

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือกลักษณะความหอมและปริมาณอะมิโลสต่ำ
ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวแบบบันทึกประวัติ

Marker Assisted Selection for Aroma and Low Amylose Content Traits in
Pedigree Breeding of Rice (*Oryza sativa* L.)

จันทร์จิรา โรหิตเสถียร (Janjira Rohitsatien)* ธาณี ศรีวงศ์ชัย (Tanee Sreewongchai)**

ประภา ศรีพิจิตต์ (Prapa Sripichitt)*** รังสฤษดิ์ กาวีตะ (Rungsarid Kaveeta)***

บทคัดย่อ

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อคุณภาพการหุงต้มที่ดีเป็นหนึ่งในเป้าหมายของการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไทย การวิจัยนี้ได้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro และ RM190 ที่เฉพาะกับลักษณะความหอมและปริมาณอะมิโลสที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 8 และ 6 ของข้าวตามลำดับ มาใช้ช่วยในการคัดเลือกลักษณะทั้ง 2 ในประชากรชั่วที่ 2 จำนวน 600 ต้นจากคู่ผสมระหว่างพันธุ์ปทุมธานี 1 (PTT1) ที่มีคุณภาพหุงต้มดี กับพันธุ์ CH4 ที่มีศักยภาพการให้ผลผลิตสูง มีการคัดเลือกแบบทีละลักษณะในประชากรดังกล่าว โดยคัดเลือกต้นที่มีพันธุกรรมแบบคงตัวในลักษณะความหอมได้จำนวน 151 ต้น จากนั้นคัดเลือกต้นที่มีพันธุกรรมคงตัวของปริมาณอะมิโลสต่ำเช่นเดียวกับพันธุ์ปทุมธานี 1 ได้ต้นที่มีพันธุกรรมที่ต้องการทั้ง 2 แบบทั้งหมด 32 ต้น ซึ่งจะได้นำไปใช้ในขั้นตอนต่อไปของการปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้มีการใช้เทคนิคการห้วงเวลาโหลดตัวอย่างในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดกรองต้นที่ต้องการ

ABSTRACT

Rice breeding for cooking qualities trait is one of the main objectives in Thai rice breeding program. Naro and RM190 markers specific to grain aroma and amylase content locating on chromosome 8 and 6 respectively. Total 600 individual plant of F_2 population of cross between PTT1 with good cooking quality variety and CH4 with high yield potential were selected individual by these DNA makers. Stepwise screening was performed and total of 151 F_2 progenies carrying homozygous allele of Naro marker was selected. Then, RM190 was used to selected low amylose content, resulting 32 F_2 progenies carrying homozygous alleles for grain aroma and low amylose content as PTT1 variety were select for the next step of breeding program. Moreover, the delay loading technique in electrophoresis was performed in order to enhance the genotype screening efficiency.

คำสำคัญ: คุณภาพหุงต้ม การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก การปรับปรุงพันธุ์แบบบันทึกประวัติ

Key words: Cooking quality, Markers assisted selection (MAS), Pedigree breeding

* นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืช ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

*** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทนำ

ข้าวเป็นพืชอาหารหลักสำหรับประชากรกว่าครึ่งหนึ่งของโลก พื้นที่การผลิตข้าวกว่าร้อยละ 90 อยู่ในทวีปเอเชีย โดยประเทศไทยถือเป็นประเทศที่มีการผลิตและส่งออกข้าวเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก คุณภาพการหุงต้มและรับประทานของข้าวเป็นคุณภาพที่ผู้บริโภคใช้ในการตัดสินใจเลือกซื้อข้าว ทั้งนี้เพราะความชอบของแต่ละคนแตกต่างกัน คุณสมบัติทางเคมีของข้าวขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวและคุณภาพแป้ง (Juliano, 1985) คุณภาพการหุงต้มและรับประทานนี้สามารถคาดคะเนโดยคุณสมบัติเมล็ดทางเคมี ปัจจัยที่ทำให้ข้าวพันธุ์ต่าง ๆ มีคุณภาพของข้าวสุกแตกต่างกันขึ้นกับองค์ประกอบดังนี้ ได้แก่ ปริมาณอะมิโลส ความคงตัวของแป้งสุก อุณหภูมิแป้งสุก อัตราการยืดตัวของเมล็ดข้าวสุก และกลิ่นหอม ในเมล็ดข้าวประกอบด้วยแป้ง 2 ชนิดคืออะมิโลสและอะมิโลเพคติน (Sanjiva et al., 1952) อัตราส่วนของอะมิโลสและอะมิโลเพคตินเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ข้าวมีคุณสมบัติแตกต่างกันโดยในเมล็ดข้าวมีอะมิโลเพคตินในอัตราส่วนที่มากกว่าอะมิโลส แต่การจำแนกประเภทของข้าวนั้นจะใช้ปริมาณอะมิโลสเป็นตัวชี้วัด ซึ่งสัดส่วนของอะมิโลสในเมล็ดข้าวที่ต่างกันมีผลต่อลักษณะของข้าวสุกที่ต่างกัน กลิ่นหอมเป็นลักษณะพิเศษของข้าวบางพันธุ์ ซึ่งเป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศ ข้าวหอมสามารถผลิตสารหอมชนิดที่เรียกว่า popcorn-like scent เก็บสะสมไว้ในส่วนต่าง ๆ ของต้น โดยเฉพาะเมล็ด ซึ่งกลิ่นของข้าวหอมนั้นเกี่ยวข้องกับสารระเหยกว่า 114 ชนิด โดยสารสำคัญที่ทำให้ข้าวมีกลิ่นหอมคือ 2-acetyl-1-pyrroline หรือ 2AP (Buttery et al., 1983)

จุดประสงค์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวมีหลายประการ เช่น การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคและแมลง การปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิต การปรับปรุงพันธุ์เพื่อคุณภาพการหุงต้มและรับประทาน เป็นต้น โดยวิธีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่นิยมคือการปรับปรุงพันธุ์แบบบันทึกประวัติซึ่งจะคัดเลือกต้นพืช

ที่มีลักษณะตรงตามวัตถุประสงค์ของโครงการจากประชากรในช่วงที่ 2 ที่พิจารณาการกระจายตัวของลักษณะต่าง ๆ สูงสุดและนำต้นที่คัดเลือกไปปลูกในช่วงต่อไปจนกว่าพืชจะมีความคงตัวทางพันธุกรรม (homozygosity) (กฤษฎา, 2551) ตัวอย่างเช่น การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความหอมและคุณภาพการหุงต้มและรับประทานได้แก่พันธุ์ข้าวปทุมธานี 1 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์ข้าวหอม BKN6-18-3-2 กับสายพันธุ์ PTT85061-86-3-2-1 ปลูกคัดเลือกข้าวลูกผสมช่วงที่ 2 ถึง 6 โดยวิธีคัดเลือกแบบบันทึกประวัติจนได้สายพันธุ์ PTT90071-93-8-1-1 เป็นข้าวเจ้าหอม ไม้ไผ่ต่อช่วงแสง คุณภาพการหุงต้มและรับประทานคล้ายข้าวขาวดอกมะลิ 105 (สถาบันวิจัยข้าว, 2543)

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection, MAS) เพื่อเลือกต้นพืชที่มีจีโนไทป์ที่ต้องการ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่นำมาใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการคัดเลือก สามารถจำแนกได้ 2 แบบคือการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนเป้าหมายช่วยในการคัดเลือก (indirect MAS; iMAS) และการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับส่วนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีน (direct MAS; dMAS หรือ functional marker assisted selection; fMAS) ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด fMAS นั้นจะมีความแม่นยำในการคัดเลือกมากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด iMAS เนื่องจากเป็นการพัฒนามาจากส่วนของยีนที่ทำหน้าที่กำหนดรหัสพันธุกรรมที่ควบคุมการทำงานของลักษณะเป้าหมายที่ต้องการมาเป็นเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก การนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการคัดเลือก โดยการเพิ่มความแม่นยำ และระยะเวลาของการปรับปรุงพันธุ์พืช (Collard et al., 2005)

พันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะความหอมและปริมาณอะมิโลสในข้าวถูกควบคุมด้วยยีนแฝง (recessive gene) ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ช่วยในการคัดเลือก

ลักษณะความหอมคือ Naro เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะกับการทำหน้าที่ของยีนความหอมในข้าวซึ่งคล่อมตำแหน่งที่ขาดหายไปของเบสจำนวน 8 เบสที่ exon7 ของยีน betaine aldehyde dehydrogenase (*Badh*) บนโครโมโซมที่ 8 เป็นเครื่องหมายแบบ co-dominance (ปาริฉัตร และคณะ, 2554) เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM190 เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite marker) ที่ปรากฏอยู่ในส่วนกำหนดรหัสของพันธุกรรมของยีน waxy ที่ควบคุมลักษณะปริมาณอะมิโลสในเมล็ดข้าว ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน waxy หรือยีน granule-bound starch synthase (GBSS) ตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลต์ดังกล่าวคือลำดับเบสซ้ำของ CT(n) เครื่องหมายดีเอ็นเอนี้จึงสามารถใช้สำหรับติดตามการปรากฏของอัลลีลยีน waxy ที่ต้องการได้ในการคัดเลือก (Ayres et al., 1997)

วัตถุประสงค์การวิจัย

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือกลักษณะความหอมและปริมาณอะมิโลสต่ำ และการพัฒนารูปแบบการคัดกรองตัวอย่างเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีลักษณะที่ต้องการในประชากรชั่วที่ 2 ของกลุ่มผสมระหว่างพันธุ์ทุมธานี 1 และ CH4

วิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. พันธุ์ข้าว

1.1. ข้าวพันธุ์ทุมธานี 1 เป็นข้าวเจ้าหอม ไร่ไวต่อช่วงแสง คุณภาพเมล็ดคล้ายพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ข้าวสุกนุ่มเหนียวมีกลิ่นหอม

1.2. ข้าวพันธุ์ CH4 เป็นข้าวเจ้าไม่หอมมีรูปทรงต้นแบบใหม่ (new plant type: NPT) ที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก แตกกอน้อย ทรงต้นตั้งตรง และให้ผลผลิตสูง

2. เครื่องหมายดีเอ็นเอ

2.1 เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro และ RM190

วิธีการ

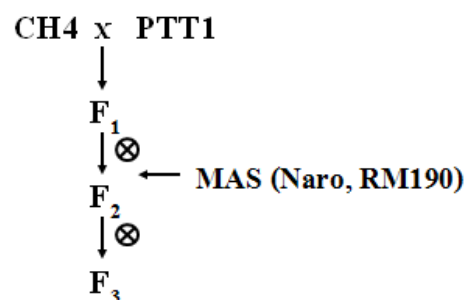
1. การผสมข้าวเพื่อสร้างประชากร

ปลูกข้าวพันธุ์พ่อ พันธุ์ปทุมธานี 1 และปลูกข้าวพันธุ์แม่ พันธุ์ CH4 เพื่อสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 แล้วสร้างเป็นประชากรชั่วที่ 2 โดยปล่อยให้มีการผสมตัวเอง นำประชากรชั่วที่ 2 ทั้งหมดมาปลูกแบบเร่งชั่วอายุ (Rapid Generation Advance: RGA) เพื่อคัดเลือกต้นที่ต้องการ ปลูกในกระบะเพาะโดยปลูกหลุมละ 1 ต้น ใช้ระยะเวลาในการปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวประมาณ 90 วัน จำนวน 600 ต้น และคัดเลือกต้นที่ต้องการ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro และ RM190

