

พันธกรรมควบคุมลักษณะและการระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้
ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย

GENETIC INHERITANCE AND MOLECULAR MAPPING OF
BLAST RESISTANT GENE IN HUAI VARIETY
OF THAI INDIGENOUS RICE



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2557

KMITL-2014-AG-M-101-168

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**GENETIC INHERITANCE AND MOLECULAR MAPPING OF BLAST
RESISTANT GENE IN HUAI VARIETY
OF THAI INDIGENOUS RICE**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2014

KMITL-2014-AG-M-101-168

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2014

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ พันธุกรรมควบคุมลักษณะและการระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทย พันธุ์ห้วย

Genetic Inheritance and Molecular Mapping of Blast Resistant Gene in Huai Variety of Thai Indigenous Rice

นักศึกษา นางสาวเพ็ญภา ตันเชียน

รหัสประจำตัว 54640804

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.นงลักษณ์ เกรินทวงศ์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผศ.ดร.ธีรวัฒน์ สรุตโยภาส

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.ดร.สมยศ	เดชภีรัตน์มงคล	 ศาสตราจารย์ ดร. สมยศ คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร
ผศ.ดร.ธานี	ศรีวงศ์ชัย	
รศ.ดร.ถนิมนันต์	เจนอักษร	
ผศ.ดร.ธีรวัฒน์	สรุตโยภาส	
ดร.นงลักษณ์	เกรินทวงศ์	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ 16 พฤษภาคม 2557

สถานที่สอบ ห้องชวนชม (1118) ชั้น 1 อาคารนูนาค L

คณบดีรับรองแล้ว



(รองศาสตราจารย์ศักดิ์ชัย ชูโชติ)

คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร

วันที่ ๒๗ เดือน พฤษภาคม พ.ศ. ๒๕๕๗

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	พันธุกรรมควบคุมลักษณะและการระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย
นักศึกษา	เพ็ญญา ดันเจริญ
รหัสประจำตัว	54640804
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
พ.ศ.	2556
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร.นงลักษณ์ เกรินทวงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร. ชีรวัดณ์ สรุตโยภาส

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Pyricularia grisea* เป็นเชื้อสาเหตุโรคไหม้ข้าวที่มีความสำคัญและมักจะระบาดทำความเสียหายต่อผลผลิตข้าวในหลายพื้นที่ของประเทศไทย การใช้พันธุ์ต้านทานน่าจะเป็นวิธีการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพ และคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ อย่างไรก็ตามพันธุ์ต้านทานมักจะสูญเสียความต้านทานในระยะต่อมา เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคไหม้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถปรับตัวเข้าทำลายพันธุ์ข้าวต้านทานภายในเวลาไม่กี่ฤดูปลูก ดังนั้นการค้นหาและระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ที่สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลากหลายสายพันธุ์ จึงมีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าวในภาคต่างๆ ของประเทศไทย จำนวน 19 ไอโซเลท วิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อราด้วยเครื่องหมาย *Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) จำนวน 14 เครื่องหมาย พบ 13 เครื่องหมายสามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อราได้ โดยมีค่า Polymorphism information content (PIC) อยู่ระหว่าง 0.1 ถึง 0.8 จัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 19 ไอโซเลทได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม 1 คิดเป็น 73 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราทั้งหมด ซึ่งเป็นเชื้อราจากบริเวณภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง กลุ่ม 2 คิดเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราทั้งหมด เป็นเชื้อราจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ และพบเชื้อราจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือแยกออกเป็นเชื้อเดี่ยว ในกลุ่ม 3 และ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ไม่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งหรือบริเวณที่มีการระบาดของโรคไหม้ ในจังหวัดเดียวกันอาจมีจำนวนเชื้อเข้าทำลายข้าวมากกว่า 1 ไอโซเลท เชื้อสาเหตุโรคไหม้ทั้ง 19 ไอโซเลทถูกนำมาใช้ในการทดสอบการเกิดโรคบนประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2 -population) จำนวน 250 ต้น ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ และข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) ซึ่งต้านทานโรคไหม้ ศึกษาปฏิกริยาของยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าว F_2 โดยประเมินการเกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรค 7 วัน ภายหลังปลูกเชื้อราทั้ง 19 ไอโซเลทที่ความเข้มข้น 10^5 conidia ต่อมิลลิลิตร พบการกระจายตัวของลักษณะต้านทาน:อ่อนแอโรคไหม้ในอัตราส่วน 15:1 ($X^2 = 0.90$, $df=1.0$) แสดงว่าข้าวพันธุ์ห้วยมียืนหลักในการต้านทานโรคไหม้ 2 ยีน (2 major resistant alleles) โดยแต่ละยีนเป็นอิสระต่อกัน (non-linkage) ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมาย microsatellite คัดเลือกเครื่องหมาย microsatellite จาก 230 เครื่องหมาย พบ 66 เครื่องหมายสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้ คัดเลือกด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) พบ 3 เครื่องหมายสามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ชัดเจน ได้แก่ เครื่องหมาย RM125, RM144 และ RM224 การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ทั้ง 3 เครื่องหมายในประชากรข้าว F_2 จำนวน 250 ต้น มีอัตราส่วนระหว่างมีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (A): มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่ (H): มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (B) เป็น 1:2:1 ด้วยค่า Chi square 0.05 ($df=2.0$), 0.1 ($df=2.0$), 0.5 ($df=2.0$) สำหรับเครื่องหมาย RM125, RM144 และ RM224 ตามลำดับ แสดงว่าเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 3 สัมพันธ์กับยีนควบคุมความต้านทานต่อโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ห้วย จากนั้นวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย RM11 และ RM1132 บนโครโมโซม 7 เครื่องหมาย RM287, RM5926 และ RM6094 บนโครโมโซม 11 และเครื่องหมาย RM247, RM235 และ RM1261 บนโครโมโซม 12 เพื่อใช้ยืนยันตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ โดยเลือกใช้ประชากรข้าวที่มี phenotype อ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจนจำนวน 15 ต้น สร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเปอร์เซ็นต์ recombination พบเครื่องหมาย RM144, RM224, RM5926 และ RM6094 ที่อยู่บนโครโมโซม 11 มีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ โดยทั้ง 4 เครื่องหมายมีระยะห่างจากยีนต้านทาน 20, 20, 26.67 และ 26.67 cM ตามลำดับ เมื่อสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้โปรแกรม MAPMAKER พบยีนต้านทานโรคไหม้มีตำแหน่งที่ตั้งอยู่บริเวณปลายด้านล่างโครโมโซม 11 วางตัวอยู่ใกล้กับเครื่องหมาย RM144, RM224, RM5926 และ RM6094 โดยมีระยะห่างจากเครื่องหมาย RM144 และ RM224 เท่ากันคือ 13.7 cM ห่างจากเครื่องหมาย RM5926 เป็นระยะทาง 17.1 cM และห่างจากเครื่องหมาย RM6094 เป็นระยะทาง 20.5 cM จากผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ประกอบกับการศึกษาปฏิบัติการของยีนและการระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ พบว่าข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย เป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรคไหม้แบบกว้าง (broad spectrum) สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลท โดยมียืนหลัก 2 ยีนที่เป็นอิสระต่อกันควบคุมความต้านทาน และตรวจพบว่า 1 ใน 2 ยีนนี้มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 11 ข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วยจึงเป็นแหล่งของยีนต้านทานโรคไหม้ที่สำคัญ สามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้ได้

Thesis Title	Genetic Inheritance and Molecular Mapping of Blast Resistant Gene in Huai Variety of Thai Indigenous Rice
Student	Pennapar Tansian
Student ID.	54640804
Degree	Master of Science
Program	Agricultural Biotechnology
Year	2013
Thesis Advisor	Dr. Nonglak Parinthawong
Thesis Co-advisor	Asst.Prof.Dr. Teerawat Sarutayophat

