งแต่ 17.6-113.6 cM

5. การสร้างแผนที่โมเลกุลเครื่องหมายและการวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนต้านทาน *Bph3*

หลังจากทราบตำแหน่งของยีนต้านทาน *Bph3* พอสังเขปจากการสืบหาโดย SSR ดำเนินการสืบหาโมเลกุลเครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งที่พบเพิ่มเติม เพื่อวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนต้านทานที่แน่นอนบนโครโมโซม วิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลจีโนไทป์ ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยโมเลกุลเครื่องหมาย SSR และข้อมูลของลักษณะความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของประชากรข้าว BC_3F_2 จำนวน 333 ต้น โดยใช้โปรแกรม JoinMap 3.0 (Van Ooijen and Voorrips, 2001) และ MapQTL 5 (Van Ooijen, 2004) พิจารณา

Table 1 Target molecular markers for marker-assisted selection

Marker	Type	Chr	Trait	Primer sequence	
				Forward primer	Reverse primer
RM190	SSR	6	AC, GC	gctacaaatagccacccacacc	caacacaagcagagaagtgaagc
BO3_127.8	SSR	8	FR	cgtggctcgacctttttaat	tcaaaccctggttacagcaa
GT11	STS	6	GT	cgagcgagggtttactgttc	ggaggaaacagcagcaactc
RM589	SSR	6	BPH	atcatggtcggtggcttaac	caggttccaaccagacactg

AC = amylose content, FR = fragrance, GC = Gel consistency, GT = Gelatinization temperature, BPH = brown planthopper resistance

Bureau of Rice Research and Development

ความน่าเชื่อถือของการจัดกลุ่มโดยดูจากค่า LOD ที่มีค่ามากกว่า 3.0 และระยะห่างบนแผนที่โมเลกุลเครื่องหมาย วิเคราะห์โดยใช้ฟังก์ชันของ Kosambi (1944)

6. การแยก linkage drag และการคัดเลือกลักษณะความหอมและคุณภาพการหุงต้ม

แยกอัลลีล Wx^a ที่ติดมากับยีนต้านทาน *Bph3* จากพันธุ์ข้าว Rathu Heenati โดยทดสอบปฏิกิริยาความต้านทานของสายพันธุ์ข้าว จำนวน 2,343 ต้น ในสภาพโรงเรือน คัดเลือกเฉพาะต้นที่ต้านทานนำมาวิเคราะห์เพื่อคัดเลือกหาต้นที่มียีนต้านทานและยีน *Wx* ที่เป็นอัลลีลของขาวดอกมะลิ 105 (Wx^b) โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย RM190 และ RM589 และคัดเลือกลักษณะความหอมและอุณหภูมิแป้งสุกโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย BO3_127.8 และ GT11 ตามลำดับ (Table 1)

7. การประเมินพื้นฐานทางพันธุกรรม (genetic background) ของสายพันธุ์คัดเลือก

คัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมาย SSR ที่กระจายทั่วทั้งจีโนมข้าว (McCouch *et al.*, 1997, 2002) จำนวน 120 คู่ไพร์เมอร์ คัดเลือกเฉพาะโมเลกุลเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างพ่อ-แม่ จำนวน 75 คู่ไพร์เมอร์ เฉลี่ย 5-7 คู่ไพร์เมอร์ต่อโครโมโซม ทดสอบโมเลกุลเครื่องหมายกับดีเอ็นเอของสายพันธุ์คัดเลือกจำนวน 51 สายพันธุ์ จากประชากรรุ่น BC_3F_4 ของคู่ผสม Rathu Heenati x ขาวดอกมะลิ 105 วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์อัลลีลหรือพันธุกรรมของพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ Rathu Heenati ในสายพันธุ์คัดเลือก

8. การประเมินลักษณะทางการเกษตรและผลผลิตของสายพันธุ์คัดเลือก

ประเมินลักษณะทางการเกษตรและผลผลิตในแปลงทดลองปี 2550 ที่ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี เก็บข้อมูลวันออกดอก ความสูง จำนวนรวงต่อกอ จำนวน 5 กอ ต่อสายพันธุ์ และเก็บเกี่ยวผลผลิตแต่ละสายพันธุ์ จำนวน 48 กอ บันทึกข้อมูลองค์ประกอบผลผลิต และคำนวณผลผลิตเฉลี่ยต่อกอที่ความชื้น 14%

9. การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมีของเมล็ดสายพันธุ์คัดเลือก

วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ เช่น สีเปลือก ความกว้าง ความยาวของเมล็ดข้าวเปลือกและข้าวกล้อง ลักษณะท้องไข่ เปอร์เซ็นต์ท้องไข่คำนวณจากเมล็ดที่เกิดท้องไข่จากการสุ่มตรวจเมล็ดจำนวน 100 เมล็ด วิเคราะห์ปริมาณแอมิโลส (amylose content, AC) อุณหภูมิแป้งสุก (gelatinization temperature, GT) และความคงตัวของแป้งสุก (gel consistency, GC) ตามวิธีการของ Lanceras และคณะ (2000) และให้คะแนนความหอมโดยการดมตามวิธีการของ Wanchana และคณะ (2005)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสืบหาตำแหน่งของยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลบนจีโนมข้าว

1.1 ความต้านทานของพันธุ์/สายพันธุ์ข้าวต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

จากการประเมินความต้านทานของพันธุ์ข้าว Rathu Heenati และขาวดอกมะลิ 105 ต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล พบว่า พันธุ์ Rathu Heenati ต้านทานได้ดีทั้งในระยะกล้าและระยะแตกกอ ในขณะที่พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อ่อนแอทั้งสองระยะ (Table 2) สำหรับกลไกความต้านทานของพันธุ์ Rathu Heenati ต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล จากการทดสอบความชอบและอัตราการกินอาหาร (Jairin, 2008) คาดว่าลักษณะความต้านทานน่าจะเกี่ยวข้องกับอินทรีย์เคมีภายในต้นข้าวที่ยับยั้งการกินอาหารของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

การทดสอบความต้านทานของประชากรข้าว BC_3F_2 จำนวน 333 สายพันธุ์ ในระยะแตกกอ พบว่า มีการกระจายตัวของลักษณะต้านทานและอ่อนแอในอัตรา 3:1 ($\chi^2 = 0.03$, $P < 0.86$) ซึ่งบ่งชี้ถึงยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานเป็นยีนเด่นเพียงยีนเดียว แต่พบลักษณะการข่มแบบไม่สมบูรณ์เนื่องจากพบสายพันธุ์ส่วนใหญ่ในกลุ่มต้านทานแสดงลักษณะต้านทานในระดับปานกลาง (Fig. 2)

