

การพัฒนาข้าวเหนียวหอมให้ต้านทานต่อแมลงบั่ว โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ
ช่วยในการคัดเลือก



มาริสา อิ่มเพ็ง

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร

พฤษภาคม 2568

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

การพัฒนาข้าวเหนียวหอมให้ต้านทานต่อแมลงบั่ว โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ
ช่วยในการคัดเลือก



มาริสา อิ่มเพ็ง

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร

พฤษภาคม 2568

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

DEVELOPMENT OF AROMATIC GLUTINOUS RICE WITH RESISTANCE TO GALL MIDGE
USING DNA MARKER-ASSISTED SELECTION



MARISA IMPENG

A Thesis Submitted to University of Phayao
in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Master of Science Degree in Agricultural Science
May 2025

Copyright 2025 by University of Phayao

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาข้าวเหนียวหอมให้ต้านทานต่อแมลงบั่ว โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ
ช่วยในการคัดเลือก

ของ มาริสา อิมเพ็ง

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร

ของมหาวิทยาลัยพะเยา

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ดร. จีรพงศ์ ใจรินทร์)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไวยจน์ กันจู)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุญฤทธิ์ สิ้นค้างาม)

..... อาจารย์บัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยพะเยา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาวิณี จันทร์วิจิตร)

..... คณบดีคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิพรพรรณ เนืองเม็ก)

- เรื่อง:** การพัฒนาข้าวเหนียวหอมให้ต้านทานต่อแมลงบั่ว โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก
- ผู้วิจัย:** มาริสา อิมเพ็ง, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (วิทยาศาสตร์การเกษตร), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2567
- อาจารย์ที่ปรึกษา:** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไวกัญ กัญญา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญฤทธิ์ ลินคำงาม
- คำสำคัญ:** ความต้านทานต่อแมลงบั่ว, ข้าวเหนียว, การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม, เครื่องหมายดีเอ็นเอ

บทคัดย่อ

แมลงบั่ว (*Orseolia oryzae*; rice gall midge) เป็นแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญ ทำให้ต้นข้าวเกิดหลอดบั่วและไม่ออกรวง ทำให้ผลผลิตข้าวลดลง การใช้พันธุ์ต้านทานนับเป็นแนวทางหนึ่งที่ป้องกันความเสียหายได้ งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อศึกษาพันธุกรรมความต้านทานต่อแมลงบั่วในข้าวพันธุ์ปลูก กข22 เปรียบเทียบกับข้าวพื้นเมืองเหมยนอง 62 เอ็ม และใช้ กข22 เป็นพันธุ์ให้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวพันธุ์อื่นให้ต้านทานต่อแมลงบั่ว จากการทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วในประชากรข้าวชั่วที่ F₂ จำนวน 2 ประชากร ที่เกิดจากคู่ผสมระหว่าง PYO16-001-3-24B กับเหมยนอง 62 เอ็ม และ PYO16-001-3-24B กับ กข22 ในสภาพโรงเรือน โดยใช้ประชากรแมลงบั่วจากจังหวัดแพร่ จากการวิเคราะห์อัตราส่วนทางพันธุกรรมด้วยวิธีการทดสอบไคสแควร์ พบว่า เหมยนอง 62 เอ็มและ กข22 มียีนที่ควบคุมลักษณะต้านทาน จำนวน 2 ยีน และมีปฏิกิริยาการข้ามของยีนต่างตำแหน่งแบบดิวลิปเกท รีเซสสียีน (duplicate recessive gene) เมื่อตรวจสอบจีโนมไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่อยู่ในบริเวณ qGM12 จำนวน 9 เครื่องหมาย ในต้นข้าวชั่วที่ F₂ ที่แสดงความต้านทานและอ่อนแอจากคู่ผสมทั้งสอง คู่ละ 200 ต้น พบว่า มี 3 และ 2 เครื่องหมาย สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นข้าวที่ต้านทานออกจากต้นอ่อนแอที่มาจากคู่ผสม PYO16-001-3-24B กับเหมยนอง 62 เอ็ม และคู่ผสม PYO16-001-3-24B กับ กข22 ได้ ตามลำดับ สำหรับการพัฒนาข้าวเหนียวหอมให้ต้านทานต่อแมลงบั่ว ได้ทำการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ 5 สายพันธุ์ กับพันธุ์ต้านทาน กข22 และใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM6800, RM3340 และ RM110 ช่วยคัดเลือกต้นที่ได้รับ qGM12 จนได้ประชากรชั่วที่ F_{4:5} จำนวน 15 สายพันธุ์ เมื่อนำมาปลูกทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วจากจังหวัดแพร่ น่าน และเชียงราย ในสภาพโรงเรือนพบว่า มี 5 สายพันธุ์ ที่แสดงความต้านทานมาก ถึงค่อนข้างต้านทาน ได้แก่ 1) PYO21-005-6-5-5 และ 2) PYO21-020-6-5-6 มีความต้านทานระดับดีมาก (เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย 1-5%) และ 3) PYO21-001-8-4-2, 4) PYO21-002-5-2-8 และ 5) PYO21-002-18-7-4 อยู่ในระดับค่อนข้างต้านทาน (เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย 6-10%) หลังจากนั้นนำสายพันธุ์ต้านทานและค่อนข้างต้านทานทั้ง 5 สายพันธุ์ มาปลูกทดสอบผลผลิต พบว่า มีผลผลิตเฉลี่ย 662.98 กก./ไร่ โดยสายพันธุ์ที่มีผลผลิตสูงสุด 2 อันดับแรก ได้แก่ ข้าวเหนียวหอมสีดา PYO21-005-6-5-5 มีผลผลิตสูงสุด 731.27 กิโลกรัมต่อไร่ และข้าวเหนียวหอมสีขาว PYO21-001-8-4-2 มีผลผลิตเฉลี่ย 724.61 กิโลกรัมต่อไร่ โดยทั้งหมดมีคุณลักษณะที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นพันธุ์ข้าวเหนียวต้านทานแมลงบั่ว จากผลการทดลองดังกล่าว จะนำสายพันธุ์ต้านทานและมีผลผลิตสูงไปปลูกคัดเลือกให้มีความสม่ำเสมอต่อไป

Title: DEVELOPMENT OF AROMATIC GLUTINOUS RICE WITH RESISTANCE TO GALL MIDGE USING DNA MARKER-ASSISTED SELECTION

Author: Marisa Impeng, Thesis: M.Sc. (Agricultural Science), University of Phayao, 2024

Advisor: Assistant Professor Dr. Vaiphot Kunjoo Co-advisor Assistant Professor Dr. Bunyarit Sinkangarm

Keywords: Rice gall midge resistance Glutinous rice Genetic inheritance DNA markers

ABSTRACT

The rice gall midge (*Orseolia oryzae*) is a major pest in rice cultivation, causing the formation of galls in rice plants and preventing panicle emergence, leading to significant yield loss. Utilizing resistant varieties is an effective strategy for mitigating such damage. This research aimed to investigate the genetic resistance to gall midge in the RD22 rice variety compared to the local variety Muey Nawng 62M (MN62M), and to utilize RD22 as a donor parent in breeding new resistant glutinous rice lines. Reactions to gall midge infestation were assessed in two F₂ rice populations derived from the crosses PYO16-001-3-24B × MN62M and PYO16-001-3-24B × RD22, under greenhouse conditions using gall midge populations from Phrae province. Genetic segregation ratios analyzed using chi-square tests revealed that both MN62M and RD22 carried two genes conferring resistance which exhibit duplicate recessive epistasis. Genotyping of resistant and susceptible F₂ individuals using 9 SSR DNA markers located in the qGM12 region identified 3 and 2 markers, respectively, that could distinguish resistant from susceptible plants in the two populations. To develop aromatic glutinous rice lines resistant to gall midge, five improved rice lines were crossed with the resistant RD22 variety. Marker-assisted selection using SSR markers RM6800, RM3340 and RM110 targeting the qGM12 region was employed, leading to the identification of 15 F₄:5 lines. These lines were then evaluated for resistance against gall midge populations from Phrae, Nan, and Chiang Rai provinces under greenhouse conditions. Five lines exhibited high to moderate resistance: PYO21-005-6-5-5 and PYO21-020-6-5-6 showed high resistance (1-5% infestation), while PYO21-001-8-4-2, PYO21-002-5-2-8 and PYO21-002-18-7-4 exhibited moderate resistance (6-10% infestation). Subsequently, all of five resistant and moderately resistant lines were evaluated for grain yield. The average grain yield was found to be 662.98 kg/rai, with the two highest-yielding lines being the black aromatic glutinous rice line PYO21-005-6-5-5 (731.27 kg/rai) and the white aromatic glutinous rice line PYO21-001-8-4-2 (724.61 kg/rai). These lines exhibit favorable agronomic characteristics suitable for further development as gall midge-resistant glutinous rice lines. Based on the experimental results, these high-yielding and resistant lines will be advanced and selected for genetic uniformity and stability in the next generations.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไวพจน์ กันจु อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้ให้โอกาส ให้ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับหลักการปรับปรุงพันธุ์พืชและการประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อการพัฒนาพันธุ์พืช รวมถึงทักษะความรู้ในห้องปฏิบัติการและในพื้นที่แปลงทดสอบ กระทั่งการดูแลเอาใจใส่ และขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญฤทธิ์ สิ้นค้างาม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาวิณี จันทร์วิจิตร ที่ช่วยตรวจสอบความถูกต้องของวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ คุณพนนิภา ยาใจ เจ้าพนักงานการเกษตรชำนาญงานสังกัดศูนย์วิจัยข้าวแพร่ กรมการข้าว และเจ้าหน้าที่ที่ให้ความอนุเคราะห์และให้ความช่วยเหลือในการประเมินความต้านทานแมลงบั่วในโรงเรือน ณ ศูนย์วิจัยข้าวแพร่ จังหวัดแพร่

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการและแปลงปฏิบัติการสาขาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้ความอนุเคราะห์และให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือห้องปฏิบัติการ และดูแลแปลงทดสอบต่าง ๆ จนสำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณวรารุณี ลิ้มสุข ผู้ช่วยนักวิจัย และน้อง ๆ สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา และท่านอื่น ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือทั้งในห้องปฏิบัติการและในแปลงทดสอบ จนสำเร็จได้ด้วยดีเสมอมา รวมทั้งขอขอบคุณบุคคลสำคัญอื่น ๆ และเกษตรกรทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำและมอบประสบการณ์การทำงานด้านแปลงในพื้นที่ต่าง ๆ

ขอขอบคุณบิดามารดาที่ให้อำลังใจ ให้โอกาสแก่ข้าพเจ้าให้ได้ศึกษาเรียนรู้ สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยพะเยา สถาบันการศึกษาที่ข้าพเจ้าศึกษาเรียนรู้ ให้สถานที่ และทรัพยากรในการทำงานวิจัย และหาข้อมูลเพิ่มเติม

มาริสา อิ่มเพ็ง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
1.3 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 การผลิตข้าวในภาคเหนือ	5
2.2 ข้อมูลทั่วไปของแม่ฮ่องบัว.....	6
2.3 การเข้าทำลายและการระบาด.....	9
2.4 กลไกการต้านทานและพันธุกรรมความต้านทานของพืช	11
2.5 พันธุ์/สายพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา.....	15
2.6 การสร้างข้าวสายพันธุ์แท้	18
2.7 การคัดเลือกข้าวพันธุ์ผสม	19
2.8 การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม.....	20
2.9 การศึกษาพันธุ์และการทดสอบผลผลิต.....	23
2.10 เครื่องหมายดีเอ็นเอและการใช้เครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก.....	25

2.11 ขั้นตอนการทำแผนที่ทางพันธุกรรม	27
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	29
3.1. ตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา	29
3.2 วิธีการทดลอง	30
3.3 สถานที่ทำการทดลอง	41
3.4 ระยะเวลาการดำเนินงาน	41
บทที่ 4 ผลการทดลอง	42
4.1 การเปรียบเทียบพันธุกรรมความต้านทานต่อแมลงบั่วในข้าวเหนียว 62 เอ็ม และข้าว กข22	42
4.2 การตรวจสอบจีโนไทป์อย่างละเอียดในประชากรชั่วที่ F_2 ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ	46
4.3 การพัฒนาข้าวเหนียวหอมต้านทานแมลงบั่ว	49
4.4 การทดสอบผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิตในประชากร $F_{4:5}$	55
บทที่ 5 บทสรุป	61
5.1 อภิปรายผลการทดลอง	61
สรุปผลการทดลอง	63
บรรณานุกรม	64
ภาคผนวก	72
ภาคผนวก ก วิธีการสกัดดีเอ็นเอ	73
ภาคผนวก ข วิธีการเตรียมเจล PAGE และ วิธีการย้อมเจล PAGE	74
ประวัติผู้วิจัย	76

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 การเข้าทำลายและความเสียหายของแมลงบั่วในประเทศไทย	10
ตาราง 2 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากรข้าวเหนียวข้าวต่าง ๆ เพื่อตรวจสอบการคงอยู่ของ QTL ด้านทานแมลงบั่ว (qGM12) และยีนความหอม (badh2).....	33
ตาราง 3 องค์ประกอบของสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR.....	33
ตาราง 4 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบจีโนไทป์อย่างละเอียดบน qGM12 ในประชากรข้าวข้าวที่ F ₂ จากคู่ผสม PYO16-001-24B X เหมยหนอง 62 เอ็ม และ PYO16-001-24B X กข22.....	36
ตาราง 5 การทดสอบการกระจายตัวของความต้านทานต่อแมลงบั่ว ด้วยวิธีการทดสอบไคสแควร์ (χ^2) ในประชากรข้าวข้าวที่ F ₂ ที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างข้าวสายพันธุ์ PYO16-001-3-24B X เหมยหนอง 62 เอ็ม และ PYO16-001-3-24B X กข22 ที่ทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่ว ในสภาพโรงเรือนทดลอง	44
ตาราง 6 จีโนไทป์ของข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์รับและพันธุ์ให้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานแมลงบั่วจำนวน 6 พันธุ์/สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR จำนวน 9 เครื่องหมาย ที่อยู่ในบริเวณ qGM12.....	45
ตาราง 7 จำนวนต้นข้าวข้าวที่ F ₂ จากคู่ผสม PYO16-001-3-24B X เหมยหนอง 62 เอ็ม และ PYO16-001-3-24B X กข22 ที่แสดงจีโนไทป์แบบต่าง ๆ กับ ความต้านทานต่อแมลงบั่ว	47
ตาราง 8 การวิเคราะห์หว่านจีโนไทป์ 4 เครื่องหมายและฟีโนไทป์โดยใช้ ANOVA และสมการถดถอย ในประชากร F ₂ 2 คู่ผสมได้แก่ PYO16-001-3-24B X เหมยหนอง 62 เอ็ม และ PYO16-001-3-24B X กข22	48
ตาราง 9 จำนวนสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกในแต่ละรุ่นของกลุ่มผสมต่าง ๆ.....	49
ตาราง 10 ข้อมูลการทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วทั้ง 3 ประชากรจากจังหวัดแพร่, น่าน และเชียงราย โดยแสดงเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย ในประชากรข้าวที่ F _{4:5} ในสภาพโรงเรือน.....	51

ตาราง 11 จีโนไทป์ของข้าวเหนียวด้านทานแมลงบัวข้าวที่ $F_{4:5}$ จำนวน 15 สายพันธุ์ที่ตรวจด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR จำนวน 4 เครื่องหมายที่มีตำแหน่งอยู่บน qGM12 และ Aromarker ที่จำเพาะต่อยีน badh2 ที่ควบคุมลักษณะความหอมในข้าว.....	53
ตาราง 12 แสดงวันที่ตกกล้า วันที่ดำนา และวันออกดอกที่ 75% ของข้าวแต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบผลผลิต ณ แปลงทดสอบบ้านแม่กาหลวง จ.พะเยา ในฤดูปลูกนาปี พ.ศ. 2566.....	56
ตาราง 13 ลักษณะผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตของข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ด้านทานแมลงบัวจำนวน 5 สายพันธุ์ และพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ 7 พันธุ์ ที่ปลูกทดสอบผลผลิตในสภาพน้ำสมบูรณ์ ของฤดูนาปี พ.ศ. 2566 ในพื้นที่จังหวัดพะเยา	59



สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1 ลักษณะของ (ก) แมลงบั่วตัวเต็มวัยเพศเมีย (ข) แมลงบั่วตัวเต็มวัยเพศผู้ (ค) แมลงบั่วระยะดักแด้ และ (ง) แมลงบั่วขณะออกจากระยะดักแด้.....	8
ภาพ 2 ผังการพัฒนาข้าวพันธุ์ กข22 (RD22).....	16
ภาพ 3 การสร้างประชากรช่วงที่ F ₂ เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบพันธุ์กรรมความต้านทานแมลงบั่วระหว่างหมยหนอง 62 เอ็ม (MN62M) และ กข22 (RD22) ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้.....	31
ภาพ 4 การพัฒนาประชากรข้าวเหนียวหอมลูกผสมสายพันธุ์แท้ (RILs) ให้มี qGM12 ที่ควบคุมความต้านทานต่อแมลงบั่ว โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการช่วยคัดเลือก	32
ภาพ 5 ตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ ในบริเวณ qGM12 บนโครโมโซม 2	36
ภาพ 6 ลักษณะของต้นข้าวที่เกิดหลอดบั่ว (ก) และต้นแคระ (ข) ที่เกิดจากการเข้าทำลายของแมลงบั่ว เปรียบเทียบกับต้นปกติ (ค).....	38
ภาพ 7 การกระจายตัวของความต้านทานแมลงบั่วในประชากรข้าวช่วงที่ F ₂ ที่เกิดจากคู่ผสม ได้แก่ ข้าวสายพันธุ์ PYO16-001-3-24B X หมยหนอง 62 เอ็ม และ PYO16-001-3-24B X กข 22 ที่ทดสอบโดยใช้แมลงบั่วจากจังหวัดแพร่ ในสภาพโรงเรือนทดลอง	42
ภาพ 8 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของพันธุ์รับและพันธุ์ให้ในเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์รับและพันธุ์ให้ (polymorphism)	46
ภาพ 9 แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอของประชากรข้าวเหนียวพันธุ์ปรับปรุงใหม่ต้านทานแมลงบั่วด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ 2 เครื่องหมาย ได้แก่ RM279 และ RM3340 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์รับและพันธุ์ให้.....	55
ภาพ 10 ประชากรข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่จำนวน 5 สายพันธุ์ และพันธุ์มาตรฐาน เปรียบเทียบ 7 พันธุ์ ที่ปลูกทดสอบผลผลิตในสภาพน้ำสมบูรณ์ของแปลงแม่กาหลวง อ.เมือง จ.พะเยา ในฤดูนาปี พ.ศ.2566.....	58

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวเหนียวเป็นธัญพืชที่สำคัญรองจากข้าวเจ้าที่คนไทยนิยมบริโภค ปัจจุบันได้รับความนิยมมากขึ้นในภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ของประเทศไทย โดยข้าวเหนียวที่นิยมปลูกในพื้นที่นาชลประทานในเขตภาคเหนือ คือ ข้าวสันป่าตอง 1 ซึ่งเป็นข้าวเหนียวไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นเตี้ย ลำต้นแข็งแรง ปลูกได้ตลอดทั้งฤดูปลูก ทั้งฤดูปลูกนาปรังและฤดูปลูกนาปี ให้ผลผลิตสูง เฉลี่ย 630 กิโลกรัมต่อไร่ นอกจากนี้ยังมีคุณภาพพุงต้มที่ดี คือ มีความเหนียวนุ่ม เมล็ดสวย และอร่อย (กรมการข้าว, 2559) ในปี พ.ศ. 2560 กรมการข้าวได้ประกาศเตือน การระบาดของแมลงบั่วในพื้นที่ต่าง ๆ เช่น จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย แพร่ น่าน พะเยา พิษณุโลก พิจิตร และชัยนาท (กรมการข้าว, 2560ก) มีข้อมูลจากกองส่งเสริมอารักขาพืชและการจัดการดินปุ๋ยพบว่า ในปี พ.ศ. 2565 มีการระบาดในพื้นที่จังหวัดนครนายก ชัยนาท ฉะเชิงเทรา นครสวรรค์ และพัทลุง จำนวน 2,275 ไร่ (กรมการข้าว, 2565) และในปี พ.ศ. 2566 มีการระบาดในพื้นที่จังหวัดอุทัยธานี และเลย จำนวน 42,914 ไร่ โดยข้าวที่แมลงบั่วเข้าทำลายจะมีลักษณะเป็นหลอดบั่ว และไม่สามารถออกรวงได้ ทำให้เกิดความเสียหายเป็นอย่างมาก จากการระบาดนั้นทำให้ปริมาณผลผลิตของข้าวลดลง (กรมส่งเสริมเกษตร, 2566) แนวทางการแก้ไขปัญหาการระบาดสามารถทำได้ยาก เนื่องจากการใช้สารเคมีกำจัดนั้นใช้ไม่ได้ผลกับแมลงบั่ว เพราะแมลงบั่วมีวงจรชีวิตที่ค่อนข้างสั้น ประมาณ 14 วัน จึงควบคุมได้ค่อนข้างยาก นอกจากนั้นการใช้สารเคมียังเป็นการทำลายศัตรูทางธรรมชาติของแมลงบั่วอีกด้วย ดังนั้นการเลือกใช้พันธุ์ต้านทานจึงเป็นแนวทางการป้องกันความเสียหายจากการระบาดของแมลงบั่วที่ดี

แมลงบั่ว (rice gall midge) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Orseolia oryzae* เป็นแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญ เข้าทำลายข้าวในระยะต้นกล้า มีลักษณะคล้ายยุงหรือริ้น เข้าทำลายยอดข้าวอ่อนที่กำลังเจริญ ทำให้ยอดมีลักษณะเป็นหลอดหอม และไม่สามารถออกรวงได้ ทำให้ลำต้นข้าวมีลักษณะแคระแกร็น ต้นเตี้ย กลม มีสีเขียวเข้ม แตกกอมาก และมีรวงน้อย ซึ่งการระบาดมีความสัมพันธ์กับความชื้นสัมพัทธ์อากาศ (กรมการข้าว, 2560ข) ปัจจุบันมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) และไบโอไทป์ (biotypes) ของแมลงบั่ว พบว่าสามารถจัดจำแนกประชากรแมลงบั่วเป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยความผันแปรของลำดับ

นิวคลีโอไทด์ของยีน *mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (mtCOI)* ได้แก่ 1) แผลงบัวในประเทศไทย และ 2) แผลงบัวจากประเทศอินเดีย ตลอดจนมีการศึกษาความต้านทานแผลงบัวในข้าวพันธุ์หมยนอง 62 เอ็ม (MN62M) ซึ่งเป็นข้าวเหนียวพื้นเมืองไทยที่มีความต้านทานต่อแผลงบัว โดยวิธีการวางตำแหน่งยีน (quantitative trait loci (QTL) mapping) พบว่า ข้าวหมยนอง 62 เอ็ม สามารถต้านทานแผลงบัวในประเทศไทยได้หลายไบโอไทป์ และพบตำแหน่ง QTL ที่ควบคุมความต้านทาน และตั้งชื่อว่า “*qGM12*” โดยมีเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่จำเพาะจำนวน 3 ตำแหน่ง อยู่บนโครโมโซม 2 ได้แก่ RM110, RM3340 และ RM6800 (Leelagud, et al., 2020) นอกจากนี้มีการรายงานข้าวเหนียวพันธุ์ กข22 (RD22) ยังสามารถต้านทานแผลงบัวได้ในหลายพื้นที่ทั้งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย (กรมการข้าว, 2559ก) โดยกลไกความต้านทานของข้าวต่อแผลงบัวเป็นแบบ antibiosis เพราะหนอนบัวจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติได้ในข้าวพันธุ์ต้านทาน (Hidaka, et al., 1974) งานวิจัยนี้จึงได้นำข้าวหมยนอง 62 เอ็ม และ กข22 มาใช้เป็นข้าวพันธุ์ให้ (donor parents) เพื่อถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมต้านทานต่อแผลงบัวเข้าสู่ข้าวเหนียวหอมสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ที่พัฒนามาจากข้าวสันป่าตอง 1 ที่มีความอ่อนแอต่อแผลงบัว (วรารุณี โละสฤษ, 2561) โดยใช้วิธีปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐาน (conventional breeding) ร่วมกับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection; MAS)

การปรับปรุงพันธุ์พืชแบบมาตรฐาน (conventional breeding) เป็นการคัดเลือกจากลักษณะที่ปรากฏ (phenotypes) ซึ่งอาจมีผลจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ทำให้การคัดเลือกพืชเป้าหมายผิดพลาดได้ (สุรพร เกตุงาม, 2546) และใช้ระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ค่อนข้างมาก ปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย (gene specific marker) เพื่อใช้เลือกต้นพืชที่มีลักษณะเป้าหมาย เช่น Aromarker ที่จำเพาะต่อยีน *badh2* ที่ควบคุมลักษณะความหอมในข้าว (Vanavichit, et al., 2024), RM144 และ RM224 ที่จำเพาะต่อ *qBL11* ที่ควบคุมความต้านทานโรคไหม้ พบในข้าวหอมนิล (JHM) (Wongsaprom, et al., 2010), *Paxa5* ที่จำเพาะต่อยีน *xa5* ที่พบในข้าวพันธุ์ IR62266 (Korinsak, et al., 2014) PB7-8 ที่จำเพาะต่อยีน *Xa21* พบในข้าวพันธุ์ IR1188 ที่ควบคุมความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง (Chunwongse, et al., 1993; Korinsak S., 2009) และ RM110, RM3340 และ RM6800 ที่จำเพาะต่อ *qGM12* ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานแผลงบัวในข้าวพันธุ์หมยนอง 62 เอ็ม (Leelagud, et al., 2020) ซึ่งจะใช้ร่วมกับวิธีการคัดเลือกแบบมาตรฐาน ซึ่งเรียกว่า marker assisted selection (MAS) ซึ่งทำให้การคัดเลือกมีความแม่นยำมากขึ้น (จิราพร แก่นทรัพย์ และคณะ, 2563) เพราะเป็นการตรวจสอบจากยีนเป้าหมายซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพและ

ความก้าวหน้าในการปรับปรุงพันธุ์อีกด้วย แต่ในการพัฒนาพันธุ์กรรมข้าว การใช้ข้าวเหนยนอง 62 เอ็ม ที่เป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองมาเป็นพันธุ์ให้ (donor parent) อาจทำให้มีลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ถ่ายทอดมาสู่ประชากรรุ่นลูก เช่น ความไวต่อช่วงแสง ลักษณะเมล็ดกลม และลักษณะทรงต้น เป็นต้น ดังนั้นการใช้ข้าวพันธุ์ปลูกสมัยใหม่ที่สามารถต้านทานแมลงบั่วในประเทศไทย ได้แก่ กข22 มาเป็นพันธุ์ให้ ซึ่งมีลักษณะทางการเกษตรที่ดีกว่าข้าวเหนยนอง 62 เอ็ม จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับความต้านทานต่อแมลงบั่วจากข้าว กข22 จะทำให้คัดเลือกสายพันธุ์ทำได้รวดเร็วขึ้น และมีความต้านทานต่อแมลงบั่ว รวมถึงมีลักษณะที่ดี แต่ยังไม่มีการยืนยันว่าพบ QTL ที่ควบคุมลักษณะความต้านทาน รวมถึงกลไกการต้านทานอื่น ๆ จาก กข22

จากความสำคัญของข้าวเหนียวเป็นอาหารหลักของคนในภาคเหนือของประเทศไทยจึงได้มีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวไม่ไวต่อช่วงแสง โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกในเขตภาคเหนือตอนบน สำหรับพื้นที่นาชลประทาน ในปัจจุบันโครงการปรับปรุงข้าวดังกล่าวได้ทำการคัดเลือกโดยทำการสร้างคู่ผสมครั้งแรกที่มหาวิทยาลัยพะเยา ข้าวเหนียวสายพันธุ์ก้าวหน้าที่นำมาใช้ปรับปรุงพันธุ์ให้ต้านทานแมลงบั่ว จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ 1) PYO12-001-8-6-3-7-3-4B เป็นข้าวเหนียวหอม ไม่ไวต่อช่วงแสง มีลักษณะต้นเตี้ย มีเมล็ดสีเหลืองเข้ม 2) PYO13-034-14-65-2-2-1B เป็นข้าวเหนียวไม่หอม และไม่ไวต่อช่วงแสง มีลักษณะต้นเตี้ย ทรงต้นแข็งแรง มีเมล็ดสีเหลืองเข้ม 3) PYO13-034-12-66-17-16-1B เป็นข้าวเหนียวไม่หอม และไม่ไวต่อช่วงแสง ลักษณะต้นเตี้ย ทรงต้นแข็งแรง มีเมล็ดสีเหลืองเข้ม และผลผลิตสูง 4) PYO16-03-93-11-6B เป็นข้าวเจ้าเก่า ไม่หอม และไม่ไวต่อช่วงแสง ลักษณะต้นเตี้ย ทรงต้นสวย และ 5) PYO16-012-140-4-7B เป็นข้าวเหนียวเก่าหอม และไม่ไวต่อช่วงแสง ลักษณะต้นเตี้ย ทรงต้นคล้ายสันป่าตอง 1 (วรารุณี โละสุข, 2561; ไวกิจน์ กันจู และคณะ, 2560) โดยข้าวทั้ง 5 สายพันธุ์ จะถูกนำมาใช้เป็นข้าวพันธุ์แม่สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ให้ต้านทานต่อแมลงบั่วต่อไป

โครงการวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อเปรียบเทียบพันธุ์กรรมความต้านทานต่อแมลงบั่วจากข้าวพันธุ์ต้านทานเหนยนอง 62 เอ็ม และ กข22 ว่ามี *qGM12* เหมือนกันหรือไม่ และนำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับความต้านทานบั่วจาก กข22 ใช้คัดเลือกข้าวเหนียวที่พัฒนาสายพันธุ์มาจากข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ 1) PYO12-001-8-6-3-7-3-4B, 2) PYO13-034-14-65-2-2-1B, 3) PYO13-034-12-66-17-16-1B, 4) PYO16-03-93-11-6B และ 5) PYO16-012-140-4-7B ให้ต้านทานแมลงบั่ว โดยการพัฒนาประชากรด้วยวิธีการผสมเดี่ยว (single cross) เพื่อถ่ายทอด *qGM12* ซึ่งเป็น QTL ที่ควบคุมความต้านทาน

