



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ย โดยวิธีปรับปรุงพันธุ์
แบบผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก
GLUTINOUS RICE IMPROVEMENT OF RD 6 FOR SEMIDWARF
PLANT HEIGHT BY MOLECULAR MARKER-ASSISTED
BACKCROSSING

โดย

วราภรณ์ แสงทอง ประวิตร พุทธานนท์ ยุพเยาว์ คบพิมาย
ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์ ศุภางค์ ทิพย์พิทักษ์



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง * การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ย โดยวิธีปรับปรุงพันธุ์แบบผสม
กลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก
GLUTINOUS RICE IMPROVEMENT OF RD 6 FOR SEMIDWARF PLANT
HEIGHT BY MOLECULAR MARKER-ASSISTED BACKCROSSING

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2550 จำนวน 480,000 บาท
ประจำปี 2551 จำนวน 480,000 บาท

หัวหน้าโครงการ วราภรณ์ แสงทอง
ผู้ร่วมโครงการ ประวิตร พุธานนท์
ยุพเยาว์ คบพิมาย
ช่อทิพา สกูลสิงหาโรจน์
ศุภางค์ ทิพย์พิทักษ์

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ย โดยวิธีปรับปรุงพันธุ์
แบบผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก

GLUTINOUS RICE IMPROVEMENT OF RD6 FOR SEMIDWARF
PLANT HEIGHT BY MOLECULAR MARKER-ASSISTED
BACKCROSSING

วราภรณ์ แสงทอง¹ ประวิตร พุทยานนท์² ยุพเยาว์ คบพิมาย¹

ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์¹ ศุภางค์ ทิพย์พิทักษ์¹

VARAPORN SANGTONG PRAWIT PUDDHANON

YUPPAYAO KOPHIMAI CHOTIPA SAKULSINGHAROJ

SUPANG TIPPITAK

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

²ภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มีพื้นที่ปลูกถึง 15 ล้านไร่ คิดเป็นร้อยละ 83 ของพื้นที่ปลูกข้าวเหนียวทั้งหมด ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 นิยมปลูกกันมากเนื่องจากมีคุณภาพการหุงต้มเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค แต่เนื่องจากข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มีลำต้นสูงจึงหักล้ม ทำให้ผลผลิตต่ำ จึงปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยโดยวิธีผสมกลับและใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก พันธุ์รับ (recipient parent) คือข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 มีอีโนไทป์เป็น Sd1Sd1 และพันธุ์ให้ (donor parent) คือข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 มีอีโนไทป์เป็น sd1sd1 การปรับปรุงพันธุ์เริ่มจากหา target marker ได้ไพรเมอร์ RD6Sd1MW1F/1R ที่เฉพาะกับอัลลีลเด่น Sd1 ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และไพรเมอร์ sd1MW3F/3R ที่เฉพาะกับอัลลีลด้อย sd1 ของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 ผลการหา flanking marker 1 คือ RM1339 (บนโครโมโซมที่ 1 ที่ 147.5 cM) และ flanking marker 2 คือ RM 3375 (บนโครโมโซมที่ 1 ที่ 155.1 cM) ผลการหา background marker ได้ SSR marker จำนวน 69 ตำแหน่ง การผสมพันธุ์ในฤดูแรก ผลิต F₁ โดยการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวพันธุ์ กข 6 กับข้าวพันธุ์ กข 1 ในฤดูที่ 2 ผสม F₁ กับข้าวพันธุ์ กข 6 และในฤดู 3- 6 ผสม BC_nF₁ กับ ข้าวพันธุ์ กข 6 ในแต่ละ

ละข้าวของการผสมกลับใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก ในฤดูที่ 6 ได้ต้น BC₄F₁-127-4121-2630-358 ที่มีอีโนไทป์เป็น Sd1sd1 และ flanking marker 1, flanking marker 2 และ background marker จำนวน 69 ตำแหน่งมีอีโนไทป์เหมือนกับ กข 6 ทุกตำแหน่ง ต่อจากนั้นนำสายพันธุ์ กข 6 ต้นเดียว ผสมกับ สายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสงได้เมล็ด F₁ ปลูกต้น F₁ แล้วคัดเลือกด้วยโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อหาต้นที่มีทั้งยีนคือ *sd1* และ *hd1* ทำการผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด F₂ ได้เมล็ด F₂ ทั้งหมด 100 ประชากร เมล็ด F₂ เหล่านี้จะนำไปปลูกในสภาพวันยาวเพื่อคัดเลือกหาต้น F₂ ที่มีอีโนไทป์เป็นต้นเดียวไม่ไวต่อช่วงแสงต่อไป

ABSTRACT

The glutinous rice variety, RD 6, is being planted for more than 15 million rai which is equivalent to almost 83% of the total land area planted. RD 6 has been generally accepted because of its high cooking quality in response to the demand of the consumers. However, RD 6 is a tall plant and easily breaks causing a decrease in yield thus varietal improvement of RD 6 is aimed to attain a semi-dwarf variety through molecular marker-assisted backcrossing by using a recipient parent that is tall, RD 6, which has a genotype of Sd1Sd1 and a donor parent that is semi-dwarf, RD 1 having a genotype of sd1sd1. Genetic improvement was started by identifying a target marker, RD6Sd1MW1F/1R primer specifically with a dominant allele, *Sd1*, of RD 6 and sd1MW3F/3R primer specifically with a recessive gene, *sd1*, of the donor parent, RD 1. Results showed flanking marker 1, RM1339 (on chromosome 1 at 147.5 cM) and flanking number 2, RM 3375 (on chromosome 1 at 155.1 cM) while results of identifying background marker showed SSR markers of 69 loci. Genetic crossing conducted during the 1st season was between RD 6 and RD 1 while the 2nd season, crossing was between F₁ and RD 6 while the 3rd-6th seasons, between BC_nF₁ with RD 6. During each molecular marker-assisted backcrossing selection, BC₄F₁-127-4121-2630-358 resulted on the 6th season with a genotype of Sd1sd1 and flanking marker 1, flanking marker 2 and background marker at 69 loci, which showed a genotype similar to RD 6 in each locus. Afterwards, the semi-dwarf RD 6 was then crossed with non-photo sensitive RD 6 using F₁ seeds and then planted for use in the molecular marker-assisted backcrossing to determine plants with genotype of *sd1* and *hd1* which were then self-crossed to

produce 100 F_2 populations to be planted during the longer daylengths in order to select F_2 plants with phenotypes of semi-dwarfness and non-photo sensitivity.



คำนิยม

ขอขอบพระคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ที่ให้ทุนวิจัย แก่คณะผู้วิจัยในการทำการวิจัยเรื่องการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ย โดยวิธีปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกในปีงบประมาณ 2550 และ 2551 ขอขอบคุณศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี molecular marker-assisted backcrossing เพื่อปลูกในฤดูนาปรัง ในปี 2547-2550 ขอขอบคุณศูนย์วิจัยข้าวเชียงใหม่ และศูนย์วิจัยข้าวแพร่ที่ให้เมล็ดเพื่อการวิจัย ขอชื่นชมกับความพยายามของนางสาวกมลทิพย์ บุญรัตน์นักศึกษาปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และนางสาวสุพรรณษา เพชรหินผู้ช่วยนักวิจัยของโครงการที่ช่วยทำวิจัย จนกระทั่งโครงการวิจัยนี้จนสำเร็จอย่างดียิ่ง



สารบัญเรื่อง

	หน้า
คำนำ	1-9
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	3-9
ประวัติการปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข 6	3-4
ยีนที่ควบคุมต้นเตี้ย (semidwarfing gene; <i>sd1</i>)	4-5
การพัฒนาข้าวต้นเตี้ยในประเทศไทย	5-6
วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบผสมกลับ (conventional backcrossing)	6-8
ตัวอย่างของการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้ MAB	8-9
อุปกรณ์และวิธีการ	10-18
การหา target marker	11-12
การหา flanking marker	13
การหา background marker	14
การผสมพันธุ์ข้าวและการคัดเลือกโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย	14-15
การสร้างสายพันธุ์ กข 6 ต้นเตี้ยไม่ไวต่อช่วงแสง	15-16
การศึกษากายภาพของพันธุ์กรรมของอัลลีล <i>Sd1/sd1</i>	17-18
ผลการทดลอง	19-67
การหา target marker	19-31
การหา flanking marker	32-38
การหา background marker	39-43
การผสมพันธุ์ข้าว และการคัดเลือก	44-53
การสร้างสายพันธุ์ กข 6 ต้นเตี้ยไม่ไวต่อช่วงแสง	54-63
การศึกษากายภาพของพันธุ์กรรมของอัลลีล <i>Sd1/sd1</i>	64-67
วิจารณ์ผล	68-69
สรุปผล	69-72
เอกสารอ้างอิง	73-75
ภาคผนวก	76-81

สารบัญตาราง (ก)

	หน้า
ตารางที่ 1 โพรเมอร์ที่ออกแบบให้เฉพาะกับอัลลีล <i>Sd1/sd1</i> จำนวน 10 คู่ที่ออกแบบโดยใช้โปรแกรม Primer3 และมีลำดับเบสของอัลลีลเด่น <i>Sd1</i> จากข้าวต้นสูงพันธุ์ Nipponbare (Genbank Acc. No.: AF465255) เป็นแม่พิมพ์	22
ตาราง 2 โพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ที่ได้จากการออกแบบเพื่อให้เฉพาะกับอัลลีลเด่น <i>Sd1</i> ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6	27
ตารางที่ 3 ลำดับเบสของโพรเมอร์ของ SSR marker จำนวน 5 ตำแหน่งที่ใช้เป็น flanking marker 1 และอีก 10 ตำแหน่งที่ใช้เป็น flanking marker 2 ซึ่งหาได้จาก genetic and physical map ของ McCouch <i>et al.</i> (2002)	35-36
ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์ยีนโนไทป์ของต้น BC_1F_1 ที่เหมือนกับยีนโนไทป์ของ กข 6 เมื่อตรวจด้วย background marker ที่อยู่บน non-target chromosome จำนวน 21 ตำแหน่ง และบน target chromosome จำนวน 2 ตำแหน่ง	46
ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ยีนโนไทป์ที่เหมือนกับ กข 6 ของต้น BC_2F_1 -127- เมื่อตรวจด้วย Background marker ที่อยู่บน non-target chromosome จำนวน 22 ตำแหน่ง และอยู่บน target chromosome จำนวน 2 ตำแหน่ง	48
ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์ยีนโนไทป์ที่เหมือนกับ กข 6 ของต้น BC_1F_1 -127 BC_2F_1 -127-4121 และ BC_3F_1 -127-4121-2630 เมื่อตรวจด้วย background marker ที่อยู่บน non-target chromosome จำนวน 63 ตำแหน่ง และอยู่บน target chromosome จำนวน 6 ตำแหน่ง	50
ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ยีนโนไทป์ที่เหมือนกับ กข 6 ของต้น BC_1F_1 -127 BC_2F_1 -127-4121 BC_3F_1 -127-4121-2630 และ BC_4F_1 -127-4121-2630-358 เมื่อตรวจด้วย Background marker ที่อยู่บน non-target chromosome จำนวน 63 ตำแหน่ง และอยู่บน target chromosome จำนวน 6 ตำแหน่ง	52
ตารางที่ 8 การทดสอบอัตราส่วนยีนโนไทป์ต้นสูง/ต้นเตี้ยของต้นข้าวสายพันธุ์ BC_3F_2 -127-4121-2630-1609 โดยใช้วิธีทดสอบไค-สแควร์	64
ตารางที่ 9 การทดสอบอัตราส่วนยีนโนไทป์ของยีน <i>Sd1/sd1</i> ของต้นข้าวสายพันธุ์ BC_3F_2 -127-4121-2630-1609 โดยใช้วิธีทดสอบไค-สแควร์	67

สารบัญภาพ (ข)

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงลำดับเบสของอัลลีลเด่น Sd1 ของข้าวพันธุ์ Nipponbare	20
ภาพที่ 2 ภาพถ่ายเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อเปรียบเทียบขนาดของแถบ ดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์ เมื่อใช้ sd1MW3F/3R เป็นไพรเมอร์ และมี ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 ที่มีอีโนไทป์เป็น Sd1Sd1 F ₁ (กข 6 x กข 1) มีอีโนไทป์เป็น Sd1sd1 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 มีอีโนไทป์เป็น sd1sd1	23
ภาพที่ 3 ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์จำนวน 834 คู่เมื่อใช้ ดีเอ็นเอของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 เป็นแม่พิมพ์ และมี sd1MW3F/3R เป็นไพรเมอร์	23
ภาพที่ 4 ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์จำนวน 451 คู่ เมื่อใช้ ดีเอ็นเอของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 เป็นแม่พิมพ์ และมี sd1MW3F/3R เป็นไพรเมอร์	24
ภาพที่ 5 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้จากผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 เมื่อใช้ sd1MW3F/3R เป็นไพรเมอร์ กับลำดับเบสของอัลลีลเด่น Sd1 ของข้าวพันธุ์ Nipponbare	25
ภาพที่ 6 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้จากผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 เมื่อใช้ sd1MW3F/3R เป็นไพรเมอร์เปรียบเทียบ กับลำดับเบสของอัลลีลเด่น Sd1 ของข้าวพันธุ์ Nipponbare	26
ภาพที่ 7 แสดงตัวอย่างภาพถ่ายเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอของผลผลิตของพีซีอาร์ เมื่อใช้ RD6Sd1MW1F/1R เป็นไพรเมอร์ที่เฉพาะกับอัลลีลเด่น Sd1 ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 โดยดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่ใช้ คือ ดีเอ็นเอของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 มีอีโนไทป์เป็น Sd1Sd1 F ₁ (กข 6 x กข 1) มีอีโนไทป์เป็น Sd1sd1 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 มีอีโนไทป์เป็น sd1sd1 สัญลักษณ์กำกับ	28
ภาพที่ 8 ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 เมื่อใช้ RD6Sd1MW1F /1R เป็นไพรเมอร์	28
ภาพที่ 9 ผลการเปรียบเทียบระหว่างลำดับเบสของอัลลีลเด่น Sd1 ที่ได้จากผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 เมื่อใช้ RD6Sd1MW1F/1R เป็นไพรเมอร์ที่	29

เฉพาะกับอัลลีลเด่น <i>Sd1</i> ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 กับลำดับเบสของอัลลีลเด่น <i>Sd1</i> ของข้าวพันธุ์ Nipponbare	
ภาพที่ 10 แสดงตำแหน่งของ ไพรมเมอร์ RD6 <i>Sd1</i> MW1F/1R ที่เฉพาะกับอัลลีลเด่น <i>Sd1</i> และไพรมเมอร์ <i>sd1</i> MW3F/3R ที่เฉพาะกับอัลลีลด้อย <i>sd1</i>	31
ภาพที่ 11 แสดง genetic map of a semidwarfing gene <i>sd-1</i> ทำให้ทราบว่ายาลลีล <i>Sd1/sd1</i> ยึดติด กับโมเลกุลเครื่องหมาย S13471, E30867, E61578 และ S13312 (Monna <i>et al.</i> , 2002)	32
ภาพที่ 12 แสดงชื่อ และตำแหน่งของโมเลกุลเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 1 ใน genetic and physical map ของ McCouch <i>et al.</i> (2002) ที่ยึดติดกับยีน <i>Sd1/sd1</i>	33
ภาพที่ 13 แสดงตำแหน่งของยีน <i>Sd1/sd1</i> ที่อยู่ใกล้กับ RM8235 บนโครโมโซมที่ 1 จาก http://www.gramene.org/Oryza_sativa_japonica/contigview?region=1&vc_start=38609231&vc_end=38792353	34
ภาพที่ 14 แสดงตำแหน่งของยีน <i>Sd1/sd1</i> และ SSR marker ที่จะใช้เป็น flanking marker 1 และ flanking marker 2 ซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 ใน genetic and physical map ของ McCouch <i>et al.</i> (2002)	34
ภาพที่ 15 แสดงภาพถ่ายเมล็ดเมื่อย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท เพื่อเปรียบเทียบขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ เมื่อใช้ RM1339 (147.5 cM) เป็นไพรมเมอร์ โดยมีดีเอ็นเอแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 F_1 (กข 6 x กข 1) และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1	37
ภาพที่ 16 แสดงตัวอย่างภาพถ่ายเมล็ดภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ เมื่อใช้ RM 3375 (155.1 cM) เป็นไพรมเมอร์ โดยมีดีเอ็นเอแม่พิมพ์ คือดีเอ็นเอของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 F_1 (กข 6 x กข 1) และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1	38
ภาพที่ 17 แสดงขนาดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อเปรียบเทียบแถบ ดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์ เมื่อใช้ RM444 เป็นไพรมเมอร์ โดยดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่ใช้ คือ ดีเอ็นเอของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 F_1 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1	41
ภาพที่ 18 แสดงขนาดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อเปรียบเทียบแถบ ดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์ เมื่อใช้ RM167 เป็นไพรมเมอร์ โดยดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่ใช้ คือ ดีเอ็นเอของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 F_1 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1	42
ภาพที่ 19 แสดงแผนการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยและไม่ไวต่อช่วงแสงโดยวิธีการ	45

ผสมกลับโดยใช้โมเดลเครื่องหมายมาช่วยในการคัดเลือก	
ภาพที่ 20 ต้นข้าวที่ปลูกในฤดูนาปี 2550	65
ภาพที่ 21 แสดงขนาดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อเปรียบเทียบแถบ	66
ดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์เมื่อใช้ (a) RD6Sd1MW1F/1R และ	
(b) sd1MW3F/3R เป็นไพรเมอร์ และดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่ใช้คือดีเอ็นเอของ	
ข้าวพันธุ์ต่างๆ	



สารบัญภาพผนวก (ค)

	หน้า
ภาพผนวกที่ 1 โครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี molecular marker-assisted backcrossing เพื่อปลูกในฤดูนาปรัง	77
ภาพผนวกที่ 2 สายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสงที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์	77
ภาพผนวกที่ 3 สายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสง และพันธุ์ข้าวเปรียบเทียบ	78
ภาพผนวกที่ 4 การปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยโดยวิธี marker-assisted backcrossing	78
ภาพผนวกที่ 5 ทำไมต้องต้นเตี้ย	79
ภาพผนวกที่ 6 สายพันธุ์ กข 6 ต้นเตี้ย	79
ภาพผนวกที่ 7 การกระจายตัวของประชากร BC ₄ F ₂	80
ภาพผนวกที่ 8 การปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวต่อช่วงแสงและต้นเตี้ย molecular marker-assisted backcrossing	80
ภาพผนวกที่ 9 สายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสง และ สายพันธุ์ กข 6 ต้นเตี้ย	81
ภาพผนวกที่ 10 กระจายตัวของต้น F ₂ ที่เกิดจากต้น F ₁ ที่มียีนไทป์เป็น Hd1hd1Sd1sd1 ตามกฎข้อ 2 ของเมนเดล	81

คำนำ (Introduction)

ข้าวเป็นพืชที่สำคัญที่สุดในโลกพืชหนึ่งเพราะข้าวเป็นอาหารหลักของคนกว่าครึ่งโลก โดยเฉพาะคนในทวีปเอเชีย ในปี พ.ศ.2544 มีพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมดในโลก 947 ล้านไร่ คิดเป็นผลผลิต 586 ล้านตัน มีผลผลิตเฉลี่ย 619 ก.ก./ไร่ (<http://oae.go.th>) นอกจากข้าวเป็นพืชที่สำคัญของโลกแล้ว ข้าวยังเป็นพืชที่สำคัญที่สุดของประเทศไทยเพราะข้าวเป็นอาหารหลักของคนไทย คนไทยบริโภคข้าวเฉลี่ยคนละ 130 กิโลกรัมต่อปี (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ 2544) ข้าวเป็นพืชที่มีพื้นที่ปลูกมากที่สุดในประเทศไทย ในปี พ.ศ.2545/46 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าว 57 ล้านไร่ เป็นพื้นที่ปลูกข้าวเจ้า 39 ล้านไร่ และเป็นพื้นที่ปลูกข้าวเหนียว 18.2 ล้านไร่ พื้นที่ปลูกข้าวเหนียวคิดเป็นร้อยละ 32 ของพื้นที่ทั้งหมด ผลผลิตข้าวทั้งหมด 20 ล้านตันข้าวเปลือก เป็นผลผลิตข้าวเจ้า 14.3 ล้านตันข้าวเปลือก และเป็นผลผลิตข้าวเหนียว 5.6 ล้านตันข้าวเปลือก คิดเป็นร้อยละ 28 ของผลผลิตข้าวทั้งหมด (<http://oae.go.th>)

จากพื้นที่ปลูกข้าวเหนียวทั้งหมด 18.2 ล้านไร่ เป็นพื้นที่ปลูกข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ซึ่งเป็นข้าวไวแสงถึง 15 ล้านไร่ คิดเป็นพื้นที่ปลูกข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ถึงร้อยละ 83 ของพื้นที่ปลูกข้าวเหนียวทั้งหมด และคิดเป็นร้อยละ 26 ของพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมดของประเทศ ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เป็นพันธุ์ข้าวที่ปลูกมากเป็นอันดับสองรองจากข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่มีพื้นที่ปลูก 18 ล้านไร่ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 31 ของพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมดของประเทศ (กรมวิชาการเกษตร, 2546) พันธุ์ข้าวเหนียวที่มีพื้นที่ปลูกรองจากพันธุ์ กข 6 คือ กข10 เป็นข้าวไม่ไวแสงมีพื้นที่ปลูก 2 ล้านไร่ คิดเป็นร้อยละ 11 ของพื้นที่ปลูกข้าวเหนียวทั้งหมด ส่วนข้าวเหนียวพันธุ์อื่นๆ มีพื้นที่ปลูกเพียงร้อยละ 6 ของพื้นที่ปลูกข้าวเหนียวทั้งหมด พันธุ์อื่นๆ ได้แก่ ข้าวเหนียวสันป่าตองเป็นข้าวไวแสง กข 8 เป็นข้าวไวแสง ข้าวเหนียวแพร่1 เป็นพันธุ์ไม่ไวแสง และพันธุ์พื้นเมืองเป็นข้าวไวแสง จากข้อมูลจะเห็นได้ว่าประเทศไทยมีพันธุ์ข้าวเหนียวที่มีคุณภาพการหุงต้มเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคซึ่งสามารถปลูกได้ทุกฤดูจำนวนน้อยพันธุ์ ดังนั้นโครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะปรับปรุงข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้มีต้นเตี้ย ไม่ไวแสง และมีคุณภาพหุงต้มดีเหมือนข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เดิม ถ้าข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ต้นเตี้ยจะตอบสนองต่อปุ๋ยได้ดีขึ้น ด้านทานต่อการหักล้มและมีดัชนีเก็บเกี่ยวเพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้ผลผลิตของข้าวสูงขึ้น และถ้าข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ไม่ไวแสงจะทำให้สามารถปลูกได้ทุกฤดูทั้งในฤดูนาปีและนาปรัง ซึ่งสายพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ต้นเตี้ยไม่ไวแสงและมีคุณสมบัติการหุงต้มหรืออื่นๆ เหมือนกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อชาวนาในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือเพราะจะทำให้ชาวนามีพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ที่มีผลผลิตสูง มีคุณภาพหุงต้มดี มีกลิ่นหอมและปลูกได้ทุกฤดู

ปรับปรุงข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้มีต้นเตี้ย ไม่ไวแสง และมีคุณภาพหุงต้มดีเหมือนข้าวเหนียว พันธุ์ กข 6 เดิม ทำได้โดยโครงการการนี้จะปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ให้ต้นเตี้ยทำให้มียีน *sd1* ซึ่งจะได้จากการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีแบบผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยทำการคัดเลือก เมื่อได้สายพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ต้นเตี้ยแล้วจะนำไปผสมกับสายพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ไม่ไวแสงซึ่งจะได้จากโครงการ “ปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี molecular marker-assisted backcrossing” ซึ่งได้รับทุนวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (2547-2550) พันธุ์ข้าวเหนียวที่ได้จากการผสมระหว่างข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ต้นเตี้ยกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ไม่ไวแสง คือพันธุ์ข้าวเหนียวที่มีทั้งลักษณะต้นเตี้ยและไม่ไวแสง พร้อมกับมีคุณภาพหุงต้มและลักษณะอื่นๆ เหมือนกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ซึ่งข้าวเหนียวพันธุ์ใหม่นี้มียีนต้นเตี้ย (*sd1*) ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ซึ่งจะทำให้ข้าวมีความสูงลดลงด้านทานต่อการหักล้ม และตอบสนองต่อปุ๋ยได้ดีขึ้นจึงเป็นสาเหตุให้ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์มีผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ กข 6 เดิม เนื่องจากสายพันธุ์ข้าว กข 6 ที่ปรับปรุงพันธุ์ได้มียีนไม่ไวแสง (*hd-1*) จึงสามารถปลูกได้ตลอดปีทั้งในฤดูนาปีและฤดูนาปรัง แต่สิ่งที่สำคัญที่สุดอีกประการหนึ่งคือข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่ปรับปรุงให้ต้นเตี้ยและไม่ไวแสงนี้จะยังคงมีคุณภาพของการหุงต้ม ความหอมและลักษณะอื่นๆ เหมือนพันธุ์ กข 6 เดิมเพราะจะใช้การปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับที่จะใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยคัดเลือกให้ได้ต้นที่มียีนเพียง 2 ตำแหน่งเปลี่ยนไป คือจากยีนไทป์ *Sd1Sd1 Hd1Hd1* เป็น *sd1sd1 hd1hd1* ส่วนอื่นๆ ของจีโนมจะเหมือนกับจีโนมของ กข 6 ซึ่งวิธีการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยคัดเลือกนี้เป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชแนวใหม่ เพราะมีการใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยในการคัดเลือก ซึ่งจะเป็นการคัดเลือกที่ยืนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการโดยตรง ไม่ได้คัดเลือกจากฟีโนไทป์เหมือนการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบ ดั้งเดิม ซึ่งจะทำให้การคัดเลือกแม่นยำยิ่งขึ้น ทำได้ในระยะเวลาอันสั้น ไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม และเป็นการใช้ประโยชน์จากงานวิจัยต่างๆ รวมทั้ง rice genome project ที่มีการค้นพบยีนและลำดับเบสของยีนที่ควบคุมลักษณะต่างๆ

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

ข้าว (*Oryza sativa* L.) ต้นเตี้ย (semidwarf) ยีนที่ควบคุมต้นเตี้ย (semidwarfing gene; *sd1*) โมเลกุลเครื่องหมาย (molecular marker) และ การผสมกลับ (backcrossing)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาโมเลกุลเครื่องหมายที่สามารถตรวจสอบความแตกต่างระหว่างยีนเด่นที่ควบคุมให้ข้าวมีต้นสูง (*Sd1*) ซึ่งอยู่ในข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 และยีนด้อยที่ควบคุมให้ข้าวมีต้นเตี้ย (*sd1*) ซึ่งมีอยู่ในข้าวเจ้าพันธุ์ กข 1 ซึ่งจะใช้เป็นพันธุ์ให้ในการปรับปรุงพันธุ์ โดยโมเลกุลเครื่องหมายนี้จะนำมาใช้สำหรับคัดเลือกข้าวต้นที่มียีน *sd1* ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยในชั่วต่างๆ ของการผสมกลับ

2. หา flanking marker จำนวน 2 ตำแหน่ง คือ flanking marker 1 และ flanking marker 2 หน้าที่ของ flanking marker คือ ป้องกันไม่ให้ยีนที่ควบคุมลักษณะที่ไม่ต้องการจากพันธุ์ให้ (ในที่นี้คือ กข 1) ติดไปกับพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการปรับปรุง คือ สายพันธุ์ กข 6 ต้นเตี้ย

3. หา background marker ชนิด SSR marker จำนวน 150 ตำแหน่ง เพื่อช่วยในการคัดเลือกให้ได้เปอร์เซ็นต์จีโนมของ กข 6 สูงขึ้นในระยะเวลาอันสั้น

4. เพื่อปรับปรุงข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยเพื่อเพิ่มผลผลิต นอกจากนี้ยังมีคุณภาพการหุงต้ม และคุณลักษณะอื่นๆ เหมือนกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เดิม โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายที่พัฒนาไว้ในข้อ 1, 2 และ 3 มาช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับ ซึ่งจะทำให้ได้สายพันธุ์ข้าวที่มีคุณลักษณะที่ต้องการในระยะเวลาอันสั้น

5. เพื่อสร้างสายพันธุ์ข้าว กข 6 ต้นเตี้ยและไม่ไวแสง โดยการนำเอาสายพันธุ์ กข 6 ต้นเตี้ยที่ได้จากโครงการนี้ไปผสมกับสายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวแสงซึ่งจะได้จากโครงการ “ปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี molecular marker-assisted backcrossing” ซึ่งได้รับทุนวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (2547-2550) ซึ่งเป็นการต่อยอดงานวิจัยของภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ที่มีอยู่แล้ว

การตรวจเอกสาร (Literature review)

ประวัติการปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข 6

ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เป็นพันธุ์ข้าวเหนียวที่มีกลิ่นหอม ได้รับการปรับปรุงพันธุ์โดยการนำพันธุ์ข้าวขาวมะลิ 105 ขยายรังสีแกมมาในปริมาณ 10 กิโลแตร ที่สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ ในปี พ.ศ. 2508 กข 6 ได้ปลูกและคัดเลือกครั้งแรกที่สถานีทดลองข้าวบางเขน และ พิมาย กข 6 เป็นพันธุ์ข้าวเหนียวหอมพันธุ์แรกที่ได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตรให้ใช้ขยายพันธุ์ในปี พ.ศ. 2520 แนะนำให้ปลูกในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ กข 6 ให้ผลผลิตสูงและทนสภาพแห้งแล้งได้ดีกว่าข้าวเหนียวสันป่าตอง มี

ความต้านทานต่อโรคไหม้และโรคใบจุดสีน้ำตาลได้ดีกว่าพันธุ์เหนียวสันป่าตอง (<http://www.geocities.com/psplant/rice.html>)

ลักษณะประจำพันธุ์ข้าว กข 6

ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เป็นข้าวไวแสง มีวันเก็บเกี่ยวโดยประมาณ 21 พฤศจิกายน ความสูง 150 เซนติเมตร สีของเปลือกมีสีเหลือง ความยาวข้าวกล้อง 7.2 มิลลิเมตร รูปร่างเรียวยาว ข้าวสุกนุ่มหอม มีคุณภาพการหุงต้มดี มีกลิ่นหอม ทนแล้ง ต้านทานโรคไหม้ โรคใบจุดสีน้ำตาล ไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้ง เพี้ยกระโดดสีน้ำตาล และบัว ผลผลิต 670 กิโลกรัม/ไร่ (เอกสงวน, 2542)

ยีนที่ควบคุมต้นเตี้ย (semidwarfing gene; *sd1*)

ในปี ค.ศ. 1960 ทั่วโลกมีความวิตกกังวลเกี่ยวกับวิกฤตการณ์ขาดแคลนอาหารที่จะเกิดขึ้น เพื่อเตรียมการรับมือกับปัญหานี้ สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) ได้ทำการพัฒนาข้าวพันธุ์เตี้ยขึ้นมา คือ พันธุ์ IR8 หรือที่เรียกกันว่า “ข้าวมหัศจรรย์” การถือกำเนิดขึ้นของข้าวพันธุ์ IR8 นี้ มีผลทำให้ได้พันธุ์ข้าวที่มีผลผลิตสูงขึ้น และช่วยบรรเทาวิกฤตการณ์ขาดแคลนอาหารในเอเชียระหว่างปี 1960 ถึง 1990 ซึ่งเหตุการณ์นี้เป็นที่รู้จักกันในชื่อ “การปฏิวัติเขียว” (Motoyuki *et al.* 2003) ลักษณะต้นเตี้ยนี้เป็นลักษณะที่มีความสำคัญมากลักษณะหนึ่งในธัญญาพืชรวมถึงข้าว ยีนที่ควบคุมลักษณะต้นเตี้ยคือ *sd1* ซึ่งเป็นที่รู้จักกันในชื่อ “ยีนปฏิวัติเขียว” (Monna *et al.* 2002) ยีนที่ควบคุมต้นเตี้ยในข้าว (*sd1*) มีความสำคัญเป็นอันดับต้นๆ ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวสมัยใหม่ (Spiemeyer *et al.* 2002) *sd1* มีผลต่อความสูงของต้นข้าวคือทำให้ความสูงของต้นข้าวลดลง เนื่องจากความยาวของปล้องลดลงประมาณ 25 % (Garland *et al.* 2001) นอกจากนี้ยังทำให้ลำต้นข้าวหนาขึ้น ช่วยเพิ่มดัชนีเก็บเกี่ยว ต้านทานการล้ม และเพิ่มการตอบสนองต่อปุ๋ยไนโตรเจน เป็นผลให้ผลผลิตเพิ่มมากขึ้น โดยไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพของรวงข้าวและเมล็ด (Monna *et al.* 2002) *sd1* ค้นพบครั้งแรกในประเทศจีน (Spiemeyer *et al.* 2002) พบในข้าว 3 พันธุ์ คือ พันธุ์ Dee-geo-woo-gen Ai-jiao-nan-te และ Ai-zai-zhan ต่อมาได้ถูกนำไปพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ข้าวในไต้หวัน จีน หลายๆ ประเทศในเอเชีย และ ที่สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) (Chang *et al.* 2001) ในต้นปี ค.ศ. 1960 สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติได้นำพันธุ์ Dee-geo-woo-gen มาผสมข้ามกับพันธุ์ Peta ซึ่งเป็นพันธุ์ต้นสูง พัฒนาจนได้ข้าวพันธุ์ IR 8 (Spiemeyer *et al.* 2002) สำหรับข้าวพันธุ์ IR 8 นั้นเป็นข้าวต้นเตี้ย มีอายุออกดอกประมาณ 98 วัน อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 126 วัน อ่อนแอต่อโรคใบไหม้ (http://www.rdi.ku.ac.th/troprice_th/cariety.htm) พบว่าลักษณะต้นเตี้ยที่แสดงออกโดยยีน

sd1 นี้ เป็นผลเนื่องมาจากการขาดฮอร์โมนควบคุมการเจริญเติบโตของพืชคือจิบเบอเรลลิน (GAs) (Spiemeyer *et al.* 2002) จิบเบอเรลลินเป็นสารในกลุ่มฮอร์โมนพืช ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโตและพัฒนาของพืช รวมไปถึง การงอกของเมล็ด การแผ่ของใบ การยืดของลำต้น การชักนำการออกดอก และการสุกแก่ของผล (Schomburg *et al.* 2003) ลักษณะต้นเตี้ยของข้าวพันธุ์ IR8 ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากยีน *sd1* และได้มีการศึกษากลไกเชิงโมเลกุลของลักษณะนี้ จากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของพันธุ์ข้าวที่มี *sd1* พบว่ามีระดับจิบเบอเรลลินต่ำกว่าพันธุ์ปกติที่มี *Sd1* และข้าวที่มี *sd1* มีการตอบสนองเป็นอย่างดีต่อจิบเบอเรลลินภายนอก (exogenous GAs) เมื่อทำการโคลนยีนและการวิเคราะห์ลำดับเบสในอัลลีลต่างๆ ของยีนในตำแหน่ง *Sd1* (*Sd1* locus) พบว่าเป็นรหัสพันธุกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน (GAs biosynthesis enzyme หรือ GA20 oxidase) การตรวจสอบลำดับเบสของ *sd1* พบว่ามีการขาดหายหรือแทนที่ nucleotide ใน GA20 oxidase gene (*GA20ox-2*) (Matsuoka *et al.* 2003) ในพันธุ์ IR 8 พบว่า *sd1* มีการขาดหายไปของ nucleotide จำนวน 386 bp เมื่อเปรียบเทียบกับ *Sd1* ซึ่งการขาดหายไปของ nucleotide เกิดขึ้นระหว่าง exon แรก และ exon ที่สอง (Motoyuki *et al.* 2003) พบว่าลักษณะต้นเตี้ยในข้าวมีสาเหตุมาจากการสูญเสียการทำงานของ *GA20ox-2* gene ในจีโนมของข้าวมี *GA-20 oxidase* genes อย่างน้อย 2 ชนิดคือ *GA20ox-1* และ *Ga20ox-2* และ *Sd1* คือ *GA20ox-2* ซึ่งแสดงออกในหลายส่วนของต้นข้าวโดยเฉพาะที่ใบและดอกที่มีการแสดงออกมากกว่าส่วนอื่นๆ ส่วน *GA20ox-1* มักจะแสดงออกในดอกที่ยังไม่บาน การลดลงของความสูงของต้นข้าวเกี่ยวข้องกับ *sd1* และขึ้นกับการลดปริมาณ GAs ในใบ อันเนื่องมาจากการกลายพันธุ์ของยีน *GA20ox-2* (Matsuoka *et al.* 2003)