1.2 ตำแหน่งของยีนต้านทาน Bph3 บนจีโนมข้าว

สืบหาตำแหน่งของยีนต้านทาน *Bph3* โดยคัดเลือกและจัดกลุ่มสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล จากประชากรข้าว BC_3F_2 กลุ่มละ 15 สายพันธุ์ วิเคราะห์หาตำแหน่งยีนต้านทานโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย SSR จำนวน 36 คู่ไพร์เมอร์ บนโครโมโซม

Bureau of Rice Research and Development

Table 2 Average damage score of the parents to brown planthopper at vegetative stage (seedling and tillering stages) of rice plants

Cultivar	Seedling stage by SSBS			Tillering stage by MMTS		
	7 DAI	10 DAI	14 DAI	7 DAI	15 DAI	23 DAI
Rathu Heenati	1.0	2.2	2.4	1.0	1.0	1.0
KDML105	6.5	8.9	9.0	5.0	9.0	9.0
TN1	7.0	9.0	9.0	5.0	9.0	9.0

DAI = Days after infestation

Damage score: 1 = very slight damage, 9 = all plants dead

4 6 และ 10 บริเวณที่คาดว่าน่าจะเป็นตำแหน่งของยีนต้านทานจากการรายงานของ Kawaguchi และคณะ (2001), Sun และคณะ (2005) และ Yan และคณะ (2002) ทดสอบโมเลกุลเครื่องหมายกับกลุ่มต้านทานและอ่อนแอ พบว่า มีเพียงโมเลกุลเครื่องหมาย RM190 บนโครโมโซม 6 ที่สามารถแยกดีเอ็นเอของข้าวในกลุ่มต้านทานและอ่อนแอออกจากกันได้อย่างชัดเจน แสดงว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะต้านทานมีตำแหน่งอยู่ใกล้กับโมเลกุลเครื่องหมาย RM190 จึงหาโมเลกุลเครื่องหมายบริเวณรอบๆ ตำแหน่ง RM190 เพิ่มเติมเพื่อหาโมเลกุลเครื่องหมายที่วางชิดกับ *Bph3* มากยิ่งขึ้น และนำไปวิเคราะห์กับดีเอ็นเอที่ได้จากประชากรข้าว BC_3F_2 จำนวน 333 เบอร์พันธุ์ จากนั้นวิเคราะห์หา linkage group และตำแหน่งยีนต้านทานโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ JoinMap 3.0 และ MapQTL 5 จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้อมูลฟีโนไทป์กับจีโนไทป์ของประชากร BC_3F_2 สามารถยืนยันตำแหน่งของยีนต้านทาน *Bph3* บนโครโมโซม 6 อยู่ห่างจากตำแหน่งของ *bph4* ไปทางปลายด้าน short arm ระหว่างโมเลกุลเครื่องหมาย RM588 และ RM589 โดยมีตำแหน่งอยู่ใกล้กับโมเลกุลเครื่องหมาย RM589 (Fig. 3) ซึ่งสามารถอธิบายลักษณะต้านทานได้ ร้อยละ 60.7

เนื่องจากพันธุ์ข้าว Rathu Heenati ที่มียีน *Bph3* (Lakshminarayana and Khush, 1977) สามารถต้านทานได้ครอบคลุมความหลากหลายของประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ไม่เฉพาะในประเทศไทยแต่ยังต้านทานต่อประชากรที่พบในประเทศลาว เวียดนาม จีน ญี่ปุ่น เกาหลี ฟิลิปปินส์ บังคลาเทศ และบางประชากรในอินเดีย (Angeles, *et al.*, 1986; Jairin *et al.*, 2005; Khush, 1984;

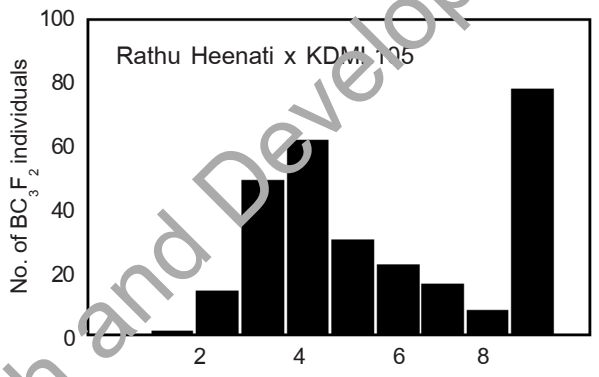

Fig. 2 Frequency distribution of BPH damage rating of a mapping population by the MMTS

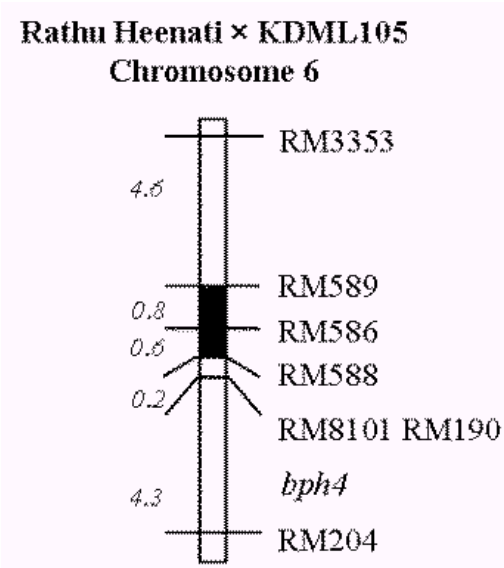

Fig. 3 Linkage maps of the BPH resistant gene *Bph3* on short arm of chromosome 6. The distance between markers was in centiMogans (cM). The solid bars indicate the location of the BPH resistant gene *Bph3*

Bureau of Rice Research and Development

Li *et al.*, 2002; Soundararajan *et al.*, 2004; Velusamy *et al.*, 1995) ดังนั้น จึงศึกษาและวิเคราะห์หาตำแหน่งของยีนต้านทานบนโครโมโซมในพันธุ์ข้าวดังกล่าว ในระยะแรก พบว่า *Bph3* และ *bph4* มีตำแหน่งใกล้กันบนโครโมโซม 7 โดยใช้ trisomic analysis (Ikeda and Kaneda, 1981) นักวิจัยเชื่อว่า *Bph3* วางตัวอยู่บนโครโมโซม 4 (Yan *et al.*, 2002) แต่ยังไม่มีการยืนยันตำแหน่งของยีน *Bph3* ในพันธุ์ข้าว Rathu Heenati ต่อมาได้มีรายงานการค้นพบตำแหน่งของยีนต้านทานหลักในพันธุ์ข้าว Rathu Heenati บนโครโมโซม 4 (Sun *et al.*, 2005) จึงได้ใช้โมเลกุลเครื่องหมายในตำแหน่งที่มีการค้นพบมาทดสอบกับประชากรข้าวที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ แต่ไม่พบโมเลกุลเครื่องหมายใดมีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานในกลุ่มต้านทานและอ่อนแอ ความแตกต่างตำแหน่งของยีนต้านทานที่พบในการทดลองนี้กับของ Sun และคณะ (2005) อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของพันธุ์ข้าวที่ใช้หรือประชากรแมลงที่ใช้ทดสอบ อย่างไรก็ตาม มีรายงานตำแหน่งยีนต้านทาน *bph4* ในพันธุ์ข้าว Babawee บนโครโมโซม 6 (Kawaguchi *et al*., 2001) มีรายงานว่ายีน *bph4* มีตำแหน่งใกล้ (allelic หรือ closely linked) กับยีน *Bph3* (Sidhu and Khush, 1979) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่พบตำแหน่งของยีน *Bph3* บนโครโมโซม 6 ใกล้กับยีน *bph4* (Fig. 3)