ABSTRACT

Pyricularia grisea is a fungal pathogen of rice blast disease, a major disease that currently outbreak and causes yield losses in several rice growing areas of Thailand. Utilization of the resistant varieties is considered to be the most effective and economical method to control the rice blast. However, resistant varieties are usually have less durable resistance because the fungus is high genetic diversity, and able to break the resistance within a few seasons. Therefore, the screening and mapping for blast resistant genes that confer resistant to several blast isolates is important in breeding for the resistant varieties. In this research, genetic diversity of 19 isolates of rice blast pathogen collected from paddy fields in Thailand were analyzed using 14 *Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) markers. Thirteen markers resulted to polymorphism and their polymorphism information content (PIC) values were 0.1 to 0.8. Cluster analysis grouped the 19 isolates of fungal pathogen into 4 groups, group 1 comprised 73% of the total included isolates from the North, Northeast and Central regions. Group 2 was 15% composed of isolates from the Northeast and South, and 2 isolates from the Northeast were separated from others and set in group 3 and 4. Relationship of rice blast fungi in each group did not depend on the outbreak area. The disease outbreak area in the same province appeared to be infected by more than one isolates. The nineteen isolates of rice blast pathogen were pathogenicity tested on 250 F₂- plants derived from a cross between Huai variety (GS19769), the Thai indigenous blast resistant variety, and KDML105, the susceptible cultivar. Reaction of blast resistant genes in F₂ population was evaluated 7 days after inoculation with a mix of 19 isolates at concentration of 10⁵ conidia/ml.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The result showed the distribution of blast resistance: susceptible in a good fit ratio of 15:1 ($\chi^2 = 0.90$, $df = 1.0$), indicating that Huai variety carried 2 non-linkage of major dominant resistant alleles. The location of blast resistant genes was identified by using microsatellite marker. Out of 230 markers, 66 markers were able to distinguish the parents. Only 3 markers, namely RM125, RM144 and RM224 were selected after screening by BSA method. Distribution of 3 microsatellite markers in 250 F_2 - plants for the proportion of the susceptible parent allele; A: both parent allele; H: resistant parent allele; B, showed a good fit to the ratio of 1:2:1 with the Chi-square value of 0.05, 0.1 and 0.5 ($df=2.0$) for the RM125, RM144 and RM224, respectively. The result indicated that each marker linked to each single blast resistant allele. Analysis of marker RM11 and RM1132 on chromosome 7, marker RM287, RM5926 and RM6094 on chromosome 11 and marker RM247, RM235 and RM1261 on chromosome 12 were conducted to confirm the gene location using 15 F_2 - plants that showed the susceptible phenotype to blast disease. Recombination frequency of each marker was analyzed and the results showed that the marker RM144, RM224, RM5926 and RM6094 on chromosome 11 were linked to the blast resistant gene at the distance of 20, 20, 26.67 and 26.67 cM, respectively. The location of the resistant gene was analyzed using MAPMAKER software. The resistant gene located at the bottom end of chromosome 11 and linked to markers RM144, RM224, RM5926 and RM6094, at a distance of 13.7, 13.7, 7.1 and 20.5 cM, respectively. The results of the genetic diversity of rice blast pathogen and identification of blast resistant gene indicated that Huai variety was broad spectrum resistant to multiple fungal isolates of blast pathogen. It carried 2 non-linkage major resistant genes and one gene located on chromosome 11. Therefore, Huai variety can be used as genetic resource in breeding program for resistance to rice blast disease.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจาก ดร. นงลักษณ์ เกรินทวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผศ.ดร. ชีรวัดน์ ศรุตโยภาส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และ ผศ.ดร. ธาณี ศรีวงศ์ชัย ที่ให้คำปรึกษาให้ความรู้และคำแนะนำ ตลอดจนแนวทางแก้ไขปัญหาก็เป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาจากท่านอาจารย์และขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ถนิมนันต์ เจนอักษร และ รศ.ดร. สมยศ เดชภีรัตน์มงคล กรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERODCHE) ส่วนหนึ่งจากกองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ภายใต้โครงการค้นหายีนด้านทานโรคใหม่ที่เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* จากแหล่งพันธุกรรมข้าวพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย และกองทุนสนับสนุนการศึกษาและค้นคว้าวิจัยเพื่อทำวิทยานิพนธ์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอขอบพระคุณอาจารย์สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกๆ ท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ ให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบคุณ คุณเสาวลักษณ์ อัครราช คุณจักรกฤษณ์ ศรีแสง คุณปาริฉัตร รัตนผล และคุณอุษณีย์ ไวยเลิศ ที่ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือต่างๆ ในงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร และสาขาอื่นๆ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกคนที่ให้คำแนะนำต่างๆ และคอยให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนในทุกๆ เรื่อง ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกๆ ท่าน

เพ็ญญา ต้นเขียน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และ v ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ	VI
สารบัญตาราง	XI
สารบัญภาพ	XII
รายการคำย่อและสัญลักษณ์.....	XIII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 สถานที่ดำเนินงาน	2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ข้าวและความสำคัญ.....	3
2.2 ข้าวขาวดอกมะลิ 105.....	4
2.3 ข้าวพื้นเมืองไทย	5
2.3.1 การค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมือง.....	6
2.4 โรคไหม้ของข้าว.....	8
2.4.1 วงจรชีวิตของเชื้อรา.....	8
2.4.2 วงจรการเกิดโรค	10
2.4.3 ลักษณะอาการของโรคไหม้	10
2.4.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในข้าว.....	10
2.5 การปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ในประเทศไทย	12
2.5.1 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสาเหตุโรคไหม้กับพันธุ์ข้าวต้านทาน	15
2.5.2 ยีนต้านทานโรคไหม้ของข้าว	15
2.6 เครื่องหมายดีเอ็นเอ	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	22
3.1 อุปกรณ์และวัสดุการวิจัย	22
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย	25
3.2.1 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคใหม่.....	25
3.2.1.1 การรวบรวมและแยกเชื้อสาเหตุโรคใหม่.....	25
3.2.1.2 การเตรียมดีเอ็นเอเชื้อรา.....	25
3.2.1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ.....	26
3.2.1.4 การวิเคราะห์ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR	27
3.2.1.5 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อรา.....	28
3.2.2 การวิเคราะห์การกระจายตัวของยีน และการสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีน ด้านทานโรคใหม่บนโครโมโซมไมโทคอนเดรีย.....	28
3.2.2.1 การสร้างประชากรข้าว	28
3.2.2.2 การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะด้านทานโรคใหม่ โดยวิธีทดสอบการเกิดโรคในประชากรข้าวชั่วที่ 2	29
3.2.2.3 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าวชั่วที่ 2.....	31
3.2.2.3.1 การคัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่าง ระหว่างพ่อและแม่ได้	31
3.2.2.3.2 การคัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่าง ระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้	32
3.2.2.3.3 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทาน และความอ่อนแอในประชากรข้าวชั่วที่ 2.....	33
3.2.2.4 สร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนด้านทานโรคใหม่ จากเปอร์เซ็นต์รีคอม- บิเนชัน (recombination)	35
3.2.2.5 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite เพื่อยืนยันจำนวนและระบุตำแหน่งของยีนด้านทานโรคใหม่	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.2.6 การสร้างแผนที่เพื่อระบุตำแหน่งของยีนด้านทานโรคใหม่ ด้วยโปรแกรม MAPMAKER.....	36
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	37
4.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคใหม่.....	37
4.2 การกระจายตัวของยีน และแผนที่ระบุตำแหน่งยีนด้านทานโรคใหม่ บนโครโมโซมข้าว.....	39
4.2.1 การสร้างประชากรข้าว.....	39
4.2.2 การกระจายตัวของลักษณะด้านทานโรคใหม่โดยวิธีทดสอบการเกิดโรค ในประชากรข้าวชั่วที่ 2	41
4.2.3 การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าวชั่วที่ 2	43
4.2.3.1 เครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้.....	43
4.2.3.2 เครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทาน และความอ่อนแอได้.....	43
4.2.3.3 การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าวชั่วที่ 2	47
4.2.4 สร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนด้านทานโรคใหม่ จากเปอร์เซ็นต์ recombination.....	48
4.2.5 ยืนยันตำแหน่งยีนด้านทานโรคใหม่ด้วยเครื่องหมาย microsatellite.....	49
4.2.6 การระบุตำแหน่งของยีนด้านทานโรคใหม่ด้วยโปรแกรม MAPMAKER	51
บทที่ 5 วิจัยผลการทดลอง	59
5.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคใหม่.....	59
5.2 การกระจายตัวของยีน และแผนที่ระบุตำแหน่งยีนด้านทานโรคใหม่ บนโครโมโซมข้าว.....	60
5.2.1 ลักษณะประจำพันธุ์ข้าว	60
5.2.2 การกระจายตัวของลักษณะด้านทานโรคใหม่ในประชากรข้าวชั่วที่ 2	61
5.2.3 การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F2) และแผนที่ระบุตำแหน่งยีนด้านทานโรคใหม่ จากเปอร์เซ็นต์ recombination.....	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือนำไปใช้ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.2.4 แผนทีระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้.....	63
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	66
บรรณานุกรม.....	69
ภาคผนวก ก.....	78
ภาคผนวก ข.....	84
ประวัติผู้เขียน.....	89