การพัฒนาข้าวต้นเตี้ยในประเทศไทย

สำหรับการพัฒนาพันธุ์ข้าวต้นเตี้ยในประเทศไทย เริ่มขึ้นในปี พ.ศ. 2509 มีการนำพันธุ์ IR8 จากสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) จากประเทศฟิลิปปินส์ มาผสมกับข้าวพันธุ์เหลืองทองที่สถานีทดลองข้าวบางเขน แล้วทำการคัดเลือกแบบคัดพันธุ์สืบตระกูลจนได้สายพันธุ์ BKN 56-1-2 ซึ่งเป็นข้าวเจ้าพันธุ์ผสมพันธุ์แรกที่ปลูกได้ทุกฤดูกาล และได้รับเป็นพันธุ์รับรอง เมื่อวันที่ 15 สิงหาคม 2512 ในชื่อพันธุ์ กข 1 ข้าวพันธุ์ กข 1 เป็นข้าวเจ้าต้นเตี้ย มีความสูงประมาณ 115 เซนติเมตร ไม่ไวต่อช่วงแสง มีอายุเก็บเกี่ยวประมาณ 130 วัน ลำต้นและใบมีสีเขียวอ่อน ใบตรงตั้งตรง เมล็ดเรียวยาว มีปริมาณอะมิโลส 29-31 % ให้ผลผลิตเฉลี่ย 742 กิโลกรัมต่อไร่ สำหรับลักษณะเด่นของข้าวพันธุ์ กข 1 คือ เหมาะสำหรับปลูกในเขตชลประทานซึ่งสามารถ

ควบคุมน้ำได้ ตอบสนองต่อการใช้น้ำในระดับสูง แตกกอดี ต้นไม่ล้มง่าย ค่อนข้างต้านทานต่อโรคใบจุด (กรมวิชาการเกษตร, 2546) เห็นได้ว่าข้าวเจ้าพันธุ์ กข 1 มีจุดเด่นในด้านการตอบสนองต่อการปลูกได้เป็นอย่างดี และ ยังลดการสูญเสียในระหว่างการเพาะปลูกอันเนื่องมาจากปัญหาข้าวล้ม ช่วยในการเพิ่มผลผลิตมากขึ้น จึงเป็นพันธุ์ที่ควรส่งเสริมให้เกษตรกรใช้ในการเพาะปลูก หรือใช้เป็นสายพันธุ์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไปในอนาคตข้างหน้า สาเหตุที่โครงการวิจัยนี้เลือกพันธุ์ข้าว กข 1 มาใช้เป็นพันธุ์ให้ (donor parent) คือให้ยีนที่ควบคุมต้นเตี้ย (*sd1*) สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ให้ต้นเตี้ยเพราะข้าวพันธุ์ กข 1 ได้รับยีนต้นเตี้ย (*sd1*) มาจาก IR8 ซึ่ง IR 8 มี *sd1* ที่ได้มาจาก Dee-geo-woo-gen ซึ่งลำดับเบสของ *sd1* นี้ทราบเป็นที่เรียบร้อยแล้ว นำมาใช้หาโมเลกุลเครื่องหมายได้ เพื่อใช้คัดเลือkdต้นข้าวที่มี *sd1* ในข้าวต่างๆ ของการคัดเลือก

วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบผสมกลับ (conventional backcrossing)

วิธีการปรับปรุงพันธุ์ผสมกลับเป็นการย้ายยีนที่ต้องการจากพันธุ์ให้ (donor parent) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ที่มีลักษณะการเกษตรไม่ดีไปสู่พันธุ์รับ (recipient parent) ซึ่งเป็นพันธุ์ดี เริ่มโดยผสมพันธุ์รับกับพันธุ์ให้เพื่อผลิต F_1 ต่อจากนั้นนำ F_1 ผสมกลับไปหาพันธุ์รับ ในการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้วิธีผสมกลับนั้นจะต้องทำการผสมกลับไปหาพันธุ์รับถึง 6 ครั้ง จึงจะได้เปอร์เซ็นต์จีโนมของตัวรับ เท่ากับ 99.2 ซึ่งจะอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ (Allard 1969) พันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับจะมีพันธุกรรมเหมือนกับพันธุ์รับยกเว้นยีนในตำแหน่งที่ต้องการ (target gene) ที่ได้จากพันธุ์ให้

การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยในการคัดเลือก (molecular marker-assisted backcrossing)

Decoux และ Hospital (2002) รายงานว่าเมื่อเปรียบเทียบการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยคัดเลือกยีนในไทป์ที่ต้องการ (molecular marker-assisted backcrossing) กับการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีผสมกลับแบบดั้งเดิมคือไม่มีโมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยในการคัดเลือก (conventional backcrossing) พบว่าการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยคัดเลือกยีนในไทป์ที่ต้องการมีข้อได้เปรียบกว่าการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีผสมกลับแบบดั้งเดิม คือ การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยคัดเลือกมีความรวดเร็วที่จะกำจัดจีโนมของพันธุ์ให้ (donor parent) จึงทำให้เปอร์เซ็นต์จีโนมของพันธุ์รับ (recipient parent) เพิ่มขึ้นได้เร็วกว่า ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยคัดเลือกจะทำให้จำนวนครั้งที่ต้องทำการผสมกลับ

น้อยกว่า การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีผสมกลับแบบดั้งเดิม นอกจากนี้การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยคัดเลือก มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีผสมกลับแบบดั้งเดิม ในการลดความยาวชิ้นส่วนของโครโมโซมของพันธุ์ให้ที่ติดมากับยีนที่ต้องการ (target gene) ซึ่งเรียกว่า linkage drag ชิ้นส่วนโครโมโซมของพันธุ์ให้ที่ติดมากับยีนที่ต้องการ เป็นสิ่งที่ไม่ต้องการ เพราะจะมีการกระจายตัว (segregate) ของชิ้นส่วนของโครโมโซมที่ติดมากับยีนที่ต้องการอยู่ในประชากรในชั่วต่อๆ ไป (Young and Tanksley 1989; Hospital 2001) การลดขนาดของชิ้นส่วนโครโมโซมของพันธุ์ให้ที่ติดมากับยีนที่ต้องการทำได้โดยใช้ flanking marker ซึ่งจะอยู่บนขาทั้ง 2 ข้างของยีนที่ต้องการ และควรห่างจากยีนที่ต้องการไม่เกิน 20 cM มาช่วยคัดเลือก เริ่มต้นต้องคัดเลือกต้นที่มียีนที่ต้องการเสียก่อน แล้วนำต้นเหล่านี้มาคัดเลือกหาต้นที่มี flanking marker ทั้ง 2 ตำแหน่งอยู่สภาพ homozygous สำหรับอัลลีลของพันธุ์ให้ ซึ่งจะทำให้แน่ใจได้ว่ายีนที่ต้องการได้เข้ามาอยู่ในต้นที่ต้องการและชิ้นส่วนของโครโมโซมที่ติดมากับยีนก็มีความยาวไม่เกิน flanking marker การจะลดความยาวของชิ้นส่วนของโครโมโซมที่ติดมากับยีนที่ต้องการนั้นทำได้โดย เลือก flanking marker ที่อยู่ใกล้กับยีนที่ต้องการให้มากที่สุด (Hospital 2001) แต่โอกาสที่จะได้รับต้นพืชที่มี flanking marker ทั้ง 2 สองตำแหน่ง จะเป็น homozygous ของอัลลีลที่เป็นของพันธุ์รับในการผสมกลับเพียงครั้งเดียวนั้นต่ำมาก ดังนั้นในการผสมกลับครั้งแรกจึงควรคัดเลือกต้นที่ flanking marker ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งเป็น homozygote ของอัลลีลที่เป็นของพันธุ์รับเสียก่อน และในการผสมกลับครั้งที่ 2 จึงคัดเลือกหาต้นที่มี flanking marker อีกตำแหน่งหนึ่งเป็น homozygous ของอัลลีลที่เป็นของพันธุ์รับ (Young and Tanksley 1989)

เนื่องจาก PCR – based markers เช่น sequence – tagged site และ microsatellites มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย ในการศึกษาจีโนมของพืชหลายชนิด เพราะ PCR – based markers มีข้อดีหลายอย่างเช่น

- (1) เก็บตัวอย่างมาสกัด ดีเอ็นเอ ได้ในระยะแรกของการเจริญเติบโต เพราะต้องการเนื้อเยื่อจำนวนน้อย
- (2) เตรียม ดีเอ็นเอ ได้ง่ายสะดวกและรวดเร็วเพราะต้องการปริมาณ ดีเอ็นเอ เพียงเล็กน้อย
- (3) สามารถวิเคราะห์ได้ครั้งละหลายตัวอย่างเพราะประสิทธิภาพของ PCR เทคโนโลยี ดังนั้นการใช้ PCR - based markers เพื่อช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับจะทำได้มีประสิทธิภาพ และสามารถใช้กับประชากรที่มีขนาดใหญ่ได้ การหาขนาดของประชากรที่เหมาะสมในการผสมกลับแต่ละครั้งสามารถใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

สำเร็จรูป คือ POPMIN ขนาดของประชากรจะขึ้นอยู่กับระยะห่างระหว่างยีนที่ต้องการ (target locus) กับ flanking marker แต่ละตัว (Decoux and Hospital 2002)

การใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับ สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือขนาดของประชากรในแต่ละชั่ว จำนวนตำแหน่ง และชนิดของโมเลกุลเครื่องหมาย (molecular marker) ที่จะใช้และจำนวนของยีนในไทป์ที่จะคัดเลือกได้ การที่จะให้ได้จีโนมของพันธุ์รับ (recipient parent) มีมากน้อยเท่าไรขึ้นอยู่กับจำนวนและการกระจายตัวของโมเลกุลเครื่องหมายที่ตำแหน่งที่ไม่ใช่ยีนที่ต้องการ (non-target loci) และ recombination frequencies ระหว่างยีนที่ต้องการ (target gene) และ flanking marker ตัวแปรเหล่านี้มีอิทธิพลต่อจำนวนครั้งที่ต้องใช้ไปในการผสมกลับเพื่อให้บรรลุเป้าหมายที่ตั้งใจ (Ribaut *et al.* 2002)

ในทางทฤษฎีถ้าไม่จำกัดขนาดของประชากรที่จะใช้ ในการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับที่ใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยคัดเลือกสามารถทำได้โดยการผสม 3 ชั่ว โดยเริ่มด้วยทำการผสมระหว่างพันธุ์รับกับพันธุ์ให้เพื่อผลิตเมล็ด F_1 และชั่วที่ 2 ผลิตเมล็ด BC_1F_1 และชั่วที่ 3 ผลิตเมล็ด BC_1F_2 เนื่องจาก PCR based markers เช่น simple sequence repeats (SSR) และ single nucleotide polymorphisms (SNPs) ทำให้การตรวจหายีนในไทป์ที่ต้องการในประชากรขนาดใหญ่ทำได้ง่ายและรวดเร็วมีประสิทธิภาพสูง การใช้โมเลกุลเครื่องหมายในการปรับปรุงพันธุ์แบบวิธีผสมกลับ นั้นในแต่ละชั่วแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือขั้นตอนแรก ตรวจหาต้นที่มียีนในไทป์เป็น heterozygous สำหรับอัลลีลที่เป็นของตัวให้ และ อัลลีลของตัวรับที่ตำแหน่งของยีนที่ต้องการ (target locus) ขั้นที่ 2 ตรวจหาต้นที่มียีนในไทป์เป็น homozygous สำหรับอัลลีลของพันธุ์รับที่ตำแหน่งที่ไม่ใช่ยีนที่ต้องการ (non target loci) โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายที่กระจายอย่างสม่ำเสมอทุกโครโมโซม และโมเลกุลเครื่องหมายแต่ละตัวควรห่างกันประมาณ 20 cM (Ribaut *et al.* 2002) ความสำเร็จของการใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีผสมกลับขึ้นอยู่กับว่าเราต้องการจะได้ต้นที่มียีนในไทป์ทั้งหมดเป็นของตัวรับยกเว้นที่ตำแหน่งยีนที่ต้องการ (target locus) นั้นเราต้องการได้ homozygous สำหรับอัลลีลของพันธุ์ให้

ตัวอย่างของการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้ Molecular marker-assisted backcrossing

Chen *et al.* (2000) ทำการปรับปรุงข้าวพันธุ์ Minghui 63 ให้ต้านทานโรค bacterial blight โดยใช้ การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยคัดเลือกยีนที่ต้องการ ทำโดยผสมพันธุ์ Minghui 63 เป็นพันธุ์รับ กับพันธุ์ IRBB21 เป็นพันธุ์ให้เพราะมียีน Xa21 ที่เป็นยีนที่ต้องการคือยีนต้านทานต่อโรค bacterial blight ต่อจากนั้นทำการผสมกลับ 3 ครั้ง และผสมตัวเองหนึ่งครั้ง ใช้ restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers

ช่วยในการคัดเลือก ผลของการปรับปรุงพันธุ์ได้พันธุ์ Minghui 63 (*Xa21*) มีจีโนมเหมือนกับพันธุ์ Minghui 63 ยกเว้นชิ้นส่วนของ โครโมโซมที่มี *Xa21* บรรจุอยู่ และ ชิ้นของโครโมโซมที่เป็นของพันธุ์ให้มีความยาวน้อยกว่า 3.8 cM พบว่าพันธุ์ Minghui 63 (*Xa21*) มีน้ำหนักเมล็ดมากกว่า Minghui 63 และมีความต้านทานต่อ โรค bacterial blight เท่ากับพันธุ์ IRBB21 ซึ่งเป็นพันธุ์ให้

Chen *et al.* (2001) ปรับปรุงพันธุ์ข้าวพันธุ์ 6078 ในการต้านทานต่อโรค bacterial blight โดยใช้ การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยคัดเลือกยีนที่ต้องการ ทำโดยผสมข้าวพันธุ์ 6078 เป็นพันธุ์รับ กับพันธุ์ IRBB21 เป็นพันธุ์ให้มียีน *Xa21* เป็นยีนที่ต้องการเป็นยีนที่ต้านทานต่อโรค bacterial blight ต่อจากนั้นทำการผสมกลับ 3 ครั้ง และผสมตัวเองหนึ่งครั้ง และใช้ AFLP ช่วยในการคัดเลือกเพื่อให้ต้นพันธุ์ที่ปรับปรุงได้มียีนไทป์เหมือนพันธุ์ 6078 มากที่สุด สายพันธุ์ที่ปรับปรุงได้มี ยีนไทป์ของพันธุ์ 6078 ประมาณ 98.8 เปอร์เซ็นต์ และมีชิ้นของ โครโมโซมที่บรรจุ *Xa21* ความยาวประมาณ 3.8 cM พบว่าพันธุ์ 6078 (*Xa21*) มีระดับความต้านทานโรค bacterial blight เท่ากับพันธุ์ IRBB21 มีลักษณะทางการเกษตรและสมรรถนะการผสมเหมือนกับพันธุ์ 6078

Zhou *et al.* (2003) รายงานว่าการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย มาช่วยคัดเลือกยีนไทป์ที่ต้องการ ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว Zhenshan 97B เพื่อให้มีคุณภาพสูงดีขึ้น โดยการผสมพันธุ์ Zhenshan 97B เป็นพันธุ์รับซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีคุณภาพการสูงต่ำไม่ดีกับพันธุ์ Minghui 63 (*wx - MH*) เป็น พันธุ์ให้ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีคุณภาพสูงที่ดี ต่อจากนั้นทำการผสมกลับ 3 ครั้ง และผสมตัวเองหนึ่งครั้ง และมีการใช้ flanking marker คัดเลือกเพื่อลดความยาวของชิ้นส่วนของโครโมโซมที่มาจากพันธุ์ให้ที่ติดอยู่กับ *xw - MH* และนอกจากนี้ยังใช้โมเลกุลเครื่องหมายคัดเลือกต้นที่มีจีโนมของตัวรับในเปอร์เซ็นต์สูง เมื่อเปรียบเทียบสายพันธุ์ที่ปรับปรุงพันธุ์ได้คือพันธุ์ Zhenshan 97B (*wx - MH*) และพันธุ์ Zhenshan 97B พันธุ์เดิมพบว่าจีโนมของพันธุ์ที่ปรับปรุงใหม่เหมือนกับพันธุ์เดิมยกเว้นบริเวณ *wx - MH* นอกจากนี้ Zhenshan 97B (*wx - MH*) มีลักษณะทางการเกษตรเหมือนเดิมและมีคุณภาพสูงดีขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and methods)

โดยโครงการนี้จะปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ให้ได้ต้นเตี้ยที่มียีนไทป์เป็น sd1sd1 โดยวิธีผสมกลับและใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยคัดเลือก ต่อจากนั้นนำไปผสมกับสายพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ไม่ไวแสงที่ได้จากโครงการ “ปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี molecular marker-assisted backcrossing” ซึ่งได้รับทุนวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (2547-2550) ซึ่งทำให้ได้สายพันธุ์ กข 6 ที่มีทั้งลักษณะต้นเตี้ยและไม่ไวแสง พร้อมกับมีคุณภาพหุงต้มและลักษณะอื่นๆ เหมือนกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เดิม ข้าวสายพันธุ์ กข 6 ต้นเตี้ยมีความสูงลดลง จึงต้านทานต่อการหักล้ม และตอบสนองต่อปุ๋ยได้ดีขึ้น ควรมีผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ กข 6 เดิม และสายพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ที่ไม่ไวต่อช่วงแสงสามารถปลูกได้ตลอดปีทั้งในฤดูนาปี และฤดูนาปรัง

การปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก (molecular marker-assisted backcrossing) ต้องมีพันธุ์รับ (เช่น กข 6) เป็นพันธุ์ที่ดีแต่ขาดลักษณะบางอย่าง (ต้นเตี้ย) และพันธุ์ให้ (เช่น กข 1) เป็นพันธุ์อะไรก็ได้แต่ต้องมีลักษณะที่ต้องการหรือมียีนที่ต้องการ (sd1 ควบคุมให้ข้าวมีต้นเตี้ย) วิธีการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีผสมกลับทำได้โดยนำพันธุ์รับ (กข 6) มาผสมกับพันธุ์ให้ (กข 1) เพื่อผลิตลูกผสมชั่วแรก (F_1) จากนั้นนำ F_1 ผสมกลับไปหาพันธุ์รับ (กข 6) ได้ลูกผสมกลับชั่วแรกคือ BC_1F_1 แล้วคัดเลือกต้นที่ต้องการด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย Newbury (2003) อธิบายถึงขั้นตอนการคัดเลือกต้นพืชที่ได้จากการผสมกลับในแต่ละชั่วโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกกว่ามี 3 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรก ใช้ target marker (เช่น sd1 marker) คัดเลือกต้นที่มียีนในตำแหน่งที่สนใจให้เป็น heterozygous (Sd1sd1) ขั้นตอนที่ 2 ทำการลดจำนวนของยีนที่ไม่ต้องการที่ติดมาจากตัวให้ (linkage drag) โดยใช้ flanking marker ทั้ง 2 ตำแหน่งซึ่งห่างจากยีนที่สนใจ (target gene) ข้างละประมาณ 2 cM โดยคัดเลือกทั้งสองตำแหน่งนี้ให้เหมือนกับพันธุ์รับ ขั้นตอนที่ 3 ใช้ background marker คัดเลือกต้นที่มียีนไทป์เหมือนพันธุ์รับ (กข 6) มากที่สุด แล้วนำต้นที่คัดเลือกได้ไปผสมกลับไปหาพันธุ์รับ (กข 6) การผสมกลับทำทั้งหมด 3 ครั้ง จนกระทั่งได้ต้นที่มีลักษณะต่างๆ เหมือนพันธุ์รับ (กข 6) ยกเว้นลักษณะที่ต้องการ (ต้นเตี้ย) ซึ่งการใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยคัดเลือก จะทำให้การปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

สำหรับโครงการวิจัยนี้มีทั้งหมด 6 การทดลอง ขั้นตอนการวิจัยทั้ง 6 การทดลองมีรายละเอียดต่อไปนี้

1. การหา target marker ที่เฉพาะกับอัลลีลด้อย *sd1* เพื่อใช้คัดเลือกหาต้นข้าวที่มีอัลลีลด้อย *sd1*

2. การหา flanking marker 1 และ 2 ที่ขนานอยู่ทั้ง 2 ข้างของยีน *Sd1/sd1* เพื่อใช้คัดเลือกหาต้นข้าวที่มีจำนวนยีนที่ไม่ต้องการซึ่งติดมาจากพันธุ์ให้ (donor parent) น้อยที่สุด

3. การหา background marker ที่กระจายอยู่บนโครโมโซมทั้ง 12 แท่ง เพื่อใช้ตรวจหาต้นข้าวที่เปอร์เซ็นต์ยีนไทยเหมือนกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มากที่สุด

4. การผสมพันธุ์ข้าว และการคัดเลือกต้นข้าวด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย เพื่อให้ได้สายพันธุ์ กข 6 ต้นเดี่ยว

5. การผสมระหว่างสายพันธุ์ กข 6 ต้นเดี่ยว กับ สายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสง เพื่อผลิตสายพันธุ์ กข 6 ต้นเดี่ยวไม่ไวต่อช่วงแสง

6. การศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของอัลลีล *Sd1/sd1* ในข้าวโดยใช้ target marker

1. การหา target marker ที่เฉพาะกับอัลลีลด้อย *sd1* เพื่อใช้คัดเลือกหาต้นข้าวที่มีอัลลีลด้อย *sd1*

1.1 การออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะกับอัลลีล *Sd1/sd1* และคัดเลือกไพรเมอร์

เนื่องจาก Monna *et al.* (2002) รายงานว่าอัลลีลเด่นของ *Sd1* มี 2743 คู่เบส ประกอบด้วย 3 เอกซอน (exons) ที่มีจำนวนเบส 558 318 และ 291 คู่ และ 2 อินทรอน (introns) ที่มีจำนวนเบส 105 และ 1,471 คู่ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างอัลลีลเด่น *Sd1* กับลำดับเบสของอัลลีลด้อย *sd1* พบว่าอัลลีลด้อย *sd1* มีเบสขาดหายของเบสจำนวน 383 คู่ โดยเริ่มจากช่วงกลางของเอกซอน 1 จำนวน 262 คู่ ในอินทรอน 1 ขาดจำนวน 105 คู่ และช่วงต้นของเอกซอน 2 ขาดจำนวน 16 คู่ ทำให้เกิด stop codon หลังบริเวณที่ขาดหายไป จึงทำให้การแปลรหัสหยุดลงก่อนที่จะถึง stop codon เดิม มีผลทำให้โปรตีนที่ผลิตได้ไม่ทำหน้าที่ (nonfunctional protein)

ดังนั้นการออกแบบไพรเมอร์ทำโดยนำลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวต้นสูงพันธุ์ Nipponbare (Genebank Acc. No.: AF465255) มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ โดยใช้โปรแกรม Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) โดยให้ forward primer และ reverse primer ขนานอยู่ทั้งสองข้างของเบสที่ขาดหายไปของอัลลีลด้อย *sd1* ได้ไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 10 คู่ ไพรเมอร์เหล่านี้ต้องนำมาคัดเลือกหาไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่าง

ของอัลลีลเด่น *Sd1* ออกจากอัลลีลด้อย *sd1* จึงนำไพรเมอร์เหล่านี้มาทำพีซีอาร์ โดยมีดีเอ็นเอข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 F_1 (กข 6 x กข 1) และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 เป็นแม่พิมพ์ ตรวจสอบผลผลิตของพีซีอาร์ด้วย 2% อะกาโรสเจล ใน 1x TBE buffer แล้วย้อมแผ่นเจลด้วยเอทิดีเอมโบรไมด์ นำเจลไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง GelDoc นำภาพถ่ายมาตรวจผลหาไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1

1.2 การตรวจสอบความถูกต้องของไพรเมอร์ที่เฉพาะกับอัลลีล *Sd1/sd1*

ถึงแม้ว่าคัดเลือกได้ไพรเมอร์ *sd1MW3F/3R* ที่ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 เพื่อความถูกต้องว่า เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่นี้แล้วขึ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้นั้นเป็นส่วนหนึ่งของอัลลีล *Sd1/sd1* จึง นำผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวทั้ง 2 พันธุ์ไปหาลำดับเบสที่ภาควิชาชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ต่อจากนั้นนำลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 ที่หาลำดับเบสได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวต้นสูง Nipponbare (Genbank Acc. No.: AF465255) โดยใช้โปรแกรม BLAST 2 SEQUENCES (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>) ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีลำดับเบสเหมือนกับลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวต้นสูง Nipponbare

1.3 การออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะกับอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6

เนื่องจากเมื่อทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ *sd1MW3F/3R* โดยมีดีเอ็นเอของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 เป็นแม่พิมพ์ พบว่าบางครั้งเกิด/บางครั้งไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ จึงสันนิษฐานว่าการจับกันอย่างคู่สม (anneal) ระหว่างเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 กับลำดับเบสของไพรเมอร์ *sd1MW3F/3R* ได้ไม่ดี จึงต้องทำการออกแบบไพรเมอร์ให้สามารถเพิ่มขึ้นดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงกับอัลลีลเด่น *Sd1* เท่านั้น การออกแบบไพรเมอร์ทำโดยนำลำดับเบสที่หาจากผลผลิตพีซีอาร์ที่มี ดีเอ็นเอของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 เป็นแม่พิมพ์ โดยมีไพรเมอร์ *sd1MW3F/3R* มาเปรียบเทียบกับ และนำลำดับเบสของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 ที่ไม่ซ้ำกับลำดับเบสของข้าวต้นเตี้ยมาใช้เป็นแม่พิมพ์ในการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ ดังนั้น forward primer และ reverse primer เฉพาะอัลลีลเด่น *Sd1* ของ กข 6 เท่านั้น คือออกแบบให้ไพรเมอร์อยู่ในบริเวณที่มีลำดับเบสเฉพาะในอัลลีลเด่น *Sd1* แต่ไม่มีลำดับเบสในอัลลีลด้อย *sd1* เนื่องจากอัลลีลด้อย *sd1* มีการขาดหายไปของเบสจำนวน 383 คู่ คือ โดยเริ่มจากช่วงกลางของเอกซอน 1 มีเบสขาดหาย 262 คู่ ในอินทرون 1 มีเบสขาดหาย 105 คู่ และช่วงต้นของเอกซอน 2

มีเบสขาดหาย 16 คู่ ตามลำดับ ดังนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะกับอัลลีลเด่น *Sd1* ในบริเวณนี้ โดยใช้โปรแกรม Primer3 สร้างสร้างคราะห์ให้ไพรเมอร์ แล้วนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาทำพีซีอาร์โดยใช้ ดีเอ็นเอข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 F_1 (กข 6 x กข 1) และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 เป็นแม่พิมพ์ แล้วตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 3 พันธุ์ คัดเลือกเฉพาะไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอ จำนวน 1 แถบเมื่อใช้ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 และ F_1 เป็นแม่พิมพ์ ส่วนเมื่อใช้ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 1 เป็นแม่พิมพ์จะต้องไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ต่อจากนั้นตรวจสอบว่าไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้เฉพาะกับอัลลีลเด่น *Sd1* หรือไม่ ทำโดยส่งผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์ กข 6 ไปหาลำดับเบส แล้วนำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวพันธุ์ Nipponbare (Genbank Acc. No.:AF465255) โดยใช้โปรแกรม BLAST 2 SEQUENCES (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลำดับเบสเหมือนกับลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวพันธุ์ Nipponbare

2. การหา flanking marker 1 และ 2 ที่ขนานอยู่ทั้ง 2 ข้างของยีน *Sd1/sd1*

การหา flanking marker จำนวน 2 ตำแหน่ง คือ flanking marker 1 และ flanking marker 2 เพื่อใช้คัดเลือกหาต้นข้าวที่มีจำนวนของอัลลีลที่ไม่ต้องการที่ติดมาจากพันธุ์ให้ (donor parent) น้อยที่สุด มีขั้นตอนดังนี้ คือ

2.1 การหา flanking marker 1 และ 2

Monna *et al.* (2002) ทำการโคลนยีน *Sd1/sd1* โดยใช้ positional cloning และได้แสดง Genetic map of a semidwarfing gene *sd-1* ทำให้ทราบว่าอัลลีล *Sd1/sd1* ยึดติดกับ โมเลกุลเครื่องหมายชื่ออะไร เมื่อนำชื่อโมเลกุลเครื่องหมายเหล่านี้ไปหาดำแหน่งบนโครโมโซมที่ 1 ใน genetic and physical map ของ McCouch *et al.* (2002) ก็จะสามารถคัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSR ที่ขนานอยู่ทั้ง 2 ข้างของยีน *Sd1/sd1* ได้จำนวนหนึ่ง ต่อจากนั้นสร้างสร้างคราะห์ให้ไพรเมอร์เพื่อใช้ในการทำพีซีอาร์

2.2 การคัดเลือก SSR maker ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1

เมื่อหา SSR marker ที่ขนานอยู่ทั้ง 2 ข้างของยีน *Sd1/sd1* ได้จากข้อ 2.1 ต่อจากนั้นทำการคัดเลือก SSR marker เหล่านี้โดยใช้เป็นไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ โดยมีดีเอ็นเอแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 F_1 (กข 6 x กข 1) และ กข 1 คัดเลือกไพรเมอร์ที่แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันระหว่างของข้าวพันธุ์ กข 6 และ กข 1 เพื่อใช้เป็น flanking marker ต่อไป

3. การหา และ การคัดเลือก background marker

การหา และ การคัดเลือก background marker ที่กระจายอยู่บนโครโมโซมทั้ง 12 แท่ง เพื่อใช้ตรวจหาต้นข้าวที่เปอร์เซ็นต์ยีนในไทป์เหมือนกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มากที่สุดมีขั้นตอนดังนี้

3.1 การหา background marker

การคัดเลือก background marker ทำโดยเลือก SSR marker ทั้งหมด 152 ตำแหน่งที่กระจายอยู่ทั่วโครโมโซมทั้ง 12 แท่ง จาก Genetic : Rice-Cornell SSR 2001 และ QTL:Rice-TKU Integrated QTL 2002 (http://www.gramene.org/db/cmap/map_search) เมื่อนำ SSR marker ที่คัดเลือกได้ ซึ่งมีระยะห่างกันเฉลี่ยประมาณ 12.7 cM ทำการส่งส่งเคราะห์ไพรเมอร์เพื่อใช้ในการทำพีซีอาร์

3.2 การคัดเลือก background marker ที่เกิด polymorphism ระหว่างข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1

การคัดเลือก background marker ทำโดยนำ SSR marker ทั้งหมด 152 ตำแหน่งที่กระจายอยู่ทั่วโครโมโซมทั้ง 12 แท่ง (จากข้อ 3.1) มาใช้เป็นไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 F_1 และ กข 1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ต่อจากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์มาแยกขนาดด้วยเจล เพื่อคัดเลือก SSR marker ที่ให้แถบดีเอ็นเอมีขนาดที่แตกต่างกัน (polymorphism) ระหว่างข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1

4. การผสมพันธุ์ข้าวและการคัดเลือกโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ให้ต้นเตี้ยมีพันธุ์รับ (recipient parent) คือข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และที่ตำแหน่งของยีน $Sd1/sd1$ มียีนในไทป์เป็น $Sd1Sd1$ ส่วนพันธุ์ให้ (donor parent) คือข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 และที่ตำแหน่งของอัลลีล $Sd1/sd1$ มียีนในไทป์เป็น $sd1sd1$ แผนการผสมพันธุ์ และการคัดเลือกต้นข้าวโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย สรุปขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยโดยวิธีผสมกลับ และใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกในแต่ละฤดูมีดังนี้

ฤดูที่ 1 การผลิตเมล็ด F_1 โดยใช้ข้าวพันธุ์ กข 6 เป็นแม่ผสมกับข้าวพันธุ์ กข 1 เป็นพ่อ

ฤดูที่ 2 การคัดเลือกต้น F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และการผลิตเมล็ด BC_1F_1

ฤดูที่ 3 การคัดเลือกต้น BC_1F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_2F_1

ฤดูที่ 4 การคัดเลือกต้น BC_2F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_3F_1

ฤดูที่ 5 การคัดเลือกต้น BC_3F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_4F_1

ฤดูที่ 6 การคัดเลือกต้น BC_4F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_5F_1

ฤดูที่ 7 การคัดเลือกต้น BC_5F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_6F_1

5. การสร้างสายพันธุ์ กข 6 ต้นเดี่ยวไม่ไวต่อช่วงแสง

เนื่องจากโครงการ “ปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเดี่ยว โดยวิธีปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก” ซึ่งได้รับทุนวิจัยจากสำนักวิจัย และส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (2550-2551) และโครงการ “ปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี molecular marker-assisted backcrossing” ซึ่งได้รับทุนวิจัยจากศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (2547-2550) เป็นโครงการที่ทำในระยะเวลาใกล้เคียงกัน ดังนั้นเมื่อได้สายพันธุ์ กข 6 ต้นเดี่ยว และสายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสงที่ได้มาจากโครงการทั้ง 2 ตามลำดับ จึงนำมาผสมพันธุ์กันเพื่อให้ได้เมล็ด F_1 ต่อจากนั้นทำการคัดเลือกด้วยโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อให้ได้ต้น F_1 ที่มีทั้งยีนด้อย $sd1$ และ $hd1$ และทำการผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด F_2 ซึ่งมีการกระจายตัวของยีนทำให้พบต้น F_2 ที่มียีนไทป์เป็น $sd1sd1hd1hd1$ เกิดขึ้นซึ่งมีฟีโนไทป์เป็นข้าวต้นเดี่ยวไม่ไวต่อช่วงแสง เมื่อนำต้น F_2 ไปปลูกในสภาพวันยาวในเดือนเมษายนก็จะสามารถคัดเลือกต้น F_2 ที่มีฟีโนไทป์เป็นต้นเดี่ยวไม่ไวต่อช่วงแสงได้ ซึ่งจะเป็นโครงการต่อเนื่องจากโครงการนี้ เนื่องจากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวสายพันธุ์ กข 6 ต้นเดี่ยว และข้าวสายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสง เริ่มผสมกันตั้งแต่ในฤดูที่ 5 ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเดี่ยวฯ ซึ่งในฤดูที่ 5 นี้ได้ต้น BC_3F_1 ที่มียีนไทป์เป็น $Sd1sd1$ จึงนำมาผสมกับ ต้น BC_4F_1 ที่มียีนไทป์ $Hd1hd1$ ซึ่งมีรายละเอียดของการผสมระหว่างสายพันธุ์ทั้งต้นเดี่ยว และสายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสงมีดังต่อไปนี้

