

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือกลักษณะความหอม และปริมาณอะมิโลสต่ำ ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวแบบบันทึกประวัติ

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

จันทร์จิรา โรหิตเสถียร (Janjira Rohitsatien)* ดร.ธานี ศรีวงศ์ชัย (Dr.Tanee Sreewongchai)^{1**}
 ดร.ประภา ศรีพิจิตต์ (Dr.Prapa Sripichitt)*** ดร.รังสฤษดิ์ กาวีตะ (Dr.Rungsarid Kaveeta)***

บทคัดย่อ

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อคุณภาพการหุงต้มที่ดีเป็นหนึ่งในเป้าหมายของการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไทย การวิจัยนี้ได้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro และ RM190 ที่เฉพาะกับลักษณะความหอมและปริมาณอะมิโลส ที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 8 และ 6 ของข้าวตามลำดับ มาใช้ช่วยในการคัดเลือกลักษณะทั้ง 2 ในประชากร ข้าวที่ 2 จำนวน 600 ต้นจากคูผสมระหว่างพันธุ์ปทุมธานี 1 (PTT1) ที่มีคุณภาพการหุงต้มดี กับพันธุ์ CH4 ที่มีศักยภาพการให้ผลผลิตสูง มีการคัดเลือกแบบที่ลักษณะในประชากรดังกล่าว โดยคัดเลือกต้นที่มีพันธุกรรม แบบคงตัวในลักษณะความหอมได้จำนวน 151 ต้น จากนั้นคัดเลือกต้นที่มีพันธุกรรมคงตัวของปริมาณ อะมิโลสต่ำเช่นเดียวกับพันธุ์ปทุมธานี 1 ได้ต้นที่มีพันธุกรรมที่ต้องการทั้ง 2 แบบทั้งหมด 32 ต้น ซึ่งจะได้ นำไปใช้ในขั้นตอนต่อไปของการปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้มีการใช้เทคนิคการหน่วงเวลาโพลิตด้วยอย่างในการทำ อิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดกรองต้นที่ต้องการ

ABSTRACT

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

คำสำคัญ: คุณภาพการหุงต้ม การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก การปรับปรุงพันธุ์แบบบันทึกประวัติ

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

¹ Correspondent author: taneesree@yahoo.com

* นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืช คณะเกษตร ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

*** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทนำ

ข้าวเป็นพืชอาหารหลักสำหรับประชากรกว่าครึ่งหนึ่งของโลก พื้นที่การผลิตข้าวกว่าร้อยละ 90 อยู่ในทวีปเอเชีย โดยประเทศไทยถือเป็นประเทศที่มีการผลิตและส่งออกข้าวเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก คุณภาพการหุงต้มและรับประทานของข้าวเป็นคุณภาพที่ผู้บริโภคใช้ในการตัดสินใจเลือกซื้อข้าว ทั้งนี้เพราะความชอบของแต่ละคนแตกต่างกัน คุณสมบัติทางเคมีของข้าวขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวและคุณภาพแป้ง [1] คุณภาพการหุงต้มและรับประทานนี้สามารถคาดคะเนโดยคุณสมบัติเมล็ดทางเคมี ปัจจัยที่ทำให้ข้าวพันธุ์ต่าง ๆ มีคุณภาพของข้าวสุกแตกต่างกันขึ้นกับองค์ประกอบดังนี้ ได้แก่ ปริมาณอะมิโลส ความคงตัวของแป้งสุก อุณหภูมิแป้งสุก อัตราการยืดตัวของเมล็ดข้าวสุก และกลิ่นหอม ในเมล็ดข้าวประกอบด้วยแป้ง 2 ชนิดคืออะมิโลสและอะมิโลเพคติน [2] อัตราส่วนของอะมิโลสและอะมิโลเพคตินเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ข้าวมีคุณสมบัติแตกต่างกันโดยในเมล็ดข้าวมีอะมิโลเพคตินในอัตราส่วนที่มากกว่าอะมิโลส แต่การจำแนกประเภทของข้าวนั้นจะใช้ปริมาณอะมิโลสเป็นตัวชี้วัด ซึ่งสัดส่วนของอะมิโลสในเมล็ดข้าวที่แตกต่างกันมีผลต่อลักษณะของข้าวสุกที่ต่างกัน กลิ่นหอมเป็นลักษณะพิเศษของข้าวบางพันธุ์ ซึ่งเป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศ ข้าวหอมสามารถผลิตสารหอมชนิดที่เรียกว่า popcorn-like scent เก็บสะสมไว้ในส่วนต่าง ๆ ของต้นโดยเฉพาะเมล็ด ซึ่งกลิ่นของข้าวหอมนั้นเกี่ยวข้องกับสารระเหยกว่า 114 ชนิด โดยสารสำคัญที่ทำให้ข้าวมีกลิ่นหอมคือ 2-acetyl-1-pyrroline หรือ 2AP [3]

