คำนำ (Introduction)

ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมด 57 ล้านไร่ เป็นพื้นที่ปลูกข้าวเจ้า 39 ล้านไร่ คิดเป็น 69 % และเป็นพื้นที่ปลูกข้าวเหนียว 18 ล้านไร่ คิดเป็น 31 % ของพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมด พันธุ์ข้าวเจ้าที่มีพื้นที่ปลูกมากที่สุด คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวไวแสงมีพื้นที่ปลูก 18 ล้านไร่คิดเป็น 31 % ของพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีพันธุ์ข้าวเจ้าพันธุ์ดีจำนวนมากที่มีผลผลิตสูง ไม่ไวต่อช่วงแสงจึงปลูกได้ทั้งนาปีและนาปรัง มีความต้านทานต่อโรค และแมลงศัตรูข้าว เช่น ข้าวเจ้าพันธุ์ สุพรรณบุรี 1, สุพรรณบุรี 2, สุพรรณบุรี 3, สุพรรณบุรี 60, สุพรรณบุรี 90, ปทุมธานี 1, ปทุมธานี 60, ชัยนาท 1, ชัยนาท 80 และ กข 39 ฯ ซึ่งพันธุ์ข้าวเจ้าเหล่านี้ได้รับการปรับปรุงพันธุ์และผ่านการทดสอบสายพันธุ์ตามหลักวิชาการจากกรมการข้าวมาเป็นอย่างดี จึงทำให้ชาวนาที่ปลูกข้าวเจ้ามีโอกาสที่จะเลือกพันธุ์ข้าวเจ้าที่จะปลูกให้เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ของตนได้ ส่วนพันธุ์ข้าวเหนียวที่มีพื้นที่ปลูกมากที่สุด คือ ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เป็นข้าวไวแสงมีพื้นที่ปลูก 15 ล้านไร่ คิดเป็น 83 % ของพื้นที่ปลูกข้าวเหนียวทั้งหมด และคิดเป็น 26 % ของพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมดของประเทศ ข้าวเหนียวที่มีพื้นที่ปลูกรองจากพันธุ์ กข 6 คือ กข 10 เป็นข้าวเหนียวไม่ไวแสงมีพื้นที่ปลูก 2 ล้านไร่ซึ่งคิดเป็น 11 % ของพื้นที่ปลูกข้าวเหนียวทั้งหมด ส่วนข้าวเหนียวพันธุ์อื่นๆ มีพื้นที่ปลูกเพียงร้อยละ 6 ของพื้นที่ปลูกข้าวเหนียวทั้งหมด พันธุ์ข้าวเหนียวอื่นๆ ได้แก่ ข้าวเหนียวสันป่าตองเป็นข้าวไวแสง กข 8 เป็นข้าวไวแสง ส่วนข้าวเหนียวแพร่ 1 และสันป่าตอง 1 เป็นพันธุ์ไม่ไวต่อช่วงแสง และพันธุ์พื้นเมืองเป็นข้าวไวต่อช่วงแสง (กรมวิชาการเกษตร, 2546)

ชาวนาส่วนใหญ่ในเขตภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะปลูกข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ไว้เพื่อบริโภค เนื่องจากเป็นพันธุ์ข้าวเหนียวที่ข้าวสุกอ่อนนุ่ม และมีกลิ่นหอม แต่ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เป็นข้าวที่ไวต่อช่วงแสงจึงปลูกได้เฉพาะฤดูนาปีเท่านั้นไม่สามารถปลูกในฤดูนาปรังได้ นอกจากนี้ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ไม่ต้านต่อโรค และแมลงส่วนใหญ่ของข้าว พันธุ์ข้าวเหนียวที่ไม่ไวต่อช่วงแสงที่ชาวนานิยมปลูกไว้ขายมีเพียง 3 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวเหนียวพันธุ์ สันป่าตอง 1, กข 10 และแพร่ 1 ดังนั้นชาวนาที่ปลูกข้าวเหนียวจึงขาดแคลนพันธุ์ข้าวเหนียวที่มีผลผลิตสูง ไม่ไวต่อช่วงแสง ต้นเตี้ย และมีความต้านทานต่อโรคและแมลงของข้าว

ในอดีตมีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวทำโดยการฉายรังสี เช่น นำเมล็ดข้าวเจ้าพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 และ กข 1 มาฉายรังสีเพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และปลูกคัดเลือกจนได้ข้าวเหนียวพันธุ์ดี คือ กข 6 และ กข 10 ตามลำดับ ใช้ระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวเหล่านี้พันธุ์ละ 12 ปี จึงจะได้ข้าวเหนียวพันธุ์ดีออกมาสู่เกษตรกร ส่วนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์

แพร่ 1 และ สันป่าตอง 1 ใช้การปรับปรุงแบบดั้งเดิม ใช้เวลาปรับปรุงพันธุ์นานถึง 19 และ 16 ปี ตามลำดับ ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวแต่ละพันธุ์ใช้เวลาเฉลี่ย 15 ปี (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงระยะเวลาที่ใช้ในการปรับปรุงพันธ์ข้าวเหนียวของประเทศไทย

ข้าวเหนียวพันธุ์	พ.ศ. ที่เริ่มปรับปรุง	พ.ศ.ที่รับรองพันธุ์	ระยะเวลาที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ (ปี)
กข 6	2508	2520	12
กข 10	2512	2524	12
แพร่ 1	2518	2537	19
สันป่าตอง 1	2527	2543	16
เฉลี่ย	-	-	15

แหล่งที่มา กรมการข้าว 2552

เนื่องจากในปัจุบันการปรับปรุงพันธุ์ข้าวสามารถใช้ความรู้ทางพันธุศาสตร์โมเลกุล เช่น เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) มาช่วยในการคัดเลือก เป็นการคัดเลือกในระดับยีโนไทป์ หรือยีน ไม่ใช่คัดเลือกฟีโนไทป์ที่มีผลจากสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องเหมือนการปรับปรุงพันธุ์อย่างดั้งเดิม การใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการคัดเลือกยีโนไทป์ทำให้การคัดเลือกมีความแม่นยำ และถูกต้องมากยิ่งขึ้น รวมทั้งยังเป็นการช่วยลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลง

โครงการวิจัยนี้ "การปรับปรุงข้าวพันธุ์เหนียวหอมจากข้าวเจ้าด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก" เลือกจะนำข้าวเจ้าพันธุ์ดีจำนวน 2 พันธุ์ คือ ข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 มาปรับปรุงพันธุ์ให้เป็นข้าวเหนียวหอมด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยในการคัดเลือก สาเหตุที่เลือกข้าวเจ้าพันธุ์ สุพรรณบุรี 1 และ ชัยนาท 80 มาเป็นพันธุ์รับ เพื่อปรับปรุงให้เป็นข้าวเหนียว เพราะข้าวเจ้าทั้ง 2 พันธุ์มีผลผลิตสูง ต้นเตี้ย ไม่ไวต่อช่วงแสง และมีลักษณะที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง คือ ต้านทานต่อโรคและแมลงที่สำคัญของข้าว ซึ่งลักษณะต้านทานต่อโรค และแมลงนี้ มีความสำคัญมาก เพราะการปรับปรุงพันธุ์ในลักษณะนี้ทำได้ยากต้องใช้ระยะเวลานาน และในอนาคตปัญหาโรคแมลงของข้าวก็จะกลายเป็นปัญหาสำคัญของการปลูกข้าว นอกจากนี้ข้าวเจ้าพันธุ์ ชัยนาท 80 เป็นข้าวที่มีอายุสั้นเพียง 99 วันเมื่อปลูกในฤดูนาปรัง ซึ่งจะทำให้ได้พันธุ์ข้าวเหนียวที่มีอายุสั้น ซึ่งจะทำให้เกษตรกรสามารถปลูกข้าว หรือพืชอื่นในนาได้มากครั้งยิ่งขึ้น เมื่อพันธุ์ข้าว สุพรรณบุรี 1 และ ชัยนาท 80 ถูกปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีผสม

กลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือก ก็จะยังคงลักษณะอื่นๆ ของพันธุ์เดิมไว้ ยกเว้นเปลี่ยนจากข้าวเจ้าไม่หอม เป็น ข้าวเหนียวหอม

สาเหตุที่เลือกวิธีปรับปรุงพันธุ์ข้าวเจ้าให้เป็นข้าวเหนียวหอมด้วยวิธีผสมกลับ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก เพราะวิธีนี้จะทำให้ได้สายพันธุ์ข้าวเหนียวที่มีพันธุกรรมทั้งหมดเหมือนกับพันธุ์ข้าวเจ้าพันธุ์เดิม (สุพรรณบุรี 1 และ ชัยนาท 80) แสดงว่ายังคงรักษาลักษณะผลผลิตสูง ต้านทานต่อโรคและแมลงไว้ ยกเว้นเปลี่ยนเฉพาะยีโนไทป์ WxWx FgrFgr ที่มีฟีโนไทป์เป็นข้าวเจ้าไม่หอม กลายเป็นข้าวเหนียวหอมที่มียีโนไทป์เป็น wxwx fgrfgr นอกจากนี้การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกช่วยย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้ถึง 3-7 ปี ซึ่งถ้าโครงการนี้ประสบผลสำเร็จจะเป็นแนวทางใหม่ที่สามารถใช้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ดีซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อชาวนาที่ปลูกข้าวเหนียว

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. สร้างสายพันธุ์ข้าวเหนียวหอมจำนวน 2 สายพันธุ์จากข้าวเจ้าพันธุ์ดี คือ พันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 ด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือก

ขอบเขตของโครงการวิจัย

ขอบเขตการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 ให้เป็นข้าวเหนียวหอมด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือก ทำโดยใช้ข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 เป็นพันธุ์รับ (recurrent parent) และมีพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เป็นพันธุ์ให้ (donor parent) อัลลีลด้อย *wx* ที่ควบคุมให้ข้าวเป็นข้าวเหนียว และ อัลลีลด้อย *fgr* ที่ควบคุมให้ข้าวหอม target gene คือ อัลลีลด้อย *wx* และอัลลีลด้อย *fgr* เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้คัดเลือก *Wx/wx* คือ ไพรเมอร์ Glu-23 (Wanchana et al., 2003) เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้คัดเลือก *Fgr/fgr* คือไพรเมอร์ ESP, IFAP, INSP และ EAPA (Bradbury et. al., 2005) ซึ่งไพรเมอร์ทั้ง 2 ตำแหน่งมีเรียบร้อยแล้ว แต่ยังต้องหา flanking marker 1 และ 2 ที่ขนาบอยู่ทั้ง 2 ข้างของยีน *Wx/wx* และ *Fgr/fgr* เพื่อป้องกันไม่ให้ยีนอื่นๆ ที่ไม่ต้องการติดมากับ target gene และหา background marker เป็นชนิด SSR marker อีกประมาณ 60 ตำแหน่ง เฉลี่ย 5 ตำแหน่ง/โครโมโซม เพื่อใช้คัดเลือกหาต้น BC_nF_n ที่มีพันธุกรรมเหมือนพันธุ์รับมากที่สุด ขั้นตอนโดยย่อเริ่มจากการผลิตเมล็ด F_1 ระหว่างข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 กับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 และข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 1 กับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 การคัดเลือกต้น F_1 ผลิตเมล็ด BC_1F_1 คัดเลือกต้น BC_1F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล ผลิตเมล็ด BC_2F_1

คัดเลือกต้น BC_2F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และ ผลิตเมล็ด BC_3F_1 ซึ่งในโครงการนี้จะหยุดลงในขั้นตอนนี้ และจะขอโครงต่อจนทำสำเร็จ

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

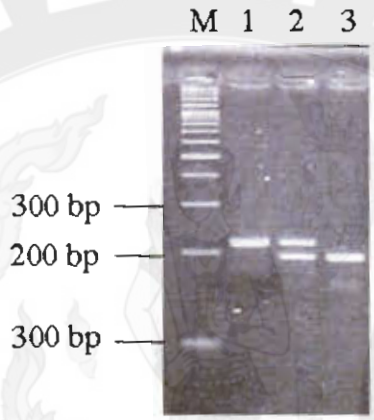
ลักษณะความเป็นข้าวเจ้า และข้าวเหนียวถูกควบคุมด้วย waxy gene (*Wx/wx*) ซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 6 อัลลีลเด่น *Wx* ควบคุมความเป็นข้าวเจ้า และอัลลีลด้อย *wx* ควบคุมความเป็นข้าวเหนียว เนื่องจากมีความแตกต่างกันระหว่างอัลลีลเด่น *Wx* กับ อัลลีลด้อย *wx* คือ ในอัลลีลด้อยพบมีการเพิ่มขึ้นของเบสจำนวน 23 bp อีก 1 ชุดใน เอ็กซอนที่ 2 แต่ไม่พบการเพิ่มนี้ในอัลลีลเด่น จึงมีการออกแบบไพรเมอร์ Glu-23 ให้เฉพาะกับ 23-bp duplication นี้ ซึ่งสามารถใช้ไพรเมอร์นี้แยกความแตกต่างของอัลลีลด้อย *wx* ของข้าวเหนียว จากอัลลีลเด่น *Wx* ของข้าวเจ้าได้ (glutinous/non-glutinous alleles) (Wanchana *et al.*, 2003)

เจตศรัณย์ และคณะ (2549) ซึ่งเป็นนักศึกษาระดับปริญญาโทของคณะผู้วิจัย ศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะความเป็นข้าวเจ้า และข้าวเหนียว โดยศึกษาอัตราส่วนฟีโนไทป์ และยีโนไทป์ในข้าวรุ่น F_2 ซึ่งเกิดจากการผสมกัน ระหว่างข้าวเหนียว กับข้าวเจ้า ได้แก่ คู่ผสมระหว่างข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 x ข้าวเจ้าพันธุ์ Taichung 65, ข้าวเจ้าพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 x ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6, ข้าวเจ้าพันธุ์ ชัยนาท 1 x ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 และ ข้าวเจ้าพันธุ์ ปทุมธานี 1 x ข้าวเหนียว พันธุ์ กข6 พบว่าอัตราส่วนฟีโนไทป์ของเมล็ดข้าวรุ่น F_2 เท่ากับ 3/4 ข้าวเจ้า:1/4 ข้าวเหนียว และเมื่อศึกษาอัตราส่วนยีโนไทป์ของต้นข้าวรุ่น F_2 ของคู่ผสมข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 x ข้าวเจ้าพันธุ์ Taichung 65 ด้วยไพรเมอร์ Glu-23 ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างของอัลลีลเด่น *Wx* จากอัลลีลด้อย *wx* พบว่าอัตราส่วนยีโนไทป์ของต้นข้าวรุ่น F_2 เท่ากับ 1/4 WxWx : 2/4 Wxwx : 1/4 wxwx นอกจากนี้เมื่อนำต้น F_2 จากคู่ผสมข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 x ข้าวเจ้าพันธุ์ Taichung 65 ที่มียีโนไทป์เป็น WxWx ผสมตัวเองได้เมล็ด F_3 เป็นข้าวเจ้าทุกเมล็ด เมื่อผสมตัวเองต้น F_2 มียีโนไทป์เป็น wxwx ได้เมล็ด F_3 เป็นข้าวเหนียวทุกเมล็ด และเมื่อผสมตัวเองต้น F_2 ที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx ได้เมล็ด F_3 มีอัตราส่วนฟีโนไทป์เท่ากับ 3/4 ข้าวเจ้า : 1/4 ข้าวเหนียว ดังนั้นอัลลีลเด่น *Wx* ข่ม อัลลีลด้อย *wx* อย่างสมบูรณ์ สรุปว่าการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะความเป็นข้าวเจ้า และข้าวเหนียวเป็นไปตามกฎข้อที่ 1 ของเมนเดล ดังนั้นลักษณะความเป็นข้าวเจ้า และข้าวเหนียวถูกควบคุมด้วยยีนเพียง 1 ตำแหน่ง