1.3 ความแม่นยำของโมเลกุลเครื่องหมาย

เพื่อยืนยันความแม่นยำของโมเลกุลเครื่องหมาย RM589 ที่มีตำแหน่งใกล้ยีนต้านทาน *Bph3* ได้ทดสอบความต้านทานของประชากร BC_3F_4 จำนวน 330

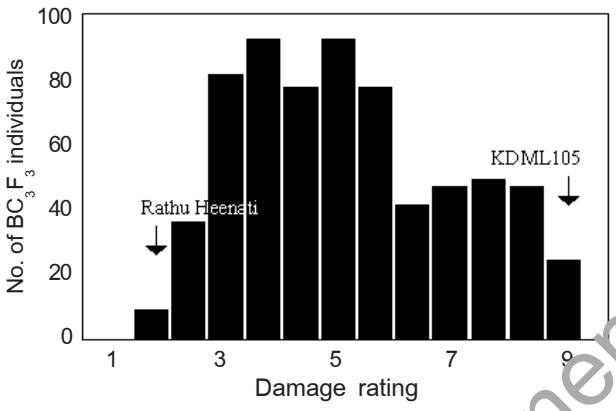

Fig. 4 Frequency distribution of BPH resistance scores of BC_3F_4 based on the MMRS method at the tillering stage of the rice plants

สายพันธุ์ที่ได้จากสายพันธุ์ที่เกิด heterozygous บริเวณตำแหน่งยีนต้านทาน *Bph3* พบว่า การกระจายตัวของความต้านทานในประชากรข้าว มีจำนวนต้นต้านทาน : ต้านทานปานกลาง : อ่อนแอ สอดคล้องกับอัตรา 1:2:1 (χ^2 = 1.09, P = 0.58) (Fig. 4) บ่งชี้ว่าลักษณะต้านทานถูกควบคุมโดยยีนเด่นเพียงยีนเดียวในลักษณะข่มแบบไม่สมบูรณ์ ส่วนการกระจายตัวของอัลลีลที่ตำแหน่งโมเลกุลเครื่องหมาย RM589 ของประชากร BC_3F_4 พบว่ามีจำนวนต้นที่มีอัลลีลของพันธุ์ Rathu Heenati ที่เป็น homozygous ต้นที่เป็น heterozygous และต้นที่มีอัลลีลของพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่เป็น homozygous สอดคล้องกับอัตรา 1:2:1 (χ^2 = 1.04, P = 0.59) เช่นเดียวกับลักษณะต้านทาน และจากการวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะทางฟีโนไทป์ร่วมกับจีโนไทป์ โมเลกุลเครื่องหมาย RM589

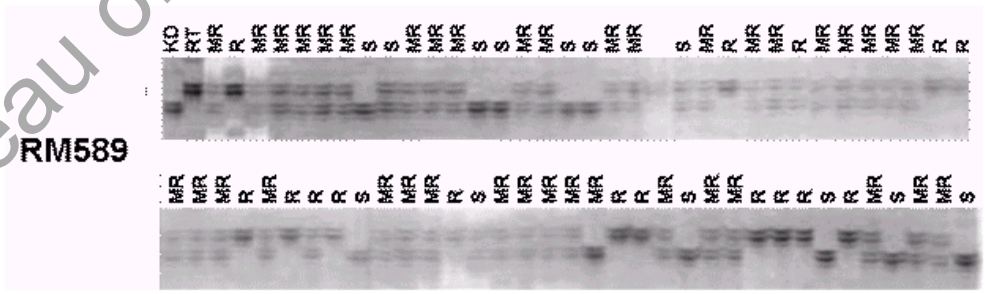

Fig. 5 PCR amplification of BC_3F_4 plants with the marker RM589 linked to *Bph3*
KD = KDML105, RT = Rathu Heenati, R = resistant, MR = moderately resistant, S = susceptible

Bureau of Rice Research and Development

บนโครโมโซม 6 สามารถอธิบายลักษณะต้านทานได้ถึงร้อยละ 80.6 ตัวอย่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์โดยโมเลกุลเครื่องหมาย RM589 และข้อมูลความต้านทานของบางสายพันธุ์แสดงไว้ใน Fig. 5

1.4 การแยก linkage drag ระหว่าง Bph3 และ Wx^a อัลลีล

จากการศึกษาพบว่ายีนต้านทาน *Bph3* ในพันธุ์ข้าว Rathu Heenati มีตำแหน่งใกล้กับยีน waxy (*Wx*) ที่สร้าง granule-bound starch synthase (GBSS) ซึ่งจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์แอมิโลส (Wang *et al.*, 1995) บนโครโมโซม 6 ซึ่งมีระยะห่างระหว่างทั้งสองยีนประมาณ 380 kb ยีน *Wx* ในพันธุ์ Rathu Heenati มีอัลลีลเป็น Wx^a ซึ่งทำให้เมล็ดมีปริมาณแอมิโลสค่อนข้างสูง (Isshiki *et al.*, 1998; Sano *et al.*, 1986) และเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการหรือที่เรียกว่า "linkage drag" จำเป็นต้องแยกยีนทั้งสองโดยการคัดเลือกลักษณะต้านทานในสภาพเรือนทดลอง ร่วมกับการใช้โมเลกุลเครื่องหมาย ขั้นแรกทดสอบความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของประชากรข้าว BC_3F_2 จำนวนทั้งหมด 2,343 ต้น คัดเลือกต้นที่ต้านทานจำนวน 200 ต้น จากนั้นแยก linkage drag ระหว่างยีนต้านทานและยีนควบคุมการสร้างแอมิโลสออกจากกัน ใช้โมเลกุลเครื่องหมาย RM589 และ RM190 คัดเลือกต้นที่ต้านทานและมีอัลลีลตรงตำแหน่งยีน *Wx* เหมือนพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (Wx^b) และคัดเลือกต้นข้าวโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย (Table 1) ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความหอม ค่าการสลายตัวในด่าง และปริมาณแอมิโลสไปพร้อมกัน คัดเลือกได้ต้นที่ต้องการ 1 ต้น (#101) (Fig. 6) เพื่อพัฒนาเป็นสายพันธุ์ต้านทานในชั่วต่อไป

ผลการทดลองชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการใช้โมเลกุลเครื่องหมายในกรณีที่แก้ linkage drag ที่ไม่คาดคิดมาก่อน วิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional breeding) อาจต้องใช้ระยะเวลาและปริมาณของประชากรข้าวค่อนข้างมาก เพื่อขจัดยีนที่ไม่ต้องการออกจากยีนที่ควบคุมลักษณะที่สนใจ โอกาสที่จะได้สายพันธุ์ที่ต้องการก็น้อยลง ดังจะเห็นได้จากพันธุ์ข้าวหรือสายพันธุ์ข้าวที่คาดว่าจะได้รับยีนต้านทาน *Bph3* เป็นพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสค่อนข้างสูง เช่น IR72,

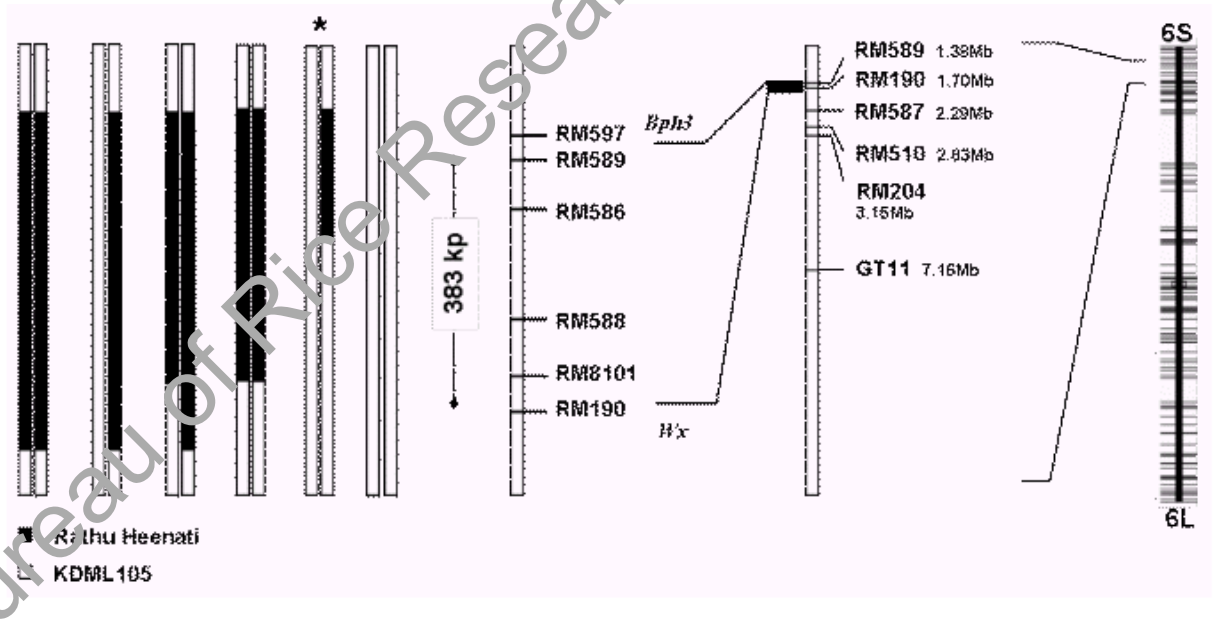

Fig. 6 Fine-scale mapping of two loci, *Bph3* and Wx^a, controlling BPH resistance and amylose content, respectively. The locations of two genes, *Bph3* and *Wx* showed in the linkage map. Graphical genotypes of the region in six BC_3F_2 plants showed on the left; white blocks regions derived from KDML105 and black blocks regions derived from Rathu Heenati. The progeny with an asterisk (#101) was selected to develop the BC_3F_3.

Bureau of Rice Research and Development

IR56, IR13540-56-3-2-1 พิษณุโลก 2 เป็นต้น ในกรณีนี้การคัดเลือกโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายมีข้อได้เปรียบ และเพิ่มโอกาสที่จะได้สายพันธุ์ที่ต้องการ อีกทั้งยังลดระยะเวลาเนื่องจากสามารถคัดเลือกลักษณะที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพของเมล็ดในระยะกล้า

2. การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและมีคุณภาพการหุงต้มดีโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ปลูกประชากรข้าว BC_3F_3 ที่ได้เมล็ดจากต้น (#101) ที่ขจัด linkage drag ออกไปแล้ว เพื่อคัดเลือกให้ได้สายพันธุ์ต้านทานและมีลักษณะต่างๆ ใกล้เคียงกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยการคัดเลือกโดยโมเลกุลเครื่องหมายได้สายพันธุ์ BC_3F_4 ที่ต้องการ 2 ต้น (Fig. 1) เพื่อพัฒนาเป็นสายพันธุ์รุ่นต่อไปจนได้สายพันธุ์ BC_3F_6 จำนวน 51 สายพันธุ์ ใช้สำหรับประเมินลักษณะทางการเกษตรและผลผลิตในแปลงทดลอง ความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และประเมินคุณภาพทางกายภาพและการหุงต้ม

2.1 ความต้านทานของสายพันธุ์คัดเลือกต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ผลจากการทดสอบความต้านทานของสายพันธุ์คัดเลือกในระยะกล้าโดยวิธี SSBS กับประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่มีความแตกต่างของชีวชนิดจำนวน 6 ประชากร พบว่า สายพันธุ์คัดเลือกต้านทานได้ดีต่อทุกประชากรแมลง (Table 3) แสดงว่าสายพันธุ์คัดเลือกได้รับยีนต้านทานจาก Rathu Heenati ซึ่งต้านทานได้ครอบคลุมประชากรแมลงที่เก็บในประเทศไทย (Jairin *et al*., 2007a) อย่างไรก็ตาม พบว่ามีความแตกต่างของระดับความต้านทานในบางสายพันธุ์ต่อแมลงบางประชากร ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากยังมียีนต้านทานอื่นที่ไม่สามารถค้นพบในการศึกษาครั้งนี้ ทำให้ระดับความต้านทานในบางสายพันธุ์ไม่เท่ากัน

ผลของการทดสอบความต้านทานในระยะแตกกอของข้าวสายพันธุ์คัดเลือกบางสายพันธุ์ เมื่อประเมินด้วยวิธีการทดสอบปฏิกิริยาความต้านทาน (MMTS) พบว่า สายพันธุ์ทดสอบแสดงความต้านทานได้ดี (Fig. 7) และจากการทดสอบความชอบของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลต่อพันธุ์ข้าว พบว่า แมลงส่วนใหญ่ไม่ชอบเกาะบนสาย

Table 3 The reaction to BPH populations collected in Thailand in 2004 and 2007, of some selected introgression lines, using SSBS to evaluate the resistance

Designation	Reaction to BPH populations*					
	UBN	DUD	NAN	KPP	WTG	PSL
UBN03078-101-342-6-56	R	R	R	R	R	R
UBN03078-101-342-6-58	R	R	R	R	R	R
UBN03078-101-342-4-106	R	R	MR	MR	R	MR
UBN03078-101-342-4-143	R	R	R	R	R	R
KDML105	S	S	S	S	S	S
Rathu Heenati	R	R	R	R	R	R

R = resistant, MR = moderately resistant, S = susceptible

* Four different biotypes of BPH populations (Jairin *et al*., 2007a) were collected from four provinces, Ubon Ratchathani (UBN), Nan (NAN), Kamphaeng Phet (KPP) and Phitsanulok (PSL) in 2004. Two BPH populations were collected from the outbreak fields from Det Udom (DUD), Ubon Ratchathani province and Wang Thong (WTG), Phitsanulok province in 2007.

