



การพัฒนาพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 พันธ์ 4 ให้ต้านทานโรคไหม้ด้วยยีน *Pi9* ทั้ง 4 อัลลีล (*Pi2*, *Pi9*, *Piz* และ *Piz-t*)

Development of Blast Disease Resistance in Khao Dawk Mali 105 Plus IV Rice Variety Using all Four Alleles (*Pi2*, *Pi9*, *Piz* and *Piz-t*) of *Pi9* Gene

รัตติกาน เกิดผล¹, ธนพล ไชยแสน¹, นงลักษณ์ เภรินทวงศ์², ธาณี ศรีวงศ์ชัย^{1*}

¹ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900

²ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

Rattigan Kaedphol¹, Tanapon Chaisan¹, Nonglak Parinthawong², Taneé Sreewongchai^{1*}

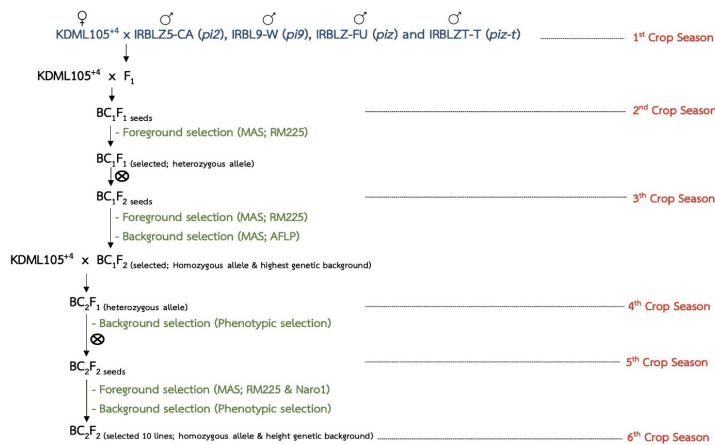
¹Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

²Department of Plant Production Technology, School of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520

Received 5 February 2025; Received in revised 8 October 2025; Accepted 15 October 2025

GRAPHICAL ABSTRACT

ABSTRACT



Khao Dawk Mali 105 (KDML105) is a premium Thai rice variety widely favored for consumption; however, it is highly susceptible to blast disease. This study aimed to introgress four alleles of the *Pi9* gene group—*Pi2*, *Pi9*, *Piz*, and *Piz-t*—from resistant donor lines IRBLZ5-CA, IRBL9-W, IRBLZ-FU, and IRBLZT-T, respectively, into the improved KDML105⁺⁴ variety through marker-assisted backcrossing. Simple sequence repeat (SSR) markers RM225 and Naro1 were used to detect the presence of blast resistance genes and the fragrance gene, respectively. Additionally, amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers were employed to identify individuals with genetic backgrounds closely resembling that of the recurrent parent. Phenotypic traits were

also evaluated to support the selection process. The results successfully identified 10 BC₂F₂ lines per cross that carried the targeted resistance genes and exhibited the desired phenotypic traits, resulting in a total of 40 selected lines. These lines are recommended for further evaluation under field conditions to assess the stability of blast resistance and yield performance. Moreover, future studies should examine their resistance against diverse blast pathogen races under real-world growing environments, particularly in high-risk areas. The ultimate goal is to develop new rice lines suitable for cultivation in areas vulnerable to blast outbreaks and capable of meeting the practical needs of local farmers.

คำสำคัญ	บทคัดย่อ
<p>การปรับปรุงพันธุ์ข้าว; การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ช่วยคัดเลือก; วิธีการผสมกลับ; ความต้านทานโรคไหม้</p> <p>Keywords</p> <p>Rice breeding; DNA marker-assisted selection; Backcrossing method; Blast disease resistance</p>	<p>ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวไทยคุณภาพสูงที่เป็นที่นิยมในการบริโภค แต่มักอ่อนแอต่อโรคไหม้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อถ่ายทอดยีนต้านทานโรคไหม้กลุ่ม <i>Pi9</i> ทั้ง 4 อัลลีล ได้แก่ <i>Pi2</i>, <i>Pi9</i>, <i>Piz</i> และ <i>Piz-t</i> จากสายพันธุ์ IRBLZ5-CA, IRBL9-W, IRBLZ-FU และ IRBLZT-T ตามลำดับ ไปยังพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 พลับ 4 (KDML105⁺) โดยใช้วิธีผสมกลับร่วมกับการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแบบ SSR ได้แก่ RM225 และ Naro1 ถูกใช้เพื่อตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้และยีนความหอม ตามลำดับ ขณะที่เครื่องหมายโมเลกุลแบบ AFLP ถูกใช้เพื่อคัดเลือกรุ่นที่มีพื้นฐานพันธุกรรมใกล้เคียงพันธุ์รับมากที่สุด นอกจากนี้ ยังประเมินลักษณะทางฟีโนไทป์เพื่อประกอบการคัดเลือกร่วมด้วย จากผลการทดลองสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวลูกผสมกลับชั่วที่ BC₂F₂ ที่มีคุณลักษณะตรงตามเกณฑ์ได้จำนวน 10 สายพันธุ์ต่อคู่ผสม อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 40 สายพันธุ์นำไปปลูกทดสอบภายใต้สภาพแปลงทดลองเพื่อประเมินความเสถียรของลักษณะต้านทานโรคไหม้และประสิทธิภาพการให้ผลผลิต ก่อนพิจารณาเข้าสู่กระบวนการปรับปรุงพันธุ์ในระดับสูงต่อไป รวมไปถึงศึกษาประสิทธิภาพในการต้านทานเชื้อโรคไหม้หลากหลายสายพันธุ์ภายใต้สภาพแวดล้อมจริงในพื้นที่ปลูกหลัก เพื่อให้ได้สายพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมสำหรับการปลูกในพื้นที่เสี่ยงต่อการระบาดของโรคไหม้ และตอบสนองต่อความต้องการของเกษตรกรในพื้นที่ปลูกจริง</p>

*ผู้รับผิดชอบบทความ: taneesree@yahoo.com

DOI:

1. บทนำ

ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวที่มีคุณภาพการรับประทานที่ดี เมื่อหุงสุกเมล็ดมีความนุ่มและมีกลิ่นหอม ส่งผลให้ขายได้ในราคาสูง พื้นที่เพาะปลูกข้าวขาวดอกมะลิ 105 ส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือของประเทศ อย่างไรก็ตาม ข้าวพันธุ์ดังกล่าวยังมีความอ่อนแอต่อโรคและแมลงศัตรูพืช โดยเฉพาะโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญและพบการระบาดอย่างต่อเนื่องในพื้นที่เพาะปลูกหลัก [1] ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว [2] ได้พัฒนาพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์ใหม่ให้มีลักษณะต้านทานต่อโรค แมลง และทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ด้วยการเพิ่มยีนต้านทาน 4 ลักษณะ ได้แก่ ยีนต้านทานโรคไหม้ (*Pik*) ยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง (*Xa21*) ยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Bph3*) และ ยีนทนทานต่อน้ำท่วมฉับพลัน (*Sub1*) โดยใช้ชื่อว่าข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 พลัส 4 (KDML105⁺) เพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกทดแทนข้าวพันธุ์เดิม ปัจจุบันโครงการวิจัยด้านปรับปรุงพันธุ์นิยมใช้แหล่งพันธุกรรมต้านทานโรคไหม้จากข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pik* ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวมาเป็นระยะเวลาช้านาน เพราะมีความสามารถในการต้านทานโรคแบบกว้าง (Broad spectrum resistance) ต่อเชื้อโรคไหม้ในประเทศไทย [3] มีรายงานเกี่ยวกับยีนต้านทานโรคไหม้ในกลุ่ม *Pi9* ว่าสามารถต้านทานเชื้อโรคไหม้แบบกว้างได้ดีกว่ายีนต้านทาน *Pik* [4] และจากข้อมูลของกรมการข้าว และสถาบันวิจัยข้าวระหว่างประเทศ (International rice research institute; IRRI) ที่ได้มีการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านทานโรคไหม้ของยีนต้านทานทั้ง 4 อัลลีลในกลุ่ม *Pi9* คือ *Pi2*, *Pi9*, *Piz* และ *Piz-t* พบว่ามีความสามารถในการต้านทานประชากรเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่พบในประเทศไทยได้เป็นอย่างดี [5] ซึ่งยีนดังกล่าวมีตำแหน่งอยู่ที่บริเวณเซนโตรเมียร์ของโครโมโซมข้าวคู่ที่ 6 โดยมีแหล่งกำเนิดที่แตกต่างกัน ได้แก่ ยีนต้านทาน *Pi2* ได้รับการถ่ายทอด

มาจากข้าวพันธุ์อินดิกา สายพันธุ์ 5173 ยีนต้านทาน *Pi9* ถูกถ่ายทอดมาจากข้าวป่า (*Oryza minuta*: 2n=4x=48) ยีนต้านทาน *Piz* มีต้นกำเนิดมาจากข้าวของอเมริกา สายพันธุ์ Zeuth และยีนต้านทาน *Piz-t* ได้รับการถ่ายทอดมาจากข้าวพันธุ์อินดิกา สายพันธุ์ TKM1 [6] การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีการผสมกลับ มักถูกใช้ในกรณีที่มีพืชพันธุ์ที่อยู่แล้วแต่ยังขาดลักษณะใดลักษณะหนึ่งอยู่ ซึ่งลักษณะที่ขาดควรเป็นลักษณะเชิงคุณภาพที่ควบคุมด้วยยีนน้อยคู่ การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีนี้เป็น การนำประชากรรุ่นลูกผสมกลับไปหาพ่อหรือแม่พันธุ์ดีหลายๆ ครั้ง เพื่อเพิ่มลักษณะที่ต้องการไว้ในพันธุ์เดิม โดยยังคงลักษณะเหมือนต้นพ่อหรือแม่ไว้ [7] นอกจากนี้ การนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบผสมกลับ (Marker-assisted backcrossing, MABC) ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและย่นระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลงได้ โดยสามารถทำได้ 2 แนวทางหลักด้วยกัน เริ่มจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอคัดเลือกลูกเป้าหมาย (Target gene) ที่ต้องการปรับปรุงก่อนแล้วจึงใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอคัดเลือกลูกต้นที่มีพื้นฐานพันธุกรรมใกล้เคียงพันธุ์รับ (Genetic background selection) เพื่อให้ได้ต้นพืชที่มีลักษณะตรงตามเป้าหมายที่ต้องการและคงพันธุกรรมเหมือนกับพันธุ์เดิมมากที่สุด [8, 9] อย่างไรก็ตาม เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ดังนั้น จึงมีโอกาสสูงที่เชื้อจะเกิดการเปลี่ยนแปลงยีนก่อโรคและปรับตัวเพื่อให้สามารถอยู่รอดและเข้าทำลายข้าวได้ ซึ่งหากเกิดเหตุการณ์นี้ขึ้นจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อการผลิตข้าวเป็นอย่างมาก ด้วยเหตุนี้จึงต้องพัฒนาพันธุ์ข้าว KDML105⁺ ให้มียีนต้านทานโรคไหม้ชนิดอื่นเพิ่มเติมจากยีนต้านทาน *Pik* ที่มีอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่เคยมีรายงานการนำยีนต้านทานกลุ่ม *Pi9* มาใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ข้าวพันธุ์ KDML105⁺ ให้ต้านทานโรคไหม้แบบ Multi-allelic โดยวิธีการการใช้ Marker-assisted backcrossing มาก่อน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อถ่ายทอดยีนต้านทานโรคไหม้กลุ่ม *Pi9*

ทั้ง 4 อัลลีล ได้แก่ $Pi2$, $Pi9$, Piz และ $Piz-t$ จากข้าวสายพันธุ์ IRBLZ5-CA, IRBL9-W, IRBLZ-FU และ IRBLZT-T ไปหาข้าวพันธุ์ KDML105⁺⁴ โดยใช้วิธีการผสมกลับร่วมกับการคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล และการประเมินลักษณะฟีโนไทป์ร่วมด้วย เพื่อให้ได้พันธุ์ข้าว KDML105⁺⁴ ที่มียืนต้านทานกลุ่มใหม่ และรองรับการปรับตัวของเชื้อโรคใหม่ที่มีโอกาสจะเปลี่ยนแปลงไปในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 อุปกรณ์

2.1.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์รับ (Recurrent parent) คือข้าวพันธุ์ KDML105⁺⁴

2.1.2 พันธุ์ข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ (Donor parent) คือสายพันธุ์ข้าวที่มียืนต้านทานโรคไหม้กลุ่ม $Pi9$ ทั้ง 4 อัลลีล จำนวน 4 สายพันธุ์ ประกอบด้วยสายพันธุ์ IRBLZ5-CA (มียืนต้านทาน $Pi2$), สายพันธุ์ IRBL9-W (มียืนต้านทาน $Pi9$), สายพันธุ์ IRBLZ-FU (มียืนต้านทาน Piz) และสายพันธุ์ IRBLZT-T (มียืนต้านทาน $Piz-t$)

2.1.3 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้คัดเลือกลักษณะ ของยืนเป้าหมาย 2 ลักษณะ ได้แก่ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM225 [10] สำหรับใช้จำแนกพันธุ์กรรมที่มีลักษณะต้านทานโรคไหม้กลุ่มยืน $Pi9$ ทั้ง 4 อัลลีล (Table 1) และ เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro1 [11] สำหรับใช้จำแนกพันธุ์กรรมที่มีลักษณะความหอม