จุดประสงค์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวมีหลายประการ เช่น การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคและแมลง การปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิต การปรับปรุงพันธุ์เพื่อคุณภาพการหุงต้มและรับประทาน เป็นต้น โดยวิธีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่นิยมคือการปรับปรุงพันธุ์แบบบันทึกประวัติ ซึ่งจะคัดเลือกต้นพืชที่มีลักษณะตรงตามวัตถุประสงค์ของโครงการจากประชากรในช่วงที่ 2 ที่พืชมีการกระจายตัวของ

ลักษณะต่าง ๆ สูงสุดและนำต้นที่คัดเลือกไปปลูกในช่วงต่อ ๆ ไปจนกว่าพืชจะมีความคงตัวทางพันธุกรรม (homozygosity) [4] ตัวอย่างเช่น การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความหอมและคุณภาพการหุงต้มและรับประทานดี ได้แก่ พันธุ์ข้าวปทุมธานี 1 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์ข้าวหอม BKN6-18-3-2 กับสายพันธุ์ PTT85061-86-3-2-1 ปลูกคัดเลือกข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 ถึง 6 โดยวิธีคัดเลือกแบบบันทึกประวัติจนได้สายพันธุ์ PTT90071-93-8-1-1 เป็นข้าวเจ้าหอม ไม้ไผ่ต่อช่วงแสง คุณภาพการหุงต้มและรับประทานคล้ายข้าวขาวดอกมะลิ 105

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection, MAS) เพื่อเลือกต้นพืชที่มีจีโนไทป์ที่ต้องการ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่นำมาใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการคัดเลือก สามารถจำแนกได้ 2 แบบคือการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนเป้าหมายช่วยในการคัดเลือก (indirect MAS; iMAS) และการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับส่วนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีน (direct MAS; dMAS หรือ functional marker assisted selection; fMAS) ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด fMAS นั้นจะมีความแม่นยำในการคัดเลือกมากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด iMAS เนื่องจากการพัฒนามาจากส่วนของยีนที่ทำหน้าที่กำหนดรหัสพันธุกรรมที่ควบคุมการทำงานของลักษณะเป้าหมายที่ต้องการมาเป็นเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก การนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการคัดเลือก โดยการเพิ่มความแม่นยำ และระยะเวลาของการปรับปรุงพันธุ์พืช [5]

พันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะความหอมและปริมาณอะมิโลสในข้าวถูกควบคุมด้วยยีนแฝง (recessive gene) ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ช่วยในการคัดเลือกลักษณะความหอมคือ Naro เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะกับการทำหน้าที่ของยีนความหอมในข้าวซึ่งคล่อมตำแหน่งที่ขาดหายไปของเบสจำนวน 8 เบสที่ exon7 ของยีน betaine

aldehyde dehydrogenase (Badh) บนโครโมโซมที่ 8 เป็นเครื่องหมายแบบ co-dominance [6] เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM190 เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite marker) ที่ปรากฏอยู่ในส่วนกำหนดรหัสพันธุกรรมของยีน waxy ที่ควบคุมลักษณะปริมาณอะมิโลสในเมล็ดข้าว ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน waxy หรือยีน granule-bound starch-synthase (GBSS) ตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลท์ดังกล่าวคือลำดับเบสซ้ำของ CT(n) เครื่องหมายดีเอ็นเอนี้จึงสามารถใช้สำหรับติดตามการปรากฏของอัลลีลยีน waxy ที่ต้องการได้ในการคัดเลือก [7]