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่		
2.1	ตำแหน่งของยีนต้านทานโรคใหม่ที่เชื่อมโยงกับเครื่องหมายดีเอ็นเอบนโครโมโซมข้าว.....	16
3.1	เชื้อสาเหตุโรคใหม่ 19 ไอโซเลทที่ใช้ในการทดสอบความต้านทานโรคและแหล่งที่มา.....	26
4.1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ของเครื่องหมายโมเลกุล MGM และค่า polymorphic information content (PIC)	38
4.2	ผลประเมินการเกิดโรคด้วยเชื้อสาเหตุโรคใหม่ 19 ไอโซเลทบนประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F ₂) จำนวน 250 ต้น	42
4.3	อัตราการกระจายตัวของลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคใหม่ 19 ไอโซเลทในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F ₂) จำนวน 250 ต้น.....	42
4.4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้จำนวน 66 เครื่องหมาย และผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี bulk sergeant analysis (BSA)	45
4.5	อัตราการกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าวที่ 2 (F ₂) จำนวน 250 ต้น	49
4.6	การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าว 15 ต้น ที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคใหม่ และเปอร์เซ็นต์การเกิด recombination ของยีนต้านทานโรคใหม่.....	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตารางภาคผนวก

หน้า

ตารางผนวกที่

- 1 วิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าว F_2 จำนวน 250 ต้น
ด้วยเครื่องหมาย microsatellite85



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 วงจรชีวิต (Life cycle) และ วงจรการเกิด โรค (Pathogenesis cycle) ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ (Dean. <i>et al.</i> 2005).....	9
3.1 เกณฑ์ให้คะแนนการเกิดโรคตามระดับคะแนนของ Roumen <i>et al.</i> (1997).....	31
4.1 รูปแบบดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 19 ไอโซเลท จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ของเครื่องหมาย MGM209 และ MGM57	38
4.2 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ (Dendrogram) ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 19 ไอโซเลท วิเคราะห์โดยวิธี SAHN จากเครื่องหมายจำนวน MGM 13 เครื่องหมาย.....	39
4.3 ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าว ก) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) ข) พันธุ์เมืองไทย พันธุ์ห้วย (19769) และ ค) ลูกผสมชั่วที่ 1 (KDML105×GS19769)	40
4.4 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมายที่วิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA)	44
4.5 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM144 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2) จำนวน 250 ต้น	52
4.6 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM224 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2) จำนวน 250 ต้น	53
4.7 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM125 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2) จำนวน 250 ต้นด้วย	54
4.8 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM11 และ RM1132 โคโรโมโซม 7 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2) จำนวน 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้	55
4.9 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM247, RM1261 และ RM235 โคโรโมโซม 12 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2) จำนวน 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้	55
4.10 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM5926, RM6094 และ RM287 โคโรโมโซม 11 ในประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) จำนวน 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้.....	56
4.11 แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ และระยะห่างระหว่างเครื่องหมายบนโครโมโซม 11 ของข้าว.....	58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายการคำย่อและสัญลักษณ์

PCR	=	Polymerase Chain Reaction
PAGE	=	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
RFA	=	Rice Flour Agar
BSA	=	Bulk Segregant Analysis
PIC	=	polymorphic information content
dNTPs	=	deoxynucleotide triphosphates
df	=	degree of freedom
P	=	probability
β	=	beta
M	=	molar
mM	=	millimolar
μ M	=	micromolar
bp	=	base pare
cM	=	centiMorgans
χ^2	=	Chi-Square

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวเป็นพืชอาหารที่สำคัญของโลก ประชากรโลกมากกว่าครึ่งโลกโดยเฉพาะประชากรในทวีปเอเชียบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก แหล่งปลูกข้าวที่สำคัญจึงอยู่ในทวีปเอเชีย ในปี พ.ศ. 2556 ประเทศไทยส่งออกข้าวมากเป็นอันดับ 3 ของโลก (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2556) ปริมาณส่งออกรวม 6.61 ล้านตันข้าวสาร มูลค่า 133,839 ล้านบาท ทั้งนี้ปริมาณข้าวที่ส่งออกแยกเป็นข้าวหอมมะลิ 29 เปอร์เซ็นต์ หรือ 1.91 ล้านตันข้าวสาร มีมูลค่าการส่งออก 59,479 ล้านบาท หรือคิดเป็น 44 เปอร์เซ็นต์ของมูลค่าการส่งออกข้าวทั้งหมด (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2556) ข้าวหอมมะลิของไทยเป็นที่นิยมทั้งชาวไทยและชาวต่างประเทศ เนื่องจากมีคุณลักษณะเด่น คือ เป็นข้าวที่มีแป้งอะมิโลส (amylose) ต่ำ คือประมาณ 13.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหุงเป็นข้าวสุกจึงมีลักษณะนุ่มเหนียว และที่สำคัญมีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์ กรมการข้าวกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ประกาศรับรองพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และ กข15 เป็นข้าวหอมมะลิของไทย การผลิตข้าวหอมมะลิพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในประเทศไทยยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภคทั่วโลก เพราะปริมาณผลผลิตมีจำกัด เนื่องจากให้ผลผลิตต่อไร่ต่ำ คือ ให้ผลผลิตประมาณ 515 กิโลกรัมต่อไร่ เป็นพันธุ์ข้าวที่ตอบสนองต่อช่วงแสงจึงปลูกได้เฉพาะในฤดูนาปีหรือฤดูฝนเพียงปีละครั้งเท่านั้น และยังประสบปัญหาการสูญเสียผลผลิตที่เกิดจากการเข้าทำลายของโรคไหม้ เนื่องจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว. 2553)

โรคไหม้ของข้าวเกิดจากเชื้อราสาเหตุ *Pyricularia grisea* Sacc. มีชื่อเรียกในระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศว่า *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr. เป็นเชื้อราที่มีความสำคัญและเป็นปัญหาต่อการปลูกข้าวในหลายพื้นที่ เชื้อสาเหตุโรคไหม้มีความแปรปรวนมากกว่าเชื้อราชนิดอื่นๆ เชื้อราชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลงได้อย่างรวดเร็วภายในไม่กี่ชั่วอายุ (generations) สามารถเข้าทำลายข้าวได้ทุกระยะการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะต้นกล้าไปจนถึงระยะออกรวง (Ou. 1988 อ้างโดยพูนศักดิ์ เมฆวัฒนา กาญจน์ และคณะ. 2550) ในปี พ.ศ. 2535 พบการระบาดของโรคไหม้ในระยะข้าวออกรวงบริเวณภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ทำให้พื้นที่ปลูกข้าวได้รับความเสียหายประมาณ 1.2 ล้านไร่ มีรายงานมูลค่าความเสียหายประมาณ 436 ล้านบาท (Disthapom. 1994)

การควบคุมโรคไหม้ในข้าวโดยใช้พันธุ์ข้าวต้านทานโรค เป็นวิธีการที่เหมาะสมมากที่สุดวิธีหนึ่ง เนื่องจากการใช้พันธุ์ต้านทานมีข้อดีหลายประการ ได้แก่ ช่วยลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรค ส่งผลให้ต้นทุนในการปลูกข้าวลดลง ลดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมปลอดภัยทั้งต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค และให้ผลคุ้มค่าในระยะยาว (พูนศักดิ์ เมฆวัฒนา กาญจน์ และคณะ. 2550) ปัจจุบันได้มีการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวประมาณ 96 ยีน และมียีนต้านทานโรคไหม้ 9 ยีนที่ได้ทำการโคลนยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และหาลำดับเบสแล้ว (Miah *et al.*, 2012) ถึงแม้ว่าการใช้พันธุ์ต้านทานจะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมาก แต่การใช้ยีนต้านทานโรคใหม่แบบแคบที่จำเพาะกับเชื้อสาเหตุโรคใหม่เพียงไม่กี่สายพันธุ์มักจะส่งผลให้ข้าวพันธุ์ต้านทานสูญเสียความต้านทานต่อโรคได้ภายในระยะเวลาไม่กี่ปี เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคใหม่มีการปรับตัวและมีวิวัฒนาการให้สามารถเข้าทำลายข้าวได้ (Sreewongchai *et al.*, 2010) ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาและค้นหายีนต้านทานโรคใหม่ใหม่ๆ ในข้าวอยู่เสมอ แนวทางการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคใหม่ของไทย จึงควรเลือกใช้ยีนต้านทานโรคใหม่ที่สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคใหม่ได้หลายสายพันธุ์ ควรมีการรวมยีนต้านทานโรคใหม่หลายๆ ยีนไว้ร่วมกัน เพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานโรคใหม่ได้อย่างยั่งยืน (ศรีสวัสดิ์ จันทร์ทอง และคณะ. 2553) และที่สำคัญแหล่งพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคใหม่ส่วนใหญ่ได้มาจากข้าวพันธุ์พื้นเมือง (ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ และสุริพร เกตุงาม. 2552)