ต่อแมลงบั่วจาก กข22 และใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อ qGM12 คัดเลือกต้นข้าวที่มียืน
เป้าหมาย ร่วมกับการประเมินความต้านทานต่อแมลงบั่วในสภาพโรงเรือนทดลอง ตลอดจน
การปลูกศึกษาพันธุ์เบื้องต้น หลังจากสิ้นโครงการวิจัยนี้ คาดว่าจะได้ข้าวเหนียวหอมที่มีความ
ต้านทานต่อแมลงบั่ว สำหรับนำไปปลูกคัดเลือกให้มีความสม่ำเสมอต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบพันธุ์กรรมความต้านทานต่อแมลงบั่วระหว่างข้าวพื้นเมืองหมยนอง
62 เอ็ม และข้าวพันธุ์ปลูก กข22
2. เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ข้าวเหนียวหอมที่พัฒนาขึ้นใหม่ให้ต้านทานต่อแมลงบั่ว โดยใช้
เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก

1.3 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย

ได้สายพันธุ์ข้าวเหนียวหอม ไม่ไวต่อช่วงแสง ที่ต้านทานแมลงบั่ว และนักปรับปรุงพันธุ์
สามารถนำลักษณะต้านทานต่อแมลงบั่วจากข้าว กข22 เป็นพันธุ์ให้ และสามารถใช้
เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งครอบคลุม qGM12 คัดเลือกสายพันธุ์ต้านทานที่ปรับปรุงมาจาก
กข22 ได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การผลิตข้าวในภาคเหนือ

ภาคเหนือของประเทศไทยมีลักษณะภูมิประเทศที่หลากหลายและมีสภาพภูมิอากาศที่เอื้อต่อการเพาะปลูกข้าว โดยการผลิตข้าวในภาคเหนือตอนบนมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อการบริโภคในครัวเรือนและความมั่นคงทางอาหาร เนื่องจากพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นพื้นที่พื้งพำน้ำฝน คิดเป็น 74.8% และมีพื้นที่ชลประทานเพียง 25.19% เท่านั้น (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2560) พื้นที่ถือครองทางการเกษตรในภาคเหนือตอนบนเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 13.5 ไร่ต่อครัวเรือน ซึ่งถือว่าน้อยกว่าภาคอื่น ๆ (สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2556) ลักษณะการทำนาของเกษตรกรมีหลากหลายรูปแบบ ได้แก่ นาดำ (82%) นาหว่านแห้ง นาหว่านน้ำตม และนาหยอด โดยเฉพาะในพื้นที่เชิงเขาที่ไม่สามารถเก็บกักน้ำได้ดี เช่น จังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงราย เชียงใหม่ และน่าน จึงมีการปลูกข้าวไร่ในบางพื้นที่ (กรมการข้าว, 2558) ฤดูกาลเพาะปลูกเริ่มตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม โดยส่วนใหญ่จะเริ่มปลูกในเดือนกรกฎาคม (69%) และเริ่มเก็บเกี่ยวตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงธันวาคม โดยเดือนพฤศจิกายนเป็นช่วงที่มีการเก็บเกี่ยวมากที่สุด (กรมการข้าว, 2558) การปลูกข้าวนาสวนมักกระจุกตัวอยู่ในพื้นที่ราบระหว่างภูเขา ซึ่งมีระดับน้ำตื้นกว่า 80 เซนติเมตร พันธุ์ข้าวที่นิยมปลูกในภาคเหนือตอนบน ได้แก่ ข้าวเหนียว (63.2%) ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (31.4%) ข้าวเจ้า (4.9%) ข้าวหอมปทุมธานี (0.2%) และข้าวสีหรือข้าวอินทรีย์ (0.1%) (กรมการข้าว, 2558) ในขณะที่ภาคเหนือตอนล่าง ได้แก่ จังหวัดกำแพงเพชร นครสวรรค์ พิจิตร เพชรบูรณ์ และอุทัยธานี มีพื้นที่เพาะปลูกข้าวรวมกันประมาณ 7.4 ล้านไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2566) โดยมีการเพาะปลูกทั้งข้าวนาปีและข้าวนาปรัง โดยพื้นที่ข้าวนาปีคิดเป็น 85 % และข้าวนาปรัง 15% ของพื้นที่เพาะปลูกข้าวทั้งหมด ปริมาณผลผลิตรวมในแต่ละจังหวัดของภาคเหนือตอนล่างมีดังนี้ กำแพงเพชร 764,252 ตัน นครสวรรค์ 1,424,502 ตัน พิจิตร 1,042,725 ตัน เพชรบูรณ์ 623,107 ตัน และอุทัยธานี 348,675 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2566) สำหรับจังหวัดในภาคเหนือตอนบน เช่น พิษณุโลกมีพื้นที่การเพาะปลูก 1,487,347 ไร่ สุโขทัย 1,129,280 ไร่ แพร่ 299,420 ไร่ อุตรดิตถ์ 599,645 ไร่ น่าน 336,747 ไร่ และตาก 383,170 ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรที่ 2 พิษณุโลก, 2565) ในการผลิตข้าวมักพบปัญหาการระบาดของแมลงศัตรูข้าวเสมอ โดยทั่วไปใน

ประเทศไทยจะพบแมลงศัตรูข้าวประมาณ 50 ชนิด แบ่งเป็น 4 ประเภท คือ แมลงเจาะลำต้น และยอด เช่น หนอนกอต่าง ๆ แมลงกินใบ เช่น หนอนห่อใบข้าว หนอนปลอก แมลงพวงปาก ดูด เช่น เพลี้ยต่าง ๆ และศัตรูพืชชนิดอื่น ๆ เช่น แมลงบั่ว ไโรขาว และไรแดง เป็นต้น ซึ่งแมลง เหล่านี้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการผลิตข้าว และจะมีการระบาดแบบต่อเนื่อง ซึ่งส่งผลทำให้ปริมาณผลผลิตข้าวลดลง แต่จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสภาวะการระบาดของ แมลง (วิรัชทร สร้อยนาค และคณะ, 2558)

แนวโน้มการผลิตและปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ในช่วงปี พ.ศ. 2555/2556 ถึง 2564/2565 พบว่า พื้นที่เพาะปลูกและผลผลิตข้าวนาปีมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง อันเนื่องมาจากการ ปรับโครงสร้างการผลิตข้าวของภาครัฐ โดยเฉพาะนโยบาย Zoning ที่ส่งเสริมให้เกษตรกร ปรับเปลี่ยนพื้นที่ปลูกข้าวนาปีที่ไม่เหมาะสมไปปลูกพืชชนิดอื่น เช่น อ้อย ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ มัน ลำปะลั และพืชไร่นาสวนผสม (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2559) นอกจากนี้ ปัญหาก็ยัง แล้ง ฝนทิ้งช่วง การระบาดของศัตรูพืช เช่น แมลงบั่ว หนอนกอ เพลี้ยจักจั่นสีเขียว เพลี้ยจักจั่น สีน้ำตาล และโรคข้าว เช่น โรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง โรคใบสีแสด และโรคถดถอยฝักดาบ ก็มีผลกระทบโดยตรงต่อผลผลิตข้าว (กรมการข้าว, 2558) ทั้งนี้ดินในภาคเหนือถือว่ามีความอุดมสมบูรณ์มากกว่าภูมิภาคอื่น ๆ ของประเทศ ทำให้ยังคงมีศักยภาพในการพัฒนาและส่งเสริมการผลิตข้าวอย่างยั่งยืนได้ในอนาคต

2.2 ข้อมูลทั่วไปของแมลงบั่ว

2.2.1 อนุกรมวิธานของแมลงบั่ว

แมลงบั่ว (rice gall midges, RGM) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Orseolia oryzae* ถูกค้นพบครั้งแรกใน Monghyr district ของรัฐ Bihar ในประเทศอินเดีย (Riley, 1881) ณ เวลานั้นยังไม่มี การตั้งชื่อ ภายหลังได้มีการตั้งชื่อและเปลี่ยนมาใช้ *Orseolia oryzae* จนถึงปัจจุบัน (Gagne et al., 1973) ปัจจุบัน แมลงบั่วข้าวถูกจัดจำแนกออกเป็น 2 สปีชีส์ ได้แก่ แมลงบั่วข้าวเอเชีย (Asian rice gall midge) และแมลงบั่วข้าวแอฟริกัน (African rice gall midge) (จินตนา ทยาธรรม และ คณะ, 2548) ได้มีการจัดจำแนกแมลงบั่วข้าวเอเชียตามกฎเกณฑ์ของ International Code of Zoological Nomenclature ดังนี้

phylum: Arthropoda

class: Insecta

order: Diptera

sub order: Nematocera

family: Cecidomyiidae

genus: *Orseolia*

species: *oryzae* (wood-Mason)

สำหรับแมลงบั่วเอเชีย มีการรายงานพบการเข้าทำลายของแมลงบั่วในประเทศ บังกลาเทศ ปากีสถาน ศรีลังกา (Hill, 1975) พม่า เขมร จีน อินเดีย อินโดนีเซีย ลาว เนปาล ไทย และเวียดนาม (Plumb, 1967) ในปัจจุบันพบการแพร่กระจายและความเสียหายจากการเข้าทำลายของแมลงบั่วมีมากขึ้น ซึ่งเดิมในอินเดียพบการระบาดเฉพาะในฤดูฝน แต่ปัจจุบันพบการระบาดในฤดูหนาวด้วย (Kalode, et al., 1977)

สำหรับแมลงบั่วในประเทศไทยสามารถจำแนกตามไบโอไทป์ (biotype) ได้หลายประเภท ขึ้นอยู่กับเทคนิคหรือวิธีการที่ใช้ในการจัดจำแนก ดังนี้

1. กรณีใช้วิธีการจำแนกจากเทคนิค random amplification of polymorphic DNA (RAPD) จากดีเอ็นเอของแมลงบั่วจาก 14 แหล่งที่มา สามารถจัดแนกไบโอไทป์ได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) แมลงบั่วในพื้นที่จังหวัดแพร่ น่าน เชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง พิจิตร และกำแพงเพชร 2) แมลงบั่วในพื้นที่จังหวัดนครพนม อุบลราชธานี และพัทลุง และ 3) แมลงบั่วในพื้นที่จังหวัดอุดรธานีและหนองคาย (จินตนา ทยาธรรม และคณะ, 2542)

2. กรณีใช้วิธีการจำแนกจากปฏิกิริยาการเข้าทำลายของแมลงบั่ว 4 แหล่งที่มาต่อพืชอาศัยในข้าว 5 พันธุ์ สามารถจัดจำแนกไบโอไทป์ของแมลงบั่วได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ 1) แมลงบั่วในพื้นที่จังหวัดน่าน 2) แมลงบั่วในพื้นที่จังหวัดนครพนม 3) แมลงบั่วในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี และ 4) แมลงบั่วในพื้นที่จังหวัดฉะเชิงเทรา (จินตนา ทยาธรรม และคณะ, 2535)

3. กรณีใช้เครื่องหมายโมเลกุล amplified fragment length polymorphism (AFLP) และเครื่องหมายโมเลกุลที่เฉพาะเจาะจงกับไบโอไทป์ (biotype-specific markers) ที่จำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมและไบโอไทป์ของแมลงบั่วที่พบในประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างดักแดแมลงบั่วจาก 19 แห่ง ใน 12 จังหวัด ในช่วงปี 2549-2550 แล้วได้ทำการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างประชากรจำนวน 242 อัลลิล จาก 12 คู่ไพรเมอร์ และทำการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA ได้ 4 กลุ่ม และพบแมลงบั่ว 2 ไบโอไทป์ (จิรพงศ์ จิรินทร์ และคณะ, 2552)

4. กรณีใช้การจัดจำแนกจากการวิเคราะห์ความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในไมโทคอนเดรียของแมลงบั่วจาก 13 แหล่งที่มา พบว่า แมลงบั่วอินเดียต่างจากแมลงบั่ว

ในพื้นที่ประเทศไทย และไบโอไทป์ของแมลงบัวในประเทศไทยมีอย่างน้อย 5 ไบโอไทป์ (พิกุลลีลากุล และคณะ, 2563)

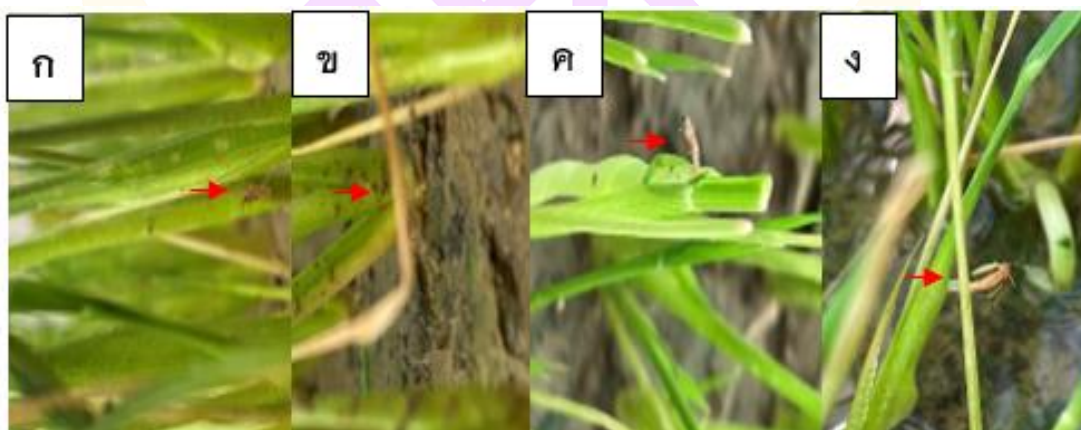
2.2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแมลงบัว (จินตนา ทยาธรรม และคณะ, 2548) แบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ

1. ตัวเต็มวัยของแมลงบัว มีลักษณะคล้ายยุงหรือริ้น ลำตัวยาว 3 – 4 มิลลิเมตร หนวดและขาไม่มีสีดำ กลางวันจะซ่อนตัวอยู่ใต้ใบข้าวบริเวณกอข้าว และจะบินไปหาไฟเพื่อผสมพันธุ์ในเวลากลางคืน เพศผู้มีลำตัวสีน้ำตาลปนเหลือง ขนาดเล็กกว่าเพศเมีย เพศเมียส่วนท้องมีสีแดงส้ม วางไข่ใต้ใบข้าวในตอนกลางคืน สามารถวางไข่ได้หลายร้อยฟองในเวลา 4 วัน

2. ไข่ มีลักษณะคล้ายกล้วยหอม เป็นฟองเดี่ยว ๆ 3 – 4 ฟอง สีชมพูอ่อน ระยะไข่ประมาณ 3 – 4 วัน จากนั้นฟักเป็นตัวหนอน

3. ตัวหนอน มีลักษณะคล้ายหนอนแมลงวัน หัวท้ายเรียว มี 3 ระยะ ตัวหนอนที่ฟักจากไข่จะเข้าไปกัดกินที่จุดเจริญ (growing point) ทำให้ต้นข้าวสร้างหลอดหุ้มตัวหนอนไว้ เกิดเป็นช่องกลวง ที่เรียกว่า หลอดบัว (silver shoot) ซึ่งลักษณะเป็นหลอดยาว สีเขียวอ่อน ต่างจากหน่อข้าวปกติ ต้นข้าวที่ถูกทำลายจะมีลักษณะแคระแกร็น เตี้ย ลำต้นกลม สีเขียวเข้ม และไม่ออกรวง และเข้าสู่ระยะดักแด้

4. ดักแด้ จะมีสีชมพูอ่อนจะเคลื่อนย้ายมาอยู่ส่วนปลายของหลอดข้าว และกลายเป็นสีแดงก่อนเจาะออกเป็นตัวเต็มวัยในตอนกลางคืน



ภาพ 1 ลักษณะของ (ก) แมลงบัวตัวเต็มวัยเพศเมีย (ข) แมลงบัวตัวเต็มวัยเพศผู้ (ค) แมลงบัวระยะดักแด้ และ (ง) แมลงบัวขณะออกจากกระดักแด้

ที่มา: มารีสา อิมเพ้ง (ผู้ถ่าย)

2.3 การเข้าทำลายและการระบาด

ในฤดูปลูก 1 ฤดู แมลงบั่วสามารถขยายพันธุ์ได้ 6 – 7 ชั่วอายุต่อฤดูปลูก โดยชั่วอายุที่ 2 – 4 จะเป็นช่วงที่ทำความเสียหายให้ข้าวมากที่สุด อาหารของแมลงบั่ว ได้แก่ ข้าว ข้าวป่า หญ้าไซ หญ้าปล้องเขียว หญ้าปล้องหิน หญ้าชันกาด และหญ้าตีนตีด ในการป้องกันแมลงบั่วสามารถทำได้โดยกำจัดวัชพืชรอบแปลงนา ก่อนตกลำ เพื่อทำลายพืชอาศัยของแมลงบั่ว ปรับวิธีปลูกโดยการปักดำ เพื่อลดความรุนแรงที่เกิดจากการทำลายของแมลงบั่ว ไม่ปลูกข้าวโดยวิธีการหว่านหรือปักดำระยะถี่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของแมลงบั่วเป็นประจำ ทำลายตัวเต็มวัยของแมลงบั่วที่บินมาเล่นไฟในเวลากลางคืน และไม่สามารถใช้สารเคมีในการฆ่าแมลงบั่วได้ เพราะไม่สามารถกำจัดแมลงบั่วและยังเป็นการทำลายศัตรูทางธรรมชาติของแมลงบั่วอีกด้วย (สาธิต มิตรหาญ และ จันทรจิรา รุ่งเจริญ, 2564; กรมการข้าว, 2560ข; Hidaka, et al., 1974; จิรพงศ์ ไกรรินทร์ และคณะ, 2552)

การระบาดของแมลงบั่วในประเทศไทย พบการระบาดครั้งแรกในภาคเหนือที่จังหวัดแพร่ และในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่จังหวัดตราด (Ladell, et al., 1933) ต่อมาพบการแพร่กระจายของแมลงบั่วใน 15 จังหวัด ในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Hitai, et al., 1965) แมลงบั่วเป็นแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญในภาคเหนือตอนบน โดยเฉพาะพื้นที่จังหวัดตาก แพร่ ลำปาง น่าน พะเยา แม่ฮ่องสอน เชียงราย และเชียงใหม่ ระบาดรุนแรงในช่วงเดือนกันยายนถึงเดือนตุลาคม ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือบริเวณจังหวัดเลย อุบลราชธานี หนองคาย นครพนม และสกลนคร เนื่องจากมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ของแมลงบั่ว คือ มีความชื้นสูง เป็นพื้นที่ที่เป็นเขาล้อมรอบ เพราะความชื้นมีความสัมพันธ์กับการวางไข่ จำนวนไข่ การฟักไข่ การอยู่รอดหลังการฟักไข่ของหนอนและการเข้าทำลายยอดข้าวอ่อน (กรมการข้าว, 2560ข)

ในปัจจุบันกรมการข้าวได้ตรวจพบการระบาดของแมลงบั่วในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย ในพื้นที่จังหวัดตาก ลำปาง แพร่ น่าน พะเยา เชียงราย เชียงใหม่ เนื่องจากสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณของแมลงบั่ว คือ มีความชื้นสูง เป็นพื้นที่ภูเขาล้อมรอบ (กรมการข้าว, 2560ก) และยังเป็นพื้นที่ที่เคยพบการระบาดของแมลงบั่วมาก่อน การระบาดของแมลงบั่วทำให้พันธุ์ข้าวท้องถิ่นเดิมที่เคยให้ผลผลิตปริมาณมากและเป็นที่นิยมบริโภค มีผลผลิตลดลง เช่น ปี พ.ศ. 2562 พื้นที่โครงการพัฒนาพื้นที่สูงแบบโครงการหลวงบ่อเกลือ อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน พบการเข้าทำลายของแมลงบั่วในข้าวประมาณ 9% ทำให้ผลผลิตข้าวลดลง 63% และในพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงเลอตอ อำเภอแม่ระมาด จังหวัดตาก มีการเข้าทำลายของแมลงบั่ว ในปี พ.ศ. 2560 คิดเป็น 2% และในปี พ.ศ. 2562 พบการเข้าทำลาย 75.3% ทำให้ผลผลิตข้าวลดลง 18 – 29% (สาธิต มิตรหาญ และ จันทรจิรา รุ่งเจริญ, 2564) ในเดือนตุลาคม 2559 มีการรายงานจากเทศบาลตำบลปง อำเภอปง จังหวัด

พะเยา ว่าเกิดการระบาดของแมลงบั่ว ชาวนาได้รับความเดือดร้อนกว่า 500 ราย เกิดความเสียหายกว่า 3,700 ไร่ ในพื้นที่จังหวัดพะเยา และในพื้นที่ใกล้เคียงอีกกว่า 10,000 ไร่ (เทศบาลตำบลง, 2559) ในเดือนกุมภาพันธ์ 2560 มีการรายงานจากเดลินิวส์และพีพีทีวีออนไลน์ ว่าเกิดการระบาดของแมลงบั่วในพื้นที่จังหวัดพิจิตร เนื่องจากแมลงบั่วกัดกินต้นข้าวทำให้ต้นข้าวไม่ออกรวง โดยมีชาวนาได้รับผลกระทบไม่น้อยกว่า 10,000 ไร่ จากนาข้าวทั้งหมดในพื้นที่กว่า 50,000 ไร่ (เดลินิวส์และพีพีทีวีออนไลน์, 2560) และในเดือนมกราคม 2564 มีการรายงานจากข่าวช่อง 8 ว่าพบการระบาดของแมลงบั่วในพื้นที่จังหวัดอุทัยธานี เจ้าของที่นาจำนวน 20 ไร่ (ข่าวช่อง 8, 2564) คาดว่านาข้าวจะเสียหายทั้งหมด เนื่องจากต้นข้าวถูกแมลงบั่วเข้าทำลาย ทำให้ไม่ออกรวง และพบกับสภาพความแห้งแล้งจึงทำให้ต้นข้าวยืนต้นตาย นอกจากนี้แมลงบั่วยังเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว คาดว่าจะทำความเสียหายให้กลับพื้นที่ข้างเคียงเป็นบริเวณกว้างอีกด้วย ซึ่งในปัจจุบันยังไม่สามารถคาดการณ์การระบาดของแมลงบั่วได้ ดังนั้นการใช้ชีวพันธุ์ต้านทานจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการบรรเทาความเสียหายของผลผลิตข้าว (สุรัตน์ ทองคำดี, 2550)

ตาราง 1 การเข้าทำลายและความเสียหายของแมลงบั่วในประเทศไทย

ปี	จังหวัดที่พบการระบาด	พื้นที่เสียหายโดยประมาณ	ความเสียหายที่เกิดขึ้น
1933	แพร่, ตราด	ไม่ระบุ	พบการระบาดครั้งแรก
1965	15 จังหวัดภาคเหนือและ ตะวันออกเฉียงเหนือ	ไม่ระบุ	พบการแพร่กระจาย
2559	พะเยา	3,700 ไร่ (+10,000 ไร่ พื้นที่ ใกล้เคียง)	ชาวนาเดือดร้อนกว่า 500 ราย
2560	ตาก (เลอตอ)	ไม่ระบุ	พบการระบาด 2%
2560	พิจิตร	10,000 ไร่	ต้นข้าวไม่ออกรวง
2562	น่าน (บ่อเกลือ)	ไม่ระบุ	แมลงบั่วทำลาย 9%, ผลผลิตลดลง 63%
2562	ตาก (เลอตอ)	ไม่ระบุ	การระบาด 75.3%, ผลผลิต ลดลง 18-29%
2564	อุทัยธานี	20 ไร่	ต้นข้าวไม่ออกรวงและแห้งตาย คาดเสียหายทั้งหมด

2.4 กลไกการต้านทานและพันธุกรรมความต้านทานของพืช

2.4.1 กลไกการต้านทานต่อแมลงในพืช พืชแสดงความหลากหลายของกลไกในการป้องกันต่อการบุกรุกของแมลงศัตรูพืชสามารถจัดจำแนกได้ (ชเนษฎ์ ม้าลำพอง, 2562) ดังนี้

1. การหลีกเลี่ยง (avoidance) คือ กลไกที่ช่วยลดโอกาสของการสัมผัสระหว่างแมลงศัตรูพืชและพืชปลูก คือ กลไกนี้จะทำงานก่อนที่จะมีการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัยและศัตรูพืช ทำให้พืชหลีกเลี่ยงในการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชเรียกว่า antixenosis (การต่อต้านของพืชต่อแมลง) หรือความไม่ชอบพืชของแมลง (non-preference) พืชที่ใช้กลไกนี้จะมีลักษณะสัณฐานวิทยาหรือสารเคมีที่ไม่ดึงดูดต่อแมลงศัตรูพืช

2. ความต้านทาน (resistance) กลไกของการต้านทานจะเกิดขึ้นหลังจากแมลงศัตรูพืชเข้าทำลาย โดยกลไกการทำงานของความต้านทานจะช่วยลดความเสียหายจากการเข้าทำลายหรือลดการเจริญเติบโตและการพัฒนาของศัตรูพืช ลักษณะของกลไกความต้านทานอาจเป็นกลไกทางชีวเคมี สรีรวิทยา กายวิภาค หรือสัณฐานวิทยา เรียกว่า antibiosis ความต้านทานเกี่ยวข้องกับความสามารถทางพันธุกรรมของพืชอาศัย เพื่อลดผลกระทบในการเข้าทำลายของศัตรูพืช

3. ความทนทาน (tolerance) ความทนทานมีกลไกการทำงานเพื่อลดขอบเขตของความเสียหายโดยจะพยายามทำหน้าที่ตามปกติในสภาวะที่มีความเครียดทางชีวภาพ เช่น พืชบางชนิดให้ผลผลิตที่ลดลงเมื่อมีการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืช คือ พืชอาศัยทนทานต่อแมลงศัตรูพืชได้ กลไกนี้อาจใช้กับสถานการณ์ที่พืชสามารถฟื้นตัวได้อย่างรวดเร็วหลังจากเกิดการเข้าทำลายของศัตรูพืช

จากการศึกษากลไกการต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในข้าว พบว่า ข้าวมีกลไกการต้านทานแมลงมี 3 รูปแบบ คือ 1) antixenosis คือ แมลงไม่ชอบกินทำให้อัตราการเข้าทำลายมีน้อยกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ 2) antibiosis คือ แมลงสามารถกินได้ แต่พืชมีการคลั่งสารเคมีบางชนิดออกมาทำให้มีผลต่อการเจริญเติบโตของแมลง ทำให้แมลงไม่สามารถเจริญจนครบวงจรได้ จึงทำให้ประชากรแมลงมีจำนวนลดน้อยลง และ 3) tolerance คือ แมลงกิน แมลงเข้าทำลายแต่พืชไม่ตาย โดยพืชจะมีการปรับตัวในรูปแบบต่าง ๆ ต่อไป ซึ่งพืชสามารถดำเนินชีวิตอยู่ต่อไปได้โดยไม่มีผลต่อแมลงในการเข้าทำลาย ซึ่งมีการทดสอบกลไกการต้านทาน พบว่า กลไกทางพันธุกรรมสามารถต้านทานได้มากที่สุด เช่น ในการพัฒนาประชากรข้าวโดยการถ่ายทอดยีนต้านทานซึ่งมีความต้านทานแบบ antibiosis คือ *Bph14*, *Bph15* และ *Bph16* รองลงมาคือ กลไกทางชีวเคมี คือ พืชสามารถผลิตสารเคมีขึ้นมาต่อต้านการเข้าทำลายของแมลง ซึ่งสารเคมีนั้นมีผลกระทบต่อแมลงโดยตรง และกลไกที่มีความสามารถในการต้านทานน้อย

ที่สุด คือ กลไกทางกายภาพ เช่น ความแข็งแรงของใบหรือลำต้น ชั้นผิวที่แข็งแรง และกลไกทางพฤติกรรม คือ การตอบสนองของต้นข้าวต่อการเข้าทำลายของแมลง กล่าวคือ ในข้าวต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลใช้กลไกการต้านทานทั้ง 3 รูปแบบ ร่วมกัน ทำให้มีความสามารถในการต้านทานค่อนข้างมาก (กมล ปัตตาวะตัง และคณะ, 2557)

2.4.2 กลไกการต้านทานต่อแมลงบั่วในข้าว

กลไกการต้านทานแมลงบั่วในข้าวสามารถจำแนกได้เป็น 3 กลไกหลัก ได้แก่ 1) Antixenosis หรือ Non-preference กลไกที่พืชมีลักษณะทางกายภาพหรือเคมีซึ่งไม่ดึงดูดแมลง เช่น ความยาวใบ ความกว้างใบ หรือการปล่อยสารระเหยที่ทำให้แมลงไม่นิยมเข้าวางไข่ (พนัสนิภา ยาใจ และ ปรีดา เสี่ยงใหญ่, ม.ป.ป.; Sahu, et al., 2023b) 2) Antibiosis พืชมีสารชีวเคมีที่ส่งผลต่อการพัฒนาของแมลง เช่น ฟีนอล ฟลาโวนอยด์ และกรดอะมิโนอิสระ ที่ทำให้แมลงหยุดการเจริญเติบโตหรือตายก่อนถึงระยะโตเต็มวัย (Hidaka, et al., 1974; Sahu, et al., 2023b) และ 3) Tolerance พืชสามารถทนทานและฟื้นตัวจากความเสียหายที่เกิดจากแมลง โดยแม้มีการเกิดหลอดบั่วบางส่วน แต่ต้นข้าวยังคงสามารถสร้างแขนงและให้ผลผลิตได้ในระดับที่เหมาะสม (พนัสนิภา ยาใจ และปรีดา เสี่ยงใหญ่, ม.ป.ป.)