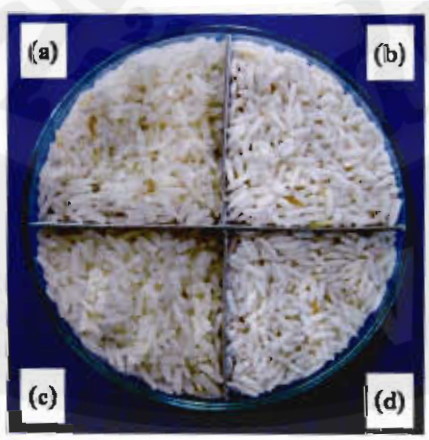
ต่อมา เจตศรัณย์ (2550) ทำการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเจ้าพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 ให้เป็นข้าวเหนียวด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือก โดยใช้ไพรเมอร์ Glu-23 ช่วยในการคัดเลือก (ภาพที่ 1) ได้ข้าวเหนียวสายพันธุ์ (wxwx) ที่มีพันธุกรรมเหมือนข้าวเจ้าพันธุ์ ขาวดอก

มะลิ 105 ยกเว้นเปลี่ยนจากข้าวเจ้า (WxWx) มาเป็นข้าวเหนียว (wxwx) (ภาพที่ 2) และพบว่าผลผลิต และองค์ประกอบผลผลิตของข้าวเจ้าพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 เดิม กับ สายพันธุ์ข้าวเหนียว (wxwx) ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ไม่แตกต่างกัน

ดังนั้นวิธีการนี้จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเจ้าพันธุ์ดีที่มีอยู่อย่างมากมายของไทยให้เป็นข้าวเหนียวพันธุ์ใหม่ได้



ภาพที่ 1 ภาพถ่ายเจลภายใต้แสง UV ของลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุล Glu-23 ตรวจสอบยีโนไทป์ของต้นข้าว (M) คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder (1) ต้นข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่มียีโนไทป์เป็น wxwx (2) ต้นข้าว F1 ที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx และ (3) ต้นข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่มียีโนไทป์เป็น WxWx

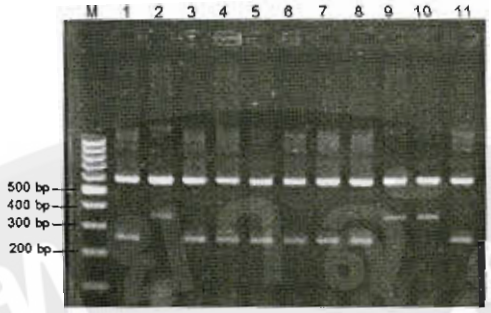


ภาพที่ 2 ลักษณะเมล็ดข้าวสารของพันธุ์ข้าวในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเจ้าพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 ให้เป็นข้าวเหนียวด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (a) ข้าวเจ้า

พันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 และ (b) ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ ส่วน (c) สายพันธุ์ข้าวเจ้า (WxWx) และ (d) สายพันธุ์ข้าวเหนียว (wxwx) ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์

เนื่องจากข้าวหอมเป็นที่นิยมบริโภคกันอย่างกว้างขวาง เช่นข้าวเจ้าพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงต้องการปรับปรุงให้พันธุ์ข้าวเหนียวที่จะได้จากโครงการวิจัยนี้มีความหอมอยู่ด้วย จากการตรวจเอกสารพบว่ายีนหอม (fragrance gene, *fgr*) เป็นรหัสพันธุกรรมของเอ็นไซม์ aldehyde dehydrogenase 2 (BAD2) และยีนนี้ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 8 ยีนนี้ทำให้เกิดความหอมในข้าว Jasmine และ Basmati พบว่าพันธุ์ข้าวไม่หอม (non-fragrant rice varieties) มี อัลลีลที่เป็นรหัสพันธุกรรมของ BAD2 ที่ทำงานได้ปกติ (functional allele) แต่พันธุ์ข้าวหอม (fragrant varieties) มีอัลลีลที่เป็นรหัสพันธุกรรมของ BAD2 ที่ไม่ทำงาน (non functional allele) เพราะเกิดการขาดหายของเบสจำนวน 8 bp (eight base pair deletion) และ เกิด SNPs จำนวน 3 ตำแหน่งในเอ็กซอนที่ 7 ของอัลลีลดังกล่าว (three SNPs in exon 7) เป็นสาเหตุให้เกิด premature stop codon จึงทำให้เอนไซม์ BAD2 ไม่ทำงาน มีการออกแบบไพรเมอร์ ESP, IFAP, INSP และ EAPA ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างอัลลีลเด่น *Fgr* ที่ทำให้ข้าวไม่หอม จาก อัลลีลด้อย *fgr* ที่ทำให้ข้าวหอม (Bradbury *et al.*, 2005)

คณะผู้วิจัยได้ใช้ไพรเมอร์ ESP, IFAP, INSP และ EAPA ในการทำ PCR เพื่อเป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจสอบสายพันธุ์ข้าวที่ได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ กข 6 ให้ไม่ไวต่อช่วงแสง และมีดีเอ็นเอแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ต่างๆ ผลการทดลอง พบอัลลีลหอม (fgr) ในข้าวสายพันธุ์ BC_3F_1-51-501-6211 (เลนที่ 3), BC4F1-51-501-6211-2320 (เลนที่ 4), BC_5F_1-51-501-6211-2320-414 (เลนที่ 5), BC_3F_3-51-501-6211-1955 (hd1hd1) (เลนที่ 6), BC_3F_3-51-501-6211-2008 (เลนที่ 7) และ BC_3F_1-84-448-7237 (เลนที่ 8) เช่นเดียวกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 (เลนที่ 1) และข้าวเจ้าหอมพันธุ์ปทุมธานี 1 (เลนที่ 11) ก็มียีนหอม เพราะมีแถบดีเอ็นเอขนาด 257 bp แต่ข้าวเจ้าพันธุ์ Taichung 65 (เลนที่ 2), ข้าวเหนียวพันธุ์ กข I0 (เลนที่ 9) และสันป่าตอง 1 (เลนที่ 10) ไม่พบอัลลีลหอม นอกจากนี้เมื่อนำเอาเมล็ดข้าวกล้องของข้าวสายพันธุ์ BC_3F_3-51-501-6211-1955 (hdIhd1) (เลนที่ 6), BC_3F_3-51-501-62I1-2008 (เลนที่ 7) ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารหอม (2-acetyl-1-pyrroline, 2AP) โดยวิธี gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบสารหอมในข้าว กข 6 ไม่ไวต่อช่วงแสงทั้ง 2 สายพันธุ์ ดังนั้นเครื่องหมายโมเลกุลนี้สามารถให้คัดเลือกต้นข้าวที่มีอัลลีลหอม (*fgr*) ได้