ฤดูที่ 5 การผลิตเมล็ด F_1 ที่มีทั้งยีน $sd1$ และ $hd1$ อยู่ในต้นเดียวกัน โดยทำการผสมต้น BC_4F_1 ที่มียีนไทป์ $Hd1hd1$ ซึ่งได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ให้ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสงฯ และต้น BC_3F_1 ที่มียีนไทป์เป็น $Sd1sd1$ ซึ่งได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเดี่ยวฯ ดังนั้นเมล็ด F_1 มียีนไทป์เกิดขึ้น 4 แบบ คือ เป็น $Hd1Sd1Sd1$ $Hd1Hd1Sd1sd1$ $Hd1hd1Sd1Sd1$ และ $Hd1hd1Sd1sd1$ ในฤดูต่อไปปลูก และคัดเลือกให้เหลือเฉพาะต้นที่มียีนไทป์เป็น $Hd1hd1Sd1sd1$ เพื่อผสมตัวเอง

ฤดูที่ 6 แบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลอง

ฤดูที่ 6.1 ปลูกเมล็ด F_1 จากฤดูที่ 5 คัดเลือกต้น F_1 ที่มียีนไทป์เป็น $Hd1hd1Sd1sd1$ และผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด F_2

ฤดู 6.2 การผลิตเมล็ด F_1 ที่มีทั้งยีน $sd1$ และ $hd1$ อยู่ในต้นเดียวกันจาก ต้น BC_5F_1 ที่มียีนไทป์ $Hd1hd1$ ซึ่งได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ให้ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสงฯ และต้น BC_4F_1 ที่มียีนไทป์เป็น $Sd1sd1$ ซึ่งได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยฯ ซึ่งเมล็ด F_1 ที่ได้จะมียีนไทป์ 4 แบบเหมือนฤดูที่ 5

ฤดูที่ 7 แบ่งการทดลองเป็น 4 การทดลอง คือ

ฤดูที่ 7.1 ปลุกคัดเลือกต้น F_2 ($BC_4F_1 \times BC_5F_1$) ที่ได้จากฤดูที่ 6.1 จำนวน 95 ต้น ในสภาพวันยาวให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อคัดเลือกต้นเตี้ยไม่ไวต่อช่วงแสงที่มียีนไทป์เป็น $hd1hd1sd1sd1$ และทำการผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด F_3

ฤดูที่ 7.2 ผลิตเมล็ด F_1 จากต้น F_2 ที่มียีนไทป์เป็น $hd1hd1sd1sd1$ ที่คัดเลือกได้ในฤดู 7.1 กับต้น BC_5F_2 ที่มียีนไทป์ $hd1hd1Sd1Sd1$ ดังนั้นเมล็ด F_1 นี้มียีนไทป์แบบเดียวคือ $hd1hd1Sd1sd1$

ฤดูที่ 7.3 คัดเลือกต้น F_1 ที่มียีนไทป์เป็น $Hd1hd1Sd1sd1$ ที่ได้จากฤดูที่ 6.2 ที่เกิดจากต้น BC_5F_1 ที่มียีนไทป์ $Hd1hd1$ และต้น BC_4F_1 ที่มียีนไทป์เป็น $Sd1sd1$ และทำการผสมตัวเองต้นที่คัดเลือกได้เพื่อผลิตเมล็ด F_2

ฤดูที่ 7.4 ผลิตเมล็ด F_1 ที่มีทั้งยีน $sd1$ และ $hd1$ อยู่ในต้นเดียวกันจาก BC_6F_1 ($Hd1hd1Sd1Sd1$) ซึ่งได้มาจากโครงการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวต่อช่วงแสงฯ กับ BC_5F_1 ($Hd1hd1Sd1sd1$) ซึ่งได้มาจากโครงการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยฯ

ฤดูที่ 8 แบ่งการทดลองเป็น 4 การทดลอง คือ

ฤดูที่ 8.1 ปลุกคัดเลือกสายพันธุ์ F_3 ที่ได้จากฤดูที่ 7.1 ในนาทดลอง และผสมตัวเองได้เมล็ด F_4

ฤดูที่ 8.2 ปลุกเมล็ด F_1 ($hd1hd1Sd1sd1$) ที่ได้จากฤดู 7.2 ในสภาพวันยาวที่ให้ได้รับ 14 ชั่วโมงต่อวัน คัดเลือกเฉพาะต้นที่ออกดอกได้ในสภาพวันยาวเท่านั้น และผสมตัวเองได้เมล็ด F_2

ฤดูที่ 8.3 คัดเลือกต้น F_1 จากฤดูที่ 7.4 ที่มียีนไทป์เป็น $Hd1hd1Sd1sd1$ และผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด F_2

โครงการวิจัยต่อเนื่องจากโครงการนี้จะนำเมล็ดที่ได้จาก **ฤดูที่ 7.3** คือ F_2 **ฤดูที่ 8.1** คือ F_4 **ฤดูที่ 8.2** คือ F_2 และ **ฤดูที่ 8.3** คือ F_2 ไปปลูกในแปลงนาในเดือนเมษายนซึ่งเป็นสภาพวันยาว ซึ่งจะคัดเลือกต้น กข 6 ต้นเตี้ยไม่ไวต่อช่วงแสงคือต้นที่ออกดอกได้ในสภาพวันยาว

6. การศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของอัลลีล *Sd1/sd1* ในข้าวโดยใช้ target marker

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน *Sd1/sd1* คือ สายพันธุ์ BC₃F₂-127-4121-2745-2630 จำนวน 65 ต้น ซึ่งได้มาจากโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยโดยวิธีปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก โดยที่ข้าวเหนียวต้นสูงพันธุ์ กข 6 มีอีโนไทป์เป็น *Sd1Sd1* เป็นพันธุ์รับ ส่วนพันธุ์ให้ อัลลีล *sd1* คือ ข้าวเจ้าต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 ที่มีอีโนไทป์เป็น *sd1sd1* ทำการผสมกลับ 3 ครั้ง ในแต่ละช่วงของการผสมกลับใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก ได้ต้นพันธุ์ BC₃F₁-127-4121-2745-2630 ที่มีอีโนไทป์เป็น *Sd1sd1* (บนโครโมโซมที่ 1) และโครโมโซมที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์ตำแหน่ง SSR marker เป็น homozygous ของอัลลีล กข 6 เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจด้วย SSR marker 6 ตำแหน่ง พบว่าเป็น homozygous ของอัลลีล กข 6 ทั้ง 6 ตำแหน่ง ส่วนโครโมโซมที่เหลืออีก 11 แท่ง (โครโมโซมที่ 2-12) มีเปอร์เซ็นต์ตำแหน่งของ SSR marker เป็น homozygous ของอัลลีล กข 6 เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจด้วย SSR marker จำนวน 63 ตำแหน่ง พบว่าเป็น homozygous ของอัลลีล กข 6 เท่ากับ 62 ตำแหน่ง และตรวจด้วย flanking marker คือ flanking 1 (147.5 cM) และ flanking 2 (155.1 cM) พบว่ายังเป็นเฮเทอโรไซกัสอยู่ทั้ง 2 ตำแหน่ง ทำการผสมตัวเองต้นต้น BC₃F₁ ได้เมล็ด BC₃F₂ ปลูกต้น BC₃F₂-127-4121-2745-2630 และพันธุ์เปรียบเทียบ คือข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6, ข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 F₁ ของ (กข 6 x กข 1) เพื่อศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน *Sd1/sd1*

6.1 การศึกษาอัตราส่วนฟีโนไทป์ต้นสูง/ต้นเตี้ยของสายพันธุ์ BC₃F₂-127-4121-2745-2630

การศึกษ้อัตราส่วนฟีโนไทป์ต้นสูง/ต้นเตี้ย ทำโดยเพาะเมล็ดข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 ข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 และ BC₃F₂-127-4121-2630-1609 ลงในกระถาง พันธุ์ละ 2 กระถางๆ ละประมาณ 200 เมล็ด ในวันที่ 9 กรกฎาคม 2550 ณ โรงเรือนกระจก ของศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เมื่อต้นข้าวอายุได้ประมาณ 1 เดือน ย้ายต้นข้าวลงปลูกในแปลงนา ในวันที่ 13 สิงหาคม 2550 (ฤดูนาปี 2550) ณ บริเวณนาทดลอง ของภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยปลูกสายพันธุ์ BC₃F₂-127-4121-2745-2630 ปลูกจำนวน 5 แถวๆ ละ 20 ต้น พร้อมพันธุ์เปรียบเทียบพันธุ์ คือข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และ ข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 พันธุ์ละ 2 แถว โดยมีระยะห่างระหว่างต้นและแถวเป็น 25x25 เซนติเมตร เมื่อถึงระยะสุกแก่ทำการวัดความสูงของต้นข้าว จากระดับพื้นดินถึงปลายรวงแล้วนำมาทดสอบด้วยไค-สแควร์ เพื่อศึกษาว่าการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเป็นไปตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดลหรือไม่

6.2 การศึกษาอัตราส่วนยีนโนไทป์ของยีน *Sd1/sd1* ของต้นข้าวสายพันธุ์ BC₃F₂-127-4121-2745-2630

การศึกษาอัตราส่วนยีนโนไทป์ทำโดยสกัดดีเอ็นเอของต้นข้าวสายพันธุ์ BC₃F₂-127-4121-2745-2630 จำนวน 48 ต้น พันธุ์ กข 6 กข 1 และ F₁ ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Genomic DNA Purification Kit ของบริษัท Fermentas) ทำตามวิธีของบริษัท นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอของข้าวด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ ไพรมเมอร์จำนวน 2 คู่ คือ RD6Sd1MW1F/1R ที่เฉพาะกับอัลลีลเด่น *Sd1* และ sd1MW3F/3R ที่เฉพาะกับอัลลีลด้อย *sd1* ส่วนประกอบของพีซีอาร์มีดังนี้ คือ ดีเอ็นเอของข้าว 100 ng ไพรมเมอร์ของสาย forward และ reverse สายละ 0.4 μ M และ 1x ของ GoTaq®Green Master Mix โดยปฏิกิริยามีปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 15 μ l รายละเอียดของอุณหภูมิต่างๆ ที่ใช้ในแต่ละรอบมีดังนี้ ระยะเวลาที่ 1 Pre-Denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 2 นาที ระยะเวลาที่ 2 Denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 1 นาที ระยะเวลาที่ 3 Annealing ของไพรมเมอร์ RD6Sd1MW1F/1R ใช้อุณหภูมิ 60 °C นาน 1.30 นาที ส่วนไพรมเมอร์ sd1MW3F/3R ใช้อุณหภูมิ 50 °C นาน 1.30 นาที ระยะเวลาที่ 4 Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 1.30 นาที ทำซ้ำจากระยะที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ สุดท้ายเป็นระยะ Final Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 5 นาที เมื่อสิ้นสุดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วนำผลผลิต PCR มาตรวจผลด้วย 2% อะกาโรสเจล ใน 1x TBE buffer แล้วย้อมแผ่นเจลด้วยเอทิดิเคียมโบรไมด์ นำเจลไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง GelDoc นำภาพถ่ายมาตรวจผลเพื่อแล้วนับต้นที่มียีนโนไทป์เป็น Sd1Sd1 Sd1sd1 และ sd1sd1 จากนั้นนำมาวิเคราะห์ผลด้วยการทดสอบไคสแควร์ ว่าเป็นไปตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดลหรือไม่

อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and methods)

โดยโครงการนี้จะปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ให้ได้ต้นเตี้ยที่มียีนไทป์เป็น sd1sd1 โดยวิธีผสมกลับและใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยคัดเลือก ต่อจากนั้นนำไปผสมกับสายพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ไม่ไวแสงที่ได้จากโครงการ “ปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี molecular marker-assisted backcrossing” ซึ่งได้รับทุนวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (2547-2550) ซึ่งทำให้ได้สายพันธุ์ กข 6 ที่มีทั้งลักษณะต้นเตี้ยและไม่ไวแสง พร้อมกับมีคุณภาพหุงต้มและลักษณะอื่นๆ เหมือนกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เดิม ข้าวสายพันธุ์ กข 6 ต้นเตี้ยมีความสูงลดลง จึงต้านทานต่อการหักล้ม และตอบสนองต่อปุ๋ยได้ดีขึ้น ควรมีผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ กข 6 เดิม และสายพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ที่ไม่ไวต่อช่วงแสงสามารถปลูกได้ตลอดปีทั้งในฤดูนาปี และฤดูนาปรัง

การปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก (molecular marker-assisted backcrossing) ต้องมีพันธุ์รับ (เช่น กข 6) เป็นพันธุ์ที่ดีแต่ขาดลักษณะบางอย่าง (ต้นเตี้ย) และพันธุ์ให้ (เช่น กข 1) เป็นพันธุ์อะไรก็ได้แต่ต้องมีลักษณะที่ต้องการหรือมียีนที่ต้องการ (sd1 ควบคุมให้ข้าวมีต้นเตี้ย) วิธีการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีผสมกลับทำได้โดยนำพันธุ์รับ (กข 6) มาผสมกับพันธุ์ให้ (กข 1) เพื่อผลิตลูกผสมชั่วแรก (F_1) จากนั้นนำ F_1 ผสมกลับไปหาพันธุ์รับ (กข 6) ได้ลูกผสมกลับชั่วแรกคือ BC_1F_1 แล้วคัดเลือกต้นที่ต้องการด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย Newbury (2003) อธิบายถึงขั้นตอนการคัดเลือกต้นพืชที่ได้จากการผสมกลับในแต่ละชั่วโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกกว่ามี 3 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรก ใช้ target marker (เช่น sd1 marker) คัดเลือกต้นที่มียีนในตำแหน่งที่สนใจให้เป็น heterozygous (Sd1sd1) ขั้นตอนที่ 2 ทำการลดจำนวนของยีนที่ไม่ต้องการที่ติดมาจากตัวให้ (linkage drag) โดยใช้ flanking marker ทั้ง 2 ตำแหน่งซึ่งห่างจากยีนที่สนใจ (target gene) ข้างละประมาณ 2 cM โดยคัดเลือกทั้งสองตำแหน่งนี้ให้เหมือนกับพันธุ์รับ ขั้นตอนที่ 3 ใช้ background marker คัดเลือกต้นที่มียีนไทป์เหมือนพันธุ์รับ (กข 6) มากที่สุด แล้วนำต้นที่คัดเลือกได้ไปผสมกลับไปหาพันธุ์รับ (กข 6) การผสมกลับทำทั้งหมด 3 ครั้ง จนกระทั่งได้ต้นที่มีลักษณะต่างๆ เหมือนพันธุ์รับ (กข 6) ยกเว้นลักษณะที่ต้องการ (ต้นเตี้ย) ซึ่งการใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยคัดเลือก จะทำให้การปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

สำหรับโครงการวิจัยนี้มีทั้งหมด 6 การทดลอง ขั้นตอนการวิจัยทั้ง 6 การทดลองมีรายละเอียดต่อไปนี้

1. การหา target marker ที่เฉพาะกับอัลลีลด้อย *sd1* เพื่อใช้คัดเลือกหาต้นข้าวที่มีอัลลีลด้อย *sd1*

2. การหา flanking marker 1 และ 2 ที่ขนานอยู่ทั้ง 2 ข้างของยีน *Sd1/sd1* เพื่อใช้คัดเลือกหาต้นข้าวที่มีจำนวนยีนที่ไม่ต้องการซึ่งติดมาจากพันธุ์ให้ (donor parent) น้อยที่สุด

3. การหา background marker ที่กระจายอยู่บนโครโมโซมทั้ง 12 แท่ง เพื่อใช้ตรวจหาต้นข้าวที่เปอร์เซ็นต์ยีนไทยเหมือนกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มากที่สุด

4. การผสมพันธุ์ข้าว และการคัดเลือกต้นข้าวด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย เพื่อให้ได้สายพันธุ์ กข 6 ต้นเดียว

5. การผสมระหว่างสายพันธุ์ กข 6 ต้นเดียว กับ สายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสง เพื่อผลิตสายพันธุ์ กข 6 ต้นเดียวไม่ไวต่อช่วงแสง

6. การศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของอัลลีล *Sd1/sd1* ในข้าวโดยใช้ target marker

1. การหา target marker ที่เฉพาะกับอัลลีลด้อย *sd1* เพื่อใช้คัดเลือกหาต้นข้าวที่มีอัลลีลด้อย *sd1*

1.1 การออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะกับอัลลีล *Sd1/sd1* และคัดเลือกไพรเมอร์

เนื่องจาก Monna *et al.* (2002) รายงานว่าอัลลีลเด่นของ *Sd1* มี 2743 คู่เบส ประกอบด้วย 3 เอกซอน (exons) ที่มีจำนวนเบส 558 318 และ 291 คู่ และ 2 อินทอน (introns) ที่มีจำนวนเบส 105 และ 1,471 คู่ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างอัลลีลเด่น *Sd1* กับลำดับเบสของอัลลีลด้อย *sd1* พบว่าอัลลีลด้อย *sd1* มีเบสขาดหายของเบสจำนวน 383 คู่ โดยเริ่มจากช่วงกลางของเอกซอน 1 จำนวน 262 คู่ ในอินทอน 1 ขาดจำนวน 105 คู่ และช่วงต้นของเอกซอน 2 ขาดจำนวน 16 คู่ ทำให้เกิด stop codon หลังบริเวณที่ขาดหายไป จึงทำให้การแปลรหัสหยุดลงก่อนที่จะถึง stop codon เดิม มีผลทำให้โปรตีนที่ผลิตได้ไม่ทำหน้าที่ (nonfunctional protein)

ดังนั้นการออกแบบไพรเมอร์ทำโดยนำลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวต้นสูงพันธุ์ Nipponbare (Genebank Acc. No.: AF465255) มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ โดยใช้โปรแกรม Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) โดยให้ forward primer และ reverse primer ขนานอยู่ทั้งสองข้างของเบสที่ขาดหายไปของอัลลีลด้อย *sd1* ได้ไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 10 คู่ ไพรเมอร์เหล่านี้ต้องนำมาคัดเลือกหาไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่าง

ของอัลลีลเด่น *Sd1* ออกจากอัลลีลด้อย *sd1* จึงนำไพรเมอร์เหล่านี้มาทำพีซีอาร์ โดยมีดีเอ็นเอข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 F_1 (กข 6 x กข 1) และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 เป็นแม่พิมพ์ ตรวจสอบผลผลิตของพีซีอาร์ด้วย 2% อะกาโรสเจล ใน 1x TBE buffer แล้วย้อมแผ่นเจลด้วยเอทิดีเอมโบรไมด์ นำเจลไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง GelDoc นำภาพถ่ายมาตรวจผลหาไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1

1.2 การตรวจสอบความถูกต้องของไพรเมอร์ที่เฉพาะกับอัลลีล *Sd1/sd1*

ถึงแม้ว่าคัดเลือกได้ไพรเมอร์ *sd1MW3F/3R* ที่ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 เพื่อความถูกต้องว่า เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่นี้แล้วขึ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้นั้นเป็นส่วนหนึ่งของอัลลีล *Sd1/sd1* จึง นำผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวทั้ง 2 พันธุ์ไปหาลำดับเบสที่ภาควิชาชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ต่อจากนั้นนำลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 ที่หาลำดับเบสได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวต้นสูง Nipponbare (Genbank Acc. No.: AF465255) โดยใช้โปรแกรม BLAST 2 SEQUENCES (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>) ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีลำดับเบสเหมือนกับลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวต้นสูง Nipponbare

1.3 การออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะกับอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6

เนื่องจากเมื่อทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ *sd1MW3F/3R* โดยมีดีเอ็นเอของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 เป็นแม่พิมพ์ พบว่าบางครั้งเกิด/บางครั้งไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ จึงสันนิษฐานว่าการจับกันอย่างคู่สม (anneal) ระหว่างเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 กับลำดับเบสของไพรเมอร์ *sd1MW3F/3R* ได้ไม่ดี จึงต้องทำการออกแบบไพรเมอร์ให้สามารถเพิ่มขึ้นดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงกับอัลลีลเด่น *Sd1* เท่านั้น การออกแบบไพรเมอร์ทำโดยนำลำดับเบสที่หาจากผลผลิตพีซีอาร์ที่มี ดีเอ็นเอของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 เป็นแม่พิมพ์ โดยมีไพรเมอร์ *sd1MW3F/3R* มาเปรียบเทียบกับ และนำลำดับเบสของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 ที่ไม่ซ้ำกับลำดับเบสของข้าวต้นเตี้ยมาใช้เป็นแม่พิมพ์ในการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ ดังนั้น forward primer และ reverse primer เฉพาะอัลลีลเด่น *Sd1* ของ กข 6 เท่านั้น คือออกแบบให้ไพรเมอร์อยู่ในบริเวณที่มีลำดับเบสเฉพาะในอัลลีลเด่น *Sd1* แต่ไม่มีลำดับเบสในอัลลีลด้อย *sd1* เนื่องจากอัลลีลด้อย *sd1* มีการขาดหายไปของเบสจำนวน 383 คู่ คือ โดยเริ่มจากช่วงกลางของเอกซอน 1 มีเบสขาดหาย 262 คู่ ในอินทرون 1 มีเบสขาดหาย 105 คู่ และช่วงต้นของเอกซอน 2

มีเบสขาดหาย 16 คู่ ตามลำดับ ดังนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะกับอัลลีลเด่น *Sd1* ในบริเวณนี้ โดยใช้โปรแกรม Primer3 สร้างสร้างคราะห์ให้ไพรเมอร์ แล้วนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาทำพีซีอาร์โดยใช้ ดีเอ็นเอข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 F_1 (กข 6 x กข 1) และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 เป็นแม่พิมพ์ แล้วตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 3 พันธุ์ คัดเลือกเฉพาะไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอ จำนวน 1 แถบเมื่อใช้ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 และ F_1 เป็นแม่พิมพ์ ส่วนเมื่อใช้ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 1 เป็นแม่พิมพ์จะต้องไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ต่อจากนั้นตรวจสอบว่าไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้เฉพาะกับอัลลีลเด่น *Sd1* หรือไม่ ทำโดยส่งผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวพันธุ์ กข 6 ไปหาลำดับเบส แล้วนำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวพันธุ์ Nipponbare (Genbank Acc. No.:AF465255) โดยใช้โปรแกรม BLAST 2 SEQUENCES (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลำดับเบสเหมือนกับลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวพันธุ์ Nipponbare

2. การหา flanking marker 1 และ 2 ที่ขนานอยู่ทั้ง 2 ข้างของยีน *Sd1/sd1*

การหา flanking marker จำนวน 2 ตำแหน่ง คือ flanking marker 1 และ flanking marker 2 เพื่อใช้คัดเลือกหาต้นข้าวที่มีจำนวนของอัลลีลที่ไม่ต้องการที่ติดมาจากพันธุ์ให้ (donor parent) น้อยที่สุด มีขั้นตอนดังนี้ คือ

2.1 การหา flanking marker 1 และ 2

Monna *et al.* (2002) ทำการโคลนยีน *Sd1/sd1* โดยใช้ positional cloning และได้แสดง Genetic map of a semidwarfing gene *sd-1* ทำให้ทราบว่าอัลลีล *Sd1/sd1* ยึดติดกับ โมเลกุลเครื่องหมายชื่ออะไร เมื่อนำชื่อโมเลกุลเครื่องหมายเหล่านี้ไปหาดำแหน่งบนโครโมโซมที่ 1 ใน genetic and physical map ของ McCouch *et al.* (2002) ก็จะสามารถคัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมายชนิด SSR ที่ขนานอยู่ทั้ง 2 ข้างของยีน *Sd1/sd1* ได้จำนวนหนึ่ง ต่อจากนั้นสร้างสร้างคราะห์ให้ไพรเมอร์เพื่อใช้ในการทำพีซีอาร์

2.2 การคัดเลือก SSR maker ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1

เมื่อหา SSR marker ที่ขนานอยู่ทั้ง 2 ข้างของยีน *Sd1/sd1* ได้จากข้อ 2.1 ต่อจากนั้นทำการคัดเลือก SSR marker เหล่านี้โดยใช้เป็นไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ โดยมีดีเอ็นเอแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 F_1 (กข 6 x กข 1) และ กข 1 คัดเลือกไพรเมอร์ที่แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันระหว่างของข้าวพันธุ์ กข 6 และ กข 1 เพื่อใช้เป็น flanking marker ต่อไป

3. การหา และ การคัดเลือก background marker

การหา และ การคัดเลือก background marker ที่กระจายอยู่บนโครโมโซมทั้ง 12 แท่ง เพื่อใช้ตรวจหาต้นข้าวที่เปอร์เซ็นต์ยีนในไทป์เหมือนกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มากที่สุดมีขั้นตอนดังนี้

3.1 การหา background marker

การคัดเลือก background marker ทำโดยเลือก SSR marker ทั้งหมด 152 ตำแหน่งที่กระจายอยู่ทั่วโครโมโซมทั้ง 12 แท่ง จาก Genetic : Rice-Cornell SSR 2001 และ QTL:Rice-TKU Integrated QTL 2002 (http://www.gramene.org/db/cmap/map_search) เมื่อนำ SSR marker ที่คัดเลือกได้ ซึ่งมีระยะห่างกันเฉลี่ยประมาณ 12.7 cM ทำการส่งส่งเคราะห์ไพรเมอร์เพื่อใช้ในการทำพีซีอาร์

3.2 การคัดเลือก background marker ที่เกิด polymorphism ระหว่างข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1

การคัดเลือก background marker ทำโดยนำ SSR marker ทั้งหมด 152 ตำแหน่งที่กระจายอยู่ทั่วโครโมโซมทั้ง 12 แท่ง (จากข้อ 3.1) มาใช้เป็นไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 F_1 และ กข 1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ต่อจากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์มาแยกขนาดด้วยเจล เพื่อคัดเลือก SSR marker ที่ให้แถบดีเอ็นเอมีขนาดที่แตกต่างกัน (polymorphism) ระหว่างข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1

4. การผสมพันธุ์ข้าวและการคัดเลือกโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ให้ต้นเตี้ยมีพันธุ์รับ (recipient parent) คือข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และที่ตำแหน่งของยีน $Sd1/sd1$ มียีนในไทป์เป็น $Sd1Sd1$ ส่วนพันธุ์ให้ (donor parent) คือข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 และที่ตำแหน่งของอัลลีล $Sd1/sd1$ มียีนในไทป์เป็น $sd1sd1$ แผนการผสมพันธุ์ และการคัดเลือกต้นข้าวโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย สรุปขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยโดยวิธีผสมกลับ และใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกในแต่ละฤดูมีดังนี้

ฤดูที่ 1 การผลิตเมล็ด F_1 โดยใช้ข้าวพันธุ์ กข 6 เป็นแม่ผสมกับข้าวพันธุ์ กข 1 เป็นพ่อ

ฤดูที่ 2 การคัดเลือกต้น F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และการผลิตเมล็ด BC_1F_1

ฤดูที่ 3 การคัดเลือกต้น BC_1F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_2F_1

ฤดูที่ 4 การคัดเลือกต้น BC_2F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_3F_1

ฤดูที่ 5 การคัดเลือกต้น BC_3F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_4F_1

ฤดูที่ 6 การคัดเลือกต้น BC_4F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_5F_1

ฤดูที่ 7 การคัดเลือกต้น BC_5F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_6F_1

5. การสร้างสายพันธุ์ กข 6 ต้นเดี่ยวไม่ไวต่อช่วงแสง

เนื่องจากโครงการ “ปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเดี่ยว โดยวิธีปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก” ซึ่งได้รับทุนวิจัยจากสำนักวิจัย และส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (2550-2551) และโครงการ “ปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี molecular marker-assisted backcrossing” ซึ่งได้รับทุนวิจัยจากศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (2547-2550) เป็นโครงการที่ทำในระยะเวลาใกล้เคียงกัน ดังนั้นเมื่อได้สายพันธุ์ กข 6 ต้นเดี่ยว และสายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสงที่ได้มาจากโครงการทั้ง 2 ตามลำดับ จึงนำมาผสมพันธุ์กันเพื่อให้ได้เมล็ด F_1 ต่อจากนั้นทำการคัดเลือกด้วยโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อให้ได้ต้น F_1 ที่มีทั้งยีนด้อย $sd1$ และ $hd1$ และทำการผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด F_2 ซึ่งมีการกระจายตัวของยีนทำให้พบต้น F_2 ที่มียีนไทป์เป็น $sd1sd1hd1hd1$ เกิดขึ้นซึ่งมีฟีโนไทป์เป็นข้าวต้นเดี่ยวไม่ไวต่อช่วงแสง เมื่อนำต้น F_2 ไปปลูกในสภาพวันยาวในเดือนเมษายนก็จะสามารถคัดเลือกต้น F_2 ที่มีฟีโนไทป์เป็นต้นเดี่ยวไม่ไวต่อช่วงแสงได้ ซึ่งจะเป็นโครงการต่อเนื่องจากโครงการนี้ เนื่องจากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวสายพันธุ์ กข 6 ต้นเดี่ยว และข้าวสายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสง เริ่มผสมกันตั้งแต่ในฤดูที่ 5 ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเดี่ยวฯ ซึ่งในฤดูที่ 5 นี้ได้ต้น BC_3F_1 ที่มียีนไทป์เป็น $Sd1sd1$ จึงนำมาผสมกับ ต้น BC_4F_1 ที่มียีนไทป์ $Hd1hd1$ ซึ่งมีรายละเอียดของการผสมระหว่างสายพันธุ์ทั้งต้นเดี่ยว และสายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสงมีดังต่อไปนี้

ฤดูที่ 5 การผลิตเมล็ด F_1 ที่มีทั้งยีน $sd1$ และ $hd1$ อยู่ในต้นเดียวกัน โดยทำการผสมต้น BC_4F_1 ที่มียีนไทป์ $Hd1hd1$ ซึ่งได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ให้ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสงฯ และต้น BC_3F_1 ที่มียีนไทป์เป็น $Sd1sd1$ ซึ่งได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเดี่ยวฯ ดังนั้นเมล็ด F_1 มียีนไทป์เกิดขึ้น 4 แบบ คือ เป็น $Hd1Sd1Sd1$ $Hd1Hd1Sd1sd1$ $Hd1hd1Sd1Sd1$ และ $Hd1hd1Sd1sd1$ ในฤดูต่อไปปลูก และคัดเลือกให้เหลือเฉพาะต้นที่มียีนไทป์เป็น $Hd1hd1Sd1sd1$ เพื่อผสมตัวเอง

ฤดูที่ 6 แบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลอง

ฤดูที่ 6.1 ปลูกเมล็ด F_1 จากฤดูที่ 5 คัดเลือกต้น F_1 ที่มียีนไทป์เป็น $Hd1hd1Sd1sd1$ และผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด F_2

ฤดู 6.2 การผลิตเมล็ด F_1 ที่มีทั้งยีน $sd1$ และ $hd1$ อยู่ในต้นเดียวกันจาก ต้น BC_5F_1 ที่มียีนไทป์ $Hd1hd1$ ซึ่งได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ให้ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสงฯ และต้น BC_4F_1 ที่มียีนไทป์เป็น $Sd1sd1$ ซึ่งได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยฯ ซึ่งเมล็ด F_1 ที่ได้จะมียีนไทป์ 4 แบบเหมือนฤดูที่ 5

ฤดูที่ 7 แบ่งการทดลองเป็น 4 การทดลอง คือ

ฤดูที่ 7.1 ปลุกคัดเลือกต้น F_2 ($BC_4F_1 \times BC_3F_1$) ที่ได้จากฤดูที่ 6.1 จำนวน 95 ต้น ในสภาพวันยาวให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อคัดเลือกต้นเตี้ยไม่ไวต่อช่วงแสงที่มียีนไทป์เป็น $hd1hd1sd1sd1$ และทำการผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด F_3

ฤดูที่ 7.2 ผลิตเมล็ด F_1 จากต้น F_2 ที่มียีนไทป์เป็น $hd1hd1sd1sd1$ ที่คัดเลือกได้ในฤดู 7.1 กับต้น BC_5F_2 ที่มียีนไทป์ $hd1hd1Sd1Sd1$ ดังนั้นเมล็ด F_1 นี้มียีนไทป์แบบเดียวคือ $hd1hd1Sd1sd1$

ฤดูที่ 7.3 คัดเลือกต้น F_1 ที่มียีนไทป์เป็น $Hd1hd1Sd1sd1$ ที่ได้จากฤดูที่ 6.2 ที่เกิดจากต้น BC_5F_1 ที่มียีนไทป์ $Hd1hd1$ และต้น BC_4F_1 ที่มียีนไทป์เป็น $Sd1sd1$ และทำการผสมตัวเองต้นที่คัดเลือกได้เพื่อผลิตเมล็ด F_2

ฤดูที่ 7.4 ผลิตเมล็ด F_1 ที่มีทั้งยีน $sd1$ และ $hd1$ อยู่ในต้นเดียวกันจาก BC_6F_1 ($Hd1hd1Sd1Sd1$) ซึ่งได้มาจากโครงการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวต่อช่วงแสงฯ กับ BC_5F_1 ($Hd1hd1Sd1sd1$) ซึ่งได้มาจากโครงการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยฯ

ฤดูที่ 8 แบ่งการทดลองเป็น 4 การทดลอง คือ

ฤดูที่ 8.1 ปลุกคัดเลือกสายพันธุ์ F_3 ที่ได้จากฤดูที่ 7.1 ในนาทดลอง และผสมตัวเองได้เมล็ด F_4

ฤดูที่ 8.2 ปลุกเมล็ด F_1 ($hd1hd1Sd1sd1$) ที่ได้จากฤดู 7.2 ในสภาพวันยาวที่ให้ได้รับ 14 ชั่วโมงต่อวัน คัดเลือกเฉพาะต้นที่ออกดอกได้ในสภาพวันยาวเท่านั้น และผสมตัวเองได้เมล็ด F_2

ฤดูที่ 8.3 คัดเลือกต้น F_1 จากฤดูที่ 7.4 ที่มียีนไทป์เป็น $Hd1hd1Sd1sd1$ และผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด F_2

โครงการวิจัยต่อเนื่องจากโครงการนี้จะนำเมล็ดที่ได้จาก **ฤดูที่ 7.3** คือ F_2 **ฤดูที่ 8.1** คือ F_4 **ฤดูที่ 8.2** คือ F_2 และ **ฤดูที่ 8.3** คือ F_2 ไปปลูกในแปลงนาในเดือนเมษายนซึ่งเป็นสภาพวันยาว ซึ่งจะคัดเลือกต้น กข 6 ต้นเตี้ยไม่ไวต่อช่วงแสงคือต้นที่ออกดอกได้ในสภาพวันยาว

6. การศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของอัลลีล *Sd1/sd1* ในข้าวโดยใช้ target marker

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน *Sd1/sd1* คือ สายพันธุ์ BC₃F₂-127-4121-2745-2630 จำนวน 65 ต้น ซึ่งได้มาจากโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยโดยวิธีปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก โดยที่ข้าวเหนียวต้นสูงพันธุ์ กข 6 มีอีโนไทป์เป็น *Sd1Sd1* เป็นพันธุ์รับ ส่วนพันธุ์ให้ อัลลีล *sd1* คือ ข้าวเจ้าต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 ที่มีอีโนไทป์เป็น *sd1sd1* ทำการผสมกลับ 3 ครั้ง ในแต่ละช่วงของการผสมกลับใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก ได้ต้นพันธุ์ BC₃F₁-127-4121-2745-2630 ที่มีอีโนไทป์เป็น *Sd1sd1* (บนโครโมโซมที่ 1) และโครโมโซมที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์ตำแหน่ง SSR marker เป็น homozygous ของอัลลีล กข 6 เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจด้วย SSR marker 6 ตำแหน่ง พบว่าเป็น homozygous ของอัลลีล กข 6 ทั้ง 6 ตำแหน่ง ส่วนโครโมโซมที่เหลืออีก 11 แท่ง (โครโมโซมที่ 2-12) มีเปอร์เซ็นต์ตำแหน่งของ SSR marker เป็น homozygous ของอัลลีล กข 6 เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ เมื่อตรวจด้วย SSR marker จำนวน 63 ตำแหน่ง พบว่าเป็น homozygous ของอัลลีล กข 6 เท่ากับ 62 ตำแหน่ง และตรวจด้วย flanking marker คือ flanking 1 (147.5 cM) และ flanking 2 (155.1 cM) พบว่ายังเป็นเฮเทอโรไซกัสอยู่ทั้ง 2 ตำแหน่ง ทำการผสมตัวเองต้นต้น BC₃F₁ ได้เมล็ด BC₃F₂ ปลูกต้น BC₃F₂-127-4121-2745-2630 และพันธุ์เปรียบเทียบ คือข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6, ข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 F₁ ของ (กข 6 x กข 1) เพื่อศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน *Sd1/sd1*