งานวิจัยนี้ศึกษาปฏิกิริยาและระบุตำแหน่งของยีนต้านทานต่อโรคใหม่ในข้าวพื้นเมืองของไทย พันธุ์ห้วย (GS19769) ยีนที่ตรวจพบจากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นพื้นฐานข้อมูลที่สำคัญ และอาจเป็นประโยชน์อย่างมากต่อโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมของไทยให้ต้านทานต่อโรคใหม่ ซึ่งจะส่งผลให้ประเทศไทยส่งออกข้าวหอมได้มากขึ้น เป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของข้าวหอมไทยในตลาดโลก

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคใหม่ด้วยเครื่องหมาย microsatellite
- 1.2.2 เพื่อศึกษาปฏิกิริยาของยีนต้านทานโรคใหม่ในข้าวพันธุ์ห้วย
- 1.2.3 เพื่อระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคใหม่บนโครโมโซมข้าว

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

ห้องปฏิบัติการโรคพืช สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ทราบถึงความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคใหม่จากแหล่งปลูกข้าวภูมิภาคต่างๆ ในประเทศไทย
- 1.4.2 ทราบปฏิกิริยาของยีนต้านทานโรคใหม่ในข้าวพันธุ์ห้วย
- 1.4.3 ทราบตำแหน่งของยีนต้านทานโรคใหม่ที่พบบนแผนที่พันธุกรรมของข้าวพันธุ์ห้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าวและความสำคัญ

ข้าวเป็นธัญพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกับพืชจำพวกหญ้า (Family Gramineae or Poaceae) ถูกจัดอยู่ในสกุล (Genus) *Oryza* มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2 ชุด (diploid, $2n=24$) ข้าวที่ปลูกเป็นอาหาร (cultivated species) ถูกแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ข้าวเอเชีย (*Oryza sativa* L.) และข้าวแอฟริกา (*Oryza glaberrima* Steud.) ส่วนที่เหลืออีก 21 ชนิดเป็นข้าวป่า (wild species) ซึ่งเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในประเทศต่างๆ ของทุกทวีปที่ปลูกข้าว เช่น *Oryza perennis*, *Oryza officinalis*, *Oryza spontanea* และ *Oryza nivara* เป็นต้น ข้าวเอเชีย (*O. sativa* L.) แบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ ข้าวอินดิกา (Indica rice) เป็นข้าวเมล็ดยาวเรียวยาวเจริญเติบโตได้ดีในบริเวณเขตร้อน ข้าวจาโปนิกา (Japonica rice) เป็นข้าวเมล็ดสั้นป้อม เจริญเติบโตดีในเขตอบอุ่น และข้าวจาวานิกา (Javanica rice) เป็นข้าวต้นสูง เมล็ดใหญ่ป้อม ปลูกมากในประเทศอินโดนีเซีย (บุญหงส์ จงคิด. 2549)

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตศูนย์กลางความผันแปรของข้าว ประกอบด้วยสภาพแวดล้อมและภูมิอากาศมีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ทำให้เกิดความหลากหลายของพันธุ์ข้าวทั้งในกลุ่มของพันธุ์ข้าวที่นิยมปลูกอยู่ในปัจจุบัน พันธุ์ข้าวพื้นเมือง และพันธุ์ข้าวป่า (สมทรง โชติชื่น. 2550) ในประเทศไทยพบพันธุ์ข้าวปลูกประมาณอย่างน้อย 3,500 ชื่อที่มีลักษณะต่างกัน โดยสถาบันวิจัยข้าวได้รวบรวมพันธุ์ข้าวปลูกและข้าวป่าของไทยไว้ได้มากกว่า 17,000 ตัวอย่าง (สงกรานต์ จิตรากร และบริบูรณ์ สมฤทธิ์. 2544)

ประชากรกว่าครึ่งโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลักโดยเฉพาะประชากรในทวีปเอเชีย แหล่งปลูกข้าวที่สำคัญจึงอยู่ในทวีปเอเชีย (สงกรานต์ จิตรากร. 2544) ความสามารถในการผลิตข้าวของไทย ในปี พ.ศ. 2555-2556 ข้าวนาปีมีเนื้อที่เพาะปลูก 64.35 ล้านไร่ ผลผลิต 26.60 ล้านตัน ข้าวเปลือก ผลผลิตต่อไร่ 413 กิโลกรัม และข้าวนาปรังมีเนื้อที่เพาะปลูก 16.07 ล้านไร่ ผลผลิต 10.74 ล้านตันข้าวเปลือก ผลผลิตต่อไร่ 669 กิโลกรัม การบริโภคในประเทศประมาณ 14.10 ล้านตันข้าวเปลือก ประเทศอินเดียส่งออกข้าวได้มากเป็นอันดับ 1 ของโลก รองลงมาได้แก่ เวียดนาม สำหรับไทยส่งออกข้าวได้เป็นอันดับ 3 ของโลก (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2556) ในปี พ.ศ. 2556 ไทยส่งออกข้าวรวมทั้งหมด 6.61 ล้านตันข้าวสาร มูลค่า 133,839 ล้านบาท ทั้งนี้ปริมาณข้าวที่ส่งออกแยกเป็นข้าวหอมมะลิ 29 เปอร์เซ็นต์ หรือ 1.91 ล้านตันข้าวสาร มีมูลค่าการส่งออก 59,479 ล้านบาทหรือคิดเป็น 44 เปอร์เซ็นต์ของมูลค่าการส่งออกข้าวทั้งหมด (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2556)

2.2 ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML105)

พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ได้มาจากการคัดเลือกแบบคัดพันธุ์บริสุทธิ์ (pure line selection) ปลูกเปรียบเทียบพันธุ์ที่สถานีทดลองข้าวโคกสำโรง และปลูกเปรียบเทียบพันธุ์ในท้องถิ่นภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จนได้สายพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 4-2-105 ซึ่งเลข 4 หมายถึง สถานที่เก็บรวงข้าว คืออำเภอบางคล้า เลข 2 หมายถึงพันธุ์ทดสอบที่ 2 คือ ข้าวดอกมะลิ และเลข 105 หมายถึง แถวหรือรวงที่ 105 จากจำนวน 199 รวง พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวเจ้าไวต่อช่วงแสงอย่างอ่อน (weakly photoperiod sensitive) ปลูกให้ผลดีในฤดูนาปี ความสูงถึงคอรวงเฉลี่ย 140 เซนติเมตร กอตั้ง ปล้องสีเหลืองอ่อน กาบใบและใบสีเขียว มีขนใบ ปลายใบตก ถิ่นใบสีเขียวรูปร่างแหลมมี 2 ยอด หูใบและข้อต่อใบสีเขียวอ่อน ปลายยอดดอกสีขาว กลีบรองดอกสีขาว ยอดเกสรตัวเมียสีขาว ต้นข้าวแข็งปานกลาง (มีลุ่มบ้าง) รวงแน่นปานกลาง คอรวงยาว ระแงะถี่ ใบธงเอนปานกลาง เปลือกและยอดเมล็ดสีฟ้า มีขนสั้นบนเปลือกเมล็ด กลีบรองดอกสีฟ้า น้ำหนักข้าวเปลือก 1,000 เมล็ด ประมาณ 27.9 กรัม เมล็ดข้าวเปลือกยาว 10.4 มิลลิเมตร กว้าง 2.6 มิลลิเมตร เมล็ดข้าวกล้องรูปร่างเรียวยาว ระยะพักตัวของเมล็ด 8 สัปดาห์ ผลผลิตเฉลี่ย 515 กิโลกรัมต่อไร่ ข้าวหอมของไทยเป็นที่นิยมทั้งชาวไทยและชาวต่างประเทศ เป็นข้าวที่มีคุณภาพเมล็ดดี ข้าวสารใสแฉ่ง คุณภาพจัดสีดี ท้องใบน้อย มีปริมาณ amylose ต่ำ ประมาณ 15-16 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหุงสุกมีลักษณะเหนียว นุ่ม และที่สำคัญมีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์ เป็นพันธุ์ข้าวที่ทนปานกลางต่อสภาพแล้ง ดินเปรี้ยว และดินเค็ม ปลูกได้ในพื้นที่ดอนและสภาพข้าวไร่ แต่มีข้อจำกัด คือ ผลผลิตค่อนข้างต่ำ ลำต้นอ่อนลุ่มง่าย ไม่ต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูข้าวทุกชนิด โดยเฉพาะโรคไหม้ พบว่าทำ ความเสียหายต่อผลผลิตของข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นอย่างมาก (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว. 2553)