แผนผังการปรับปรุงพันธุ์

2. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือก

ตรวจสอบความแตกต่างของเครื่องหมายดีเอ็นเอ



เอ Naro (NaroF; 5/-AGGTTGCATTTACTGGGA G-3/ และ NaroR; 5/-TGGCTACTAGAATGATGCT-3/) และ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM190 (RM190F; 5/-GCTACAAATAGCCACCCACACC-3/ และ RM190R; 5/-CAACACAAGCAGAGAAGTGAAGC-3/) ในพันธุ์พ่อแม่ และใช้คัดเลือกในประชากรชั่วที่ 2 ทั้ง 600 ตัวอย่างโดยใช้เทคนิคการห้วงเวลาโหลดตัวอย่าง (delay loading) และวิธีการ stepwise marker screening (Sreewongchai et al., 2010) ในเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 2 โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Phire® Plant Direct PCR Kit ซึ่งเป็นชุด Kit ที่สามารถทำ PCR ได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอก่อนโดยเจาะใบข้าวด้วย

Harris UNI-CORE™ จะได้เนื้อเยื่อรูปร่างกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร (จำนวน 5 ชิ้น) ใส่ลงใน PCR plate เตรียมส่วนผสมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR (master mixture) โดยต้องเตรียมปริมาตรรวมทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ดังตารางที่ 1 เมื่อผสม master mixture ในหลอด PCR เรียบร้อยแล้วหยด mineral oil 1 หยด เพื่อป้องกันการระเหยออกระหว่างการทำ PCR นำหลอด PCR ใส่ลงในเครื่อง PCR (thermal cycler) ตั้งโปรแกรมตามเงื่อนไขดังตารางที่ 2 เมื่อปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเสร็จสิ้น นำหลอด PCR ออกจากเครื่องแล้วเติม sequencing dye 1 เท่า (10 ไมโครลิตร) จากนั้นเก็บไว้ที่ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี Polyacrylamide Gel

Electrophoresis (PAGE) ย้อมเจลดด้วย silver nitrate (AgNO_3) ตามวิธีการของ Benbouza et al. (2006)

ในการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือก ลักษณะความหอมจะใช้เทคนิคการห้วงเวลาไหลด้อย่าง (delay loading) ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสใช้หัวขนาด 50 ช่อง เมื่อหยอดตัวอย่าง PCR product 4 ไมโครลิตรในแต่ละช่องจนครบ เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าใช้กำลังไฟที่ 45 วัตต์ เมื่อแถบสีของ dye เคลื่อนลงมาได้ระยะ 5 เซนติเมตร จึงหยอดตัวอย่าง PCR product ชุดที่ 2 ลงในแต่ละช่อง ทำเช่นเดียวกันนี้ 4-6 ชั้น หลังจากนั้นจึงหิวออก ปลดกระแสไฟต่อ เมื่อแถบสีของ dye ชั้นที่ 1 ลงมาได้ระยะ 30 เซนติเมตรจึงปิดเครื่องและย้อมสีแถบดีเอ็นเอ

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นและปริมาตรสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

สารละลาย	ความเข้มข้นที่ใช้	ปริมาณที่ใช้ (μl)
2x plant PCR buffer	1x	5
5μmol forward primer	0.5 μmol	1
5μmol reverse primer	0.5 μmol	1
Phire [®] Hot Start DNA polymerase	-	0.2
Sterile distilled H ₂ O	-	2.8
Total	-	10

ตารางที่ 2 เงื่อนไขในการตั้งค่าของปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (วินาที)
First denature	98	300
Denature	98	5
Annealing	59	5
Extension	72	30
Final extension	72	60
Hold	16	∞

