การพัฒนาพันธุ์ข้าวปทุมธานี 1 ให้ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย

DEVELOPMENT OF PATHUM THANI1 RICE TO RESIST BROWN PLANTHOPPER USING MARKER ASSISTED SELECTION

เจตน์คชฤกษ์ [1)] ภมร ปัตตาวะตัง [1)] สุรเดช ปาละวิสุทธิ์[1)] จิรพงศ์ใจรินทร์[2)]
JateKotcharerk[1)] Phamorn Pattavatang[1)]Suradet Palawisut[1)] Jirapong Jairin[2)]

ABSTRACT

The main purpose of this research was to increase the ability of PathumThani 1 rice to resist brown planthopper. The major tool used to accomplish this was marker assisted selection technology targeting on the gene *Bph 3*. The target gene harbored in the donor; UBN03078-101-342-4-19 (KDML105 x RathuHeenati introgression lines), should be transferred into the new generations of rice breeding program performed in this research. We aimed to develop the PathumThani 1 which still maintains its eating and cooking properties but hopefully increases BPH resistance. F1 generations of the crossing between PathumThani 1 and the donor were selected by targeting theRM 586, RM8072 andRM8074molecular markerof the *Bph3* then back-crossed to generate BC_1F_1-BC_4F_2. Selection of each generations by the MAS were done in association with screening of plant type of BC_1F_1- BC_4F_1 populations with heterozygous genotype. The selected lines were then self- crossing generating BC_4F_2 generation which furtherly were selected for the lines harboring homozygous *Bph3*. There were 75 lines including the 58 lines with similar plant type to PathumThani 1 were selected and propagated to produce a new generation BC_4F_4 of 218 lines. These lines were examined for their ability in resistance to BPH in Phitsanulok area. The result showed that there were 13 lines identified as moderately resistant (MR) line. For resistance analysis with other BPH from Ang Thong, Chainat, KamphaengPhet, and Pichit, only PSL13279-1-2-16-1-2-3-1 line was resistant (R) and MR to all the BPH, while PSL13279-1-2-16-1-2-3-2andPSL13279-1-5-15-7-4-9-4 were susceptible (S) and moderately susceptible (MS) to BPH from Ang Thong and Chainat, respectively. In conclusion, there were selected 3 lines harboring at least 2 markers of *Bph3* gene which were RM586 andRM8072 located on chromosome 6.

Keywords : PathumThani 1, Brown Planthopper, Marker assisted selection (MAS), *Bph3*

1) ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก ต. วังทอง อ. วังทอง จ. พิษณุโลก 65130 โทรศัพท์ 0-5531-1184-5
Phitsanulok Rice Research Center, Wang Thorng, Phitsanulok 65130. Tel. 0-5531-1184
2) ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ตู้ปณ.65 อำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี 34000 โทรศัพท์ 0-4534-4102-4
Ubon Ratchathani Rice Research Center, P.O.BOX 65, Mueang, Ubon Ratchathani 34000 Tel. 0-4534-4102-4

Bureau of Rice Research and Development

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เพื่อพัฒนาพันธุ์ข้าวปทุมธานี 1 ให้ได้สายพันธุ์ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลโดยใช้ MAS (Marker Assisted Selection) ด้วยการถ่ายทอดยีนต้านทาน *Bph3* จากพันธุ์ผู้ให้ (donor) คือ UBN03078-101-342-4-19 (KDML105 X RathuHeenatiintrogression lines) เข้าไปในพันธุ์ข้าวปทุมธานี 1ทำการผสมกลับไปยังพันธุ์แม่เพื่อให้ได้ลูกที่มีคุณลักษณะเหมือนพันธุ์ประทุมธานี 1 สร้างประชากร F_1 คัดเลือกโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย RM 586,RM8072 และ RM8074 ซึ่งเชื่อมโยงกับยีน *Bph3*สร้างประชากรลูกผสมกลับ BC_1F_1-BC_4F_2คัดเลือกในแต่ละชั่วควบคู่กับคัดเลือกลักษณะทรงต้นจาก BC_1F_1- BC_4F_1ที่มีจีโนไทป์ Heterozygous และปล่อยผสมตัวเองได้ต้น BC_4F_2คัดเลือกที่มีจีโนไทป์ Homozygous เหมือน UBN03078-101-342-4-19 ผู้ให้ ที่มียีน *Bph3* จำนวน 75สายพันธุ์ คัดลักษณะทรงต้นการติดเมล็ดเหมือนพันธุ์ปทุมธานี 1 ได้จำนวน 58สายพันธุ์นำเมล็ด BC_4F_3ไปปลูกขยายได้ข้าวลูกผสม BC_4F_4 จำนวน218สายพันธุ์ ไปประเมินความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลประชากรจากจังหวัด พิษณุโลกที่ต้านทานระดับ MR จำนวน 13 สายพันธุ์ นำไปประเมินกับประชากรแมลงจังหวัดอ่างทอง ชัยนาท กำแพงเพชร และพิจิตร พบว่ามีจำนวน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ PSL13279-1-2-16-1-2-3-1 มีปฏิกิริยาความต้านทานระดับ R – MR ในทุกกลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ PSL13279-1-2-16-1-2-3-2 และ PSL13279-1-5-15-7-4-9-4 มีปฏิกิริยาค่อนข้างไม่ต้านทานระดับ MS ต่อกลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจังหวัดอ่างทอง และจังหวัดชัยนาท ตามลำดับ ขณะที่สายพันธุ์ UBN03078-101-342-4-19 ซึ่งเป็นสายพันธ์พ่อหรือ donor gene มีปฏิกิริยาค่อนข้างไม่ต้านทานระดับ MS ต่อกลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจังหวัดพิจิตร ส่วนพันธุ์ประทุมธานี 1 ที่เป็นพันธุ์แม่ มีปฏิกิริยาค่อนข้างไม่ต้านทานถึงไม่ต้านทานระดับ MS– S ทุกกลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล พันธุ์มาตรฐานอ่อนแอ Taichung Native 1 (TN1) ไม่ต้านทานสูงสุดระดับ HS ในทุกกลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ผลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ามีจำนวน 3 สายพันธุ์ ที่มียีนต้านทาน*Bph3* อย่างน้อย 2 ตำแหน่ง คือ RM586 และ RM8072 อยู่บนโคโมโซม 6 และสามารถนำไปศึกษาองค์ประกอบด้านอื่นๆใช้เป็นแหล่งของยีนต้านทานและพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลต่อไป