ข้าวหอมของไทยเป็นที่ต้องการทั้งภายในประเทศและนอกประเทศ ตลาดข้าวหอมโลกมีมูลค่าไม่ต่ำกว่า 2 แสนล้านบาท ครั้งหนึ่งเป็นข้าวหอมมะลิ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมมะลิของไทยให้มีคุณภาพที่ดีขึ้น ต้านทานต่อโรคและแมลง จะส่งผลให้ประเทศไทยส่งออกข้าวหอมได้มากขึ้น และเป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของข้าวหอมไทยในตลาดโลก ต้นทุนการผลิตข้าวหอมจะถูกลง ซึ่งเป็นผลดีต่อเกษตรกรและการแข่งขันในตลาดโลก (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว. 2553)

ในปี พ.ศ. 2541 สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (International Rice Research Institute, IRRI) ร่วมมือกับศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ดำเนินการปรับปรุงพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานต่อโรคไหม้ โดยรักษาคุณภาพเมล็ดและการหุงต้มที่ดีเช่นเดียวกับพันธุ์เดิมไว้ และมีการปรับตัวได้ดีในสภาพนาที่น้ำฝน ในภาคเหนือตอนบนและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ดำเนินการผสมพันธุ์ข้าวที่ IRRI ประเทศฟิลิปปินส์ พันธุ์ IR70179-45-1-1 เป็นพันธุ์พ่อที่มีลักษณะความต้านทานโรคไหม้ และมีการปรับตัวได้ดีในนาที่น้ำฝน โดยผ่านการคัดเลือกจากการปลูกทดสอบในศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คือ และพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์แม่ ปลูกประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 - hybrid) และชั่วที่ 2 (F_2) โดยคัดเลือกต้นที่ต้านทานโรคไหม้และมีความหอม ผสมกลับไปยังพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ได้ ลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_2) ทำการทดสอบความต้านทานและความหอม คัดเลือกและนำไปปลูกใน นาข้าว ผสมกลับอีกครั้งจนได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 2 (BC_2F_2) และรุ่นต่อไป ในปี พ.ศ. 2545 คัดเลือก พันธุ์ที่สามารถต้านทานโรคไหม้ได้ดี และนำมาทดสอบคุณภาพการหุงต้ม ได้ข้าวอายุเบาที่มี คุณสมบัติเหมือนข้าวดอกมะลิ 105 จำนวน 19 สายพันธุ์ นำมาทดสอบการให้ผลผลิตเบื้องต้นในฤดู แล้งและฤดูฝน ของปีพ.ศ. 2546-2547 ทั้งภายในสถานีและในแปลงนาเกษตรกร จนได้พันธุ์ข้าว IR77924-62-71-1-2 ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์เป็นที่ยอมรับของเกษตรกร มีลักษณะเด่น คือ เป็น ข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง อายุตกกล้าถึงออกดอกประมาณ 100-110 วัน มีความต้านทานโรคไหม้ที่พบ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือของประเทศไทย คุณภาพเมล็ด การหุงต้ม เหมือนพันธุ์ ข้าวดอกมะลิ 105 (บุญรัตน์ จงดี และคณะ. 2548) เมื่อวันที่ 6 มีนาคม 2550 คณะกรรมการพิจารณา พันธุ์ กรมการข้าว มีมติให้ข้าวพันธุ์ IR77924-62-71-1-2 เป็นพันธุ์รับรอง ชื่อ กข33 (หอมอุบล 80) เพื่อแนะนำให้เกษตรกรปลูก (สำนักงานวิจัยและพัฒนาข้าว. 2557)

2.3 ข้าวพื้นเมืองไทย (Thai indigenous rice)

พันธุ์ข้าวพื้นเมืองเป็นพันธุ์ข้าวที่ได้รับการคัดเลือกโดยเกษตรกร และสืบทอดกันมาหลายชั่วอายุ เนื่องจากเป็นพันธุ์พื้นเมืองมีคุณสมบัติที่ดีเป็นที่ต้องการของคนในแต่ละท้องถิ่น สามารถทน ต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง ทนต่อโรค และแมลง (วิชา ชิติประเสริฐ. 2544) พันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทยทั้งหมดที่เก็บรวบรวมจาก 76 จังหวัด โดยจำแนกชื่อเบื้องต้นมีชื่อไม่ซ้ำกันพบทั้งหมด 5,928 ชื่อพันธุ์ จากความหลากหลายของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของประเทศไทยทำให้คาดเดาได้ว่าน่าจะมีพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทยมากกว่านี้ เพราะว่ามีพันธุ์ข้าวยังมีอีกหลายตัวอย่างที่ยังไม่ทราบชื่อ และที่เก็บรวบรวมไว้ยังไม่ได้ทำการประเมินลักษณะประจำพันธุ์หรือจำแนกชื่อพันธุ์ พันธุ์ข้าวพื้นเมืองของ ไทยเหล่านี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างมาก และมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าว (ฉวีวรรณ วุฒินาโณ. 2543) เนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ได้ข้าวพันธุ์ดีไม่ว่าจะเป็น การเพิ่มผลผลิต เพิ่มคุณภาพ เพิ่มความต้านทานโรค และความต้านทานแมลง นอกจากจะต้องอาศัย เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์ การผสมพันธุ์ และการคัดเลือกพันธุ์ รวมไปถึงการทดสอบพันธุ์ที่เหมาะสม สิ่งที่สำคัญที่ขาดไม่ได้ คือ เชื้อพันธุ์ข้าว ยิ่งเชื้อพันธุ์ข้าวมีฐานทางพันธุกรรมกว้างมีความ หลากหลายมากเท่าใด โอกาสและความสำเร็จที่จะได้พันธุ์ข้าวตามต้องการก็จะมีมากขึ้น (วิชา ชิติ ประเสริฐ. 2544)

สมทรง โชติชื่น และคณะ (2554) จำแนกและประเมินลักษณะต้านทานโรคไหม้ของเชื้อ พันธุกรรมข้าวประมาณ 5,000 ตัวอย่าง ที่ศูนย์วิจัยข้าวทั่วประเทศ ในระหว่างปี พ.ศ. 2551-2553 พบ พันธุ์ข้าวส่วนใหญ่ค่อนข้างอ่อนแอ จนถึงอ่อนแอมาก มีพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานโรคไหม้ใน

ระดับสูงจำนวน 50 ตัวอย่าง เช่น บักม่วย (3257), เหลืองทอง (12518), เจ้าดำ (21648), อีอี (22769), กช4 (22197), ดำหอม (23509), สัจหทัย (15101) และคอเหมย (13773) เป็นต้น และมีพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานโรคไหม้ในระดับกลางจำนวน 19 ตัวอย่าง เช่น ขาวแดง (23271), ขาวเกษตร (5467), หมากผาง (13905), จะหล่อยนะ (23152) และเบิ้ลละ (23728) เป็นต้น

Salih *et al.* (2013) จำแนกพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ จากพันธุ์ข้าวของไทยทั้งหมด 311 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น ข้าวพื้นเมืองจำนวน 263 ตัวอย่าง ข้าวที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์แล้วจำนวน 43 ตัวอย่าง และข้าวป่าจำนวน 5 ตัวอย่าง ตรวจสอบความต้านทานโดยปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 29 ไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดพิจิตร โลก อุบลราชธานี ขอนแก่น เชียงราย หนองคาย ชัยภูมิ และอุดรธานี จากการตรวจสอบพบพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 35 ตัวอย่าง แบ่งเป็น ข้าวพื้นเมืองจำนวน 25 ตัวอย่าง ข้าวที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์แล้วจำนวน 9 ตัวอย่าง และข้าวป่า จำนวน 1 ตัวอย่าง จากพันธุ์พื้นเมือง 25 ตัวอย่างพบว่ามีพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานโรคไหม้ได้ในระดับสูงมากกว่าพันธุ์อื่นๆ ได้แก่หมายเลข GS23107 (กำเพ็ช), GS19769 (ห้วย), GS20874 (ย้งมอ) และ GS23774 (ดอกพยอมไร่) โดยไม่พบอาการของโรคบนพันธุ์ข้าวทั้ง 4 ตัวอย่างเลย