การศึกษากลไกการต้านทานในข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ได้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของกลไกในแต่ละสายพันธุ์ เช่น ข้าวพันธุ์ กข4 และ กข9 มีลักษณะต้านทานแบบ non-preference และ tolerance (วีรวิทย์ กิตติคุณกุล, 2523) ส่วนพันธุ์หม่นนอ 62 เอ็ม แสดงกลไกแบบ antibiosis ที่ทำให้หนอนบั่วไม่สามารถพัฒนาได้อย่างสมบูรณ์ (Hidaka, et al., 1974) การทดลองที่ดำเนินการโดยสถาบันวิจัยข้าวแห่งชาติ ประเทศอินเดีย ได้ประเมินข้าวจำนวน 202 สายพันธุ์ โดยศึกษาทั้งลักษณะทางกายภาพและเคมีของต้นข้าวที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทาน ภายใต้การปล่อยแมลงบั่วในระยะกล้า (อายุ 15 วัน) และวัดผลการเข้าทำลาย รวมถึงวิเคราะห์ทางชีวเคมี เช่น ปริมาณน้ำตาล โปรตีน สารฟีนอล และสารเคลือบใบ พบว่า ข้าวพันธุ์ที่มีความยาวใบและกาบใบมาก มีความต้านทานสูง ขณะที่ข้าวที่อ่อนแอมีใบกว้างและมีความชื้นสูง ซึ่งเป็นลักษณะที่เอื้อต่อการเข้าทำลายของแมลง นอกจากนี้ ข้าวที่ต้านทานได้ดีมักมีปริมาณน้ำตาลและโปรตีนต่ำกว่าข้าวอ่อนแอ (Sahu, et al., 2023b)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานแมลงบั่วในประเทศไทยเริ่มต้นตั้งแต่ช่วง พ.ศ. 2511–2513 โดยมีความร่วมมือระหว่าง IRRI และหน่วยงานข้าวในหลายประเทศ รวมถึงไทย จากการทดลองในปี พ.ศ. 2512 พบว่า ข้าวพันธุ์ Eswarakora จากอินเดีย และข้าวพื้นเมืองของไทยคือหม่นนอ 62 เอ็ม มีความต้านทานสูง ต่อมาได้ใช้พันธุ์ EK1263 และ EK1252 จากอินเดียเป็นพ่อแม่พันธุ์ในการพัฒนาพันธุ์ กข4 และ กข9 ที่มีลักษณะ non-preference และ tolerance

(วีรวุฒิ กตัญญกุล, 2523) แม้พันธุ์ต้านทานเหล่านี้จะมีความสามารถในการป้องกันแมลงบั่วได้ดี แต่กลับมีข้อจำกัดด้านคุณภาพการบริโภค โดยเฉพาะลักษณะข้าวสุกที่แข็ง เกษตรกรจึงไม่นิยมปลูก ทำให้มีการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่โดยการฉายรังสีพันธุ์ กข4 จนได้ กข7 ที่ยังคงความต้านทานไว้ และมีคุณภาพการหุงต้มดีขึ้น (วีรวุฒิ กตัญญกุล, 2524; 2527)

ในปี พ.ศ. 2558 มีการทดลองพัฒนาและประเมินสายพันธุ์ลูกผสมกลับหัว (BC_4F_{3-4}) ที่เกิดจากการผสม (อาบาญา X ขาวดอกมะลิ 105) X ชัยนาท 1 เพื่อให้ได้พันธุ์ที่มีความต้านทานในภาคเหนือตอนล่าง อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพของสายพันธุ์ใหม่ยังไม่สามารถเทียบได้กับพันธุ์หมยหนอง 62 เอ็ม (วีรยุทธ สร้อยนาถ, 2558)

ล่าสุด ปี พ.ศ. 2566 ศูนย์วิจัยข้าวแพร่และศูนย์วิจัยข้าวสกลนครรายงานว่าการทดลองจำนวน 11 สายพันธุ์ แสดงความต้านทานต่อแมลงบั่ว ได้แก่ ข้าวหอม (G.S. No. 4853), ข้าวหอม (G.S. No. 4865), ดอกจัน (G.S. No. 5598), ปัดหิน, 39-12-7, เบาอุเด็น, เจ้ามะลิ, KALAJOHA, ขาวดอกมะลิ, นางเอก, ดอกหมอก และ กข29 ซึ่งสะท้อนถึงความก้าวหน้าของการปรับปรุงพันธุ์อย่างต่อเนื่องในประเทศไทย (กุลชนา ดาวเวิล และคณะ, 2566)

2.4.3 หลักการการปรับปรุงพันธุ์ต้านทาน

การปรับปรุงพันธุ์ต้านทานเป็นจุดประสงค์หลักของนักปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งนักปรับปรุงพันธุ์จะใช้วิธีมาตรฐานหรือปรับเปลี่ยนพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานโดยลักษณะผลผลิต คุณภาพและความต้านทานของแมลงศัตรูพืชเป็นลักษณะที่ต้องคำนึงถึงเป็นอันดับต้น ๆ ของการปรับปรุงพันธุ์พืช (เชษฐภฏ์ ม้าลำพอง, 2562)

ขั้นตอนแรก คือ การรวบรวมพันธุ์ต้านทานแมลงศัตรูพืชจากพันธุ์ปลูก พันธุ์การค้า และพันธุ์พื้นเมืองหรือพันธุ์ป่า ที่มีความสามารถในการต้านทานแมลงศัตรูพืช และ/หรือมียืนต้านทาน เมื่อพบแหล่งของยืนต้านทานแล้ว จะทำการผสมเพื่อให้ยืนต้านทานที่ต้องการถ่ายโอนไปยังพันธุ์ที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์ หรือพันธุ์ที่อ่อนแอต่อแมลงศัตรูพืชนั้น ๆ จากนั้นทำการคัดเลือกพันธุ์ที่มีความสามารถในการต้านทาน พร้อมทั้งตรวจจีโนมไทป์เพื่อยืนยันการมีอยู่ของยืนต้านทาน และตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างจีโนมไทป์และฟีโนไทป์นั้น ๆ จากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้อง

2.4.4 ยีน/QTL ความต้านทานต่อแมลงบั่วในข้าว

ในปี พ.ศ. 2556 Lu และคณะ ได้ทำการจำแนกและวิเคราะห์พันธุกรรมความต้านทานแมลงบั่วในพันธุ์ข้าว 91-1A2 โดยใช้วิธีการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ 91-1A2 กับ Jinggui, TN1, W1263 (*Gm1*), IET2911 (*Gm2*), BG404-1 (*gm3*), OB677 (*Gm4*), ARC5984 (*Gm5*) และ Duokang 1 (*Gm6*) เพื่อสร้างประชากร F_1 , BC_1F_1 และ F_2 จากนั้นทำการประเมินความต้านทาน

ต่อแมลงบัวโบไอบี IV ของประเทศจีน พบว่า ข้าวพันธุ์ 91-1A2 และประชากร F_1 ทั้งหมด แสดงความต้านทานได้ดี ผลการวิเคราะห์ด้วยการทดสอบไคสแควร์ (Chi-square test) ในประชากร BC_1F_1 และ F_2 แสดงอัตราส่วนที่สอดคล้องกับ 1:3 และ 9:7 ตามลำดับ ซึ่งบ่งชี้ว่า ลักษณะความต้านทานถูกควบคุมโดยยีนเด่นสองยีน ซึ่งถือเป็นการค้นพบยีนต้านทานชนิดใหม่ ที่ยังไม่เคยรายงานมาก่อน (Lu, et al., 2013)

ต่อมาในปี พ.ศ. 2559 มีการศึกษาการต้านทานต่อแมลงบัวแอฟริกัน (African rice gall midge; AfRGM) โดยใช้ข้าวสามคู่ผสม ได้แก่ ITA306 X BW348-1, ITA306 X TOG7106 และ ITA306 X TOS14519 เพื่อทำการวิเคราะห์ตำแหน่ง QTL ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความต้านทาน ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี composite interval mapping (CIM) พบ QTL จำนวน 28 ตำแหน่ง ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อแมลงบัว โดยมีค่าการอธิบายความแปรปรวน (R^2) อยู่ระหว่าง 1.3% ถึง 34.1% โดยเฉพาะ QTL ที่มีความสำคัญมากที่สุดอยู่บนโครโมโซมที่ 4 (*qAfrGM4*) จากประชากร ITA306 X TOS14519 ซึ่งมีค่า LOD สูงที่สุด นอกจากนี้เมื่อทำการรวมข้อมูลจาก ประชากรทั้งหมด (meta-QTL) พบ QTL ทั้งหมด 17 ตำแหน่ง ซึ่งช่วยเพิ่มความแม่นยำในการ เลือกใช้ตำแหน่งยีนสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต (Tao, et al., 2016)

ในปี พ.ศ. 2563 Leelagud และคณะ ได้ทำการศึกษาพันธุกรรมความต้านทานแมลง บัวในพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทยหมยนอง 62 เอ็ม (MN62M) โดยตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน *mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (mtCOI)* เพื่อศึกษาความหลากหลายของ แมลงบัวในประเทศไทย ผลการวิเคราะห์พบว่า แมลงบัวในประเทศไทยมีความแตกต่างจาก แมลงบัวในประเทศอินเดีย และมีไบโอไทป์หลากหลาย จากการทดสอบกับข้าวหลายพันธุ์ พบว่า หมยนอง 62 เอ็มสามารถต้านทานแมลงบัวได้ทุกไบโอไทป์ในการทดลอง และพบ QTL ที่ควบคุมความต้านทานอยู่บนโครโมโซมที่ 12 บริเวณระหว่างเครื่องหมาย RM6800 และ S2_419160 ซึ่งได้รับการตั้งชื่อว่า *qGM12* โดยมีเครื่องหมาย SSR ได้แก่ RM3340, RM6800 และ RM110 ที่สามารถใช้คัดเลือกลายพันธุ์ที่มีความต้านทานได้อย่างแม่นยำ (Leelagud, et al., 2020)

นอกจากนี้ ในปี พ.ศ. 2566 Sahu และคณะ ได้ทำการศึกษาในข้าวจำนวน 202 สายพันธุ์ จากสถาบันวิจัยข้าวแห่งชาติ ประเทศอินเดีย โดยประเมินความต้านทานแมลงบัวและ ตรวจสอบจีโนมไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 13 เครื่องหมาย อาทิ GM3DEL3, GM4DEL, GM8DEL, GM3SSR, RM17480 ฯลฯ ผลการศึกษาพบว่า เครื่องหมาย RM17480 ซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 4 มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับลักษณะความต้านทานต่อแมลงบัว โดยสายพันธุ์ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 250 bp แสดงความต้านทาน ขณะที่แถบขนาด 200 bp แสดงความอ่อนแอ (Sahu, et al., 2023a)

โดยสรุป ปัจจุบันมีการรายงาน ยีนหรือ QTL ความต้านทานต่อแมลงบั่วในข้าวอย่างน้อย 12 ตำแหน่ง (*Gm1-Gm12*) ซึ่งกระจายอยู่บนหลายโครโมโซม เช่น โครโมโซม 2, 4, 8, 9 และ 12 โดยยีนส่วนใหญ่เป็นยีนเด่น ยกเว้นบางตำแหน่ง เช่น *gm12* ที่เป็นยีนด้อย (Lu, et al., 2013; Leelagud, et al., 2020; Sahu, et al., 2023a) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้มีประโยชน์ในการใช้เทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection; MAS) เพื่อพัฒนาพันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานต่อแมลงบั่วได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.5 พันธุ์/สายพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา

2.5.1 สันป่าตอง 1

ข้าวพันธุ์สันป่าตอง 1 (San Pah Tawng 1; SPT1) เป็นข้าวเหนียวที่ได้จากการผสมข้าวสายพันธุ์ BKNLR75001-B-CNT-B-B-RST-3-2 และ กข2 ที่สถานีทดลองข้าวสันป่าตอง ในปี พ.ศ. 2527 ได้รับการรับรองพันธุ์จากคณะกรรมการบริหารกรมวิชาการเกษตร ในวันที่ 19 มกราคม 2543 มีลักษณะเป็นข้าวไม่ไวต่อแสง ทรงกอตั้ง ใบสีเขียว กาบใบสีเขียว ใบธงตั้งตรง รวงยาว ระแงงถี่ รวงแน่น คอรวงสั้น ฟางแข็ง ใบแก่ช้า เมล็ดข้าวเปลือกมีสีฟาง ผลผลิต 630 กิโลกรัมต่อไร่ ระยะพักตัวของเมล็ดประมาณ 8 สัปดาห์ อายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 130-135 วัน ลำต้นมีความสูงประมาณ 119 เซนติเมตร มีลักษณะเด่น คือ สามารถต้านทานโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง ให้ผลผลิตสูง ปลูกได้ตลอดทั้งปี แต่มีข้อควรระวัง คือ ไม่ต้านทานโรคใบสีส้ม และแมลงบั่ว เป็นที่นิยมปลูกในบริเวณพื้นที่นาชลประทานภาคเหนือตอนบน และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดแพร่ ลำปาง เชียงใหม่ เชียงราย และพะเยา (กรมการข้าว, 2559ก)

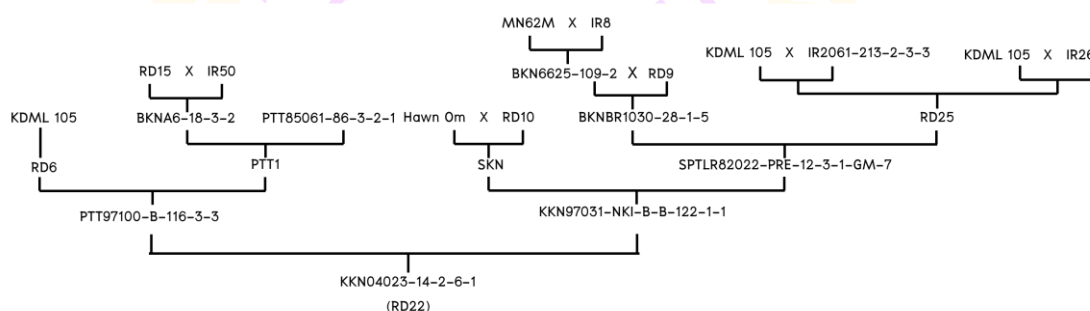
2.5.2 เหมยนอง 62 เอ็ม

ข้าวพันธุ์เหมยนอง 62 เอ็ม (Muey Nawng 62 M; MN62M) เป็นข้าวเหนียวพื้นเมืองที่ได้จากการรวบรวมพันธุ์โดยเจ้าหน้าที่สถานีกสิกรรมแม่โจ้ ในปี พ.ศ. 2494 และนายมณี เชื้อวิโรจน์ เจ้าหน้าที่วิชาการ สถานีทดลองข้าวสันป่าตอง ที่ได้นำมาปลูกคัดเลือกและเปรียบเทียบพันธุ์ในสถานีทดลองข้าวต่าง ๆ ในภาคเหนือ ได้รับรองพันธุ์จากกรมการพิจารณาพันธุ์ให้ขยายพันธุ์ ในวันที่ 6 พฤษภาคม พ.ศ. 2502 มีลักษณะเป็นข้าวไวต่อแสง ลำต้นและรอบใบสีม่วง เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเขียว กอแผ่ เมล็ดสั้น ป้อม ข้าวเปลือกสีฟางกระ น้ำตาล ก้นจุด คุณภาพข้าวสุก เหนียวนุ่ม ระยะพักตัวของเมล็ดประมาณ 1 สัปดาห์ ลำต้นสูงประมาณ 150 เซนติเมตร มีลักษณะเด่น คือ สามารถต้านทานแมลงบั่วได้ ต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาล และค่อนข้างต้านทานโรคใบสีส้ม แต่มีข้อควรระวัง คือ เมล็ดมีระยะพักตัวสั้น

เมื่อเมล็ดข้าวแก่ต้องรีบเก็บเกี่ยวทันที นวดยาก ไม่ต้านทานโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง ไม่ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เป็นที่นิยมปลูกในบริเวณภาคเหนือตอนบน โดยเฉพาะพื้นที่ที่มีการระบาดของแมลงปั่ว เช่น จังหวัดแพร่ ผลผลิต 540 กิโลกรัมต่อไร่ (กรมการข้าว, 2559; ศันสนีย์ จำจด, 2565)

2.5.3 กข22

ข้าวพันธุ์ กข22 (RD22) เป็นข้าวเหนียวพันธุ์ปลูกที่ได้จากการผสมข้าวสายพันธุ์ PTT97100-B-116-3-3 ซึ่งให้ผลผลิตสูง แต่อ่อนแอต่อโรคไหม้เป็นพันธุ์แม่ และข้าวสายพันธุ์ KKKK97031-NKI-B-B-122-1-1 ซึ่งต้านทานต่อโรคไหม้และแมลงบั่ว คุณภาพเมล็ดและคุณภาพข้าวสุก รับประทานดี มีกลิ่นหอม แต่ผลผลิตค่อนข้างต่ำเป็นพ่อพันธุ์ โดยการผสมพันธุ์แบบผสมเดี่ยว ได้รับรองพันธุ์จากคณะกรรมการวิจัยและพัฒนาข้าว ในวันที่ 12 กรกฎาคม พ.ศ. 2559 มีลักษณะเป็นข้าวไม่วิวดอแสง ทรงกอตั้งตรง ลำต้นค่อนข้างแข็ง ใบสีเขียวเข้มปลายใบตั้งตรง ใบแก่ช้ำ ใบธงยาว มุมใบธงตั้ง ลักษณะรวงแน่นปานกลาง คอรวงสั้น จัดเป็นข้าวเหนียวเมล็ดยาว รูปร่างเรียวยาว เมล็ดข้าวเปลือกสีเหลืองเข้ม คุณภาพการสีดีมาก ได้ข้าวเต็มเม็ด คุณภาพข้าวสุก เนื้อสัมผัสนุ่ม มีกลิ่นหอมเล็กน้อย ระยะพักตัวของเมล็ด 4 สัปดาห์ อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 130 วัน ผลผลิต 684 กิโลกรัมต่อไร่ ลำต้นสูงประมาณ 120 เซนติเมตร มีลักษณะเด่น คือ ต้านทานต่อโรคไหม้ในระยะกล้าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และต้านทานต่อแมลงบั่วในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือตอนบน เป็นที่นิยมปลูกในบริเวณพื้นที่มีระบบน้ำชลประทาน โดยเฉพาะพื้นที่ที่มีโรคใบไหม้และแมลงบั่วระบาดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือตอนบน (กรมการข้าว, 2559ค; สมใจ สาสีโท, 2558; สมใจ สาสีโท, 2560)



ภาพ 2 ผังการพัฒนาข้าวพันธุ์ กข22 (RD22)

2.5.4 ข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่

ข้าวเหนียวที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นข้าวเหนียวขาวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ ถูกพัฒนาจากข้าวสันป่าตอง 1 จำนวน 4 สายพันธุ์ และข้าวเหนียวหอมสีดำสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ จำนวน 1 สายพันธุ์ ที่ปรับปรุงพันธุ์มาจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ โดยใช้วิธีปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐานร่วมกับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก โดยทำการสร้างคู่ผสมครั้งแรกที่มหาวิทยาลัยพะเยา ในปี พ.ศ. 2555 โดยคัดเลือกข้าวเหนียวสายพันธุ์ดีเด่นสำหรับพื้นที่นาชลประทานในเขตภาคเหนือตอนบนรวมมีข้าวที่นำมาใช้ปรับปรุงพันธุ์ให้ต้านทานแมลงบั่ว จำนวนทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่

1. ข้าวเหนียวหอมสายพันธุ์ PYO16-001-3-24B เกิดจากคู่ผสมระหว่าง SPT1*³/RD6//SPT1*³/RGD07585-5-B-MAS-12-1-MAS-14 เป็นข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง สามารถต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง (ไวพจน์ กันจู และคณะ, 2563)
2. ข้าวเหนียวหอมสายพันธุ์ PYO12-001-8-6-3-7-3-4B เกิดจากคู่ผสมสายพันธุ์แท้ระหว่าง สันป่าตอง 1 X กข6 มีลักษณะต้นเตี้ย อายุเบา มีเมล็ดสีเหลืองเข้มเหมือน กข6 (ไวพจน์ กันจู และคณะ, 2563)
3. ข้าวเหนียวสายพันธุ์ PYO13-034-14-65-2-2-1B ได้จากลูกผสมกลับชั่วที่ BC₂F₆ จากคู่ผสมระหว่าง สันป่าตอง 1 X RGD07585-5-B-MAS-12-1-MAS-14 เป็นข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง ไม่หอม มีลักษณะต้นเตี้ย ทรงต้นสวย และมีเมล็ดสีเหลืองเข้มเหมือน กข6 (วรารุณี โละสุษ, 2561; ไวพจน์ กันจู และคณะ, 2563)
4. ข้าวเหนียวสายพันธุ์ PYO13-034-12-66-17-16-1B ได้จากลูกผสมกลับชั่วที่ BC₂F₆ จากคู่ผสมระหว่าง สันป่าตอง 1 X RGD07585-5-B-MAS-12-1-MAS-14 เป็นข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง ไม่หอม ลักษณะต้นเตี้ย ทรงต้นสวย มีเมล็ดสีเหลืองเข้มเหมือน กข6 และผลผลิตสูง (วรารุณี โละสุษ, 2561; ไวพจน์ กันจู และคณะ, 2563)
5. ข้าวเหนียวดำสายพันธุ์ PYO16-012-140-4-7B เป็นข้าวเหนียวหอมสีดำที่พัฒนามาจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ ได้จากลูกผสมกลับชั่วที่ BC₃F₄ จากคู่ผสมระหว่างไรซ์เบอร์รี่ X กข6 ไม่ไวต่อช่วงแสง และทรงต้นเหมือนข้าวไรซ์เบอร์รี่ (ไวพจน์ กันจู และคณะ, 2563)

2.6 การสร้างสายพันธุ์แท้

เป็นวิธีการสร้างสายพันธุ์แท้มี 2 รูปแบบ ดังนี้

1. ลูกผสมกลับสายพันธุ์แท้ (backcross introgression lines; BILs) (ชเนษฎ์ ม้าลำพอง, 2555) เป็นการนำลูกผสมชั่วที่ 1 มาปลูก และทำการผสมกลับเข้ากับพันธุ์แม่จนได้ประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ 1 ซึ่งเป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มลักษณะบางอย่างที่ขาดไปในแม่พันธุ์จากที่มีอยู่ให้สมบูรณ์มากขึ้น โดยเฉพาะลักษณะความต้านทานโรค และต้านทานแมลง เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถคาดคะเนผลล่วงหน้าได้ และสามารถทำซ้ำให้ได้ผลเหมือนเดิมทุกครั้ง

การผสมกลับ (backcross) มีองค์ประกอบ คือ ตัวรับ (recipient parent) คือ แม่พันธุ์ที่จะเอาลูกผสมกลับมาผสมเพื่อให้ได้ลักษณะที่ดีเอาไว้ และตัวให้ (donor parent) เป็นพันธุ์ที่มีลักษณะที่ต้องการที่ไม่มีในตัวรับ และต้องการถ่ายทอดลักษณะที่ต้องการไปไว้ในตัวรับ

วิธีการผสมกลับแยกได้เป็น 2 กรณี ได้แก่ 1) กรณีตัวให้ถูกควบคุมด้วยยีนเด่น และ 2) กรณีที่ตัวให้ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย ซึ่งการพิสูจน์ว่ายีนในตัวให้เป็นยีนเด่นหรือด้อย ทำได้จากการนำไปผสมข้ามกับพันธุ์ที่ไม่มีลักษณะนั้น ๆ เช่น ตัวให้มีลักษณะต้านทานโรค ถ้านำไปผสมข้ามกับพันธุ์ที่ไม่ต้านทานโรค แล้วลูกที่ได้แสดงความต้านทานโรคออกมา อาจคาดได้ว่าตัวให้นั้นถูกควบคุมด้วยยีนเด่น แต่ถ้าลูกที่ได้ไม่ต้านทานโรค แสดงว่า ตัวให้ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย ในการพิสูจน์ว่ามียีนควบคุมอยู่กี่คู่ ทำได้โดยการปล่อยให้ผสมตัวเอง 1 ครั้ง แล้วสำรวจอัตราส่วนการกระจายตัวของชั่วที่ F_2 เช่น ถ้ามีจำนวนต้นลักษณะต้านทาน:ไม่ต้านทาน เท่ากับ 3:1 แสดงว่า มียีนควบคุมเพียงยีนเดียว

2. ลูกผสมสายพันธุ์แท้ (recombinant inbred lines; RILs) (กรมการข้าว, 2556) เป็นการนำลูกผสมชั่วที่ F_1 มาปลูกและปล่อยให้ข้าวผสมตัวเองภายในต้นเดียวกันจนได้ประชากรลูกผสมชั่วที่ F_2 แล้วปล่อยให้ผสมตัวเอง ในแต่ละชั่วจะคัดเลือกต้นที่มีลักษณะที่ต้องการจนมีความสม่ำเสมอ การคัดเลือกต้นที่ได้จากวิธีการนี้ จะเป็นการคัดเลือกต้นที่มีลักษณะตรงตามความต้องการของผู้คัดเลือก เช่น สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง คุณภาพเมล็ดดี เป็นไปตามมาตรฐาน มีความสามารถในการต้านทานโรคและแมลง โดยทุกต้นในสายพันธุ์จะมีลักษณะเหมือนกัน

2.7 การคัดเลือกข้าวพันธุ์ผสม

พันธุ์ผสม หมายถึง ข้าวที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ พันธุ์ผสมที่ได้รับการคัดเลือกจากการผสมตัวเองหลายชั่วจะมีลักษณะจีโนไทป์ (genotype) เข้าสู่สภาพโฮโมไซกัส (homozygous) มากขึ้น จนได้เป็นสายพันธุ์แท้ (inbred line) ที่มีพันธุ์กรรมคงที่ (กรมการข้าว, 2556) วิธีการคัดเลือกมี 4 วิธี ดังนี้

1. การคัดเลือกหมู่ (bulk selection) เป็นวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์แท้จากประชากรข้าวพันธุ์ผสม โดยเก็บเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จากการผสมข้ามสายพันธุ์ แล้วเก็บเมล็ดลูกชั่วที่ 2 รวมกันไปปลูกแปลงใหญ่ แล้วปล่อยให้เกิดการคัดเลือกทางธรรมชาติหรือคัดเลือกจากนักปรับปรุงพันธุ์ โดยจะคัดเลือกลักษณะที่ต้องการในแต่ละคู่ผสม เก็บเมล็ดจากกอที่คัดเลือกไว้ นำไปนวดรวมกันแล้วนำไปปลูกรวมในรุ่นต่อไป ทำซ้ำจนได้ชั่วที่ 6 หรือมากกว่า จะได้สายพันธุ์แท้ที่มีความคงตัวทางพันธุกรรม (กรมการข้าว, 2556)

2. การคัดเลือกแบบสืบประวัติ (pedigree selection) เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เพราะสามารถแยกแยะสายพันธุ์ลูกผสม ออกจากประชากรสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่ตั้งแต่วัยเยาว์แรก ๆ สามารถสืบประวัติที่มาของแต่ละสายพันธุ์ได้ว่าสายพันธุ์ที่คัดเลือกนั้นผ่านการผสมตัวเองมาแล้วกี่รุ่น สามารถคาดคะเนความคงที่ทางพันธุกรรมได้ โดยมีวิธีการคือ คัดเลือกต้นข้าวสายพันธุ์ลูกผสม เก็บเกี่ยวแยกกันเป็นกอ ๆ แล้วนำไปปลูกในรุ่นต่อไปเป็นกอดต่อแถว คือนำเมล็ดจากกอที่คัดเลือกมา 1 กอ ไปปลูกเป็น 1 แถว แต่ละแถวจะเป็น 1 สายพันธุ์ การปลูกด้วยวิธีนี้มีข้อดี คือ สามารถสังเกตความสม่ำเสมอของข้าวในแต่ละแถวได้ชัดเจน สามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ง่าย (กรมการข้าว, 2556)

3. การคัดเลือกหมู่ดัดแปลง (modified bulk method selection) เป็นการปรับปรุงการคัดเลือกแบบหมู่โดยมีการคัดเลือกสายพันธุ์แท้ออกจากกลุ่มสายพันธุ์ คือ ในกลุ่มประชากรจะมีการแสดงออกของลักษณะที่แตกต่างกัน นักปรับปรุงพันธุ์จะคัดเลือกต้นที่มีลักษณะที่ตรงตามความต้องการมารวมกัน (กรมการข้าว, 2556)

4. วิธีเก็บหนึ่งเมล็ดต่อต้น (single seed descent) เป็นการประยุกต์มาจากวิธีการจดประวัติ ซึ่งเป็นวิธีการที่เสียเวลาและแรงงานมาก วิธีการปรับปรุงพันธุ์ แบบนี้สามารถปลูกได้นอกฤดูปลูก โดยปลูกในเรือนเพาะชำก็ได้ เท่ากับเป็นการร่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นเข้า วิธีการสำคัญของการปรับปรุงพันธุ์แบบนี้ คือ ปลูกพืชที่ได้จากการผสมพันธุ์ (F_1) ทุกเมล็ด เก็บเมล็ดจากต้นที่ปลูกทุกต้น ต้นละ 2-3 เมล็ด นำเมล็ดที่ได้มาปลูกเป็นหลุม ๆ ละ 1 ต้น (เมล็ดที่เหลือเก็บเอาไว้สำรอง เมื่อการปลูกครั้งแรกไม่ได้ผล) และเก็บเมล็ดจากต้นเหล่านี้ต้นละ 2-3 เมล็ด

และปลูกเพียง 1 เมล็ดต่อต้น ทำเช่นนี้ไปจนถึงชั่วที่ $F_{4.5}$ หรือ F_6 หรือจนแน่ใจว่าพืชเหล่านี้มีความคงตัวทางพันธุกรรมสูงมากพอที่จะเป็นพันธุ์แท้จึงดำเนินการแบบวิธีจดประวัติต่อไป