Bureau of Rice Research and Development

Fig. 7 The levels of resistance to BPH at tillering stage in some introgressed lines, KDML105, a susceptible recurrent cultivar, and TN1, a susceptible cultivar. The plants have been exposed to BPH feeding for two generations of the insects

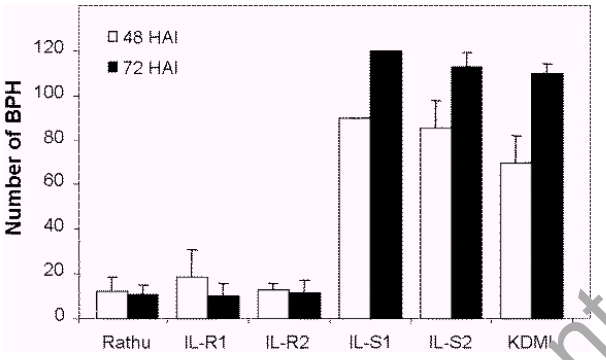

Fig. 8 Number of BPH nymphs (means ± SE) settled on rice cultivars and some introgressed plants in a choice test during 48 and 72 h after infestation

พันธุ์ต้านทานหลังจากปล่อยแมลงนาน 72 ชม. (Fig. 8)

2.2 ลักษณะทางการเกษตรและผลผลิต

การทดสอบสายพันธุ์คัดเลือก BC_3F_6 51 สายพันธุ์ ในแปลงนาศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี พบว่า ลักษณะทางการเกษตร เช่น ลักษณะทรงต้น วันออกดอก ลักษณะรวง ลักษณะเมล็ด ของสายพันธุ์ข้าวส่วนใหญ่คล้ายกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แต่ยังพบการกระจายตัวของลักษณะต่างๆ ระหว่างสายพันธุ์คัดเลือกบ้าง (Table 4, Fig. 9) ค่าเฉลี่ยความสูงของสายพันธุ์อยู่ระหว่าง 122.2-164.6 ซม. ในขณะที่ค่าเฉลี่ยขาวดอกมะลิ 105 สูง 139.0 ซม. วันออกดอกของสายพันธุ์ส่วนใหญ่เหมือนกับขาวดอกมะลิ 105 มีเพียงบางสายพันธุ์ที่ออกดอกล่าช้ากว่า 3-7 วัน ค่าเฉลี่ยของจำนวนรวงต่อกอและผลผลิตของสายพันธุ์คัดเลือกสูงกว่าขาวดอกมะลิ 105 ร้อยละ 18.4 และ 18.1 ตามลำดับ

ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางการเกษตร (Table 5) พบว่า ผลผลิตมีความสัมพันธ์ด้านบวกจำนวนรวงต่อกอ จำนวนเมล็ดต่อรวง และความสูง ($r = 0.37$, $P < 0.01$; $r = 0.40$, $P < 0.01$; $r = 0.42$, $P < 0.01$ ตามลำดับ) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ด้านบวกระหว่างผลผลิตกับน้ำหนัก 1,000 เมล็ด วันออกดอกมีความสัมพันธ์ด้านลบกับผลผลิตและจำนวนเมล็ดต่อรวง ($r = -0.37$, $P < 0.01$; $r = 0.39$, $P < 0.01$ ตามลำดับ) แสดงว่าจำนวนรวงต่อกอ จำนวนเมล็ดต่อรวง และความสูง มีผลต่อการให้ผลผลิตของสายพันธุ์ข้าวคัดเลือก ซึ่งให้ผลผลิตสูงกว่า

Table 4 Performance of principal agronomic traits of some selected introgressed line

Designation	DH	PN	GP	NP	PH	GY	GW
UBN03078-101-342-6-56	127	13.0	4.07	122.4	139.6	24.5	32.7
UBN03078-101-342-6-58	127	13.2	3.03	93.4	143.4	25.4	33.4
UBN03078-101-342-4-106	127	11.8	3.80	130.0	152.8	27.1	27.8
UBN03078-101-342-4-143	127	19.2	3.72	96.2	143.8	23.3	27.1
KDML105	127	13.8	2.91	102.6	139.0	22.0	29.4

DH = days to heading, PN = panicle number, GP = grain weight per panicle (g), NP = number of grain per panicle, PH = plant height (cm), GY = grain yield per plant (g), GW = 1,000-grain weight (g)