2.3.1 การค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ในพันธุ์ข้าวพื้นเมือง

Zhu *et al.* (2004) พบข้าวพื้นเมืองของประเทศจีนพันธุ์ Q14 แสดงความต้านทานโรคไหม้ มียีน *Pi27(t)* ซึ่งต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ ที่เก็บรวบรวมจากประเทศญี่ปุ่น ไทย และจีน ค้นหาและระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้โดยทดสอบการเกิดโรคในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2) ที่ผสมพันธุ์ระหว่างข้าวพันธุ์ Q14 และข้าวพันธุ์ Q16 ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ พบการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในอัตราส่วน 3:1 (ต้านทาน:อ่อนแอ) คัดเลือกเครื่องหมายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนด้วยเทคนิค bulk segregant analysis (BSA) จากเครื่องหมาย microsatellite จำนวน 189 เครื่องหมาย พบจำนวน 2 เครื่องหมายสามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ คือ เครื่องหมาย RM151 และ RM259 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 1 เลือกใช้ประชากรข้าว F_2 จำนวน 155 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ เมื่อตรวจสอบการกระจายตัวของเครื่องหมาย พบยีนต้านทานโรคไหม้ถูกควบคุมด้วยยีนเพียงยีนเดียว ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM151 และ RM259 เป็นระยะทาง 11.9 และ 9.7 centiMorgans (cM) ตามลำดับ

เมทินี กัดมูข และคณะ (2552) ตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib*, *Pi-2t* และ *Pi-ta* บนโครโมโซม 2, 6 และ 12 ตามลำดับ ในข้าวพื้นเมืองไทยจำนวน 110 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนต้านทานโรคไหม้ทั้ง 3 ยีน พบว่าข้าวพื้นเมืองของไทยจำนวน 79 ตัวอย่าง มียีนต้านทานโรคไหม้อย่างน้อยหนึ่งยีน และมีข้าวพื้นเมือง 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ข้าว

ขาวใหญ่ (D001) ข้าวตะหมาย (D016) และข้าวเหนียวแพร่ไร่ (D058) ที่มียืนต้นทานโรคไหม้ทั้ง 3 ยืน

อิงออน สีแก้ว และคณะ (2553) ค้นหายืนต้นทานโรคไหม้ *Pid2* ในข้าวพื้นเมืองไทย จำนวน 69 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยืนต้นทาน *Pid2* ผลจากการตรวจสอบพบยืนต้นทานโรคไหม้ *Pid2* ในข้าวพื้นเมืองจำนวน 39 พันธุ์ ที่มีอัลลีลของยืนต้นทานโรคไหม้ *Pid2* ยืนยันผลการตรวจสอบโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีอัลลีลของยืนต้นทานโรคไหม้ *Pid2* เปรียบเทียบกับพันธุ์ที่มีอัลลีลที่ไม่ต้านทานของยืน *Pid2* พบว่ามี single nucleotide polymorphism (SNP) A/G ในส่วน recognition site ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mlu* I โดยพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีอัลลีลที่ต้านทานของยืนต้นทานโรคไหม้ *Pid2* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5-A*CGCGT-3 ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 700 และ 400 คู่เบส หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Mlu* I ส่วนในข้าวพื้นเมืองที่มีอัลลีลที่ไม่ต้านทานของยืน *Pid2* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5-G*CGCGT-3 ซึ่งเอนไซม์ *Mlu* I ไม่สามารถตัดนิวคลีโอไทด์ในส่วนนี้ได้ จึงยังคงได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส

Shi *et al.* (2010) ระบุ Quantitative Trait Loci (QTL) ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง Heikezijing ที่แสดงความต้านทานต่อโรคไหม้แบบกว้าง (broad spectrum) โดยใช้ประชากร recombinant inbred lines (RILs) ที่ได้จากการผสมระหว่างข้าวพันธุ์ Heikezijing ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของประเทศจีน สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในประเทศจีนและญี่ปุ่นได้ในระดับสูง และข้าวพันธุ์ Suyunuo ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ ทดสอบความต้านทานโรคไหม้โดยการปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 18 ไอโซเลท บนประชากร RILs จำนวน 166 ต้น ข้าวพันธุ์พ่อและแม่ รวมถึงพันธุ์ข้าวเปรียบเทียบที่ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ พบในข้าวพื้นเมืองพันธุ์ Heikezijing มีตำแหน่ง QTL บนโครโมโซม 11 และพบบาง QTLs เช่น *qtl11-5-5* แสดงความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 2 ไอโซเลท หรือมากกว่า QTLs กลุ่มหนึ่งประกอบด้วย *qtl11-2-2*, *qtl11-3-1*, *qtl11-4-1*, *qtl11-5-5*, *qtl11-6-1*, *qtl11-7-5*, *qtl11-8-2*, *qtl11-9-2*, *qtl11-10-4* และ *qtl11-11-1* ผลจากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าข้าวพื้นเมืองพันธุ์ Heikezijing สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลท ยืนต้นทานที่พบเป็นยืนต้นทานโรคไหม้แบบกว้าง (broad spectrum)

กฤตภิตติศักดิ์ ไพตรีจิตต์ และคณะ (2554) ค้นหายืนต้นทานโรคไหม้ *Pi9* และ *Pigm(t)* บนโครโมโซม 6 และยืน *Pi36* บนโครโมโซม 8 ในข้าวพื้นเมืองไทยจำนวน 203 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยืนต้นทานโรคไหม้ดังกล่าว จากการตรวจสอบพบว่าข้าวพื้นเมืองของไทยทั้งหมดจำนวน 203 พันธุ์มียืนต้นทานโรคไหม้อย่างน้อยหนึ่งยืน และมีข้าวพื้นเมืองจำนวน 42 พันธุ์มียืนต้นทานโรคไหม้ทั้ง 3 ยืน

Huang *et al.* (2011) ค้นพบยืนต้นทานโรคไหม้ยืนใหม่ *Pi47* และ *Pi48* บนโครโมโซม 11 และ 12 ตามลำดับ ในข้าวพื้นเมืองพันธุ์ Xiangzi 3150 (XZ3150) ซึ่งมีความต้านทานต่อเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาเหตุโรคไหม้ *M. grisea* ที่เก็บรวบรวมจากมณฑลยูนนานในประเทศจีน ค้นหาและสร้างแผนที่ระบบยีนต้านทานโรคไหม้ในพันธุ์ข้าว XZ3150 โดยวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวชั่วที่ 9 ซึ่งเป็นประชากร recombinant inbred line (RILs) จำนวน 286 ต้น ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ XZ3150 เป็นพันธุ์พ่อ และ CO39 เป็นพันธุ์แม่ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ ค้นหาและสร้างแผนที่ของยีนต้านทานโดยใช้เครื่องหมาย simple sequence repeat (SSR) พบว่ายีนต้านทานโรคไหม้ยีนใหม่ *Pi47* มีตำแหน่งตั้งอยู่บนโครโมโซม 11 อยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM206 และ RM224 และยีนต้านทานโรคไหม้ยีนใหม่ *Pi48* มีตำแหน่งตั้งอยู่บนโครโมโซม 12 อยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM5364 และ RM7102 และยังสรุปอีกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ยีนใหม่ที่พบในการศึกษานี้ จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการสร้างแผนที่ยีนต้านทานโรคไหม้ในอนาคต และยังสามารถใช้ประโยชน์ในการโคลนยีน และการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือก

Li *et al.* (2012) ตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1* ในข้าวพื้นเมืองของมณฑลยูนนาน จำนวน 173 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมาย MRG4766 ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด simple sequence repeat (SSR) คือ พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 64 พันธุ์ คิดเป็น 36.99 เปอร์เซ็นต์ของพันธุ์ข้าวทั้งหมดที่ทำการตรวจสอบ พบว่าพันธุ์ข้าวที่มียีน *Pi1* มีการกระจายอยู่ทั่วไปในมณฑลยูนนาน และยังพบว่ายีน *Pi1* มีความถี่ของการกระจายตัวสูงมากคิดเป็น 41.03 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณพื้นที่ปลูกข้าวทางตอนใต้ของมณฑลยูนนานในประเทศจีน

2.4 โรคไหม้ของข้าว (Rice Blast Disease)