คำสำคัญ: ข้าวประทุมธานี 1, เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล, โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก (MAS) *Bph3*.

คำนำ

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (Brown planthopper, *Nilaparvatalugens*Stal)เป็นแมลงศัตรูข้าวและสร้างความเสียหายให้กับนาข้าวโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตชลประทาน สามารถเข้าทำลายต้นข้าวได้หลายพันธุ์และทุกระยะการเจริญเติบโต โดยดูดกินน้ำเลี้ยงทำให้ต้นข้าวมีอาการเหี่ยวและแห้งตายหรือที่เรียกว่า Hopperburn (Yang, et al., 2002) นอกจากนี้ยังเป็นแมลงพาหะถ่ายทอดเชื้อไวรัสก่อโรคเขียวเตี้ย ซึ่งทำให้ต้นข้าวเตี้ย แคระแกร็น เป็นพุ่มแตกกอมาก ต้นข้าวที่เป็นโรคจะไม่ออกรวงหรือรวงลีบ และโรคใบหงิก ทำให้ข้าวต้นเตี้ย ปลายใบบิดเป็นเกลียวออกรวงช้าและให้รวงที่ไม่สมบูรณ์ รวงให้เมล็ดลีบเป็นส่วนใหญ่ (Renganayaki, et al., 2002) ทำให้ผลผลิตข้าวลดลง และไม่คุ้มค่าการลงทุน (สุวัฒน์, 2544) การป้องกันกำจัดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลนิยมใช้สารเคมีฆ่าแมลงเป็นหลัก (สำนวน และวีรเทพ, 2548) ซึ่งมีผลกระทบต่อมนุษย์และสภาพแวดล้อมเป็นอย่างมาก และเป็นสาเหตุสำคัญในการทำให้สมดุลธรรมชาติ

Bureau of Rice Research and Development

เสียหาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทำลายศัตรูธรรมชาติที่สำคัญในระบบนิเวศน์ของนาข้าว เช่น มวนเขียวดูดไข่ (*Cyrtorhinuslividipennis* ,Reuter) แตนเบียนไข่ (*Paracentro-biaandoi* ,Ishii) ด้วงดิน (*Ophioneaishii* ,Habu) และด้วงเต่า (*Micraspiscrocea* ,Mulsant) เป็นต้น การควบคุมโดยใช้ข้าวพันธุ์ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันแมลง ที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก และเป็นวิธีการที่ปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม

ในช่วง 3 ทศวรรษที่ผ่านมาได้มีการวิจัย และพัฒนาพันธุ์ข้าวต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลหลายสายพันธุ์ หนึ่งในจำนวนนั้น คือ ข้าวพันธุ์ปทุมธานี1 (PathumThani 1 : PPT 1) ที่สำคัญมีคุณสมบัติต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้เป็นอย่างดี ได้จากการผสมระหว่าง BKNA6-18-6-2 กับสายพันธุ์ PTT85061-86-3-2-1 ได้สายพันธุ์ PTT90071-93-8-1-1 รับรองพันธุ์ปี2543 (กรมวิชาการเกษตร, 2546)อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบว่าลักษณะต้านทานของข้าวพันธุ์ปทุมธานี1 ลดลงอย่างมาก เนื่องจากเป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกกันอย่างแพร่หลายอย่างต่อเนื่องติดต่อกันเป็นเวลาหลายปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งพื้นที่นาชลประทานในเขตภาคกลาง และภาคเหนือตอนล่าง เนื่องจากข้าวพันธุ์ปทุมธานี1จัดเป็นข้าวคุณภาพดีเป็นที่ต้องการของตลาดมาก ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวพันธุ์ปทุมธานี1 เพื่อให้มีคุณลักษณะต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น แต่ยังคงความเป็นพันธุ์ปทุมธานี 1 ไว้ จึงเป็นแนวทางที่จะสามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้