Bureau of Rice Research and Development

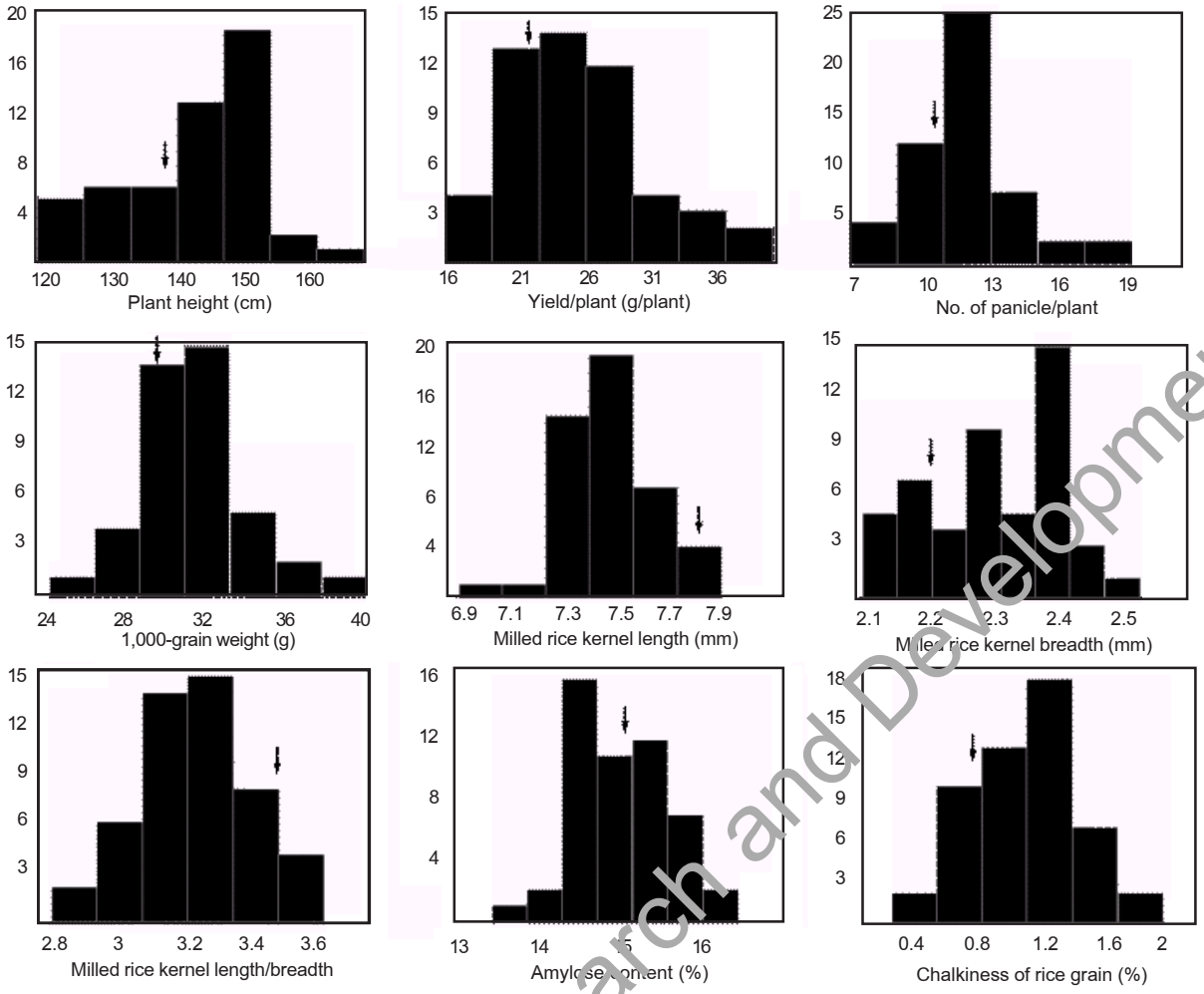

Fig. 9 Frequency distribution of plant height (cm), grain yield per plant (g/plant), panicle per plant, 1,000-grain weight (g), milled rice kernel length (mm), milled rice kernel breadth (mm), milled rice kernel length/ breadth, amylose content (%) and chalkiness of rice grain (%) in BC_3F_6 progenies. Arrows indicated the mean of KDML105.

Bureau of Rice Research and Development

ขาวดอกมะลิ 105 ร้อยละ 1.1

2.3 คุณภาพทางกายภาพและการหุงต้มและการรับประทาน

ผลการวิเคราะห์คุณภาพเมล็ดของสายพันธุ์คัดเลือกจำนวน 51 สายพันธุ์ ที่เก็บจากแปลงนา ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี นาปี ปี 2550 (Table 6 และ 7) การกระจายตัวของลักษณะคุณภาพทางกายภาพ การหุงต้ม และการรับประทานของสายพันธุ์คัดเลือก (Fig. 9) สีเปลือกของเมล็ดข้าวสายพันธุ์คัดเลือกมีสีเหลืองฟางเหมือนกับขาวดอกมะลิ 105 เปอร์เซ็นต์ท้องไข่ของสายพันธุ์คัดเลือก 0.4-1.9 ซึ่งใกล้เคียงกับขาวดอกมะลิ 105 (0.8) ในขณะที่ปริมาณท้องไข่ในพันธุ์ Rathu Heenati สูงถึงร้อยละ 46.8 ความยาวของเมล็ดข้าวกล้องของสายพันธุ์ข้าวเฉลี่ย 6.9-7.9 มม. ปริมาณแอมิโลส 14.1-16.1 ค่าสลายตัวในด่างเหมือนกับขาวดอกมะลิ 105 คือ 6.9-7.0 และลักษณะความคงตัวของแป้งสุกค่อนข้างจะมีการกระจายตัวมากกว่าลักษณะทางคุณภาพอื่น คือ 83.8-115.0 ซม. ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะดังกล่าวถูกควบคุมโดย QTL ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ไม่ได้คัดเลือก และยีน *Wx* นอกจากจะเป็นยีนหลักที่ควบคุมการสร้างแอมิโลส ยังเกี่ยวข้องกับลักษณะความคงตัวของแป้งสุกอีกด้วย (He *et al.*, 2006)

ความหอมเป็นอีกลักษณะหนึ่งที่ต้องการในข้าวคุณภาพดี สายพันธุ์ข้าวเกือบทั้งหมดมีความหอม แต่มีการกระจายตัวของระดับความหอมในสายพันธุ์ข้าว ทั้งนี้

Table 5 Correlation coefficients between panicle number (PN), plant height (PH), grain yield per plant (GY), grain weight per panicle (GP), number of grain per panicle (NP), flowering date (FD), 1,000-grain weight (GW)

Trait	PN	PH	GY	GP	NP	FD
PH	0.54***					
GY	0.37**	0.42**				
GP	0.40**	0.41**	0.31*			
NP	0.42**	0.40**	0.40**	0.88***		
FD	- 0.31*	- 0.34*	- 0.37**	- 0.33*	- 0.39**	
GW	0.07	0.04	- 0.02	0.13	- 0.05	0.13

Significant differences at ***P< 0.001, **0.01, *0.05, respectively

Table 6 General appearance quality traits of rice grains of some selected introgressed lines

Designation	HC	MB	ML	ML/MB	CK
UBN03078-101-342-6-56	ST	2.4	7.8	3.3	1.9
UBN03078-101-342-6-58	ST	2.5	7.8	3.2	1.3
UBN03078-101-342-4-106	ST	2.2	7.2	3.2	1.1
UBN03078-101-342-4-143	ST	2.1	7.7	3.7	1.4
KDML105	ST	2.2	7.8	3.6	0.8

HC = hull color (ST = straw colored), MB = milled rice kernel breadth (mm), ML = milled rice kernel length (mm), ML/MB = milled rice kernel breadth/milled rice kernel, CK = chalkiness (%)

อาจเนื่องมาจากการคัดเลือกความหอมของสายพันธุ์ข้าวใช้โมเลกุลเครื่องหมายบนโครโมโซม 8 เพียงแห่งเดียว แต่ลักษณะความหอมไม่ได้ถูกควบคุมโดยยีนหลักบนโครโมโซม 8 เพียงยีนเดียว ปัจจุบันมีการค้นพบ QTL ที่เกี่ยวข้องกับความหอมบนโครโมโซม 3 และ 4 (Amarawathi *et al.*, 2008) ซึ่งอาจส่งผลต่อระดับความหอมในสายพันธุ์คัดเลือก อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาครั้งนี้พิสูจน์ให้เห็นว่าการใช้โมเลกุลเครื่องหมาย มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกลักษณะทางคุณภาพทางกายภาพและการหุงต้มของเมล็ดข้าว โดยเฉพาะปริมาณแอมิโลส ความคงตัวของแป้งสุก การสลายตัวในด่าง และความหอม