วัตถุประสงค์การวิจัย

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือกลักษณะความหอมและปริมาณอะมิโลสต่ำ และการพัฒนารูปแบบการคัดกรองตัวอย่างเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกต้นข้าวที่มีลักษณะที่ต้องการในประชากรชั่วที่ 2 ของคู่ผสมระหว่างพันธุ์พุ่มธานี 1 และ CH4

เครื่องมือและวิธีการ

อุปกรณ์

1. พันธุ์ข้าว

1.1 ข้าวพันธุ์พุ่มธานี 1 เป็นข้าวเจ้าหอมไม่ไวต่อช่วงแสง คุณภาพเมล็ดคล้ายพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ข้าวสุกนุ่มเหนียวมีกลิ่นหอม

1.2 ข้าวพันธุ์ CH4 เป็นข้าวเจ้าไม่หอม มีรูปทรงต้นแบบใหม่ (new plant type: NPT) ที่มีจำนวนเมล็ดต่อรวงมาก แตกกอน้อย ทรงต้นตั้งตรงและให้ผลผลิตสูง

2. เครื่องหมายดีเอ็นเอ

2.1 เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro และ RM190

วิธีการ

1. การผสมข้าวเพื่อสร้างประชากร

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

2. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือก

ตรวจสอบความแตกต่างของเครื่องหมาย

ดีเอ็นเอ Naro (NaroF; 5/-AGGTTGCATT-TACTGGGAG-3/ และ NaroR; 5/-TGGCTAC-TAGAATGATGCT-3/) และเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM190 (RM190F; 5/-GCTACAAATAGCCA CCCACACC-3/ และ RM190R; 5/-CAACACAA-GCAGAGAAGTGAAGC-3/) ในพันธุ์พุ่มแม่ และใช้คัดเลือกในประชากรชั่วที่ 2 ทั้ง 600 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคการหน่วงเวลาไหลตัวอย่าง (delay loading) และวิธีการ stepwise marker screening [8] ในเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 2 โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Phire® Plant Direct PCR Kit ซึ่งเป็นชุด Kit ที่สามารถทำ PCR ได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอก่อนโดยเจาะใบข้าวด้วย Harris UNI-CORE™ จะได้เนื้อเยื่อรูปวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร (จำนวน 5 ชิ้น) ใส่ลงใน PCR plate เตรียมส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR (master mixture) โดยต้องเตรียมปริมาตรรวมทั้งหมด 10 ไมโครลิตร (ตารางที่ 1) เมื่อผสม master mixture ในหลอด PCR เรียบร้อยแล้วหยด mineral oil 1 หยดเพื่อป้องกันการระเหยออกระหว่างการทำ PCR นำหลอด PCR ใส่ลงในเครื่อง PCR (thermal cycler) ตั้งโปรแกรมตามเงื่อนไข (ตารางที่ 2) เมื่อปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเสร็จสิ้น นำหลอด PCR ออกจากเครื่องแล้วเติม sequencing dye 1 เท่า (10 ไมโครลิตร) จาก

นั้นเก็บไว้ที่ตู้แช่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) ย้อมเจลด้วย silver nitrate (AgNO_3) ตามวิธีการของ Benbouza, Jacquemin, Baudoin, and Mergeai [9]

ในการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือกลักษณะความหอมจะใช้เทคนิคการหน่วงเวลาโหลดตัวอย่าง (delay loading) ในการทำอิเล็กโตรโฟริซิสใช้หรีขนาด 50 ช่อง เมื่อหยอดตัวอย่าง PCR product 4 ไมโครลิตรในแต่ละช่องจนครบ เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าใช้กำลังไฟที่ 45 วัตต์ เมื่อแถบสีของ dye เคลื่อนลงมาได้ระยะ 5 เซนติเมตรจึงหยอดตัวอย่าง PCR product ชุดที่ 2 ลงในแต่ละช่อง ทำเช่นเดียวกันนี้ 4-6 ชั้น หลังจากนั้นดึงหรือออก ปลอยกระแสไฟต่อ เมื่อแถบสีของ dye ชั้นที่ 1 ลงมาได้ระยะ 30 เซนติเมตรจึงปิดเครื่องและย้อมสีแถบดีเอ็นเอ