ปัจจุบันมีรายงานการค้นพบตำแหน่งของยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลบนโครโมโซมข้าวไม่น้อยกว่า 20 ยีน (Zhang, 2007) ในจำนวนนี้มียีนต้านทาน *Bph1*, *bph2*, *bph5*, *bph7*, *bph8*และ *Bph9* ที่แมลงส่วนใหญ่ที่พบในประเทศไทยสามารถเข้าทำลายได้ พันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทาน *bph4*, *Bph6* และ *Bph10* สามารถต้านทานต่อแมลงบางประชากร มีเพียงไม่กี่ยีนที่ต้านทานต่อแมลงส่วนใหญ่ ได้แก่ *Bph3*, *Bph11*, *bph12*, *Bph14*และ *Bph15* และยังมีพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานบางยีน เช่น *Bph13*, *bph16*, *Bph17*, *Bph18*และ *bph19*ที่ยังไม่ได้นำมาศึกษาและทดสอบกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในประเทศไทย นอกจากนั้นยังมีรายงานการค้นพบลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานที่ควบคุมโดย QTL (Quantitative Trait Loci) กระจายทั่วทั้ง 12 โครโมโซมของข้าว (Alam and Cohen, 1998; Jairin et al., 2005; Soundararajan et al., 2004; Su et al., 2002; Xu et al., 2002)การค้นหายีนต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลดังกล่าว สามารถกระทำได้อย่างรวดเร็วด้วยเทคนิคทางโมเลกุลเครื่องหมาย ยีนต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลหลายชนิดได้ถูกค้นพบ รวมทั้งโมเลกุลเครื่องหมาย ที่สามารถใช้ในการติดตามยีนต่าง ๆ เหล่านั้นได้รับการพัฒนาขึ้นมากมาย สามารถนำมาใช้ตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรม ติดตาม และคัดเลือกข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ต้องการในแต่ละขั้นตอนระหว่างกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วถูกต้อง แม่นยำ สามารถลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้สั้นลงได้เป็นอย่างมาก การวิจัยเพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวปทุมธานี 1ให้มีความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยการถ่ายทอดยีนต้านทาน *Bph3* จาก Introgression lines ที่ได้จากคู่ผสมระหว่างพันธุ์ราตูฮีเนติ (RathuHeenati : Rathu) กับขาวดอกมะลิ 105 (KhaoDawk Mali 105: KDML 105) (จิระพงศ์และคณะ,2548)ได้ดำเนินการตั้งแต่ พ.ศ. 2554 ได้ลูกผสมกลับชั่วที่ BC_4F_5ที่มียีน *Bph3* และมีลักษณะอื่น ๆ ที่ใกล้เคียงกับข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 มาก อย่างไรก็ตามเนื่องจากลักษณะของข้าวผสมกลับที่ได้ยังมีลักษณะทางกายภาพแตกต่างจากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมถูกต้องตามความต้องการ ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายก่อนการทดสอบในสภาพแปลงเพื่อเปรียบเทียบผลผลิตตามขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ข้าว เพื่อรับรองสายพันธุ์สู่เกษตรกรต่อไป

Bureau of Rice Research and Development

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สายพันธุ์UBN03078-101-342-4-19(เป็น Introgression lines ที่มียีน *Bph3* ได้จากคู่ผสม RathuHeenati กับขาวดอกมะลิ 105) กับ ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1
2. อุปกรณ์ปลูกข้าวและใช้ผสมพันธุ์ข้าว
3. กรงเลี้ยงแมลงพร้อมอุปกรณ์ทดสอบปฏิกิริยาและประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจังหวัดพิษณุโลก,อ่างทอง, ชัยนาท, กำแพงเพชรและ พิจิตร
4. วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้สกัด DNA
5. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้น DNAโดยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction)
6. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับทำAgarose gel Electrophoresis
7. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับทำPolyacylamide gel electrophoresis
8. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับทำ Silver Staining

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. ทดสอบปฏิกิริยาพ่อและแม่กับแมลงคัดต้นที่ต้านทานมาปลูกตัดใบข้าวมาสกัด DNA เพื่อ Server หา marker พ่อและแม่ที่ แตกต่างกันในโครโมโซม6
2. การพัฒนาประชากรข้าวชั่วที่ F_1 ถึง BC_4F_1การสร้างประชากรข้าวผสมกลับ ที่มียีน *Bph3* ใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก
3. คัดเลือกสายพันธุ์ข้าวBC_1F_1 และ BC_4F_2 ที่มียีน *Bph3* ซึ่งต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก
4. ประเมินระดับความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและคัดเลือกประชากรข้าวชั่วที่ BC_4F_4 และ BC_4F_5 ที่มียีน *Bph 3*

วิธีดำเนินงาน

การทดสอบปฏิกิริยาความต้านทานของข้าวพันธุ์พ่อแม่

ประเมินความต้านทานในข้าวพันธุ์พ่อแม่และพันธุ์มาตรฐานอื่น ๆ ที่มียีนต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เพื่อให้ทราบถึงระดับความต้านทานของข้าวพันธุ์พ่อแม่ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล จำนวน 1 ประชากรเปรียบเทียบกับพันธุ์มาตรฐานอื่น ๆ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของระดับการเข้าทำลายของแมลง