ภาพที่ 3 แสดงขนาดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV เพื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอจากผลผลิต PCR เมื่อใช้ ESP, IFAP, INSP และ EAPA ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลยีนหอมของข้าว (fragrance gene) (Bradbury *et al.*, 2005) เป็นไพรเมอร์ และมีดีเอ็นเอแม่พิมพ์ คือ ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์ต่างๆ ถ้าข้าวพันธุ์ใดมีอัลลีลหอม (fgr) จะมีแถบดีเอ็นเอขนาด 257 bp แต่ถ้าข้าวที่ไม่มีอัลลีล หอม (*Fgr*) จะไม่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 257 bp โดยที่ M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder พบว่าเลนที่ 1 คือแถบดีเอ็นเอของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6, เลนที่ 3 ข้าวสายพันธุ์ BC_3F_1-51-501-6211, เลนที่ 4 ข้าวสายพันธุ์ BC_4F_1-51-501-6211-2320, เลนที่ 5 ข้าวสายพันธุ์ BC_5F_1-51-501-6211-2320-414, เลนที่ 6 สายพันธุ์ BC_3F_3-51-501-6211-1955 (hd1hd1), เลนที่ 7 ข้าวสายพันธุ์ BC_3F_3-51-501-6211-2008, เลนที่ 8 ข้าวสายพันธุ์ BC_3F_1-84-448-7237 และเลนที่ 11 ข้าวเจ้าหอมพันธุ์ปทุมธานี 1 มีอัลลีลหอม (fgr) เพราะมีแถบดีเอ็นเอขนาด 257 bp แต่เลนที่ 2 คือข้าวพันธุ์ Taichung 65 เลนที่ 9 ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 10 และเลนที่ 10 ข้าวเหนียวพันธุ์สันป่าตอง 1 ไม่มีอัลลีล หอม (*fgr*) จึงไม่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 257 bp

ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ให้ข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 ให้เป็นข้าวเหนียวหอมด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกจึงจะทำให้สำเร็จโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก

การปรับปรุงพันธุ์พืชแบบดั้งเดิม (conventional plant breeding) เน้นการคัดเลือกฟีโนไทป์ที่ดีที่สุดในประชากรที่มีการกระจายตัวที่ได้มาจากการผสมพันธุ์ ซึ่งประสบปัญหาว่าเกิดปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมและสภาพแวดล้อม (genotype x environment interaction ; G x E)

ประกอบกับการคัดเลือก และการทดสอบฟีโนไทป์ต้องใช้เงินจำนวนมาก และใช้เวลานาน การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยคัดเลือก (marker-assisted selection; MAS) เน้นการคัดเลือกที่ยีนไม่ใช่ฟีโนไทป์ ดังนั้นการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม และสามารถคัดได้ในทุกช่วงอายุของพืช เนื่องจากการมี molecular marker และ genetic map เกิดขึ้นจึงทำให้การใช้ MAS มีความเป็นไปได้ทั้งลักษณะที่เป็นที่เชิงคุณภาพ (qualitative trait) และลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait loci) (Francia et al., 2005)

วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบผสมกลับแบบดั้งเดิม(conventional backcrossing) เป็นการถ่ายทอดยีนที่ต้องการจากพันธุ์ให้ (donor parent) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ที่มีลักษณะการเกษตรไม่ดีไปสู่พันธุ์รับ (recipient parent) ซึ่งเป็นพันธุ์ดี (elite variety) เริ่มโดยผสมพันธุ์รับกับพันธุ์ให้เพื่อผลิต F1 ต่อจากนั้นนำ F1 ผสมกลับไปหาพันธุ์รับ ต้องทำการผสมกลับไปหาพันธุ์รับถึง 6 ครั้ง จึงจะได้เปอร์เซ็นต์จีโนมของพันธุ์รับ เท่ากับ 99.2 จึงจะอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ พันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับจะมีพันธุกรรมเหมือนกับพันธุ์รับยกเว้นยีนในตำแหน่งที่ต้องการ (target gene) ที่ได้มาจากพันธุ์ให้ (Allard, 1969)

สำหรับวิธีการผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted backcrossing; MAB) (Frisch et al., 1999a) เมื่อเปรียบเทียบ MAB กับวิธีการผสมกลับแบบดั้งเดิม พบว่า การใช้ marker มาช่วยในการคัดเลือกจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีผสมกลับแบบดั้งเดิมได้ 3 ประการ (1) บางลักษณะการคัดเลือกด้วยฟีโนไทป์ทำได้ยาก การใช้ marker ที่ลิงค์ของ target gene ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ และความแม่นยำของการคัดเลือก (2) marker ช่วยคัดเลือกต้น BC ที่มีปริมาณจีโนมของพันธุ์รับสูง และ marker ช่วยคัดเลือกต้นที่มี linkage drag ที่มีขนาดสั้นๆ และ (3) ในการถ่ายทอดยีนด้อย (recessive gene) ถ้าใช้วิธีผสมกลับแบบดั้งเดิมต้องทำการผสมตัวเองเพิ่มอีกหนึ่งชั่วหลังจากการผสมกลับในแต่ละชั่ว แต่เมื่อใช้ marker ช่วยในการคัดเลือกไม่ต้องทำการผสมตัวเองในแต่ละชั่วของการผสมกลับอีก (Francia et al., 2005) วิธีการผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกนั้น การคัดเลือกต้น BC_nF_1 ที่ต้องการด้วย marker มี 3 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรก ใช้ target marker คัดเลือกต้นที่มียีนที่ต้องการ (target gene) โดยคัดเลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น heterozygous สำหรับอัลลีลของพันธุ์รับ และอัลลีลของพันธุ์ให้ ขั้นตอนที่ 2 ทำการลดจำนวนของยีนที่ไม่ต้องการที่ติดมาจากพันธุ์ให้ (linkage drag) โดยใช้ flanking marker จำนวน 2 ตำแหน่งซึ่งขนาบอยู่ทั้งสองข้างของยีนที่ต้องการ โดยคัดเลือกให้ marker ทั้งสองตำแหน่งเป็น homozygous สำหรับอัลลีลของพันธุ์รับ ขั้นตอนที่ 3 ใช้ background marker ซึ่งกระจายอยู่ในตำแหน่งต่างๆ (non target loci) ในจีโนมเพื่อคัดเลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น homozygous สำหรับอัลลีลของพันธุ์รับ ซึ่งจะทำให้ได้ต้นที่มียีโนไทป์เหมือนพันธุ์รับมากที่สุดได้

เร็วขึ้น (Newbury, 2003) Frisch *et al.* (1999b) รายงานว่าเมื่อ MAB ในกรณีที่มี target gene เพียงหนึ่งตำแหน่งจะสามารถลดจำนวนครั้งของการผสมกลับลงถึง 2-4 ชั่ว

การปรับปรุงพันธุ์ข้าว

ประเทศ (2526) รายงานขั้นตอนการวิจัยให้ได้ข้าวพันธุ์ดีมีดังนี้

-การอนุรักษ์พันธุ์ข้าว (rice conservation) เพื่อเก็บรักษาข้าวพันธุ์ดี และข้าวพันธุ์พื้นเมือง รวมทั้งพันธุ์ข้าวที่นำมาจากประเทศอื่นๆ เก็บรักษาไว้ เพื่อใช้เป็นเชื้อพันธุกรรมสำหรับในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป

-การผสมพันธุ์ (hybridization) การชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรรมพันธุ์ (inducing mutation) และการคัดเลือก (selection)การผสมพันธุ์ เป็นการผสมระหว่างข้าว 2 พันธุ์หรือมากกว่า เพื่อรวมเอาลักษณะที่ต้องการเอามาไว้ในต้นเดียวกัน เมื่อผสมพันธุ์แล้วจะได้เมล็ดชั่วแรก (F1) นำไปปลูกเมื่อ F_1 ผสมตัวเองได้เมล็ด F_2 ต่อจากนั้นปลูกเมล็ด F_2 แล้วทำการคัดเลือก แบบ bulk selection หรือ pedigree selection จะใช้แบบใดขึ้นกับลักษณะที่ต้องการคัดเลือก การคัดเลือกทำตั้งแต่ F_2-F_6 ซึ่งลักษณะที่ต้องคัดเลือกในชั่ว F_6 คือ รูปแบบของทรงต้น อายุ ความต้านทานต่อโรคแมลง และลักษณะเมล็ด

-การชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรรมพันธุ์ทำให้พันธุ์ข้าวที่ดีอยู่แล้วมีลักษณะที่ต้องการเพิ่มขึ้น โดยใช้รังสีหรือ สารเคมี การคัดเลือกทำคล้ายกับการคัดเลือกข้าวลูกผสม

-การศึกษาพันธุ์ขั้นต้น (observation) พันธุ์ข้าว F_6 ที่คัดเลือกไว้ นำไปปลูกสายพันธุ์ละ 1-4 แถว และต้องปลูกพันธุ์มาตรฐานเป็นพันธุ์เปรียบเทียบ ลักษณะต่างๆ ที่ศึกษาคือ รูปแบบ ทรงต้น ความต้านทานโรคและแมลง อายุ และลักษณะเมล็ด คัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีไว้ ทำการปลูกและคัดเลือกอีก 2 ครั้งใน F_7 และ F_8

-การเปรียบเทียบผลผลิตภายในสถานี (intra-station trial) นำสายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกขั้นต้นมาจัดเป็นกลุ่มตามอายุและความสูง นำมาทำการปลูกเปรียบเทียบผลผลิตในสถานี โดยการทดลองหนึ่งๆ มีสายพันธุ์ข้าวประมาณ 15-25 สายพันธุ์และต้องมีพันธุ์มาตรฐานด้วย ทำการศึกษาถึงผลผลิต ขนาด คุณภาพของเมล็ด คุณภาพหุงต้มและรับประทาน

-การเปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสถานี (inter-station trial) สายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกจากการเปรียบเทียบผลผลิตภายในสถานี นำมาจัดเป็นกลุ่มตามอายุและความสูง แล้วนำไปปลูกเปรียบเทียบผลผลิตตามสถานีต่างๆ พร้อมกัน ซึ่งได้ข้อมูลการปรับตัวของสายพันธุ์ข้าวเหล่านี้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน วิธีทดสอบทำเหมือนการเปรียบเทียบผลผลิตภายในสถานี

-การเปรียบเทียบผลผลิตท้องถิ่น (regional trial) สายพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกจากการเปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสถานี นำมาจัดเป็นกลุ่มตามอายุและความสูง แล้วนำไปปลูกเปรียบเทียบผลผลิตในแปลงนาของเกษตรกรตามท้องถิ่นต่างๆ ซึ่งพันธุ์ที่ปลูกทดสอบในขั้นนี้คาดว่าจะเป็นพันธุ์ใหม่ ซึ่งได้ข้อมูลการปรับตัวของสายพันธุ์ข้าวเหล่านี้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันวิธีทดสอบทำเหมือนการเปรียบเทียบผลผลิตภายในสถานีสายพันธุ์ข้าวที่มีผลผลิตสูงและมีลักษณะที่ดี ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบผลผลิตระดับท้องถิ่น จะเสนอให้คณะกรรมการพิจารณาพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตรพิจารณาว่าสมควรจะส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกหรือไม่

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

พันธุ์รับ

โครงการวิจัยนี้เลือกข้าวเจ้าพันธุ์ดีจำนวน 2 พันธุ์ คือ ข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 เป็นพันธุ์รับในการปรับปรุงพันธุ์ เพราะข้าวทั้งสองพันธุ์มีลักษณะที่ดีดังต่อไปนี้ คือ

ข้าวพันธุ์ สุพรรณบุรี 1 ลักษณะประจำพันธุ์ เป็นข้าวเจ้าสูงประมาณ 125 เซนติเมตร ไม่ไวต่อช่วงแสง อายุเก็บเกี่ยว ประมาณ 120 วัน เมล็ดข้าวเปลือกสีฟาง ระยะพักตัวของเมล็ดประมาณ 22 วัน เมล็ดข้าวกล้อง กว้าง x ยาว x หนา = 22 x 7.3 x 1.8 มิลลิเมตร ปริมาณอมิโลส 29 % คุณภาพข้าวสุก ร่วน แข็ง ผลผลิตประมาณ 806 กิโลกรัมต่อไร่ ลักษณะเด่น มีผลผลิตสูง ตอบสนองต่อการใช้ปุ๋ย ต้านทานโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง และต้านทานโรคใบหงิก และโรคใบสีส้ม ในสภาพธรรมชาติ ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และเพลี้ยกระโดดหลังขาว (กรมการข้าว, 2552)

ข้าวพันธุ์ ชัยนาท 80 (กข 29) ลักษณะประจำพันธุ์ เป็นข้าวเจ้าไม่ไวต่อช่วงแสง อายุเก็บเกี่ยว 103 วัน ในฤดูนาปี และ 99 วันในฤดูนาปรังเมื่อปลูกโดยวิธีหว่านน้ำตม สูงเฉลี่ย 104 เซนติเมตร ข้าวกล้อง สีขาว เป็นท้องไข่น้อย รูปร่างเรียว ยาว 7.34 มิลลิเมตร กว้าง 2.23 มิลลิเมตร หนา 1.80 มิลลิเมตร มีปริมาณ อมิโลสสูง (26.6-29.4%) ผลผลิตเฉลี่ย 876 กิโลกรัม / ไร่ ลักษณะเด่น อายุสั้น ผลผลิตสูง เฉลี่ย 876 กิโลกรัมต่อไร่ ค่อนข้างต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในภาคเหนือตอนล่าง และโรคขอบใบแห้ง มีปริมาณธาตุเหล็กในข้าวกล้อง 15.7 มิลลิกรัม ต่อ 1 กิโลกรัม ในข้าวสาร 6.7 มิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัม ข้อควรระวัง ไม่ควรปลูกในช่วงกลางเดือนกันยายนถึงปลายเดือนพฤศจิกายน ซึ่งมีอากาศเย็น ทำให้เมล็ดลีบมาก ผลผลิตต่ำ ชัยนาท 80 อ่อนแอต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ในเขตจังหวัดนครปฐม ปทุมธานี ราชบุรี และฉะเชิงเทรา (ศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวชลบุรี, 2552)

พันธุ์ให้

ในโครงการวิจัยนี้เลือกพันธุ์ให้ คือ ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เป็นข้าวเหนียวหอมที่มีคุณภาพหุงต้มเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค จึงทำให้ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มีพื้นที่ปลูกถึง 15 ล้านไร่ ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ให้อัลลีลด้อย *wx* ซึ่งควบคุมให้ข้าวเป็นข้าวเหนียว และนอกจากนี้ให้อัลลีลด้อย *fgr* ซึ่งควบคุมให้ข้าวหอม รายละเอียดของพันธุ์ข้าว กข 6 มีดังนี้

ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ โดยนำข้าวขาวดอกมะลิ 105 อาบรังสีแกมมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ได้ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 มีความสูงประมาณ 154 เซนติเมตร ไวต่อช่วงแสง อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 21 พฤศจิกายน เมล็ดข้าวกล้อง กว้าง x ยาว x หนา = 2.2 x 7.2 x

1.7 มิลลิเมตร คุณภาพข้าวสุก เหนียวนุ่ม มีกลิ่นหอม ผลผลิตประมาณ 666 กิโลกรัมต่อไร่ ลักษณะเด่นมีคุณภาพการหุงต้มดี มีกลิ่นหอม ต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาล ข้อควรระวังไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้ง และโรคใบไหม้ ไม่ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและแมลงบั่ว(กรมการข้าว, 2552)

ขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 ให้เป็นข้าวเหนียวหอมด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือก ทำโดยใช้ข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 เป็นพันธุ์รับ (recurrent parent) และมีพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 เป็นพันธุ์ให้ (donor parent) อัลลีลด้อย *wx* ที่ควบคุมให้ข้าวเป็นข้าวเหนียว และ อัลลีลด้อย fgr ที่ควบคุมให้ข้าวหอม target gene คือ อัลลีลด้อย *wx* และ อัลลีลด้อย *fgr* โดยที่ *Wx/wx* อยู่บนโครโมโซมที่ 6 อัลลีลีเด่น *Wx* ควบคุมให้เป็นข้าวเจ้า และอัลลีลด้อย *wx* ควบคุมให้เป็นข้าวเหนียว เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้คัดเลือก *Wx/wx* คือไพรเมอร์ Glu-23 (Wanchana et al., 2003) ซึ่งจะเรียกว่า waxy marker ส่วน *Fgr/fgr* อยู่บนโครโมโซมที่ 8 อัลลีลเด่น *Fgr* ควบคุมให้ข้าวไม่หอม และอัลลีลด้อย *fgr* ควบคุมให้ข้าวหอม เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้คัดเลือก *Fgr/fgr* คือไพรเมอร์ ESP, IFAP, INSP และ EAPA (Bradbury et. al., 2005) ซึ่งจะเรียกว่า fragrance marker นอกจากนี้มี flanking marker I และ 2 ที่ขนาบอยู่ทั้ง 2 ข้างของยีน *Wx/wx* และ *Fgr/fgr* เพื่อป้องกันไม่ให้ยีนอื่นๆ ที่ไม่ต้องการติดมากับ target gene นอกจากนี้มี background marker เป็นชนิด SSR marker อีกประมาณ 60 ตำแหน่ง เฉลี่ย 5 ตำแหน่ง/โครโมโซม เพื่อใช้คัดเลือกหาต้น BC_nF_n ที่มีพันธุกรรมเหมือนพันธุ์รับมากที่สุด

ขั้นตอนโดยย่อเริ่มจากการผลิตเมล็ด F1 ระหว่างข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 กับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 และข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 1 กับข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ต่อจากนั้นผสมกลับไปหาพันธุ์รับของแต่ละคู่ผสมจำนวน 5 ครั้ง แต่ละครั้งของการผสมกลับจะปลูกต้น BCnF1 และคัดเลือกด้วย *wx* marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx และนำมาคัดเลือกต่อด้วย fragrance marker โดยเลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Fgrfgr ต่อจากนั้นจึงคัดเลือกด้วย flanking marker 1 และ 2 ของ *Wx/wx* ในชั่ว BC_1F_1 และ BC_2F_1 ตามลำดับ และคัดเลือกด้วย flanking marker I และ 2 ของ *Fgr/fgr* ในชั่ว BC_3F_1 และ BC_4F_1 ตามลำดับ สาเหตุที่ต้องคัดเลือกแต่ละ flanking maker ในชั่วของการผสมกลับต่างกันเพราะจำนวนต้นที่ต้องใช้ในการคัดเลือกจะไม่มีมากเกินไป ถ้าใช้ต้นจำนวนมากจะสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายอย่างมาก ส่วน background marker จะใช้คัดเลือกในชั่ว BC_5F_1 เพราะจะมีประสิทธิภาพสูงสุด เพราะต้นข้าวส่วนใหญ่มีพันธุกรรมเหมือนพันธุ์รับแล้ว ต่อจากนั้นผสมตัวเองต้น BC_5F_1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_5F_2 แล้วปลูก ต้น BC_5F_2 คัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล เพื่อหาต้นที่มียีโนไทป์ทั้งหมดเหมือนพันธุ์รับ ยกเว้นที่ตำแหน่ง *Wx/wx* มียีโนไทป์เป็น wxwx ซึ่งเป็นข้าวเหนียว และที่ตำแหน่ง *Fgr/fgr* มียีโนไทป์เป็น fgrfgr ซึ่งเป็นข้าวหอม ต่อจากนั้นจึงทำการศึกษาพันธุ์ 2 และ 4

แถว เพื่อคัดเลือกข้าวสายพันธุ์ที่ดี แล้วจึงนำไปทดสอบใน และระหว่างสถานีทดลอง รวมทั้งปลูกทดสอบในนาเกษตรกรต่อไป รายละเอียดของโครงการทั้งหมดมีดังต่อไปนี้

<u>ฤดูที่ 1</u> การผลิตเมล็ด F_1 และ การหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่างๆ

การผลิตเมล็ด F_1

การผลิตเมล็ด F_1 จำนวน 2 คู่ผสม คู่ผสมแรก คือ ข้าวเจ้าพันธุ์ สุพรรณบุรี 1 x ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 คู่ผสมที่ 2 คือ ข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 80 x ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6

การหา target marker

เนื่องจากต้องการปรับปรุงข้าวเจ้าให้เป็นข้าวเหนียว และมีกลิ่นหอมด้วย ดังนั้นจึงต้องมี target marker จำนวน 2 ตำแหน่ง

ตำแหน่งที่ 1 คือ waxy gene (*Wx/wx*) อยู่บนโครโมโซมที่ 6 โดยที่อัลลีลเด่น *Wx* ควบคุมความเป็นข้าวเจ้า ส่วนอัลลีลด้อย *wx* ควบคุมความเป็นข้าวเหนียว ใช้ไพรเมอร์ชื่อ Glu-23 (Wanchana et al., 2003) เป็น waxy marker เพื่อคัดเลือกหาต้นข้าวที่มีอัลลีลด้อย *wx* ของข้าวเหนียว

ตำแหน่งที่ 2 คือ fragrance gene (*Fgr/fgr*) อยู่บนโครโมโซมที่ 8 โดยที่อัลลีลเด่น *Fgr* ควบคุมให้ข้าวไม่หอม ส่วนอัลลีลด้อย *wx* ควบคุมให้ข้าวหอม ใช้ไพรเมอร์ ESP, IFAP, INSP และ EAPA (Bradbury et al., 2005) เป็น fragrance marker เพื่อคัดเลือกหาต้นข้าวที่มีอัลลีลด้อย *fgr* ที่ทำให้ข้าวหอม

ซึ่งในขณะนี้คณะผู้วิจัยมีทั้ง waxy และ fragrance marker อยู่เรียบร้อยแล้ว

การหา flanking marker 1 และ 2

การหา flanking marker ทำโดยเข้าไปใน http://www.gramene.org/ เลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ที่ขนาบอยู่ทั้ง 2 ข้างของยีน Wx/wx และยีน *Fgr/fgr* สั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์นำมาทำ PCR โดยมีดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1, ชัยนาท 80 และ กข 6 เป็นแม่พิมพ์ คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์สุพรณบุรี 60 กับ กข 6 และระหว่าง ชัยนาท 80 กับ กข 6

การหา background marker

การหา background marker ทำโดย คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 200-300 ตำแหน่งที่กระจายอยู่บนโครโมโซมทั้ง 12 คู่ของข้าว สั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์ นำมาทำ PCR โดยมี

ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1, ชัยนาท 80 และ กข 6 เป็นแม่พิมพ์ คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 กับ กข 6 และระหว่าง ชัยนาท 80 กับ กข 6 เนื่องจากข้าวทั้ง 3 พันธุ์เป็นข้าวอินดิกา ดังนั้นจึงต้องใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวนมากถึง 20-25 ตำแหน่ง/โครโมโซม จึงได้ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวอินดิกา 2 พันธุ์ ประมาณ 4-6 ตำแหน่ง/โครโมโซม

ฤดูที่ 2 การคัดเลือกต้น F_1 และการผลิตเมล็ด BC_1F_1

ปลูกต้น F_1 ของคู่ผสมทั้ง 2 คู่ คือ สุพรรณบุรี 1 กับ กข 6 และ ระหว่าง ชัยนาท 80 กับ กข 6 แล้วคัดเลือกด้วย target marker เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นต้น F_1 จริง ต่อจากนั้นนำต้น F_1 ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์รับ เพื่อผลิตเมล็ด BC_1F_1

ฤดูที่ 3 การคัดเลือกต้น BC_1F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และ การผลิตเมล็ด BC_2F_1