ในการปรับปรุงพันธุ์วิธีนี้จะเห็นว่าสามารถปลูกเมล็ด F_2 ไว้ได้เป็นจำนวนมาก เพราะใช้เนื้อที่ปลูก (เช่น ในกระถาง ในเรือนเพาะชำ) และแรงงานเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังนั้นการประเมินผลในรุ่นหลัง ๆ น่าจะมีประสิทธิภาพมากกว่าการที่เก็บ F_2 ไว้เป็นจำนวนน้อย เพราะความผันแปรของลูก F_2 จะพบมากขึ้น เมื่อมีต้น F_2 ปลูกเป็นจำนวนมาก นอกจากนั้นยังไม่ต้องจดข้อมูลระหว่างฤดูปลูก เพราะว่ายังไม่ได้กระทำการคัดเลือกจนกว่าพืชเหล่านี้จะมีระดับความเป็นพันธุ์แท้อยู่ในระดับสูงเสียก่อน คือ จนกว่าจะถึงชั่วที่ 6-7 จึงมีการจดบันทึกข้อมูลต่าง ๆ ซึ่งถ้าหากทำการคัดเลือกในชั่วต้น ๆ จะไม่ค่อยได้ผล เพราะจีโนไทป์ของพืชกำลังค่อย ๆ เปลี่ยนไป และประการสำคัญ คือ การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีนี้จะย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์เข้ามาได้อีก (กรมการข้าว, 2556)

2.8 การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม

ในการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมที่มีการผสมกันระหว่างประชากรที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกัน โดยอาศัยหลักการทางพันธุกรรม เช่น กฎของเมนเดลในการอธิบายอัตราส่วนการถ่ายทอดลักษณะที่เกิดขึ้น และเพื่อวัดการกระจายตัวของฟีโนไทป์ (phenotype) หรือเพื่อประเมินการแสดงออกของลักษณะทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในรุ่นต่าง ๆ สามารถใช้การทดสอบทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนการกระจายตัวกับกฎของเมนเดล หรือการมีปฏิสัมพันธ์ของยีนแบบ epistasis โดยการใช้ การทดสอบไคสแควร์ (Chi-square test, χ^2) ดังขั้นตอนต่อไปนี้

2.8.1 การสร้างประชากรลูกที่มีการกระจายตัว

การสร้างประชากรลูกชั่วที่ F_2 ที่มีการกระจายตัวของลักษณะที่ต้องการศึกษา เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์รับและพันธุ์ให้ที่มีจีโนไทป์ (genotype) และฟีโนไทป์ (phenotype) แตกต่างกัน เช่น ในการศึกษาของเมนเดลในการถั่วลิสงเตา การศึกษานี้ช่วยอธิบายการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม เช่น ลักษณะสีเมล็ด (เหลืองและเขียว) และลักษณะรูปร่างเมล็ด (กลมและย่น) ผ่านการผสมพันธุ์ระหว่างต้นพันธุ์ที่มีลักษณะต่างกัน ในการศึกษาลักษณะสองลักษณะพร้อมกัน จะใช้หลักการของการรวมตัวอย่างอิสระ (independent assortment) ของเมนเดล

2.8.2 การวัดการกระจายตัวของฟีโนไทป์ในประชากรลูกที่มีการกระจายตัว (F_2)

การกระจายตัวของฟีโนไทป์ในประชากรลูกชั่วที่ F_2 มักจะถูกวัดในรูปแบบของอัตราส่วน เช่น อัตราส่วนการแสดงออกของลักษณะต่าง ๆ ที่พบในประชากรชั่วที่ F_2 เมื่อมาผสมตนเอง (selfing) ถ้าศึกษาหนึ่งลักษณะ จะมีอัตราส่วนการถ่ายทอดเท่ากับ 3:1 ตามกฎการถ่ายทอดพันธุกรรมของเมนเดล ซึ่งแสดงว่าถูกควบคุมด้วยยีน 1 คู่ หรืออัตราส่วนอื่นตามการแสดงออกของยีนแบบอีพิสเตซิส (epistasis) หรือกรณี 2 ลักษณะ ก็จะมีอัตราส่วนสอดคล้องกับ 9:3:3:1 หรือไม่

2.8.3 การทดสอบไคสแควร์ (Chi-square test, χ^2)

เมื่อมีการสร้างประชากรลูกชั่วที่ F_2 ที่คาดการณ์ไว้ตามกฎของเมนเดลหรือทฤษฎีพันธุกรรมต่าง ๆ สามารถใช้การทดสอบไคสแควร์เพื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนฟีโนไทป์ที่เกิดขึ้นในประชากรชั่วที่ F_2 กับอัตราส่วนที่คาดการณ์จากทฤษฎี เช่น อัตราส่วน 3:1 ซึ่งหากผลจากการทดสอบไคสแควร์ (χ^2) มีค่าต่ำมาก และไม่แตกต่างจากค่าที่คาดการณ์ จะบ่งบอกว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างฟีโนไทป์ที่พบจริงในประชากรกับการคาดการณ์จากทฤษฎีการถ่ายทอดพันธุกรรมของเมนเดล ผลลัพธ์จากการทดสอบไคสแควร์จะสามารถเปรียบเทียบกับค่าตารางการแจกแจงไคสแควร์ เพื่อหาค่าความน่าจะเป็น (p-value) หาก p-value สูงกว่า 0.05 แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการกระจายตัวของฟีโนไทป์ที่พบกับที่คาดการณ์ สมการการทดสอบไคสแควร์ มีดังนี้

ถ้าให้

$$\chi^2 = \sum ((O_i - E_i)^2 / E_i) \text{ โดย } i = 1 \text{ ถึง } k$$

เมื่อ

O_i = ความถี่ที่สังเกตได้จากกลุ่มที่ i , $i = 1, 2, \dots, k$

E_i = ความถี่คาดหวังจากกลุ่มที่ i , $i = 1, 2, \dots, k$

โดย $E_i = NP_i$

N = จำนวนความถี่ทั้งหมด = $\sum O_i = \sum E_i$

P_i = ความน่าจะเป็นที่คาดหมายในเหตุการณ์ที่ i

k = จำนวนกลุ่ม

สมการนี้ใช้ทดสอบว่า การแจกแจงของข้อมูลในตัวอย่างเป็นไปตามการแจกแจงในทฤษฎีที่ตั้งไว้หรือไม่ เช่น การแจกแจงปกติ หรือการแจกแจงแบบไคสแควร์ เป็นต้น

สมการดังกล่าวใช้ในการตรวจสอบว่า ความถี่ที่สังเกตได้แตกต่างจากความถี่ที่คาดหวังอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยถาคค่าที่ได้อยู่ในช่วงของค่าที่น้อยเพียงพอ เกณฑ์ที่ตั้งไว้ก็คือว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างข้อมูลจริงกับข้อมูลคาดหวังในเชิงนัยสำคัญทางสถิติ

2.8.4 การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับอีพิสตาซิส

อีพิสตาซิส (epistasis) เป็นหนึ่งในกลไกสำคัญในทางพันธุศาสตร์ที่อธิบายการปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อการแสดงออกของลักษณะทางฟีโนไทป์ของสิ่งมีชีวิต การศึกษาอีพิสตาซิสช่วยให้นักวิจัยเข้าใจความซับซ้อนของลักษณะเชิงพันธุกรรม โดยเฉพาะในลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative traits) และโรคที่มีหลายยีนเข้ามาเกี่ยวข้อง (polygenic diseases) (Phillips, 2008)

อีพิสตาซิส หมายถึง การที่การแสดงออกของยีนหนึ่งถูกยับยั้งหรือได้รับผลกระทบจากยีนอื่น ซึ่งอาจอยู่ในตำแหน่งที่แตกต่างกันบนโครโมโซม การศึกษาปรากฏการณ์นี้ พบว่าการปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนมีผลอย่างมากต่อความแปรผันของลักษณะทางพันธุกรรม และไม่สามารถอธิบายได้ด้วยผลของยีนเดี่ยว (Moore, 2005)

อีพิสตาซิสสามารถจำแนกออกเป็นหลายประเภท ได้แก่ 1) dominant epistasis: ยีนเด่นหนึ่งตำแหน่งสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนในอีกตำแหน่ง เช่น ยีนสีของพืชข้าวโพดบางสายพันธุ์ 2) recessive epistasis: ยีนด้อยหนึ่งตำแหน่งต้องอยู่ในรูปแบบ homozygous recessive จึงจะสามารถกลบลักษณะของอีกยีนได้ เช่น สีขนของหนู และ 3) duplicate epistasis: ยีนสองตำแหน่งมีหน้าที่เหมือนกัน การมียีนใดก็ตามหนึ่งตำแหน่งก็เพียงพอที่จะทำให้เกิดลักษณะนั้น (Cordell, 2002)

2.8.5 ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. การศึกษาของ Fairbanks et al. (2016) จากงานวิจัยเรื่อง Mendelian genetics and the principles of inheritance in pea plants ซึ่งงานวิจัยนี้สำรวจการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมในถั่วลันเตา โดยอ้างอิงถึงกฎของเมนเดล และการใช้สถิติเพื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของฟีโนไทป์ในประชากร F_2 นักวิจัยได้วิเคราะห์การถ่ายทอดลักษณะเด่นและลักษณะด้อยในถั่วลันเตา โดยใช้การทดสอบไคสแควร์เพื่อยืนยันความถูกต้องของการคาดการณ์ตามกฎของเมนเดล ผลการศึกษาชี้ให้เห็นถึงความสอดคล้องระหว่างข้อมูลที่ได้จากการทดลองและทฤษฎีของเมนเดล ซึ่งยืนยันถึงความถูกต้องของกฎการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมที่เมนเดลได้เสนอไว้

2. การศึกษาของ Lynch and Walsh (1998) จากงานวิจัยเรื่อง Genetics and analysis of quantitative traits ได้สำรวจการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีน (epistasis) และอิทธิพลของมันต่อการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม โดยเน้นการวิเคราะห์ลักษณะเชิงปริมาณ นักวิจัยได้เสนอแนวทางการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อศึกษาการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีน และผลกระทบของมันต่อฟีโนไทป์ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า อีพิสตาซิสมีบทบาทสำคัญในการกำหนดลักษณะเชิงปริมาณ และการวิเคราะห์ที่แม่นยำจำเป็นต้องพิจารณาการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนเพื่อเข้าใจกลไกทางพันธุกรรม

3. การใช้การทดสอบไคสแควร์ในการวิเคราะห์การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมในการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจำเป็นต้องตรวจสอบว่า อัตราส่วนที่ได้จากการทดลองตรงกับทฤษฎีที่ตั้งไว้หรือไม่ การทดสอบไคสแควร์ (Chi-square test) เป็นเครื่องมือทางสถิติที่ใช้ในการยืนยันความถูกต้องของการคาดการณ์ตามกฎของเมนเดลหรือการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนที่เป็นอีพิสตาซิส การใช้การทดสอบนี้ช่วยให้นักวิจัยสามารถประเมินความสอดคล้องระหว่างข้อมูลที่ได้จากการทดลองและทฤษฎีทางพันธุกรรมที่ตั้งไว้ (McClean, (n.d.))

2.9 การศึกษาพันธุ์และการทดสอบผลผลิต

การศึกษาพันธุ์ (observation) (กรมการข้าว, 2556) เป็นการนำสายพันธุ์ข้าวมาปลูกศึกษาลักษณะทางการเกษตร บันทึกการกระจายตัวทางพันธุกรรม เช่น ลักษณะทรงต้น วันออกดอก ใบ ลักษณะเมล็ด ว่ามีการกระจายตัวทางพันธุกรรมมากน้อยเพียงใด โดยแบ่งเป็นขั้นตอนย่อย 2 ขั้นตอน คือ

1.1 การศึกษาพันธุ์ขั้นต้น (2-row observation) เป็นการเก็บรวบรวมข้าวสายพันธุ์ที่ต้องการศึกษามาสายพันธุ์ละ 3 – 5 กอ มาปลูกแบบ 2 แถวต่อสายพันธุ์ แถวละ 5 เมตร ระยะระหว่างกอ คือ 25 x 25 เซนติเมตร ทุก 10 สายพันธุ์ทดสอบ ปลูกคั่นด้วยพันธุ์เปรียบมาตรฐานเพื่อศึกษาลักษณะทางการเกษตร และความคงตัวทางพันธุกรรม หากพบสายพันธุ์ที่มีความคงตัวทางพันธุกรรมแล้ว จะเก็บเกี่ยวกอที่ดีที่สุด เหมือนกันที่สุด สายพันธุ์ละ 3 – 5 กอ นำมารวมกันเพื่อไปปลูกศึกษาขั้นสูงต่อไป หากยังพบการกระจายตัวทางพันธุกรรมอยู่จะคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะที่ต้องการ และเก็บเกี่ยวเพื่อปลูกคัดเลือกแบบสืบประวัติในรุ่นต่อไป

1.2 การศึกษาพันธุ์ขั้นสูง (4-row observation) เป็นการนำเมล็ดที่มีความคงตัวทางพันธุกรรมแล้วมาปลูกแบบ 4 แถวต่อสายพันธุ์ ในทุก ๆ 10 สายพันธุ์ จะปลูกคั่นด้วยพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ โดยทำการทดลองซ้ำเพียง 1 – 2 ซ้ำ เท่านั้น เป็นศึกษาความคงตัวทางพันธุกรรมในประชากรที่มีจำนวนเพิ่มขึ้นจากการศึกษาพันธุ์ขั้นต้น เช่น ความสูงของต้น อายุ

การออกดอก สีใบ สีเมล็ด หากพบว่าสม่ำเสมอจะเก็บเกี่ยว 2 แถว กลางเว้นกอหัว และท้ายแถว เพื่อประเมินผลผลิตเบื้องต้น และใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ในการเปรียบเทียบผลผลิตในสถานี

การทดสอบผลผลิต (yield trials) ข้าวสายพันธุ์ที่คงตัวทางพันธุกรรม ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ 1) การเปรียบเทียบผลผลิตภายในสถานี (intra-station yield trial) 2) การเปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสถานี (inter-station yield trial) และ 3) การเปรียบเทียบผลผลิตในนารายณ์ (farmer's field yield trial)

ในส่วนของการเปรียบเทียบผลผลิตมีขั้นตอน ดังนี้

1. การเปรียบเทียบผลผลิตภายในสถานี (intra-station yield trial) เป็นการปลูกข้าวสายพันธุ์ทดสอบเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์เปรียบเทียบในพื้นที่ของสถานี โดยจะเก็บเกี่ยวผลผลิตที่ได้ ไปตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพและทางเคมี ทั้งยังตรวจสอบความต้านทานต่อโรคและแมลง แล้วจึงวิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างทางสถิติระหว่างสายพันธุ์ทดสอบและพันธุ์เปรียบเทียบ โดยจะคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง ทรงต้นดี คุณภาพเมล็ดดี และมีความสามารถในการต้านทานโรคและแมลง เพื่อไปเปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสถานีต่อไป

2. การเปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสถานี (inter-station yield trial) เป็นการปลูกข้าวสายพันธุ์ทดสอบเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์เปรียบเทียบในพื้นที่ของแต่ละกลุ่มสถานีหรือเครือข่าย จำนวนหลายสถานี โดยบันทึกวันออกดอก สุ่มนับการแตกกอ จำนวนรวง ความสูงจากพื้นดินถึงปลายรวง แปลงละ 10 กอ หลังจากเก็บเกี่ยวผลผลิตจะทำการนวด ผัด ชั่งน้ำหนัก และวัดความชื้นของเมล็ด จากนั้นแบ่งเมล็ดเพื่อตรวจสอบคุณภาพทั้งทางกายภาพและเคมี อีกทั้งยังตรวจสอบความต้านทานต่อโรคและแมลง แล้วจึงวิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างทางสถิติระหว่างสายพันธุ์ทดสอบและพันธุ์เปรียบเทียบในการทดลองเดียวกันของแต่ละสถานี ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสม่ำเสมอ มีคุณภาพที่ดี และมีความสามารถในการต้านทานโรคและแมลง เพื่อไปเปรียบเทียบผลผลิตในนารายณ์ต่อไป

3. การเปรียบเทียบผลผลิตในนารายณ์ (farmer's field yield trial) เป็นการประเมินผลผลิตขั้นสุดท้าย เพื่อทดสอบความสามารถในการให้ผลผลิตในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ แบ่งเป็น 2 รูปแบบ คือ แบบหว่าน และแบบปักดำ โดยจะทำการปลูกในพื้นที่นาของชาวนา ซึ่งจะบันทึกข้อมูล คือ จำนวนรวงต่อกอ ความสูงของต้น อายุวันออกดอก วันเก็บเกี่ยว การล้ม การแตกกอ เป็นต้น เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี และเป็นข้าวสายพันธุ์ดีเด่น

2.10 เครื่องหมายดีเอ็นเอและการใช้เครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก

การใช้เครื่องหมายพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์จะมีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ศึกษาโครงสร้างของจีโนม เพื่อค้นหายีน/QTL ที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการศึกษา เพื่อให้ได้เครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับลักษณะที่สนใจศึกษา เรียกว่า เครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection; MAS)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นตำแหน่งบนโครโมโซมที่ใช้ในการอ้างอิงไปยังตำแหน่งของยีนที่สนใจศึกษา เมื่อมีการสร้างแผนที่ทางพันธุกรรม สำหรับนักปรับปรุงพันธุ์ที่ต้องการทราบถึงลิงค์เกจ (linkage) หรือการเชื่อมโยง (association) ของเครื่องหมายกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่นักปรับปรุงพันธุ์ต้องการศึกษา ซึ่งการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมจะง่ายต่อการติดตามการมีอยู่ของยีนที่เชื่อมโยงกับลักษณะการแสดงออกทำให้ง่ายต่อการคัดเลือกลักษณะดังกล่าว (ตำแหน่งของเครื่องหมายมีตำแหน่งใกล้เคียงกับยีนที่สนใจศึกษาบนโครโมโซม) ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์พืช นักปรับปรุงพันธุ์สามารถคัดเลือกลักษณะที่ต้องการผ่านการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมได้ หากมีการค้นพบ/ตรวจสอบความเชื่อมโยงของตำแหน่งบนโครโมโซมและเครื่องหมายพันธุกรรมได้ จะเป็นการย่นระยะเวลา สามารถทำการคัดเลือกได้รวดเร็วและมีความแม่นยำมากขึ้น ซึ่งเครื่องหมายพันธุกรรมสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) เป็นเครื่องหมายที่มีการแสดงออกที่ชัดเจนเมื่อฟีโนไทป์อยู่ในระยะเติบโตอย่างเต็มที่ ซึ่งเป็นผลของความสัมพันธ์ระหว่างยีนและสภาพแวดล้อม เช่น รูปร่างเมล็ด และสีดอก

2. เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นตำแหน่งบนสายดีเอ็นเอที่ทราบรูปแบบของอัลลีลและสามารถตรวจสอบได้ในทุกระยะของการเติบโต

ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถจำแนกออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่

1. ยีนตำแหน่งเดียว หลายอัลลีล เครื่องหมายแบบข่มร่วม (single locus, multi allelic, co-dominant marker) เช่น restriction fragment length polymorphism (RFLP) และ microsatellites หรือ simple sequence repeat (SSR) ซึ่ง SSR มีความสามารถในการตรวจจับ polymorphism ในระดับที่สูงกว่า RFLPs

2. ยีนหลายตำแหน่ง อัลลีลเดียว เครื่องหมายแบบข่ม (multi-locus, single allelic, dominant marker) เช่น amplified fragment length polymorphism (AFLP) และ random amplified polymorphic DNA (RAPD)

การใช้เครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์พืช สามารถทำได้หลายวัตถุประสงค์ เช่น

1. ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) เนื่องจากความสำเร็จของการปรับปรุงพันธุ์ขึ้นอยู่กับขนาดของเชื้อพันธุกรรมเริ่มต้นในการปรับปรุงพันธุ์ จึงใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกเชื้อพันธุกรรม การพัฒนาแผนที่ความเชื่อมโยงของตำแหน่งยีนกับเครื่องหมายบนโครโมโซม ซึ่งการศึกษานี้จะทำให้นักปรับปรุงพันธุ์สามารถคัดเลือกพันธุ์พ่อแม่ที่เหมาะสมได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยลักษณะทางโมเลกุลจะช่วยคัดเลือกพ่อแม่ที่เข้ากันได้ในระดับพันธุกรรม นอกจากนั้นเครื่องหมายโมเลกุลยังประโยชน์ในการระบุตำแหน่งของลักษณะทางปริมาณ ซึ่งเรียกว่า quantitative traits loci (QTLs)

การแยกความแตกต่างทางสายพันธุ์ของสายพันธุ์พ่อและแม่ ซึ่งเรียกเครื่องหมายดีเอ็นเอ นั้นว่า polymorphic marker สามารถแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ ไฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัส ได้แก่ 1) เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบซ้ำร่วม บ่งบอกความสามารถได้จากแถบของขนาดดีเอ็นเอ 2) เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบซ้ำสมบูรณ์ บ่งบอกความแตกต่างได้จากการปรากฏ และไม่ปรากฏจากแถบของดีเอ็นเอ และ 3) เครื่องหมายที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างทางสายพันธุ์ของพ่อและแม่ได้ เรียกว่า monomorphic maker

2. การเกิดอินโทรเกรสชัน (introgression) อย่างรวดเร็วของลักษณะที่ถ่ายทอดได้ง่าย การเกิดอินโทรเกรสชันจากพันธุ์ป่าไปยังฐานพันธุกรรมอื่น ซึ่งต้องผ่านการผสมกลับหลายรอบ ทำให้ใช้เวลานาน และการเกิดลิงค์เกจจากลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ที่ติดมากับลักษณะที่ต้องการ จึงจำเป็นต้องเพิ่มจำนวนครั้งในการผสมกลับให้มากขึ้น แต่หากใช้เครื่องหมายพันธุกรรมและการวิเคราะห์ QTL ของจีโนมไทป์ของพันธุ์ป่าที่ประกอบด้วยยีนที่ต้องการจะสามารถระบุได้แม่นยำมากขึ้น และลดลิงค์เกจที่ไม่ต้องการได้

3. การแก้ปัญหาด้วยวิธีใหม่ที่ไม่สามารถจัดการปัญหาด้วยวิธีการแบบดั้งเดิม หรือการแก้ปัญหาด้วยวิธีการผสมพันธุ์แบบมาตรฐาน เมื่อลิงค์เกจเป็นยีนแฝงและมีระยะที่ใกล้ชิดมาก จำนวนรอบของการผสมกลับที่เพิ่มขึ้นอาจไม่สามารถตรวจพบยีนที่สนใจ และเอาลิงค์เกจที่ไม่ต้องการออกไปได้ ดังนั้นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลสามารถแก้ปัญหาได้ โดยพืชพันธุ์ใหม่สามารถเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการผ่านเทคนิคพีระมิดยีน (gene pyramiding)

4. การระบุพันธุ์พืช เครื่องหมายโมเลกุลมีประสิทธิภาพในการระบุพันธุ์เพื่อป้องกันการละเมิดลิขสิทธิ์พืชได้

ปัจจุบันได้มีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรมาใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกพันธุ์ และปรับปรุงพันธุ์ เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์ได้

ในการคัดเลือกพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ มีความสะดวก รวดเร็ว และแม่นยำกว่าการสังเกตลักษณะจากภายนอก หรือลักษณะของพันธุ์ซึ่งปรากฏออกมา นอกจากนี้การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอยังสามารถช่วยลดระยะเวลา พื้นที่ และแรงงานในการปรับปรุงพันธุ์ได้อีกด้วย (จิราพร แก่นทรัพย์ และคณะ, 2563)

คุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอ

ปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคในเครื่องหมายดีเอ็นเออย่างรวดเร็ว และปริมาณมากในเวลาสั้น ๆ โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ดีควรมีลักษณะ ดังนี้ มีเครื่องหมายจำนวนมาก แสดงโพลีมอร์ฟิซึมสูง มีการถ่ายทอดแบบข่มร่วม มีการกระจายทั่วทั้งจีโนม มีความเสถียรภาพสูง คือเป็นกลาง ไม่สับสนของต่อสภาพแวดล้อมได้ง่าย ทำซ้ำได้ผลเหมือนเดิม ใช้งานง่าย วิเคราะห์ง่าย รวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายต่ำ สามารถนำไปใช้ระหว่างห้องปฏิบัติการ หรือในประชากรอื่น ๆ ได้ เป็นต้น การเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานวิจัยถือเป็นวิธีการที่สะดวก รวดเร็ว สามารถคัดเลือกได้ในทุกระยะการเติบโตของพืช และไม่มีผลกระทบจากสิ่งแวดล้อม นอกจากนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอยัง ใช้เป็นข้อมูลสำหรับวิเคราะห์ตำแหน่งยีน และการสร้างแผนที่ยีน (gene mapping) ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญที่ช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์ทราบถึงจำนวน ตำแหน่ง และอิทธิพลของยีนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพื่อเป็นแนวทางในการผนวกรวมยีนเหล่านั้นมาสร้างพืช สายพันธุ์ใหม่ได้อย่างรวดเร็ว (จุฑาพร แสงประจักษ์, 2555)

2.11 ขั้นตอนการทำแผนที่ทางพันธุกรรม

ในอดีตที่ผ่านมา การทำแผนที่ยีนหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ควบคุมลักษณะปริมาณ (QTL mapping) เพื่อระบุตำแหน่งบนโครโมโซมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะเป้าหมาย จะใช้ประชากรที่เป็นพ่อแม่ร่วมกัน แต่ในปัจจุบัน มีการทำ association mapping ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการคัดเลือกลักษณะเป้าหมาย โดยศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลำดับเบสที่แตกต่างกันในจีโนมของกลุ่มประชากรหนึ่ง ๆ ต่อลักษณะฟีโนไทป์หนึ่ง ๆ ที่มีความแตกต่างกัน โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดที่มีความถี่ในจีโนมสูงและมีคุณภาพสูง เช่น เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด single nucleotide polymorphism (SNP) การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือกพันธุ์รุ่นแรก ๆ จะเป็นการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RFLP, AFLP, RAPD และ SSR ซึ่งมีความถี่ในจีโนมต่ำกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SNP ที่นิยมใช้มากขึ้นในปัจจุบัน (จิราพร แก่นทรัพย์, 2563) ตัวอย่างเช่น การผนวกรวมยีนที่ควบคุมลักษณะดีต่าง ๆ เข้าด้วยกันในพืชต้นเดียวกัน หรือเรียกว่า gene pyramiding เช่น การผนวกรวมยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง โรคไหม้ และยีนความต้านทานแมลงบั่วในข้าว เป็นต้น (กรมวิชาการเกษตร, 2543)

ขั้นตอนของการใช้ QTL สำหรับเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก (MAS) เริ่มจากการพัฒนาประชากรจากการคัดเลือกพันธุ์พ่อแม่และประชากรที่ผ่านการผสมข้าม เมื่อได้ประชากรแล้วจึงจัดทำแผนที่ QTL โดยเริ่มจากการวิเคราะห์ QTL การทำเครื่องหมายลิงค์เกจ ประเมินลักษณะที่แสดงออกที่สนใจ (ฟีโนไทป์) จากนั้นทำการตรวจสอบ QTL จากการยืนยันตำแหน่งและผลของ QTL ตรวจสอบ QTL ในประชากรอิสระ ทดสอบตามหลักการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม ทำแผนที่ความละเอียดสูง จากนั้นทำการตรวจสอบเครื่องหมาย ประกอบด้วยทดสอบเครื่องหมายในเชื้อพันธุกรรมที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่สนใจ ทำให้ได้ MAS ที่มีความสามารถในการจำแนกเครื่องหมายที่มีความใกล้ชิดที่ใช้ติดตามลักษณะที่สนใจในการศึกษา เช่น

จากการศึกษาของ Galeng-Lawilao (2018) ในการทำแผนที่ QTL ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อไส้เดือนฝอยในข้าวเอเชีย โดยได้ศึกษาในประชากรข้าวลูกผสมสายพันธุ์แท้ 300 สายพันธุ์ จากคู่ผสมระหว่าง IR78877-208-B-1-2 ซึ่งเป็นข้าวที่มีความสามารถในการต้านทานไส้เดือนฝอย และ IR64 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่ได้รับความนิยม และให้ผลผลิตสูง แต่อ่อนแอต่อไส้เดือนฝอย โดยได้ทำการวิเคราะห์ QTL ดำเนินการโดยใช้ SNP จำนวน 131 ตำแหน่ง และ SSR จำนวน 33 เครื่องหมาย จากการศึกษาสามารถระบุ QTL ได้ 3 ตำแหน่ง อยู่บนโครโมโซม 4 (*qMGR 4.1*), 7 (*qMGR 7.1*) และ 9 (*qMGR 9.1*) และพบปฏิสัมพันธ์แบบเอพิสตาซิส 2 ตำแหน่ง ได้แก่ *qMGR 3.1* กับ *qMGR 11.1* และ *qMGR 4.2* กับ *qMGR 8.1* ที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ของไส้เดือนฝอย (*Meloidogyne graminicola*) และพบ QTL ที่ควบคุมความทนทานต่อไส้เดือนฝอยบนโครโมโซม 5 (*qYR 5.1*) และ 11 (*qYR 11.1*)

ปัจจุบันมีการปรับเปลี่ยนการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อนำมาช่วยคัดเลือกจากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ไม่ทราบหน้าที่มาเป็น functional marker ที่แตกต่างจากอัลลีลอื่น ๆ เป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นหรือหายไปของเบส เรียกว่า insertion-deletion (indel) polymorphisms หรือ single nucleotide polymorphism (SNP) ได้นำมาใช้ในกาปรับปรุงพันธุ์ในปัจจุบันมากขึ้น (สุริพร เกตุงาม, 2546)