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อ KDML105 X RathuHeenatiintrogression linesจำนวน 8 สายพันธุ์ แม่ประทุมธานี1 และพันธุ์รับรองอื่นๆ Local Resistant Check พิษณุโลก 2,กข.41,กข.31 ,Taichung Native 1,RathuHeenati, Babaweeและ PTB33 มาปลูกสายพันธุ์ละ 25 เมล็ด ทำ 2 ซ้ำ ใช้พันธุ์ข้าว PTB33 และRathuHeenatiเป็นพันธุ์มาตรฐานต้านทาน (Resistant Check) และTaichung Native 1 เป็นพันธุ์มาตรฐานอ่อนแอ (Susceptible Check) ในสภาพกรงเลี้ยงแมลงใช้ประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล จากจังหวัดพิษณุโลก ปล่อยแมลงวัย 1-2 จำนวน 8-10 ตัว/ต้น ทำการประเมินค่าระดับความเสียหาย หรือข้าวพันธุ์Taichung Native 1 ตายหมด ทำการให้ระดับคะแนนความเสียหายหลังจากปล่อยแมลงไปแล้วนาน 15 ,18 , 22 และ 25 วัน นำต้นที่ต้านทานปลูกลงกระถาง

การศึกษาโมเลกุลเครื่องหมาย(Severmaker)เพื่อได้คัดเลือกสายพันธุ์ลูกผสมRathu/KDML105ที่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลประชากรพิษณุโลกสายพันธุ์ UBN03078-101-342-4-19 ปลูกข้าวพันธุ์

Bureau of Rice Research and Development

ปทุมธานี 1 ดำเนินการตัดใบข้าวนำมาสกัด DNA เพื่อหาโมเลกุลเครื่องหมาย จำนวน17 โมเลกุลเครื่องหมายบนโครโมโซม 6 และได้โมเลกุลเครื่องหมายที่มี polymorphism จำนวน 3 โมเลกุลเครื่องหมายคือ RM586, RM8072 และ RM8074

การพัฒนาสร้างประชากรข้าวชั่วที่ F_1 ที่มียีน *Bph3*ที่ได้พัฒนามาจากคู่ผสมระหว่าง UBN03078-101-342-4-19 กับข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ได้ลูกผสมF_1 PTT1/ UBN03078-101-342-4-19 จำนวน 21 เมล็ดนำเมล็ดมาเพาะปลูกลงกระถางหลังจากนั้นตัดใบทำการสกัด DNA จากใบอ่อนของประชากรข้าวชั่วที่F_1-BC_4F_1โดยวิธี DNA Trap® ตรวจสอบจีโนไทป์ประชากรข้าวชั่วที่ F_1ถึงBC_4F_1ด้วยโมเลกุลเครื่องหมายชนิด Microsatellite marker จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ RM586,RM8072และRM8074 เพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวลูกผสมกลับชั่วที่ F_1-BC_4F_1ที่มียีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลชนิด*Bph3* ทำการคัดเลือกต้นข้าวที่แสดงจีโนไทป์ทั้ง 3 ตำแหน่งเป็น Heterozygous และมีลักษณะสัณฐานทรงต้นเหมือนกับพันธุ์ปทุมธานี1ปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อสร้างประชากรข้าวชั่วที่ BC_4F_2นำประชากรข้าวชั่วที่ BC_4F_2มาเพาะปลูกต้นกล้า BC_4F_2 สกัด DNA มาตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลRM586และRM8072แล้วทำการคัดเลือกต้นที่แสดงจีโนไทป์เป็น homozygous เหมือน donor ปลูกลงกระถางปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อสร้างประชากรชั่วที่ BC_4F_3สำหรับนำประเมินความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ซึ่งแผนผังการพัฒนาประชากรแสดงในภาพที่ 1

การตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากรข้าวผสมกลับ

นำ DNA จากประชากรข้าวที่ต้องการตรวจสอบมาเพิ่มชิ้นส่วน DNA โดยวิธี PCR ในตำแหน่ง RM586,RM8072 และRM8074ด้วยองค์ประกอบทางเคมีของปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 10 µl ประกอบด้วย

DNA (20 ng/ µl)	2	µl
10X PCR buffer	1	µl
dNTPs (1 mM)	2	µl
$MgCl_2$ (25 mM)	1	µl
Forward primer (5 µmol)	0.5	µl
Reverse primer (5 µmol)	0.5	µl
Taq polymerase (500U)	0.1	µl
dH_2O	2.9	µl

นำส่วนผสมที่ได้ใส่เครื่อง PCR โดยมีรายละเอียดของอุณหภูมิและระยะเวลาในแต่ละรอบปฏิกิริยามีดังนี้

95°C	5	นาที	
95°C	30	วินาที	35 รอบ
55°C	30	วินาที	
72°C	1	นาที	
72°C	5	นาที	
4°C			

นำผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณมาตรวจสอบรูปแบบของแถบ DNA โดยการทำ 4.5% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) และย้อมแผ่นเจลด้วยวิธี Silver straining