โรคไหม้ของข้าวเกิดจากเชื้อราสาเหตุ *P. grisea* Sacc. มีชื่อเรียกในระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศว่า *M. grisea* (Hebert) Barr. อยู่ใน Class Ascomycete จีโนมของเชื้อรามีขนาด 37.8 ล้านคู่เบส มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด (diploid, $2n=14$) เป็นเชื้อราที่มีความสำคัญและเป็นปัญหาต่อการปลูกข้าวในหลายพื้นที่ทั่วโลก (Dean *et al.*, 2005) โดยในปี พ.ศ. 2535 ประเทศไทยพบการระบาดของโรคไหม้ในระยะข้าวออกรวงบริเวณภาคเหนือ ทำให้พื้นที่ปลูกข้าวได้รับความเสียหายเป็นปริมาณกว่า 1.2 ล้านไร่ มีรายงานมูลค่าความเสียหายประมาณ 436 ล้านบาท (Disthaporn, 1994)

2.4.1 วงจรชีวิตของเชื้อรา (Life cycle)

2.4.1.1 ระบบสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Sexual reproductive)

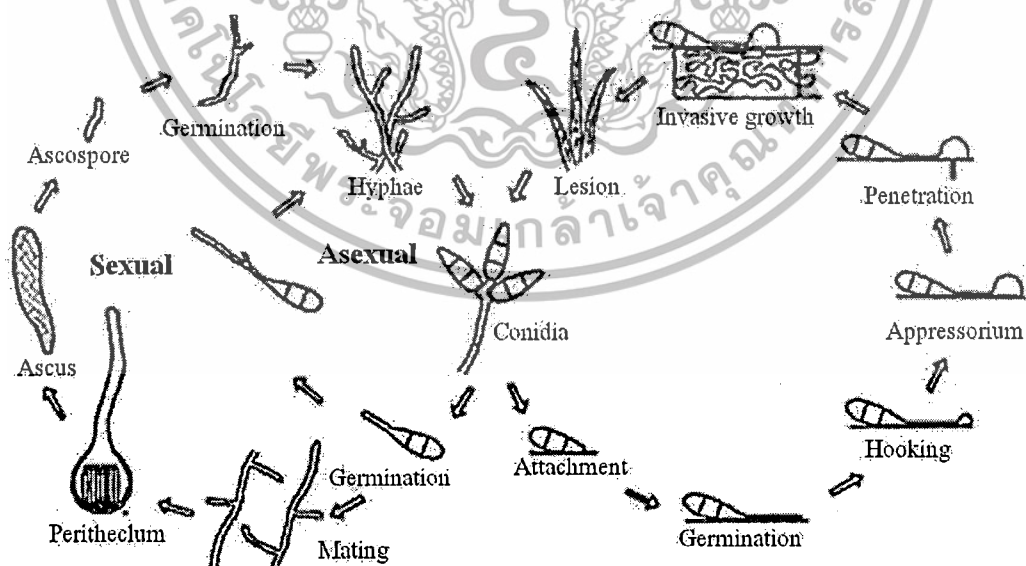
เชื้อราใน Class Ascomycete สามารถสืบพันธุ์โดยอาศัยเพศได้โดยมียีนที่ควบคุมการผสมพันธุ์ คือ MAT1 โดยมีเพศอยู่ 2 แบบ (mating type) ได้แก่ MAT1-1 และ MAT1-2 เชื้อราสามารถผสมพันธุ์กันได้เมื่อเชื้อราที่มีเพศที่ต่างกัน เส้นใยของเชื้อราต่างเพศกันเริ่มเชื่อมติดกัน มีการรวมตัวของนิวเคลียส (mating) เชื้อราจะสร้างเนื้อเยื่อห่อหุ้มที่มีลักษณะทรงกลมพู่ เรียกว่า perithecia ภายในสร้าง ascus และภายในแต่ละ ascus สร้างส่วนขยายพันธุ์หรือ ascospore จำนวน 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ascospore ในบางครั้งเชื้อราสามารถผสมพันธุ์กันได้แต่ไม่สมบูรณ์อาจพบว่ามีการสร้าง perithecia ที่ภายในสร้าง ascus แต่ไม่สามารถสร้าง ascospore ได้ ทำให้เชื้อราไม่สามารถสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศได้อย่างสมบูรณ์ (พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2548) เมื่อ ascospore ถูกปล่อยออกจาก ascus จะงอกเป็นเส้นใยและเจริญเป็นกลุ่มเส้นใย และสามารถสร้าง conidia ได้ต่อไป (Dean. *et al.*, 2005) (ภาพที่ 2.1) ในประเทศไทยพบเชื้อราสามารถผสมพันธุ์กันทั้งแบบสมบูรณ์และไม่สมบูรณ์ เชื้อสาเหตุโรคใหม่ทั้งสองเพศ คือ MAT1-1 และ MAT1-2 แต่ส่วนใหญ่พบเป็นเพศ MAT1-2 (Mekwatanakarn *et al.* 1999 อ้างโดยพูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2548)

2.4.1.2 ระบบสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual reproduction)

เชื้อราสามารถสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้างส่วนขยายพันธุ์จากปลายของเส้นใยที่เรียกว่า conidiophore ส่วนขยายพันธุ์ที่ได้ เรียกว่า conidia ลักษณะของ conidia มีรูปร่างแตกต่างกันคืออาจมีรูปร่างแบบ pyriform จนถึง obclavate ส่วนมากด้านปลายแคบกว่าด้านโคน และมี 2 เส้นกั้น (septate) มีขนาดที่หลากหลายแตกต่างกันตามพืชอาศัยและสภาพแวดล้อม โดยปกติมีขนาด 19-23 x 7-9 ไมโครเมตร ไม่มีสีหรือมีสีเขียวมะกอกอ่อน ส่วนมาก conidia จะเจริญจากเซลล์ปลาย (apical cell) หรือเซลล์ฐาน (basal cell) มากกว่าที่จะเจริญจากเซลล์กลาง (middle cell) conidiophore มีรูปร่างยาวเป็นส่วนก้านที่ช่วยพยุง conidia ไว้ ส่วนมากที่ฐานมีขนาดใหญ่กว่าส่วนปลาย เกิดเป็นกลุ่มโผล่มาจากปากใบหรือจากผนังเซลล์พืช มี 2-4 เส้นกั้น ในหนึ่ง conidiophore มักพบ conidia ประมาณ 1-20 conidia ซึ่ง conidia เป็นส่วนของเชื้อราที่สามารถปลิวไปตามลม และสามารถเข้าทำลายส่วนต่างๆ ของข้าวได้ (Ou. 1985) (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 วงจรชีวิต (Life cycle) และวงจรการเกิดโรค (Pathogenesis cycle) ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ (Dean *et al.*, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 วงจรการเกิดโรค (Pathogenesis cycle)

เชื้อสาเหตุโรคใหม่จะสร้าง conidia และปลิวไปในอากาศ เมื่อ conidia ของเชื้อราตกลงบนส่วนต่างๆ ของข้าว (attachment) conidia จะเริ่มงอก (germination) ภายในระยะเวลา 30-90 นาที เมื่อพบสภาพแวดล้อมเหมาะสม ได้แก่ ความชื้นในอากาศสูง และอุณหภูมิอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส มีการเจริญของเส้นใยและทำการยึดเกาะ (hooking) ประมาณ 2-4 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อราจะสร้าง appressorium และใช้อวัยวะปลายแหลมที่เรียกว่า penetration peg แทะเกร็ดตัวเข้าไป เชื้อราเจริญโดยใช้อาหารในข้าว ภายหลังจากเชื้อราเข้าทำลายประมาณ 7 วัน ข้าวจะแสดงบาดแผลที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคใหม่ (lesion) การเข้าทำลายของเชื้อมักเกิดขึ้นในช่วงเวลากลางคืนซึ่งอุณหภูมิค่อนข้างเย็นและมีความชื้นสูง (ภาพที่ 2.1) (พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2548; Dean *et al.*, 2005)

2.4.3 ลักษณะอาการของโรคใหม่ (Symptoms of Rice Blast Disease)

เชื้อสาเหตุโรคใหม่สามารถเข้าทำลายข้าวได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ระยะต้นกล้าไปจนถึงระยะออกรวง อาการของโรคปรากฏบนส่วนของข้าวที่อยู่เหนือดิน คือ ใบ กาบใบ ข้อต่อของใบ ข้อของลำต้น และคอรวง โดยแบ่งอาการของโรคตามอายุของข้าวออกเป็น 3 ระยะ