6.1 การศึกษาอัตราส่วนฟีโนไทป์ต้นสูง/ต้นเตี้ยของสายพันธุ์ BC₃F₂-127-4121-2745-2630

การศึกษ้อัตราส่วนฟีโนไทป์ต้นสูง/ต้นเตี้ย ทำโดยเพาะเมล็ดข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 ข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 และ BC₃F₂-127-4121-2630-1609 ลงในกระถาง พันธุ์ละ 2 กระถางๆ ละประมาณ 200 เมล็ด ในวันที่ 9 กรกฎาคม 2550 ณ โรงเรือนกระจก ของศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เมื่อต้นข้าวอายุได้ประมาณ 1 เดือน ย้ายต้นข้าวลงปลูกในแปลงนา ในวันที่ 13 สิงหาคม 2550 (ฤดูนาปี 2550) ณ บริเวณนาทดลอง ของภาควิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยปลูกสายพันธุ์ BC₃F₂-127-4121-2745-2630 ปลูกจำนวน 5 แถวๆ ละ 20 ต้น พร้อมพันธุ์เปรียบเทียบพันธุ์ คือข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และ ข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 พันธุ์ละ 2 แถว โดยมีระยะห่างระหว่างต้นและแถวเป็น 25x25 เซนติเมตร เมื่อถึงระยะสุกแก่ทำการวัดความสูงของต้นข้าว จากระดับพื้นดินถึงปลายรวงแล้วนำมาทดสอบด้วยไค-สแควร์ เพื่อศึกษาว่าการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเป็นไปตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดลหรือไม่

6.2 การศึกษาอัตราส่วนยีนโนไทป์ของยีน *Sd1/sd1* ของต้นข้าวสายพันธุ์ BC₃F₂-127-4121-2745-2630

การศึกษาอัตราส่วนยีนโนไทป์ทำโดยสกัดดีเอ็นเอของต้นข้าวสายพันธุ์ BC₃F₂-127-4121-2745-2630 จำนวน 48 ต้น พันธุ์ กข 6 กข 1 และ F₁ ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Genomic DNA Purification Kit ของบริษัท Fermentas) ทำตามวิธีของบริษัท นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอของข้าวด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ ไพรมเมอร์จำนวน 2 คู่ คือ RD6Sd1MW1F/1R ที่เฉพาะกับอัลลีลเด่น *Sd1* และ sd1MW3F/3R ที่เฉพาะกับอัลลีลด้อย *sd1* ส่วนประกอบของพีซีอาร์มีดังนี้ คือ ดีเอ็นเอของข้าว 100 ng ไพรมเมอร์ของสาย forward และ reverse สายละ 0.4 μ M และ 1x ของ GoTaq®Green Master Mix โดยปฏิกิริยามีปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 15 μ l รายละเอียดของอุณหภูมิต่างๆ ที่ใช้ในแต่ละรอบมีดังนี้ ระยะเวลาที่ 1 Pre-Denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 2 นาที ระยะเวลาที่ 2 Denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 1 นาที ระยะเวลาที่ 3 Annealing ของไพรมเมอร์ RD6Sd1MW1F/1R ใช้อุณหภูมิ 60 °C นาน 1.30 นาที ส่วนไพรมเมอร์ sd1MW3F/3R ใช้อุณหภูมิ 50 °C นาน 1.30 นาที ระยะเวลาที่ 4 Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 1.30 นาที ทำซ้ำจากระยะที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ สุดท้ายเป็นระยะ Final Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 5 นาที เมื่อสิ้นสุดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วนำผลผลิต PCR มาตรวจผลด้วย 2% อะกาโรสเจล ใน 1x TBE buffer แล้วย้อมแผ่นเจลด้วยเอทิดิเคียมโบรไมด์ นำเจลไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง GelDoc นำภาพถ่ายมาตรวจผลเพื่อแล้วนับต้นที่มียีนโนไทป์เป็น Sd1Sd1 Sd1sd1 และ sd1sd1 จากนั้นนำมาวิเคราะห์ผลด้วยการทดสอบไคสแควร์ ว่าเป็นไปตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดลหรือไม่

ผลการวิจัยและผลการทดลอง (Result)

การทดลองมี 6 การทดลอง คือ

1. การหา target marker ที่เฉพาะกับอัลลีลด้วย *sd1* เพื่อใช้คัดเลือกหาต้นข้าวที่มีอัลลีลด้วย *sd1*

2. การหา flanking marker 1 และ 2 ที่ขนานอยู่ทั้ง 2 ข้างของยีน *Sd1/sd1* เพื่อใช้คัดเลือกหาต้นข้าวที่มีจำนวนยีนที่ไม่ต้องการซึ่งติดมาจากพันธุ์ให้ (donor parent) น้อยที่สุด

3. การหา background marker ที่กระจายอยู่บนโครโมโซมทั้ง 12 แท่ง เพื่อใช้ตรวจหาต้นข้าวที่เปอร์เซ็นต์ยีนในไทป์เหมือนกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มากที่สุด

4. การผสมพันธุ์ข้าว และการคัดเลือกต้นข้าวด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย เพื่อให้ได้สายพันธุ์ กข 6 ต้นเดียว

5. การผสมระหว่างสายพันธุ์ กข 6 ต้นเดียว กับ สายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสง เพื่อผลิตสายพันธุ์ กข 6 ต้นเดียวไม่ไวต่อช่วงแสง

6. การศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของอัลลีล *Sd1/sd1* ในข้าวโดยใช้ target marker

รายละเอียดของผลการทดลองทั้ง 6 การทดลองมีดังนี้

1. การหา target marker ที่เฉพาะกับอัลลีลด้วย *sd1* เพื่อใช้คัดเลือกหาต้นข้าวที่มีอัลลีลด้วย *sd1*

1.1 การออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะกับอัลลีล *Sd1/sd1* และการคัดเลือกไพรเมอร์

เนื่องจาก Monna *et al.* (2002) รายงานว่าอัลลีลเด่นของ *Sd1* มี 2,743 คู่เบส ประกอบด้วย 3 เอกซอน (exon) ที่มีจำนวนเบส 558 318 และ 291 คู่ ตามลำดับ และ 2 อินทรอน (intron) ที่มีจำนวนเบส 105 และ 1,471 คู่ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างอัลลีลเด่น *Sd1* กับลำดับเบสของอัลลีลด้วย *sd1* พบว่าอัลลีลด้วย *sd1* มีเบสขาดหายของเบสจำนวน 383 คู่ โดยเริ่มจากช่วงกลางของเอกซอน 1 จำนวน 262 คู่ ในอินทรอน 1 ขาดจำนวน 105 คู่ และช่วงต้นของเอกซอน 2 ขาดจำนวน 16 คู่ ทำให้เกิด stop codon หลังบริเวณที่ขาดหายไป จึงทำให้การแปลรหัสหยุดลงก่อนที่จะถึง stop codon เดิม มีผลทำให้โปรตีนที่ผลิตได้ไม่ทำหน้าที่ (nonfunctional protein) (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 แสดงลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวพันธุ์ Nipponbare มี 2,743 คู่เบส ประกอบด้วย 3 เอกซอน (exon) และ 2 อินทรอน (intron) คือเอกซอน 1-3 ที่มีเบสจำนวน 558 (สีชมพูและตัวอักษรพิมพ์ใหญ่), 318 (สีเขียวตัวและอักษรพิมพ์ใหญ่) และ 291 คู่ (สีน้ำตาลและตัวอักษรพิมพ์ใหญ่) ตามลำดับ และอินทรอน 1-2 มีเบสจำนวน 105 (สีดำและตัวอักษรพิมพ์เล็ก) และ 1,471 คู่ (สีน้ำเงินและตัวอักษรพิมพ์เล็ก) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* กับลำดับเบสของอัลลีลด้อย *sd1* พบว่าอัลลีลด้อย *sd1* มีเบสขาดหายของเบสจำนวน 383 คู่ (แสดงด้วยอักษรตัวเอียง) โดยเริ่มจากช่วงกลางของเอกซอน 1 (สีชมพู) จำนวน 262 คู่ ในอินทรอน 1 (สีดำ) จำนวน 105 คู่ และช่วงต้นของเอกซอน 2 (สีเขียว) จำนวน 16 คู่ ตามลำดับ

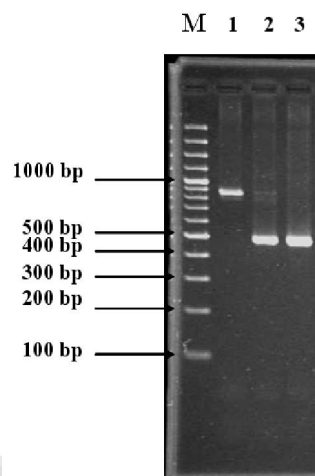
ดังนั้นการออกแบบไพรเมอร์ทำโดยนำลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวพันธุ์ Nipponbare (Genebank Acc. No.: AF465255) มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์โดยใช้โปรแกรม Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) โดยให้ forward primer และ reverse primer ขนานอยู่ทั้งสองข้างของเบสที่ขาดหายไปของอัลลีลด้อย *sd1* ได้ไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 10 คู่ (ตาราง 1) ต่อจากนั้นนำไพรเมอร์มาคัดเลือก เพื่อหาไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างของอัลลีลเด่น *Sd1* ออกจากอัลลีลด้อย *sd1* ทำโดยนำไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้มาทำพีซีอาร์ โดยมีดีเอ็นเอข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 F_1 (กข 6 x กข 1) และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 เป็นแม่พิมพ์ ผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์ sd1MW3F/3R ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอของข้าว กข 6 F_1 (กข 6 x กข 1) และ กข 1 เพียงแถบเดียวมีขนาด 873 คู่เบส 490 คู่เบส และ 490 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 2) ซึ่งขนาดของแถบดีเอ็นเอเหล่านี้ใกล้เคียงกับที่โปรแกรม Primer3 คำนวณไว้ แต่เมื่อใช้ sd1MW3F/3R เป็นไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์หลายๆ ครั้ง พบว่าการเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 873 คู่เบสของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 ไม่ได้เกิดทุกครั้ง เพราะบางครั้งก็ไม่เกิด ส่วน F_1 แทนที่จะเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ คือแถบหนึ่งควรมีขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 และอีกแถบหนึ่งควรจะเท่ากับแถบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 1 แต่ผลการทดลองพบว่าทุกครั้งที่ทำพีซีอาร์โดยใช้ดีเอ็นเอของต้น F_1 เป็นแม่พิมพ์มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นเพียง 1 แถบ และมีขนาดเท่ากับ 490 คู่เบสซึ่งเท่ากับแถบของข้าวพันธุ์ กข 1 ดังนั้นไพรเมอร์ sd1MW3F/3R จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างยีนในไทป์ *Sd1sd1* จากยีนในไทป์ *sd1sd1* ได้ จึงต้องออกแบบไพรเมอร์ใหม่ที่เฉพาะกับอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวพันธุ์ กข 6

1.2 การตรวจสอบความถูกต้องของไพรเมอร์ที่เฉพาะกับอัลลีล *Sd1/sd1*

ถึงแม้ว่าคัดเลือกได้ไพรเมอร์ sd1MW3F/3R ที่ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 (ภาพที่ 2) เพื่อความถูกต้องว่า เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่นี้แล้วขึ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้นั้น เป็นส่วนหนึ่งของอัลลีล *Sd1/sd1* จึงนำผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวทั้ง 2 พันธุ์ไปหาลำดับเบส ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 หาลำดับเบสได้จำนวน 834 คู่ (ภาพที่ 3) และผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 หาลำดับเบสได้จำนวน 451 คู่ (ภาพที่ 4) ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ไพรมเมอร์ที่ออกแบบให้เฉพาะกับอัลลีล *Sd1/sd1* จำนวน 10 คู่ที่ออกแบบโดยใช้โปรแกรม Primer3 และมีลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* จากข้าวต้นสูงพันธุ์ Nipponbare (Genebank Acc. No.: AF465255) เป็นแม่พิมพ์

order	primer name	primer sequence 5' ----->3'	melting	PCR	chromosome No.
			temperature (C°)	product size (bp)	
1	sd1MW1F	CTGAGGATGGAGCCCAAGAT	56.0	323	1
	sd1MW1R	ATGGCGGGTAGTAGTTGCAC	55.0		
2	sd1MW2F	CACCGCCCATGGACTC	54.5	604	1
	sd1MW2R	TCGAAGCAGAGGAGAACAGAG	54.8		
3	sd1MW3F		55.0	490	1
	sd1MW3R		54.9		
4	sd1MW4F	TCAACACAGCGCTCACTTCT	54.7	535	1
	sd1MW4R	GTCCTGGAGGAGGATGGTG	55.4		
5	sd1MW5F	GCTCGTCTTCTCCCCTGTTA	59.4	2,655	1
	sd1MW5R	GTACAGCGGTAGGGTCCAAA	59.9		
6	sd1MW6F	GGGTCATTGATTGACCATC	60.1	2,790	1
	sd1MW6R	AGAGAGAAGCCCAACCAAC	60.6		
7	sd1MW7F	TAGAACGCGTCACGTAATGG	59.7	3,066	1
	sd1MW7R	CTATCGGACAAAGCGGATTC	59.6		
8	sd1MW8F	ACGGGTTCTTCCAGGTGTC	59.9	525	1
	sd1MW8R	AGTGGGGCATTCCATTGTT	60.1		
9	sd1MW9F	ACGGGTTCTTCCAGGTGTC	59.9	829	1
	sd1MW9R	ATGTCGGGGGAGATCCATA	60.1		
10	sd1MW10F	ACGGGTTCTTCCAGGTGTC	59.9	866	1
	sd1MW10R	CTTACATGGCGTCGTCACAC	60.1		



ภาพที่ 2 ภาพถ่ายเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอจาก ผลผลิตพีซีอาร์ เมื่อใช้ sd1MW3F/3R เป็นไพรเมอร์ และมีดีเอ็นเอแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอ ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 ที่มีอีโนไทป์เป็น Sd1Sd1 F₁ (กข 6 x กข 1) มีอีโนไทป์เป็น Sd1sd1 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 มีอีโนไทป์เป็น sd1sd1 สัญลักษณ์กำกับ M คือ แถบ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลขที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอของผลผลิตของพีซีอาร์ของ ข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 เลขที่ 2 คือ แถบดีเอ็นเอของผลผลิตของ พีซีอาร์ของ F₁ (กข 6 x กข 1) และเลขที่ 3 คือ แถบดีเอ็นเอของผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1

```
>RD6sd1MW3F/3R (sd1MW3F).esd 834 MegaBACE
CGGGGGGCCCCNGGGGGGCTGCACGCGCTCTGGCGCGCGCCGCGCTCGACGG
CGCCAGCGACTTCTTCCGCGCTCCCGCTCGCCGAGAAGCGCCGCGCGCGCCGCG
GTCCCGGGCACCGTGTCCGGCTACACGAGCGCCACGCGGACCGCTTCGCGCT
CCAAGCTCCCATGGAAGGAGACCTCTCCTTCGGCTTCACGACCGCGCGCGCC
GCCCCCGTCGTCGCGGACTACTTCTCCAGCACCTCGGCCCCGACTTCGCGCC
AATGGGGTAATTAACGATGGTGGACGACATTGCATTCAAATTCAAAACAAAT
TCAAAACACACCGACCGAGATTATGCTGAATTCAAACGCGTTTGTGCGCGCAGG
AGGGTGTACAGAAAGTACTGCGAGGAGATGAAGGAGCTGTGCTGACGATCAT
GGAATCCTGGAGCTGAGCCTGGGCGTGGAGCGAGGCTACTATAGGGAGTTCT
TCGCGGACAGCAGCTCAATCATGCGGTTGCAACTACTACCCGCCATGCCCGGA
GCCGGAGCGGACGCTCGGCACGGGCCCCGCACTGCGACCCACCGCCTCACCA
TCCTCCTCCAGGACGACGTCGGCGGCGCTCGAGGGTCCCTGCTCGGACGGCGG
AATGGCGCCCCCGTCAGGCCCCGTCCCGGGCGCATGGTCATCAACATCGG
GCGAATTCATGGGTAAACCATCTTCTATTCTCCTCCTCTGTTCTCCTCTG
CTTCGAACAACAGAACNAGTTATTCAGGCTTTTTTCTCTTCGCGCAAATTGAG
AAAATAACTGGTAGGGCGGGTTTCATGAAACGAAAACAA
```

ภาพที่ 3 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์จำนวน 834 คู่เมื่อใช้ดีเอ็นเอของข้าวต้น สูงพันธุ์ กข 6 เป็นแม่พิมพ์ และมี sd1MW3F/3R เป็นไพรเมอร์

```
>RD1sd1MW3F/3R (sd1MW3F) .esd 451 MegaBACE
ATNGNTCGTCGCTGACGATCATGGAACCTCCTGGAGCTGAGCCTGGGCGTGAGCGA
GGCTACTATAGGGAGTTCTTCGCGGACAGCAGCTCAATCATGCGGTGCAACTACTA
CCCCCATGCCCCGAGCCGGAGCGGACGCTCGGCACGGGCCCGCACTGCGACC
CCACCGCCCTCACCATCCTCCTCCAGGACGACGTCGGCGGCCCTCGAGGTCCTCGT
CGACGGCGAATGGCGCCCCGTGAGCCCCGTCCCCGGCGCCATGGTCATCAACAT
CGGCGACACCTTCATGGTAAACCATCTCCTATTCTCCTCTCCTCTGTTCTCCTCTGC
TTGGAAGCAACAGAACAAGTAATTCAAAGCTTTTTTTTCTCTCGCGCGCGAAATTGA
CGAGAAAAATAGATCGTGGTAGGGGCGGGGCTTTCCTGAAGCGGGAAAAACGACT
TGAAGTATA
```

ภาพที่ 4 ผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์จำนวน 451 คู่ เมื่อใช้ดีเอ็นเอของข้าว
ต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 เป็นแม่พิมพ์ และมี sd1MW3F/3R เป็นไพรเมอร์

ต่อจากนั้นนำลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และผลผลิต
พีซีอาร์ของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 ที่หาลำดับเบสได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของอัลลีลเด่น
Sd1 ของข้าวพันธุ์ Nipponbare (Genebank Acc. No.: AF465255) โดยใช้โปรแกรม BLAST 2
SEQUENCES (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>) พบว่าลำดับเบสของข้าว
ต้นสูงพันธุ์ กข 6 เหมือนกับลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวพันธุ์ Nipponbare (Genebank
Acc. No.: AF465255) คิดเป็น 97 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5) ดังนั้นไพรเมอร์ sd1MW3F/3R สามารถ
เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของอัลลีลเด่น *Sd1* ส่วนการเปรียบเทียบลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ของข้าว
ต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 เมื่อใช้ sd1MW3F/3R เป็นไพรเมอร์ พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับลำดับเบส
ของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวต้นสูงพันธุ์ Nipponbare (Genebank Acc. No.: AF465255) คิดเป็น
98 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 6) แสดงว่าไพรเมอร์ sd1MW3F/3R สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ
อัลลีลด้วย *sd1* ในข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 ได้เช่นเดียวกัน

Score = 1183 bits (615), Expect = 0.0 Identities = 723/745 (97%), Gaps = 14/745 (1%) Strand=Plus/PI

<i>Sd1</i> of RD6	25	CGCTCTGGCGCGCGCGCGCTCGACGGCGCCAGCGACTTCTTCGGCTCCCGCTCGCCGA	84
<i>Sd1</i> of Nipponbare	315	CGCTCTGGCGCGCGCGCGCTCGACGGCGCCAGCGACTTCTTCGGCTCCCGCTCGCCGA	374
<i>Sd1</i> of RD6	85	GAAGCGCGCGCGCGCGCGCTCCCGGGCACCGTGTCCGGCTACACAGCGCCACGCCGA	144
<i>Sd1</i> of Nipponbare	375	GAAGCGCGCGCGCGCGCGCTCCCGGGCACCGTGTCCGGCTACACAGCGCCACGCCGA	434
<i>Sd1</i> of RD6	145	CGGCTTCGGCTCCAAGCTCCCATGGAAGGAGACCGCTCTCCTTCGGCTTCACGACCGCGC	204
<i>Sd1</i> of Nipponbare	435	CGGCTTCGGCTCCAAGCTCCCATGGAAGGAGACCGCTCTCCTTCGGCTTCACGACCGCGC	494
<i>Sd1</i> of RD6	205	CGCGCGCGCGCTCGTCCGCGACTACTTCTCCAGCACCGCTCGGCGCGGACTTCGGGCAAT	264
<i>Sd1</i> of Nipponbare	495	CGCGCGCGCGCTCGTCCGCGACTACTTCTCCAGCACCGCTCGGCGCGGACTTCGGGCAAT	554
<i>Sd1</i> of RD6	265	GGGGTAATTAAAAAGATGCTGGACGACATTGCATTTCAAATTCAAAACAAATTCAAAACA	324
<i>Sd1</i> of Nipponbare	555	GGGGTAATTAAAAAGATGCTGGACGACATTGCATTTCAAATTCAAAACAAATTCAAAACA	614
<i>Sd1</i> of RD6	325	CACCGACCGAGATTATGCTGAATTCAAACGCGTTTGTGCGCGCAGGAGGTGTACAGAA	384
<i>Sd1</i> of Nipponbare	615	CACCGACCGAGATTATGCTGAATTCAAACGCGTTTGTGCGCGCAGGAGGTGTACAGAA	674
<i>Sd1</i> of RD6	385	GTACTGCGAGGAGATGAAGGAGCTGTGCTGACGATCATGGAATCCTTGAGCTGAGCCT	444
<i>Sd1</i> of Nipponbare	675	GTACTGCGAGGAGATGAAGGAGCTGTGCTGACGATCATGGAATCCTTGAGCTGAGCCT	734
<i>Sd1</i> of RD6	445	GGCGCTGGAGCGAGGCTACTATAGGGAGTTCCTCGCGACAGCAGCTCAATCATGCGGT	504
<i>Sd1</i> of Nipponbare	735	GGCGCTGGAGCGAGGCTACTATAGGGAGTTCCTCGCGACAGCAGCTCAATCATGCGG-T	793
<i>Sd1</i> of RD6	505	GCAACTACTACCGCCATGCCCGGAGCCGGAGCGGACGCTCGGCACGGGCCCCGACTGCG	564
<i>Sd1</i> of Nipponbare	794	GCAACTACTACCGCCATGCCCGGAGCCGGAGCGGACGCTCGGCACGGGCCCCGACTGCG	853
<i>Sd1</i> of RD6	565	ACCCACCG-CCTCACCATCCTCTCCAGGACGAGCTCGGCGGCTTCGAGGTCCTCTGT	623
<i>Sd1</i> of Nipponbare	854	ACCCACCGCCTCACCATCCTCTCCAGGACGAGCTCGGCGGCTTCGAGG--TCCTCTGT	911
<i>Sd1</i> of RD6	624	CGGACGGCGGAATGGCGCCCCGTGAGGCCCCGTCCCCGGCGCCATGTCATCAACATC	683
<i>Sd1</i> of Nipponbare	912	C-GACGGC-GAATGGC-CCCCGTCA-GCCCCGTCCCC-GGCGCCATGTCATCAACATC	966
<i>Sd1</i> of RD6	684	GG-GCGAATTTCATGGCTAAACCATCTTCTAATCTCCTCCTCTCTCTCTCTCTCTCT	742
<i>Sd1</i> of Nipponbare	967	GGCGACACCTTCAT-GGTAAACCATCTCTAATCTCCT-CTCCTCTCTCTCTCTCTCTCT	1023
<i>Sd1</i> of RD6	743	TCGAA-CAACAGAACNAGTATTCA	766
<i>Sd1</i> of Nipponbare	1024	TCGAAGCAACAGAACAGTAAITCA	1048

ภาพที่ 5 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสที่หาได้จากผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 เมื่อใช้ sd1MW3F/3R เป็นไพรเมอร์ กับลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวพันธุ์ Nipponbare (Genebank Acc.No.: AF465255) โดยใช้โปรแกรม BLAST2 SEQUENCES พบว่าลำดับเบสผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 เหมือนกับลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวต้นสูงพันธุ์ Nipponbare (Genebank Acc. No.: AF465255) คิดเป็น 97 เปอร์เซ็นต์

Score = 714 bits (371), Expect = 0.0 Identities = 412/417 (98%), Gaps = 3/417 (0%) Strand=Plus/Plus

<i>sd1</i> of RD1	8	GTGCTGACGATCATGGAACCTCTGGAGCTGAGCCTGGGCGTG-AGCGAGGCTACTATAG	66
<i>Sd1</i> of Nipponbare	699	GTGCTGACGATCATGGAACCTCTGGAGCTGAGCCTGGGCGTGAGCGAGGCTACTACAG	758
<i>sd1</i> of RD1	67	GGAGTTCCTCGCGGACAGCAGCTCAATCATGCGGTGCAACTACTACCCGCCATGCCCCGA	126
<i>Sd1</i> of Nipponbare	759	GGAGTTCCTCGCGGACAGCAGCTCAATCATGCGGTGCAACTACTACCCGCCATGCCCCGA	818
<i>sd1</i> of RD1	127	GCCGGAGCGGACGCTCGGCACGGGCCCGCACTGCGACCCACCGCCCTCACCATCTCTCT	186
<i>Sd1</i> of Nipponbare	819	GCCGGAGCGGACGCTCGGCACGGGCCCGCACTGCGACCCACCGCCCTCACCATCTCTCT	878
<i>sd1</i> of RD1	187	CCAGGACGACGTCGGCGGCTCGAGTCTCTGTCGACGGCGAATGGCGCCCCGTCAGCCC	246
<i>Sd1</i> of Nipponbare	879	CCAGGACGACGTCGGCGGCTCGAGTCTCTGTCGACGGCGAATGGCGCCCCGTCAGCCC	938
<i>sd1</i> of RD1	247	CGTCCCGGCGCCATGCTCATCAACATCGGCGACACCTTCATGGTAAACCATCTCTTATT	306
<i>Sd1</i> of Nipponbare	939	CGTCCCGGCGCCATGCTCATCAACATCGGCGACACCTTCATGGTAAACCATCTCTTATT	998
<i>sd1</i> of RD1	307	CTCCTCTCTCTGTTCTCTCTGCTTCGAAGCAACAGTAATTCAAAGCTTTTTT	366
<i>Sd1</i> of Nipponbare	999	CTCCTCTCTCTGTTCTCTCTGCTTCGAAGCAACAGTAATTC-AAGCTTTTTT	1057
<i>sd1</i> of RD1	367	TTCTCTCGCGCGGAAATTGACGAGAAAAAT-AGATCGTGGTAGGGCGGGGCTTTC	422
<i>Sd1</i> of Nipponbare	1058	TTCTCTCTCGCGCGGAAATTGACGAGAAAAATAAGATCGTGGTAGGGCGGGGCTTTC	1114

ภาพที่ 6 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสที่หาได้จากผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 เมื่อใช้ *sd1*MW3F/3R เป็นไพรเมอร์เปรียบเทียบ กับลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวพันธุ์ Nipponbare (Genebank Acc.No.: AF465255) โดยใช้โปรแกรม BLAST2 SEQUENCES พบว่าลำดับเบสจากผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 เหมือนกับลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวพันธุ์ Nipponbare (Genebank Acc. No.: AF465255) คิดเป็น 98 เปอร์เซ็นต์

1.3 การออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะกับอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6

เนื่องจากเมื่อทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ *sd1*MW3F/3R โดยมีดีเอ็นเอของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 เป็นแม่พิมพ์ พบว่าบางครั้งเกิด/บางครั้งไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ จึงสันนิษฐานว่าการจับกันอย่างคู่สม (anneal) ระหว่างเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 กับลำดับเบสของไพรเมอร์ *sd1*MW3F/3R ได้ไม่ดี จึงต้องทำการออกแบบไพรเมอร์ให้สามารถเพิ่มขึ้นดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงกับอัลลีลเด่น *Sd1* เท่านั้น การออกแบบไพรเมอร์ทำโดย นำลำดับเบสที่หาจากผลผลิตพีซีอาร์ที่มี ดีเอ็นเอของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 (ภาพที่ 5) และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 (ภาพที่ 6) เป็นแม่พิมพ์ และมี *sd1*MW3F/3R เป็นไพรเมอร์ มาเปรียบเทียบกัน ต่อจากนั้นนำลำดับเบสของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 ที่ไม่ซ้ำกับลำดับเบสของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 มาใช้เป็นแม่พิมพ์ในการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ ดังนั้น forward primer และ reverse primer เฉพาะอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวพันธุ์ กข 6 เท่านั้น คือออกแบบให้ไพรเมอร์อยู่ในบริเวณที่มีลำดับเบสเฉพาะในอัลลีลเด่น *Sd1*

แต่ไม่มีลำดับเบสในอัลลิลด้วย *sd1* เนื่องจากอัลลิลด้วย *sd1* มีการขาดหายไปของเบสจำนวน 383 คู่ คือ ตั้งแต่โดยเริ่มจากช่วงกลางของเอกซอน 1 มีเบสขาดหาย 262 คู่ (สีชมพู) ในอินทรอน 1 มีเบสขาดหาย 105 คู่ (สีดำ) และช่วงต้นของเอกซอน 2 มีเบสขาดหาย 16 คู่ (สีเขียว) ตามลำดับ (ภาพที่ 1) ดังนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะกับอัลลิลเด่น *Sd1* ในบริเวณนี้โดยใช้โปรแกรม Primer3 ในการออกแบบได้ไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 2 คู่ คือ RD6Sd1MW1F/1R และ RD6Sd1MW3F/3R (ตาราง 2)

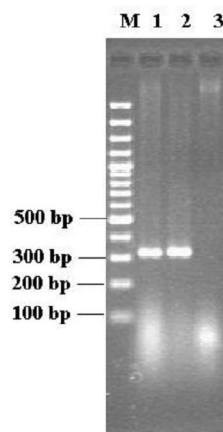
ตาราง 2 ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ที่ได้จากการออกแบบเพื่อให้เฉพาะกับอัลลิลเด่น *Sd1* ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6

order	primer name	primer sequence 5' ----->3'	melting	PCR product size (bp)	chromosome No.
			temperature (C°)		
1	RD6Sd1MW1F		60.6	327	1
	RD6Sd1MW1R		60.6		
2	RD6Sd1MW3F	CACCGTGTCCGGCTACAC	61.1	245	1
	RD6Sd1MW3R	CGCGTTTGAATTCAGCATAA	59.8		

เมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาทำพีซีอาร์โดยใช้ดีเอ็นเอข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6, F_1 (กข 6 x กข 1) และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 เป็นแม่พิมพ์ พบว่าไพรเมอร์ RD6Sd1MW1F/1R ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอเฉพาะเมื่อใช้ดีเอ็นเอของข้าวต้นสูง กข 6 และ F_1 (กข 6 x กข 1) เป็นแม่พิมพ์เท่านั้น แต่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอเมื่อใช้ดีเอ็นเอของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 เป็นแม่พิมพ์ แถบดีเอ็นเอของทั้งข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และ F_1 มีขนาดเท่ากับ 327 คู่เบส โดยมีแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเพียงแถบเดียว และมีขนาดใกล้เคียงกับที่โปรแกรม Primer3 คำนวณไว้ (ภาพที่ 7)

เมื่อส่งผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 ที่ใช้ไพรเมอร์ RD6Sd1MW1F/1R ไปหาลำดับเบสได้จำนวน 272 คู่ (ภาพที่ 8) และเมื่อนำลำดับเบสที่หาได้นี้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของอัลลิลเด่น *Sd1* ของข้าวพันธุ์ Nipponbare (Genbank Acc. No.: AF465255) โดยใช้โปรแกรม BLAST 2 SEQUENCES (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) พบว่าลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 เหมือนกับลำดับเบสของอัลลิลเด่น *Sd1* ของข้าวพันธุ์ Nipponbare (Genbank Acc. No.: AF465255) คิดเป็น 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 9) ดังนั้นไพรเมอร์ RD6Sd1MW1F/1R สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่เฉพาะกับอัลลิลเด่น

Sd1 ในข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 เพราะทำการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอเฉพาะอัลลีลเด่น *Sd1* เท่านั้น แต่ไพรเมอร์ RD6*Sd1*MW1F/1R ไม่สามารถแยกยีนในไทป์ *Sd1Sd1* ออกจากยีนในไทป์ *Sd1sd1* ได้ เพราะ RD6*Sd1*MW1F/1R ให้แถบดีเอ็นเอที่เท่ากันระหว่าง กข 6 กับ F_1 โดยมีขนาดของแถบดีเอ็นเอเป็น 327 คู่เบส (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 แสดงตัวอย่างภาพถ่ายเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอของผลผลิตของพีซีอาร์ เมื่อใช้ RD6*Sd1*MW1F/1R เป็นไพรเมอร์ที่เฉพาะกับอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 โดยดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่ใช้ คือ ดีเอ็นเอของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 มียีนในไทป์เป็น *Sd1Sd1* F_1 (กข 6 x กข 1) มียีนในไทป์เป็น *Sd1sd1* และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 มียีนในไทป์เป็น *sd1sd1* สัญลักษณ์กำกับ M คือ marker หรือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอของผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 เลนที่ 2 คือ แถบดีเอ็นเอของผลผลิตของพีซีอาร์ของ F_1 (กข 6xกข 1) และเลนที่ 3 คือเลนที่ใส่ผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอ

> RD6*Sd1*MW1F/1R (RD6*Sd1*MW1F).esd 272 MegaBACE

```
ACGGCGCGCCCCGGTCGTCGCGACTACTTCTCCAGCACCCCTCGGCCCCGACTTCG
CGCCAATGGGGTAATTAACGATGGTGGACGACATTGCATTTCAAATTCAAAACAAA
TTCAAAACACACCGACCGAGATTATGCTGAATTCAAACGCGTTTGTGCGCGCAGGAG
GGTGTACCAGAAGTACTGCGAGGAGATGAAGGAGCTGTCGCTGACGATCATGGAAC
TCCTGGAGCTGAGCCTGGGCGTGGAGCGAGGCTACTATGGGAGTC
```

ภาพที่ 8 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 เมื่อใช้ RD6*Sd1*MW1F/1R เป็นไพรเมอร์

Score = 471 bits (245), Expect = 6e-130 Identities = 254/256 (99%), Gaps = 1/256 (0%) Strand=Plus/Plus

Sd1 of RD6	10	CCCCGGTCGTCGC-GACTACTTCTCCAGCACCCCTCGGCCCCGACTTCGCGCCAATGGGGT	68
Sd1 of Nipponbare	500	CCCCGGTCGTCGCGACTACTTCTCCAGCACCCCTCGGCCCCGACTTCGCGCCAATGGGGT	559
Sd1 of RD6	69	AATTAAACGATGGTGGACGACATTGCATTCAAATCAAACAAATTCAAACACACCG	128
Sd1 of Nipponbare	560	AATTAAACGATGGTGGACGACATTGCATTCAAATCAAACAAATTCAAACACACCG	619
Sd1 of RD6	129	ACCGAGATTATGCTGAATTCAAACGCGTTTGTGCGCGCAGGAGGGTGTACCAGAAGTACT	188
Sd1 of Nipponbare	620	ACCGAGATTATGCTGAATTCAAACGCGTTTGTGCGCGCAGGAGGGTGTACCAGAAGTACT	679
Sd1 of RD6	189	GCGAGGAGATGAAGGAGCTGTGCGCTGACGATCATGGAACCTCTGGAGCTGAGCCTGGGCG	248
Sd1 of Nipponbare	680	GCGAGGAGATGAAGGAGCTGTGCGCTGACGATCATGGAACCTCTGGAGCTGAGCCTGGGCG	739
Sd1 of RD6	249	TGGAGCGAGGCTACTA	264
Sd1 of Nipponbare	740	TGGAGCGAGGCTACTA	755