จากการศึกษาของ Siripom Korinsak (2009) ในการวิเคราะห์ผลจากตาราง ANOVA และค่าสหสัมพันธ์ระหว่างผลจีโนไทป์และผลฟีโนไทป์ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สอดคล้องกับตำแหน่งของจีโนม และรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แสดงออก พบว่าการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง ฟีโนไทป์ – จีโนไทป์ โดยใช้ ANOVA และการวิเคราะห์ค่าถดถอยในประชากรลูกผสมกลับช่วงที่ $BC_2F_{2,3}$ จากคู่ผสมระหว่าง PK และ Ba7 ลักษณะของอัลลีลมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 8 จาก 9 เครื่องหมายมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.01 สามารถแปลความหมายได้ว่า ตำแหน่งบนโครโมโซมมีความสัมพันธ์กับลักษณะที่แสดงออก ซึ่งสามารถติดตามการแสดงออกของลักษณะดังกล่าวได้จากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการติดตามยีนที่ควบคุมลักษณะดังกล่าว

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1. ตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา

3.1.1 ข้าวพันธุ์รับ และพันธุ์ให้ที่ใช้ในการศึกษา

3.1.1.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์แม่

ในการสร้างประชากรชั่วที่ F_2 สำหรับการศึกษาอัตราการถ่ายทอดความต้านทานจากเหมยนอง 62 เอ็ม และ กข22 พันธุ์ข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์แม่เป็นข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ ได้แก่ PYO16-001-3-24B

สำหรับการสร้างประชากรชั่วที่ $F_{4.5}$ พันธุ์ข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์แม่เป็นข้าวเหนียวหอมและไม้หอมสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ ประกอบด้วย 5 สายพันธุ์ ได้แก่

1. PYO12-001-8-6-3-7-3-4B
2. PYO13-034-12-65-2-2-1B
3. PYO13-034-12-66-17-16-1B
4. PYO16-003-93-11-6B
5. PYO16-012-140-4-7B

3.1.1.2 พันธุ์ข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อ

พันธุ์ข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อในการพัฒนาประชากรในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วยข้าว 2 พันธุ์ ได้แก่

ข้าวพันธุ์เหมยนอง 62 เอ็ม (MN62M) เป็นข้าวเหนียวพื้นเมืองของประเทศไทย ไรต์ต่อช่วงแสง มี $qGM12$ ซึ่งเป็น QTL ความต้านทานแมลงบั่ว (กรมการข้าว, 2559; Leelagud, et al., 2020)

ข้าวพันธุ์ กข22 (RD22) เป็นข้าวเหนียวหอมพันธุ์ปรับปรุง ไม่ไวต่อช่วงแสง และมีความสามารถในการต้านทานแมลงบั่ว (กรมการข้าว, 2559ค)

3.1.2 ข้าวพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ

3.1.2.1 การทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่ว ในประชากรชั่วที่ F_2 จากคู่ผสม 2 คู่ ได้แก่

1. PYO16-001-3-24B X เหมยนอง 62 เอ็ม
2. PYO16-001-3-24B X กข22

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบพันธุ์กรรมความต้านทานต่อแมลงบั่วในข้าวเหนียว 62 เอ็ม และ กข22 โดยจะใช้พันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ 3 สายพันธุ์/พันธุ์ ได้แก่ PYO16-001-3-24B, เหมยนอง 62 เอ็ม และ กข22

3.1.2.2 การทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วในประชากรข้าวชั้วที่ $F_{4:5}$ จากกลุ่มผสม 4 คู่ ได้แก่

1. PYO12-001-8-6-3-7-3-4B X กข22
2. PYO13-034-12-65-2-2-1B X กข22
3. PYO16-012-140-4-7B X กข22
4. PYO16-012-140-4-7B X เหมยนอง 62 เอ็ม

จะใช้พันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ 6 สายพันธุ์/พันธุ์ ได้แก่ PYO12-001-8-6-3-7-3-4B, PYO13-034-12-65-2-2-1B, PYO16-03-93-11-6B, PYO16-012-140-4-7B, เหมยนอง 62 เอ็ม และ กข22

การทดสอบผลผลิตเบื้องต้นในประชากรรุ่น $F_{4:5}$ จาก 4 กลุ่มผสม ได้แก่

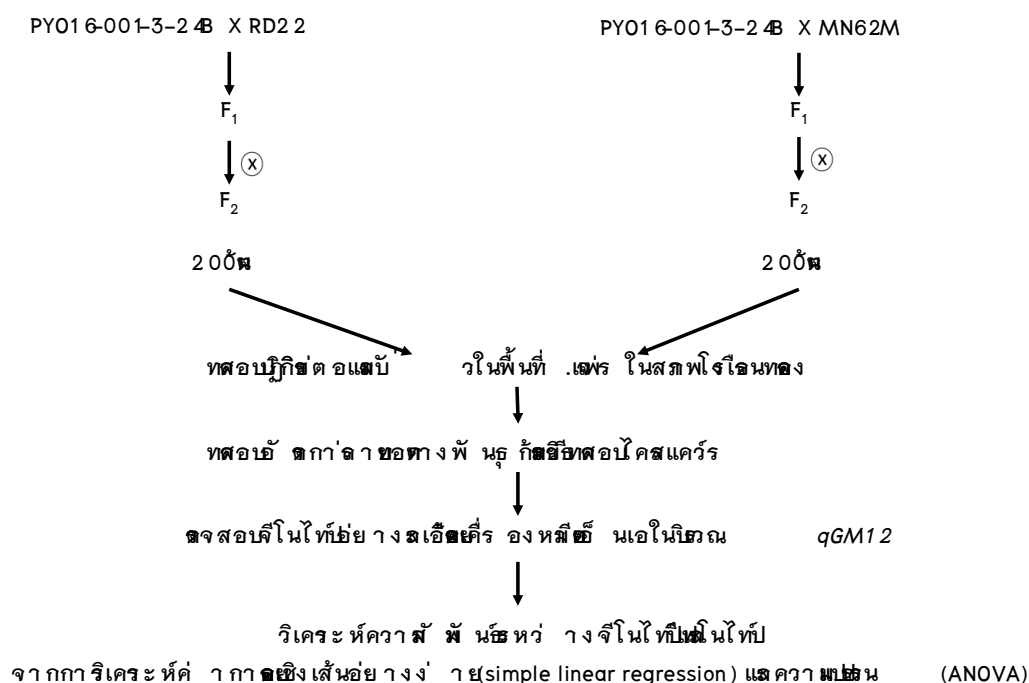
1. PYO12-001-8-6-3-7-3-4B X กข22
2. PYO13-034-12-65-2-2-1B X กข22
3. PYO16-012-140-4-7B X กข22
4. PYO16-012-140-4-7B X เหมยนอง 62 เอ็ม

โดยมีพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ 7 สายพันธุ์/พันธุ์ ได้แก่ สันป่าตอง 1, กข 6, กข22, ไรซ์เบอร์รี่, PYO13-034-12-65-2-2-1B, PYO12-001-8-6-7-3-4B และ PYO16-012-140-4-7B

3.2 วิธีการทดลอง

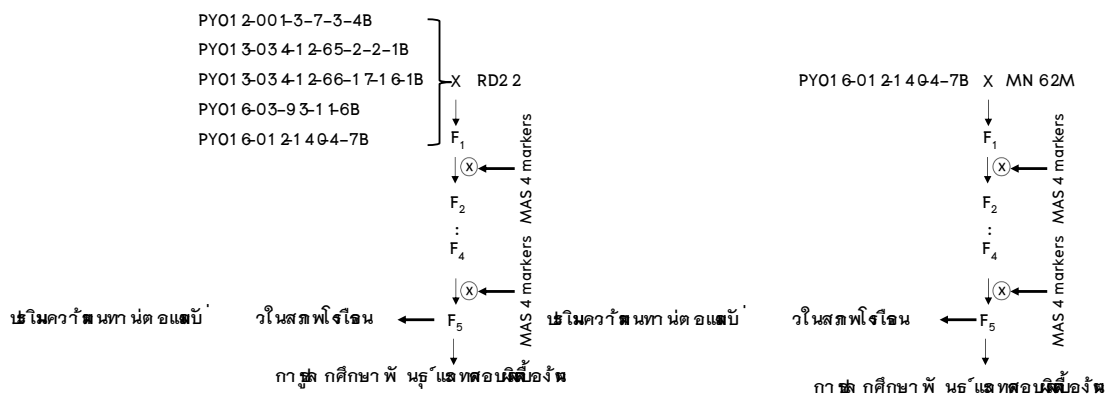
3.2.1 การเปรียบเทียบพันธุ์กรรมความต้านทานต่อแมลงบั่วในข้าวเหนียว 62 เอ็ม และ กข22 มีขั้นตอน ดังนี้

1. การสร้างประชากรชั้วที่ F_2 จำนวน 2 ประชากร จากกลุ่มผสมจำนวน 2 คู่ โดยใช้ข้าวเหนียวหอมสายพันธุ์ PYO16-001-3-24B เป็นพันธุ์รับ และใช้ข้าวเหนียวพันธุ์เหนียว 62 เอ็ม และ กข22 เป็นพันธุ์ให้ จำนวนคู่ละประมาณ 200 ต้น นำมาทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่ว จังหวัดแพร่ ในโรงเรือนทดลอง ณ ศูนย์วิจัยข้าวแพร่ จ.แพร่ (ภาพ 3)



ภาพ 3 การสร้างประชากรช่วงที่ F₂ เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบพันธุกรรมความต้านทานแมลงบั่วระหว่างเหเมยหนอง 62 เอ็ม (MN62M) และ กข22 (RD22) ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้

2. การพัฒนาประชากรข้าวเหนียวหอมลูกผสมสายพันธุ์แท้ (RILs) ให้มี qGM12 ที่ควบคุมความต้านทานต่อแมลงบั่ว โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการช่วยคัดเลือก โดยสร้างประชากรจากคู่ผสมจำนวน 6 คู่ เมื่อได้ประชากรช่วงที่ F₁ ทำการคัดเลือกสายพันธุ์จากการตรวจจีโนมไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ 4 เครื่องหมาย ได้แก่ Aromarker, RM110, RM3340 และ RM6800 ร่วมกับการคัดเลือกจากลักษณะทางการเกษตรที่ดีจนถึงช่วงที่ F_{4:5} จากนั้นทำการทดสอบปฏิบัติต่อแมลงบั่วในสภาพโรงเรือนทดลองกับประชากรแมลงบั่วในจังหวัดแพร่ น่าน และเชียงราย ณ ศูนย์วิจัยข้าวแพร่ จ.แพร่ และปลูกศึกษาพันธุ์ และทดสอบผลผลิตเบื้องต้นในประชากรช่วงที่ F_{4:5} ณ แปลงทดลองบ้านแม่กาหลวง ต.แม่กา อ.เมือง จ.พะเยา (ภาพ 4)



ภาพ 4 การพัฒนาประชากรข้าวเหนียวหอมลูกผสมสายพันธุ์แท้ (RILs) ให้มี *qGM12* ที่ควบคุมความต้านทานต่อแมลงข้าว โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการช่วยคัดเลือก

3.2.2 การตรวจจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

เพาะเมล็ดข้าวหึ่งอก ทำการตัดตัวอย่างใบอ่อนของข้าวมาสกัดดีเอ็นเอและนำมาตรวจจีโนไทป์ ดังขั้นตอนต่อไปนี้

3.2.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการเก็บตัวอย่างใบอ่อนจากต้นข้าวที่ต้องการตรวจสอบจีโนไทป์ไปสกัดดีเอ็นเอตามวิธี DNATrap® ของห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน (ภาคผนวก ก วิธีการสกัดดีเอ็นเอ) เพื่อตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งอยู่บน *qGM12* สำหรับการคัดเลือกลำต้นที่มี *qGM12*

3.2.2.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายด้วยวิธี PCR

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นข้าวมาเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ 4 ตำแหน่ง ดังตาราง 2

องค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR จะใช้ตามวิธีของ (Yi, et al., 2012) ซึ่งแสดงในตาราง 3

ตาราง 2 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากรข้าวเหนียวข้าวต่าง ๆ เพื่อตรวจสอบการคงอยู่ของ QTL ด้านทานแมลงบัว (*qGM12*) และยีนความหอม (*badh2*)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ	โครโมโซม	ยีน/QTL	ลักษณะ	ขนาดผลผลิต PCR (bp)	อ้างอิง
Aromarker	8	<i>badh2</i>	fragrance	320	Vanavichit et al., (2004); Wanchana et al., (2005); ไวพจน์ กันจุ และคณะ (2556)
RM110	2	<i>qGM12</i>	RGM	156	Leelagud et al., (2020)
RM3340	2	<i>qGM12</i>	RGM	117	Leelagud et al., (2020)
RM6800	2	<i>qGM12</i>	RGM	158	Leelagud et al., (2020)

ตาราง 3 องค์ประกอบของสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

สารองค์ประกอบ	ปริมาตร 1X (μl)
10X PCR buffer	1.00
dNTPs (1 mM)	0.20
MgCl ₂ (50 mM)	0.80
forward primer (10 μmol)	0.50
reverse primer (10 μmol)	0.50
Taq polymerase (5U)	0.10
gDNA (20 ng/μL)	2.00
dH ₂ O	4.90
ปริมาตรรวม	10.00

3.2.2.3 สภาพปฏิกิริยา PCR เพื่อการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย

โดยเริ่มจากการขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอเกลียวคู่เป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว (denaturation) ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิเป็นอุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน primer annealing โดยการลดอุณหภูมิเพื่อให้เกิดการเข้าคู่กันของเบสระหว่างไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้อุณหภูมิ 55°C นาน 30 วินาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน extension เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ หรือเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอให้มากขึ้น โดยใช้อุณหภูมิ 72°C นาน 2 นาที โดยจะกระทำการจนครบวงจรทั้งหมด 35 รอบ และรักษาผลผลิต PCR ไว้ที่ 4°C

95°C	5 min	} 35 cycles
95 °C	30 sec	
55°C	30 sec	
72°C	2 min	
72°C	5 min	

3.2.2.4 การตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ

นำผลผลิต PCR มาเติม bromothymol blue 6 μ l แล้วทำให้เสียสภาพเป็นเส้นเดี่ยวที่อุณหภูมิ 75°C นาน 5 นาที แล้ววางในน้ำแข็งทันทีนาน 5 นาที แล้วดูผลผลิต PCR มา 5 μ l ใส่ในช่องเจลอะคริลลาไมด์ จากนั้นแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งวิธี denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) โดยใช้เจลอะคริลลาไมด์ความเข้มข้น 4.5% สัดส่วน acrylamide:bis-acrylamide เท่ากับ 29:1 ความละเอียดของเจลชนิดนี้สูง จะใช้ผลผลิต PCR ที่มีความแตกต่างกันมากกว่า 5 bp และย้อมเจลด้วยวิธี silver staining (วิธีการเตรียมเจล PAGE และวิธีการย้อมเจล PAGE แสดงในภาคผนวก ข)

3.2.2.5 การแปลผลและการคัดเลือกต้นเป้าหมาย

หลังจากนั้นทำการอ่านผลรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ (band reading) โดยนำภาพเจลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ gel electrophoresis มาเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอของพ่อและแม่ในแต่ละชั่วของแต่ละประชากร โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อติดตามการมีอยู่ของยีนเป้าหมาย

ในประชากรข้าวชั่วที่ F₂ ถ้าแสดงแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ เหมือนข้าว PYO16-001-3-24B แสดงว่า มีจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัสเหมือนข้าวพันธุ์รับจะให้แทนเป็น 1 ถ้าแสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ โดยเหมือนข้าว PYO16-001-3-24B 1 แถบ และเหมือนพันธุ์ให้ 1 แถบ (เหมยนอง 62 เอ็ม หรือ กข22) แสดงว่า มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัส จะให้แทนเป็น 2 และถ้าแสดงแถบดีเอ็นเอ 1 แถบเหมือนข้าวเหมยนอง 62 เอ็ม หรือ กข22 แสดงว่า มีจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัสเหมือนข้าวพันธุ์ให้ จะให้แทนเป็น 3 โดยข้อมูลเหล่านี้จะใช้เป็นข้อมูลจีโนไทป์เพื่อวิเคราะห์ต่อไป

ในประชากรข้าวชั่วที่ F_{4:5} ถ้าแสดงแถบดีเอ็นเอ 1 แถบเหมือนข้าวพันธุ์รับ แสดงว่า มีจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัสจะให้แทนเป็น 1 ถ้าแสดงแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ โดยเหมือนข้าวพันธุ์รับ 1 แถบ และเหมือนพันธุ์ให้ 1 แถบ (เหมยนอง 62 เอ็ม หรือ กข22) แสดงว่า มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัส จะให้แทนเป็น 2 และถ้าแสดงแถบดีเอ็นเอ 1 แถบเหมือนข้าวเหมยนอง 62 เอ็ม หรือ กข22 แสดงว่า มีจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัสเหมือนข้าวพันธุ์ให้ จะให้แทนเป็น 3 โดยข้อมูลเหล่านี้จะใช้เป็นข้อมูลจีโนไทป์เพื่อวิเคราะห์ต่อไป

ข้าวที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์ให้ต้านทานต่อแมลงบั่วในแต่ละชั่วจะพยายามคัดเลือกต้นที่มี *qGM12* โดยแสดงจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสทั้ง 3 ตำแหน่ง เหมือน กข22 และเป็นข้าวเหนียวหอม

3.2.3. การตรวจสอบจีโนไทป์อย่างละเอียดบน *qGM12* ที่ถ่ายทอดจาก กข22

เนื่องด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งอยู่บน *qGM12* ได้แก่ RM110, RM3340 และ RM6800 (Leelagud, et al., 2020) ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์รับ PYO16-001-3-24B และพันธุ์ให้ กข22 ได้ จึงทำให้ต้องค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งใกล้เคียงหรืออยู่บน *qGM12* โดยนำเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 9 เครื่องหมาย (ตาราง 4) มาตรวจสอบจีโนไทป์ของข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่จำนวน 8 พันธุ์/สายพันธุ์ หรือเรียกว่า parental survey จากการใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์รับและพันธุ์ให้ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์รับและพันธุ์ให้ได้จำนวน 8 พันธุ์/สายพันธุ์ ได้แก่ สันป่าตอง 1, PYO16-001-3-24B, PYO12-001-8-6-3-7-3-4B, PYO13-034-65-2-2-1B, PYO13-034-12-66-17-16-1B, PYO16-001-3-24B, กข22 และ เหมยหนอง 62 เอ็ม

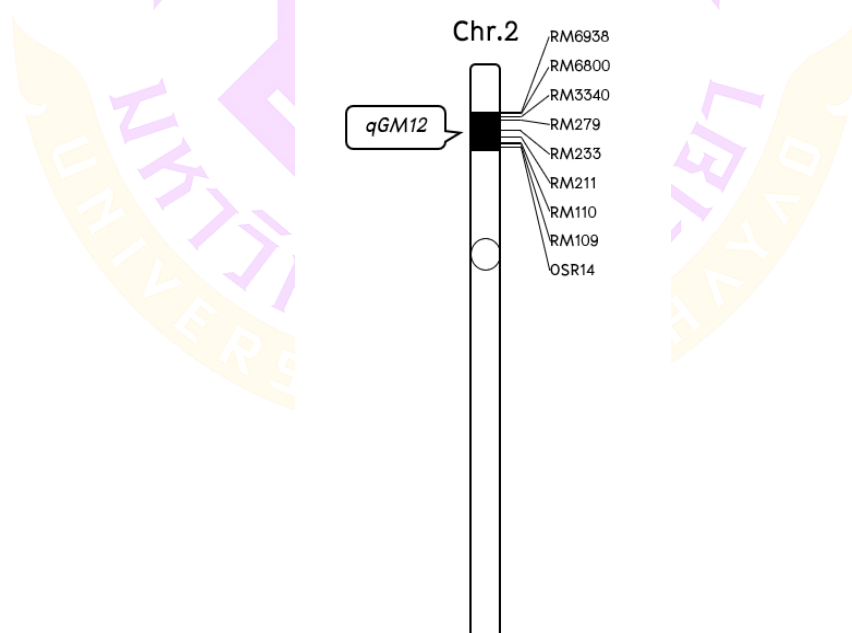
เมื่อได้ผลการคัดกรองเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ได้แล้วนั้น จึงนำมาตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากรข้าวชั่วที่ F_2 ของ 2 คู่ผสม ได้แก่ PYO16-001-3-24B X เหมยหนอง 62 เอ็ม และ PYO16-001-3-24B X กข22 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ที่เป็นข้อมูลการทดสอบปฏิกริยาต่อแมลงบั่วโดยวิธีคำนวณค่าถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย (simple linear regression) และความแปรปรวนต่อไป

จากการตรวจจีโนไทป์ในเครื่องหมายดีเอ็นเอ 4 ตำแหน่ง ได้แก่ RM110, RM3340, RM6800 และ RM279 พบว่า เครื่องหมาย RM6800 ไม่สามารถจำแนกรูปแบบของแถบดีเอ็นเอได้

ตาราง 4 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบจีโนไทป์อย่างละเอียดบน *qGM12*
ในประชากรข้าวข้าวที่ F_2 จากคู่ผสม PY016-001-24B X เหมยหนอง 62 เอ็ม
และ PY016-001-24B X กข22

Marker name	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')	PCR amplicon (bp)
RM6938	CTCCGCGGAGTCGATTTTA	AACCAACCACTGATTATTCCAAC	206
RM3340	TCTTGGCAAGCTCTCCTCTC	CCATCATCTCGATCTTGACG	117
RM6800	GTCCACGAGATGGACTCCTC	TTCTGAAGGCCAGGCCAG	158
RM279	GCGGGAGAGGGATCTCCT	GGCTAGGAGTTAACCTCGCG	174
RM233	CCAAATGAACCTACATGTTG	GCATTGCAGACAGCTATTGA	162
RM109	GCCGCCGAGAGGGAGAGAGAG	CCCCGACGGGATCTCCATCGTC	97
RM110	TCGAAGCCATCCACCAACGAAG	TCCGTACGCCGACGAGGTCGAG	156
OSR14	AAATCCACGCACATTGCG	AGGTAAACGAGCTTGAGGTG	167
RM211	CCGATCTCATCAACCAACTG	CTTCACGAGGATCTCAAAGG	161

หมายเหตุ; ลำดับเบสของไพรเมอร์อ้างอิงจากฐานข้อมูล <https://www.gramene.org>



ภาพ 5 ตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ ในบริเวณ *qGM12*
บนโครโมโซม 2

ส่วนในประชากรข้าวข้าวที่ $F_{4:5}$ จากคู่ผสมทั้ง 4 คู่ จะทำการตรวจจีโนไทป์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 4 เครื่องหมาย ได้แก่ Aromarker, RM110, RM3340 และ RM6800 เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ได้รับยีน $qGM12$ จากข้าว กข22 จากนั้นจะนำข้าวที่ได้รับยีน $qGM12$ จาก กข22 ที่แสดงจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัสเหมือน กข22 มาทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วในสภาพโรงเรือน และปลูกทดสอบผลผลิตเบื้องต้นต่อไป

3.2.4 การทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วในสภาพโรงเรือนทดลอง

3.2.4.1 การทดสอบในประชากรข้าวที่ F_2

ทำการทดลองที่ศูนย์วิจัยข้าวแพร่ จังหวัดแพร่ ด้วยวิธีการของ พันนิภา ยาใจ (2558) โดยใช้ประชากรแมลงบั่วในพื้นที่จังหวัดแพร่ โดยนำเมล็ดข้าวข้าวที่ F_2 จำนวน 200 เมล็ดต่อคู่ผสม มาเพาะให้งอกประมาณ 3 วัน หลังจากนั้น นำเมล็ดมาปลูกลงบนดินในถาดเป็นแถว แถวละ 20 ต้น จำนวน 10 แถวต่อประชากร โดยพบนต้นกล้าที่แข็งแรงจากคู่ผสมที่ 1 และ 2 จำนวน 177 และ 199 ต้น ตามลำดับ จากนั้นย้ายเข้ากรงเลี้ยง จนต้นกล้าอายุ 7 วันหลังจากย้ายปลูก ทำการปล่อยแมลงบั่วเพศเมียในอัตราส่วน ต้นกล้า 10 ต้นต่อแมลงบั่วเพศเมีย 1 ตัวลงในกรงที่ทำการทดลอง โดยมีการให้ละอองน้ำเพื่อเป็นการเพิ่มความชื้น และลดอุณหภูมิ หลังจากนั้น 7 วัน ทำการประเมินการเข้าทำลายของแมลงบั่วในประชากรข้าวที่ปลูกทดสอบ แบ่งเป็นการประเมินในประชากรข้าวข้าวที่ F_2 จะประเมินรายต้น โดยแทนลักษณะต้านทานด้วย 0 (ต้นปกติไม่เกิดหลอดบั่ว และต้นที่มีลักษณะเป็นต้นแคระ) และแทนลักษณะอ่อนแอด้วย 1 (ต้นที่เกิดหลอดบั่ว) (ภาพ 6) หลังจากนั้นทดสอบการกระจายตัวของลักษณะในข้าวทั้งสองประชากร เพื่อหาจำนวนยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อแมลงบั่ว ในข้าวพันธุ์หม่นทอง 62 เอ็ม และ กข22 ด้วยวิธีการทดสอบไคสแควร์ (χ^2) (Jia-shi Lu et al., 2016) ดังสมการ

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

เมื่อ O เป็นค่าสังเกตที่ได้จากการทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วในโรงเรือนทดลอง และ E เป็นค่าคาดหวังตามทฤษฎีของการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม

3.2.4.2 การทดสอบในประชากรข้าวที่ $F_{4:5}$

ทำการปลูกทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วจำนวน 3 ประชากร ได้แก่ ประชากรแมลงบั่วในจังหวัดแพร่ น่าน และเชียงราย ในสภาพโรงเรือน ณ ศูนย์วิจัยข้าวแพร่ จังหวัดแพร่ ด้วยวิธีการของ พันนิภา ยาใจ (2558) และพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ 5 พันธุ์/สายพันธุ์ ได้แก่ PYO12-001-8-6-3-7-4B, PYO13-034-12-65-2-2-1B, PYO16-012-140-4-7B, หม่นทอง 6 เอ็ม

และ กข22 ทำการเพาะเมล็ด 3 วัน จนเมล็ดงอก จากนั้นนำเมล็ดมาเรียงบนถาดเพาะเป็นแถว ๆ ละ 20 เมล็ดต่อสายพันธุ์ จำนวน 2 ซ้ำต่อทรง จากนั้นย้ายถาดเพาะเข้าสู่โรงเลี้ยงเมื่อต้นกล้าอายุ 7 วัน ทำการปล่อยแมลงบั่วเพศเมียในอัตราส่วนต้นกล้า 10 ต้นต่อแมลงบั่วเพศเมีย 1 ตัว โดยในแต่ละโรงเลี้ยงจะใช้ประชากรแมลงบั่วในพื้นที่จังหวัดแพร่ น่าน และเชียงราย จากนั้นมีการให้ละอองน้ำเพื่อเพิ่มความชื้น และลดอุณหภูมิในเวลากลางวันให้ไม่สูงเกิน 38°C จากนั้น 7 วัน จึงทำการประเมินการเข้าทำลายของแมลงบั่วที่ปลูกทดสอบ

ส่วนการประเมินในพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ จะทำการบันทึกข้อมูลการเข้าทำลายของแมลงบั่วแต่ละต้น เป็นตัวเลข 3 ตำแหน่ง โดยตำแหน่งแรกแสดงต้นที่มีลักษณะเป็นหลอดบั่ว (ภาพ 6ก) ตำแหน่งที่สองแสดงต้นที่มีลักษณะผิดปกติ (ภาพ 6ข) และตำแหน่งที่สามแสดงต้นที่มีลักษณะปกติ (ภาพ 6ค) จากนั้นนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย และแปลผลตามมาตรฐานของ Standard Evaluation System for Rice ของ IRRI (2002)



ภาพ 6 ลักษณะของต้นข้าวที่เกิดหลอดบั่ว (ก) และต้นแคระ (ข) ที่เกิดจากการเข้าทำลายของแมลงบั่ว เปรียบเทียบกับต้นปกติ (ค)

ที่มา: มารีสา อิ่มเพ็ง (ผู้ถ่าย)

คำนวณเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายและแปลผลตามมาตรฐานของ IRRI ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย (\%)} = \frac{\text{ผลรวมจำนวนต้นที่เกิดหลอด}}{\text{ผลรวมจำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$$

แล้วนำผลการแปลผลปฏิกิริยาต่อแมลงศัตรูมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายตามเกณฑ์มาตรฐานของ Standard Evaluation System for Rice (IRRI, 2002) ดังนี้

0	ต้านทานสูง (HR)	มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย 0%
1	ต้านทาน (R)	มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย 0-5%
3	ค่อนข้างต้านทาน (MR)	มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย 6-10%
5	ค่อนข้างอ่อนแอ (MS)	มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย 11-20%
7	อ่อนแอ (S)	มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย 21-50%
9	อ่อนแอมาก (HS)	มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายมากกว่า 50%

3.2.5 การทดสอบผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิตเบื้องต้น ในสภาพน้ำสมบูรณ์
ในแปลงทดลองบ้านแม่กาหลวง ต.แม่กา อ.เมือง จ.พะเยา

เพื่อศึกษาลักษณะพันธุ์ขั้นต้นในประชากรข้าวช่วงที่ F_{4:5} ได้รับยีน qGM12 จำนวน 5 พันธุ์ต่อสายพันธุ์ ได้แก่ 1) PYO21-001-8-4-2B (PYO12-001-8-6-3-7-3-4B X กข22), 2) PYO21-002-5-2-8B, 3) PYO21-002-18-7-4B (PYO13-034-12-65-2-2-1B X กข22, 4) PYO21-005-6-5-5B (PYO16-012-140-4-7B X กข22) และ 5) PYO21-020-6-5-6B (PYO16-012-140-4-7B X เหมยหนอง 62 เอ็ม) และพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ 7 สายพันธุ์ ได้แก่ กข6, กข22, ไรซ์เบอร์รี่, สันป่าตอง 1, PYO12-001-8-6-3-7-3-4B, PYO16-012-140-4-7B และ PYO13-034-12-65-2-2-1B จะทำการปลูกข้าวสายพันธุ์ละ 6 แถว ๆ ละ 21 ต้น จำนวน 2 ซ้ำ ระยะการปักดำ 20 X 20 เซนติเมตร วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) จำนวน 2 ซ้ำ โดยปักดำต้นเดียวต่อกอ บันทึกลักษณะทาง การเกษตรผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิตเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์เปรียบเทียบ (check variety) ได้แก่ ค่าเฉลี่ยความสูงของต้นจากการสุ่มวัด 5 ต้นต่อแปลงทดลอง, ค่าเฉลี่ยวันออกดอกที่ 75%, ค่าเฉลี่ยจำนวนหน่อต่อกอจากการสุ่มนับ 5 กอต่อแปลงทดลอง จำนวน 2 ซ้ำ, ค่าเฉลี่ยจำนวนรวงต่อกอจากการสุ่มนับ 5 กอต่อแปลงทดลอง, น้ำหนักเมล็ดดีต่อรวงจำนวน 5 รวงต่อแปลงทดลอง, น้ำหนักเมล็ดลีบต่อรวงจำนวน 5 รวงต่อแปลงทดลอง, น้ำหนักเมล็ดต่อกอ และค่าเฉลี่ยน้ำหนักผลผลิตจาก 2 ซ้ำ ตามวิธีของ กรมการข้าว (2556) จากนั้นทำการ

คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะทรงต้นดี และให้ผลผลิตเบื้องต้นดี และสามารถต้านทานแมลงบั่ว สำหรับปลูกคัดเลือกให้สม่ำเสมอต่อไป

3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.2.6.1 ข้อมูลการทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วในประชากรช่วงที่ F_2 จำนวน 2 ประชากรที่เกิดจากคู่ผสมระหว่าง PYO16-001-3-24B กับหมยหนอง 62 เอ็ม และ PYO16-001-3-24B กับ กข22 ในโรงเรือน โดยใช้ประชากรบั่วในพื้นที่จังหวัดแพร่ นำมาผลที่ได้มาวิเคราะห์อัตราส่วนความอ่อนแอต่อความต้านทานและนำไปเปรียบเทียบกับอัตราส่วนการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมแบบต่าง ๆ ได้แก่ dominant, recessive และ epistasis ที่ได้จากผลตรวจ จีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ 9 เครื่องหมาย นำผลการทดลองทั้งสองมาทดสอบไคสแควร์ ซึ่งจะช่วยให้ทราบถึงการแสดงออกของยีนว่ามีการแสดงออกแบบเด่นหรือด้อย และมียีนที่ควบคุมความต้านทานต่อแมลงบั่วจำนวนกี่ยีน ในข้าวหมยหนอง 62 เอ็ม และ กข22 หลังจากนั้นนำผลจีโนไทป์ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่าง PYO16-001-3-24B ผสมกับ หมยหนอง 62 เอ็ม และ กข22 มาวิเคราะห์สมการถดถอย และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) (Nasser Tao et al., 2016) ด้วยโปรแกรม R version 4.2.1 (R Core team., 2017) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วน 3:1, 9:7 และ 15:1 ว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญที่อัตราส่วนใด แปลผลว่ามีจำนวนยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อแมลงบั่วอย่างไร

3.2.6.2 ข้อมูลการทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วในประชากรช่วงที่ $F_{4:5}$ จำนวน 15 สายพันธุ์ และพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ 4 สายพันธุ์ มาประเมินความต้านทานแมลงบั่วในพื้นที่จังหวัดแพร่ น่าน และเชียงราย (พนนิภา ยาใจ, 2558) จากนั้นตรวจจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ 4 เครื่องหมาย ได้แก่ RM110, RM3340, RM6800 และ RM279 แล้วจึงทำการปลูกคัดเลือกเพื่อศึกษาพันธุ์และทดสอบผลผลิตเบื้องต้นในช่วงที่ $F_{4:5}$ ต่อไป

3.2.6.3 ข้อมูลในการทดสอบผลผลิตเบื้องต้น ในประชากรช่วงที่ $F_{4:5}$ จำนวน 5 สายพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบการประเมินความต้านทานแมลงบั่ว แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD (Least Significant Difference) ด้วยโปรแกรม R version 4.2.1 (R Core team., 2017)

3.3 สถานที่ทำการทดลอง

ทำการพัฒนาประชากรข้าวชัยที่ F_2 และ $F_{4:5}$ ที่มีความต้านทานต่อแมลงบั่วในพื้นที่ปฏิบัติการสาขาเกษตรศาสตร์ การตรวจสอบจีโนไทป์ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการด้านพืช สาขาเกษตรศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ในส่วนการทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วในสภาพโรงเรือน ที่ศูนย์วิจัยข้าวแพร่ อ.เมืองแพร่ จ.แพร่ และการปลูกทดสอบผลผลิตที่แปลงทดลองบ้านแม่กาหลวง ต.แม่กา อ.เมือง จ.พะเยา

3.4 ระยะเวลาการดำเนินงาน

เริ่มตั้งแต่เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2564 ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2566



บทที่ 4

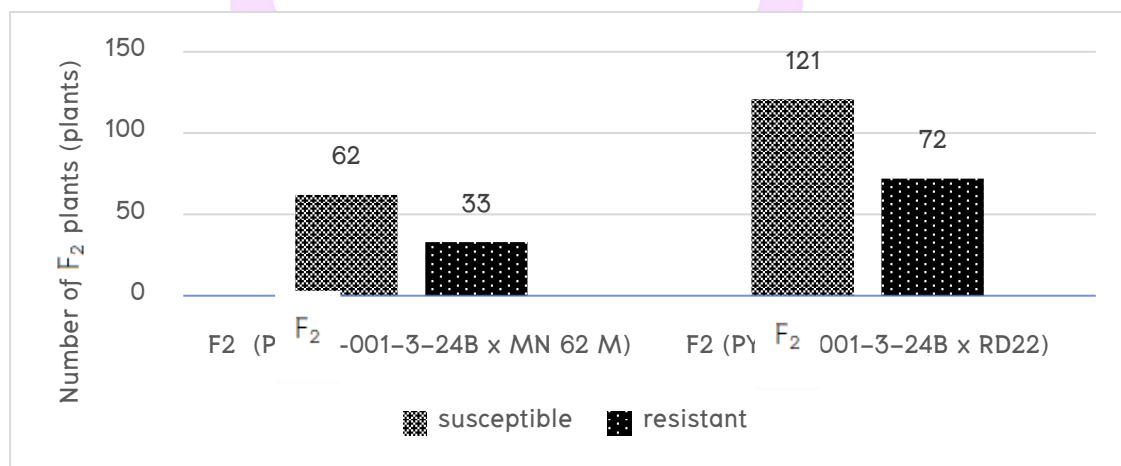
ผลการทดลอง

4.1 การเปรียบเทียบพันธุกรรมความต้านทานต่อแมลงบั่วในข้าวเหนียว 62 เอ็ม และข้าว กข22

4.1.1 จากผลการทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วประชากรในจังหวัดแพร่สภาพโรงเรือน ณ ศูนย์วิจัยข้าวแพร่ จ.แพร่ ของประชากรข้าวข้าวที่ F_2 จำนวน 2 ประชากร แบ่งเป็น

1. PYO16-001-3-24B X เหมยหนอง 62 เอ็ม จำนวน 95 ต้น พบว่า มีต้นปกติ ไม่เกิดหลอดบั่ว 3 ต้น ต้นแคระไม่เกิดหลอดบั่ว 30 ต้น รวมต้นที่แสดงความต้านทาน 33 ต้น คิดเป็น 34.7% และมีต้นที่แสดงความอ่อนแอหรือเกิดหลอดบั่ว 62 ต้น คิดเป็น 65.3% (ภาพ 7)

2. PYO16-001-3-24B X กข22 จำนวน 193 ต้น พบว่า มีต้นปกติ ไม่เกิดหลอดบั่ว 3 ต้น ต้นแคระไม่เกิดหลอดบั่ว 69 ต้น รวมต้นที่แสดงความต้านทาน 72 ต้น คิดเป็น 37.3% และมีต้นที่แสดงความอ่อนแอหรือเกิดหลอดบั่ว 121 ต้น คิดเป็น 62.7% (ภาพ 7)



ภาพ 7 การกระจายตัวของความต้านทานแมลงบั่วในประชากรข้าวข้าวที่ F_2 ที่เกิดจาก คู่ผสม ได้แก่ ข้าวสายพันธุ์ PYO16-001-3-24B X เหมยหนอง 62 เอ็ม และ PYO16-001-3-24B X กข22 ที่ทดสอบโดยใช้แมลงบั่วจากจังหวัดแพร่ ในสภาพ โรงเรือนทดลอง

ในขณะที่เหมยนอง 62 เอ็ม มีความต้านทานต่อแมลงบัวแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย 5.93% และ กข22 มีความต้านทานต่อแมลงบัวในระดับค่อนข้างอ่อนแอ แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย 11.15% ส่วน PYO16-001-3-24B มีความต้านทานต่อแมลงบัวในระดับค่อนข้างอ่อนแอ แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย 12.53% และอัตราส่วนความต้านทานต่ออ่อนแอไม่ใช่ 1:3 ตามกฎของเมนเดล (ภาพ 7)

4.1.2 จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะพันธุกรรมความต้านทานต่อแมลงบัวในคู่ผสม PYO16-001-3-24B x เหมยนอง 62 เอ็ม จำนวน 95 ต้น พบว่า มีอัตราส่วนจำนวนต้นอ่อนแอต่อจำนวนต้นต้านทาน เท่ากับ 9:7 ที่ค่า $\chi^2 = 3.136$ ($p=0.05$) แสดงให้เห็นว่ามียีนที่ควบคุมความต้านทานต่อแมลงบัว จำนวน 2 ยีน และมีแสดงออกแบบ duplicate recessive gene และเมื่อวิเคราะห์อัตราส่วนการกระจายตัวในประชากรข้าวชั่วที่ F_2 ส่วนจากคู่ผสม PYO16-001-3-24B x กข22 จำนวน 193 ต้น พบว่า มีอัตราส่วนจำนวนต้นอ่อนแอต่อจำนวนต้นต้านทาน เท่ากับ 9:7 โดยค่า $\chi^2 = 0.05$ ($df = 1$) มีค่าเท่ากับ 3.84 (ตาราง 5)



ตาราง 5 การทดสอบการกระจายตัวของความต้านทานต่อแมลงบั่ว ด้วยวิธีการทดสอบไคสแควร์ (χ^2) ในประชากรข้าวชั่วที่ F₂ ที่เกิดจาก
ผสมระหว่างสายพันธุ์ PYO16-001-3-24B X เหมยนอง 62 เอ็ม และ PYO16-001-3-24B X กข2 ที่ทดสอบปฏิบัติการต่อแมลงบั่ว
ในสภาพโรงเรือนทดลอง

พันธุ์/สายพันธุ์		F ₂ (PYO16-001-3-24B X MN62M)				F ₂ (PYO16-001-3-24B X RD22)			
		ค่าสังเกต		ค่าคาดหวัง		ค่าสังเกต		ค่าคาดหวัง	
		RD22	3:1	15:1	9:7	13:3	3:1	15:1	9:7
ต้านทาน	26	0	1	62	71.25	89.06	53.44	77.2	121
อ่อนแอ	74	100	99	33	23.75	5.94	41.56	17.8	72
รวม	100	100	100	95	95	95	95	95	193
		$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$		4.8	131.57	3.14	13.9	15.59	317.68
				*	**	ns	**	**	ns

หมายเหตุ: ค่า F-test สำหรับ df = 1

ns = ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p > 0.05)

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p ≤ 0.05) = 3.84

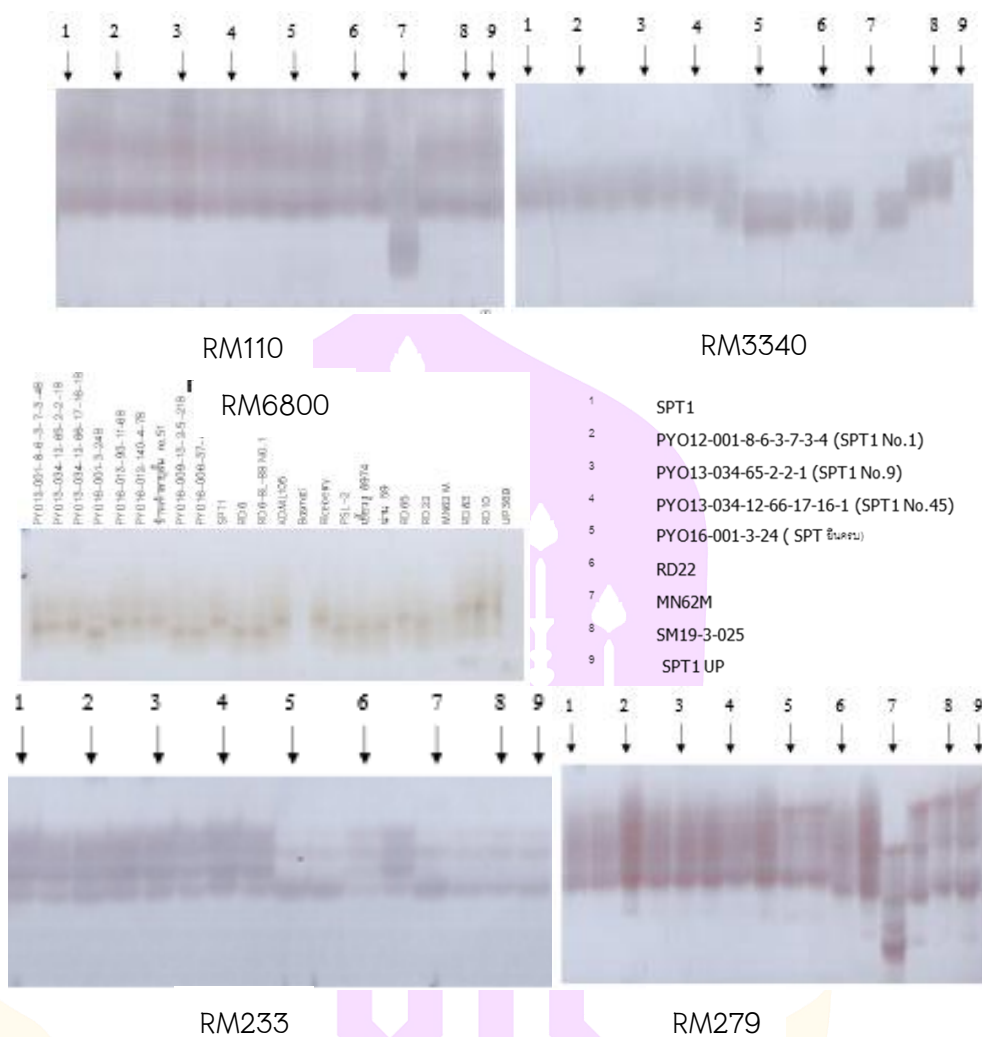
** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญสูง (p ≤ 0.01) = 6.63

4.1.3 จากการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ที่อยู่ในตำแหน่งเป้าหมายและใกล้เคียง *qGM12* ได้ทำการตรวจสอบจำนวน 9 เครื่องหมาย โดยใช้ประชากรข้าวพันธุ์รับและพันธุ์ให้ในการพัฒนาประชากรทั้งหมดที่เกี่ยวข้อง 6 พันธุ์/สายพันธุ์ (ตาราง 6)

ตาราง 6 จีโนไทป์ของข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์รับและพันธุ์ให้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานแมลงบั่วจำนวน 6 พันธุ์/สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR จำนวน 9 เครื่องหมาย ที่อยู่ในบริเวณ *qGM12*

พันธุ์/สายพันธุ์	จีโนไทป์								
	RM109	RM6800	RM3340	RM6938	RM110	OSR14	RM211	RM233	RM279
PYO16-001-3-24B	a	a	b	a	b	b	a	b	c
RD22	a	a	b	a	b	a	a	a	b
MN62M	b	a	b	b	a	a	b	a	c
PYO13-001-3-7-3-4B	b	b	c	c	b	b	a	b	c
PYO13-034-12-65-2-2-1B	b	b	c	b	b	a	a	a	c
PYO16-012-140-4-7B	-	b	c	-	a	-	-	-	-

จากการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอในตำแหน่งใกล้เคียงดังกล่าว พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพในการติดตาม *qGM12*^{MN62M} มี 4 เครื่องหมาย ได้แก่ RM110, RM3340, RM233 และ RM279 และในการติดตาม *qGM12*^{RD22} ได้แก่ RM279 ซึ่งสามารถนำผลนี้มาใช้ในการตรวจจีโนไทป์ในประชากรชั่วที่ F₂ ในการศึกษาในครั้ง โดยเปรียบเทียบกับข้าวที่ใช้เป็นพ่อและแม่ แสดงดัง ตาราง 6 นอกจากผลการศึกษานี้ยังสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากรชั่วที่ F_{4:5} จำนวน 6 คู่ผสม โดยในคู่ผสม 1) PYO12-001-3-7-3-4B X กข22, 2) PYO13-034-12-65-2-2-1B X กข 22, 3) PYO13-034-12-66-17-16-1B X กข 22, 4) PYO16-03-93-11-6B X กข 22, 5) PYO16-012-140-4-7B X กข 22 และ 6) PYO16-012-140-4-7B X เหมยหนอง 62 เอ็ม สามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอได้ 5 เครื่องหมาย ได้แก่ RM110, RM3340, RM6800, RM233 และ RM279 แสดงดัง ภาพ 8



ภาพ 8 ลักษณะแถบดีเอ็นเอของพันธุ์รับและพันธุ์ให้ในเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์รับและพันธุ์ให้ (polymorphism)

4.2 การตรวจสอบจีโนไทป์อย่างละเอียดในประชากรชั่วที่ F_2 ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์ที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ 5 ตำแหน่ง ได้แก่ RM110, RM3340, RM6800, RM233 และ RM279 กับข้อมูลการทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบัว พบว่า เครื่องหมายโมเลกุล RM3340 และ RM279 มีความสัมพันธ์กับปฏิกิริยาต่อต้านแมลงบัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.01$) และสามารถจำแนกพันธุ์ข้าวต้านทานและอ่อนแอได้อย่างชัดเจน และในเครื่องหมายอื่น ๆ ได้แก่ RM110, RM6800 และ RM233 ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับปฏิกิริยาต่อแมลงบัว (ตาราง 7)

ตาราง 7 จำนวนต้นข้าวข้าวที่ F₂ จากคู่ผสม PYO16-001-3-24B X เหมยหนอง 62 เอ็ม และ PYO16-001-3-24B X กข22 ที่แสดงจีโนไทป์แบบต่าง ๆ กับ ความต้านทานต่อแมลงบัว

เครื่องหมาย	ฟีโนไทป์	PYO16-001-3-24B X MN62M				PYO16-001-3-24B X RD22			
		จีโนไทป์			รวม	จีโนไทป์			รวม
		AA	Aa	aa		AA	Aa	aa	
RM110	R	19	10	7	33	-	-	-	-
	S	40	9	7	62	-	-	-	-
	รวม	59	19	14	95	-	-	-	-
RM3340	R	17	7	9	33	-	-	-	-
	S	47	10	5	62	-	-	-	-
	รวม	64	17	14	95	-	-	-	-
RM233	R	19	6	8	33	-	-	-	-
	S	45	7	8	62	-	-	-	-
	รวม	65	13	16	95	-	-	-	-
RM279	R	18	7	8	33	6	22	25	70
	S	40	13	9	62	19	33	53	123
	รวม	58	20	17	95	25	55	78	193

หมายเหตุ; R คือ ลักษณะแสดงความต้านทานต่อแมลงบัว

S คือ ลักษณะแสดงความอ่อนแอต่อแมลงบัว

A แทนอัลลีลของ เหมยหนอง 62 เอ็ม หรือ กข22

a แทนอัลลีลของ PYO16-001-3-24B

จากการวิเคราะห์จีโนไทป์ และฟีโนไทป์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ 5 เครื่องหมาย ข้างต้นในประชากรคู่ผสม PYO16-001-3-24B X เหมยหนอง 62 เอ็ม จำนวน 95 ต้น พบว่า อัตราส่วนความต้านทานมีแนวโน้มสัมพันธ์กับจีโนไทป์แบบ AA และ Aa และต้นที่แสดงจีโนไทป์ aa แสดงฟีโนไทป์อ่อนแอต่อแมลงบัว และในเครื่องหมาย RM279 ในประชากรคู่ผสม PYO16-001-3-24B X กข22 จำนวน 193 ต้น แบ่งเป็นต้านทาน 70 ต้น และอ่อนแอ 123 ต้น พบว่า ต้นที่มีจีโนไทป์เป็น AA มีความสัมพันธ์กับฟีโนไทป์ต้านทานต่อแมลงบัวมากที่สุด และจีโนไทป์ Aa และ aa มีแนวโน้มสัมพันธ์กับฟีโนไทป์อ่อนแอต่อแมลงบัว (ตาราง 8)

ตาราง 8 การวิเคราะห์ห่าวจีโนไทป์ 4 เครื่องหมายและพีโนไทป์โดยใช้ ANOVA และสมการถดถอย ในประชากร F₂ 2 คู่ผสมได้แก่ PYO16-001-3-24B X หมมยของ 62 เอ็ม และ PYO16-001-3-24B X กข22

ค่าเฉลี่ยการทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงปั่ว									
เครื่องหมาย	PYO16-001-3-24B X MN62M				PYO16-001-3-24B X RD22				
	PYO16-001-3-24B	Heterozygous	MN62M	P-value	R ²	PYO16-001-3-24B	Heterozygous	RD22	P-value
RM3340	0.734	0.588	0.357	** 0.006	0.07970	-	-	-	-
RM110	0.720	0.474	0.500	ns 0.065	0.00379	-	-	-	-
RM233	0.633	0.650	0.500	ns 0.507	0.01917	-	-	-	-
RM279	0.689	0.650	0.500	ns 0.481	0.01830	0.760	0.600	0.679	ns 0.185
									0.00391

หมายเหตุ: ค่า F-test สำหรับ df = 2, df = 40 ($\alpha = 0.05$) ≈ 3.23

ns = ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญสูง ($p \leq 0.01$)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลข้างต้น แสดงว่า ลักษณะความต้านทานต่อแมลงศัตรูถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 2 ยีน ซึ่งมีการข่มกันระหว่างยีนที่อยู่คนละตำแหน่งแบบ duplicate recessive epistasis เป็นไปตามอัตราส่วนอ่อนแอต่อต้านทาน เท่ากับ 9:7 ซึ่งพบทั้งในประชากรที่พัฒนาจากข้าวเหนียว 62 เอ็ม และ กข22

4.3 การพัฒนาข้าวเหนียวหอมต้านทานแมลงศัตรู

4.3.1 จากการพัฒนาประชากรลูกผสมสายพันธุ์แท้ (RILs) จากการพัฒนาลูกผสมจำนวน 6 คู่ผสม ได้แก่

1. PYO12-001-8-6-3-7-3-4B X กข22 (PYO21-001)
2. PYO13-034-12-65-2-2-1B X กข22 (PYO21-002)
3. PYO16-034-12-66-17-16B X กข22 (PYO21-003)
4. PYO16-03-93-11-6B X กข22 (PYO21-004)
5. PYO16-012-140-4-7B X กข22 (PYO21-005)
6. PYO16-012-140-4-7B X เหมยหนอง 62 เอ็ม (PYO21-020)

ได้ทำการปลูก กำหนดรหัสประจำต้น เก็บตัวอย่างใบอ่อนเพื่อตรวจจีโนมไทป์ และคัดเลือกลักษณะทางการเกษตรที่ดีในชั่วต่าง ๆ (ตาราง 9) และทำการแบ่งเมล็ดชั่ว $F_{4.5}$ เพื่อทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงศัตรูในโรงเรือนและตรวจจีโนมไทป์ (ตาราง 10) นอกจากนี้ยังนำเมล็ดชั่ว $F_{4.5}$ มาปลูกเพื่อทดสอบผลผลิตเบื้องต้น ณ แปลงทดสอบแม่กาหลวง จ.พะเยา ในฤดูนาปี 2566

ตาราง 9 จำนวนสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกในแต่ละรุ่นของกลุ่มผสมต่าง ๆ

รหัส	คู่ผสม	จำนวนต้นที่ได้รับการคัดเลือกในแต่ละรุ่น (ต้น)			
		F_2	F_3	F_4	F_5
PYO21-001	PYO12-001-8-6-3-7-3-4B X RD22	2	12	10	3
PYO21-002	PYO13-034-12-65-2-2-1B X RD22	4	14	20	14
PYO21-005	PYO16-012-140-4-7B X RD22	4	11	31	19
PYO21-020	PYO16-012-140-4-7B X MN62M	15	28	23	22
รวม		24	65	84	58

จากการคัดเลือกจากจีโนไทป์และฟีโนไทป์ พบว่า 1) ในคู่ผสมระหว่าง PYO12-001-8-6-3-7-3-4B X กข22 ได้รับการคัดเลือกจากชั่วที่ F_2 จำนวน 2 ต้น F_3 จำนวน 12 ต้น F_4 จำนวน 10 ต้น และ F_5 จำนวน 3 ต้น 2) ในคู่ผสมระหว่าง PYO13-12-65-2-2-1B X กข22 ได้รับการคัดเลือกจากชั่วที่ F_2 จำนวน 4 ต้น F_3 จำนวน 14 ต้น F_4 จำนวน 20 ต้น และ F_5 จำนวน 14 ต้น 3) ในคู่ผสมระหว่าง PYO16-012-140-4-7B X เหมยนอง 62 เอ็ม ได้รับการคัดเลือกจากชั่วที่ F_2 จำนวน 15 ต้น F_3 จำนวน 28 ต้น F_4 จำนวน 23 ต้น และ F_5 จำนวน 22 ต้น และ 4) ในคู่ผสมระหว่าง PYO16-012-140-4-7B X กข22 ได้รับการคัดเลือกจากชั่วที่ F_2 จำนวน 4 ต้น F_3 จำนวน 11 ต้น F_4 จำนวน 31 ต้น และ F_5 จำนวน 19 ต้น ซึ่งผลการคัดเลือkdังกล่าวสะท้อนถึงศักยภาพของแต่ละคู่ผสมในการถ่ายทอดลักษณะต้านทานไปยังรุ่นลูกชั่วที่ลึกขึ้น โดยเฉพาะในคู่ผสม PYO16-012-140-4-7B X กข22 และ PYO16-03-93-11-6B X กข22 ที่แสดงจำนวนต้นที่ได้รับการคัดเลือกในชั่ว F_4 และ F_5 ค่อนข้างสูง แสดงถึงแนวโน้มของการคงอยู่ของลักษณะต้านทานต่อแมลงบั่วในสายพันธุ์เหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ตาราง 10)

4.3.2 การตรวจสอบจีโนไทป์ในประชากรชั่ว $F_{4.5}$

จากการตรวจสอบจีโนไทป์โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ RM3340, RM6800, RM110 และ RM279 ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อแมลงบั่วที่อยู่ในบริเวณ *qGM12* พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มประชากรได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ 1) กลุ่มที่ได้ *qGM12* จากข้าวพันธุ์เหมยนอง 62 เอ็ม จำนวน 3 สายพันธุ์ และ 2) กลุ่มที่ได้ *qGM12* จากข้าวพันธุ์ กข22 จำนวน 12 สายพันธุ์ (ตาราง 10)

จากการทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วในสภาพโรงเรือน โดยใช้ประชากรแมลงบั่วที่รวบรวมจาก 3 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย แพร่ และน่าน ทำการประเมินในประชากรข้าวเหนียวชั่วที่ $F_{4.5}$ ซึ่งได้จากการผสมระหว่างข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่กับพันธุ์ต้านทาน พบว่า ข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์รับจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ PYO12-001-8-6-3-7-3-4B, PYO13-034-12-65-2-2-1B, PYO13-034-12-66-17-16-1B, PYO16-03-93-11-6B และ PYO16-012-140-4-7B มีความสามารถในการต้านทานแมลงบั่วอยู่ในระดับอ่อนแอมาก ขณะที่ข้าวพันธุ์ให้ ได้แก่ เหมยนอง 62 เอ็ม และ กข22 แสดงระดับความต้านทานอยู่ในช่วงค่อนข้างต้านทาน และค่อนข้างอ่อนแอ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม จากการทดสอบพบว่า มีประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ $F_{4.5}$ จำนวน 5 สายพันธุ์ ที่แสดงระดับความต้านทานต่อแมลงบั่วที่ดี ได้แก่ 1) PYO21-005-6-5-5 และ PYO21-020-6-5-6 (จากการผสมระหว่าง PYO16-012-140-4-7B x กข22) ซึ่งมี เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของแมลงบั่วในระดับต้านทาน อยู่ที่ 1-5% และ 2) PYO21-001-8-4-2 4 (จากการผสมระหว่าง PYO12-001-8-6-3-7-3-4B x กข22), PYO21-002-5-2-8 และ PYO21-002-18-7-4 (จากการผสมระหว่าง PYO13-034-12-65-2-2-1B x กข22) ซึ่งมี เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายในระดับค่อนข้างต้านทาน อยู่ที่ 6-10% (ตาราง 10)

ตาราง 10 ข้อมูลการทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วทั้ง 3 ประชากรจากจังหวัดแพร่, น่าน และเชียงราย โดยแสดงเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย
ในประชากรชั่วที่ F_{4:5} ในสภาพโรงเรือน