การคัดเลือกสายต้นดำเนินการแบบ stepwise marker screening ประชากรชั่วที่ 2 คัดเลือกด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro ได้ต้นที่มีลักษณะความหอมหลังจากนั้นนำต้นที่คัดเลือกได้มาคัดเลือกลักษณะปริมาณอะมิโลสด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM190 ต่อไป

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro และ RM190 จำแนกลักษณะความหอมและลักษณะปริมาณอะมิโลสต่ำตามลำดับ ในพันธุ์พ่อคือพันธุ์ปทุมธานี 1 และพันธุ์แม่พันธุ์ CH4 เครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งสองสามารถแยกความแตกต่างในพันธุ์พ่อและแม่ได้

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือกลักษณะความหอมและลักษณะปริมาณอะมิโลสในประชากรชั่วที่ 2 จากประชากรทั้งหมด 600 ต้น เริ่มจากใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro คัดเลือกต้นที่มีพันธุกรรมแบบคงตัวในลักษณะความหอมหลังจากการทำ PCR แล้วนำมาแยกขนาดชั้นดีเอ็นเอด้วย

อิเล็กโตรโฟริซิสโดยใช้เทคนิคการหน่วงเวลาโหลดตัวอย่าง (delay loading) (ภาพที่ 2) พบว่ามีการกระจายตัวของจีโนไทป์ของพันธุ์กรรมที่ควบคุมลักษณะความหอมในอัตราส่วน 1:2:1 สำหรับพันธุกรรมแบบ *Badh/Badh*: *Badh/badh*: *badh/badh* โดยสามารถคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้จำนวน 151 ต้น จากนั้นนำต้นที่คัดเลือกได้ไปคัดเลือกลักษณะที่มีพันธุกรรมแบบคงตัวของปริมาณอะมิโลสต่ำ เช่นเดียวกับพันธุ์ปทุมธานี 1 พบว่ามีการกระจายตัวของจีโนไทป์ของพันธุ์กรรมที่ควบคุมลักษณะปริมาณอะมิโลสในอัตราส่วน 1:2:1 สำหรับพันธุกรรมแบบ *Waxy/Waxy*: *Waxy/waxy*: *waxy/waxy* โดยสามารถคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้ 32 ต้น (ตารางที่ 3) ดังนั้นในการคัดเลือกลักษณะดังกล่าวในรุ่นต่อไปไม่จำเป็นต้องคัดเลือกเนื่องจากได้มีการเลือกต้นที่มีพันธุกรรมคงตัวของลักษณะที่ต้องการไว้แล้ว เช่นเดียวกับรายงานของ Collard et al [5] และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rattanapol [10] ที่มีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอคัดเลือกลักษณะปริมาณอะมิโลสและความหอมในประชากรชั่วที่ 2 และ 3 จากการผสมข้ามระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่เป็นข้าวคุณภาพดีกับพันธุ์ Qiqnizhan ที่มีลักษณะรูปทรงต้นข้าวแบบใหม่ (จำนวนเมล็ดต่อรวงมาก แตกกอน้อย ทรงต้นตั้งตรง และให้ผลผลิตสูง) สามารถคัดเลือกลักษณะที่มีพันธุกรรมคงตัวของปริมาณอะมิโลสและความหอมได้ โดยลักษณะดังกล่าวไม่มีการกระจายในรุ่นต่อไป เนื่องจากทั้งสองลักษณะถูกควบคุมด้วยยีนแฝง