2.2 วิธีการ

2.2.1 การออกแบบการผสมพันธุ์และการคัดเลือกประชากรข้าว

ผสมข้ามระหว่างข้าวพันธุ์ KDML105⁺⁴ กับสายพันธุ์ข้าวที่มียืนต้านทานโรคไหม้กลุ่ม $Pi9$ ทั้ง 4 อัลลีล ได้แก่ $Pi2$, $Pi9$, Piz , และ $Piz-t$ จำนวน 4 คู่ผสม ได้แก่ KDML105⁺⁴ × IRBLZ5-CA, KDML105⁺⁴ × IRBL9, KDML105⁺⁴ × IRBLZ-FU และ KDML105⁺⁴ × IRBLZT-T ตามลำดับ หลังจากได้ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) จึงผสมกลับไปหาพันธุ์ KDML105⁺⁴ เพื่อสร้างประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_1F_1 และใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ Simple sequence repeat หรือ SSR โดยใช้ไพรเมอร์ RM225 คัดเลือกลักษณะต้านทานโรคไหม้ที่มีพันธุกรรมแบบเฮเทอโรไซกัส (Heterozygous) ที่ตำแหน่งยืนเป้าหมายทั้งสิ้น ต่อมาปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อให้ได้ประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_1F_2 และปลูกคู่ผสมละ 200 ต้น คัดเลือกลักษณะต้านทานโรคไหม้ที่มีพันธุกรรมแบบคงตัว (Homozygous) ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM225 จากนั้นคัดเลือกต้นที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมใกล้เคียงพันธุ์รับมากที่สุด ด้วยเทคนิค Amplified fragment length polymorphism หรือ AFLP นำต้นที่ผ่านการคัดเลือกผสมกลับไปหาพันธุ์ KDML105⁺⁴ อีกครั้ง ได้ประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_1 จากนั้นปลูกประเมินลักษณะฟีโนไทป์ โดยคัดเลือกลักษณะทรงต้นที่ใกล้เคียงกับพันธุ์รับมากที่สุด แล้วจึงปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อให้ได้ประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_2 ในขั้นตอนสุดท้าย

Table 1 Molecular markers utilized in foreground selection.

Marker	Type	Detection	Traits	Sequence forward (5'-3')	Sequence reverse (5'-3')
RM225	Specific marker (SSR)	(CT)18	blast disease resistance	TGCCCATATGGTCTGGATG	GAAAGTGGATCAGGAAGGC

ปลูกประชากรลูกผสมกลับซ้ำที่ BC₂F₂ ของทั้ง 4 คู่ผสม เพื่อคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคไหม้และลักษณะความหอมที่มีพันธุกรรมแบบคงตัว โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM225 และ Naro1 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังประเมินลักษณะฟีโนไทป์ร่วมด้วยเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับพันธุ์รับมากที่สุด จำนวน 10 สายพันธุ์ต่อคู่ผสม (Figure 1)

2.2.2 การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase chain reaction; PCR)

เก็บใบอ่อนต้นข้าวอายุประมาณ 3 สัปดาห์จากพันธุ์พ่อแม่ และประชากรลูกผสมกลับ มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Phire® plant direct

PCR kit เริ่มโดยเจาะใบข้าวด้วย Harris UNI-CORE™ ได้เนื้อเยื่อรูปวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร (จำนวน 5 ชิ้น) ใส่ลงใน PCR plate เตรียมส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR (Master mixture) ปริมาตรรวมทั้งหมด 10 ไมโครลิตร (Table 2) เมื่อผสม Master mixture ในหลอด PCR เรียบร้อยแล้วจึงหยด Mineral oil จำนวน 1 หยด เพื่อป้องกันการระเหย จากนั้นนำหลอด PCR ใส่ลงในเครื่อง Thermal cycler แล้วตั้งโปรแกรมตามเงื่อนไข (Table 3) เมื่อปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเสร็จสิ้น นำ PCR plate ออกจากเครื่องแล้วเติม Sequencing dye 10 ไมโครลิตร เก็บไว้ในตู้แช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

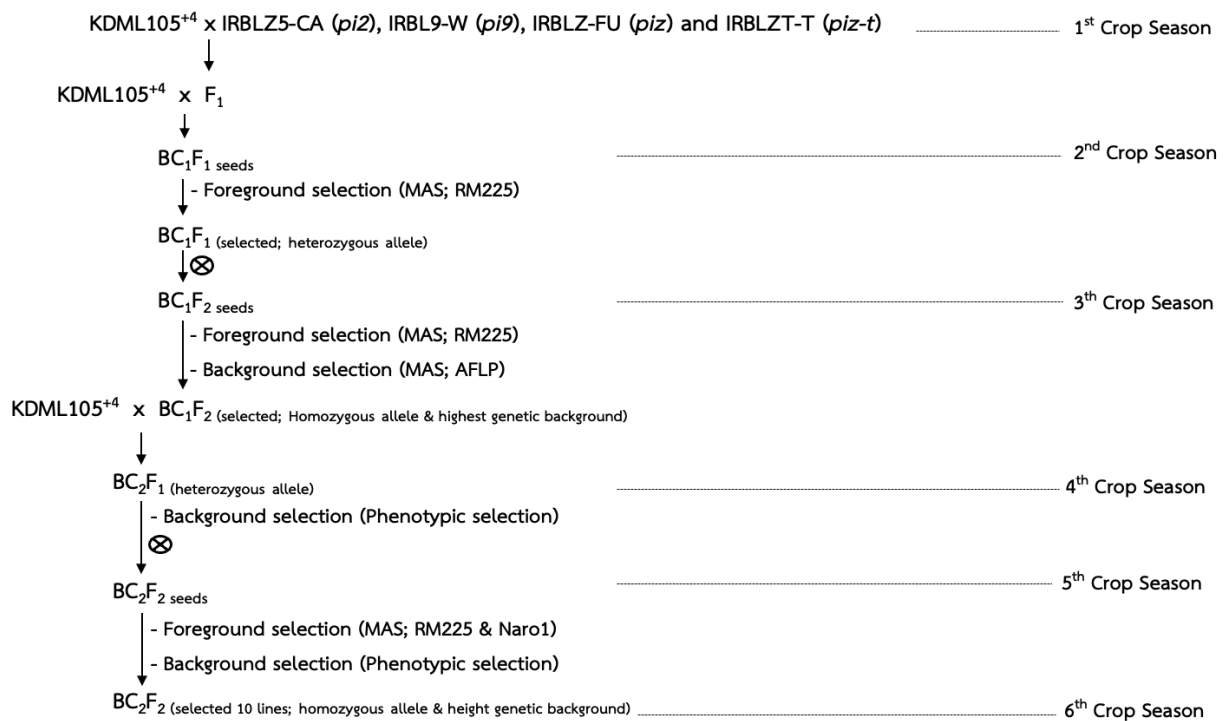


Figure 1 Breeding scheme for the development of blast resistance in KDML105⁺⁴ rice variety with four alleles of *Pi9* gene by backcross breeding method.

“MAS” indicates the Marker Assisted Selection.

“AFLP” indicates the Amplified Fragment Length Polymorphism.

Table 2 The concentration and volume of the solution used in the polymerase chain reaction; PCR.

Stock	PCR concentration	Final PCR volume (µL)
2x plant PCR buffer	1x	5
5 µmol forward primer	0.5 µmol	0.5
5 µmol reverse primer	0.5 µmol	0.5
Phire® Hot Start DNA polymerase	-	0.2
Sterile distilled H ₂ O	-	3.8
Total	-	10

Table 3 The conditions used for setting up the polymerase chain reaction; PCR.