Bureau of Rice Research and Development

การประเมินความต้านทานของประชากรข้าวชั่วที่ BC_4F_4

ทดสอบปฏิกิริยาของข้าวลูกผสมกลับ BC_4F_4 ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยโมเลกุลเครื่องหมายข้างต้น ข้าวที่มีพันธุกรรมต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นแบบ homozygousdominance และมีลักษณะสัณฐานเหมือนประทุมธานี1 ด้วยประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากจังหวัดพิษณุโลกเพื่อประเมินความต้านทานในประชากรข้าวชั่วที่ BC_4F_4เพื่อลดจำนวนประชากรข้าวลูกผสมBC_4F_4และประชากรแมลงจากอ่างทอง ชัยนาท กำแพงเพชรและพิจิตรใช้สายพันธุ์ละ 25 เมล็ด ใช้พันธุ์ข้าว PTB33และRathuHeenati เป็นพันธุ์มาตรฐานต้านทาน (Resistant Check) และพันธุ์Taichung Native 1 (TN1) เป็นพันธุ์มาตรฐานอ่อนแอ (Susceptible Check) Local Resistant Check คือ ปทุมธานี1, PSL2,CNT1,RD41 RD47และ RD31 ในสภาพกรงเลี้ยงแมลงใช้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลวัย 1-2 จำนวน 8-10 ตัวต่อต้น ทำการประเมินค่าระดับความเสียหาย หรือข้าวพันธุ์ไทซุง 1 ตายหมด เป็นระยะเวลา 15,18,21,24วัน และคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทานไปปลูกลงกระถาง

การประเมินความต้านทานของประชากรข้าวชั่วที่ BC_4F_5ต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ทดสอบปฏิกิริยาของข้าวลูกผสมกลับ BC_4F_5 ที่ผ่านการทดสอบคัดเลือกต้นที่รอดจากการทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลด้วยด้วยประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากจังหวัดพิจิตร โดยมีขั้นตอนเช่นเดียวกับประชากร BC_4F_4 เพื่อยืนยันผล

การเก็บรวบรวมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

เก็บรวบรวมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากพื้นที่มีการระบาดใน จังหวัดพิษณุโลก, อ่างทอง ,ชัยนาท, กำแพงเพชรและพิจิตร 5ประชากร ทำการคัดเลือกแมลงที่ปลอดโรคและแมลงเบียน และเพาะเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณด้วยข้าวสายพันธุ์Taichung Native 1 (TN1) ให้มีจำนวนปริมาณเพียงพอต่อการทดสอบ

การให้คะแนน ปฏิกิริยาของพันธุ์ข้าวต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในสภาพโรงเรือน ใช้วิธีการให้คะแนนความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตาม Standard Evaluation System for Rice, SES (IRRI, 2002) โดยมีหลักการดังนี้

SES Score	Reactions of Rice varieties	Visual Score
0	No damage	HR
1	Very slight damage	R
3	First and 2nd leaves of most plants partially yellowing	MR
5	Pronounced yellowing and stunting or about 10 to 25% of the plants wilting or dead and remaining plants severely stunted or dying	MS
7	More than half of the plants	S
9	All plants dead	HS

Standard Evaluation System for Rice, SES (IRRI, 2002)

Bureau of Rice Research and Development

ผลการทดลองและวิจารณ์

การพัฒนาพันธุ์ข้าวปทุมธานี 1 ให้ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก(Marker-assisted selection: MAS)ด้วยการถ่ายทอดยีนต้านทาน *Bph3* จากพันธุ์พันธุ์พ่อหรือ donor geneคือ UBN03078-101-342-4-19 และผสมกลับรุ่น BC_1F_1 ถึง BC_4F_5 พบว่า ได้สายพันธุ์ข้าวผสมกลับรุ่น BC_1F_1 จำนวน 10 สายพันธุ์ที่มียีนต้านทาน*Bph3* ถูกนำไปผสมกลับเข้าหาพันธุ์ปทุมธานี 1 ได้ประชากรผสมกลับรุ่น BC_2F_1 จำนวน 17 สายพันธุ์ ถูกนำไปผสมกลับเข้าหาพันธุ์ปทุมธานี 1 ได้ประชากรผสมกลับรุ่น BC_3F_1 จำนวน 15 สายพันธุ์ถูกนำไปผสมกลับเข้าหาพันธุ์ปทุมธานี 1 ได้ประชากรผสมกลับรุ่น BC_4F_1 จำนวน 98 สายพันธุ์ สายพันธุ์ดังกล่าวถูกนำไปตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย RM586 และRM8072 พบต้นข้าว BC_4F_1 ที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous ที่โมเลกุลเครื่องหมาย RM586 จำนวน 43 สายพันธุ์ และที่โมเลกุลเครื่องหมาย RM8072 จำนวน 36 สายพันธุ์ และคัดเลือกต้นกล้าที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous ทั้ง 2 ตำแหน่งของโมเลกุลเครื่องหมายได้จำนวน 36 ต้น คิดเป็นร้อยละ 36.7เปอร์เซ็นต์จากจำนวน 36 ต้น ทำการคัดเลือกลักษณะทรงต้นเหมือนพันธุ์ปทุมธานี 1 และปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อสร้างประชากรรุ่น BC_4F_2 คัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมาย RM586 และRM8072คิดเป็นร้อยละ 21.71 เปอร์เซ็นต์ที่มีจีโนไทป์ Homozygous เหมือน UBN03078-101-342-4-19 ผู้ให้ ที่มียีน *Bph3* จำนวน 75สายพันธุ์ คัดลักษณะทรงต้นการติดเมล็ดเหมือนพันธุ์ปทุมธานี 1 ได้จำนวน 58สายพันธุ์นำเมล็ด BC_4F_3เปปลูกขยายได้ข้าวลูกผสม BC_4F_4 จำนวน218สายพันธุ์ ไปประเมินความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลประชากรจากจังหวัด พิษณุโลกที่ต้านทานระดับ MR จำนวน 13 สายพันธุ์ จนถึง BC_4F_5 ซึ่งให้ลักษณะเป็น homozygous นำไปทดสอบกับกลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในจังหวัดต่างๆ ได้แก่ จังหวัดพิษณุโลก อ่างทอง ชัยนาท พิจิตร และกำแพงเพชร (ตารางที่3) เพื่อศึกษาลักษณะทาง phenotypeพบว่า มีประชากรสายพันธุ์ข้าวที่ได้รับการพัฒนามีปฏิกิริยาความต้านทานระดับ R - MR ในทุกกลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ได้แก่ PSL13279-1-2-16-1-2-3-1และมีประชากรสายพันธุ์ข้าวบางสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานได้ทุกกลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ได้แก่ PSL13279-1-2-16-1-2-3-2 มีปฏิกิริยาความต้านทานระดับ MR ต่อกลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจังหวัดพิษณุโลก ชัยนาท พิจิตร และกำแพงเพชร แต่ค่อนข้างไม่ต้านทานระดับ MS ประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจังหวัดอ่างทอง สายพันธุ์ข้าว PSL13279-1-5-15-7-4-9-4 มีปฏิกิริยาความต้านทานระดับ R -MR ต่อกลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจังหวัดพิษณุโลก อ่างทอง พิจิตร และกำแพงเพชร แต่ค่อนข้างไม่ต้านทานระดับ MS ประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจังหวัดชัยนาท ขณะที่ UBN03078-101-342-4-19 มีปฏิกิริยาความต้านทานระดับ R -MR ต่อกลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจังหวัดพิษณุโลก อ่างทอง ชัยนาท และกำแพงเพชร แต่ค่อนข้างไม่ต้านทานระดับ MS ประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจังหวัดพิจิตร ส่วนพันธุ์ Taichung Native 1 ไม่ต้านทานสูงสุดระดับ HS ในทุกกลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ผลของการปลูกทดสอบประชากรสายพันธุ์ข้าวต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในจังหวัดต่างๆ ที่พบว่ามีปฏิกิริยาความต้านทานระดับแตกต่างกันนั้น แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างประชากรสายพันธุ์ข้าวทดสอบกับความหลากหลายของชีวชนิดของแมลงพัชนี (2539) รายงานว่า เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นแมลงที่มีพันธุกรรมแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างกลุ่มประชากรและเมื่อมีการผสมพันธุ์ภายในกลุ่มประชากรชีวชนิดเดียวกันประมาณ 10 รุ่นลักษณะความรุนแรง (virulence) ในการทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลก็จะมีการเปลี่ยนแปลงไปภมร และคณะ (2553) ผลการศึกษา สามารถแบ่งกลุ่มเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ศึกษาในพื้นที่ระบาดจังหวัดพิษณุโลกและกำแพงเพชรที่เก็บรวบรวมตัวอย่างระหว่างปี พ.ศ. 2549–2550 มีการ