ลำดับ	พันธุ์ประวัติ	คู่ผสม	สุรินทร์ (homozygous)				เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย (%)				การเข้าทำลาย			
			แมลงบั่วจาก จ.แพร่				แมลงบั่วจาก จ.น่าน				แมลงบั่วจาก จ.เชียงราย			
			RM	RM	RM	RM	ค่าเฉลี่ย	เบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความต้านทาน	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ย	เบี่ยงเบนมาตรฐาน	ความต้านทาน	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
1	PY021-001-8-4-2	PY012-001-8-6-3-7-4B X RD22	b	a	b	b	8.6	1.9	MR	0.7	8.4	0.7	MR	3.9
2	PY021-001-8-5-5	PY012-001-8-6-3-7-4B X RD22	b	a	b	b	43.2	0.8	S	3.3	34.8	3.3	S	10.7
3	PY021-002-5-2-8	PY013-034-12-65-2-2-1B X RD22	b	a	b	b	8.4	1.5	MR	5.7	9.7	5.7	MR	1.4
4	PY021-002-18-1-1	PY013-034-12-65-2-2-1B X RD22	b	a	b	b	33.3	2.4	S	14.3	42.9	14.3	S	0.3
5	PY021-002-18-1-2	PY013-034-12-65-2-2-1B X RD22	b	a	b	b	35.1	2.2	S	1.8	60.1	1.8	HS	8.1
6	PY021-002-18-7-2	PY013-034-12-65-2-2-1B X RD22	b	a	b	b	26.8	2.4	S	13.6	32.6	13.6	S	0.3
7	PY021-002-18-7-3	PY013-034-12-65-2-2-1B X RD22	b	a	b	b	17.9	2.1	MS	0.7	34.1	0.7	S	11.8
8	PY021-002-18-7-4	PY013-034-12-65-2-2-1B X RD22	b	a	b	b	15.1	4.7	MS	3.8	7.7	3.8	MR	0
9	PY021-002-18-7-5	PY013-034-12-65-2-2-1B X RD22	b	a	b	b	14.7	2.9	MS	4.3	14.3	4.3	MS	5.2
10	PY021-002-18-7-6	PY013-034-12-65-2-2-1B X RD22	b	a	b	b	28.4	7.2	S	14.8	33	14.8	S	9.2
11	PY021-005-6-5-2	PY016-012-140-4-7B X RD22	b	a	b	b	21	5.4	S	2.9	26.7	2.9	S	2.9
12	PY021-005-6-5-5	PY016-012-140-4-7B X RD22	b	a	b	b	3.6	1.9	R	2.2	2.2	2.2	R	0
13	PY021-020-6-5-3	PY016-012-140-4-7B X MN62M	a	a	a	a	14.3	1.8	MS	4	27.8	4	S	15.3
14	PY021-020-6-5-6	PY016-012-140-4-7B X MN62M	a	a	a	a	4.2	2.8	R	0	0	0	HR	0
15	PY021-020-6-5-7	PY016-012-140-4-7B X MN62M	a	a	a	a	27.7	2	S	0.3	16.3	0.3	MS	4.3
16	PY012-001-8-6-3-7-4B	Parent	b	b	b	c	36.2	2	S	5.8	62.4	5.8	HS	9.5
17	PY013-034-12-65-2-2-1B	Parent	b	b	b	c	44.6	5.4	S	10.4	60.4	10.4	HS	3.6
18	PY016-012-140-4-7B	Parent	b	b	b	c	32.1	4.4	S	7.7	42.3	7.7	S	3.2
19	MN62M	Donor for RGM resistance	a	a	a	a	5.6	2.8	MR	2.7	10.7	2.7	MS	1.6
20	RD22	Donor for RGM resistance	a	a	b	b	6.8	0.5	MR	8	16	8	MS	10.6

จากการทดสอบปฏิกิริยาความต้านทานต่อแมลงบั่วทั้ง 3 ประชากร พบว่า ข้าวสายพันธุ์ PY021-001-8-4-2 แสดงระดับความต้านทานดีที่สุด โดยมีค่าร้อยละเฉลี่ยของการเข้าทำลายต่ำสุดเพียง 8.1% และจัดอยู่ในกลุ่ม MR ในทุกประชากรของแมลงบั่ว ขณะที่สายพันธุ์ PY021-002-5-8-5 มีค่าการเข้าทำลายเฉลี่ยสูงถึง 40.2% และจัดอยู่ในกลุ่ม S ซึ่งบ่งชี้ถึงความไวต่อการเข้าทำลายจากแมลงบั่วอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อพิจารณาลักษณะทางพันธุกรรมพบว่า สายพันธุ์ที่มีลักษณะพันธุกรรมแบบ homozygous แบบเดียวกับพันธุ์หมยหนอง 62 เอ็ม (ซึ่งเป็น donor ของยีนต้านทาน) ที่ตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุล RM110 และ RM279 ซึ่งแสดงระดับความต้านทานที่สูงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับบทบาทของหมยหนอง 62 เอ็ม ในการถ่ายทอด *qGM12* (ตาราง 11 และ ภาพ 9)

สำหรับการต้านทานต่อแมลงบั่ว ในขณะที่พันธุ์พ่อแม่ที่ไม่มีลักษณะทางพันธุกรรมดังกล่าว เช่น ใน กข22 แสดงระดับความต้านทานต่ำกว่าชัดเจน โดยมีค่าการเข้าทำลายเฉลี่ยสูงถึง 11.2% และจัดอยู่ในกลุ่ม MS นอกจากนี้ ยังพบว่า ประชากรแมลงบั่วจากจังหวัดเชียงรายมีแนวโน้มก่อให้เกิดการเข้าทำลายสูงที่สุดในหลายสายพันธุ์ เช่น PY021-002-18-1-2 ที่มีค่าการเข้าทำลายถึง 51.9% และจัดอยู่ในกลุ่ม HS แม้จะมีระดับความต้านทานปานกลางเมื่อทดสอบกับประชากรจากจังหวัดแพร่และน่าน แสดงให้เห็นถึงความแปรผันทางพันธุกรรมของประชากรแมลงบั่วในแต่ละพื้นที่ และความจำเป็นในการพัฒนาแหล่งพันธุกรรมต้านทานที่ครอบคลุมมากขึ้น นอกจากการทดสอบปฏิกิริยาต่อแมลงบั่วแล้ว จึงได้คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการต้านทานแมลงบั่วเพื่อนำไปทดสอบผลผลิต และองค์ประกอบของผลผลิตต่อไปในประชากรชั่วที่ $F_{4:5}$ ได้แก่ 1) PY021-001-8-4-2B, 2) PY021-002-5-2-8B, 3) PY021-002-18-7-4B, 4) PY021-005-6-5-5B และ 5) PY021-020-6-5-6B และพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ 7 สายพันธุ์ ได้แก่ กข6, กข22, ไรซ์เบอร์รี่, สันป่าตอง 1, PY012-001-8-6-3-7-3-4B, PY016-012-140-4-7B และ PY013-034-12-65-2-2-1B (ตาราง 11 และ ภาพ 9)

ตาราง 11 จีโนไทป์ของข้าวเหนียวต้านทานแมลงบั่วช่วงที่ F_{4.5} จำนวน 15 สายพันธุ์ที่ตรวจด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR จำนวน 4 เครื่องหมายที่มีตำแหน่งอยู่บน *qGM12* และ Aromarker ที่จำเพาะต่อยีน *badh2* ที่ควบคุมลักษณะความหอมในข้าว

ลำดับ	พันธุ์ประวัติ	ความต้านทานแมลงบั่ว	คู่ผสม	จีโนไทป์				
				badh2				
				Aromarker	RM279	RM6800	RM3340	RM110
1	PYO21-001-8-4-2	MS	PYO12-001-3-7-3-4B X RD22	a	c	a	c	a
2	PYO21-001-8-5-5	S	PYO12-001-3-7-3-4B X RD22	a	c	a	c	a
3	PYO21-002-5-2-8	MR	PYO13-034-12-65-2-2-1B X RD22	a	c	a	c	a
4	PYO21-002-18-1-1	s	PYO13-034-12-65-2-2-1B X RD22	a	c	a	c	a
5	PYO21-002-18-1-2	S	PYO13-034-12-65-2-2-1B X RD22	a	c	a	c	a
6	PYO21-002-18-7-2	S	PYO13-034-12-65-2-2-1B X RD22	a	c	a	c	a
7	PYO21-002-18-7-3	S	PYO13-034-12-65-2-2-1B X RD22	a	c	a	-	a
8	PYO21-002-18-7-4	R	PYO13-034-12-65-2-2-1B X RD22	a	c	a	c	a
9	PYO21-002-18-7-5	MS	PYO13-034-12-65-2-2-1B X RD22	a	c	a	c	a
10	PYO12-002-18-7-6	S	PYO13-034-12-65-2-2-1B X RD22	a	c	a	c	a
11	PYO21-005-6-5-2	S	PYO16-012-140-4-7B X RD22	a	c	a	c	a
12	PYO21-005-6-5-3	S	PYO16-012-140-4-7B X RD22	a	c	a	c	a
13	PYO21-005-6-5-5	R	PYO16-012-140-4-7B X RD22	a	c	a	c	a
14	PYO21-020-6-5-6	HR	PYO16-012-140-4-7B X RD22	a	c	a	c	a
15	PYO21-005-6-5-7	s	PYO16-012-140-4-7B X RD22	a	d	a	c	a
16	PYO12-001-8-6-3-7-4B	S	Parent	a	a	a	a	a
17	PYO12-001-8-6-3-7-4B	S	Parent	c	a	a	a	a
18	PYO13-034-12-65-2-2-1B	MS	Donor for RGM resistance	a	c	a	c	a
19	PYO13-034-12-65-2-2-1B	R	Donor for RGM resistance	c	d	a	d	c

หมายเหตุ: a หมายถึงอัลลีลเหมือนพันธุ์แบบไฮโซไกส

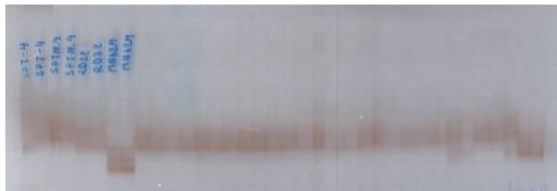
b หมายถึงอัลลีลแบบเฮเทอโลไซกัส

c หมายถึงอัลลีลเหมือนพันธุ์^{ไฮ}ไฮโซไกส (กข22) แบบไฮโซไกส

d หมายถึงหมายถึงอัลลีลเหมือนพันธุ์^{ไฮ}ไฮโซไกส (เหมือนของ 62 เอ็ม) แบบไฮโซไกส



RM279



RM3340



ภาพ 9 แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอของประชากรข้าวเหนียวพันธุ์ปรับปรุงใหม่ด้านทานแมลงบั่ว ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ 2 เครื่องหมาย ได้แก่ RM279 และ RM3340 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์รับและพันธุ์ให้

4.4 การทดสอบผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิตในประชากร F_{4:5}

จากการทดสอบผลผลิตของประชากรข้าวเหนียวพันธุ์ปรับปรุงใหม่ด้านทานแมลงบั่วในช่วงที่ F_{4:5} จำนวน 5 สายพันธุ์ ณ แปลงทดลองบ้านแม่กาหลวง อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา ภายใต้สภาพแวดล้อมที่มีน้ำสมบูรณ์ (ภาพ 10) โดยมีมาตรฐานเปรียบเทียบ จำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ กข6, กข22, ไรซ์เบอร์รี่ และ สันป่าตอง 1 และข้าวพันธุ์รับ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ PYO12-001-8-6-3-7-3-4B, PYO12-034-12-65-2-2-1B และ PYO16-012-140-4-7B โดยผลการทดลองมี ดังนี้

4.4.1 วันออกดอก 75%

จากการทดสอบพบว่า ข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ด้านทานแมลงบั่วในรุ่น F_{4:5} มีอายุเฉลี่ยที่ 75% ของการออกดอกอยู่ในช่วง 113-119 วัน ซึ่งสั้นกว่าพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบที่อยู่ในช่วง 115-125 วัน โดยสายพันธุ์ที่ออกดอกเร็วที่สุด คือ PYO21-002-5-2-8 (113 วัน) และสายพันธุ์ที่ออกดอกช้าที่สุดในกลุ่มทดลอง คือ PYO21-002-18-7-4 (119 วัน) เทียบกับพันธุ์มาตรฐานเช่น กข6 และไรซ์เบอร์รี่ ที่ใช้เวลานานถึง 125 วัน (ตาราง 12)

ตาราง 12 แสดงวันที่ตกกล้า วันที่ดำนา และวันออกดอกที่ 75% ของข้าวแต่ละสายพันธุ์
ที่ใช้ทดสอบผลผลิต ณ แปลงทดสอบบ้านแม่กาหลวง จ.พะเยา ในฤดูปลูกนา
ปี พ.ศ. 2566

ลำดับ	พันธุ์ประวัติ	ตกกล้า	ดำนา	วันออกดอก 75%	อายุวันออกดอก(วัน)
1	PYO21-001-8-4-2	11 ก.ค. 2566	10 ส.ค. 2566	23 ต.ค. 2566	115
2	PYO21-002-5-2-8			21 ต.ค. 2566	113
3	PYO21-002-18-7-4			27 ต.ค. 2566	119
4	PYO21-005-6-5-5			23 ต.ค. 2566	115
5	PYO21-020-6-5-6			26 ต.ค. 2566	118
6	SPT1			27 ต.ค. 2566	119
7	PYO13-034-12-65-2-2-1B			28 ต.ค. 2566	120
8	PYO12-001-8-6-3-7-3-4B			23 ต.ค. 2566	115
9	RB			2 พ.ย. 2566	125
10	PYO16-012-140-4-7B			28 ต.ค. 2566	120
11	RD22			23 ต.ค. 2566	115
12	RD6			2 พ.ย. 2566	125

4.4.2 ความสูงของต้น (PH)

สายพันธุ์ข้าวที่มีความสูงเฉลี่ยมากที่สุด คือ กข6 (139.8 ซม.) ซึ่งเป็นพันธุ์มาตรฐานรองลงมา คือ PYO21-020-6-5-6 (132.2 ซม.) และ PYO21-005-6-5-5 (125.7 ซม.) สายพันธุ์ใหม่บางสายพันธุ์ เช่น PYO21-002-5-2-8 มีลำต้นเตี้ยที่สุด (87.1 ซม.) ซึ่งอาจส่งผลดีต่อความต้านทานการล้มในบางสภาพแวดล้อม (ตาราง 13)

4.4.3 จำนวนต้นตอก (TN)

สายพันธุ์ข้าวที่มีจำนวนต้นตอกเฉลี่ยมากที่สุด คือ PYO21-002-18-7-4 โดยมีค่าเท่ากับ 7 ต้นตอก ซึ่งบ่งชี้ถึงศักยภาพในการแตกกอที่ดีและมีแนวโน้มส่งผลต่อผลผลิตที่สูงขึ้น ขณะที่พันธุ์มาตรฐานอย่าง กข6 มีจำนวนต้นตอกน้อยที่สุด (5 ต้นตอก) สะท้อนให้เห็นถึงข้อจำกัดทางการเจริญเติบโตของพันธุ์ดังกล่าว (ตาราง 13)

4.4.4 จำนวนรวงตอก (PN)

สายพันธุ์ข้าวที่ปรับปรุงใหม่ทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่มีจำนวนรวงตอกเฉลี่ย 6 รวงตอก แสดงถึงความสามารถในการสร้างรวงได้ดี ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของผลผลิต ในขณะที่พันธุ์ กข6 มีจำนวนรวงตอกน้อยที่สุด (5 รวงตอก) ซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดในการสะสมผลผลิตของพันธุ์ดังกล่าว (ตาราง 13)

4.4.5 น้ำหนักเมล็ดดีต่อรวง (FGW)

พันธุ์ กข22 มีน้ำหนักเมล็ดดีต่อรวงมากที่สุด (26.52 กรัม) แสดงถึง ศักยภาพในการพัฒนาเมล็ดและการสะสมอาหารที่ดี ขณะที่พันธุ์ PYO16-012-140-4-7B มีน้ำหนักเมล็ดดีต่ำที่สุด (15.20 กรัม) บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพการสร้างเมล็ดที่ต่ำกว่า (ตาราง 13)

4.4.6 น้ำหนักเมล็ดลีบต่อรวง (UFGW)

สายพันธุ์ PYO21-002-18-7-4 มีน้ำหนักเมล็ดลีบต่ำที่สุด (1.28 กรัม) สะท้อนการผสมเกสรและการพัฒนาเมล็ดที่มีประสิทธิภาพ เมื่อเทียบกับพันธุ์ PYO21-008-2-4-2 ที่มีน้ำหนักเมล็ดลีบสูงสุด (2.65 กรัม) แสดงถึงแนวโน้มการเกิดเมล็ดลีบที่มากกว่า (ตาราง 13)

4.4.7 น้ำหนักเมล็ดทั้งหมดต่อกอ (TGW)

พันธุ์ที่มีน้ำหนักเมล็ดมากที่สุด คือ กข22 (25.52 กรัม) รองลงมา คือ กข6 (24.11 กรัม) ขณะที่พันธุ์ PYO16-012-140-4-7B มีน้ำหนักเมล็ดต่ำที่สุด (15.20 กรัม) สะท้อนถึงความแตกต่างของขนาดและความสมบูรณ์ของเมล็ดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตาราง 13)

4.4.8 ผลผลิตต่อไร่ (GY)

สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตต่อไร่สูงที่สุด คือ กข6 (905.63 กก.ต่อไร่) รองลงมาคือ PYO12-001-8-6-3-7-3-4B (769.86 กก.ต่อไร่) และ กข22 (747.94 กก.ต่อไร่) ซึ่งแสดงศักยภาพการให้ผลผลิตสูงเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยรวม (709.13 กก.ต่อไร่) ขณะที่พันธุ์ปรับปรุงใหม่ที่ให้ผลผลิตสูงที่สุด คือ PYO21-005-6-5-5 (731.27 กก.ต่อไร่) (ตาราง 13)

จากผลการประเมินลักษณะทางการเกษตรของข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ในประชากร F₅ พบว่า สายพันธุ์ PYO21-002-18-7-4 มีศักยภาพสูงที่สุดในด้านผลผลิตต่อไร่และจำนวนรวงต่อกอ ซึ่งสะท้อนความสามารถในการสะสมผลผลิต และประสิทธิภาพการผสมเกสรที่ดี เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์มาตรฐาน (ตาราง 13)

ในขณะที่ สายพันธุ์ PYO21-005-6-5-5 และ PYO21-020-6-5-6 แสดงค่าน้ำหนักเมล็ดดีต่อรวง (FGW) สูงกว่าค่าเฉลี่ยโดยรวม แสดงถึงศักยภาพในการพัฒนาเป็นพันธุ์ที่มีคุณภาพเมล็ดดีและประสิทธิภาพการสร้างเมล็ดสูง ซึ่งเหมาะสมต่อการคัดเลือกเข้าสู่กระบวนการปรับปรุงพันธุ์ในระยะต่อไป (ตาราง 13)

สายพันธุ์ข้าวเหนียวปรับปรุงใหม่ทั้งหมดมีแนวโน้มให้ผลผลิตสูงกว่าหรือใกล้เคียงพันธุ์มาตรฐาน ทั้งยังมีคุณภาพด้านการติดเมล็ดและองค์ประกอบผลผลิตที่เด่นชัด แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นพันธุ์ข้าวเหนียวต้านทานแมลงบั่วในเชิงพาณิชย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ตาราง 13)



ภาพ 10 ประชากรข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่จำนวน 5 สายพันธุ์ และพันธุ์
มาตรฐานเปรียบเทียบ 7 พันธุ์ ที่ปลูกทดสอบผลผลิตในสภาพน้ำสมบูรณ์ของ
แปลงแม่กากลาง อ.เมือง จ.พะเยา ในฤดูนาปี พ.ศ.2566



ตาราง 13 ลักษณะผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตของข้าวเหนียวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ต้านทานแมลงบัวจำนวน 5 สายพันธุ์ และพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ 7 พันธุ์ ที่ปลูกทดสอบผลผลิตในสภาพนาสมบูรณ์ ของฤดูนาปี พ.ศ. 2566 ในพื้นที่จังหวัดพะเยา

ลำดับ	พันธุ์ประวัติ	ข้อมูล	ค่าเฉลี่ย							
			DF 75% (day)	PH (cm)	TN (tiller/hill)	PN (panicle/hill)	FGW (g)	UFGW (g)	TGW (g)	GY (kg/rai)
1	PY021-008-2-4-2	PY012-001-3-7-3-4B X RD22	115 ^h	124 ^{bcd}	6 ^{ab}	6 ^a	21.92 ^{abc}	2.65 ^a	21.92 ^{abc}	724 ^{ab}
2	PY021-002-5-2-8	PY013-034-12-65-2-2-1B X RD22	113 ⁱ	87 ^f	6 ^{ab}	6 ^a	23.96 ^{ab}	1.61 ^{de}	23.97 ^{ab}	613 ^b
3	PY021-002-18-7-4	PY013-034-12-65-2-2-1B X RD22	119 ^e	113 ^{cde}	7 ^a	6 ^a	19.21 ^{bc}	1.28 ^g	19.21 ^{bc}	645 ^b
4	PY021-005-6-5-5	PY016-012-140-4-7B X RD22	115 ^h	125 ^{bc}	6 ^{ab}	6 ^a	17.43 ^{bc}	1.55 ^{def}	17.43 ^{bc}	731 ^{ab}
5	PY021-020-6-5-6	PY016-012-140-4-7B X MN62M	118 ^g	132 ^{ab}	6 ^{ab}	6 ^a	19.64 ^{abc}	1.33 ^g	19.64 ^{abc}	600 ^b
6	SPT1	Parent	119 ^f	117 ^{cde}	6 ^{ab}	6 ^a	21.13 ^{abc}	1.72 ^{cd}	21.13 ^{abc}	676 ^{ab}
7	PY013-034-12-65-2-2-1B	Parent	120 ^c	115 ^{cde}	6 ^{ab}	6 ^a	19.96 ^{abc}	1.88 ^{bc}	19.96 ^{abc}	701 ^{ab}
8	PY012-001-8-6-3-7-3-4B	Parent	115 ^h	110 ^{de}	6 ^{ab}	6 ^a	21.42 ^{abc}	2.05 ^b	21.42 ^{abc}	769 ^{ab}
9	RB	Parent	125 ^a	109 ^e	6 ^{ab}	5 ^b	17.81 ^{bc}	1.52 ^{defg}	17.80 ^{bc}	616 ^b
10	PY016-012-140-4-7B	Parent	120 ^d	110 ^{de}	6 ^{ab}	6 ^a	15.20 ^c	1.35 ^g	15.20 ^c	564 ^b
11	RD22	Parent	115 ^h	116 ^{cde}	5 ^b	5 ^b	26.52 ^a	1.54 ^{defg}	25.52 ^a	747 ^{ab}
12	RD6	Parent	125 ^b	139 ^a	5 ^b	5 ^b	24.11 ^{ab}	1.41 ^{efg}	24.11 ^{ab}	905 ^a
Min			113	87	5	5	17.81	1.28	15.2	564
Max			125	139	7	6	26.52	2.68	25.52	905
Mean			118.25	116	5.55	5.44	22.03	1.66	20.88	709
CV (%)			3.32	11	10.23	9.75	11.48	21.93	13.74	13.87
F-test			**	**	*	*	**	**	**	**

หมายเหตุ: ค่า F-test สำหรับ $df = 11$, $df = 132$ ($\alpha = 0.05$) ≈ 1.89

Ns = ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญสูง ($p < 0.01$)



บทที่ 5

บทสรุป

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

จากการเปรียบเทียบพันธุกรรมความต้านทานแมลงบัว พบว่า อัตราการแสดงออกต้านทานต่ออ่อนแอไม่ใช่ 1:3 ตามกฎของเมนเดล หมายความว่า มียีนควบคุมลักษณะความต้านทานต่อแมลงบัวมากกว่า 1 ยีน จากผลการทดลองแสดงถึงความต้านทานต่อแมลงบัวในข้าวพันธุ์ให้จากหมยหนอง 62 เอ็ม และ กข22 ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย เนื่องจากมีจำนวนต้นที่แสดงความต้านทานน้อยกว่าจำนวนต้นที่แสดงความอ่อนแอ

จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะพันธุกรรมความต้านทานต่อแมลงบัวในคู่ผสม PYO16-001-3-24B x หมยหนอง 62 เอ็ม พบว่า ยีนที่ควบคุมลักษณะดังกล่าวมีแนวโน้มจะมีจำนวน 2 ยีน และมีแสดงออกของยีนแบบ duplicate recessive gene ซึ่งหนึ่งในนั้นเป็นยีนที่อยู่บริเวณ *qGM12* จากอัตราส่วน พบว่า เป็นยีนหลัก (major gene) แต่เนื่องจากข้าวพันธุ์หมยหนอง 62 เอ็ม ที่มีความต้านทานต่อแมลงบัว แต่เป็นข้าวพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งไม่เหมาะสมกับการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากอาจได้ลักษณะไม่พึงประสงค์ถ่ายทอดมาด้วย จึงคัดเลือกข้าวพันธุ์ปลูกที่มีความต้านทานต่อแมลงบัวในการปรับปรุงพันธุ์ และมีบรรพบุรุษเป็นหมยหนอง 62 เอ็ม ได้แก่ ข้าว กข22 ซึ่งมีการรายงานว่ามีสามารถต้านทานแมลงบัวได้ในบางพื้นที่ แต่ยังไม่มีการรายงานกลไกการต้านทานแมลงบัวแต่อย่างใด

จากการศึกษาของ จีรพงษ์ ใจรินทร์ และคณะ (2564) ได้ค้นพบ *qGM12* ในข้าวพันธุ์หมยหนอง 62 เอ็ม ที่ควบคุมลักษณะการต้านทานแมลงบัว โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ 3 เครื่องหมาย ได้แก่ RM110, RM3340 และ RM6800 เมื่อเปลี่ยนพันธุ์ให้เป็นข้าว กข22 ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวแสดงลักษณะของอัลลีลไม่แตกต่างกัน ทำให้ต้องคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันของอัลลีลในเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งใกล้เคียงและในตำแหน่งเดียวกัน จึงทำการทดสอบกับพันธุ์รับและพันธุ์ให้ทั้งสาม ได้แก่ PYO16-001-3-24B, หมยหนอง 62 เอ็ม และ กข22 พบว่า ในคู่ผสมที่ 1) PYO16-001-3-24B x หมยหนอง 62 เอ็ม สามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอได้ 8 เครื่องหมาย ได้แก่ RM109, RM3340, RM6938, RM110, RM233, RM279, OSR14 และ RM211 จากข้าวหมยหนอง 62 เอ็ม และในคู่ผสมที่ 2)

PYO16-001-3-24B x กข22 สามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ได้แก่ RM279 ในการติดตาม *qGM12* จากข้าว กข22 ในการตรวจสอบจีโนไทป์

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการประเมินความต้านทานแมลงบั่วในจังหวัดแพร่ ในประชากร F_2 และการตรวจจีโนไทป์ในเครื่องหมายดีเอ็นเอ พบว่า ในคู่ผสมที่ 1) PYO16-001-3-24B x เหมยหนอง 62 เอ็ม ในเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 5 เครื่องหมาย พบว่า มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ แสดงได้ว่า เครื่องหมายทั้ง 4 มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานแมลงบั่วใน *qGM12*^{MN62M} และในคู่ผสมที่ 2) PYO16-001-3-24B x กข22 ในเครื่องหมายดีเอ็นเอ 2 เครื่องหมาย ได้แก่ RM110 พบว่า มีความสัมพันธ์ เท่ากับ 0 แสดงว่าเครื่องหมาย RM110 ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานแมลงบั่ว หรือก็คือ ลักษณะความต้านทานแมลงบั่วไม่ขึ้นอยู่กัตำแหน่ง *qGM12*^{RD22} และในเครื่องหมาย RM279 พบว่า มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ แสดงได้ว่า เครื่องหมาย RM279 มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานแมลงบั่วใน *qGM12*^{RD22} จากผลการประเมินดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องระหว่างข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ กับลักษณะฟีโนไทป์ที่แสดงออกในสภาพจริง ซึ่งบ่งชี้ว่าสายพันธุ์ที่ได้จากการผสมกับข้าวพันธุ์ กข22 สามารถแสดงลักษณะความต้านทานต่อแมลงบั่วได้ดี โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับความต้านทานต่อแมลงบั่ว คือ RM3340 สามารถใช้ติดตามการถ่ายทอด *qGM12* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากผลการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่า ข้าวพันธุ์ กข22 ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูกมีแนวโน้มที่จะเป็นแหล่งพันธุกรรมที่สามารถถ่ายทอดยีนต้านทานแมลงบั่วไปสู่สายพันธุ์อ่อนแอได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะเมื่อใช้ร่วมกับวิธีการคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (marker-assisted selection; MAS) ซึ่งช่วยเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานได้อย่างเป็นระบบ

จากการทดสอบผลผลิตเบื้องต้น พบว่า ข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ต้านทานแมลงบั่วมีผลผลิตเฉลี่ย 662.98 กก.ต่อไร่ โดยสายพันธุ์ที่มีผลผลิตสูงสุด 2 อันดับแรก ได้แก่ 1) ข้าวเหนียวหอมสีดำ PYO21-005-6-5-5 มีผลผลิตสูงสุด 731.27 กก.ต่อไร่ และ 2) ข้าวเหนียวหอมสีขาว PYO21-001-8-4-2 มีผลผลิตเฉลี่ย 724.61 กก.ต่อไร่ โดยข้าวเหล่านี้ยังมีลักษณะทรงต้นที่ไม่สม่ำเสมอ จำเป็นต้องมีการปลูกคัดเลือกให้สม่ำเสมอต่อไป

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาเพื่อค้นหาตำแหน่งที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อแมลงบั่วในข้าวเหนียว 62 เอ็ม และ กข22 พบว่า ในข้าวพันธุ์เหนียว 62 เอ็ม มีแนวโน้มเป็น 2 QTLs ซึ่งเป็นยีนด้อยที่แสดงออกร่วมกันในลักษณะ duplicate recessive epistasis ซึ่งแสดงให้เห็นลักษณะความต้านทานในประชากรข้าวข้าวที่ F₂ และในข้าวพันธุ์ กข22 ที่พบว่า *qGM12* เป็น QTL หลัก (major QTL) โดยคาดว่าจะได้รับการถ่ายทอดมาจากเหนียว 62 เอ็ม ที่เป็นบรรพบุรุษ โดยมีเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM3340 สัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อแมลงบั่วมากที่สุด สามารถใช้ติดตามการถ่ายทอด *qGM12*^{RD22} หรือ *qGM12*^{MN62M} ในข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงได้

จากการพัฒนาข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงใหม่ต้านทานแมลงบั่วในการประเมินความต้านทานของแมลงบั่วที่มีความสามารถอยู่ในระดับต้านทาน คือ มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายอยู่ที่ 1 - 5% มี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ PYO21-005-6-5-5 และ PYO21-05-6-5-6 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เกิดจากคู่ผสมระหว่าง PYO16-012-140-4-7B X กข22 และ PYO16-012-140-4-7B X เหนียว 62 เอ็ม ตามลำดับ และในประชากรที่มีความสามารถในการต้านทานแมลงบั่วอยู่ในระดับค่อนข้างต้านทาน คือ มีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายอยู่ที่ 6-10% มี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ PYO21-001-8-4-2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เกิดจากคู่ผสมระหว่าง PYO12-001-8-6-3-7-3-4B X กข22, PYO21-002-5-2-8 และ PYO21-002-18-7-4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เกิดจากคู่ผสมระหว่าง PYO13-034-12-65-2-2-1B X กข22 ซึ่งสายพันธุ์เหล่านี้จะถูกนำไปปลูกคัดเลือกเพื่อให้มีความสม่ำเสมอและปลูกทดสอบผลผลิตต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งใกล้เคียงกับ *qGM12* ให้มากขึ้น เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้พันธุ์รับที่ใช้มีพันธุ์กรรมใกล้เคียงกับพันธุ์ให้ ทำให้มีพบเครื่องหมายที่มีความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอเพียงเครื่องหมายเดียว คือ RM279 หรืออาจต้องปรับเปลี่ยนพันธุ์รับให้มีฐานพันธุ์กรรมที่แตกต่างจากพันธุ์ให้มากขึ้น เพื่อให้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีอยู่ได้แสดงผลได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

บรรณานุกรม

กรมการข้าว. (2556). การปรับปรุงพันธุ์ข้าวนาชลประทาน. กองวิจัยและพัฒนาข้าว.