Steps of reaction	Temperature (°C)	Time (Seconds)
First denature	98	300
Denature	98	5
Annealing	55	5
Extension	72	30
Final extension	72	60
Hold	16	∞

2.2.3 การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอคัดเลือดยีนเป้าหมายและตรวจสอบความเหมือนทางพันธุกรรมกับพันธุ์รับ

การคัดเลือดยีนเป้าหมายที่เกี่ยวข้องกับลักษณะพันธุกรรมต้านทานโรคราไหม้กลุ่ม *Pi9* ทั้ง 4 อัลลีล ในประชากรลูกผสมกลับด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ซึ่งมีความจำเพาะและสามารถตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมที่ต้องการได้อย่างแม่นยำ โดยนำ PCR Product ปริมาตร 4 ไมโครลิตรของแต่ละตัวอย่างหยดลงบน Polyacrylamide gel และแยกขนาดดีเอ็นเอ

ด้วยกระแสไฟฟ้าในระบบ Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) กำลังไฟ 45 วัตต์ ให้แถบสี (Dye) เคลื่อนที่ลงมาได้ระยะประมาณ 30 เซนติเมตร จึงปิดเครื่อง จากนั้นย้อมสีเจลเพื่อตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วย Silver nitrate (AgNO₃) ตามวิธีการของ Benbouza et al. [12]

การตรวจสอบความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างประชากรลูกผสมกลับช่วงที่ BC₁F₂ กับพันธุ์รับ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบ AFLP ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมได้อย่าง

มีประสิทธิภาพ โดยได้นำตัวอย่างใบข้าวส่งวิเคราะห์ยังห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม เริ่มต้นด้วยการสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว และนำดีเอ็นเอปริมาณ 0.5 ไมโครกรัม มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิด ได้แก่ *Eco* RI และ *Tru* 91 (ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัดดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกับ *Mse* I) จากนั้นจึงเชื่อมต่อกับ Adapter ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะตรงกับตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ทั้งสอง ได้แก่ *Eco* RI-adapter และ *Mse* I-adapter ต่อจากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่าง (Polymorphism) ระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ ซึ่งใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ ประกอบด้วยไพรเมอร์ของทั้งด้าน *Eco* RI และ *Mse* I (Table 4) นำ PCR Product ที่ได้ไปวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ตามวิธีการของ Vos et al. [13] ซึ่งวิธีการดังกล่าวสามารถแสดง

รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่เฉพาะ และจำแนกพันธุ์พ่อและแม่ได้อย่างชัดเจน

2.2.4 การประเมินลักษณะทางการเกษตร และผลผลิตเบื้องต้น

การคัดเลือกทางฟีโนไทป์เป็นอีกหนึ่งขั้นตอนสำคัญที่ใช้เสริมการคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรม เพื่อให้ได้มาซึ่งสายพันธุ์ที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ใกล้เคียงกับพันธุ์รับ โดยปลูกประชากรข้าวลูกผสมกลับช่วงที่ BC₂F₂ ทั้ง 4 คู่ผสม และคัดเลือกต้นที่มีลักษณะทางการเกษตรที่ใกล้เคียงกับพันธุ์ KDML105⁺ จำนวนคู่ผสมละ 10 สายพันธุ์ เพื่อประเมินลักษณะทางฟีโนไทป์ ประกอบด้วยลักษณะสำคัญ ได้แก่ ความสูงต้น จำนวนหน่อตอก จำนวนรวงต่อกอ จำนวนเมล็ดต่อรวง น้ำหนัก 100 เมล็ด และน้ำหนักเมล็ดต่อกอ แล้วคำนวณค่าเฉลี่ยของแต่ละลักษณะเปรียบเทียบกับพันธุ์รับ

Table 4 Ten primers used for DNA fingerprinting.

No.	<i>Eco</i> RI adapter	<i>Mse</i> I adapter
1	ER-AAC	MS-ACC
2	ER-AAC	MS-AAC
3	ER-AAC	MS-AGT
4	ER-ACC	MS-CAA
5	ER-ACC	MS-CAC
6	ER-ACC	MS-CGT
7	ER-ACC	MS-ACC
8	ER-ACC	MS-AAC
9	ER-AAC	MS-CAC
10	ER-AAC	MS-CGT

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การคัดเลือกต้นข้าวลูกผสมกลับชั่วที่ BC₁F₁ และ BC₁F₂ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

จากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM225 จำแนกลักษณะด้านทานโรคไหม้ในพันธุ์พ่อและแม่ พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวสามารถแยกความแตกต่างในพันธุ์พ่อและแม่ได้ เมื่อใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอคัดเลือกต้นที่มีลักษณะพันธุกรรมแบบเฮเทอโรไซกัสในประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC₁F₁ ทั้ง 4 คู่ผสม โดยคัดเลือกต้นที่แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่ พบว่า ต้นลูกผสมกลับชั่วที่ BC₁F₁ จากคู่ผสม KDML105⁺⁴ × IRBLZ5-CA (*Pi2*) มีจำนวน 47 ต้น คู่ผสม KDML105⁺⁴ × IRBL9-W (*Pi9*) มีจำนวน 43 ต้น คู่ผสม KDML105⁺⁴ × IRBLZ-FU (*Piz*) มีจำนวน 50 ต้น และคู่ผสม KDML105⁺⁴ × IRBLZT-T (*Piz-t*) มีจำนวน 33 ต้น (Table 5) จากนั้นปล่อยให้ต้นที่ถูกคัดเลือกผสมตัวเองจนได้ประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC₁F₂ แล้วจึงคัดเลือกพันธุกรรมแบบคงตัว โดยคัดเลือกต้นที่แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ตรงกับพันธุ์ให้หรือพันธุ์พ่อ ดังตัวอย่าง (Figure 2) ผลการคัดเลือกพบว่า ต้นลูกผสมกลับชั่วที่

BC₁F₂ จากคู่ผสม KDML105⁺⁴ × IRBLZ5-CA (*Pi2*) มีจำนวน 4 ต้น คู่ผสม KDML105⁺⁴ × IRBL9-W (*Pi9*) มีจำนวน 14 ต้น คู่ผสม KDML105⁺⁴ × IRBLZ-FU (*Piz*) มีจำนวน 6 ต้น และคู่ผสม KDML105⁺⁴ × IRBLZT-T (*Piz-t*) มีจำนวน 11 ต้น (Table 5) ผลการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM225 แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของเครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนกต้นข้าวที่มียีน *Pi9* ในแต่ละยีนได้อย่างแม่นยำ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงอัตราความสำเร็จในการได้ต้นที่มียีนด้านทานแบบคงตัวนั้นแตกต่างกันในแต่ละยีน โดยเฉพาะในคู่ผสมที่มียีน *Pi9* และ *Piz-t* ที่สามารถคัดเลือกได้ในจำนวนสูงกว่ายีนอื่น

3.2 การประเมินพื้นฐานพันธุกรรมของข้าวลูกผสมกลับชั่วที่ BC₁F₂ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล AFLP

ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อถ่ายทอดยีนด้านทานโรคไหม้เข้าสู่พันธุ์ข้าว KDML105⁺⁴ ได้มีการผสมกลับกับสายพันธุ์ที่มียีนด้านทานโรคไหม้กลุ่ม *Pi9* จำนวน 4 สายพันธุ์ และนำต้นลูกผสมกลับชั่วที่ BC₁F₂ ที่ผ่านการคัดเลือกทางพันธุกรรมในระดับยีนมาประเมินพื้นฐานพันธุกรรมใกล้เคียงพันธุ์รับด้วยเครื่องหมายโมเลกุล AFLP ผลการวิเคราะห์พบว่า คู่ผสม KDML105⁺⁴ ×

Table 5 The number of plants in BC₁F₁ and BC₁F₂ progenies were selected by RM225 marker.