ภาพที่ 9 ผลการเปรียบเทียบระหว่างลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ที่ได้จากผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 เมื่อใช้ RD6Sd1MW1F/1R เป็นไพรเมอร์ที่เฉพาะกับอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 กับลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวพันธุ์ Nipponbare (Genebank Acc. No.:AF465255) โดยใช้โปรแกรม BLAST 2 SEQUENCES พบว่าลำดับเบสของผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 เหมือนกับลำดับเบสของอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวพันธุ์ Nipponbare (Genebank Acc. No.: AF465255) คิดเป็น 99 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้น target marker ที่เฉพาะกับอัลลีลเด่น *Sd1* คือไพรเมอร์ RD6Sd1MW1F/1R โดยออกแบบให้ไพรเมอร์อยู่ในส่วนของลำดับเบสที่มีเฉพาะในอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวพันธุ์ กข 6 เพราะลำดับเบส 383 คู่นี้ขาดหายไปในอัลลีลด้อย *sd1* ในภาพที่ 10 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ RD6Sd1MW1F/1R เมื่อใช้ทำพีซีอาร์เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 327 คู่เบสเฉพาะในข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และ F_1 (กข 6 x กข 1) ส่วนในข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 7) นอกจากนี้ในภาพที่ 10 แสดง target marker ที่เฉพาะกับอัลลีลด้อย *sd1* คือ sd1MW3F/3R โดยออกแบบให้ forward primer และ reverse primer ขนาบอยู่ทั้งสองข้างของเบสที่ขาดหายไปของอัลลีลด้อย *sd1* เมื่อใช้ไพรเมอร์ sd1MW3F/3R ทำพีซีอาร์เกิดแถบดีเอ็นเอของข้าว กข 6 F_1 (กข 6xกข 1) และ กข 1 เพียงแถบเดียวมีขนาด 873 คู่เบส 490 คู่เบส และ 490 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 2)

ดังนั้นการตรวจสอบว่าข้าวต้นใดมีอีโนไทป์เป็น Sd1sd1 จำเป็นต้องใช้ทั้งไพรเมอร์ที่เฉพาะกับอัลลีลเด่น Sd1 คือ RD6Sd1MW1F/1R ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 327 คู่ และเมื่อใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะกับอัลลีลด้อย sd1 คือ sd1MW3F/3R ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 490 คู่ ส่วนต้นข้าวที่มีอีโนไทป์เป็น Sd1Sd1 จะเกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 327 คู่เบสเมื่อใช้ไพรเมอร์ RD6Sd1MW1F/1R แต่จะไม่มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นเมื่อใช้ไพรเมอร์ sd1MW3F/3R ส่วนต้นข้าวที่มีอีโนไทป์เป็น sd1sd1 จะไม่มีแถบเกิดขึ้นเมื่อใช้ไพรเมอร์ RD6Sd1MW1F/1R แต่จะมีแถบดีเอ็นเอขนาด 490 คู่เบสเมื่อใช้ไพรเมอร์ sd1MW3F/3R



>Sd1 **และ** Nipponbare (Genebank Acc.No.: AF465255) จำนวนเบส 2743 คู่

[illegible]

ภาพที่ 10 แสดงตำแหน่งของ ไพรเมอร์ RD6Sd1MW1F/1R ที่เฉพาะกับอัลลีลเด่น Sd1 ที่มี

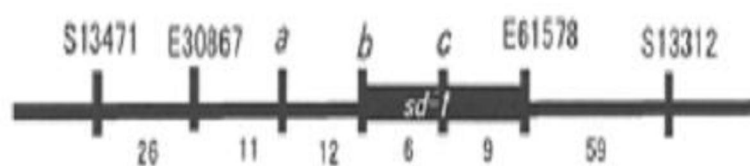
ตำแหน่งอยู่ในส่วนของลำดับเบสที่มีเฉพาะในอัลลีลเด่น *Sd1* เพราะลำดับเบส 383 คู่นี้ขาดหายไปในอัลลีลด้อย *sd1* (อักษรตัวเอียง) ส่วนของไพรเมอร์ *sd1MW3F/3R* ที่เฉพาะกับอัลลีลด้อย *sd1* ออกแบบให้ตำแหน่งของ forward primer และ reverse primer วนาอยู่ทั้งสองข้างของเบสที่ขาดหายไปของอัลลีลด้อย *sd1* (อักษรตัวเอียง)

2. การหา flanking marker 1 และ 2 ที่ขนานอยู่ทั้ง 2 ข้างของยีน *Sd1/sd1* เพื่อใช้คัดเลือกหาต้นข้าวที่มีจำนวนยีนที่ไม่ต้องการซึ่งติดมาจากพันธุ์ให้ (donor parent) น้อยที่สุด

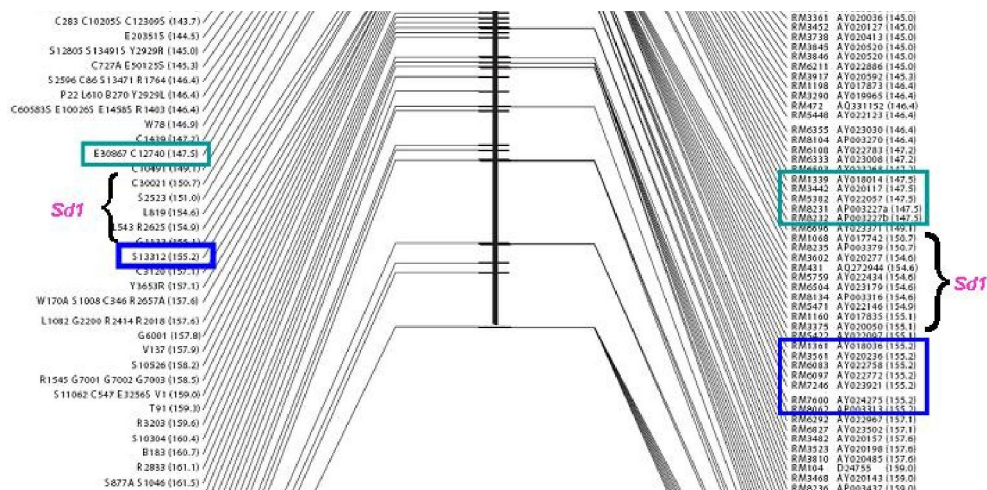
การหา flanking marker จำนวน 2 ตำแหน่ง คือ flanking marker 1 และ flanking marker 2 เพื่อใช้คัดเลือกหาต้นข้าวที่มีจำนวนของอัลลีลที่ไม่ต้องการที่ติดมาจากพันธุ์ให้ (donor parent) น้อยที่สุด มีขั้นตอนดังนี้ คือ

2.1 การหา flanking marker 1 และ 2

Monna *et al.* (2002) ทำการโคลนยีน *Sd1/sd1* โดยใช้ positional cloning และได้แสดง Genetic map of a semidwarfing gene *sd-1* ทำให้ทราบว่าอัลลีล *Sd1/sd1* ยึดติดกับ โมเลกุลเครื่องหมาย S13471, E30867, E61578 และ S13312 (ภาพที่ 11) เมื่อนำชื่อโมเลกุลเครื่องหมายเหล่านี้ไปหาดำแหน่งบนโครโมโซมที่ 1 ใน genetic and physical map ของ McCouch *et al.* (2002) พบว่าโมเลกุลเครื่องหมาย E30867 และ S13312 อยู่ที่ 147.5 cM และ 155.2 cM ตามลำดับ ต่อจากนั้นจึงหา SSR marker ที่อยู่ระหว่าง 147.5 cM- 155.2 cM พบ SSR marker ที่อยู่ตำแหน่ง 147.5 cM คือ RM1339 (147.5 cM) RM3442 (147.5 cM) RM5382 (147.5 cM) RM8231 (147.5 cM) และ RM8232 (147.5 cM) และพบ SSR marker ที่อยู่ตำแหน่ง 155.2 cM คือ RM1361 (155.2 cM) RM3561 (155.2 cM) RM6083 (155.2 cM) RM6097 (155.2 cM) RM7246 (155.2 cM) RM7600 (155.2 cM) และ RM8062 (155.2 cM) (ภาพที่ 12)



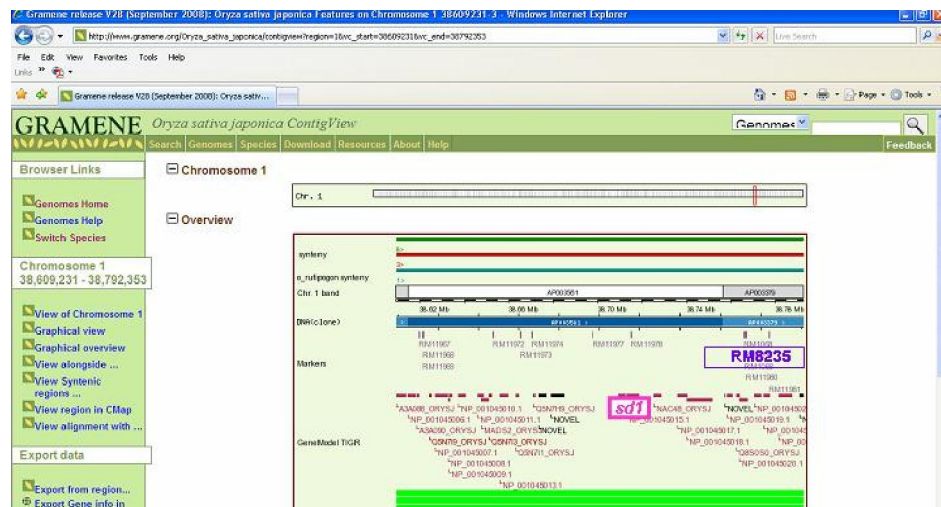
ภาพที่ 11 แสดง genetic map of a semidwarfing gene *sd-1* ทำให้ทราบว่าอัลลีล *Sd1/sd1* ยึดติด กับโมเลกุลเครื่องหมาย S13471, E30867, E61578 และ S13312 (Monna *et al.* 2002)



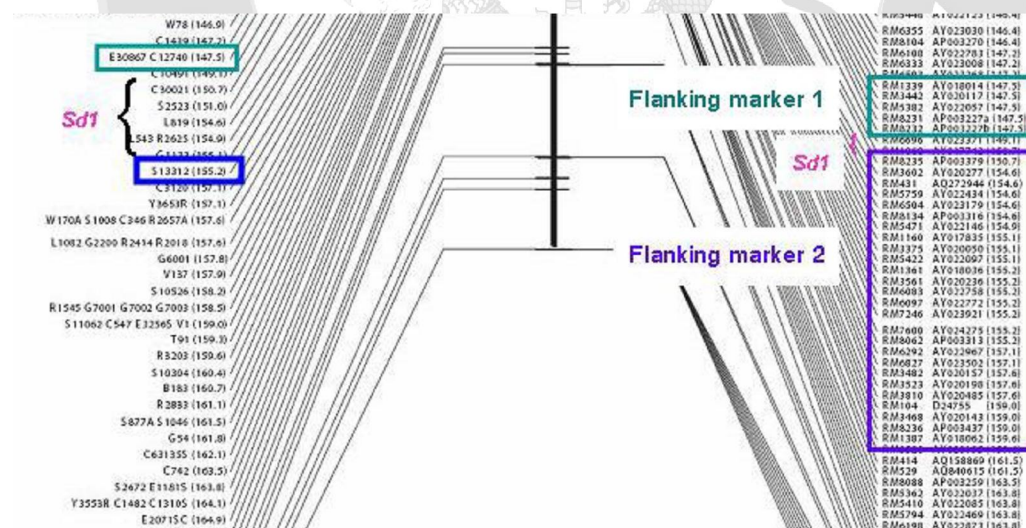
ภาพที่ 12 แสดงชื่อ และตำแหน่งของโมเลกุลเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 1 ใน genetic and physical map ของ McCouch *et al.* (2002) พบว่าโมเลกุลเครื่องหมายที่ยึดติดกับยีน *Sd1/sd1* คือ E30867 (147.5 cM) และ S13312 (155.2 cM) อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยมสีเขียว และสีน้ำเงินทางด้านซ้ายมือ ตามลำดับ ส่วน SSR marker ที่อยู่ที่ตำแหน่ง 147.5 cM และ 155.2 cM อยู่ในกรอบสี่เหลี่ยมสีเขียว และสีน้ำเงินทางด้านขวามือ ตามลำดับ

แต่เนื่องจากระยะห่างระหว่าง SSR marker ที่ขนานข้างยีน *Sd1/sd1* คือ 147.5 cM - 155.2 cM ห่างมากเกินไป จึงต้องหา SSR marker ที่อยู่ชิดกันมากขึ้น จึงค้นหาตำแหน่งของยีน *Sd1* ใน <http://www.gramene.org> พบว่ายีน *Sd1/sd1* อยู่ใกล้กับ SSR marker ชื่อ RM8235 (ภาพที่ 13) และเมื่อนำ RM8235 ไปหาตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 1 ใน genetic and physical map ของ McCouch *et al.* (2002) พบว่า RM8235 อยู่ที่ 150.7 cM สรุปว่าตำแหน่งของยีน *Sd1/sd1* อยู่ระหว่าง 147.5-150.7 cM บนโครโมโซมที่ 1 ใน genetic and physical map ของ McCouch *et al.* (2002) ดังนั้นจึงเลือก SSR marker จำนวน 5 ตำแหน่ง คือ RM1339 (147.5 cM) RM3442 (147.5 cM) RM5382 (147.5 cM) RM8231 (147.5 cM) และ RM8232 (147.5 cM) เพื่อจะใช้เป็น flanking marker 1 และ เลือก SSR marker จำนวน 10 ตำแหน่ง คือ RM8235 (150.7 cM) RM3602 (154.6 cM) RM431 (154.6 cM) RM5759 (154.6 cM) RM6504 (154.6 cM) RM3375 (155.1 cM) RM6083 (155.2 cM) RM7600 (155.2 cM) RM6827 (157.1 cM) และ RM1387 (159.6 cM) เพื่อจะใช้เป็น flanking marker 2 (ภาพที่ 14) ดังนั้นมี SSR marker จำนวน 5 ตำแหน่งอยู่ที่ 147.5 cM ใช้เป็น flanking marker 1 ส่วน SSR marker จำนวน 10

ตำแหน่งอยู่ระหว่าง 150.7 cM - 159.6 cM ใช้เป็น flanking marker 2 โดยที่ลำดับเบสของไพรเมอร์ และตำแหน่งของ SSR marker แสดงไว้ในตารางที่ 3



ภาพที่ 13 แสดงตำแหน่งของยีน *Sd1/sd1* ที่อยู่ใกล้กับ RM8235 บนโครโมโซมที่ 1 จาก http://www.gramene.org/Oryza_sativa_japonica/contigview?region=1&vc_start=38609231&vc_end=38792353



ภาพที่ 14 แสดงตำแหน่งของยีน *Sd1/sd1* และ SSR marker ที่จะใช้เป็น flanking marker 1 และ flanking marker 2 ซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 ใน genetic and physical map ของ McCouch et al. (2002)

ตารางที่ 3 ลำดับเบสของไพรเมอร์ของ SSR marker จำนวน 5 ตำแหน่งที่ใช้เป็น flanking marker 1 และอีก 10 ตำแหน่งที่ใช้เป็น flanking marker 2 ซึ่งหาได้จาก genetic and physical map ของ McCouch *et al.* (2002)

order	primer name	primer sequence 5' ----->3'	anealing temperature (C°)	PCR product size (bp)	ตำแหน่งบน chromosome no. 1
flanking marker 1					
1	RM1339F	GCGAGCACATACATCAAAGC	55	144	147.5
	RM1339R	TGTCCCGATCTGAAGAAAGG	55		
2	RM3442F	GACATACTACACTCGGTGGC	55	87	147.5
	RM3442R	CGACTTAGCACGAACATAAAC	55		
3	RM5382F	CAGGCTCCTTTTGAATTGC	55	180	147.5
	RM5382R	ATGTCTCTCCCATCAGTTCC	55		
4	RM8231F	GCGTAAGATCTCCCTACCAC	55	211	147.5
	RM8231R	CAACACATGATAGCACATGG	55		
5	RM8232F	AAACGGGTCAGCTACTAAGG	55	213	147.5
	RM8232R	ACCACGTGTGTACTCCTACC	55		
flanking marker 2					
6	RM8235F	TGCCTATTGCCTACTCACTC	55	188	150.7
	RM8235R	GATGCTGTACAGTGTCTTCG	55		
7	RM3602F	TGAAAAGCCACTCAGATGCG	55	120	154.6
	RM3602R	TGGTGAAAGGGTCAGAACTG	55		
8	RM431F	TCCTGCGAACTGAAGAGTTG	55	251	154.6
	RM431R	AGAGCAAAACCCTGGTTCAC	55		
9	RM5759F	TTAACGGTCGGGAGTCAAAG	50	77	154.6
	RM5759R	CATCGTCTTTGTCAGATGGC	50		

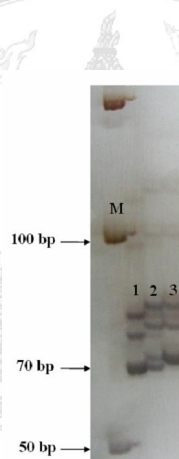
ตาราง 3 (ต่อ)

order	primer name	primer sequence 5' ----->3'	anealing		chromosome no. 1
			temperature (C°)	PCR product size (bp)	
10	RM6504F	GAGAGGCGGTAGTATGCTCG	55	116	154.6
	RM6504R	TCTCCAATTCACCGTCACC	55		
11	RM3375F	TTGACCTCCTCCTCCACAAC	54	186	155.1
	RM3375R	TTGCAAGGAACTAGGAGGG	54		
12	RM6083F	CGTAAAAGGTCCTCGTCGTC	54	131	155.2
	RM6083R	AGTAGCCTGCTCTCCATTGG	54		
13	RM7600F	GAGGATTTAATTGGGTGGGG	54	109	155.2
	RM7600R	ATCAAGGGTCGCTACACGTC	54		
14	RM6827F	GCACCGAACAATACTCTAGC	54	125	157.1
	RM6827R	CCAACCTCAACTGAAGATGC	54		
15	RM1387F	GTGGCTGGCTGATCGATC	54	198	159.6
	RM1387R	AATCAACCCAGCTACCATGC	54		

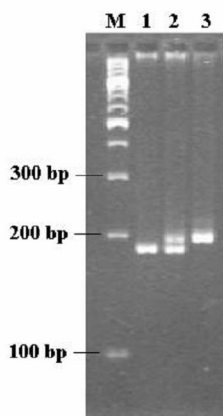
2.2 การคัดเลือก SSR marker ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1

เมื่อหา SSR marker ที่ขนานอยู่ทั้ง 2 ข้างของยีน *Sd1/sd1* ได้จากข้อ 2.1 ต่อจากนั้นทำการคัดเลือก SSR marker เหล่านั้นโดยใช้เป็นไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ โดยมีดีเอ็นเอแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 F_1 (กข 6 x กข 1) และ กข 1 ผลการทดลองพบว่าจาก SSR marker จำนวน 5 ตำแหน่งที่จะใช้เป็น flanking marker 1 มีเพียงหนึ่งตำแหน่งคือ RM1339 (147.5 cM) ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันระหว่างของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 กับของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 เมื่อตรวจสอบด้วย 6% acrylamide gel electrophoresis โดยพบว่าแถบดีเอ็นเอของ กข 6 และ กข 1 มีอย่างละ 3 แถบ แต่แถบดีเอ็นเอของ กข 1 อยู่สูงกว่าของ กข 6 ส่วนแถบดีเอ็นเอของ F_1 นั้นมี 6 แถบ และมีขนาดเท่ากับของ กข 6 และ กข 1 (ภาพ 15) เนื่องจาก RM1339 (147.5 cM) ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นถึง 3 แถบทั้งในของข้าวพันธุ์ กข 6 และ กข 1 จึงตรวจสอบข้อมูล

ใน <http://www.gramene.org> พบว่า RM1339 (147.5 cM) สามารถเพิ่มขึ้นดีเอ็นเอได้เฉพาะบนโครโมโซมที่ 1 เท่านั้น ดังนั้นจึงให้ RM1339 (147.5 cM) เป็น flanking marker 1 ส่วน SSR marker อีก 10 ตำแหน่งที่จะใช้เป็น flanking marker 2 พบว่ามีเพียง RM 3375 (155.1 cM) ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันระหว่างของข้าวพันธุ์ กข 6 และ กข 1 เมื่อตรวจสอบด้วย 4% agarose gel electrophoresis โดยพบว่าแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และ กข 1 มีเพียงอย่างละ 1 แถบ โดยที่แถบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 อยู่ต่ำกว่า กข 1 ส่วนแถบดีเอ็นเอของ F_1 นั้นมี 2 แถบ โดยมีขนาดเท่ากับของข้าวพันธุ์ กข 6 และ กข 1 (ภาพ 16) ดังนั้นจึงคัดเลือกให้ RM 3375 (155.1 cM) เป็น flanking marker 2 ดังนั้น RM1339 (147.5 cM) ถูกคัดเลือกให้เป็น flanking marker 1 และ RM 3375 (155.1 cM) ถูกคัดเลือกเป็น flanking marker 2 โดยที่ยีน *Sd1/sd1* อยู่ระหว่างโมเลกุลเครื่องหมายทั้ง 2 ตำแหน่ง



ภาพที่ 15 แสดงภาพถ่ายเจลเมื่อย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท เพื่อเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอเมื่อใช้ RM1339 (147.5 cM) เป็นไพรเมอร์ โดยมีดีเอ็นเอแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 F_1 (กข 6 x กข 1) และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 สัญลักษณ์กำกับ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 bp ladder เลนที่ 1 คือ แถบดีเอ็นเอของผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 เลนที่ 2 คือ แถบดีเอ็นเอของผลผลิตของพีซีอาร์ของ F_1 (กข 6 x กข 1) เลนที่ 3 คือ แถบดีเอ็นเอของผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1



ภาพที่ 16 แสดงตัวอย่างภาพถ่ายเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เพื่อเปรียบเทียบขนาดของ
 แถบดีเอ็นเอของผลผลิตพีซีอาร์ เมื่อใช้ RM 3375 (155.1 cM) เป็นไพรเมอร์ โดยมี
 ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ คือดีเอ็นเอของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 F_1 (กข 6 x กข 1) และข้าวต้นเตี้ย
 พันธุ์ กข 1 สัญลักษณ์กำกับ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือ
 แถบดีเอ็นเอของผลผลิตของพีซีอาร์ของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 เลนที่ 2 คือ แถบดีเอ็นเอ
 ของผลผลิตของพีซีอาร์ของ F_1 (กข 6 x กข 1) เลนที่ 3 คือ แถบดีเอ็นเอของผลผลิตของ
 พีซีอาร์ของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1

3. การหา background marker ที่กระจายอยู่บนโครโมโซมทั้ง 12 แท่ง เพื่อใช้ตรวจหาต้นข้าวที่เปอร์เซ็นต์อีโนไทป์เหมือนกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มากที่สุด

การหา และการคัดเลือก background marker ที่กระจายอยู่บนโครโมโซมทั้ง 12 แท่ง เพื่อใช้ตรวจหาต้นข้าวที่เปอร์เซ็นต์อีโนไทป์เหมือนกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มากที่สุดมีขั้นตอนดังนี้

3.1 การหา background marker

การคัดเลือก background marker ทำโดยเลือก SSR marker ทั้งหมด 152 ตำแหน่งที่กระจายอยู่ทั่วโครโมโซมทั้ง 12 แท่ง จาก Genetic : Rice-Cornell SSR 2001 และ QTL:Rice-TKU Integrated QTL 2002 (http://www.gramene.org/db/cmap/map_search) เมื่อนำ SSR marker ที่คัดเลือกได้ ซึ่งมีระยะห่างกันเฉลี่ยประมาณ 12.7 cM จำนวน SSR marker บนโครโมโซมที่ 1-12 มีจำนวนเท่ากับ 11 12 11 9 12 28 19 8 10 9 11 และ 12 ตำแหน่งตามลำดับ ซึ่งชื่อของ SSR marker และตำแหน่งของ SSR marker มีดังต่อไปนี้

โครโมโซมที่ 1 มี SSR marker จำนวน 11 ตำแหน่ง ได้แก่ RM220 (28.4 cM) RM490 (51 cM) RM24 (78.4 cM) RM493 (79.7 cM) RM9 (92.4 cM) RM306 (98.1 cM) RM488 (101.47 cM) RM11995 (144.4 cM) RM302 (147.8 cM) RM102 (152.2 cM) และ RM104 (186.6 cM)

โครโมโซมที่ 2 มี SSR marker จำนวน 12 ตำแหน่ง ได้แก่ RM279 (17.3 cM) RM341 (82.7 cM) RM262 (90.2 cM) RM475 (92.5 cM) RM263 (127.5 cM) RM6 (154.7 cM) RM112 (166 cM) RM250 (170.1 cM) RM166 (183 cM) RM207 (191.2 cM) RM535 (195.7 cM) และ RM138 (196.8 cM)

โครโมโซมที่ 3 มี SSR marker จำนวน 11 ตำแหน่ง ได้แก่ RM22 (11 cM) RM231 (15.7 cM) RM7 (64 cM) RM218 (67.8 cM) RM232 (76.7 cM) RM16 (131.5 cM) RM168 (171.2 cM) RM130 (208.2 cM) RM442 (224.2 cM) RM227 (229.7 cM) และ RM85 (231 cM)

โครโมโซมที่ 4 มี SSR marker จำนวน 9 ตำแหน่ง ได้แก่ RM307 (0 cM) RM335 (21.5 cM) RM185 (50.8 cM) RM252 (99 cM) RM470 (115.5 cM) RM303 (116.9 cM) RM255 (120.8 cM) RM124 (150.1 cM) และ RM280 (152.3 cM)

โครโมโซมที่ 5 มี SSR marker จำนวน 12 ตำแหน่ง ได้แก่ RM413 (26.7 cM) RM13 (28.6 cM) RM249 (36.6 cM) RM437 (43.4 cM) RM289 (56.7 cM) RM169 (57.9 cM) RM164 (78.7 cM) RM161 (96.9 cM) RM26 (118.8 cM) RM473 (120.2 cM) RM274 (126.6 cM) และ RM334 (141.8 cM)

โครโมโซมที่ 6 มี SSR marker จำนวน 28 ตำแหน่ง ได้แก่ RM170 (2.2 cM) Glu-23 (22.1 cM) RM217 (23.8 cM) RM204 (25.1 cM) RM225 (26.2 cM) RM314 (33.6 cM) RM276 (40.3 cM) RM5850 (53 cM) RM7311 (53 cM) RM5963 (53.5 cM) RM6302 (53.5 cM) RM1925 (53.8 cM) RM6162 (53.8 cM) RM6836 (54.1 cM) RM8225 (54.1 cM) RM8226 (54.1 cM) RM8227 (54.1 cM) RM8238 (54.1 cM) RM527 (61.2 cM) RM3330 (61.6 cM) RM8250 (61.6 cM) RM217 (68 cM) RM30 (74.3 cM) RM541 (75.5 cM) RM162 (108.3 cM) RM340 (133.5 cM) RM412 (142.4 cM) และ RM103 (143.7 cM)

โครโมโซมที่ 7 มี SSR marker จำนวน 19 ตำแหน่ง ได้แก่ RM436 (0 cM) RM214 (34.7 cM) RM432 (43.5 cM) RM11 (47 cM) RM560 (54.2 cM) RM7110 (56.2 cM) RM1135 (57.5 cM) RM182 (61 cM) RM10 (63.5 cM) RM455 (65.7 cM) RM234 (88.2 cM) RM18 (90.4 cM) RM248 (99.7 cM) RM5720 (115.5 cM) RM1306 (116.1 cM) RM1357 (116.1 cM) RM1362 (116.1 cM) RM7601 (116.6 cM) และ RM82 (128.9 cM)

โครโมโซมที่ 8 มี SSR marker จำนวน 8 ตำแหน่ง ได้แก่ RM152 (9.4 cM) RM310 (57 cM) RM42 (78.4 cM) RM515 (80.5 cM) RM210 (90.3 cM) RM458 (124.6 cM) RM264 (128.6 cM) และ RM281 (128.6 cM)

โครโมโซมที่ 9 มี SSR marker จำนวน 10 ตำแหน่ง ได้แก่ RM285 (1.8 cM) RM444 (3.3 cM) RM219 (11.7 cM) RM566 (47.7 cM) RM257 (66.1 cM) RM242 (73.3 cM) RM288 (74.6 cM) RM278 (77.5 cM) RM107 (82.4 cM) และ RM160 (85.4 cM)

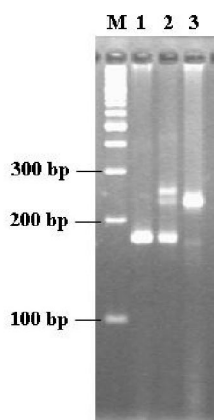
โครโมโซมที่ 10 มี SSR marker จำนวน 9 ตำแหน่ง ได้แก่ RM216 (17.6 cM) RM171 (55.8 cM) RM271 (59.4 cM) RM269 (69.6 cM) RM304 (73 cM) RM228 (87.6 cM) RM147 (99.8 cM) RM496 (113 cM) และ RM591 (118.3 cM)

โครโมโซมที่ 11 มี SSR marker จำนวน 11 ตำแหน่ง ได้แก่ RM167 (37.5 cM) RM202 (54 cM) RM287 (68.6 cM) RM209 (73.9 cM) RM21 (85.7 cM) RM473 (95.6 cM) RM206 (102.9 cM) RM254 (110 cM) RM224 (120.1 cM) RM144 (123.2 cM) และ pTA248

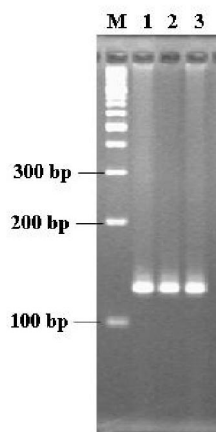
โครโมโซมที่ 12 มี SSR marker จำนวน 12 ตำแหน่ง ได้แก่ RM20 (3.2 cM) RM4 (5.2 cM) RM19 (20.9 cM) RM247 (32.3 cM) RM7102 (48.9 cM) RM101 (49.5 cM) RM155 (57.2 cM) RM277 (57.2 cM) RM3326 (73.3 cM) RM270 (91.3 cM) RM235 (101.8 cM) และ RM17 (109.1 cM)

3.2 การคัดเลือก background marker ที่เกิด polymorphism ระหว่างข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1

การคัดเลือก background marker ทำโดยนำ SSR marker ทั้งหมด 152 ตำแหน่งที่กระจายอยู่ทั่วโครโมโซมทั้ง 12 แท่ง (จากข้อ 3.1) มาใช้เป็นไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 F_1 และ กข 1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ต่อจากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์มาแยกขนาดด้วยเจล เพื่อคัดเลือก SSR marker ที่ให้แถบดีเอ็นเอมีขนาดที่แตกต่างกัน (polymorphism) ระหว่างข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 (ภาพที่ 17) ส่วน SSR marker ที่แถบดีเอ็นเอของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 มีขนาดไม่แตกต่างกัน (monomorphism) (ภาพที่ 18) ไม่ถูกคัดเลือก ดังนั้นเฉพาะ SSR marker ที่สามารถตรวจพบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 เท่านั้นที่ถูกเลือกเป็น background marker เพื่อใช้ตรวจหาต้นข้าวที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 มากที่สุด



ภาพที่ 17 แสดงขนาดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์ เมื่อใช้ RM444 เป็นไพรเมอร์ โดยดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่ใช้ คือ ดีเอ็นเอของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 F_1 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 โดยที่ M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลขที่ 1-3 คือแถบดีเอ็นเอของ กข 6 F_1 และ กข 1 ตามลำดับ พบว่าเมื่อใช้ RM444 (3.3 cM) เป็นไพรเมอร์ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันระหว่าง กข 6 และ กข 1 จึงถูกเลือกเพื่อใช้เป็น background marker



ภาพที่ 18 แสดงขนาดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เพื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์ เมื่อใช้ RM167 เป็นไพรเมอร์ โดยดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่ใช้ คือ ดีเอ็นเอของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 F₁ และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 โดยที่ M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1-3 คือแถบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 F₁ และ กข 1 ตามลำดับ ซึ่งพบว่า RM167 (37.5 cM) เป็นไพรเมอร์ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ไม่ต่างกันระหว่าง กข 6 และ กข 1 จึงไม่ถูกเลือกเป็น background marker

จากผลของการคัดเลือก SSR marker จำนวน 152 ตำแหน่ง พบ SSR marker ที่ให้แถบดีเอ็นเอมีขนาดที่ต่างกันระหว่างข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 จำนวน 69 ตำแหน่ง SSR marker เหล่านี้ใช้เป็น background marker ซึ่งแบ่งเป็น background marker ที่อยู่บน target chromosome (โครโมโซมที่ 1) จำนวน 6 ตำแหน่ง และ อยู่บน non-target chromosome (โครโมโซมที่ 2-12) จำนวน 6 6 6 6 6 10 4 5 5 4 7 และ 4 ตำแหน่งตามลำดับ ชื่อ และ ตำแหน่งของ SSR marker ที่ถูกคัดเลือกเป็น background marker บนโครโมโซมทั้ง 12 แท่ง มีดังนี้คือ

โครโมโซมที่ 1 มี background marker จำนวน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ RM220 (28.4 cM) RM24 (78.4 cM) RM493 (79.7 cM) RM9 (101.4 cM) RM488 (101.4 cM) และ RM102 (152.2 cM)

โครโมโซมที่ 2 มี background marker จำนวน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ RM262 (51 cM) RM341 (82.7 cM) RM475 (92.5 cM) RM263 (127.5 cM) RM207 (192.2 cM) และ RM535 (195.7 cM)

โครโมโซมที่ 3 มี background marker จำนวน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ RM231 (15.7 cM) RM7 (64 cM) RM232 (76.7 cM) RM16 (131.5 cM) RM168 (171.2 cM) และ RM85 (231 cM)

โครโมโซมที่ 4 มี background marker จำนวน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ RM307 (0 cM) RM335 (21.5 cM) RM252 (99 cM) RM470 (115.5 cM) RM255 (120.8 cM) และ RM280 (152.3 cM)

โครโมโซมที่ 5 มี background marker จำนวน 6 ตำแหน่ง ได้แก่ RM413 (26.7 cM) RM437 (43.4 cM) RM169 (57.9 cM) RM26 (118.8 cM) RM274 (126.6 cM) และ RM334 (141.8 cM)

โครโมโซมที่ 6 มี background marker จำนวน 10 ตำแหน่ง ได้แก่ RM170 (2.2 cM) RM162 (3.3 cM) Glu23 (22.1 cM) RM204 (25.1 cM) RM314 (33.6 cM) RM276 (40.3 cM) RM5850 (53 cM) RM217 (68 cM) RM30 (74.3 cM) และ RM541 (75.5 cM)

โครโมโซมที่ 7 มี background marker จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ RM11 (47 cM) RM234 (88.2 cM) RM5720 (115.5 cM) และ RM1362 (116.1 cM)

โครโมโซมที่ 8 มี background marker จำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ RM152 (9.4 cM) RM210 (90.3 cM) RM458 (124.6 cM) RM264 (128.6 cM) และ RM281 (128.6)

โครโมโซมที่ 9 มี background marker จำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ RM444 (3.3 cM) RM219 (11.7 cM) RM257 (66.1 cM) RM242 (73.3 cM) และ RM288 (74.6 cM)