ปลูกต้น BC_1F_1 คัดเลือกด้วย waxy marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx (heterozygous) แล้วจึงนำต้นเหล่านี้มาคัดเลือกต่อด้วย fragrance marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Fgrfgr (heterozygous) ต่อจากนั้นจึงนำต้นดังกล่าวมาคัดเลือกต่อ ด้วย flanking marker 1 ของ *waxy* gene เพื่อคัดเลือกหาต้นที่มียีโนไทป์เป็น homozygous ของอัลลีลพันธุ์รับ นำต้นที่คัดเลือกได้ผสมกลับไปหาพันธุ์รับ เพื่อผลิตเมล็ด BC_2F_1

ฤดูที่ 4 การคัดเลือกต้น BC_2F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และ การผลิตเมล็ด BC_3F_1

ปลูกต้น BC_2F_1 คัดเลือกด้วย *waxy* marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx แล้วจึงนำต้นเหล่านี้มาคัดเลือกต่อด้วย fragrance marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Fgrfgr ต่อจากนั้นจึงนำต้นดังกล่าวมาคัดเลือกต่อ ด้วย flanking marker 2 ของ *waxy* gene เพื่อคัดเลือกหาต้นที่มียีโนไทป์เป็น homozygous ของอัลลีลพันธุ์รับ นำต้นที่คัดเลือกได้ผสมกลับไปหาพันธุ์รับเพื่อผลิตเมล็ด BC_3F_1

ฤดูที่ 5 การคัดเลือกต้น BC_3F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และ การผลิตเมล็ด BC_4F_1

ปลูกต้น BC_3F_1 คัดเลือกด้วย *waxy* marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx แล้วจึงนำต้นเหล่านี้มาคัดเลือกต่อด้วย fragrance marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Fgrfgr ต่อจากนั้นจึงนำต้นดังกล่าวมาคัดเลือกต่อ ด้วย flanking marker 1 ของ fragrance gene เพื่อคัดเลือกหาต้นที่มียีโนไทป์เป็น homozygous ของอัลลีลพันธุ์รับ นำต้นที่คัดเลือกได้ผสมกลับไปหาพันธุ์รับ เพื่อผลิตเมล็ด BC_4F_1

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ฤดูที่ 6 การคัดเลือกต้น BC_4F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และ การผลิตเมล็ด BC_5F_1

ปลูกต้น BC_4F_1 คัดเลือกด้วย *waxy* marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx แล้วจึงนำต้นเหล่านี้มาคัดเลือกต่อด้วย fragrance marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Fgrfgr ต่อจากนั้นจึงนำต้นดังกล่าว มาคัดเลือกต่อ ด้วย flanking marker 2 ของ fragrance gene เพื่อคัดเลือกหาต้นที่มียีโนไทป์เป็น homozygous ของอัลลีลพันธุ์รับ นำต้นที่คัดเลือกได้ผสมกลับไปหาพันธุ์รับ เพื่อผลิตเมล็ด BC_5F_1

ฤดูที่ 7 การคัดเลือกต้น BC_5F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และการผลิตเมล็ด BC_5F_2

ปลูกต้น BC_5F_1 คัดเลือกด้วย *waxy* marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Wxwx แล้วจึงนำต้นเหล่านี้มาคัดเลือกต่อด้วย fragrance marker เลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น Fgrfgr ต่อจากนั้นจึงนำต้นดังกล่าวมาคัดเลือกต่อ ด้วย flanking marker 1 และ 2 ของทั้ง waxy marker และ fragrance gene เพื่อคัดเลือกหาต้นที่มียีโนไทป์เป็น homozygous ของอัลลีลพันธุ์รับ ต่อจากนั้นนำต้นที่คัดเลือกได้ไปคัดเลือกต่อด้วย background marker เพื่อคัดเลือกหาต้นที่มียีโนไทป์เป็น homozygous ของอัลลีลพันธุ์รับทุกตำแหน่ง ต่อจากนั้นทำการผสมตัวเองเพื่อผลิตเมล็ด BC_5F_2

ฤดูที่ 8 การคัดเลือกต้น BC_5F_2 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และ การผลิตเมล็ด BC_5F_3

ปลูกต้น BC_5F_2 คัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล *waxy* marker และ fragrance marker โดยคัดเลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น wxwx และ frgfrg ผสมตัวเองต้นที่คัดเลือกได้เพื่อผลิตเมล็ด BC_5F_3 ซึ่งจะได้สายพันธุ์ข้าวเหนียวที่มีพันธุกรรมเหมือนกับพันธุ์รับ คือ สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 ยกเว้นเป็นข้าวเหนียว และมีกลิ่นหอมเพราะมียีโนไทป์เป็น wxwx และ frgfrg

ฤดูที่ 9 การศึกษาพันธุ์ 2 แถว (2 - Row Observation) ต้น BC_5F_3 ทำการคัดเลือก และผลิตเมล็ด BC_5F_4

ฤดูที่ 10 การศึกษาพันธุ์ 4 แถว (4 - Row Observation) ต้น BC_5F_4 ทำการคัดเลือก และผลิตเมล็ด BC_5F_5

ฤดูที่ 11-12 การเปรียบเทียบผลผลิตภายในสถานี (Intra-station Yield Trials) จำนวน 2 ฤดู และศึกษาคุณภาพหุงต้ม

ฤดูที่ 13-18 ร่วมมือกับกรมการข้าวเพื่อการเปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสถานี (Inter-station Yield Trials) และการทดสอบผลผลิตในนาเกษตรกร (Farmer Yield Trials or On-Farm Trials) ประมาณ 3-5 ปี

รวมเวลาปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวหอมจากข้าวเจ้าพันธุ์ดีโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในวิธีผสมกลับใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 8-10 ปี

หมายเหตุ โครงการนี้จะขอทุนวิจัยในระยะเวลา 2 ปีก่อน คือ จากฤดูที่ 1-4 ต่อจากนั้นจึงขอทุนวิจัยต่อ คาดว่าจะใช้เวลาปรับปรุงพันธุ์ทั้งหมด 8-10 ปีน่าจะได้พันธุ์ใหม่ที่จะส่งเสริมให้ชาวนาปลูกได้ เมื่อเปรียบเทียบกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกอยู่ในปัจจุบัน เช่น กข 6, กข 10, แพร่ 1 และ สันป่าตอง 1 ใช้เวลาปรับปรุงพันธุ์เฉลี่ยถึง 15 ปี (ตารางที่ 1) ซึ่งถ้าโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวหอมจากข้าวเจ้าพันธุ์ดีด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก ประสบผลสำเร็จก็สามารถเป็นแนวทางใหม่ที่จะใช้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียว ซึ่งจะลดระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์ได้ประมาณ 3-7 ปี

ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

การวิจัยนี้จะเริ่มในวันที่ 1 ตุลาคม 2553 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2555 ซึ่งมีแผนดำเนินการวิจัยดังนี้

แผนงาน	พ.ศ.2553	พ.ศ. 2554				พ.ศ. 2555		
	10-12	1-3	4-6	7-9	10-12	1-3	4-6	7-9
5.1 การผลิตเมล็ด F_1 และการหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่างๆ	xxx	xxx						
5.2 การคัดเลือกต้น F_1 และการผลิตเมล็ด BC_1F_1			xxx	xxx				
5.3 การคัดเลือกต้น BC_1F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และ การผลิตเมล็ด BC_2F_1					xxx	xxx		
5.4 การคัดเลือกต้น BC_2F_1 ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล และการ ผลิตเมล็ด BC_3F_1							xxx	xx
สรุปผลการทดลอง								x

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ผลิตเมล็ด F_1 และ BC_1F_1 ที่เรือนกระจกของศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพของ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

การคัดเลือกโดยเครื่องหมายโมเลกุล และงานทางชีวโมเลกุลทำที่ห้องปฏิบัติการทางโมเลกุลของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