Crosses	Target alleles	No. of BC ₁ F ₁ progenies ^a		No. of BC ₁ F ₂ progenies ^a	
		Total	heterozygous alleles (Aa)	Total	Homozygous dominant alleles (AA)
KDML105 ⁺⁴ × IRBLZ5-CA	<i>Pi2</i>	87	47	38	4
KDML105 ⁺⁴ × IRBL9-W	<i>Pi9</i>	81	43	52	14
KDML105 ⁺⁴ × IRBLZ-FU	<i>Piz</i>	89	50	38	6
KDML105 ⁺⁴ × IRBLZT-T	<i>Piz-t</i>	76	33	35	11

“Aa” indicates the SSR marker of heterozygous alleles.

“AA” indicates the SSR marker of homozygous dominant alleles.

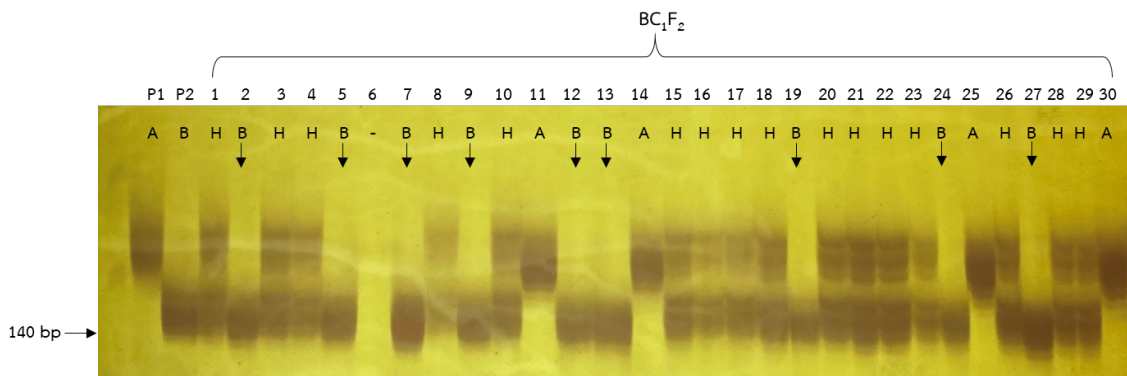


Figure 2 Identification of BC_1F_2 progenies using RM225 marker; P1, recurrent parent (KDML105⁺⁴ rice variety); P2, donor parent (IRBLZ5-CA, IRBL9-W, IRBLZ-FU and IRBLZT-T lines) and 1-30, BC_1F_2 progenies.

“A” indicates the SSR marker of homozygous recessive alleles (*aa*).

“B” indicates the SSR marker of homozygous dominant alleles (*AA*).

“H” indicates the SSR marker of heterozygous alleles (*Aa*).

IRBLZ5-CA (*Pi2*) มีต้นหมายเลข 138 ที่มีพื้นฐานพันธุกรรมใกล้เคียงพันธุ์รับมากที่สุดที่ 72.27% แต่ต้นดังกล่าวไม่สามารถผลิตเมล็ดได้ จึงคัดเลือกต้นหมายเลข 124 แทน ซึ่งมีพื้นฐานพันธุกรรมใกล้เคียงพันธุ์รับอยู่ที่ 66.98% สำหรับคู่ผสมอื่นๆ พบว่า ต้นหมายเลข 37 จากคู่ผสม KDML105⁺⁴ × IRBL9-W (*Pi9*) มีพื้นฐานพันธุกรรมใกล้เคียงพันธุ์รับ 86.29% ต้นหมายเลข 80 จากคู่ผสม KDML105⁺⁴ × IRBLZ-FU (*Piz*) มีพื้นฐานพันธุกรรมใกล้เคียงพันธุ์รับ 87.23% และต้นหมายเลข 100 จากคู่ผสม KDML105⁺⁴ × IRBLZT-T (*Piz-t*) มีพื้นฐานพันธุกรรมใกล้เคียงพันธุ์รับ 84.11% (Table 7) ผลการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ร่วมกับ AFLP ช่วยให้สามารถคัดเลือกต้นข้าวที่มีพื้นฐานพันธุกรรมใกล้เคียงพันธุ์รับสูงสุดได้ถึง 87.23% ได้ภายใน 2 ชั่วโมงการผสมกลับนั้นสะท้อนถึงประสิทธิภาพของแนวทางการใช้ Marker-assisted backcrossing ในการช่วยย่นระยะ

เวลา และเพิ่มความแม่นยำในการพัฒนาพันธุ์ข้าวอย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pricharoen et al. [14] ที่ใช้เครื่องหมาย SSR ในการถ่ายทอดลักษณะความหอมจากข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ไปยังพันธุ์ CH4 แล้วคัดเลือกต้นที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมเหมือนพันธุ์รับด้วยเครื่องหมาย AFLP พบว่า สามารถคัดเลือกต้นที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมใกล้เคียงพันธุ์รับได้ถึง 91.67% ในชั่ว BC_2F_1 ซึ่งเทียบเท่ากับการผสมกลับในชั่ว BC_3F_1 ด้วยวิธีการแบบดั้งเดิม (Conventional breeding) ผลการศึกษาทั้งสองนี้สอดคล้องกันในแง่ของการยืนยันว่าการใช้ Marker-assisted backcrossing มาใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์เป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะในพืชเศรษฐกิจอย่างข้าว ที่ต้องรักษาลักษณะทางคุณภาพเดิมของพันธุ์รับไว้พร้อมกับการเพิ่มคุณสมบัติต้านทานโรคจากพันธุ์อื่น [15, 16]

Table 6 The top 3 genetic similarity of BC₁F₂ progenies similar to KDML105⁺⁴ rice variety

Crosses	Plant number	Percentage of KDML105 ⁺⁴	Notes
KDML105 ⁺⁴ × IRBLZ5-CA	138	72.27	Undeveloped seeds
	130	70.09	Undeveloped seeds
	124	66.98	Developed seeds*
KDML105 ⁺⁴ × IRBL9-W	37	86.29	Developed seeds*
	44	83.49	Developed seeds
	47	82.24	Developed seeds
KDML105 ⁺⁴ × IRBLZ-FU	80	87.23	Developed seeds*
	84	85.67	Undeveloped seeds
	67	83.8	Developed seeds
KDML105 ⁺⁴ × IRBLZT-T	100	84.11	Developed seeds*
	113	83.49	Developed seeds
	91	82.55	Developed seeds

*” Indicates the selected plant.