โครโมโซมที่ 10 มี background marker จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ RM216 (17.6 cM) RM269 (69.6 cM) RM304 (73 cM) และ RM228 (87.6 cM)

โครโมโซมที่ 11 มี background marker จำนวน 7 ตำแหน่ง ได้แก่ RM287 (68.6 cM) RM209 (73.9 cM) RM21 (85.7 cM) RM473 (95.6 cM) RM206 (102.9 cM) RM254 (110 cM) และ pTA248

โครโมโซมที่ 12 มี background marker จำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ RM20 (3.2 cM) RM247 (32.3 cM) RM235 (101.8 cM) และ RM17 (109.1 cM)

4. การผสมพันธุ์ข้าว และการคัดเลือกต้นข้าวด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย เพื่อให้ได้สายพันธุ์ กข 6 ต้นเดียว

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียว กข 6 ให้ต้นเดียวมีพันธุ์รับ (recipient parent) คือข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และที่ตำแหน่งของยีน *Sd1/sd1* มีอีโนไทป์เป็น *Sd1Sd1* ส่วนพันธุ์ให้ (donor parent) คือข้าวต้นเดียวพันธุ์ กข 1 และที่ตำแหน่งของอัลลีล *Sd1/sd1* มีอีโนไทป์เป็น *sd1sd1* แผนการผสมพันธุ์ และการคัดเลือกต้นข้าวโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายเป็นไปดังภาพที่ 19

ฤดูที่ 1 การผลิตเมล็ด F_1

การผลิตเมล็ด F_1 ทำโดยผสมข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 กับข้าวต้นเดียวพันธุ์ กข 1 ได้เมล็ดจำนวน 38 เมล็ด

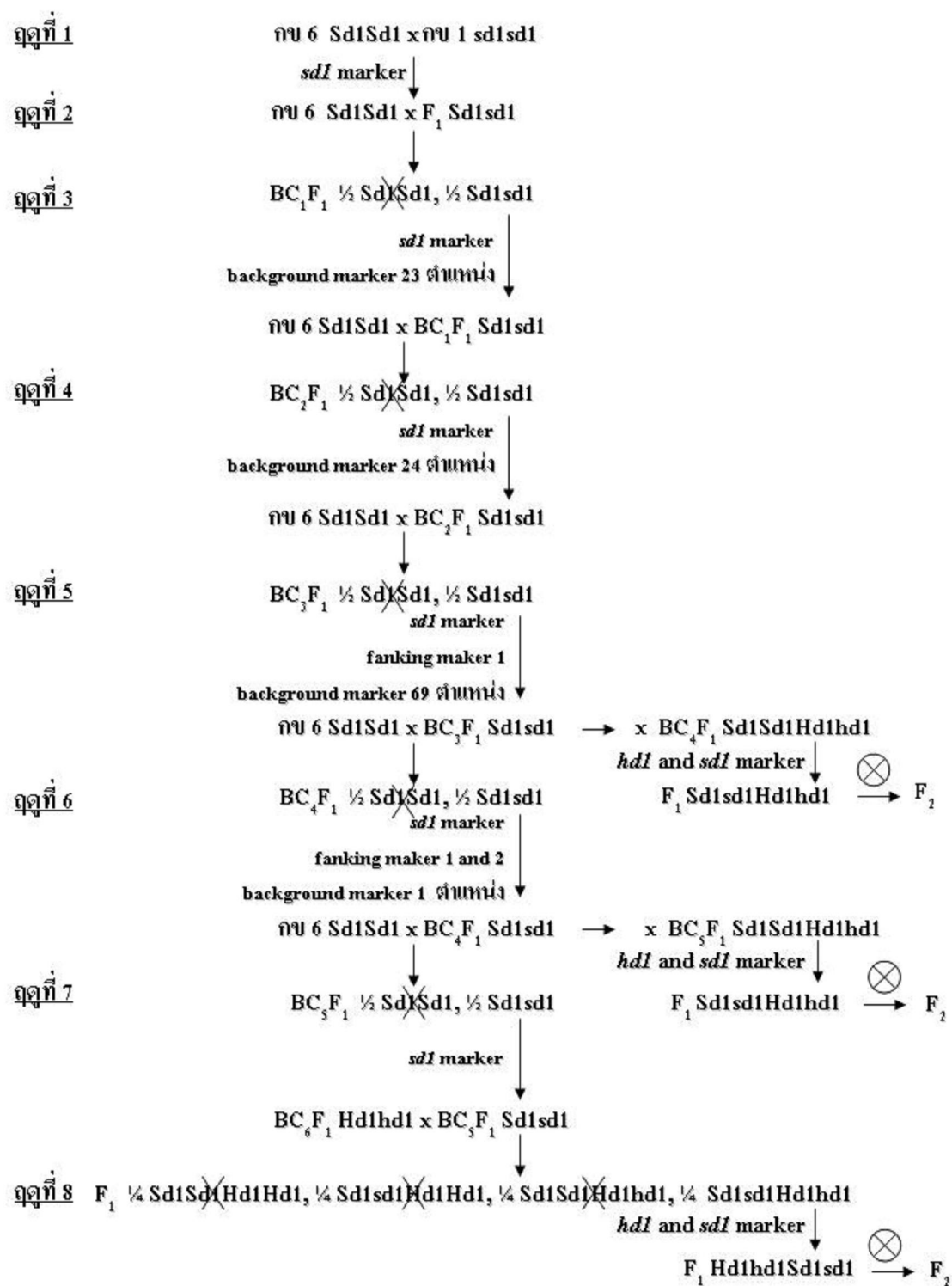
ฤดูที่ 2 การคัดเลือกต้น F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และการผลิตเมล็ด BC_1F_1

การผลิตเมล็ด BC_1F_1 ทำโดยเพาะเมล็ด F_1 จำนวน 10 ต้น และทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบของข้าวแต่ละต้น ใช้ดีเอ็นเอของข้าวแต่ละต้นเป็นแม่พิมพ์ในการทำพีซีอาร์โดยใช้ target marker คือ *Sd1MW3F/3R* เป็นไพรเมอร์ เพื่อพิสูจน์ว่าต้นที่คัดเลือกได้เป็นต้น F_1 ที่มียีนด้อย *sd1* เมื่อได้ต้น F_1 ที่ต้องการ จึงผสมกลับไปหาข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 เพื่อผลิตเมล็ด BC_1F_1 จำนวน 100 เมล็ด

ฤดูที่ 3 การคัดเลือกต้น BC_1F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_2F_1

การคัดเลือกต้น BC_1F_1 จำนวน 24 ต้นด้วย target marker คือ *Sd1MW3F/3R* พบต้นที่มียีนด้อย *sd1* จำนวน 11 ต้น ต่อจากนั้นคัดเลือกต้นข้าวที่แข็งแรงจำนวน 8 ต้น คือ ต้น BC_1F_1 -127 BC_1F_1 -128 BC_1F_1 -133 BC_1F_1 -139 BC_1F_1 -140 BC_1F_1 -142 BC_1F_1 -145 และ BC_1F_1 -150

เมื่อตรวจอีโนไทป์ของต้น BC_1F_1 ทั้ง 8 ต้นด้วย background marker ที่อยู่บน non-target chromosome (โครโมโซมที่ 2-12) จำนวน 21 ตำแหน่ง พบว่าต้น BC_1F_1 -139 BC_1F_1 -145 BC_1F_1 -127 BC_1F_1 -150 BC_1F_1 -140 BC_1F_1 -142 BC_1F_1 -128 และ BC_1F_1 -133 มีเปอร์เซ็นต์อีโนไทป์เหมือนกับ กข 6 เดิมจากสูงไปต่ำเท่ากับ 71 62 57 52 48 43 33 และ 33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ต่อจากนั้นเมื่อตรวจอีโนไทป์ของต้น BC_1F_1 ทั้ง 8 ต้นด้วย background marker ที่อยู่บน target chromosome (โครโมโซมที่ 1) จำนวน 2 ตำแหน่ง พบต้น BC_1F_1 -139 BC_1F_1 -145 BC_1F_1 -127 BC_1F_1 -150 BC_1F_1 -140 BC_1F_1 -142 BC_1F_1 -128 และ BC_1F_1 -133 มีเปอร์เซ็นต์อีโนไทป์เหมือนกับ กข 6 เท่ากับ 50 100 100 50 50 50 100 และ 50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตาราง 4)



ภาพที่ 19 แสดงแผนการปรับปรุงพันธุ์ กบ 6 ให้ต้นตอและไม่วางต่อช่วงแสงโดยวิธีการผสมกลับ โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยในการคัดเลือก

จากตาราง 4 พบว่าเมื่อตรวจต้น BC_1F_1 ด้วย background marker ที่อยู่บน non-target chromosome (โครโมโซมที่ 2-12) จำนวน 21 ตำแหน่ง พบต้น BC_1F_1 ที่มีอีโนไทป์เหมือนกับ กข 6 สูงสุด 3 อันดับแรก คือ ต้น BC_1F_1 -139 BC_1F_1 -145 และ BC_1F_1 -127 แต่เนื่องจากตอนเริ่มโครงการ คณะผู้วิจัยการต้องการปรับปรุงพันธุ์ให้ข้าว กข 6 เป็นข้าวต้นเดี่ยว และไม่ไวต่อช่วงแสงจึงได้คัดเลือกต้นข้าวทั้ง 3 ต้นโมเลกุลเครื่องหมายที่ยึดติดกับยีน *Hd1/hd1* พบว่ามีเพียงต้น BC_1F_1 -127 เท่านั้นที่ถูกคัดเลือกเพื่อผสมกลับไปหาพันธุ์รับคือพันธุ์ กข 6 เพื่อผลิตเมล็ด BC_2F_1 ได้ 57 เมล็ด แต่เมื่อทำทดลองในชั่วต่อไปก็ยกเลิกการคัดเลือกลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสง ดังนั้นในฤดูต่อไปจึงคัดเลือกต้น BC_nF_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมายที่เฉพาะกับยีน *Sd1/sd1* เท่านั้น

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์อีโนไทป์ของต้น BC_1F_1 ที่เหมือนกับอีโนไทป์ของ กข 6 เมื่อตรวจด้วย background marker ที่อยู่บน non-target chromosome จำนวน 21 ตำแหน่ง และบน target chromosome จำนวน 2 ตำแหน่ง

ต้น	เปอร์เซ็นต์อีโนไทป์ของต้น BC_1F_1 ที่เหมือนกับอีโนไทป์ของข้าวพันธุ์ กข 6 เมื่อตรวจด้วย background marker บน	
	non-target chromosome	target chromosome
	(โครโมโซมที่ 2-12)	(โครโมโซมที่ 1)
	(%)	(%)
BC_1F_1 -139	$15/21 \times 100 = 71$	$1/2 \times 100 = 50$
BC_1F_1 -145	$13/21 \times 100 = 62$	$2/2 \times 100 = 100$
BC_1F_1 -127	$12/21 \times 100 = 57$	$2/2 \times 100 = 100$
BC_1F_1 -150	$11/21 \times 100 = 52$	$1/2 \times 100 = 50$
BC_1F_1 -140	$10/21 \times 100 = 48$	$1/2 \times 100 = 50$
BC_1F_1 -142	$9/21 \times 100 = 43$	$1/2 \times 100 = 50$
BC_1F_1 -128	$7/21 \times 100 = 33$	$2/2 \times 100 = 100$
BC_1F_1 -133	$7/21 \times 100 = 33$	$1/2 \times 100 = 50$

หมายเหตุ เปอร์เซ็นต์อีโนไทป์ของ BC_1F_1 ที่เหมือนกับอีโนไทป์ของข้าวพันธุ์ กข 6

$$= (\text{จำนวน background marker ที่เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6} / \text{จำนวน background marker ทั้งหมดที่ใช้}) \times 100$$

รายละเอียดของยีนไทป์ของต้น BC_1F_1 -127 ที่ถูกคัดเลือกเพื่อผสมกลับ พบว่า เมื่อตรวจด้วย background marker ที่อยู่บน target chromosome (โครโมโซมที่ 1) จำนวน 2 ตำแหน่งมีเปอร์เซ็นต์ยีนไทป์เหมือนกับ กข 6 เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจซ้ำด้วย background marker ที่อยู่บน non-target chromosome (โครโมโซมที่ 2-12) จำนวน 21 ตำแหน่งมีเปอร์เซ็นต์ยีนไทป์เหมือนกับ กข 6 เท่ากับ $12/21 \times 100 = 57$ เปอร์เซ็นต์ ตำแหน่ง background marker ที่ยังเป็นเฮเทอไรโกสอยู่อีก 9 ตำแหน่ง คือ RM16 (โครโมโซมที่ 3 อยู่ที่ 131.5 cM) RM335 (โครโมโซมที่ 4 อยู่ที่ 21.5 cM) RM280 (โครโมโซมที่ 4 อยู่ที่ 152.3 cM) RM11 (โครโมโซมที่ 7 อยู่ที่ 47 cM) RM234 (โครโมโซมที่ 7 อยู่ที่ 88.2 cM) RM264 (โครโมโซมที่ 8 อยู่ที่ 128.6 cM) RM219 (โครโมโซมที่ 9 อยู่ที่ 11.7 cM) RM20 (โครโมโซมที่ 12 อยู่ที่ 3.2 cM) และ RM17 (โครโมโซมที่ 12 อยู่ที่ 109.1 cM)

ฤดูที่ 4 การคัดเลือกต้น BC_2F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_3F_1

การคัดเลือกต้น BC_2F_1 -127- จำนวน 54 ต้นด้วย target marker คือ sd1MW3F/3R ได้ต้นที่ยีนด้อย sd1 จำนวน 12 ต้น ต่อจากนั้นคัดเลือกต้น BC_2F_1 -127 ที่แข็งแรงมา 5 ต้น คือต้น BC_2F_1 -127-4106 BC_2F_1 -127-4107 BC_2F_1 -127-4117 BC_2F_1 -127-4119 และ BC_2F_1 -127-4121

เมื่อตรวจยีนไทป์ของต้นเหล่านี้ด้วย background marker ที่อยู่บน non-target chromosome (โครโมโซมที่ 2-12) จำนวน 22 ตำแหน่ง และอยู่บน target chromosome (โครโมโซมที่ 1) จำนวน 2 ตำแหน่ง โดย background marker จำนวน 21 ตำแหน่ง เป็นตำแหน่งเดียวกับที่ใช้คัดเลือกต้น BC_2F_1 -127 ในฤดูที่ 2 ยกเว้น RM228 (โครโมโซมที่ 10 อยู่ที่ 87.6 cM) ที่หาเพิ่ม เมื่อตรวจด้วย background marker ที่อยู่บน non-target chromosome (โครโมโซมที่ 2-12) จำนวน 22 ตำแหน่ง พบว่าต้น BC_2F_1 -127-4121 BC_2F_1 -127-4106 BC_2F_1 -127-4107 BC_2F_1 -127-4119 และ BC_2F_1 -127-4117 มีเปอร์เซ็นต์ยีนไทป์เหมือนกับ กข 6 จากสูงไปต่ำเท่ากับ 86 73 73 68 และ 68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อตรวจด้วย background marker ที่อยู่บน target chromosome (โครโมโซมที่ 1) จำนวน 2 ตำแหน่ง เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ทุกต้น ซึ่งผลการทดลองเป็นไปตามสมมุติฐาน คือ เนื่องจากต้น BC_1F_1 -127 มี background marker ที่อยู่บน target chromosome (โครโมโซมที่ 1) ทั้ง 2 ตำแหน่งอยู่ในสภาพโฮโมไซโกสของอัลลีล กข 6 แล้ว ซึ่งในชั่วต่อมา คือ BC_2F_1 -127 ทุกต้นก็ควรจะมียีนไทป์เหมือนเดิม (ตาราง 5)

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ยีนโนไทป์ที่เหมือนกับ กข 6 ของต้น BC_2F_1 -127- เมื่อตรวจด้วย background marker ที่อยู่บน non-target chromosome จำนวน 22 ตำแหน่ง และอยู่บน target chromosome จำนวน 2 ตำแหน่ง

ต้น	เปอร์เซ็นต์ยีนโนไทป์ของต้น BC_2F_1 ที่เหมือนกับยีนโนไทป์ของข้าวพันธุ์ กข 6 เมื่อตรวจด้วย background marker บน	
	non-target chromosome	target chromosome
	(โครโมโซมที่ 2-12) (%)	(โครโมโซมที่ 1) (%)
BC_2F_1 -127-4121	$19/22 \times 100 = 86$	$2/2 \times 100 = 100$
BC_2F_1 -127-4106	$16/22 \times 100 = 73$	$2/2 \times 100 = 100$
BC_2F_1 -127-4107	$16/22 \times 100 = 73$	$2/2 \times 100 = 100$
BC_2F_1 -127-4119	$15/22 \times 100 = 68$	$2/2 \times 100 = 100$
BC_2F_1 -127-4117	$15/22 \times 100 = 68$	$2/2 \times 100 = 100$

หมายเหตุ เปอร์เซ็นต์ยีนโนไทป์ของ BC_1F_1 ที่เหมือนกับยีนโนไทป์ของข้าวพันธุ์ กข 6

$$= (\text{จำนวน background marker ที่เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6} / \text{จำนวน background marker ทั้งหมดที่ใช้}) \times 100$$

การผลิตเมล็ด BC_3F_1 -127-4121 จำนวน 392 เมล็ด ได้จากผสมต้นแม่พันธุ์รับ คือ ข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 กับต้นพ่อ คือ ต้น BC_2F_1 -127-4121 ซึ่งมียีนโนไทป์เป็น Sd1sd1 และเมื่อตรวจด้วย background marker ที่อยู่บน target chromosome (โครโมโซมที่ 1) จำนวน 2 ตำแหน่งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ กข 6 เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจด้วย background marker ที่อยู่บน non-target chromosome (โครโมโซมที่ 2-12) จำนวน 22 ตำแหน่ง พบว่า background marker จำนวน 19 ตำแหน่งมียีนโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยีนโนไทป์ที่เหมือนกับ กข 6 สูงสุด เท่ากับ $= 19/22 \times 100 = 86$ เปอร์เซ็นต์ ต้น BC_2F_1 -127-4121 พบ background marker อีก 3 ตำแหน่งที่ยังเป็นเฮเทอโรไซกัสได้แก่ RM16 (โครโมโซมที่ 3 อยู่ที่ 131.5 cM) RM335 (โครโมโซมที่ 4 อยู่ที่ 21.5 cM) และ RM20 (โครโมโซมที่ 12 อยู่ที่ 3.2 cM) ในขณะที่ต้น BC_1F_1 -127 มี background marker ที่เป็นเฮเทอโรไซกัสอยู่ถึง 9 ตำแหน่ง และไม่พบ background marker ที่เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6 ในต้น BC_1F_1 -127 ที่เปลี่ยนกลับไปเป็นเฮเทอโรไซกัสในต้น BC_2F_1 -127-4121

กฎที่ 5 การคัดเลือกต้น BC_3F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_4F_1

การคัดเลือกต้น BC_3F_1 -127-4121- จำนวน 174 ต้นด้วย target marker คือ sd1MW3F/3R พบต้นที่มียืนด้อย sd1 จำนวน 82 ต้น

เมื่อตรวจยีนไทป์ของต้นเหล่านี้ด้วย background marker ที่อยู่บน non-target chromosome (โครโมโซมที่ 2-12) เฉพาะที่ยังเป็นเฮเทอโรไซกัสในต้น BC_2F_1 -127-4121 จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ RM16 (โครโมโซมที่ 3 อยู่ที่ 131.5 cM) RM335 (โครโมโซมที่ 4 อยู่ที่ 21.5 cM) และ RM20 (โครโมโซมที่ 12 อยู่ที่ 3.2 cM) พบต้น BC_3F_1 จำนวน 3 ต้นที่ background marker ทั้ง 3 ตำแหน่งมียีนไทป์เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6 พันธุ์ คือ ต้น BC_3F_1 -127-4121-2630 BC_3F_1 -127-4121-2725 และ BC_3F_1 -127-4121-2745

เมื่อตรวจทั้ง 3 ต้นด้วย flanking marker 1 คือ RM1339F/R (147.5 cM) พบต้นข้าวทั้ง 3 ต้นยังมียีนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัสในตำแหน่งนี้

เมื่อตรวจข้าวทั้ง 3 ต้นด้วย background marker ที่อยู่บน non-target chromosome (โครโมโซมที่ 2-12) จำนวน 63 ตำแหน่ง ซึ่งเป็น marker เดิมที่ใช้ตรวจต้น BC_2F_1 -127-4121 จำนวน 22 ตำแหน่ง และหาเพิ่มอีก 41 ตำแหน่ง พบว่าต้น BC_3F_1 -127-4121-2630 BC_3F_1 -127-4121-2725 และ BC_3F_1 -127-4121-2745 มีเปอร์เซ็นต์ยีนไทป์เหมือนกับ กข 6 จากสูงไปต่ำ เท่ากับ 98 95 และ 94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อตรวจทั้ง 3 ต้นด้วย background marker ที่อยู่บน target chromosome (โครโมโซมที่ 1) จำนวน 6 ตำแหน่งพบว่าทั้ง 3 ต้นมีเปอร์เซ็นต์ยีนไทป์เหมือนกับ กข 6 เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 6)

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์ยีนโนไทป์ที่เหมือนกับ กข 6 ของต้น BC_1F_1 -127 BC_2F_1 -127-4121 และ BC_3F_1 -127-4121-2630 เมื่อตรวจด้วย background marker ที่อยู่บน non-target chromosome จำนวน 63 ตำแหน่ง และอยู่บน target chromosome จำนวน 6 ตำแหน่ง

ต้น	เปอร์เซ็นต์ยีนโนไทป์ของต้น BC_nF_1 ที่เหมือนกับยีนโนไทป์ของข้าวพันธุ์ กข 6 เมื่อตรวจด้วย background marker บน					
	BC_1F_1		BC_2F_1		BC_3F_1	
	non-target	target	non-target	target	non-target	target
	chromosome (โครโมโซมที่ 2-12)	chromosome (โครโมโซมที่ 1)	chromosome (โครโมโซมที่ 2-12)	chromosome (โครโมโซมที่ 1)	chromosome (โครโมโซมที่ 2-12)	chromosome (โครโมโซมที่ 1)
BC_3F_1 -127-4121-2630	12/21=57	2/2=100	19/22=86	2/2=100	62/63=98	6/6=100
BC_3F_1 -127-4121-2725	12/21=57	2/2=100	19/22=86	2/2=100	60/63=95	6/6=100
BC_3F_1 -127-4121-2745	12/21=57	2/2=100	19/22=86	2/2=100	59/63=94	6/6=100

หมายเหตุ เปอร์เซ็นต์ยีนโนไทป์ของ BC_nF_1 ที่เหมือนกับยีนโนไทป์ของข้าวพันธุ์ กข 6 = (จำนวน background marker ที่เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6 /จำนวน background marker ทั้งหมดที่ใช้) x 100

การผลิตเมล็ด BC₄F₁-127-4121-2630 จำนวน 92 เมล็ด ทำโดยใช้ข้าวพันธุ์ กข 6 ซึ่งเป็นพันธุ์รับเป็นต้นแม่ผสมกับต้น BC₃F₁-127-4121-2630 ซึ่งใช้เป็นต้นพ่อ รายละเอียดยีนไทป์ของต้น BC₃F₁-127-4121-2630 มีดังนี้ คือ เมื่อตรวจด้วย target marker คือ sd1MW3F/3R พบอัลลีลด้วย sd1 เมื่อตรวจด้วย background marker ที่อยู่บน non-target chromosome (โครโมโซมที่ 2-12) จำนวน 63 ตำแหน่ง พบ 62 ตำแหน่งที่มียีนไทป์เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยีนไทป์ที่เหมือนกับ กข 6 = $62/63 \times 100 = 98$ เปอร์เซ็นต์ background marker อีกหนึ่งตำแหน่งที่ยังเป็นเฮเทอโรไซกัสคือ RM210 (โครโมโซมที่ 8 อยู่ที่ 90.3 cM) และเมื่อตรวจด้วย background marker ที่อยู่บน target chromosome (โครโมโซมที่ 1) จำนวน 6 ตำแหน่ง พบว่าต้นนี้มีเปอร์เซ็นต์ยีนไทป์เหมือนกับ กข 6 เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์หมายความว่าทั้ง 6 ตำแหน่งมียีนไทป์เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6

ฤดูที่ 6 การคัดเลือกต้น BC₄F₁-127-4121-2630 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC₅F₁

การคัดเลือกต้น BC₄F₁-127-4121-2630 จำนวน 190 ต้น ด้วย target marker คือ Sd1MW3F/3R ได้ต้นที่มีอัลลีลด้วย sd1 จำนวน 92 ต้น

เมื่อตรวจต้นเหล่านี้ด้วย flanking marker 1 คือ RM1339F/R (147.5 cM) พบต้นที่เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6 เพียงหนึ่งต้นคือต้น BC₄F₁-127-4121-2630-358 และเมื่อตรวจด้วย flanking marker 2 คือ RM3375F/R (155.1 cM) พบว่าต้น BC₄F₁-127-4121-2630-358 รวมทั้งอีก 32 ต้นที่มีตำแหน่งของ flanking marker 2 เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6

จากนั้นทำการคัดเลือกต้น BC₄F₁-127-4121-2630-358 ที่ตำแหน่งของ flanking marker 1 คือ RM1339F/R (147.5 cM) และ flanking marker 2 คือ RM3375F/R (155.1 cM) เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6 และอีก 5 ต้น คือต้น BC₄F₁-127-4121-2630-223 BC₄F₁-127-4121-2630-380 BC₄F₁-127-4121-2630-387 BC₄F₁-127-4121-2630-396 และ BC₄F₁-127-4121-2630-399 ที่ตำแหน่งของ flanking marker 2 คือ RM3375F/R (155.1 cM) เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6 แต่ flanking marker 1 คือ RM1339F/R (147.5 cM) ยังคงเป็นเฮเทอโรไซกัสอยู่ เมื่อนำต้นเหล่านี้มาคัดเลือกด้วย background marker จำนวน 1 ตำแหน่ง คือ RM210 (โครโมโซม 8 อยู่ที่ 90.3 cM) ที่เป็นเฮเทอโรไซกัสในต้น BC₃F₁-127-4121-2630 พบ BC₄F₁ ทั้ง 6 ต้นเป็นโฮโมไซกัสของ กข 6 ในตำแหน่งนี้ เมื่อตรวจด้วย background marker 69 ตำแหน่งพบว่า ทั้ง 4 ต้นเป็นโฮโมไซกัสของ กข 6 ทุกตำแหน่ง

ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข 6 ให้ต้นเตี้ยโดยวิธีผสมกลับและใช้โมเลกุลเครื่องหมาย มาช่วยในการคัดเลือกประสบผลสำเร็จในฤดูที่ 6 เพราะได้ต้น BC₄F₁-127-4121-2630-358 ที่มี

ตำแหน่งของอัลลีล *Sd1/sd1* มีอีโนไทป์เป็น *Sd1sd1* อีกทั้งยังเป็นต้นที่มีตำแหน่งของ flanking marker 1 คือ RM1339 (147.5 cM) และ flanking marker 2 คือ RM3375 (155.1 cM) เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6 และเมื่อตรวจด้วย background marker ที่อยู่บน non-target chromosome (โครโมโซมที่ 2-12) ทั้ง 63 ตำแหน่งมีอีโนไทป์เหมือนกับ กข 6 เท่ากับ 100 เปอร์เซนต์ เมื่อตรวจด้วย background marker ที่อยู่บน target chromosome (โครโมโซมที่ 1) จำนวน 6 ตำแหน่งพบต้นนี้มีเปอร์เซ็นต์อีโนไทป์เหมือนกับ กข 6 เท่ากับ 100 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 เปอร์เซนต์อีโนไทป์ที่เหมือนกับ กข 6 ของต้น BC_1F_1 -127 BC_2F_1 -127-4121 BC_3F_1 -127-4121-2630 และ BC_4F_1 -127-4121-2630-358 เมื่อตรวจด้วย background marker ที่อยู่บน non-target chromosome และอยู่บน target chromosome

ต้น	เปอร์เซ็นต์อีโนไทป์ของต้น BC_nF_1 ที่เหมือนกับอีโนไทป์ของข้าวพันธุ์ กข 6 เมื่อตรวจด้วย background marker บน	
	non-target chromosome (โครโมโซมที่ 2-12)	target chromosome (โครโมโซมที่ 1)
	(%)	(%)
BC_1F_1 -127	12/21=57	2/2=100
BC_2F_1 -127-4121	19/22=86	2/2=100
BC_3F_1 -127-4121-2630	62/63=98	6/6=100
BC_4F_1 -127-4121-2630-358	63/63=100	6/6=100

หมายเหตุ เปอร์เซนต์อีโนไทป์ของ BC_1F_1 ที่เหมือนกับอีโนไทป์ของข้าวพันธุ์ กข 6

$$= (\text{จำนวน background marker ที่เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6} / \text{จำนวน background marker ทั้งหมดที่ใช้}) \times 100$$

ผลิตเมล็ด BC_5F_1 -127-4121-2630-385- ทำโดยใช้ข้าวพันธุ์ กข 6 ซึ่งเป็นพันธุ์รับเป็นต้นแม่ผสมกับต้น BC_4F_1 -127-4121-2630-358 ซึ่งใช้เป็นต้นพ่อ ซึ่งต้น BC_4F_1 -127-4121-2630-358 มี อีโนไทป์ในตำแหน่ง *Sd1/sd1* เป็น *Sd1sd1* ส่วนอีโนไทป์ในตำแหน่งอื่นๆ เมื่อตรวจด้วย flanking marker 1 และ 2 รวมทั้ง background marker จำนวน 69 ตำแหน่งมีอีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6 ทุกตำแหน่ง

ฤดูที่ 7 การคัดเลือกต้น BC_5F_1 -127-4121-2630-358- ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_6F_1

การคัดเลือกต้น BC_5F_1 -127-4121-2630-358- จำนวน 5 ต้น ด้วย target marker คือ Sd1MW3F/3R ได้ต้นที่มีอัลลีลด้อย *sd1* จำนวน 2 ต้น คือ BC_5F_1 -127-4121-2725-358-1687 และ BC_5F_1 -127-4121-2725-358-1690

การผลิตเมล็ด BC_6F_1 -127-4121-2725-358-1687- และ BC_6F_1 -127-4121-2725-358-1690- ทำโดยใช้ข้าวพันธุ์ กข 6 ซึ่งเป็นพันธุ์รับเป็นต้นแม่ผสมกับต้น BC_5F_1 -127-4121-2725-358-1687 และ BC_5F_1 -127-4121-2725-358-1690 ซึ่งใช้เป็นต้นพ่อ ซึ่งต้นทั้ง 2 มียีนไทป์ที่ตำแหน่ง *Sd1/sd1* เป็น *Sd1sd1* และยีนไทป์ในตำแหน่งอื่นๆ เหมือนกับ กข 6

สรุปการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยโดยวิธีผสมกลับและใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกในแต่ละฤดูมีดังนี้

ฤดูที่ 1 การผลิตเมล็ด F_1

ฤดูที่ 2 การคัดเลือกต้น F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และการผลิตเมล็ด BC_1F_1

ฤดูที่ 3 การคัดเลือกต้น BC_1F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_2F_1

ฤดูที่ 4 การคัดเลือกต้น BC_2F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_3F_1

ฤดูที่ 5 การคัดเลือกต้น BC_3F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_4F_1

ฤดูที่ 6 การคัดเลือกต้น BC_4F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_5F_1

ฤดูที่ 7 การคัดเลือกต้น BC_5F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_6F_1

5. การผสมระหว่างสายพันธุ์ กข 6 ต้นเดี่ยว กับ สายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสง เพื่อผลิตสายพันธุ์ กข 6 ต้นเดี่ยวไม่ไวต่อช่วงแสง

เนื่องจากโครงการ “ปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเดี่ยว โดยวิธีปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก” ซึ่งได้รับทุนวิจัยจากสำนักวิจัย และส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (2550-2551) และโครงการ “ปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี molecular marker-assisted backcrossing” ซึ่งได้รับทุนวิจัยจากศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (2547-2550) เป็นโครงการที่ทำในระยะเวลาใกล้เคียงกัน ดังนั้นเมื่อได้สายพันธุ์ กข 6 ต้นเดี่ยว และสายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสงที่ได้มาจากโครงการทั้ง 2 ตามลำดับ จึงนำมาผสมพันธุ์กันเพื่อให้ได้เมล็ด F_1 ต่อจากนั้นทำการคัดเลือกด้วยโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อให้ได้ต้น F_1 ที่มีทั้งยีนด้อย *sd1* และ *hd1* และทำการผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด F_2 ซึ่งมีการกระจายตัวของยีนทำให้พบต้น F_2 ที่มียีนในไทป์เป็น *sd1sd1hd1hd1* เกิดขึ้นซึ่งมีฟีโนไทป์เป็นข้าวต้นเดี่ยวไม่ไวต่อช่วงแสง เมื่อนำต้น F_2 ไปปลูกในสภาพวันยาวในเดือนเมษายนก็จะสามารถคัดเลือกต้น F_2 ที่มีฟีโนไทป์เป็นต้นเดี่ยวไม่ไวต่อช่วงแสงได้ ซึ่งจะเป็นโครงการต่อเนื่องจากโครงการนี้ เนื่องจากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวสายพันธุ์ กข 6 ต้นเดี่ยว และ ข้าวสายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสง เริ่มผสมกันตั้งแต่ในฤดูที่ 5 ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเดี่ยว ซึ่งในฤดูที่ 5 นี้ได้ต้น BC_3F_1 -127-4121-2630 ที่มียีนในไทป์เป็น *Sd1sd1* จึงนำมาผสมกับ ต้น BC_4F_1 -51-501-6211-2255 ที่มียีนในไทป์ *Hd1hd1* ซึ่งมีรายละเอียดของการผสมระหว่างสายพันธุ์ทั้งต้นเดี่ยว และสายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสงมีดังต่อไปนี้

ฤดูที่ 5 การผลิตเมล็ด F_1 ที่มีทั้งยีน *sd1* และ *hd1* อยู่ในต้นเดียวกัน โดยทำการผสมต้น BC_4F_1 -51-501-6211-2255 ที่มียีนในไทป์ *Hd1hd1* และต้น BC_3F_1 -127-4121-2630 ที่มียีนในไทป์เป็น *Sd1sd1* ดังนั้นเมล็ด F_1 มียีนในไทป์เกิดขึ้น 4 แบบ คือ เป็น *Hd1Sd1Sd1 Hd1Hd1Sd1sd1 Hd1hd1Sd1Sd1* และ *Hd1hd1Sd1sd1* และคัดเลือกให้เหลือเฉพาะต้นที่มียีนในไทป์เป็น *Hd1hd1Sd1sd1*

รายละเอียดยีนในไทป์ของต้น BC_4F_1 -51-501-6211-2255 ได้จากโครงการ “ปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี molecular marker-assisted backcrossing” ซึ่งได้รับทุนวิจัยจากศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (2547-2550) คือที่ตำแหน่ง *Hd1/hd1* ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 6 ตำแหน่ง 54.1 cM มียีนในไทป์เป็น *Hd1hd1* ส่วนในตำแหน่งของ flanking marker 2 คือ RM8250 (61.1 cM) มียีนในไทป์เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6 รวมทั้ง background marker จำนวน 144 ตำแหน่งที่อยู่บน non target chromosome (โครโมโซมที่ 1-5 และ 7-12) ก็มียีนในไทป์เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6 ทั้งหมด และ background marker ที่อยู่

บน target chromosome (โครโมโซมที่ 6) เป็นโฮโมโลกัสของอัลลีล กข 6 จำนวน 15 ตำแหน่งจากทั้งหมด 16 ตำแหน่ง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยีนไทป์ที่เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6 เท่ากับ $15/16 \times 100 = 94\%$ แต่ยังคงเหลือ flanking marker 1 คือ RM5963 (53.5 cM) และ background marker อีกหนึ่งตำแหน่งที่ยังเป็นเฮเทโรไซกัส คือ RM136 (51.2 cM)