ผลการทดลอง

1. ผลิตเมล็ด F_1 และการหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่างๆ

การผลิตเมล็ดพันธุ์ F_1 (ชัยนาท 80 x กข6 และสุพรรณบุรี 1 x กข6)

การปลูกข้าวเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ F_1 ได้เริ่มกระทำตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2553 สิ้นสุดเมื่อเดือนมีนาคม 2554 เป็นเวลา 6 เดือน โดยทำการปลูกข้าวพันธุ์ ชัยนาท 80 และสุพรรณบุรี 1 ซึ่งใช้เป็นต้นแม่ และพันธุ์ กข 6 เป็นต้นพ่อ ทำการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ และพันธุ์สุพรรณบุรี 1 กับพันธุ์ กข6 โดยการทำ emasculation คือ การกำจัดเกสรตัวผู้ของต้นแม่ ซึ่งมีวิธีการ คือ นำรวงข้าวที่ยังติดอยู่กับต้นมาแช่ในน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วจะพบว่าดอกข้าวมีเกสรตัวผู้โผล่ออกมาจากดอก ทำการตัดแต่งช่อดอก โดยตัดดอกที่ไม่มีเกสรตัวผู้โผล่ออกมาทิ้งทั้งหมด ให้เหลือเฉพาะดอกที่มีเกสรตัวผู้โผล่ออกมาจากดอก ประมาณ 15-20 ดอก จากนั้นทำการคีบเกสรตัวผู้ออกให้หมด แล้วนำถุงกระดาษมาคลุมช่อดอกไว้ ซึ่งบนถุงกระดาษจะต้องบันทึก วัน/เดือน / ปี ที่ทำการ emasculation, เวลา และชื่อพันธุ์ข้าว จากนั้นเมื่อต้นพ่อมีเกสรตัวผู้บานจึงทำการผสมพันธุ์ข้าว โดยคีบเกสรตัวผู้จากต้นพ่อมาใส่ในดอกตัวเมียที่ทำการ emasculation จนครบทุกดอก แล้วใช้ถุงกระดาษคลุมไว้เหมือนเดิม แล้วบันทึก ชื่อพันธุ์ข้าวที่ใช้เป็นพ่อพันธุ์ และเวลาที่ทำการผสมพันธุ์ จากนั้นย้ายต้นข้าวไปวางไว้ในที่ที่มีความชื้นสูงๆ เมื่อครบ 7 วันแล้วจึงตรวจดูว่าผสมติดหรือไม่ ถ้าผสมติดจะทำการเก็บเกี่ยวได้หลังจากผสมติดไปแล้ว 25-30 วัน ซึ่งในฤดูที่ 1 ได้เมล็ดของคู่ผสมระหว่าง ชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 19 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 82 เมล็ด ซึ่งเมล็ดของคู่ผสมทั้งสองคู่นี้คือ เมล็ด F_1 ซึ่งจะปลูกเป็นต้นพ่อ แล้วนำไปผสมกลับกับพันธุ์ชัยนาท 80 และสุพรรณบุรี 1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_1F_1 ในฤดูต่อไป

2. การหา background marker

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนตำแหน่งของ background marker

ลำดับ	ชื่อ marker	Chromosome	Position (cM)	ชัยนาท 80 x กข 6	สุพรรณบุรี 1 x กข 6
1	RM588	6	1,611,442 - 1,611,468	/	/
2	RM16626	4	12,778,457 - 12,778,480	/	-
3	RM589	6	1,380,931 - 1,380,978	/	/
4	RM6836	6	9,320,821 - 9,320,862	-	/
5	RM8225	6	9,320,821 - 9,320,862	/	-
6	RM19405	6	2,839,645 - 2,839,665	/	/
7	RM25526	10	16,496,356 - 16,496,376	-	/
8	RM20342	6	23,347,950 - 23,347,970	-	/
9	RM20348	6	23,506,887 - 23,506,907	/	-
10	RM7434	6	23,552,227 - 23,552,266	/	-
11	RM19414	6	2,941,468 - 2,941,491	/	-

3. การคัดเลือกต้น F_1 และการผลิตเมล็ด BC_1F_1

การปลูกข้าวเพื่อคัดเลือกต้น F_1 และการผลิตเมล็ด BC_1F_1 ได้เริ่มกระทำตั้งแต่เดือน เมษายน 2554 สิ้นสุดเมื่อเดือน กันยายน 2554 เป็นเวลา 6 เดือน มีขั้นตอนดังนี้

1. ปลูกเมล็ด F_1 ที่ผลิตได้ในฤดูที่แล้วในขวด หลังจากข้าวมีอายุ 2 – 4 สัปดาห์ ทำการสกัดดีเอ็นเอใบข้าวโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ของบริษัท Fermentas

2. จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction ; PCR) โดยใช้ primer ที่จำเพาะเจาะจงกับ *Wx* gene

4. ทำวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis) โดยอาศัยการเคลื่อนที่ผ่านวุ้นอะกาโรส (agarose) ในสารละลาย TBE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า และย้อมชิ้นส่วนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย เอทิเดียมโบรมายด์ (ethidium bromide) เป็นเวลา 10 นาที ล้างสีย้อมส่วนที่เกินออกด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที บันทึกภาพด้วย

เครื่อง Gel Doc 2000 (บริษัท BIO-RAD Laboratory) โดยใช้ซอฟท์แวร์ Quantity One (บริษัท BIO-RAD Laboratory)

5. คัดเลือกต้นที่มียีโนไทป์เป็น heterozygous ทุกตำแหน่งไปปลูกในกระถาง โดยสามารถคัดเลือกคู่ผสมระหว่างชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 6 ต้น และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 8 ต้น

6. นำต้นที่คัดเลือกได้ในข้อที่ 5 ไปใช้เป็นต้นพ่อ โดยนำต้น F_1(ชัยนาท 80 x กข6) ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์ชัยนาท 80 และนำต้น F_1(สุพรรณบุรี 1 x กข6) ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 เพื่อผลิตเมล็ด BC_1F_1 โดยมีขั้นตอนการผสมพันธุ์เหมือนกับการผลิตเมล็ด F_1

7. ในฤดูที่ 2 นี้ สามารถผลิตเมล็ด BC_1F_1 ของคู่ผสม ชัยนาท 80 x กข6 จำนวน57 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 147 เมล็ด

สรุปผลการทดลอง

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวหอมจากข้าวเจ้าด้วยวิธีผสมกลับโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกโดยมีข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และชัยนาท 80 เป็นพันธุ์รับ และข้าวเหนียวสายพันธุ์ กข6 ด้นเตี้ยไม่ไวต่อช่วงแสงเป็นพันธุ์ให้ ทำการผสมพันธุ์เพื่อผลิตเมล็ด F_1 และคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล จากนั้นทำการผสมกลับไปหาพันธุ์รับทั้ง 2 พันธุ์ จากผลการทดลองพบว่าสามารถผลิตเมล็ด F_1 ของคู่ผสมระหว่าง ชัยนาท 80 x กข6 จำนวน 19 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข 6 จำนวน 82 เมล็ด และเมล็ด BC_1F_1 ของคู่ผสม ชัยนาท 80 x กข6 จำนวน57 เมล็ด และสุพรรณบุรี 1 x กข6 จำนวน 147 เมล็ด จากการหา background marker ทั้งหมด 11 ตำแหน่งพบว่า เครื่องหมายโมเลกุล RM588, RM16626, RM589, RM8225, RM19405, RM20348, RM7434 และ RM19414 ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 6 สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 80 กับ ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ได้ และเครื่องหมายโมเลกุล RM588, RM589, RM6836, RM19405, RM20342, RM20348 ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 6 เครื่องหมายโมเลกุล RM25526 ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 10 สามารถแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวเจ้าพันธุ์สุพรรณบุรี 1 กับ ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ได้