3.3 การประเมินลักษณะทางการเกษตรในประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC₂F₁

ในประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC₂F₁ ได้คัดเลือกเฉพาะต้นที่แสดงลักษณะทางการเกษตรใกล้เคียงกับพันธุ์รับมากที่สุด โดยใช้ลักษณะภายนอกที่สังเกตได้เป็นเกณฑ์เบื้องต้นในการคัดเลือก ได้แก่ ลักษณะทรงต้น ความสูงต้น อายุวันออกดอก ความยาวรวง และรูปร่างของเมล็ด โดยต้นที่ผ่านการคัดเลือกในแต่ละคู่ผสม ซึ่งมีลักษณะฟีโนไทป์สอดคล้องกับพันธุ์รับอย่างเด่นชัด (Figure 3) ได้รับการปล่อยให้ผสมตัวเอง จากนั้นจึงเก็บเมล็ดนำไปปลูกเป็นประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC₂F₂ กระบวนการคัดเลือกดังกล่าวมีเป้าหมายเพื่อเสริมสร้างเสถียรภาพของลักษณะทางการเกษตรที่พึงประสงค์ควบคู่กับการรักษายีนต้านทานโรครไหม้ โดยอาศัยวิธีการประเมินลักษณะฟีโนไทป์ และนำต้นที่ผ่านการประเมินเบื้องต้น

ไปคัดเลือกเพิ่มเติมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลในชั่วรุ่นถัดไป

3.4 การคัดเลือกพันธุ์กรรมต้านทานโรครไหม้ และพันธุ์กรรมความหอมในประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC₂F₂

ในประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC₂F₂ ได้คัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมจำนวนสองลักษณะที่สำคัญ ได้แก่ ลักษณะต้านทานโรครไหม้ และลักษณะความหอม โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะสำหรับแต่ละลักษณะ เริ่มจากการคัดเลือกพันธุ์กรรมต้านทานโรครไหม้แบบคงตัวด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM225 ซึ่งสามารถจำแนกอัลลีลต้านทานโรครไหม้ที่ถ่ายทอดจากสายพันธุ์พ่อ ได้แก่ Pi2, Pi9, Piz และ Piz-t ในแต่ละคู่ผสม จากนั้นจึงคัดเลือกพันธุ์กรรมความหอมแบบคงตัว โดยใช้

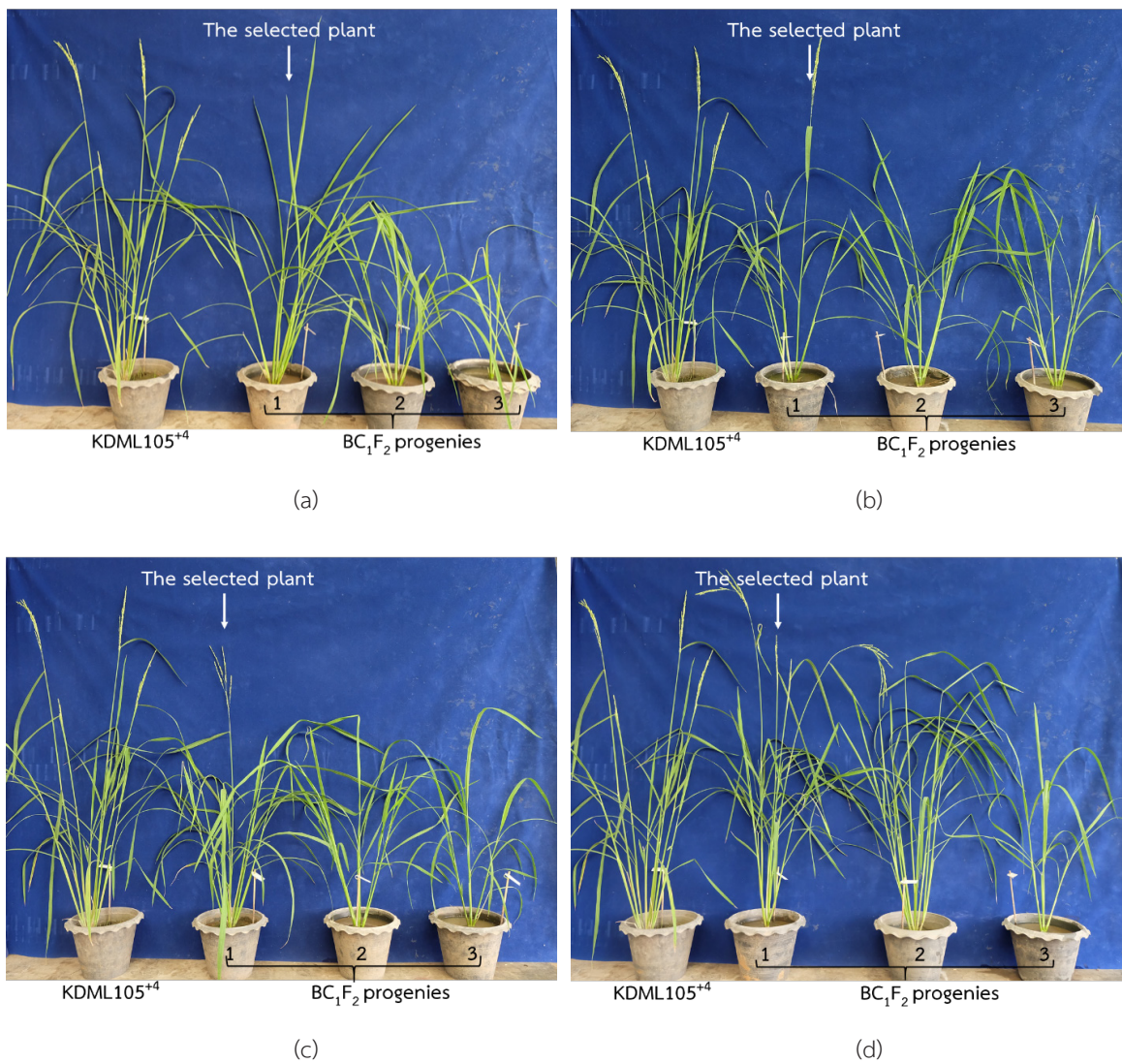


Figure 3 Phenotypic selection in BC_{2F_1} progenies to selected plants which had agronomic traits as KDML105⁺⁴ rice variety: (a) KDML105⁺⁴ x IRBLZ5-CA, (b) KDML105⁺⁴ x IRBL9-W, (c) KDML105⁺⁴ x IRBLZ-FU and (d) KDML105⁺⁴ x IRBLZT-T.

เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro1 ซึ่งใช้จำแนกยีนหอมที่เป็นลักษณะทางคุณภาพที่สำคัญของข้าวพันธุ์ KDML105⁺⁴ จากผลการคัดเลือก พบว่าในแต่ละคู่ผสมสามารถคัดเลือกต้นที่มีทั้งพันธุกรรมต้านทานโรคไหม้และความหอมแบบคงตัวได้ดังนี้ คู่ผสม KDML105⁺⁴ × IRBLZ5-CA จากต้นที่มีพันธุกรรมต้านทานโรคไหม้ที่อัลลีล *Pi2* จำนวน 25 ต้น คัดเลือกต้นที่มียีนความหอมได้จำนวน 20 ต้น คู่ผสม KDML105⁺⁴ × IRBL9-W จากต้นที่มีอัลลีล *Pi9* จำนวน 75 ต้น คัดเลือกต้นที่มียีนความหอมได้จำนวน 33 ต้น คู่ผสม KDML105⁺⁴ × IRBLZ-FU จากต้นที่มีอัลลีล *Piz* จำนวน 57 ต้น พบว่าทุกต้นมีพันธุกรรมความหอมแบบคงตัว และคู่ผสม KDML105⁺⁴ × IRBLZT-T จากต้นที่มีอัลลีล *Piz-t* จำนวน 66 ต้น สามารถคัดเลือกต้นที่มียีนความหอมได้จำนวน 30 ต้น (Table 7) การที่พบว่าประชากร BC₂F₂ ของคู่ผสม KDML105⁺⁴ × IRBLZ-FU มีพันธุกรรมความหอมครบทุกต้น (100%) แสดงว่า สายพันธุ์พ่อแม่ในชั่วรุ่น BC₁F₂ ที่ถูกคัดเลือกมีลักษณะความหอมแบบคงตัว และเมื่อผสมกับพันธุ์ KDML105⁺⁴ ซึ่งมีลักษณะเดียวกัน ทำให้ลักษณะนี้ถ่ายทอดได้ถาวรตลอดรุ่นลูก ดังนั้น การใช้เครื่องหมาย RM225 และ Naro1 ช่วยในการคัดเลือกในประชากร BC₂F₂ จึงเป็นขั้นตอนสำคัญที่นำไปสู่การได้มาซึ่งสายพันธุ์เบื้องต้นที่มีลักษณะ

เด่นร่วมกันอย่างมั่นคง โดยช่วยให้การคัดเลือกลักษณะพันธุกรรมที่ต้องการทำได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ ลดความคลาดเคลื่อนจากสิ่งแวดล้อมที่อาจส่งผลต่อลักษณะฟีโนไทป์ โดยเฉพาะลักษณะความหอมซึ่งไม่สามารถประเมินได้ด้วยสายตาในระยะต้น

3.5 การประเมินลักษณะทางการเกษตร และผลผลิตเบื้องต้นในลูกผสมกลับชั่วที่ BC₂F₂

การคัดเลือกต้นข้าวลูกผสมกลับชั่วที่ BC₂F₂ ได้ใช้ทั้งข้อมูลพันธุกรรมและลักษณะทางการเกษตรประกอบกัน โดยคัดเลือกพันธุกรรมต้านทานโรคไหม้ที่ตำแหน่งอัลลีล *Pi2*, *Pi9*, *Piz* และ *Piz-t* และพันธุกรรมความหอมแบบคงตัวด้วยเครื่องหมายโมเลกุลก่อน จากนั้นเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญกับพันธุ์รับ ผลการทดลองพบว่า สายพันธุ์ข้าวลูกผสมกลับมีความสูงต้นไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์รับ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 150.53 ซม. จำนวนรวงต่อกอ พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 (p = 0.0031) โดยคู่ผสม KDML105⁺⁴ × IRBLZT-T ให้จำนวนรวงเฉลี่ยสูงที่สุด (5.70 รวงต่อกอ) จำนวนเมล็ดดีต่อรวง พบว่า ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์รับ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 116.93 เมล็ด น้ำหนัก 100 เมล็ด พบว่า มีความ

Table 7 The number of plants were selected for homozygous alleles of blast resistant and aromatic traits in BC₂F₂ progenies.

Crosses	Total	Numbers of plants selected	
		Blast resistant ¹	Aromatic ²
KDML105 ⁺⁴ × IRBLZ5-CA (<i>Pi2</i>)	83	25	20
KDML105 ⁺⁴ × IRBL9-W (<i>Pi9</i>)	240	75	33
KDML105 ⁺⁴ × IRBLZ-FU (<i>Piz</i>)	237	57	57
KDML105 ⁺⁴ × IRBLZT-T (<i>Piz-t</i>)	240	66	30

^{1,2} indicates the sequence of the stepwise selection procedure.

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 ($p = 0.0015$) โดยคู่ผสม KDML105⁺⁴ × IRBLZ-FU ให้น้ำหนัก 100 เมล็ดสูงสุด (2.79 กรัม) สำหรับน้ำหนักเมล็ดต่อกอ พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 ($p = 0.0011$) โดยคู่ผสม KDML105⁺⁴ × IRBLZT-T ให้น้ำหนักเมล็ดต่อกอสูงสุดในกลุ่มสายพันธุ์ลูกผสม (12.25 กรัม) แต่ยังคงต่ำกว่าพันธุ์รับที่ยังคงให้ผลผลิตเฉลี่ยสูงสุด (15.28 กรัม) (Table 8) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ลูกผสมกลับชั่วที่ BC₂F₂ ที่ผ่านการคัดเลือกมีลักษณะใกล้เคียงกับพันธุ์รับ โดยเฉพาะความสูงต้นและจำนวนเมล็ดดีต่อรวง ซึ่งเป็นตัวชี้วัดศักยภาพของผลผลิตสะท้อนความสำเร็จในการผสมผสานวิธีการคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลร่วมกับการประเมินลักษณะ

ฟีโนไทป์ ทั้งนี้ การที่ลูกผสมกลับชั่วที่ BC₂F₂ ซึ่งยังอยู่ในชั่วรุ่นที่ยังมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงสามารถรักษาลักษณะใกล้เคียงกับพันธุ์รับได้ ถือเป็นข้อได้เปรียบในการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมกลับ ผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jitbumrong and Kongprakhon [17] ที่ประสบความสำเร็จในการพัฒนาข้าวเหนียวพันธุ์สกลนครให้ต้านทานโรคไหม้ได้หลายยีนโดยใช้การคัดเลือกด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอร่วมกับลักษณะทางการเกษตรในชั่ว BC₁F₁ จนได้สายพันธุ์ใหม่ที่มียีนต้านทานครบถ้วนและยังคงรักษาลักษณะเดิมของพันธุ์รับไว้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ข้าวที่ผ่านการคัดเลือกทั้ง 40 สายพันธุ์ ควรนำไปปลูกทดสอบในสภาพแปลงทดลองเพื่อประเมินผลผลิตเบื้องต้น และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคไหม้

Table 8 Major yield component traits of the top ten BC₂F₂ selected plants with four crosses compared with a recurrent parent.

Crosses/variety	Yield components				
	Plant height (cm)	No. panicles (per plant)	No. filled grains (per panicle)	Grains weight (g/100 grains)	Total grains weight (g/plant)
KDML105 ⁺⁴ × IRBLZ5-CA (<i>Pi2</i>)	165.00	5.50	124.50	2.71	10.98
KDML105 ⁺⁴ × IRBL9-W (<i>Pi9</i>)	142.14	5.43	116.71	2.62	11.38
KDML105 ⁺⁴ × IRBLZ-FU (<i>Piz</i>)	153.67	5.67	112	2.79	11.82
KDML105 ⁺⁴ × IRBLZT-T (<i>Piz-t</i>)	142.5	5.70	114.5	2.52	12.25
KDML105 ⁺⁴ (recurrent parent)	149.33	5.33	125.33	2.38	15.28
Means	150.83	5.58	116.93	2.66	11.61
SD	10.86	0.06	5.40	0.06	0.55
p-values	0.7586 ns	0.0031 **	0.0582 ns	0.0015 **	0.0011 **

“ns” indicates a non-significant difference.