เทคนิคการคัดเลือกแบบ Stepwise marker screening เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นเพื่อคัดกรองจำนวนประชากรให้ลดลงในแต่ละครั้งของการคัดเลือกก่อนนำต้นที่ได้ไปคัดเลือกลักษณะที่ต้องการต่อไปซึ่ง Sreewongchai et al. [8] ได้ใช้เทคนิค stepwise ช่วยในการรวมยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือกในชั่วที่ 2 จากประชากรจำนวน 282 ต้นเนื่องจากประชากรที่ได้มีขนาดเล็กจึงต้องมีการคัดเลือกลักษณะที่มีจีโนไทป์

heterozygous ไว้ และนำมาผสมตัวเองให้เกิดการกระจายตัวในลักษณะเป้าหมายคือต้านทานโรคไหม้ แล้วจึงคัดเลือกลักษณะเป้าหมายที่มีพันธุกรรมแบบคงตัวในประชากรชั่วที่ 3 ต่อไปเพื่อให้ได้จีโนไทป์แบบ homozygous อย่างไรก็ตามเนื่องจากการทดลองนี้มีประชากรชั่วที่ 2 ขนาดใหญ่จำนวน 600 ต้นจึงสามารถใช้เทคนิค stepwise marker ช่วยในการคัดเลือกได้ภายในประชากรชั่วเดียว

สรุปผลการวิจัย

เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถนำมาใช้ช่วยคัดเลือกต้นที่มีพันธุกรรมที่ต้องการจากประชากรชั่วที่ 2 ได้ โดยสามารถเลือกต้นที่มีพันธุกรรมทั้งความหอมและปริมาณอะมิโลสต่ำเช่นเดียวกับพันธุ์ปทุมธานี 1 ได้

นอกจากนี้เทคนิค stepwise screening เป็นเทคนิคที่ประหยัดค่าใช้จ่ายในการทดลองและลดจำนวนตัวอย่างในการทำ PCR ลงได้ถึง 38 % ซึ่งหากใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอคัดเลือกรวมทั้ง 2 ลักษณะโดยวิธีปกติจะต้องทำปฏิกิริยา PCR ทั้งสิ้น 1,200 ตัวอย่าง หากใช้เทคนิค stepwise screening จะคงเหลือตัวอย่างที่ต้องทำปฏิกิริยา PCR เพียง 751 ตัวอย่าง (600 + 151 ตัวอย่าง) ซึ่งสามารถลดจำนวนตัวอย่างลงไปได้ถึง 449 ตัวอย่าง (จาก 600 ต้นในการคัดเลือกลักษณะความหอม สามารถคัดเลือกได้จำนวน 151 ต้น หลังจากนั้นจึงนำ 151 ต้นที่เลือกได้มาคัดเลือกลักษณะปริมาณอะมิโลส)

ในการทำงานวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาเทคนิคการหน่วงเวลาโหลดตัวอย่าง (delay loading) เพื่อประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธี Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) โดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างต่อการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยหยอดตัวอย่างเป็นชั้นห่างกันเป็นช่วง ซึ่งข้อจำกัดของเทคนิคนี้สามารถใช้ได้ดีกับเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนไม่เช่นนั้นจะเกิดความสับสนในการอ่านแถบดีเอ็นเอ

เอกสารอ้างอิง

1. Juliano BO. Criteria and tests for rice grain qualities. In: Juliano BO, editor. Rice: Chemistry and Technology. St. Paul: American Association of Cereal; 1985. p. 443–524.
2. Sanjiva RB, Vasudeva AR, Subrahmanya RS. The amylose and the amylopectin content of rice and their influence on the cooking quality of cereals. Proc. Indiana Acad. Sci 1952; 36: 70–80.
3. Buttery RG, Ling LC, Juliano BO, Turnbaugh JG. Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. J. Agric. Food Chem 1983; 31: 823–826.
4. Samphantaruk K. Plant breeding : Basic methods and concepts. 1st ed . Bangkok: Kasetsart University; 2009
5. Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement : The basic concepts. Euphytica 2005; 142: 169–196.
6. Rattanapol P, Sripichitt P, Sreewongchai T. Development of functional DNA marker specific to aromatic gene in rice. In The Proceeding of 49th Kasetsart University Annual Conference; 2011 Feb 1–4;. Kasetsart University. Bangkok: 2011. p 574–580.
7. Ayres NM, McClung AM, Larkin PD, Bligh HFJ, Jones CA, Park WD. Microsatellites and a single-nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germ plasm. Theor. Appl. Genet 1997; 94: 773–781.