2.4 พื้นฐานทางพันธุกรรมของสายพันธุ์คัดเลือก

วิเคราะห์พื้นฐานทางพันธุกรรมของสายพันธุ์คัดเลือก BC_3F_4 จำนวน 51 สายพันธุ์ โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย SSR ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพ่อ-แม่ (ขาวดอกมะลิ 105 และ Rathu Heenati) จำนวน 75 คู่ไพร์เมอร์ ที่กระจายทั่วทั้งจีโนม พบว่า ค่าเฉลี่ยระยะห่างระหว่างโมเลกุลเครื่องหมายเริ่มตั้งแต่ 11.4 cM (โครโมโซม 5) จนถึง 30.2 cM (โครโมโซม 3) เปอร์เซ็นต์ของ homozygous ของอัลลีลพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อยู่ระหว่างร้อยละ 60-100 โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 86.9 ซึ่งหมายความว่าสายพันธุ์คัดเลือกมีเปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ยของพันธุกรรมที่เหมือนกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ร้อยละ 86.9

Bureau of Rice Research and Development

Table 7 The grain quality traits of some selected introgression lines and the percentage of parental genome recovery of the selections using 75 SSR markers. RH and KD stand for Rathu Heenati and KDML105 alleles, respectively.

Designation	AC	GT	FR	GC	% KD genome	% RH genome	% Residual heterozygosity
UBN03078-101-342-6-56	15.39	7.0	1	60.0	83.8	13.2	2.9
UBN03078-101-342-6-58	15.22	7.0	1	70.0	85.1	10.5	4.5
UBN03078-101-342-4-106	14.96	7.0	1	110.0	86.8	13.2	0.0
UBN03078-101-342-4-143	14.19	7.0	2	77.5	86.8	10.3	2.9
KDML105	15.28	7.0	2	75.0	100.0	-	-
Mean*	15.03	7.0		81.2	86.9	9.9	3.2

AC = amylose content (%), GT = gelatinization temperature (1-2 = high and 6-7 = low)

FR = fragrance (1 = mild; 2 = strong), GC = gel consistency (mm)

* Mean value from all 51 selected introgression lines

นับว่าค่อนข้างต่ำถ้าเปรียบเทียบกับค่าที่ควรจะเป็นตามทฤษฎีการผสมกลับครั้งที่ 3 คือ ร้อยละ 93.8 อย่างไรก็ตามพบว่าบางสายพันธุ์มีอัลลีลเหมือนขาวดอกมะลิ 105 ถึงร้อยละ 91.2 และถึงแม้ว่าประชากรข้าวที่ใช้ทดสอบจะเป็นชั่วที่ 6 (BC_3F_6) แต่ก็ยังพบว่าค่าเฉลี่ยของ heterozygous ของสายพันธุ์คัดเลือกเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 3.2 (Table 7)

สรุปผลการทดลอง

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และมีคุณภาพทางกายภาพและคุณภาพการหุงต้มและการรับประทานดี เป็นเป้าหมายสำคัญของโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าว การศึกษาครั้งนี้ได้ค้นพบตำแหน่งของยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Bph3* ซึ่งอยู่ระหว่างโมเลกุลเครื่องหมาย RM588 และ RM589 บนโครโมโซม 6 นอกจากนี้ยังได้พัฒนาสายพันธุ์ข้าวที่มีคุณภาพการหุงต้มและการรับประทานดี และต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยการผสมผสานระหว่างการคัดเลือกลักษณะความต้านทานในโรงเรือนและการใช้โมเลกุลเครื่องหมาย คัดเลือกได้สายพันธุ์ข้าวจำนวน 51 สายพันธุ์ ที่มีคุณภาพทางกายภาพและการหุงต้มและการรับประทานคล้ายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และต้านทานต่อประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่พบในประเทศไทย สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมความต้านทาน และคุณภาพเมล็ดดีในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าว และสามารถพัฒนาเป็นพันธุ์ต้านทานปลูกในพื้นที่ปลูกข้าวขาวดอกมะลิ 105 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ที่เสี่ยงต่อการระบาดทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและเพลี้ยกระโดดหลังขาว

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้อยู่ภายใต้โครงการการพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ซึ่งได้รับงบประมาณจากรัฐบาลไทย และมูลนิธิร็อคกี้เฟลเลอร์ ขอขอบคุณ คุณเจตน์ คชฤกษ์ ที่มีส่วนช่วยในการทดสอบความต้านทานของสายพันธุ์ข้าวต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล คุณ Myint Yi ที่ช่วยวิเคราะห์ GC และขอขอบคุณ ดร.ธีรยุทธ ตู้จินดา ดร.พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ ดร.วราพงษ์ ชมาฤกษ์ และดร.พยอม โคเบลลี่ ที่ให้คำแนะนำในการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Alam, S.N. and M.B. Cohen. 1998. Detection and analysis of QTLs for resistance to the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, in a doubled-haploid rice population. Theor. Appl. Genet. 97 : 1370-1379.

Bureau of Rice Research and Development

Amarawathi, Y., R. Singh, A.K. Singh, V.P. Singh, T. Mohapatra, T.R. Sharma and N.K. Singh. 2008. Mapping of quantitative trait loci for basmati quality traits in rice *(Oryza sativa* L.). Mol. Breed. 21 : 49-65.

Angeles, E.R., G.S. Khush and E.A. Heinrichs. 1986. Inheritance of resistance to planthoppers and leafhopper in rice. pp. 537-549. *In* : International Rice Research Institute, (ed.), Rice Genetics. Los Baños, Philippines.

Chen, D.H. and P.C. Ronald. 1999. A rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR applications. Plant Mol. Biol. Rep. 17 : 53-57.

Dyck, V.A. and B. Thomas. 1979. The brown planthopper problem, pp. 3-17. *In :* International Rice Research Institute, (ed.), Brown Planthopper: Threat to Rice Production in Asia. IRRI, Los Baños, Philippines.

He, Y., Y. Han, L. Jiang, C. Xu, J. Lu and M. Xu. 2006. Functional analysis of starch-synthesis genes in determining rice eating and cooking qualities. Mol. Breed. 18 : 277-290.

Ikeda, R. and C. Kaneda. 1981. Genetic analysis of resistance to brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål, in rice. Jpn. J. Breed. 31 : 279-285.

Isshiki, M., K. Morino, M. Nakajima, R.J. Okagaki, S.R. Wessler, T. Izawa and K. Shimamoto. 1998. A naturally occurring functional allele of the rice waxy locus has a GT to TT mutation at the 5' splice site of the first intron. The Plant J. 15 : 133-138.