“***” indicates a significant difference at the 0.01 probability level.

ในสภาพจริง เพื่อให้ได้สายพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมสำหรับการปลูกในพื้นที่เสี่ยงต่อการระบาดของโรคไหม้ และตอบสนองต่อความต้องการของเกษตรกรในระดับพื้นที่ต่อไป

4. สรุป

การปรับปรุงข้าวพันธุ์ KDML105⁺ ให้มีความต้านทานโรคไหม้โดยใช้วิธีการผสมกลับร่วมกับการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอร่วมกับลักษณะทางฟีโนไทป์ พบว่าผลการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ควบคู่กับ AFLP ช่วยให้สามารถคัดเลือกต้นข้าวที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมเหมือนพันธุ์รับสูงถึง 87.23% ได้ภายใน 2 ชั่วโมงการผสมกลับ สะท้อนถึงประสิทธิภาพของแนวทางการใช้ Marker-assisted backcrossing ในการย่นระยะเวลาและเพิ่มความแม่นยำในการพัฒนาพันธุ์ นอกจากนี้ การคัดเลือกร่วมกับลักษณะทางฟีโนไทป์ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะดีทั้งทางพันธุกรรมและลักษณะทางการเกษตร โดยสามารถคัดเลือกต้นข้าวลูกผสมกลับชั่วรุ่น BC₂F₂ ที่มียีนต้านทานโรคไหม้กลุ่ม *Pi9* ที่ตำแหน่ง *Pi2*, *Pi9*, *Piz* และ *Piz-t* พร้อมกับคงลักษณะเด่นของพันธุ์ KDML105⁺ ได้จำนวน 10 สายพันธุ์ต่อคู่ผสม อย่างไรก็ตาม สายพันธุ์ลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 40 สายพันธุ์ควรนำไปปลูกทดสอบภายใต้สภาพแปลงทดลองเพื่อประเมินความเสถียรของลักษณะต้านทานโรคไหม้และประสิทธิภาพการให้ผลผลิตก่อนพิจารณาเข้าสู่กระบวนการปรับปรุงพันธุ์ในระดับสูงต่อไป รวมไปถึงศึกษาประสิทธิภาพในการต้านทานเชื้อโรคไหม้หลากหลายสายพันธุ์ภายใต้สภาพแวดล้อมจริงในพื้นที่ปลูกหลัก เพื่อให้ได้สายพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมสำหรับการปลูกในพื้นที่เสี่ยงต่อการระบาดของโรคไหม้ และตอบสนองต่อความต้องการของเกษตรกรในพื้นที่ปลูกจริง

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ภายใต้ทุนอุดหนุนการพัฒนาการวิจัยการเกษตร เรื่องการพัฒนาพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานโรคไหม้ด้วยยีนต้านทานจาก *Pi9* ทั้ง 4 รูปแบบ คือ *Pi2*, *Pi9*, *Piz* และ *Piz-t* ปีงบประมาณ 2559

6. References

- [1] Sriboonjit, S. and Viboonpong, A., 2000, Evaluation of neck blast disease affected to KDML rice production by stochastic frontier method, *Econ. J.* 3: 39-52. (in Thai)
- [2] Rice Science Center 2019, Hommali 4 (KDML105⁺) Rice Variety, Available Source: <https://dna.kps.ku.ac.th/index.php/news-articles-rice-rsc-rgdu-knowledge/rice-breeding-lab/hommali4-rice-variety>, January 18, 2019. (in Thai)
- [3] Sirithunya, P., Sreewongchai, T., Sriprakhon, S., Toojinda, T., Pimpisithavorn, S., Kosawang, C. and Smitamana, P., 2007, Assessment of genetic diversity in Thai isolates of *Pyricularia grisea* by random amplification of polymorphic DNA, *J. Phytopathol.* 156: 196-204.
- [4] Tian, D., Yun, D., Xiaoshuang, Y., Gang L., Qixiang, L., Haiying, Z., Ziqiang, C., Xinrui, G., Yan, S., Yuming, L. and Liming, Y., 2022, Association analysis of rice resistance genes and blast fungal avirulence genes for effective breeding resistance cultivars, *Front. Microbiol.* 13:1-11.

- [5] Chaipanya, C., Telebanco-Yanoria, M.J., Quime, B., Longya, A., Korinsak, S., Korinsak, S., Toojinda, T., Vanavichit, A., Jantasuriyarat, C. and Zhou, B., 2017, Dissection of broad-spectrum resistance of the Thai rice variety Jao Hom Nin conferred by two resistance genes against rice blast, *Rice*. 10(18): 1-11.
- [6] Liu, G., Lu, G., Zen, L. and Wang, G.L., 2002, Two broad-spectrum blast resistance genes, *Pi9(t)* and *Pi2(t)*, are physically linked on rice chromosome 6, *Mol. Genet. Genomics*. 267: 472-480.
- [7] Allard, R.W., 1999, *Principle of Plant Breeding*, 2nd Ed., Wiley, Inc., New York.
- [8] Collard, B. and Mackill, D., 2010, Marker-assisted breeding for rice improvement, *Euphytica*. 142: 123-146.
- [9] Hasan, M.M., Rafii, M.Y., Ismail, M.R., Mahmood, M., Rahim, H.A., Alam, M.A., Ashkani, S., Malek, M.A. and Latif, M.A., 2015, Marker-assisted backcrossing: A useful method for rice improvement, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 29(2): 237-254.
- [10] Melaku, G., Zhang, S. and Haileselassie, T., 2018, Comparative evaluation of rice SSR markers on different *oryza* species, *J. Rice. Res. Dev.* 1(1): 38-48.
- [11] Rattanapol, P., Sripichitt, P. and Sreewongchai, T., 2011, Development of Functional DNA Marker Specific to Aromatic Gene in Rice, The Proceeding of 49th Kasetsart University Annual Conference, 1-4 February, 2011. Kasetsart University, Bangkok, Thailand, pp. 574-580. (in Thai)
- [12] Benbouza, H., Jacquemin, J.M., Baudoin, J.P. and Mergeai, G., 2006, Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10(2): 77-81.
- [13] Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M., 1995, AFLP: A new technique for DNA fingerprinting, *Nucl. Acids. Res.* 23: 4407- 4414.
- [14] Pricharoen, M., Sreewongchai, T. and Sripichitt, P., 2018, Improvement of 2 Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars by Marker Assisted Backcrossing to Accelerate Generations, The Proceeding of 56th Kasetsart University Annual Conference, 6-9 February, 2018, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, pp. 207-213. (in Thai)
- [15] Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B. and Pang, E.C.K., 2005, An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts, *Euphytica*. 142: 169-196.
- [16] Sreewongchai, T., Toojinda, T., Thanintorn, N., Kosawang, C., Vanavichit, A., Tharreau, D. and Sirithunya, P., 2010, Development of elite indica rice lines with wide

spectrum of resistance to Thai blast isolates by pyramiding multiple resistance QTLs, *Plant Breed.* 129: 176-180.

- [17] Jitbumrong, N. and Kongprakhon, P., 2016, Marker assisted selection (MAS): A viable tool for developing blast resistance in glutinous rice, *Khon Kaen Agr. J.* 44(1): 265-271. (in Thai)