Bureau of Rice Research and Development

เกิดชีวชนิดใหม่ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่มีการระบาด และมีปฏิกิริยาในการเข้าทำลายพันธุ์ข้าวต้านทานได้ค่อนข้างรุนแรงกว่าเดิม ทั้งนี้เนื่องจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในแต่ละเขตพื้นที่มีลักษณะความรุนแรงในการเข้าทำลายพันธุ์ข้าวที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับการปรับตัวของแมลง

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการพัฒนาพันธุ์ข้าวปทุมธานี 1 ให้ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลโดยมียีนต้านทาน*Bph3*ที่ได้รับมาจากสายพันธุ์ UBN03078-101-342-4-19(KDML105 X Rathuheenatiintrogression line) ด้วยวิธีการใช้เครื่องหมายโมเลกุล จำนวน 3 ตำแหน่งคือ RM586, RM8072 และRM8074 ที่อยู่บนตำแหน่งโคโมโซม 6 เพื่อช่วยในการคัดเลือก ได้ประชากรสายพันธุ์ข้าวผสมกลับ BC_4F_5และมีลักษณะเป็น homozygous เมื่อนำประชากรสายพันธุ์ข้าวทดสอบกับกลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในจังหวัดต่างๆ ได้แก่ จังหวัดพิษณุโลก อ่างทอง ชัยนาท พิจิตร และกำแพงเพชร พบว่า มีจำนวน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ PSL13279-1-2-16-1-2-3-1 มีปฏิกิริยาความต้านทานระดับ R – MR ในทุกกลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ PSL13279-1-2-16-1-2-3-2 และ PSL13279-1-5-15-7-4-9-4 มีปฏิกิริยาค่อนข้างไม่ต้านทานระดับ MS ต่อกลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจังหวัดอ่างทอง และจังหวัดชัยนาท ตามลำดับ ขณะที่สายพันธุ์ UBN03078-101-342-4-19 ซึ่งเป็นสายพันธุ์พ่อหรือ donor gene มีปฏิกิริยาค่อนข้างไม่ต้านทานระดับ MS ต่อกลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจังหวัดพิจิตร ส่วนพันธุ์ประทุมธานี 1 ที่เป็นพันธุ์แม่ มีปฏิกิริยาค่อนข้างไม่ต้านทานถึงไม่ต้านทานระดับ MS– S ทุกกลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล พันธุ์มาตรฐานอ่อนแอ Taichung Native 1 (TN1) ไม่ต้านทานสูงสุดระดับ HS ในทุกกลุ่มประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ผลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ามีจำนวน 3 สายพันธุ์ ที่มียีนต้านทาน *Bph3* อย่างน้อย 2 ตำแหน่ง คือ RM586 และRM8072 อยู่บนโคโมโซม 6 และสามารถนำไปศึกษาองค์ประกอบด้านอื่นๆ ต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้อยู่ภายใต้โครงการ การพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวนาชลประทาน ซึ่งได้รับงบประมาณจากรัฐบาลไทยขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่และพนักงานศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลกที่มีส่วนช่วยในการพัฒนาและทดสอบความต้านทานของสายพันธุ์ข้าวต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2546.ข้าวและธัญพืชเมืองหนาวพันธุ์ดี 30 ปีกรมวิชาการเกษตร: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 115.