กรมการข้าว. ม.ป.ท., ม.ป.พ.

กรมการข้าว. (2558). การจัดการพื้นที่การผลิตข้าว. หน้า 37-70. สืบค้นเมื่อ 2 พฤษภาคม

2567, จาก <https://ndoe.doe.go.th/zoning/data/2017/files/pdf4.pdf>.

กรมการข้าว. (2558). รายงานสถานการณ์ข้าวและพันธุ์ข้าวในประเทศไทย. กรุงเทพฯ:

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กรมการข้าว. (2559ก). พันธุ์ข้าว สันป่าตอง 1. องค์ความรู้เรื่องข้าว. สืบค้นเมื่อ 16 กรกฎาคม

2564, จาก [http://www.ricethailand.go.th/rkb3/title-index.php-file=content.](http://www.ricethailand.go.th/rkb3/title-index.php-file=content.php&id=74.html)

[php&id=74.html](http://www.ricethailand.go.th/rkb3/title-index.php-file=content.php&id=74.html).

กรมการข้าว. (2559ข). พันธุ์ข้าว เหมยหนอง 62 เอ็ม. องค์ความรู้เรื่องข้าว. สืบค้นเมื่อ 16

กรกฎาคม 2564, จาก [http://www.ricethailand.go.th/Rkb3/title-index.php-file=](http://www.ricethailand.go.th/Rkb3/title-index.php-file=content.php&id=38.html)

[content.php&id=38.html](http://www.ricethailand.go.th/Rkb3/title-index.php-file=content.php&id=38.html).

กรมการข้าว. (2559ค). พันธุ์ข้าว กข22. องค์ความรู้เรื่องข้าว. สืบค้นเมื่อ 16 กรกฎาคม

2564, จาก [http://www.ricethailand.go.th/rkb3/title-index.php-file=content.php&id=](http://www.ricethailand.go.th/rkb3/title-index.php-file=content.php&id=160.html)

[160. html](http://www.ricethailand.go.th/rkb3/title-index.php-file=content.php&id=160.html).

กรมการข้าว. (7 มีนาคม 2560ก) เดือนภัยการระบาดของแมลงบัว.

กรมการข้าว. (2560ข). ศัตรูข้าว และการป้องกันกำจัด. องค์ความรู้เรื่องข้าว. สืบค้นเมื่อ 16

กรกฎาคม 2564, จาก [http://www.ricethailand.go.th/Rkb/disease and insect/ index.php-](http://www.ricethailand.go.th/Rkb/disease and insect/ index.php-file=content.php&id=45.html)

[file=content.php&id=45.html](http://www.ricethailand.go.th/Rkb/disease and insect/ index.php-file=content.php&id=45.html).

กรมวิชาการเกษตร. (2543). การพัฒนาการเกษตรไทยยุค เทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพฯ:

สำนักงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี ชีวภาพ. กรมวิชาการเกษตร จตุจักร.

กรมส่งเสริมเกษตร. (8 กุมภาพันธ์ 2560) ข้าวเดือนการระบาดศัตรูพืชประจำสัปดาห์.

กรมส่งเสริมเกษตร. (25 มกราคม 2566) เดือนการระบาดศัตรูพืชเรื่องแมลงบัว.

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2559). นโยบายการปรับโครงสร้างการผลิตภาคการเกษตร

(Zoning). กรุงเทพฯ: สำนักปลัดกระทรวง.

กุลชนา ดาร์เวล, จินตนา สุวรรณ, พีรพล ม่วงงาม, วัชร สุขวิวัฒน์, ปราณี มรีนิล และคณะ.

(2566). การประเมินทรัพยากรพันธุกรรมข้าวเพื่อการใช้ประโยชน์ด้านปรับปรุงพันธุ์.

วารสารวิชาการข้าว, 14(1). 6–24.

คณะเกษตรศาสตร์. (2560). **การปรับปรุงพันธุ์พืชผสมตัวเอง**. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

สืบค้นเมื่อ 2 พฤษภาคม 2567, จาก http://www.agri.ubu.ac.th/mis/evaluate-assess_paper02/upload/3248.pdf.

คัตตณัฐ ชื่นวงศ์อรุณ และณภัทรดนัย. (2565). พันธุกรรมเป็นส่วนหนึ่งของกลไกการดำรงเผ่าพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต และได้รับการศึกษามาอย่างยาวนาน โดยนักวิทยาศาสตร์ยุคหลังได้ยกย่องให้ เกรเกอร์ โยฮัน เมนเดล เป็นบิดาแห่งวิชาพันธุศาสตร์ โดย ทฤษฎีของเมนเดลเป็นทฤษฎีเบื้องต้นที่เป็นรากฐานของการประยุกต์ใช้หลักการพันธุกรรม. **NATIONAL GEOGRAPHIC**. สืบค้นเมื่อ 21 มีนาคม 2567, จาก <https://ngthai.com/science/45186/mendelism/>.

ไวพจน์ กันจู, สุภัตญา เรืองข้า, สุมณ ห้อยมาลา, อนุชา พลัฒพล, อภิชาติ วรรณวิจิตร และธีรยุทธ ตูจินดา. (2556). การตรวจสอบความหอมในเชื้อพันธุกรรมข้าวไร้ไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ที่จำเพาะต่อยีน *Os2AP* และการวิเคราะห์คุณภาพหุงต้มและความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ด. **Thai J. Genetics**, 6(1). 11–24.

จินตนา ทยาธรรม, ดวงรัตน์ ธงภักดิ์ และทิพย์วดี อรรถธรรม (2542). **การใช้เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA–Polymerase Chain Reaction (RAPD–PCR) ในการจำแนกประชากรบัว (*Orseolia oryzae*)**. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.

จินตนา ทยาธรรม, ดวงรัตน์ ธงภักดิ์, ทิพย์วดี และอรรถธรรม. (2542). **การใช้เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA–Polymerase Chain Reaction (RAPD–PCR) ในการจำแนกประชากรบัว (*Orseolia oryzae*)**. จดหมายข่าวสมาคมกีฏและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย. 7(2). กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร จตุจักร.

จินตนา ทยาธรรม, นิภา จันทศรีสมหมาย และวันทนา ศรีรัตนศักดิ์. (24–28 มิถุนายน 2535). **ชีวชนิดของแมลงบัวในประเทศไทย. ใน เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาทางวิชาการแมลงและศัตรูพืช (604–652)**. ประจวบคีรีขันธ์: กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

จินตนา ทยาธรรม, เรวัต ภัทรสุทธิ, วันทนา ศรีรัตนศักดิ์ และสมใจ สาสีโท. (7–8 มีนาคม 2548). **อิทธิพลของระยะเวลาปลูกข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ระยะปักดำแตกต่างกันต่อการ**

- ทำลายของแมลงบัว. ใน **เอกสารประกอบการประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวประจำปี 2548** (84-91). นครนายก: สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร จีรพงศ์ ใจรินทร์, กัลยา สานแสน, สงวน เทียงดีฤทธิ์, พิกุล สีสากุล และคณะ (2552).
- ความหลากหลายทางพันธุกรรมและชีวชนิดของแมลงบัวในประเทศไทย, **วารสารวิชาการข้าว**, 3(2). 39-47.
- จิราพร แก่นทรัพย์, ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์ และชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์. (2563). เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรค, **วารสารวิชาการเกษตร**, 38(2). 207-222.
- จุฑาพร แสงประจักษ์. (2555). การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม. **แก่นเกษตร**, 40(3). 299-308.
- ชนษฎ์ ม้าลำพอง. (2562). **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พັນนิภา ยาใจ และปรีดา เสียงใหญ่. (ม.ป.ป.). การวิจัยและพัฒนาการจัดการแมลงบัว. **Bureau of Rice Research and Development**, 255-266.
- พັນนิภา ยาใจ, อัญชลี ตาคำ และกุลชนา เกศสุวรรณ. (25-27 กุมภาพันธ์ 2558). ประเมินความเสี่ยงและระดับเศรษฐกิจของแมลงบัวที่เข้าทำลายข้าวพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ. ใน **เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการข้าวกลุ่มศูนย์วิจัยข้าวภาคเหนือตอนบนและภาคเหนือตอนล่าง ครั้งที่ 8 ประจำปี 2558**. เชียงราย: กรมการข้าว กองวิจัยและพัฒนาข้าว ศูนย์วิจัยข้าวเชียงราย.
- พิกุล สีสากุล, กุลชนา ดาร์เวล, ยศวิศ พันธุ์เสนี, พันนิภา ยาใจ, จีรพงศ์ ใจรินทร์ และคณะ. (18-20 กุมภาพันธ์ 2563). การค้นพบยีนต้านทานแมลงบัว GM12 ในข้าวพันธุ์หม่นอง 62 เอ็ม. ใน **เอกสารประกอบการประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2563** (69-72). ขอนแก่น: กรมการข้าว.
- ภมร บัตตาวะตัง, เจตน์ ศชฤกษ์ และสุรเดช ปาละวิสุทธิ. (25-26 มีนาคม 2557). การศึกษากลไกความต้านทานของข้าวสายพันธุ์ดีต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล. ใน **เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการกลุ่มศูนย์วิจัยข้าวภาคเหนือตอนบนและภาคเหนือตอนล่าง ประจำปี 2557** (175-195). นครสวรรค์: กรมการข้าว สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว.
- รัตติยา ชราพก. (2549). **ความหลากหลายทางสายพันธุ์ของประชากรแมลงบัวในภาคเหนือของประเทศไทย**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

วรารณ คำบุญเรือง, เอกราช บุญรัตน์, ประพาส วีระแพทย์ และ พจนา วีระโสภณ. (3-5 กุมภาพันธ์ 2524). สายพันธุ์ข้าวต้านทานแมลงบั่วในสภาพธรรมชาติ. ใน **เอกสารประกอบการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 19** (40-80). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรารุณี โล๊ะสุข. (2561). การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ให้มีความหอมต้านทานโรคไหม้และโรคขอบใบแห้ง โดยใช้วิธีการผสมกลับร่วมกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยพะเยา, พะเยา.

วันทนา ศรีรัตนศักดิ์. (2560). “แมลงบั่ว: ศัตรูข้าวที่ต้องจัดการการระบาด”.

วารสารวิชาการข้าว, 8(1). 84-108.

วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ, สมชาย ธนสินชัยกุล, สุรเดช ปาละวิสุทธิ, เจนตัน คชฤกษ์ และคณิดา เกิดสุข. (2557). ปฏิกริยาของข้าวสายพันธุ์ผสมกลับ BC_4F_{3-4} ((อาบาญา/ขาวดอกมะลิ 105) x ชัยนาท 1) กับแมลงบั่วในภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย.

วารสารเกษตร, 30(2). 151-159.

วีรยุทธ สร้อยนาถ, วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ, สมชาติ ธนสินชัยกุล, วิชัย สรพงษ์ไพศาล และคณะ. (2558). ความหลากหลายของแมลงและแมงมุมในนาข้าวเขตชลประทานจังหวัดพิษณุโลก.

วารสารเกษตร, 21(3). 281-290.

วีรฤดี กัตถัญญกุล, สว่าง ชัดขวาง, จันท์เพ็ญ ลิ้มพะยอม, จิตนา ทยาธรรม และมารศรี จิระสมบัติ. (2523). การศึกษาไบโอไทป์ของแมลงบั่วในประเทศไทย. รายงานผลการทดลองและวิจัย กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2523. หน้า 7.

วีรฤดี กัตถัญญกุล, สว่าง ชัดขวาง, จิตนา ทยาธรรม, มารศรี จิระสมบัติ และคณะ. (2524). ความต้านทานของข้าวเปลี่ยนแปลงพันธุ์กรรม กข. 4 และ กข. 7 ต่อแมลงบั่ว. ม.ป.ท.: ม.ป.พ.

วีรฤดี กัตถัญญกุล, สว่าง ชัดขวาง, นิภา จันท์ศรีสมหมาย และสุพรรณ สิทธิวงศ์. (24-28 พฤษภาคม 2527). ความเสียหายของข้าวเกิดจากการทำลายของแมลงบั่ว. ใน **รายงานผลการค้นคว้าวิจัย ปี 2527** (35). กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ไวพจน์ กันจู, สุกัญญา เรืองขำ, สุมณ ห้อยมาลา, อนุชา พลัฒพลา และอภิชาติ วรณวิจิตร. (2560). **เอกสารประกอบการสอนรายวิชาพันธุศาสตร์เกษตร**. (พิมพ์ครั้งที่ 1). พะเยา: สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา.

- ไวพจน์ กันจุ, สุกัญญา เรืองขำ, สุนน ห้อยมาลา, อนุชา พลัปปลา, อภิชาติ วรณวิจิตร และ ศันสนีย์ จำจด. (7-9 เมษายน 2554). ความหลากหลายทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการในเชื้อพันธุ์ข้าวไทย. ใน **Proceedings of the 17th National Genetic Conference**. เชียงใหม่: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และสมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย.
- สมใจ สาสีโท, นันทิดา ลินสายไทย, นภสร แก้ววิเศษ, เรณู จำปาเกตุ และคณะ. (2560). ข้าวเหนียวพันธุ์ กข22. **วารสารวิชาการข้าว**, 8(1). 25-43.
- สมใจ สาสีโท. (2558). KKN04203-NKI-14-2-6-1: ข้าวเหนียวไม่ไวต่อช่วงแสงสายพันธุ์ดีเด่นภาคตะวันออกเฉียงเหนือ KKN04023-NKI-14-2-6-1: **A promising non-photosensitive glutinous rice line for northeastern Thailand**. กรุงเทพฯ: กรมการข้าว
- สาธิต มิตรหาญ และจันทร์จิรา รุ่งเจริญ. (2564). “แมลงบัว” ศัตรูตัวฉกาจของข้าว [ฐานข้อมูลสำเร็จรูป]. สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง: <https://hkm.hrdi.or.th/Knowledge/detail/494>
- สุदारตัน คำพา. (มปป.). การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมตามหลักของเมนเดล. สืบค้นเมื่อ 16 กรกฎาคม 2564, จาก http://www.satriwit3.ac.th/files/1211201313292364_17050821212034.pdf
- สุวรรต์ ทองคำดี. (2550). การจัดการผลิตข้าวในนาชลประทานในภาคเหนือตอนล่าง. สืบค้นเมื่อ 16 กรกฎาคม 2564, จาก <http://lib.doa.go.th/multim/e-book/EB00052.pdf>
- สุริพร เกตุงาม. (2546). เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. **วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**, 5(2). 37-59.
- Cordell H.J. (2002). Epistasis: what it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans. **Human Molecular Genetics**, 11(20). 2463-2468.
- Cheng L., Huang F., Jiang Z., Lu B., Zhong X. and Qiu Y. (2021). Improved phenotyping procedure for evaluating resistance in rice against gall midge (*Orseolia oryzae*), Wood-Mason. **Plant Methods**, 17(121). 1-11.
- Gogne', R.J. (1973). **Family Cecidomyiidae**. P.63-85. In Delfinado M.D., Hardy D.E., editors. A catalog of the Diptera of the Oriental region. Honolulu (USA): University Press of Hawaii.
- Hatai, N. (1965). Studies on the ecology and control of the rice gall midge. **Nettei Nokon Shuo**, 21. 75-81.

- Hidaka, T., Vungsilabutr, P. and Kadkao, S. (1974). **Studies on ecology and control of the rice gall midge in Thailand**. Tokyo: Kogusuri Printing.
- Jia-shi Lu, Long-fei HE, Jing XU, Chun-yan XU, Chuang-zhen LI, Su-mei WEI and Jian-mu SU. (2013). Identification and genetic analysis of gall midge resistance in rice germplasm 91-1A2. **Rice Science**, 20(1). 73-78.
- Judith Galeng-Lawilao, Arvind Kumar and Dirk De Waele. (2018). QTL mapping for resistance to and tolerance for the rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*. **BMC Genomic Data**, 19(1). 1-17.
- Kalode, M.B., D. Pophaly, P.R. Viswanathan and M. Sreeramulu. (1977). Studies on resistance and mass rearing of rice gall midge, *Orseolia oryzae* (Wood-Mason). **Madras Agric**, 64. 733-739.
- Korinsak, S. (2009). **Marker-assisted pyramiding bacterial blight resistance genes (*xa5*, *Xa21*, *xa33(t)*, *Xa34(t)* and *qBB11*) in rice**. M.S., Thailand: Kasetsart University, Nakhon Pathom.
- Korinsak, S., Sirithunya, K. and Toojinda, T. (2014.) Identifying a source of a bacterial blight resistance gene *xa5* in rice variety 'IR62266' and development of a functional marker 'PAXa5', the easy agarose based detection. **Thai journal Genetics**, 7(3). 164-172.
- Ladell, W.R.S. (1933). Insects injurious to rice in Siam. J. **Siam Soc. Nat Hist. Suppl**, 9. 161-172.
- Lanceras-Siangliw and Toojinda, T. (2010). Two introgressed quantitative trait loci confer a broad-spectrum resistance to blast disease in the genetic background of the cultivar RD6 a Thai glutinous jasmine rice. **Field Crops Research**, 119(2). 245-251.
- Leelagud, P., Kongsila, S., Vejchasarn, P., Darwell, K., Phansenee, Y., Suthanthangjai, A., Uparang, C., Kawichi, R., Yajai, O., Boonsa-nga, K., Chamarerk, V. and Jairin, J. (2020). Genetic diversity of Asian rice gall midge based on mtCOI gene sequences and identification of a novel resistance locus *gm12* in rice cultivar MN62M. **Molecular Biology Reports**, 2020(47). 4273-4283.
- Leelagud, P., Noppharatana, C., and Jairin, J. (2020). Detection of QTL conferring resistance to the rice gall midge in Thai rice landrace. **Thai Journal of Agricultural Science**, 53(4). 230-240.

- Lu, J.S., He, L.F., Xu, J., Qin, F., Huang, M., and Wei, S.M. (2013). Identification and genetic analysis of gall midge resistance in rice germplasm 91-1A2. **Rice Science**, 20(6). 479–484.
- Mackay, T.F.C. (2014). Epistasis and quantitative traits: using model organisms to study gene–gene interactions. **Nature Reviews Genetics**, 15(1). 22–33.
- Moore, J.H. (2005). A global view of epistasis. **Nature Genetics**, 37(1). 13–14.
- Nasser Yao, Cheng–Ruei Lee, Kassa Semagn, Mounirou Sow, Francis Nwilene, Olufisayo Kolade, Roland Bocco, Olumoye Oyetunji, Thomas Mitchell–Olds and Marie–Noelle Ndjiondjop. (2016). QTL mapping in three rice populations uncovers major genomic regions associated with African rice gall midge resistance. **PLOS ONE**, 10(1371). 1–17.
- Phillips, P.C. (2008). Epistasis the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. **Nature Reviews Genetics**, 9(11). 855–867.
- Sahu, N., Gowda G.B., Kishore, R.L., Anilkumar, C., Prasad, S.R., Mandal, L., Pirasanna, P.G.G., Patil, B.N., Adak, T., Mahendiran, A. and Chandra, R.P. (2023a). Marker–trait association analysis for gall midge (*Orseolia oryzae*) diverse rice population. **Annals of Applied Biology**, 1. 1–10.
- Sahu, N., Behera, L., Sahu, R. K., Sahu, R. K., and Rath, P. C. (2023b). Molecular characterization of rice gall midge resistance using SSR and functional markers. **Journal of Applied and Natural Science**, 15(1). 218–225.
- Sahu, N., Gowda, G.B., Kishore, R.L., Patil, B.N., Basak, N., Chandra, R.P., Anilkumar, C. and Rath, K.L. (2023c). Antixenosis and antibiosis mechanisms of resistance to Asian rice gall midge, *Orseolia oryzae* (Wood–Mason) in rice land races. **Annals of Applied Biology**, 1. 1–12.
- Samart, W., Wintai, K., Siriphat, R., Theerayut, T., Somvong, T. and Apichart, V. (2005). A rapid construction of a physical contig across a 4.5 cM region for rice grain aroma facilitates marker enrichment for positional cloning. **Science Asia**, 31(3). 299–306.
- Tao, N., Hu, Y., Huang, X., Zhou, Y., and Liu, C. (2016). Mapping of quantitative trait loci (QTLs) for resistance to African rice gall midge in rice. **Euphytica**, 208. 505–516.

- Vanavichit, A. (2005). A rapid construction of a physical contig across a 4.5 cM region for rice grain aroma facilitates marker enrichment for positional cloning. **Science Asia**, 31(3). 299–306.
- Vanavichit, A., Yoshihashi, T., Wanchana, S., Areekit, S., Saengsraku, D., Kamolsukyonyong, W., Lanceras J., Toojinda, T. and Tragoonrung, S. (2004). Positional cloning of Os2AP, the aromatic gene controlling the biosynthetic switch of 2-acetyl-1-pyrroline and gamma amino butyric acid (GABA) in rice. **Proceedings of the 1st international conference on rice for the future**, 1. 71–80.





ภาคผนวก ก วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

1) วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี DNATrap® ของห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

- 1) เก็บตัวอย่างใบข้าวอ่อนจากต้นที่ต้องการตรวจสอบจีโนมจำนวน 3 ใบต่อต้น ใส่ถุงพลาสติกแช่เย็น
- 2) นำใบข้าวมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาณ 1 กรัม เติมนิโตรเจนเหลว ทำการบดให้ละเอียดอย่างรวดเร็วด้วย blue tip
- 3) เติเมกแทรกชั่นบัฟเฟอร์ (extraction buffer) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดตัวอย่างเขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 1 ชั่วโมง
- 4) เมื่อครบเวลาแล้วนำออกจากตู้อบ นำมาแช่น้ำแข็งทันทีเป็นระยะเวลา 5 นาที
- 5) เติมนิวทราไลเซอร์ (neutralizer) 100 μ l เขย่าให้เข้ากันแล้วแช่น้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C
- 6) ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติมแทรปปิงบัฟเฟอร์ (trapping buffer) จำนวน 500 μ l แล้วกลับหลอดไปมาเบา ๆ
- 7) จากนั้นนำหลอดดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,000 rpm นาน 1 นาที ทำการเทน้ำส่วนใสทิ้ง
- 8) เติมวอชชิงบัฟเฟอร์วัน (washing buffer I) 500 μ l นำไปวอร์เท็กซ์ (vortex) ให้ตะกอนแตกละเอียด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,000 rpm นาน 1 นาที ทำการเทน้ำส่วนใสทิ้ง
- 9) เติมวอชชิงบัฟเฟอร์ทู (washing buffer II) 500 μ l เขย่าให้ตะกอนแตกละเอียด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 2 นาที ทำการเทน้ำส่วนใสทิ้ง
- 10) นำตะกอนที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 65°C นาน 30 นาที หรือจนกว่าจะแห้ง
- 11) เติมอีลูชันบัฟเฟอร์ (elution buffer) จำนวน 120 μ l เขย่าเบา ๆ อบที่อุณหภูมิ 65°C นาน 30 นาที
- 12) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 2 นาที ทำการดูดน้ำใสซึ่งมีดีเอ็นเอใส่หลอดใหม่ แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำ PCR ต่อไป

ภาคผนวก ข วิธีการเตรียมเจล PAGE และ วิธีการย้อมเจล PAGE

1) วิธีการเตรียมเจล PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)

1) เช็ดกระจกที่ใช้เป็น chamber และแผ่นที่ต้องการให้เจลติด ด้วย 95% เอทานอลให้สะอาด โดยเช็ดทำความสะอาด 5 ครั้ง

2) เช็ดกระจกแผ่นที่ใช้เป็น chamber ด้วยน้ำยาเคลือบกระจก (clear view solution) โดยใช้กระดาษทิชชูจนแห้งสนิท แล้วเช็ดด้วย 95% เอทานอลจนแห้งสนิทอีกครั้ง

3) เตรียมสารละลาย bind silane 756 ul ประกอบด้วย

- bind silane	2.25 μ l
- 0.5% acetic acid	3.75 ul
- 95% EtOH	750 ul

ผสมให้เข้ากัน แล้วเช็ดลงบนกระจกแผ่นที่ต้องการให้เจลติด โดยเกลี่ยสารละลายดังกล่าวให้ทั่วแผ่นกระจกอย่างรวดเร็ว

4) เช็ดกระจกอีกครั้งด้วย 95% เอทานอลเพื่อเกลี่ยสารละลาย bind silane ให้ทั่วกระจก เช็ดจนแห้งสนิท

5) ประกอบกระจกทั้ง 2 แผ่นเข้าด้วยกันเพื่อใช้สำหรับการเตรียมเจล โดยใช้ spacer กัน

6) เตรียมสารละลายเจล acrylamide ปริมาณ 60 ml ต่อกระจก โดยมีส่วนผสมของสารละลายดังนี้

- 4.5% acrylamide gel	60 ml (แช่เย็น)
- TEMED	84 μ l
- 10% APS	525 μ l (แช่เย็น)

7) เทสารละลายทั้งหมดใส่ขวดพลาสติก เขย่าเบา ๆ เพื่อให้ส่วนผสมเข้ากัน ห้ามเขย่าแรงเพราะจะทำให้เกิดฟองอากาศเข้าไปในกระจก แล้วค่อย ๆ เทเจลเข้าไปในแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ แล้วเสียบหวีเข้าไปด้านบนเพื่อใช้เป็นช่องสำหรับการหยอดผลผลิต PCR ที่ต้องการประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เจลแข็งตัวดี

8) นำชุดกระจกเจลไปติดตั้งกับเครื่อง vertical PAGE แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 1XTBE ลงไปให้ท่วมเจล แล้วทำการ pre-run ด้วยกระแสไฟฟ้ากำลัง 45 W จนอุณหภูมิของแผ่นกระจกประมาณ 48°C

9) นำผลผลิต PCR ที่เติมสารละลายสีที่มี formamide มา denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันทีนาน 5 นาที หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ดังกล่าวมา

หยอดลงไปในพื้นที่เจล แล้ว run ด้วยกระแสไฟฟ้า 48 W จะสปีดเลื่อนที่ลงมาประมาณ 15-20 ซม. จึงหยุดการ run แล้วนำแผ่นกระจกเจลไปย้อมด้วยวิธี silver staining ต่อไป

2) วิธีการย้อมเจล PAGE ด้วยเทคนิค silver staining ตามวิธีการของ Caetano (1997)

1) นำแผ่นกระจกเจลออกมาแช่ในสารละลายกรด acetic acid ความเข้มข้น 10% เช้าเบา ๆ นาน 30 นาที

prepare 1 liter of fix stop solution:

- acetic acid 100 ml
- dH₂O 900 ml

2) เทกรดออก แล้วเช็ดด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ รอบละ 5 นาที

3) หลังจากเทน้ำกลั่นทิ้ง เติมสารละลาย silver nitrate ความเข้มข้น 0.1% เช้าในที่มืด นาน 30 นาที

4) เทสารละลาย silver nitrate ออก ล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว ประมาณ 3 วินาที แล้วทำการเทน้ำกลั่นทิ้ง

1 liter silver stain

- silver nitrate 1 g
- dH₂O 1000 ml
- 37% formaldehyde 1.5 ml

5) เติมสารละลาย developer (Na₂CO₃ 30 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร) เช้าจนแถบดีเอ็นเอ เริ่มปรากฏให้เห็นชัดแล้ว จึงเท developer ทิ้ง แล้วหยุดปฏิกิริยาโดยเติม acetic acid มีความเข้มข้น 10% เช้าเป็นเวลา 10 นาที

developer 1 liter

- Na₂CO₃ 30 g
- dH₂O 1000 ml
- 37% formaldehyde 1.5 ml
- sodium thiosulphate 200 µl (10 mg/ml)

6) เท acetic acid ออก ล้างโดยน้ำเปล่า 2 รอบ รอบละ 5 นาที

วิธีการเตรียมสารเคมีที่ใช้ย้อมเจล

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวมารีสา อิ่มเพ็ง
วัน เดือน ปี เกิด	31 มีนาคม 2542
สถานที่เกิด	โรงพยาบาลสุโขทัย
วุฒิการศึกษา	พ.ศ.2564 วท.บ.(ชีววิทยา), มหาวิทยาลัยพะเยา, จังหวัดพะเยา
ที่อยู่ปัจจุบัน	239 ม.5 ต.ท่าชัย อ.ศรีสาขาลัย จ.สุโขทัย 64190
ผลงานตีพิมพ์	การเปรียบเทียบพันธุกรรมความต้านทานต่อแมลงบัวในข้าวพันธุ์พื้นเมืองหมยหนอง 62 เอ็ม และข้าวพันธุ์ปลูก กข22