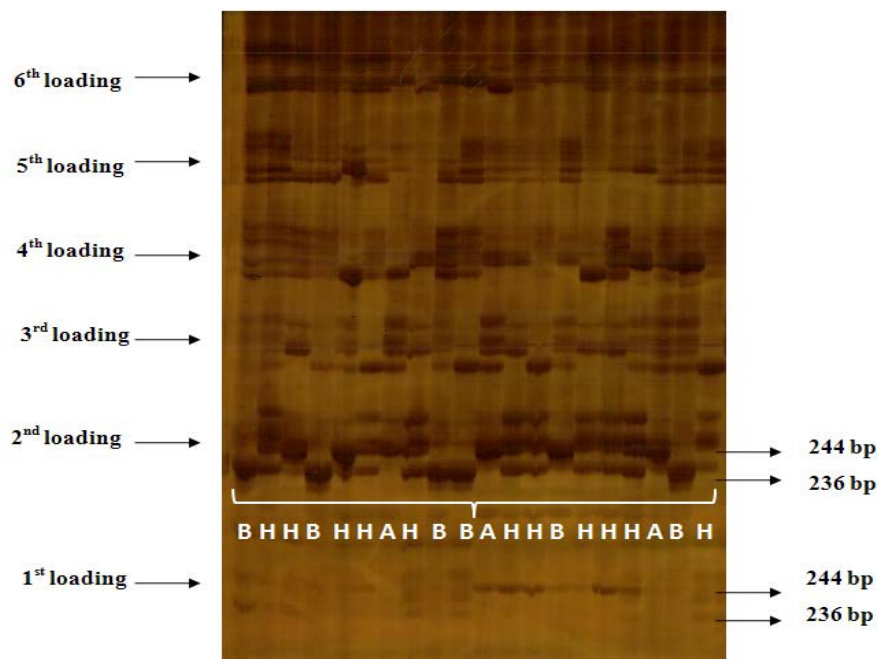
การคัดเลือกสายต้นดำเนินการแบบ stepwise marker screening ประชากรชั่วที่ 2 คัดเลือกด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro ได้ต้นที่มีลักษณะความหอมหลังจากนั้นนำต้นที่คัดเลือกได้มาคัดเลือกลักษณะปริมาณอะมิโลสด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM190 ต่อไป

ผลการวิจัย

จากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro และ RM190 จำแนกลักษณะความหอมและลักษณะปริมาณอะมิโลสตามลำดับ ในพันธุ์พ่อคือพันธุ์ปทุมธานี 1 และพันธุ์แม่พันธุ์ CH4 เครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งสองสามารถแยกความแตกต่างในพันธุ์พ่อและแม่ได้

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือกลักษณะความหอมและลักษณะปริมาณอะมิโลสในประชากรชั่วที่ 2 จากประชากรทั้งหมด 600 ต้นเริ่มจากใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro คัดเลือกต้นที่มีพันธุกรรมแบบ

คงตัวในลักษณะความหอมหลังจากการทำ PCR แล้วนำมาแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้เทคนิคการห้วงเวลาโหลดตัวอย่าง (delay loading) ดังภาพที่ 1 พบว่า มีการกระจายตัวของจีโนไทป์ของพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะความหอมในอัตราส่วน 1:2:1 สำหรับพันธุกรรมแบบ *Badh/Badh*: *Badh/badh*: *badh/badh* โดยสามารถคัดเลือกลำต้นที่ต้องการได้จำนวน 151 ต้น จากนั้นนำต้นที่คัดเลือกได้ไปคัดเลือกลำต้นที่มีพันธุกรรมแบบคงตัวของปริมาณอะมิโลสต่ำเช่นเดียวกับพันธุ์ปทุมธานี 1 พบว่ามีการกระจายตัวของจีโนไทป์ของพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะปริมาณอะมิโลสในอัตราส่วน 1:2:1 สำหรับพันธุกรรมแบบ *Waxy/Waxy* : *Waxy/waxy* : *waxy/waxy* โดยสามารถคัดเลือกลำต้นที่ต้องการได้ 32 ต้นดังตารางที่ 3



ภาพที่ 1 เทคนิคการห้วงเวลาโหลดตัวอย่าง (delay loading) ในเครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro เพื่อคัดเลือกลักษณะความหอม
 หมายถึง: A คือ ลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนพันธุ์แม่ (CH4: *Badh/Badh*); B คือลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนพันธุ์พ่อ (PTT1: *badh/badh*); H คือลักษณะทางพันธุกรรมแบบเฮเทอโรไซกัส (*Badh/badh*)