จิระพงศ์ ใจรินทร์, กิจติพงษ์ เพ็งรัตน์, สงวน เทียงดีฤทธิ์, กฤษณา สุดทสาร, จรัญจิต เพ็งรัตน์ และอุไรวรรณคชสถิตย์. 2548. การสืบหาโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล.รายงานการประชุมวิชาการ ข้าวและธัญพืชเมืองหนาวประจำปี 2548. กรมการข้าว หน้า 47-51.

สำนวน ฉิมพกา และวีรเทพ พงษ์ประเสริฐ. 2548. ปัจจัยที่มีผลต่อการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูข้าวของเกษตรกร อำเภอตะพานหิน จังหวัดพิจิตร. วารสารเกษตรนเรศวร, 8(1), 77-94.

สุวัฒน์ รวยอารีย์. 2544. เรียนรู้การจัดการศัตรูข้าวโดยวิธีผสมผสาน. ใน เอกสารวิชาการกองกีฎและสัตววิทยา กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร.

Bureau of Rice Research and Development

พัชนี ชัยวัฒน์. 2539. มุมมอง เรื่อง ชีวชนิดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล. วารสารวิชาการเกษตร 14 (1) : หน้า 56-30.

ภมร ปัตตาวะตัง, เจตน์คชฤกษ์, และสุรเดช ปาละวิสุทธิ์. 2553. การศึกษาชีวชนิดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากแหล่งระบาดภาคเหนือตอนล่าง เพื่อการคัดเลือกพันธุ์ข้าวต้านทาน. ประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว. 269 น.

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

IRRI 2002. Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines. 56 pp.

Renganayaki, K., Fritz A.K., Sadasivam S., Pammi S., Harrington S.E., McCouch S.R., 2002. Mapping and progress toward map-based cloning of brown planthopper biotype-4 resistance gene introgressed from *Oryzaofficinalis* into cultivated rice, O. *sativa*. **Crop Sci**, (42), 2112-2117.

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

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

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

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

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

Yang, H.,Ren, X., Weng, Q., Zhu, L. and He, G. 2002. Molecular mapping and genetic analysis of a rice brown planthopper (*NilaparvatalugensStal*) resistance gene.**Hereditas**, (136), 39-43.

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

Bureau of Rice Research and Development

ตารางที่ 1 Target molecular markers for marker-assisted selection

Marker	Type	Chr.	Trait	Primer sequence	
				Forward primer	Reverse primer
RM586	SSR	6	BPH	TGCCATCTCATAAACCCACTAACC	CTGAGATACGCCAACGAGATACC
RM8072	SSR	6	BPH	GATCACTCAGGTCATCCATTC	AATCAGAGAGGCTAAAGACAATAAT