ส่วนต้น BC₃F₁-127-4121-2630 ที่ได้จากโครงการต้นเตี้ยมีรายละเอียดยีนไทป์ดังนี้ คือ เมื่อตรวจด้วยด้วย target marker คือ sd1MW3F/3R พบอัลลีลด้วย sd1 เมื่อตรวจด้วย background marker ที่อยู่บน non-target chromosome (โครโมโซมที่ 2-12) จำนวน 63 ตำแหน่ง พบ 62 ตำแหน่งที่มียีนไทป์เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ยีนไทป์ที่เหมือนกับ กข 6 เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ ส่วน background marker อีกหนึ่งตำแหน่งที่ยังเป็นเฮเทโรไซกัสคือ RM210 (โครโมโซมที่ 8 อยู่ที่ 90.3 cM) และเมื่อตรวจด้วย background marker ที่อยู่บน target chromosome (โครโมโซมที่ 1) จำนวน 6 ตำแหน่งพบต้นนี้มีเปอร์เซ็นต์ยีนไทป์เหมือนกับ กข 6 เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์หมายความว่าทั้ง 6 ตำแหน่งมียีนไทป์เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6 แต่ทั้ง flanking marker 1 คือ RM1339 (147.5 cM) และ flanking marker 2 คือ RM3375 (155.1 cM) ยังคงเป็นเฮเทโรไซกัส

กฎที่ 6 แบ่งการทดลองเป็น กฎที่ 6.1 คัดเลือกต้น F₁ ที่มียีนไทป์เป็น Hd1hd1Sd1sd1 และผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด F₂ และ กฎ 6.2 การผลิตเมล็ด F₁ ที่มีทั้งยีน sd1 และ hd1 อยู่ในต้นเดียวกันจาก ต้น BC₅F₁-51-501-6211-2320-414 ยีนไทป์ Hd1hd1 ซึ่งได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ให้ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสงฯ และต้น BC₄F₁-127-4121-2630-235 ที่มียีนไทป์เป็น Sd1sd1 ซึ่งได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยฯ ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

กฎที่ 6.1 คัดเลือกต้น F₁ ที่มียีนไทป์เป็น Hd1hd1Sd1sd1 และผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด F₂ ที่ได้จากกฎที่ 5

เนื่องจากถ้าพิจารณายีน 2 ตำแหน่ง คือ Hd1/hd1 และ Sd1/sd1 ในกฎที่ 5 ทำการผสมต้น BC₄F₁-51-501-6211-2255 ซึ่งมียีนไทป์เป็น Hd1hd1Sd1Sd1 และต้น BC₃F₁-127-4121-2630 ที่มียีนไทป์เป็น Hd1Hd1Sd1sd1 ดังนั้นเมล็ด F₁ มียีนไทป์ 4 แบบคือ $\frac{1}{4}$ Hd1Hd1Sd1Sd1: $\frac{1}{4}$ Hd1hd1Sd1Sd1: $\frac{1}{4}$ Hd1Hd1Sd1sd1: $\frac{1}{4}$ Hd1hd1Sd1sd1 การคัดเลือกต้น F₁ ในกฎที่ 6.1 จึงต้องใช้โมเลกุลเครื่องหมายที่เฉพาะกับ sd1 และ hd1 คัดเลือกต้น F₁ ที่มียีนไทป์เป็น Hd1hd1Sd1sd1 ต่อจากนั้นทำการผสมตัวเองต้นที่คัดเลือกได้ เพื่อผลิตเมล็ด F₂ ซึ่งจะนำปลูกในสภาพวันยาวเพื่อคัดเลือกหาต้นข้าวสายพันธุ์ กข 6 ต้นเตี้ยไม่ไวต่อช่วงแสงต่อไป

กฎที่ 6.2 การผลิตเมล็ด F₁ ที่มีทั้งยีน sd1 และ hd1 อยู่ในต้นเดียวกัน โดยผสมระหว่างต้น BC₅F₁-51-501-6211-2255-414 ที่มียีนไทป์ Hd1hd1 ซึ่งได้จากโครงการปรับปรุง

พันธุ์ให้ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสงฯ และต้น BC_4F_1 -127-4121-2630-235 ที่มีอีโนไทป์เป็น $Sd1sd1$ ที่ได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเดี่ยวฯ โดยที่ต้น BC_5F_1 -51-501-6211-2320-414 ที่ตำแหน่ง $Hd1/hd1$ มีอีโนไทป์เป็น $Hd1hd1$ ส่วน background marker ทั้งหมด 166 ตำแหน่ง flanking marker 1 คือ RM5963 (53.5 cM) และ flanking marker 2 คือ RM8250 (61.6 cM) เป็นโฮโมไซกัสสำหรับอัลลีลของ กข 6 ส่วนต้น BC_4F_1 -127-4121-2630-358 มีอีโนไทป์ในตำแหน่ง $Sd1/sd1$ เป็น $Sd1sd1$ ส่วนอีโนไทป์ในตำแหน่งอื่นๆ คือ เมื่อตรวจด้วย flanking marker 1 flanking marker 2 และ background marker จำนวน 69 ตำแหน่งมีอีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัสของ อัลลีล กข 6 ทุกตำแหน่ง

นอกจากผสมข้ามทั้ง 2 ต้นดังกล่าวข้างต้น ยังได้ทำการผสมระหว่างต้น BC_5F_1 -51-501-6211-2320- ที่มีอีโนไทป์ $Hd1hd1$ ซึ่งได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ให้ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสงฯ และ ต้น BC_4F_1 -127-4121-2630- ที่มีอีโนไทป์เป็น $Sd1sd1$ ที่ได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเดี่ยวฯ ซึ่งต้นข้าวเหล่านี้ยังมีบางตำแหน่งที่มีอีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัสอยู่

กฎที่ 7 แบ่งการทดลองเป็น 4 การทดลอง คือ

กฎที่ 7.1 ปลุกคัดเลือกต้น F_2 -(BC_4F_1 -51-501-6211-2255 x BC_3F_1 -127-4121-2630) ที่ได้จากกฎที่ 6.1 จำนวน 95 ต้นในสภาพวันยาวให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อคัดเลือกต้นเดี่ยวไม่ไวต่อช่วงแสงที่มีอีโนไทป์เป็น $hd1hd1sd1sd1$ ได้ทั้งหมดจำนวน 9 ต้นและทำการผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด F_3 ซึ่งสายพันธุ์ F_3 มีรายละเอียดดังต่อไปนี้ คือ

1. F_3 -(BC_4F_1 -51-501-6211-2255 x BC_3F_1 -127-4121-2630)-605-1104($hd1hd1sd1sd1$)
2. F_3 -(BC_4F_1 -51-501-6211-2255 x BC_3F_1 -127-4121-2630)-605-1123($hd1hd1sd1sd1$)
3. F_3 -(BC_4F_1 -51-501-6211-2255 x BC_3F_1 -127-4121-2630)-605-1125($hd1hd1sd1sd1$)
4. F_3 -(BC_4F_1 -51-501-6211-2255 x BC_3F_1 -127-4121-2630)-605-1141($hd1hd1sd1sd1$)
5. F_3 -(BC_4F_1 -51-501-6211-2255 x BC_3F_1 -127-4121-2630)-605-1145($hd1hd1sd1sd1$)
6. F_3 -(BC_4F_1 -51-501-6211-2255 x BC_3F_1 -127-4121-2630)-605-1146($hd1hd1sd1sd1$)
7. F_3 -(BC_4F_1 -51-501-6211-2255 x BC_3F_1 -127-4121-2630)-605-1168($hd1hd1sd1sd1$)
8. F_3 -(BC_4F_1 -51-501-6211-2255 x BC_3F_1 -127-4121-2630)-605-1177($hd1hd1sd1sd1$)
9. F_3 -(BC_4F_1 -51-501-6211-2255 x BC_3F_1 -127-4121-2630)-605-1196($hd1hd1sd1sd1$)

กฎที่ 7.2 ผลิตเมล็ด F_1 จากต้น F_2 ที่มีอีโนไทป์เป็น $hd1hd1sd1sd1$ ที่คัดเลือกได้ในกฎ 7.1 กับต้น BC_5F_2 ที่มีอีโนไทป์ $hd1hd1Sd1Sd1$ ดังนั้นเมล็ด F_1 นี้มีอีโนไทป์แบบเดียวคือ $hd1hd1Sd1sd1$ ซึ่งรายละเอียดของต้น F_1 มีดังนี้ คือ

1. F_1 -(BC_5F_2 -51-501-6211-2320-414-1238 ($hd1hd1Sd1Sd1$) x F_2 -(BC_4F_1 -2255x BC_3F_1 -

- 2630)-605-1196 (hd1hd1sd1sd1))- 51R GH
2. F_1 -(BC_5F_2 -51-501-6211-2320-414-1250 (hd1hd1Sd1Sd1) x F_2 -(BC_4F_1 -2255x BC_3F_1 -2630)-605-1196 (hd1hd1sd1sd1))- 51R GH
3. F_1 -(BC_5F_2 -51-501-6211-2320-414-1262 (hd1hd1Sd1Sd1) x F_2 -(BC_4F_1 -2255x BC_3F_1 -2630)-605-1196 (hd1hd1sd1sd1))- 51R GH
4. F_1 -(BC_5F_2 -51-501-6211-2320-414-1273 (hd1hd1Sd1Sd1) x F_2 -(BC_4F_1 -2255x BC_3F_1 -2630)-605-1196 (hd1hd1sd1sd1))- 51R GH
5. F_1 -(BC_5F_2 -51-501-6211-2320-414-1280 (hd1hd1Sd1Sd1) x F_2 -(BC_4F_1 -2255 x BC_3F_1 -2630)-605-1196 (hd1hd1sd1sd1))- 51R GH
6. F_1 -(BC_5F_2 -51-501-6211-2320-414-1286 (hd1hd1Sd1Sd1) x F_2 -(BC_4F_1 -2255 x BC_3F_1 -2630)-605-1196 (hd1hd1sd1sd1))- 51R GH
7. F_1 -(BC_5F_2 -51-501-6211-2320-414-1295 (hd1hd1Sd1Sd1) x F_2 -(BC_4F_1 -2255 x BC_3F_1 -2630)-605-1196 (hd1hd1sd1sd1))- 51R GH
8. F_1 -(BC_5F_2 -51-501-6211-2320-414-1274 (hd1hd1Sd1Sd1) x F_2 -(BC_4F_1 -2255 x BC_3F_1 -2630)-605-1145 (hd1hd1sd1sd1))- 51R GH
9. F_1 -(BC_5F_2 -51-501-6211-2320-414-1280 (hd1hd1Sd1Sd1) x F_2 -(BC_4F_1 -2255 x BC_3F_1 -2630)-605-1145 (hd1hd1sd1sd1))- 51R GH
10. F_1 -(BC_5F_2 -51-501-6211-2320-414-1295 (hd1hd1Sd1Sd1) x F_2 -(BC_4F_1 -2255 x BC_3F_1 -2630)-605-1145 (hd1hd1sd1sd1))- 51R GH
11. F_1 -(BC_3F_4 -51-501-6211-2008-2328-203 (hd1hd1Sd1Sd1) x F_2 -(BC_4F_1 -2255 x BC_3F_1 -2630)-605-1145 (hd1hd1sd1sd1))- 51R GH
12. F_1 -(BC_3F_4 -51-501-6211-1955-2421-201 (hd1hd1Sd1Sd1) x F_2 -(BC_4F_1 -2255 x BC_3F_1 -2630)-605-1145 (hd1hd1sd1sd1))- 51R GH
13. F_1 -(BC_3F_3 -144-1087-794-14(1)-204 (hd1hd1Sd1Sd1) x F_2 -(BC_4F_1 -2255 x BC_3F_1 -2630)-605-1145 (hd1hd1sd1sd1))- 51R GH
14. F_1 -(BC_3F_3 -144-1087-794-14(1)-204 (hd1hd1Sd1Sd1) x F_2 -(BC_4F_1 -2255 x BC_3F_1 -2630)-605-1196 (hd1hd1sd1sd1))- 51R GH
15. F_1 -(BC_3F_3 -144-1087-794-14(2)-304 (hd1hd1Sd1Sd1) x F_2 -(BC_4F_1 -2255 x BC_3F_1 -2630)-605-1196 (hd1hd1sd1sd1))- 51R GH
16. F_1 -(F_2 -(BC_4F_1 -2255 x BC_3F_1 -2630)-605-1168 (hd1hd1sd1sd1) x BC_3F_3 -84-448-7237-

1512(18)-804 (hd1hd1Sd1Sd1))- 51R GH

17. $F_1-(F_2-(BC_4F_1-2255 \times BC_3F_1-2630)-605-1123 (hd1hd1sd1sd1) \times BC_3F_3-84-448-7237-$

1512(18)-804(hd1hd1Sd1Sd1))- 51R GH

ถดู่ที่ 7.3 คัดเลือกต้น F_1 ที่มียีนโหวปเป็น Hd1hd1Sd1sd1 ที่ได้จากถดู่ที่ 6.2 ที่เกิดจากต้น $BC_5F_1-51-501-6211-2255-$ ที่มียีนโหวป Hd1hd1 และต้น $BC_4F_1-127-4121-2630-$ ที่มียีนโหวปเป็น Sd1sd1 และทำผสมตัวเองต้นที่คัดเลือกได้เพื่อผลิตเมล็ด F_2 ซึ่งเมล็ด F_2 มีรายละเอียดดังนี้

1. $F_2-(BC_5F_1-51-501-6211-2320-416(Hd1hd1Sd1Sd1) \times BC_4F_1-127-4121-2725-387(Hd1Hd1Sd1sd1))-1402$ มี 200 เมล็ด
2. $F_2-(BC_5F_1-51-501-6211-2320-416(Hd1hd1Sd1Sd1) \times BC_4F_1-127-4121-2725-387(Hd1Hd1Sd1sd1))-1403$ มี 800 เมล็ด
3. $F_2-(BC_5F_1-51-501-6211-2320-416(Hd1hd1Sd1Sd1) \times BC_4F_1-127-4121-2725-380(Hd1Hd1Sd1sd1))-1422$ มี 600 เมล็ด
4. $F_2-(BC_5F_1-51-501-6211-2320-405(Hd1hd1Sd1Sd1) \times BC_4F_1-127-4121-2725-380(Hd1Hd1Sd1sd1))-1455$ มี 800 เมล็ด
5. $F_2-(BC_5F_1-51-501-6211-2320-405(Hd1hd1Sd1Sd1) \times BC_4F_1-127-4121-2725-396(Hd1Hd1Sd1sd1))-1473$ มี 400 เมล็ด
6. $F_2-(BC_5F_1-51-501-6211-2320-405(Hd1hd1Sd1Sd1) \times BC_4F_1-127-4121-2725-396(Hd1Hd1Sd1sd1))-1478$ มี 500 เมล็ด
7. $F_2-(BC_5F_1-51-501-6211-2320-405(Hd1hd1Sd1Sd1) \times BC_4F_1-127-4121-2725-399(Hd1Hd1Sd1sd1))-1489$ มี 1000 เมล็ด
8. $F_2-(BC_5F_1-51-501-6211-2320-406(Hd1hd1Sd1Sd1) \times BC_4F_1-127-4121-2725-396(Hd1Hd1Sd1sd1))-1504$ มี 1000 เมล็ด
9. $F_2-(BC_5F_1-51-501-6211-2320-403(Hd1hd1Sd1Sd1) \times BC_4F_1-127-4121-2725-358(Hd1Hd1Sd1sd1))-1589$ มี 800 เมล็ด
10. $F_2-(BC_5F_1-51-501-6211-2320-412(Hd1hd1Sd1Sd1) \times BC_4F_1-127-4121-2630-350(Hd1Hd1Sd1sd1))-1543$ มี 300 เมล็ด
11. $F_2-(BC_5F_1-51-501-6211-2320-412(Hd1hd1Sd1Sd1) \times BC_4F_1-127-4121-2725-387(Hd1Hd1Sd1sd1))-1548$ มี 800 เมล็ด
12. $F_2-(BC_5F_1-51-501-6211-2320-412(Hd1hd1Sd1Sd1) \times BC_4F_1-127-4121-2725-$

- 387(Hd1Hd1Sd1sd1))-1549 มี 800 เมล็ด
13. F_2 - (BC₅F₁-51-501-6211-2320-414(Hd1hd1Sd1Sd1) x BC₄F₁-127-4121-2725-358(Hd1Hd1Sd1sd1))-1556 มี 1000 เมล็ด
14. F_2 - (BC₅F₁-51-501-6211-2320-414(Hd1hd1Sd1Sd1) x BC₄F₁-127-4121-2725-358(Hd1Hd1Sd1sd1))-1567 มี 100 เมล็ด
15. F_2 - (BC₅F₁-51-501-6211-2320-414(Hd1hd1Sd1Sd1) x BC₄F₁-127-4121-2725-358(Hd1Hd1Sd1sd1))-1571 มี 500 เมล็ด
16. F_2 - (BC₅F₁-51-501-6211-2320-414(Hd1hd1Sd1Sd1) x BC₄F₁-127-4121-2725-358(Hd1Hd1Sd1sd1))-1576 มี 30 เมล็ด
17. F_2 - (BC₅F₁-51-501-6211-2320-414(Hd1hd1Sd1Sd1) x BC₄F₁-127-4121-2725-358(Hd1Hd1Sd1sd1))-1592 มี 800 เมล็ด
18. F_2 - (BC₅F₁-51-501-6211-2320-414(Hd1hd1Sd1Sd1) x BC₄F₁-127-4121-2725-387(Hd1Hd1Sd1sd1))-1548 มี 800 เมล็ด
19. F_2 - (BC₄F₁-127-4121-2725-380(Hd1Hd1Sd1sd1) x BC₅F₁-51-501-6211-2320-403(Hd1hd1Sd1Sd1))-1444 มี 1000 เมล็ด
20. F_2 - (BC₄F₁-127-4121-2725-380(Hd1Hd1Sd1sd1) x BC₅F₁-51-501-6211-2320-403(Hd1hd1Sd1Sd1))-1448 มี 100 เมล็ด
21. F_2 - (BC₄F₁-127-4121-2725-399(Hd1Hd1Sd1sd1) x BC₅F₁-51-501-6211-2320-414(Hd1hd1Sd1Sd1))-1583 มี 400 เมล็ด
22. F_2 - (BC₄F₁-127-4121-2725-358(Hd1Hd1Sd1sd1) x BC₅F₁-51-501-6211-2320-412(Hd1hd1Sd1Sd1))-1614 มี 1000 เมล็ด
23. F_2 - (BC₄F₁-127-4121-2725-358(Hd1Hd1Sd1sd1) x BC₅F₁-51-501-6211-2320-412(Hd1hd1Sd1Sd1))-1615 มี 600 เมล็ด
24. F_2 - (BC₄F₁-127-4121-2725-358(Hd1Hd1Sd1sd1) x BC₅F₁-51-501-6211-2320-412(Hd1hd1Sd1Sd1))-1613 มี 200 เมล็ด
25. F_2 - (BC₄F₁-127-4121-2630-223(Hd1Hd1Sd1sd1) x BC₅F₁-51-501-6211-2320-402(Hd1hd1Sd1Sd1))-1634 มี 800 เมล็ด
26. F_2 - (BC₄F₁-127-4121-2630-223(Hd1Hd1Sd1sd1) x BC₅F₁-51-501-6211-2320-402(Hd1hd1Sd1Sd1))-1635 มี 100 เมล็ด
27. F_2 - (BC₄F₁-127-4121-2630-223(Hd1Hd1Sd1sd1) x BC₅F₁-51-501-6211-2320-

- 402(Hd1hd1Sd1Sd1))-1632 มี 1000 เมล็ด
28. F_2 - (BC_4F_1 -127-4121-2630-223(Hd1Hd1Sd1sd1) x BC_5F_1 -51-501-6211-2320-402(Hd1hd1Sd1Sd1))-1638 มี 50 เมล็ด
29. F_2 - (BC_4F_1 -127-4121-2630-223(Hd1Hd1Sd1sd1) x BC_5F_1 -51-501-6211-2320-402(Hd1hd1Sd1Sd1))-1639 มี 200 เมล็ด
30. F_2 - (BC_5F_1 -51-501-6211-2320-406 (Hd1hd1Sd1Sd1) x BC_1F_3 -127-4402-3020 Hd1Hd1sd1sd1))-1536 มี 1000 เมล็ด
31. F_2 - (BC_5F_1 -51-501-6211-2320-406 (Hd1hd1Sd1Sd1) x BC_1F_3 -127-4402-3020 Hd1Hd1sd1sd1))-1522 มี 1000 เมล็ด
32. F_2 - (BC_5F_1 -51-501-6211-2320-406 (Hd1hd1Sd1Sd1) x BC_1F_3 -127-4402-3020 Hd1Hd1sd1sd1))-1523 มี 500 เมล็ด
33. F_2 - (BC_5F_1 -51-501-6211-2320-406 (Hd1hd1Sd1Sd1) x BC_1F_3 -127-4402-3020 Hd1Hd1sd1sd1))-1525 มี 500 เมล็ด
34. F_2 - (กข 6 (Hd1Hd1Sd1Sd1) x (BC_4F_1 -51-501-6211-2255 x BC_3F_1 -127-4121-2630)-605)-1643 150
35. F_2 - (กข 6 Hd1Hd1Sd1Sd1) x (BC_4F_1 -51-501-6211-2255x BC_3F_1 -127-4121-2630)-609)
- กฎที่ 7.4** ผลิตเมล็ด F_1 ที่มีทั้งยีน sd1 และ hd1 อยู่ในต้นเดียวกันจาก BC_6F_1 -51-501-6211-2320-414-1692 (Hd1hd1Sd1Sd1) และ BC_6F_1 -51-501-6211-2320-414-1697 (Hd1Hd1Sd1sd1) ซึ่งได้มาจากโครงการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวต่อช่วงแสงฯ กับ BC_5F_1 -127-4121-2725-358-1690 (Hd1Hd1Sd1sd1) และ BC_5F_1 -127-4121-2725-358-1687 (Hd1Hd1Sd1sd1) ซึ่งได้มาจากโครงการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยฯ ซึ่งคุณสมบัติมารายละเอียดดังต่อไปนี้
1. F_1 -(BC_5F_1 -127-4121-2725-358-1690(Hd1Hd1Sd1sd1) x BC_6F_1 -51-501-6211-2320-414-1692(Hd1hd1Sd1Sd1)) 52D GH
 2. F_1 -(BC_5F_1 -127-4121-2725-358-1687(Hd1Hd1Sd1sd1) x BC_6F_1 -51-501-6211-2320-414-1692(Hd1hd1Sd1Sd1)) 52D GH
 3. F_1 -(BC_5F_1 -127-4121-2725-358-1690(Hd1Hd1Sd1sd1) x BC_6F_1 -51-501-6211-2320-414-1697(Hd1hd1Sd1Sd1)) 52D GH
 4. F_1 -(BC_5F_1 -127-4121-2725-358-1687(Hd1Hd1Sd1sd1) x BC_6F_1 -51-501-6211-2320-414-1697(Hd1hd1Sd1Sd1)) 52D GH

ฤดูที่ 8 แบ่งการทดลองเป็น 4 การทดลอง คือ

ฤดูที่ 8.1 ปลุกคัดเลือกสายพันธุ์ F_3 ที่ได้จากฤดูที่ 7.1 ในนาทดลอง (51R G1) และผสมตัวเองได้เมล็ด F_4 ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. F_4 - (BC₄F₁-51-501-6211-2255 x BC₃F₁-127-4121-2630)-605-1104-301
(hd1hd1sd1sd1) 51R G1
2. F_4 - (BC₄F₁-51-501-6211-2255 x BC₃F₁-127-4121-2630)-605-1123-302
(hd1hd1sd1sd1) 51R G1
3. F_4 - (BC₄F₁-51-501-6211-2255 x BC₃F₁-127-4121-2630)-605-1141-303
(hd1hd1sd1sd1) 51R G1
4. F_4 - (BC₄F₁-51-501-6211-2255 x BC₃F₁-127-4121-2630)-605-1145-304
(hd1hd1sd1sd1) 51R G1
5. F_4 - (BC₄F₁-51-501-6211-2255 x BC₃F₁-127-4121-2630)-605-1196-305
(hd1hd1sd1sd1) 51R G1
6. F_4 - (BC₄F₁-51-501-6211-2255 x BC₃F₁-127-4121-2630)-605-941(5)-306
(hd1hd1sd1sd1) 51R G1
7. F_4 - (BC₄F₁-51-501-6211-2255 x BC₃F₁-127-4121-2630)-605-941(6)-307
(hd1hd1sd1sd1) 51R G1

ฤดูที่ 8.2 ปลุกเมล็ด F_1 (hd1hd1sd1sd1) ที่ได้จากฤดู 7.2 ในสภาพวันยาวที่ให้ได้รับ 14 ชั่วโมงต่อวัน คัดเลือกเฉพาะต้นที่ออกดอกได้ในสภาพวันยาวเท่านั้น และผสมตัวเองได้เมล็ด F_2 ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. F_2 -(BC₅F₂-51-501-6211-2320-414-1238 x F_2 -(BC₄F₁-2255x BC3F1-2630)-605-1196)-1436 51R GH R2
2. F_2 -(BC₅F₂-51-501-6211-2320-414-1250 x F_2 -(BC₄F₁-2255x BC3F1-2630)-605-1196)-1441 51R GH R2
3. F_2 -(BC₅F₂-51-501-6211-2320-414-1262 x F_2 -(BC₄F₁-2255x BC3F1-2630)-605-1196)-1446 51R GH R2
4. F_2 -(BC₅F₂-51-501-6211-2320-414-1273 x F_2 -(BC₄F₁-2255x BC3F1-2630)-605-1196)-1451 51R GH R2
5. F_2 -(BC₅F₂-51-501-6211-2320-414-1280 x F_2 -(BC₄F₁-2255x BC3F1-2630)-605-1196)-1456 51R GH R2

6. F_2 -(BC_5F_2 -51-501-6211-2320-414-1286 x F_2 -(BC_4F_1 -2255x BC_3F_1 -2630)-605-1196)-
1461 51R GH R2
7. F_2 -(BC_5F_2 -51-501-6211-2320-414-1295 x F_2 -(BC_4F_1 -2255x BC_3F_1 -2630)-605-1196)-
1466 51R GH R2
8. F_2 -(BC_5F_2 -51-501-6211-2320-414-1274 x F_2 -(BC_4F_1 -2255x BC_3F_1 -2630)-605-1145)-
1471 51R GH R2
9. F_2 -(BC_5F_2 -51-501-6211-2320-414-1280 x F_2 -(BC_4F_1 -2255x BC_3F_1 -2630)-605-1145)-
1476 51R GH R2
10. F_2 -(BC_5F_2 -51-501-6211-2320-414-1295 x F_2 -(BC_4F_1 -2255x BC_3F_1 -2630)-605-1145)-
1481 51R GH R2
11. F_2 -(BC_3F_4 -51-501-6211-2008-2328-203 x F_2 -(BC_4F_1 -2255x BC_3F_1 -2630)-605-1145)-
1486 51R GH R2
12. F_2 -(BC_3F_4 -51-501-6211-1955-2421-201 x F_2 -(BC_4F_1 -2255x BC_3F_1 -2630)-605-1145)-
1491 51R GH R2
13. F_2 -(BC_3F_3 -144-1087-794-14(1)-204 x F_2 -(BC_4F_1 -2255x BC_3F_1 -2630)-605-1145)-
1496 51R GH R2
14. F_2 -(BC_3F_3 -144-1087-794-14(1)-204 x F_2 -(BC_4F_1 -2255x BC_3F_1 -2630)-605-1196)- 1501
51R GH R2
15. F_2 -(BC_3F_3 -144-1087-794-14(2)-304 x F_2 -(BC_4F_1 -2255x BC_3F_1 -2630)-605-1196)- 1506
51R GH R2
16. F_2 -(F_2 -(BC_4F_1 -2255x BC_3F_1 -2630)-605-1168 x BC_3F_3 -84-448-7237-1512(18)-804)-
1511 51R GH R2
17. F_2 -(F_2 -(BC_4F_1 -2255x BC_3F_1 -2630)-605-1123 x BC_3F_3 -84-448-7237-1512(18)-804)-
1516 51R GH R2

กฎที่ 8.3 คัดเลือกต้น F_1 จากกฎที่ 7.4 ที่มีฮีนไทป์เป็น Hd1hd1Sdsd1 และผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด F_2

1. F_2 -(BC_5F_1 -127-4121-2725-358-1690(Hd1Hd1Sd1sd1) x BC_6F_1 -51-501-6211-2320-414-1692(Hd1hd1Sd1Sd1))-
2. F_2 -(BC_5F_1 -127-4121-2725-358-1687(Hd1Hd1Sd1sd1) x BC_6F_1 -51-501-6211-2320-414-1692(Hd1hd1Sd1Sd1))-

3. F_2 -(BC_5F_1 -127-4121-2725-358-1690(Hd1Hd1Sd1sd1) x BC_6F_1 -51-501-6211-2320-414-1697(Hd1hd1Sd1Sd1))-
4. F_2 -(BC_5F_1 -127-4121-2725-358-1687(Hd1Hd1Sd1sd1) x BC_6F_1 -51-501-6211-2320-414-1697(Hd1hd1Sd1Sd1))-

โครงการวิจัยต่อเนื่องจากโครงการนี้จะนำเมล็ดที่ได้จาก ฤดูที่ 7.3 คือ F_2 ฤดูที่ 8.1 คือ F_4 ฤดูที่ 8.2 คือ F_2 และ ฤดูที่ 8.3 คือ F_2 ไปปลูกในแปลงนาในเดือนเมษายนซึ่งเป็นสภาพวันยาว ซึ่งจะคัดเลือกต้น กข 6 ต้นเตี้ยไม่ไวต่อช่วงแสงคือต้นที่ออกดอกได้ในสภาพวันยาว



6. การศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของอัลลีล *Sd1/sd1* ในข้าวโดยใช้ target marker

เพื่อให้แน่ใจว่าการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายได้ผล จึงต้องทำการศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของฟีโนไทป์ต้นสูง/ต้นเตี้ยว่าสอดคล้องกับยีน *Sd1/sd1* หรือไม่ โดยทำการศึกษาทั้งอัตราส่วนฟีโนไทป์ และยีนไทป์ของสายพันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์โครงการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยๆ

6.1 การทดสอบอัตราส่วนฟีโนไทป์ต้นสูง/ต้นเตี้ย และอัตราส่วนยีนไทป์ของยีน *Sd1/sd1* ของสายพันธุ์ BC₃F₂-127-4121-2745-2630

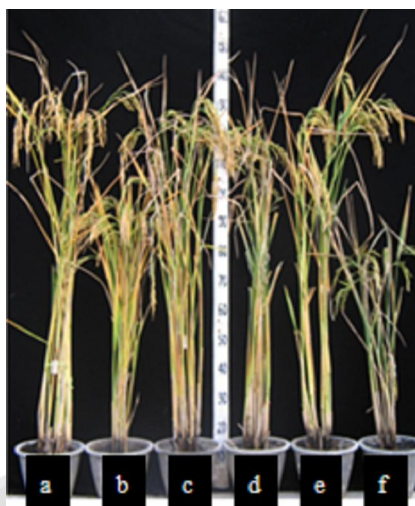
การทดสอบอัตราส่วนฟีโนไทป์สายพันธุ์ BC₃F₂-127-4121-2630-1609 จำนวน 65 ต้น ซึ่งมีความสูงระหว่าง 75-164 เซนติเมตร โดยจำรัส (2534) แบ่งความสูงต้นข้าวเป็น ข้าวต้นสูงที่มีความสูงมากกว่า 110 เซนติเมตร และข้าวต้นเตี้ยมีความสูงน้อยกว่า 110 เซนติเมตร จึงได้แบ่งความสูงต้นของข้าวทั้ง 65 ต้น ได้เป็น 2 แบบ คือ ข้าวต้นสูง (120-164 เซนติเมตร) มีจำนวน 53 ต้น และต้นเตี้ย (75-103 เซนติเมตร) มีจำนวน 12 ต้น (ภาพที่ 20) โดยมีสมมุติฐานว่า สายพันธุ์ BC₃F₂-127-4121-2630-1609 อัตราส่วนฟีโนไทป์จะต้องเท่ากับ 3/4 ต้นสูง: 1/4 ต้นเตี้ย จากผลการทดสอบพบว่าค่า $\chi^2 = 1.48$ ที่ได้จากการคำนวณนี้มีค่าน้อยกว่า $\chi^2 = 3.84$ จากตารางไค-สแควร์ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ df = 1 ดังนั้นอัตราส่วนฟีโนไทป์ของต้นข้าวสายพันธุ์ BC₃F₂-127-4121-2630-1609 เป็นไปตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 การทดสอบอัตราส่วนฟีโนไทป์ต้นสูง/ต้นเตี้ยของต้นข้าวสายพันธุ์ BC₃F₂-127-4121-2630-1609 โดยใช้วิธีทดสอบไค-สแควร์

สายพันธุ์	ฟีโนไทป์จากนาทดลองในฤดูนาปี 2550		
	ต้นสูง (120-164 เซนติเมตร) : ต้นเตี้ย (75-103 เซนติเมตร)		
	Expected value	Observed value	Chi-square ¹
BC ₃ F ₂ -127-4121-2630-1609	3:1	53:12	1.48 ^{ns}

หมายเหตุ ¹ การทดสอบอัตราส่วนฟีโนไทป์ ^{ns} ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ

ค่า $\chi^2 = 3.84$ จากตารางไค-สแควร์ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ df = 1

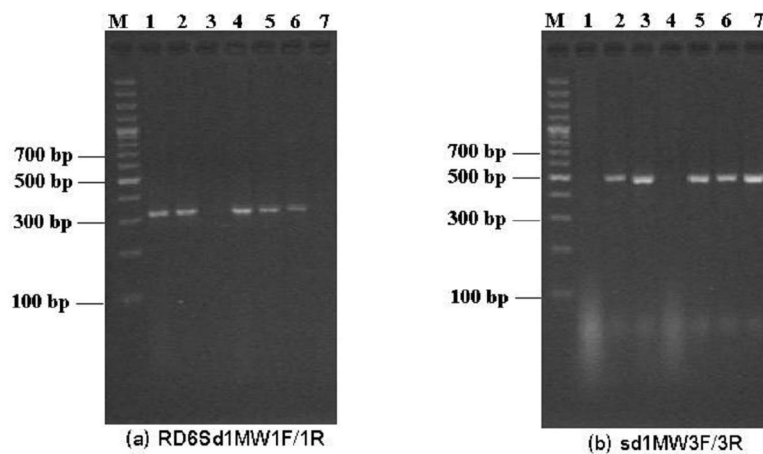


ภาพที่ 20 ต้นข้าวที่ปลูกในฤดูนาปี 2550 (a) ข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 ที่มีอีโนไทป์ Sd1Sd1 มีความสูง 158 เซนติเมตร (b) ข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 ที่มีอีโนไทป์ sd1sd1 มีความสูง 114 เซนติเมตร (c) ต้น BC₃F₂-127-4121-2630-1069(8) ที่มีอีโนไทป์ Sd1Sd1 มีความสูง 168 เซนติเมตร (d) ต้น BC₃F₂-127-4121-2630-1069(3) ที่มีอีโนไทป์ Sd1sd1 มีความสูง 137 เซนติเมตร (e) ต้น BC₃F₂-127-4121-2630-1069(4) ที่มีอีโนไทป์ Sd1sd1 มีความสูง 137 เซนติเมตร และ (f) ต้น BC₃F₂-127-4121-2630-1069(2) ที่มีอีโนไทป์ sd1sd1 มีความสูง 83 เซนติเมตร

6.2 การศึกษาอัตราส่วนอีโนไทป์ของยีน Sd1/sd1 ของต้นข้าวสายพันธุ์ BC₃F₂-127-4121-2745-2630