Jairin, J. 2008. High-resolution Mapping of a Brown Planthopper (BPH) Resistance Gene, *Bph3*, and Marker-assisted Selection for BPH Resistance in Rice. Ph.D. thesis, Kasetsart University.

Jairin, J., T. Toojinda, S. Tragoonrung, S. Tayapat and A. Vanavichit. 2005. Multiple genes determining brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance in backcross introgressed lines of Thai jasmine rice 'KDML105'. Sci. Asia. 31 : 129-135.

Jairin, J., K. Phengrat, S. Teangdeerith, A. Vanavichit and T. Toojinda. 2007a. Mapping of a broad-spectrum brown planthopper resistance gene, *Bph3*, on rice chromosome 6. Mol. Breed. 19 : 35-44.

Jairin, J., S. Teangdeerith, P. Leelagud, K. Phengrat, A. Vanavichit and T. Toojinda. 2007b. Physical mapping of *Bph3*, a brown planthopper resistance locus in rice. Mj. Int. J. Sci. Tech. 1 : 166-177.

Jairin, J., S. Teangdeerith, P. Leelagud, J. Kothcharerk, K. Sansen, M. Yi, A. Vanavichit and T. Toojinda. 2009. Development of rice introgression lines with brown planthopper resistance and KDML105 grain quality characteristics through marker-assisted selection. Field Crop Res. 110 : 263-271.

Kawaguchi, M., K. Mulata, T. Ishii, S. Takumi, N. Mori and C. Nakamura. 2001. Assigment of a brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) resistance gene *bph4* to the rice chromosome 6. Breed. Sci. 51 : 13-18.

Khush, G.S. 1984. Breeding rice for resistance to insects. Protect. Eco. 7 : 147-165.

Kosambi, D.D. 1944. The estimation of map distance from recombination values. Ann. Eugen. 12 : 172-175.

Lakshminarayana, A. and G.S. Khush. 1977. New genes for resistance to the brown planthopper in rice. Crop Sci. 17 : 96-100.

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 Res. 7 : 93-101.

Li, R.B., X.Y. Qin, S.M. Wei, F.K. Huang, Q. Li and S.Y. Luo. 2002. Identification and genetics of resistance against brown planthopper in a derivative of wild rice, *Oryza rufipogon* Griff. J. Genet. Breed. 56 : 29-36.

McCouch, S.R., X. Chen, O. Panaid, S. Temnykh, Y. Xu, Y.G. Cho, N. Huang, T. Ishii and M. Blair. 1997. Microsatellite marker development, mapping and application in rice genetics and breeding. Plant Mol. Biol. 35 : 89-99.

McCouch, S.R., L. Teytelman, Y. Xu, K.B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xing,

Bureau of Rice Research and Development

Q. Zhang, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. DeClerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware and L. Stein. 2002. Development and mapping of 2,240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). DNA Res. 9 : 199-207.

Pathak, M.D. and Z.R. Khan. 1994. Insect pests of rice. Inter. Rice Res. Ins. and Inter. Cen. Insect Phys. Eco. pp. 22-24.

Pongprasert, S. and P. Weerapat. 1979. Varietal resistance to the brown planthopper in Thailand. pp. 273-283. *In* : International Rice Research Institute (ed.), Brown planthopper : Threat to rice production in Asia. IRRI, Los Banos, Philippines.

Ramesh, M., and K. Murugan. 1996. Biochemical changes in paddy plants infested with *Nilaparvata lugens*. Insect Envi. 2 : 91-92.

Sano, Y., M. Katsumata and K. Okuno. 1986. Genetic studies of speciation in cultivated rice. 5. Inter- and intra-specific differentiation in the wx gene expression of rice. Euphytica 35 : 1-9.

Sidhu, G.S. and G.S. Khush. 1979. Linkage relationships of some genes for disease and insect resistance and semidwarf stature in rice. Euphytica 28 : 233-237.

Sogawa, K. 1982. The rice brown planthopper: feeding physiology and host plant interactions. Ann. Rev. Entomol. 27 : 49-73.

Soundararajan, R.P., P. Kadirvel, K. Gunathilagaraj and M. Maheswaran. 2004. Mapping of quantitative trait loci associated with resistance to brown planthopper in rice by means of a doubled haploid population. Crop Sci. 44 : 2214-2220.

Su, C., H. Zhai, X. Cheng and J. Wan. 2002. Detection and analysis of QTLs for resistance to brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål), in rice (*Oryza sativa* L.), using backcross inbred lines. Acta Gentica Sinica. 29 : 332-338.

Sun, L., C. Su, C. Wang, H. Zhai and J. Wan. 2005. Mapping of a major resistance gene to the brown planthopper in the rice cultivar Rathu Heenati. Breed. Sci. 55 : 391-396.

Van Ooijen, J.W. 2004. MapQTL®5, Software for the Mapping of Quantitative Trait Loci in Experimental Populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands.

Van Ooijen, J.W. and R.E. Voorrips. 2001. JoinMap®3.0, Software for the Calculation of Genetic Linkage Maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.

Velusamy, R., M. Ganesh Kumar and Y.S. Johnson Thangaraj Edward. 1995. Mechanisms of resistance to brown planthopper, *Nilaparvata lugens* in wild rice (*Oryza* spp.) cultivars. Entomol. Exp. Appl. 74 : 245-251.

Wanchana, S., W. Kamolsukyunyong, S. Ruengphayak, T. Toojinda, S. Tragoonrung and A. Vanavichita. 2005. A Rapid construction of a physical contig across a 4.5 cM region for rice grain aroma facilitates marker enrichment for positional cloning. Sci. Asia 31 : 299-306.

Wang, Z.Y., Q. Zheng, G.Z. Shen, J.P. Gao, D.P. Snustad, M.G. Li, J.L. Zhang and M.M. Hong. 1995. The amylose content in rice endosperm is related to the post-transcriptional regulation of the waxy gene. Plant J. 7 : 613-622.

Watanabe, T. and H. Kitagawa. 2000. Photosynthesis and translocation of assimilates in rice plants following phloem feeding by the planthopper *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). J. Econ. Entomol. 93 : 1192-1198.

Xu, X.F, H.W. Mei, L.J. Luo, X.N. Cheng and Z.K. Li. 2002. RFLP-facilitated investigation of the quantitative resistance of rice to brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). Theor. Appl. Genet. 104 : 248-253.

Yan, H.M., R. Qin, W.W. Jin, G.C. He and Y.C. Song. 2002. Comparative physical mapping of *Bph3* with BAC-FISH in *Oryza officinalis* and *O. sativa.* Acta Botanica Sinica. 44 : 583-587.

Zhang, Q. 2007. Strategies for developing green super rice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104 : 16402-16409.

Bureau of Rice Research and Development