BPH = brown planthopper resistance

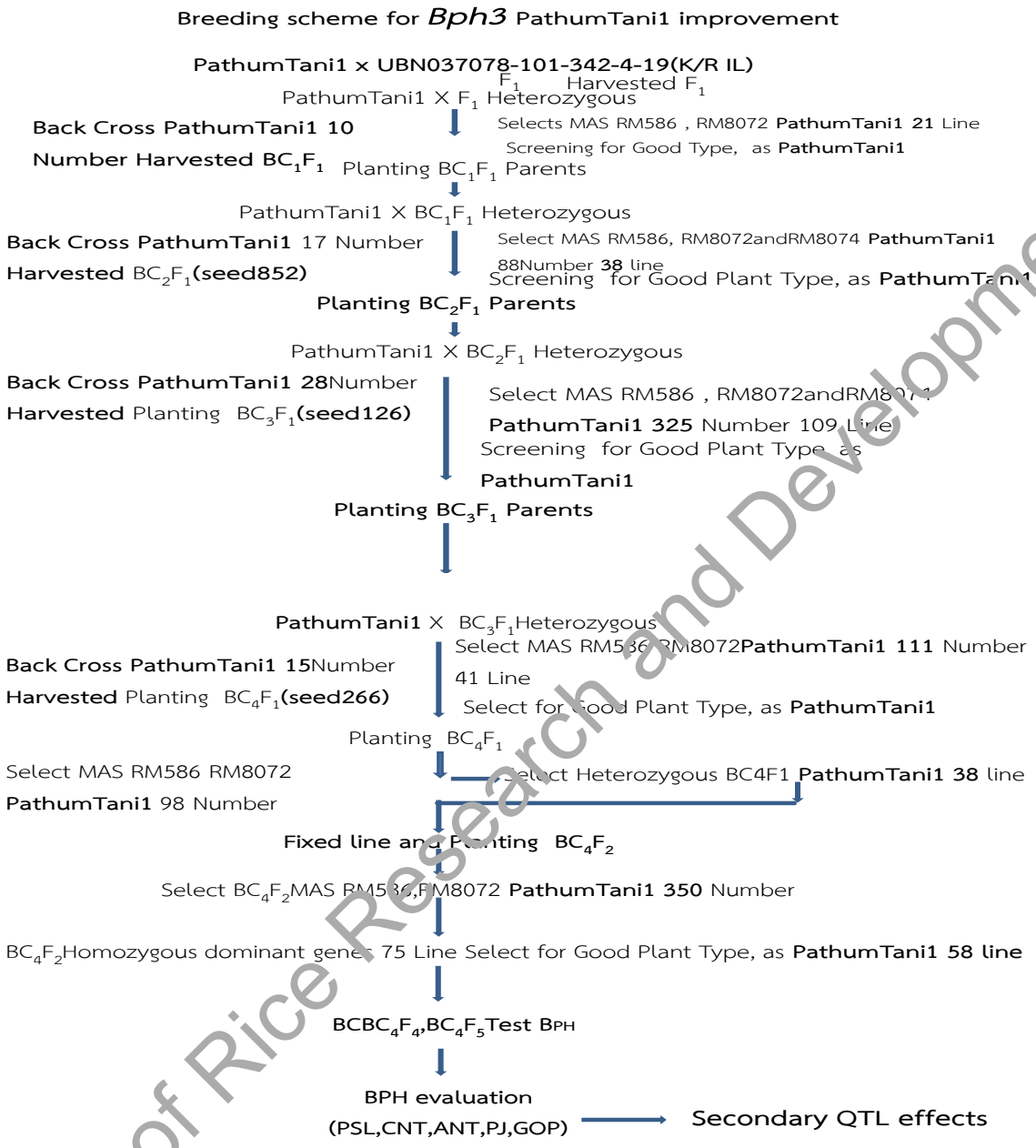
ตารางที่ 2 แสดงการคัดเลือกยีนเป้าหมาย Bph3 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RM586 และ RM8072 ในประชากรรุ่น F_1- BC_4F_2

ประชากร (รุ่น)	จำนวนสายพันธุ์	จำนวนสายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous (ค่าคาดหวัง/ค่าสังเกต)			จำนวนสายพันธุ์ที่คัดเลือกด้วย MAS	จำนวนสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกทั้ง MAS และทรงต้น	การแพร่ยีนเป้าหมายโดยใช้ MAS (%)
		RM586	RM8072	RM586 & RM8072			
F_1	10	100/10	100/10	100/10	10	10	100
BC_1F_1	88	51.13/40	45.43/38	45.43/38	38	10	43.18
BC_2F_1	325	37.4/119	34.6/110	34.6/107	107	17	32.9
BC_3F_1	111	36.93/41	36.93/41	36.9/41	41	15	36.9
BC_4F_1	98	43.87/43	36.73/36	36.73/36	36	36	36.73
homozygous							
BC_4F_2	350	23.14/81	21.71/75	21.71/75	75	58	21.71

ตารางที่ 3 ผลการประเมินความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในข้าวพันธุ์ต่างๆ โดยใช้ประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่รวบรวมจากจังหวัดพิษณุโลก ชัยนาท อ่างทอง กำแพงเพชร และพิจิตร

ที่	สายพันธุ์	ระดับปฏิกิริยาต่อแมลงเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในจังหวัดต่างๆ				
		พิษณุโลก	อ่างทอง	ชัยนาท	พิจิตร	กำแพงเพชร
1	PSL13279-[illegible]-16-1-2-3-1	R	R	MR	MR	R
2	PSL13279-1-2-16-1-2-3-2	MR	MS	MR	MR	MR
3	PSL13279-3-9-1-1-14-4-2	MS	MS	MR	MS	MS
4	PSL13279-5-1-4-7-4-5-1	MR	MS	MR	MS	MS
5	PSL13279-5-1-4-7-4-5-2	MS	MS	MR	MS	MS
6	PSL13279-5-1-4-10-7-1-1	MS	MS	R	MS	MS
7	PSL13279-5-1-4-10-7-1-2	MR	MS	MR	MS	MS
8	PSL13279-5-1-4-10-7-10-1	MR	MS	MR	MS	MS
9	PSL13279-5-1-4-10-7-10-4	MS	MS	MS	MS	MS
10	PSL13279-5-19-31-3-4-6-2	MS	MS	MS	MS	MS
11	PSL13279-5-19-31-3-4-6-3	MS	S	MS	MS	MS
12	PSL13279-5-19-31-3-4-6-4	MR	MR	MS	MS	MS
13	PSL13279-1-5-15-7-4-9-4	MS	R	MS	MR	MR
14	PTT1	MS	MS	MS	S	MS
15	UBN03078-101-342-4-19	MR	R	MR	MS	MR
16	Rathu Heenati	R	MR	R	MR	MR
17	PTB33	R	R	R	MR	R
23	TN1	HS	HS	HS	HS	HS

Bureau of Rice Research and Development



ภาพที่ 1 แผนผังการพัฒนาประชากรข้าวชั่วที่ F_1ถึง BC_4F_5ให้มียีน *Bph3* ในฐานพันธุกรรม ปทุมธานี1 โดยใช้เทคนิค MAS ร่วมกับการคัดเลือกลักษณะความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

Bureau of Rice Research and Development