8. Sreewongchai T, Toojinda T, Thanintorn N, Kosawang C, Vanavichit A, Tharreau D, et al. Development of elite indica rice lines with wide spectrum of resistance to Thai blast isolates by pyramiding multiple resistance QTLs. *Plant Breed* 2010;129: 176-180.
9. Benbouza H, Jacquemin JM, Baudoin JP, Mergeai G. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 2006;10: 77-81.
10. Rattanapol P. Rice Breeding for Photoperiod Insensitivity, High Yield and Good Grain Quality by Pedigree Method and Marker Assisted Selection [dissertation / Master of Science (Agronomy)]. Bangkok: Kasetsart University; 2012.

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นและปริมาตรสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

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

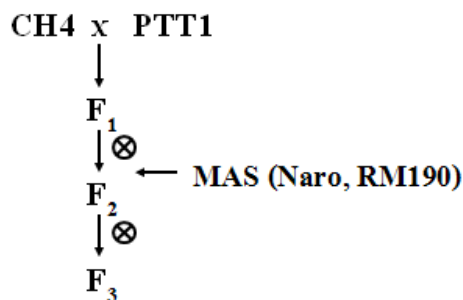
ตารางที่ 2 เงื่อนไขในการตั้งค่าของปฏิกิริยา PCR

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

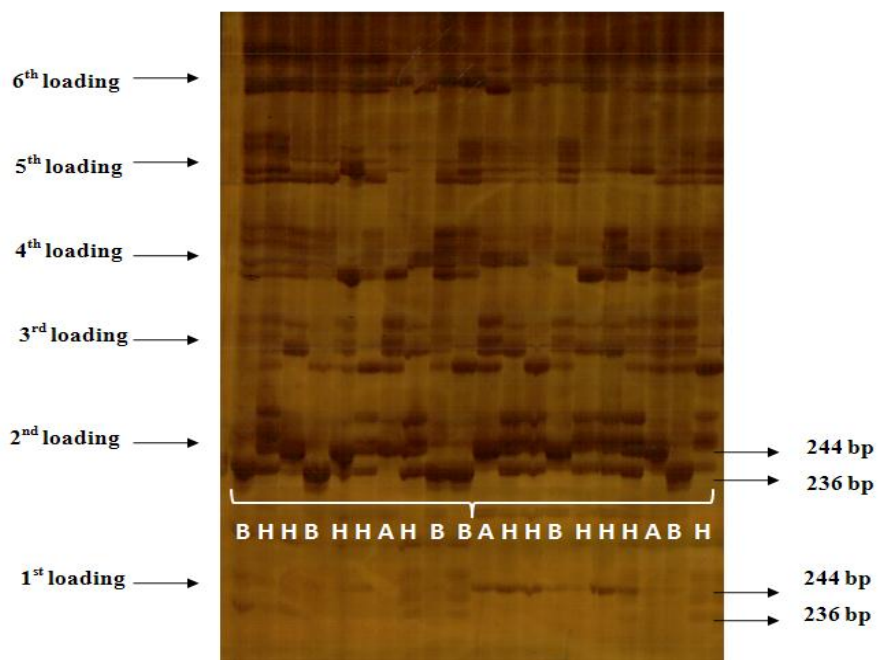
ตารางที่ 3 แสดงผลการคัดเลือกในแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งสองลักษณะในประชากรข้าวที่ 2

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

หมายเหตุ : ^{ns} คือไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์



ภาพที่ 1 แผนผังการปรับปรุงพันธุ์



ภาพที่ 2 เทคนิคการห้วงเวลาโหลดตัวอย่าง (delay loading) ในเครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro เพื่อคัดเลือกลักษณะความหอม หมายเหตุ: A คือ ลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนพันธุ์แม่ (CH4: *Badh/Badh*); B คือลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนพันธุ์พ่อ (PTT1: *badh/badh*); H คือลักษณะทางพันธุกรรมแบบเฮเทอโรไซกัส (*Badh/badh*)