ตารางที่ 3 แสดงผลการคัดเลือกในแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งสองลักษณะในประชากรชั่วที่ 2

จีโนไทป์	จำนวนต้นที่คัดเลือก (ต้น)	
	ลักษณะความหอม (Naro)	ลักษณะปริมาณอะมิโลส (RM190)
Homozygous dominant	141 (<i>Badh/Badh</i>)	33 (<i>Waxy/Waxy</i>)
Heterozygous	308 (<i>Badh/badh</i>)	86 (<i>Waxy/waxy</i>)
Homozygous recessive	151 (<i>badh/badh</i>)	32 (<i>waxy/waxy</i>)
Total	600	151
$\chi^2_{(1:2:1)}$ test	0.76 ^{ns}	3.22 ^{ns}

หมายเหตุ : ^{ns} คือไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถนำมาใช้ช่วยคัดเลือกต้นที่มีพันธุกรรมที่ต้องการจากประชากรชั่วที่ 2 ได้ โดยสามารถเลือกต้นที่มีพันธุกรรมทั้งความหอมและปริมาณอะมิโลสต่ำเช่นเดียวกับพันธุ์ปทุมธานี 1 ได้ ดังนั้นการคัดเลือกลักษณะดังกล่าวในรุ่นต่อไปไม่จำเป็นต้องคัดเลือกเนื่องจากได้มีการเลือกต้นที่มีพันธุกรรมคงตัวของลักษณะที่ต้องการไว้แล้ว เช่นเดียวกับรายงานของ (Collard et al., 2005) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ ปาริฉัตร (2555) ที่มีในการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอคัดเลือกลักษณะปริมาณอะมิโลสและความหอมในประชากรชั่วที่ 2 และ 3 จากการผสมข้ามระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่เป็นข้าวคุณภาพดีกับพันธุ์ Qiqinzhai ที่มีลักษณะรูปทรงต้นข้าวแบบใหม่ (จำนวนเมล็ดต่อรวงมาก แดกก่อนนึ่ง ทรงต้นตั้งตรง และให้ผลผลิตสูง) สามารถคัดเลือกต้นที่มีพันธุกรรมคงตัวของปริมาณอะมิโลสและความหอมได้ โดยลักษณะดังกล่าวไม่มีการกระจายในรุ่นต่อไปเนื่องจากทั้งสองลักษณะถูกควบคุมด้วยยีนแฝง

เทคนิคการคัดเลือกแบบ Stepwise marker screening เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นเพื่อคัดกรองจำนวนประชากรให้ลดลงในแต่ละครั้งของการคัดเลือกก่อนนำต้นที่ได้ไปคัดเลือกต่อในครั้งต่อไปซึ่ง Sreewongchai

et al. (2010) ได้ใช้เทคนิค stepwise ช่วยในการรวมยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือกในชั่วที่ 2 จากประชากรจำนวน 282 ต้น เนื่องจากประชากรที่ได้มีขนาดเล็กจึงต้องมีการคัดเลือกต้นที่มีจีโนไทป์ heterozygous ไว้และนำมาผสมตัวเองให้เกิดการกระจายตัวในลักษณะเป้าหมายคือต้านทานโรคไหม้แล้วจึงคัดเลือกลักษณะเป้าหมายที่มีพันธุกรรมแบบคงตัวในประชากรชั่วที่ 3 ต่อไปเพื่อให้ได้จีโนไทป์แบบ homozygous อย่างไรก็ตามเนื่องจากการทดลองนี้มีประชากรชั่วที่ 2 ขนาดใหญ่จำนวน 600 ต้นจึงสามารถใช้เทคนิค stepwise marker ช่วยในการคัดเลือกได้ภายในประชากรชั่วเดียว นอกจากนี้เทคนิค stepwise screening เป็นเทคนิคที่ประหยัดค่าใช้จ่ายในการทดลองและลดจำนวนตัวอย่างในการทำ PCR ลงได้ถึง 38 % ซึ่งหากใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอคัดเลือกลักษณะ 2 ลักษณะโดยวิธีปกติจะต้องทำปฏิกิริยา PCR ทั้งสิ้น 1,200 ตัวอย่าง หากใช้เทคนิค stepwise screening จะคงเหลือตัวอย่างที่ต้องทำปฏิกิริยา PCR เพียง 751 ตัวอย่าง (600 + 151 ตัวอย่าง) ซึ่งสามารถลดจำนวนตัวอย่างลงไปได้ถึง 449 ตัวอย่าง (จาก 600 ต้นในการคัดเลือกลักษณะความหอม สามารถคัดเลือกได้จำนวน 151 ต้นหลังจากนั้นจึงนำ 151 ต้นที่เลือกได้มาคัดเลือกลักษณะปริมาณอะมิโลส)

ในการทำงานวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาเทคนิคการห้วงเวลาโหลดตัวอย่าง (delay loading) เพื่อประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธี Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) โดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างต่อการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยหยอดตัวอย่างเป็นชั้นห่างกันเป็นช่วงซึ่งข้อจำกัดของเทคนิคนี้สามารถใช้ได้ดีกับเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนไม่เช่นนั้นจะเกิดความสับสนในการอ่านแถบดีเอ็นเอ

กิตติกรรมประกาศ

การดำเนินงานวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยดำเนินการภายใต้แผนการดำเนินงานโครงการการปรับปรุงพันธุ์ข้าวลูกผสมเพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพสำหรับการแปรรูปเชิงอุตสาหกรรมที่ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

เอกสารอ้างอิง

- กฤษฎา สัมพันธ์รักษ์. (2551). ปรับปรุงพันธุ์พืช: พื้นฐานวิธีการและแนวคิด. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ปาริฉัตร รัตนผล, ประภา ศรีพิจิตต์ และ ธาณี ศรีวงศ์ชัย. (2554). การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับการทำหน้าที่ของยีนความหอมในข้าว. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปาริฉัตร รัตนผล. 2555. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสงผลผลิตสูงและเมล็ดมีคุณภาพดีโดยวิธีบันทึกประวัติร่วมกับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่) สาขาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สถาบันวิจัยข้าว. (2543). ข้าวเจ้าหอมปทุมธานี 1. ฝ่ายถ่ายทอดเทคโนโลยีสถาบันวิจัยข้าวกรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

- Ayres, NM., McClung, AM., Larkin, PD., Bligh, HFJ., Jones, CA., and Park, WD. 1997. icrosatellites and a single-nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germ plasm. Theor. Appl. Genet. (94): 773-781.
- Benbouza, H., Jacquemin, JM., Baudoin, JP., and Mergeai, G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 10 (2): 77-81.
- Buttery, RG., Ling, LC., Juliano, BO., and Turnbaugh, JG. 1983. Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. J. Agric. Food Chem. 31: 823-826.
- Collard, BCY., Jahufer, MZZ., Brouwer, JB., and Pang, ECK. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica. 142: 169-196.
- Juliano, BO. 1985. Criteria and tests for rice grain qualities, pp. 443-524. In B.O. Juliano (Eds.). Rice Chemistry and Technology. The American Association of Cereal Chemists, St. Paul.
- Sanjiva, RB., Vasudeva, AR., and Subrahmanya, RS. 1952. The amylose and amylopectin content of rice and their influence on the cooking quality of cereals. Proc. Indian Acad. Sci. 368: 70-80.
- Sreewongchai, T., Toojinda, T., Thanintorn, N., Kosawang, C., Vanavichit, A., Tharreau, D., and Sirithunya, P. 2010. Development of elite indica rice lines with wide spectrum of resistance to Thai blast isolates by pyramiding multiple resistance QTLs. Plant Breed. 129: 176-180.