การหาอัตราส่วนอีโนไทป์ BC₃F₂-127-4121-2630-1609 จำนวน 65 ต้น โดยหลักเกณฑ์ คือ ต้นที่มีอีโนไทป์เป็น Sd1Sd1 เมื่อตรวจด้วย RD6Sd1MW1F/1R ที่เฉพาะกับอัลลีลเด่น Sd1 เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเป็น 327 คู่เบส เท่ากับแถบดีเอ็นเอของ กข 6 แต่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอเมื่อตรวจด้วย sd1MW3F/3R ส่วนต้นที่มีอีโนไทป์เป็น Sd1sd1 เมื่อตรวจด้วย RD6Sd1MW1F/1R เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเป็น 327 คู่เบส และเมื่อตรวจด้วย sd1MW3F/3R ที่เฉพาะกับอัลลีลด้อย sd1 เกิดแถบดีเอ็นเอเป็น 490 คู่เบส ส่วนต้นที่มีอีโนไทป์เป็น sd1sd1 เมื่อตรวจด้วย RD6Sd1MW1F/1R ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ แต่เมื่อตรวจด้วย sd1MW3F/3R เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเป็น 490 คู่เบส (ภาพที่ 21 (a) และ (b)) พบว่าข้าวสายพันธุ์ BC₃F₂-127-4121-2630-1609 มีจำนวน 65 ต้นมีความสูงอยู่ระหว่าง 75-164 เซนติเมตร โดยพบต้นข้าวที่มีอีโนไทป์เป็น Sd1Sd1 ที่มีความสูงอยู่ระหว่าง 138-164 เซนติเมตร มีจำนวน 16 ต้น ส่วนต้นข้าวที่มีอีโนไทป์เป็น Sd1sd1 ที่มีความสูงอยู่ระหว่าง 120-150 เซนติเมตร มีจำนวน 37 ต้น และต้นข้าวที่มีอีโนไทป์เป็น sd1sd1 ที่มีความสูงอยู่ระหว่าง 75-103 เซนติเมตร มีจำนวน 12 ต้น (ภาพที่ 20)

นำค่าสังเกตของแต่ละอีโนไทป์ของสายพันธุ์ BC₃F₂-127-4121-2630-1609 มาทดสอบด้วยไค-สแควร์ว่าเป็นไปตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดลหรือไม่ โดยมีสมมุติฐานว่า อัตราส่วนอีโนไทป์จะต้องเท่ากับ 1/4 Sd1Sd1: 2/4 Sd1sd1: 1/4 sd1sd1 จากผลการทดสอบอัตราส่วนอีโนไทป์ของสายพันธุ์ BC₃F₂-127-4121-2630-1609 มีค่า $\chi^2 = 1.74$ ที่ได้จากการคำนวณนี้มีค่าน้อยกว่า $\chi^2 = 5.99$ จากตารางไค-สแควร์ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ df=2 เป็นไปตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล (ตารางที่ 9) จากการศึกษาอัตราส่วนอีโนไทป์และอีโนไทป์ พบว่ามีความสอดคล้องกัน โดยข้าวต้นสูงคือข้าวที่มีความสูงมากกว่า 110 เซนติเมตร มีอีโนไทป์ 2 แบบ คือ Sd1Sd1 และ Sd1sd1 ส่วนข้าวต้นเตี้ยมีอีโนไทป์แบบเดียว คือ sd1sd1 (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 21 แสดงขนาดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เพื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์เมื่อใช้ (a) RD6Sd1MW1F/1R และ (b) sd1MW3F/3R เป็นไพรเมอร์ และดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่ใช้คือดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ต่างๆ โดยที่ M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder เลนที่ 1 คือแถบดีเอ็นเอของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 ซึ่งมีอีโนไทป์เป็น Sd1Sd1 เลนที่ 2 คือ F₁ ซึ่งมีอีโนไทป์เป็น Sd1sd1 เลนที่ 3 คือ ข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 ที่มีอีโนไทป์เป็น sd1sd1 เลนที่ 4 คือต้น BC₃F₂-127-4121-2630-1609(8) ที่มีอีโนไทป์เป็น Sd1Sd1 เลนที่ 5 คือต้น BC₃F₂-127-4121-2630-1609(3) ที่มีอีโนไทป์เป็น Sd1sd1 เลนที่ 6 คือต้น BC₃F₂-127-4121-2630-1609(4) ที่มีอีโนไทป์เป็น Sd1sd1 เลนที่ 7 คือต้น BC₃F₂-127-4121-2630-1609(2) ที่มีอีโนไทป์เป็น sd1sd1

ตารางที่ 9 การทดสอบอัตราส่วนยีนในไทป์ของยีน $Sd1/sd1$ ของต้นข้าวสายพันธุ์ BC_3F_2 -127-4121-2630-1609 โดยใช้วิธีทดสอบไค-สแควร์

สายพันธุ์	ยีนในไทป์ $Sd1Sd1: Sd1sd1: sd1sd1$		
	Expected value	Observed value	Chi-square ²
BC_3F_2 -127-4121-2630-1609	1:2:1	16:37:12	1.74 ^{ns}

หมายเหตุ ²การทดสอบอัตราส่วนยีนในไทป์ ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ
ค่า $\chi^2 = 5.99$ จากตารางไค-สแควร์ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ $df=2$



วิจารณ์ผล

การปรับปรุงพันธุ์ให้ข้าวพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยโดยวิธีผสมกลับ และใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยในการคัดเลือก ได้พัฒนาไพรเมอร์ sd1MW3F/3R เป็น target marker ที่เฉพาะกับอัลลีลด้อย sd1 ของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 ส่วนไพรเมอร์ RD6Sd1MW1F/1R เป็น target marker ที่เฉพาะกับอัลลีลเด่น Sd1 ซึ่งโมเลกุลเครื่องหมายทั้งสองออกแบบมาจากลำดับเบสที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน Sd1/sd1 จึงเป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่คัดเลือกได้อย่างมีประสิทธิภาพกว่าโมเลกุลเครื่องหมายที่ยึดติด (linked) กับยีน ตัวอย่างเช่น Cho *et al.* (1994) ที่ได้ทำการหาโมเลกุลเครื่องหมายชนิด RFLP ที่ linked กับยีนในตำแหน่ง Sd1/sd1 คือ RG109 และ RG220 โดยห่างจากตำแหน่งของยีน Sd1/sd1 เท่ากับ 0.8 cM และ 0.8 cM ตามลำดับ ส่วน Maeda *et al.* (1997) ได้พัฒนา PCR based marker ที่ linked กับอัลลีลด้อย sd1 จาก RG109 และ RG220 มีระยะห่างจากอัลลีลด้อย sd1 เป็น 0.3 cM และ 0.9 cM ตามลำดับ

จากการคัดเลือก background marker ที่กระจายอย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งโครโมโซม 12 แท่ง เพื่อใช้ตรวจเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ได้ background marker จำนวน 69 ตำแหน่ง ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง กข 6 กับ กข 1 ได้ โดยแต่ละ marker ห่างกันเฉลี่ยประมาณ 26.4 cM ซึ่งใกล้เคียงกับที่ Ribaut *et al.* (2002) รายงานว่าควรใช้ background marker ที่กระจายกันอย่างสม่ำเสมอทั่วโครโมโซม โดยแต่ละ marker ห่างกันเฉลี่ยประมาณ 20 cM

การปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข 6 ให้ต้นเตี้ย โดยใช้วิธีผสมกลับและใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกได้ทำการผสมกลับทั้งหมด 4 ครั้ง ซึ่งจำนวนครั้งของการผสมตัวเองเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ต้องการใกล้เคียงกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของ Chen *et al.* (2000) ซึ่งปรับปรุงพันธุ์ให้ข้าวพันธุ์ Minghui 63 มีความต้านทานต่อ bacterial blight โดยที่ target gene คือ Xa21 ที่ได้จากข้าวพันธุ์ IRBB21 มี target marker คือ 21 และ 248 ซึ่งเป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน และมี flanking marker คือ C189 และ AB9 ซึ่งขนานทั้ง 2 ข้างของยีน Xa21 และห่างจากยีนนี้ 0.8 และ 3.0 cM ตามลำดับ ใช้ background marker ชนิด RFLP จำนวน 128 ตำแหน่งคัดเลือkdต้น BC₃F₁ โดยทำการผสมกลับเพียง 3 ครั้ง และผสมตัวเองอีกหนึ่งครั้งก็ได้ต้นที่ต้านทานโรค bacterial blight ตามต้องการ นอกจากนี้ Zhou *et al.* (2003) ใช้ MAB ปรับปรุงพันธุ์ข้าว Zhenshan 97 ให้มีคุณภาพในการหุงต้มและรับประทานให้ดีขึ้น (cooking and eating quality) ซึ่งพบว่าลักษณะเหล่านี้ถูกควบคุมด้วย Waxy locus และ tightly linked genomic region โดยมี Minghui 63 เป็นพันธุ์ให้ยีน (wx-MH) การปรับปรุงพันธุ์ใช้การผสมกลับ 3 ครั้ง และทำการผสมตัวเองหนึ่งครั้งจึงได้ต้นที่มีคุณภาพในการหุงต้มและรับประทานที่ต้องการ โมเลกุล

เครื่องหมายที่ใช้คัดเลือก target marker คือ SSR marker waxy, flanking marker 1 คือ C952, flanking marker 2 คือ C688 และ background marker ชนิด AFLP จำนวน 22 คู่ซึ่งทำให้เกิด polymorphic band ระหว่างพันธุ์รับและพันธุ์ให้จำนวน 118 polymorphic band ส่วน Liu *et al.* (2006) ใช้ MAB ปรับปรุงคุณภาพในการหุงต้มและรับประทานของข้าวจำนวน 2 พันธุ์ต้องทำการผสมกลับทั้งหมด 4 ครั้ง และผสมตัวเองอีก 2 ครั้งจึงได้ต้นที่ต้องการ ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ใกล้เคียงกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข 6 ต้นเดียวของโครงการนี้ ซึ่งทำการผสมกลับทั้งหมด 4 ครั้ง

การศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน *Sd1/sd1* ของข้าวสายพันธุ์ BC₃F₂-127-4121-2630-1609 พบว่าอัตราส่วนฟีโนไทป์และยีนไทป์ของ BC₃F₂-127-4121-2630-1609 เป็น 3:1 และ 1:2:1 ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Monna *et al.* (2002) ที่ได้ศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ของความสูงต้นข้าวของประชากรที่มีการกระจายตัวของยีน *Sd1/sd1* (segregating population, SBIL5) ของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ Habataki และข้าวต้นสูงพันธุ์ Sasanishiki พบว่าจากประชากรจำนวน 263 ต้นมีความสูงอยู่ระหว่าง 60-120 เซนติเมตร พบว่าอัตราส่วนของต้นข้าวที่มีความสูง 85-120 เซนติเมตรต่อต้นข้าวที่มีความสูง 60-85 เซนติเมตร เท่ากับ 3:1 ซึ่งเป็นไปตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล

สรุปผล (Summary)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ย โดยวิธีปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับ โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก โดยมีพันธุ์รับ (recipient parent) คือข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 ซึ่งที่ตำแหน่งของยีน *Sd1/sd1* มียีนไทป์เป็น Sd1Sd1 และพันธุ์ให้ (donor parent) คือข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 ซึ่งที่ตำแหน่งของอัลลีล *Sd1/sd1* มียีนไทป์เป็น sd1sd1 เริ่มจากการหา target marker, flanking marker และ background marker เพื่อใช้ช่วยคัดเลือกต้นที่มียีนไทป์ที่ต้องการ ผลการหา target marker ได้ไพรเมอร์ RD6Sd1MW1F/1R และ sd1MW3F/3R โดยที่ไพรเมอร์ RD6Sd1MW1F/1R เฉพาะกับอัลลีลเด่น *Sd1* ของข้าวพันธุ์ กข 6 เมื่อใช้ไพรเมอร์นี้ทำพีซีอาร์เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 327 คู่เบสเฉพาะในข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และ F₁ (กข 6 x กข 1) ส่วนในข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ส่วนไพรเมอร์ sd1MW3F/3R เฉพาะกับอัลลีลด้อย *sd1* ของข้าวพันธุ์ กข 1 เมื่อใช้ไพรเมอร์ sd1MW3F/3R ทำพีซีอาร์เกิดแถบดีเอ็นเอของข้าว กข 6 F₁ (กข 6xกข 1) และ กข 1 เพียงแถบเดียวมีขนาด 873 คู่เบส 490 คู่เบส และ 490 คู่เบส ตามลำดับ ดังนั้นการตรวจสอบว่าข้าวต้นใดมียีนไทป์เป็น Sd1sd1 จำเป็นต้องใช้ทั้งไพรเมอร์ที่เฉพาะกับอัลลีลเด่น *Sd1* คือ RD6Sd1MW1F/1R ซึ่งทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 327 คู่เบส และ

เมื่อใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะกับอัลลีลด้วย *sd1* คือ *sd1MW3F/3R* ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 490 คู่เบส ส่วนต้นข้าวที่มียีนไทป์เป็น *Sd1Sd1* เมื่อใช้ไพรเมอร์ *RD6Sd1MW1F/1R* เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 327 คู่เบส และเมื่อใช้ไพรเมอร์ *sd1MW3F/3R* ไม่มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น ส่วนต้นข้าวที่มียีนไทป์เป็น *sd1sd1* เมื่อใช้ไพรเมอร์ *RD6Sd1MW1F/1R* ไม่มีแถบเกิดขึ้น และเมื่อใช้ไพรเมอร์ *sd1MW3F/3R* มีแถบดีเอ็นเอขนาด 490 คู่เบส

การหา flanking marker จำนวน 2 ตำแหน่ง คือ flanking marker 1 และ flanking marker 2 เพื่อใช้คัดเลือกหาต้นข้าวที่มีจำนวนของอัลลีลที่ไม่ต้องการที่ติดมาจากพันธุ์ให้ (donor parent) น้อยที่สุด ผลการหา flanking marker 1 ได้ RM1339 (บนโครโมโซมที่ 1 ที่ 147.5 cM) ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันระหว่างของข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 กับของข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 เมื่อตรวจสอบด้วย 6% acrylamide gel electrophoresis โดยพบว่าแถบดีเอ็นเอของ กข 6 และ กข 1 มีอย่างละ 3 แถบ แต่แถบดีเอ็นเอของ กข 1 อยู่สูงกว่าของ กข 6 ส่วนแถบดีเอ็นเอของ F_1 นั้นมี 6 แถบ และมีขนาดเท่ากับของ กข 6 และ กข 1 ส่วนการหา flanking marker 2 ได้ RM 3375 (บนโครโมโซมที่ 1 ที่ 155.1 cM) ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันระหว่างของข้าวพันธุ์ กข 6 และ กข 1 เมื่อตรวจสอบด้วย 4% agarose gel electrophoresis โดยพบว่าแถบดีเอ็นเอของทั้ง กข 6 และ กข 1 มีเพียงอย่างละ 1 แถบ โดยที่แถบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ กข 6 อยู่ต่ำกว่า กข 1 ส่วนแถบดีเอ็นเอของ F_1 นั้นมี 2 แถบ โดยมีขนาดเท่ากับของข้าวพันธุ์ กข 6 และ กข 1

การหา background marker ที่กระจายอยู่บนโครโมโซมทั้ง 12 แท่ง เพื่อใช้ตรวจหาต้นข้าวที่เปอร์เซ็นต์ยีนไทป์เหมือนกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มากที่สุด ทำโดยเลือก SSR marker ทั้งหมด 152 ตำแหน่งที่กระจายอยู่ทั่วโครโมโซมทั้ง 12 แท่ง จาก Genetic : Rice-Cornell SSR 2001 และ QTL:Rice-TKU Integrated QTL 2002 (http://www.gramene.org/db/cmap/map_search) ผลของการคัดเลือก SSR marker จำนวน 152 ตำแหน่ง พบ SSR marker ที่ให้แถบดีเอ็นเอมีขนาดที่ต่างกันระหว่างข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 จำนวน 69 ตำแหน่ง SSR marker เหล่านี้ใช้เป็น background marker ซึ่งแบ่งเป็น background marker ที่อยู่บน target chromosome (โครโมโซมที่ 1) จำนวน 6 ตำแหน่ง และ อยู่บน non-target chromosome (โครโมโซมที่ 2-12) จำนวน 6 6 6 6 10 4 5 5 4 7 และ 4 ตำแหน่ง

การผสมพันธุ์ข้าว และการคัดเลือกต้นข้าวด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย เพื่อให้ได้สายพันธุ์ กข 6 ต้นเตี้ย ให้ต้นเตี้ยมีพันธุ์รับ (recipient parent) คือข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6 และที่ตำแหน่งของยีน *Sd1/sd1* มียีนไทป์เป็น *Sd1Sd1* ส่วนพันธุ์ให้ (donor parent) คือข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1 และที่ตำแหน่งของอัลลีล *Sd1/sd1* มียีนไทป์เป็น *sd1sd1* แผนการผสมพันธุ์ และการคัดเลือกต้นข้าว โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายทำทั้งหมด 7 ฤดู คือ ฤดูที่ 1 การผลิตเมล็ด F_1 , ฤดูที่ 2 การคัดเลือกต้น

F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และการผลิตเมล็ด BC_1F_1 , ฤดูที่ 3 การคัดเลือกต้น BC_1F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_2F_1 , ฤดูที่ 4 การคัดเลือกต้น BC_2F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_3F_1 , ฤดูที่ 5 การคัดเลือกต้น BC_3F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_4F_1 , ฤดูที่ 6 การคัดเลือกต้น BC_4F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_5F_1 และ ฤดูที่ 7 การคัดเลือกต้น BC_5F_1 ด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย และผลิตเมล็ด BC_6F_1 ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข 6 ให้ต้นเตี้ยโดยวิธีผสมกลับและใช้โมเลกุลเครื่องหมายมาช่วยในการคัดเลือกประสบผลสำเร็จใน ฤดูที่ 6 เพราะได้ต้น BC_4F_1 -127-4121-2630-358 ที่มีตำแหน่งของอัลลีล *Sd1/sd1* มีอีโนไทป์เป็น *Sd1sd1* อีกทั้งยังเป็นต้นที่มีตำแหน่งของ flanking marker 1 คือ RM1339 (147.5 cM) และ flanking marker 2 คือ RM3375 (155.1 cM) เป็นโฮโมไซกัสของอัลลีล กข 6 และเมื่อตรวจด้วย background marker ที่อยู่บน non-target chromosome (โครโมโซมที่ 2-12) ทั้ง 63 ตำแหน่งมีอีโนไทป์เหมือนกับ กข 6 เท่ากับ 100 เปอร์เซนต์ เมื่อตรวจด้วย background marker ที่อยู่บน target chromosome (โครโมโซมที่ 1) จำนวน 6 ตำแหน่งพบต้นนี้มีเปอร์เซ็นต์อีโนไทป์เหมือนกับ กข 6 เท่ากับ 100 เปอร์เซนต์

เพื่อให้แน่ใจว่าการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายได้ผล จึงต้องทำการศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของอีโนไทป์ต้นสูง/ต้นเตี้ยว่าสอดคล้องกับอีโนไทป์ของยีน *Sd1/sd1* หรือไม่ โดยทำการศึกษาทั้งอัตราส่วนอีโนไทป์ และอีโนไทป์ของสายพันธุ์ที่ได้จากการโครงการปรับปรุงข้าวพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยๆ ส่วนการศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีน *Sd1/sd1* ของข้าวสายพันธุ์ BC_3F_2 -127-4121-2630-1609 พบว่าอัตราส่วนอีโนไทป์ของ BC_3F_2 -127-4121-2630-1609 เท่ากับ 3/4 ต้นสูง (120-164 เซนติเมตร) : 1/4 ต้นเตี้ย (75-103 เซนติเมตร) และอัตราส่วนอีโนไทป์ของ BC_3F_2 -127-4121-2630-1609 เท่ากับ 1/4 *Sd1Sd1* : 2/4 *Sd1sd1* : 1/4 *sd1sd1* ตามลำดับซึ่งเป็นไปตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล โดยพบว่าต้นเตี้ยจำนวน 12 ต้นจากต้นทั้งหมด 65 ต้นมีความสูงระหว่าง 75-103 เซนติเมตรและมีอีโนไทป์เป็น *sd1sd1* เท่านั้น แสดงว่าโมเลกุลเครื่องหมายที่พัฒนาขึ้นเพื่อคัดเลือกอีโนไทป์สามารถใช้คัดเลือกอีโนไทป์ที่ต้องการได้

เนื่องจากโครงการ “ปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ย โดยวิธีปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก” ซึ่งได้รับทุนวิจัยจากสำนักวิจัย และส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (2550-2551) และโครงการ “ปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี molecular marker-assisted backcrossing” ซึ่งได้รับทุนวิจัยจากศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (2547-2550) เป็นโครงการที่ทำในระยะเวลาใกล้เคียงกัน ดังนั้นเมื่อได้สายพันธุ์ กข 6 ต้นเตี้ย และสายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสงที่ได้มาจากโครงการทั้ง 2 ตามลำดับ จึงนำมาผสมพันธุ์กันเพื่อให้ได้เมล็ด F_1 ต่อจากนั้นทำการคัดเลือกด้วย

โมเลกุลเครื่องหมายเพื่อให้ได้ต้น F_1 ที่มีทั้งยีนด้วย $sd1$ และ $hd1$ และทำการผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด F_2 ซึ่งมีการกระจายตัวของยีนทำให้พบต้น F_2 ที่มีอีโนไทป์เป็น $sd1sd1hd1hd1$ เกิดขึ้นซึ่งมีอีโนไทป์เป็นข้าวต้นเตี้ยไม่ไวต่อช่วงแสง เมื่อนำต้น F_2 ไปปลูกในสภาพวันยาวในเดือนเมษายนก็จะสามารถคัดเลือกต้น F_2 ที่มีอีโนไทป์เป็นต้นเตี้ยไม่ไวต่อช่วงแสงซึ่งมีอีโนไทป์เป็น $sd1sd1hd1hd1$ ได้ ซึ่งจะเป็นโครงการต่อเนื่องจากโครงการนี้ เมล็ดที่ผลิตได้ซึ่งจะนำไปปลูกในเดือนเมษายนที่เป็นสภาพวันยาวมีดังนี้ (1) เมล็ด F_2 ที่เกิดจากการผสมตัวเองของต้น F_1 ซึ่งเกิดจากการผสมกันระหว่างต้น BC_5F_1 -51-501-6211-2255- ที่มีอีโนไทป์ $Hd1hd1$ และต้น BC_4F_1 -127-4121-2630- ที่มีอีโนไทป์เป็น $Sd1sd1$ เมล็ด ได้ F_2 ทั้งหมด 35 ประชากร โดยที่ประชากรเหล่านี้มีการกระจายตัวของยีน $Hd1/hd1$ และ $Sd1/sd1$ เป็นไปตามกฎข้อที่ 2 ของเมนเดล (2) เมล็ด F_2 ที่เกิดจากต้น F_1 ที่มีอีโนไทป์เป็น $hd1hd1Sd1sd1$ ที่ปลูกในสภาพวันยาวที่ได้รับ 14 ชั่วโมงต่อวัน คัดเลือกเฉพาะต้นที่ออกดอกได้ในสภาพวันยาวเท่านั้น และผสมตัวเองได้เมล็ด F_2 จำนวน 21 ประชากรซึ่งมีการกระจายตัวของยีน $Sd1/sd1$ เท่านั้นซึ่งจะเป็นไปตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล (3) เมล็ด F_4 จำนวน 7 สายพันธุ์ที่มีอีโนไทป์เป็น $hd1hd1sd1sd1$ และ (4) เมล็ด F_2 ที่เกิดจากต้น F_1 ที่มีอีโนไทป์เป็น $Hd1hd1Sd1sd1$ ซึ่งต้น F_1 เกิดจากการผสมกันระหว่างต้น BC_5F_1 จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยๆ กับต้น BC_6F_1 จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวต่อช่วงแสง

เอกสารอ้างอิง (Reference of Literature cited)

- กรมวิชาการเกษตร. 2546. ข้าวและธัญพืชเมืองหนาวพันธุ์ดี 30 ปีกรมวิชาการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 87-88 น.
- กรมวิชาการเกษตร. 2546. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปีเพาะปลูก 2544/45 เอกสารวิชาการ ข้าว และธัญพืชเมืองหนาวพันธุ์ดี.
- ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติและสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. 2544. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับข้าวไทย. 153 น.
- เอกสงวน ชูวิสิฐกุล. 2542. เอกสารแนะนำข้าวและธัญพืชเมืองหนาวพันธุ์ดี 75 พันธุ์. ฝ่ายถ่ายทอดเทคโนโลยีสถาบันวิจัยข้าว. 29 น.
- Allard, R.W. 1960. Principles of Plant Breeding. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Chen S, Lin XH, Xu CG, Zhang Q .2000. Improvement of bacterial blight resistance of 'Minghui 63', an elite restorer line of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection. Crop Sci 40:239-244.
- Chen S, Xu CG, Lin XH, Zhang Q. 2001. Improving bacterial blight resistance of '6078', an elite restorer line of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection. Plant Breeding 120 :133-137.
- Cheng TT, Zuro C, Marciano-romena A, Loresto GC. 2001. Semidwarfing genes in rice germplasm collection, International Rice Research Institute, Manila, Phillippines. <http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/rgn/vol1/v1i3.html> (12 November 2004)
- Cho YG, Eun MY, McCouch SR, Chae YA .1994. The semidwarf gene, *sd-1*, of rice (*Oryza sativa* L.). II. Molecular mapping and marker-assisted selection. Theor Appl Genet 89 : 54-59.
- Hospital F. 2001. Size of donor chromosome segments around introgressed loci and reduction of linkage drag in marker-assisted backcross programs. Genetics 158: 1363-1379.
- Decoux G, Hospital F. 2002. Popmin: a program for the numerical optimization of population sizes in marker-assisted backcross programs. The Journal of Heredity. 93:383-384.
- Liu Q-Q, Li Q-F, Cai X-L, Wang H-M, Tang S.-Z, Yu H.-X, Wang Z.-Y, Gu M-H. 2006.

- Molecular marker-assisted selection for improved cooking and eating quality of two elite parents of hybrid rice. *Crop Sci.* 46: 2354-2360.
- Maeda H, Ishii T, Mori H, Kuroda J, Horimoto M, Takamure I, Kinoshita T, Kamijima O. Breeding Sci. High density molecular map of semidwarfing gene, *sd-1*, in rice. *Breeding Sci* 47:317–320.
- Matsuoka M, Ashikari M. 2003. Molecular breeding of architecture of the rice plant , Bio Science Center, Nagoya University Japan : 464-8601. [Online]. Available. <http://rgp.dna.affrc.go.jp/rgp/rgmXI/Forum2003/Abstract.htm#5> (12 November 2004)
- McCouch SR, Teytelman L, Xu Y, Lobos KB, Clare K, Walton M, Fu B, Maghirang R, Li Z, Xing Y, Zhang Q, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartinhour S, Ware D, Stein L. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.* 9:199–207.
- Minobe Y. 2002. Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd-1* : rice “ green revolution gene” encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis . *DNA Research* 9 : 11-17.
- Monna L, Kitazawa N, Yoshino R, Suzuki J, Masuda H, Maehara Y, Tanji M, Sato M, Nasu S, Minobe Y. 2002. Positional cloning of rice semidwarfing gene, *sd-1*: rice “green revolution gene” encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. *DNA Res.* 9: 11-17.
- Motoyuki A, Makoto M. 2002. Isolation and characterization of rice green revolution gene, *sd-1* (semi-dwarf 1). Bioscience center, Nagoya Univ., Chikusa, Nagoya, Aichi, Japan 464-860. [Online]. Available. http://www.intl-pag.org/10/abstracts/PAGX_W286.html (12 November 2004)
- Newbury HJ. 2003. *Plant Molecular Breeding*. Wiley-Blackwell. 320 p.
- Ribaut JM, Jiang C, Hoisington D. 2002. Simulation experiments on efficiencies of gene introgression by backcrossing. *Crop Sci* 42 : 557-565.
- Schomburg FM, Bizzell CM, Lee DJ, Zeevaart JAD, Amasino RM. 2003. Overexpression of a novel class of Gibberellin 2-Oxidases decreases gibberellin levels and

creates dwarf plants. *The Plant Cell* 15 :151-163.

Spielmeyer W, Ellis MH, Chandler PM. 2002. Semidwarf (*sd-1*), “green revolution” rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proc Natl Acad Sci* 99: 9043–9048.

Tanksley SD, Young ND, Paterson AH, Bonierbale MW. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Bio/Technology* 7 : 257-264.

Young ND, Tanksley SD. 1989. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the *Tm-2* locus of tomato during backcross breeding. *Theor Appl Genet* 77 : 353-359.

Zhou PH, Tan YF, He YQ, Xu CG, Zhang Q. 2003. Simultaneous improvement for four quality traits of Zhenshan 97, an elite parent of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection. *Theor Appl Genet* 106 : 326-331.

<http://www.geocities.com/psplant/rice.html> (1 พฤศจิกายน 2547)

<http://oae.go.th> (1 พฤศจิกายน 2547)

<http://www.rdi.ku.ac.th/troprice/th/cariety.htm> (1 พฤศจิกายน 2547)

http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi (2 มกราคม 2551)

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi> (15 มกราคม 2551)

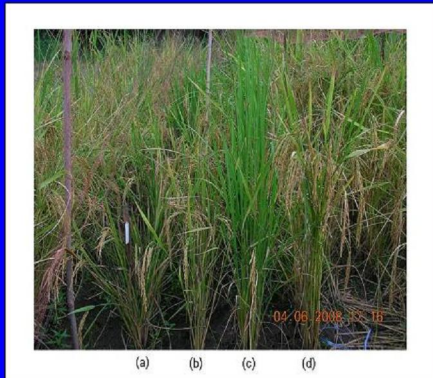
http://www.gramene.org/db/cmap/map_search (15 มกราคม 2551)

ภาพภาคผนวก

ของ

โครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ย โดยวิธีปรับปรุง
พันธุ์แบบผสมกลับโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก

โครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี
molecular marker-assisted backcrossing เพื่อปลูกในฤดูนาปรัง



- ฤดูนาปรัง 2551
- (a) ข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง พันธุ์ กข 10
- (b) ข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง กันปล่อง 1
- (c) ข้าวไวต่อช่วงแสงพันธุ์ กข 6
- (d) สายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสง

ภาพผนวกที่ 1 โครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวแสงโดยวิธี molecular marker-assisted backcrossing เพื่อปลูกในฤดูนาปรัง

สายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสงที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์



- ปลูกข้าวให้ได้รับแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน
- (a) พันธุ์รับ คือ ข้าวเหนียวไวต่อช่วงแสง พันธุ์ กข 6 มีอีโบบีเป็น hsd1hd1
- (b) ต้นข้าว BC_4F_2 ที่มีอีโบบีเป็น hsd1hd1 ที่ได้จากปรับปรุงพันธุ์ข้าวพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวต่อช่วงแสง
- (c) พันธุ์ให้ คือ ข้าวเจ้าไม่ไวต่อช่วงแสงพันธุ์ Taichung 65 มีอีโบบีเป็น hsd1hd1

ภาพผนวกที่ 2 สายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสงที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์

สายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสง และพันธุ์ข้าวเปรียบเทียบ



- ปลูกรับแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน
- (a) ข้าวไม่ไวต่อช่วงแสงพันธุ์ Taichung 65
- (b) สายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสง
- (c) ข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง พันธุ์ กข 10
- (d) ข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง สันป่าตอง 1

ภาพผนวกที่ 3 สายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสง และพันธุ์ข้าวเปรียบเทียบ

การปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยโดยวิธี marker-assisted backcrossing



- อรรถสิทธิ์ แสงทอง
- ศุภางค์ พิทยพิทักษ์
- ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์
- ยุพเยาว์ คบพิมาย
 - ภาควิชาชีววิทยา ม.แม่โจ้
- ประวิตร พุทธานนท์
- เรืองชัย ภูวัฒน์สำราญ
 - ภาควิชาพืชไร่ ม.แม่โจ้
- สุนันทา วงศ์ปิยะชน
 - ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี

ภาพผนวกที่ 4 การปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเตี้ยโดยวิธี marker-assisted backcrossing

ทำไมต้องต้นเดี่ยว



ภาพผนวกที่ 5 ทำไมต้องต้นเดี่ยว

สายพันธุ์ กข 6 ต้นเดี่ยว



- (a) พันธุ์รับ คือ ข้าวต้นสูงพันธุ์ กข 6
มียีนไทป์เป็น Sd1Sd1
- (b) ต้น BC₄F₂-127-4121-2630-358-1308
มียีนไทป์เป็น sd1sd1 ได้จากโครงการ
ปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเดี่ยว
- (c) พันธุ์ให้ คือ ข้าวต้นเตี้ยพันธุ์ กข 1
มียีนไทป์เป็น sd1sd1

ภาพผนวกที่ 6 สายพันธุ์ กข 6 ต้นเดี่ยว

การกระจายตัวของประชากร BC_4F_2



- (a) ต้น BC_4F_2 -127-4121-2630-358-1336
มียีนไทป์เป็น $sd1sd1$ ต้นสูง
- (b) ต้น BC_4F_2 -127-4121-2630-358-1305
มียีนไทป์เป็น $sd1sd1$ ต้นสูง
- (c) ต้น BC_4F_2 -127-4121-2630-358-1335
มียีนไทป์เป็น $sd1sd1$ ต้นสูง
- (d) ต้น BC_4F_2 -127-4121-2630-358-1308
มียีนไทป์เป็น $sd1sd1$ ต้นเตี้ย

ภาพผนวกที่ 7 การกระจายตัวของประชากร BC_4F_2

การปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวต่อช่วงแสงและต้นเตี้ย molecular marker-assisted backcrossing



Non-photoperiod Sensitive
Glutinous RD 6 line
 $hd1hd1$

Semidwarf and
Non-photoperiod Sensitive
Glutinous RD 6 Rice Line
 $hd1hd1sd1sd1$

ภาพผนวกที่ 8 การปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวต่อช่วงแสงและต้นเตี้ย molecular marker-assisted backcrossing

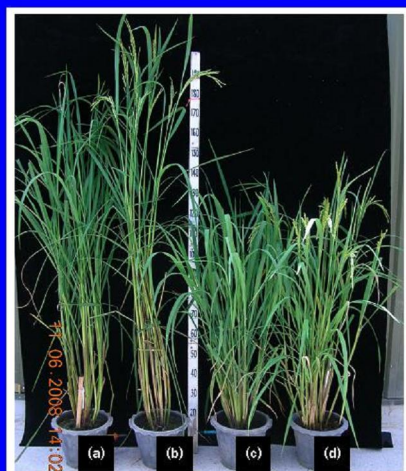
สายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสง และ สายพันธุ์ กข 6 ต้นเดี่ยว



- (a) ต้น BC₂F₁-414 (Hd1hd1)
-ที่ได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวต่อช่วงแสง
- (b) BC₂F₁-358 (Sd1sd1)
-ที่ได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ต้นเดี่ยว

ภาพผนวกที่ 9 สายพันธุ์ กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสง และ สายพันธุ์ กข 6 ต้นเดี่ยว

กระจายตัวของต้น F₂ ที่เกิดจากต้น F₁ ที่มีฮิโนไทป์เป็น Hd1hd1Sd1sd1 ตามกฎข้อ 2 ของเมนเดล



- ปลูกข้าวให้ได้รับแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน
- (a) ต้น F₂ ที่มีฮิโนไทป์ Hd1Hd1Sd1Sd1
- (b) ต้น F₂ ที่มีฮิโนไทป์ hd1hd1Sd1Sd1
- (c) ต้น F₂ ที่มีฮิโนไทป์ Hd1Hd1sd1sd1
- (d) ต้น F₂ ที่มีฮิโนไทป์ hd1hd1sd1sd1

ภาพผนวกที่ 10 กระจายตัวของต้น F₂ ที่เกิดจากต้น F₁ ที่มีฮิโนไทป์เป็น Hd1hd1Sd1sd1 ตามกฎข้อ 2 ของเมนเดล