ระยะกล้า (leaf blast) ในระยะเริ่มแรกพบจุดสีน้ำตาลขนาด 1-2 มิลลิเมตร บนใบข้าว จากนั้นจุดสีน้ำตาลจะขยายใหญ่ขึ้นและมีสีเทาตรงกลางแผลขอบแผลมีสีน้ำตาล ลักษณะแผลคล้ายรูปตา ความกว้างของแผลประมาณ 3-5 มิลลิเมตร และความยาวประมาณ 5-15 มิลลิเมตร แผลสามารถขยายลุกลามและกระจายทั่วบริเวณใบ หากอาการของโรครุนแรงกล้าข้าวจะแห้งพับตาย อาการคล้ายถูกไฟไหม้ (พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2548)

ระยะแตกกอ (collar blast, node blast) อาการพบได้ที่ใบ กาบใบ ข้อต่อของใบ และข้อของลำต้น อาการส่วนใหญ่จะพบจุดสีน้ำตาลรูปตาตรงกลางแผลเป็นสีเทา ขนาดแผลจะใหญ่กว่าที่พบในระยะกล้า แผลลุกลามติดต่อกันได้ ที่บริเวณข้อต่อใบจะมีลักษณะแผลซ้ำสีน้ำตาลดำ ใบข้าวจะหลุดหรือหักพับงาย (พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2548)

ระยะออกรวง (panicle blast) เชื้อราสามารถเข้าทำลายที่รวงข้าวจนถึงคอรวง โรคใหม่ในระยะนี้ เรียกว่า โรคใหม่คอรวง (neck blast) หากเชื้อเข้าทำลายในระยะที่ข้าวเพิ่งออกรวง จะทำให้เมล็ดข้าวลีบหมด เปลือกเมล็ดข้าวมีสีเทาดำของ conidia เชื้อรา แต่ถ้าเป็นโรคในระยะรวงข้าวแก่ใกล้เก็บเกี่ยว จะปรากฏรอยแผลซ้ำสีน้ำตาลที่บริเวณคอรวงทำให้เปราะหักง่าย รวงข้าวร่วงหล่นเสียหายมาก ถ้าเกิดการระบาดอย่างรุนแรงโดยเฉพาะในระยะที่ข้าวเริ่มออกรวงจะทำให้รวงข้าวลีบทั้งรวงไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ (สำนักงานวิจัยและพัฒนาข้าว. 2552)

2.4.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคใหม่ในข้าว

เชื้อสาเหตุโรคใหม่มีความแปรปรวนมากกว่าเชื้อราชนิดอื่นๆ เนื่องจากเชื้อราชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลงได้อย่างรวดเร็วภายในไม่กี่ชั่วอายุ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา เกิด

ได้จากหลายสาเหตุ ได้แก่ การกลายพันธุ์ของเชื้อรา พบว่าการกลายของลักษณะการสร้างเม็ดสี (melanin pigment) บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ มีผลต่อความรุนแรงของเชื้อรา โดยเม็ดสีของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ประกอบด้วยสาร polymerized dihydroxynaphthalene สารนี้เกี่ยวข้องกับขบวนการงอกเส้นใยและการแทงเข้าสู่ใบข้าว (Wheeler and Bell, 1988; Howard and Ferrari, 1989 อ้างโดยพูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์, 2548) การกลายพันธุ์ของ conidia เชื้อราทำให้มีความผิดปกติของรูปร่างลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีน *SMO1* การกลายพันธุ์นี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการเกิดโรคของเชื้อรา (Shi and Leung, 1995 อ้างโดยพูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์, 2548) การรวมตัวของยีนแบบ parasexual (parasexual recombination) คือ การแลกเปลี่ยนหน่วยพันธุกรรมของเชื้อในระยะเวลาของการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นในระยะเวลาที่เชื้อรามีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และพบว่าแสงยูวีสามารถกระตุ้นให้เชื้อสาเหตุโรคไหม้เกิด parasexual recombination ได้ด้วยความถี่สูง (Genovesi and Magill, 1976 อ้างโดยพูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์, 2548) การเกิด transposable element ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดสั้นๆ ที่สามารถเคลื่อนย้ายเข้าออกในจีโนมของพืชได้ อาจทำให้เชื้อสาเหตุโรคไหม้เกิดการกลายพันธุ์ได้ รวมไปถึงการเคลื่อนย้ายประชากรของเชื้อราจากแหล่งปลูกข้าวหนึ่งไปสู่อีกแหล่งหนึ่ง ทำให้ตรวจพบสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่แตกต่างจากที่มีอยู่เดิมในพื้นที่ ด้วยสาเหตุเหล่านี้ทำให้เกิดการระบาดของโรคไหม้อยู่เป็นประจำ เมื่อนักปรับปรุงพันธุ์ได้พัฒนาพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้พันธุ์ใหม่ออกมา เชื้อราก็สามารถปรับตัวเพื่อเข้าทำลายข้าวพันธุ์ใหม่ได้ในระยะเวลาไม่นาน (พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์, 2548)

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ และคณะ (2550) ตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทย โดยนำพันธุ์ข้าวมาตรฐานที่มียีนต้านทานเดี่ยวมาจำแนกและวิเคราะห์ความรุนแรงของสายพันธุ์เชื้อรา ปลุกพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ที่แตกต่างกันในแปลงทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี และศูนย์วิจัยข้าวขอนแก่น ภาคเหนือที่ศูนย์วิจัยข้าวแพร่ ภาคเหนือตอนล่างที่ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก และภาคใต้ที่ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง เก็บตัวอย่างเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่เข้าทำลายใบข้าวและคอรวงข้าวในพันธุ์ข้าวทดสอบมาตรฐานที่มียีนต้านทานโรคไหม้ยีนเดี่ยว โดยวิธีการแยกเชื้อให้ได้ conidia เดียวกันได้เชื้อบริสุทธิ์นำไปทดสอบความรุนแรงในการเข้าทำลายของเชื้อบนพันธุ์ข้าวมาตรฐานที่มียีนต้านทานเดี่ยว 18 สายพันธุ์ จากเชื้อจำนวน 2,476 ไอโซเลท สามารถจำแนกเชื้อได้จำนวน 623 รูปแบบการเกิดโรค (pathotype) บนพันธุ์ข้าว แบ่งออกเป็น 186 pathotype ที่พบมีการระบาดของโรคไหม้ และ 437 pathotype เป็น pathotype ที่หายาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประชากรเชื้อสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทยมีความหลากหลายสูง pathotype ของเชื้อราที่พบประจำมีความรุนแรงน้อยกว่า pathotype ที่หายาก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยมีจำนวน pathotype ของเชื้อราที่เข้าทำลายข้าวมากที่สุด

Sirithunya *et al.* (2008) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *P. grisea* ในประเทศไทย โดยเก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุโรคไหม้จากข้าว หญ้า ข้าวบาร์เลย์ และข้าวปารวม

ทั้งหมดจำนวน 174 ไอโซเลท ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา โดยใช้เทคนิค Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD) แล้วจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อราได้เป็น 9 กลุ่ม ได้แก่กลุ่ม A ถึงกลุ่ม I พบว่ากลุ่ม B, C และ H มีความโดดเด่นที่สุดพบมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราทั้งหมดในการศึกษานี้ และมีการกระจายตัวของประชากรสูง โดยมีกระจายตัวของประชากรเชื้อราอย่างกว้างขวางทั่วประเทศไทย แต่ในสายพันธุ์อื่นๆ จะมีการกระจายตัวของประชากรเชื้อราอย่างจำกัดแคในพื้นที่นั้นๆ เช่น สายพันธุ์กลุ่ม A ถูกจำกัดอยู่เพียงในบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย จากผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา พบว่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือภาคเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคใหม่สูง ในขณะที่ภาคตะวันออกและภาคใต้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ

อัคราพร ณ ลำปาง เนินพลับ และพูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ (2552) ทำการเก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุโรคใหม่ที่ทำให้เกิดอาการบนข้าวต่างสายพันธุ์ ที่ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลกและแปลงนาเกษตรบริเวณภาคเหนือตอนล่างในระหว่างฤดูปลูก พ.ศ. 2550-2551 โดยเก็บจากนิเวศนาชลประทานและน่าน้ำฝน ในข้าวพื้นเมืองและข้าวไร่ รวบรวมเชื้อสาเหตุโรคใหม่ได้ทั้งหมด 80 ไอโซเลท แยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำมาทดสอบกับชุดข้าว Near Isogenic Lines (NILs) ของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) ที่มีฐานพันธุกรรมคล้ายกันแต่มียีนต้านทานโรคใหม่ที่แตกต่างกันสายพันธุ์ละ 1 ยีน รวมทั้งหมดจำนวน 18 สายพันธุ์ เพื่อจำแนก pathotype ของเชื้อรา พบว่าที่ความเหมือน 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถจำแนกเชื้อราได้จำนวน 13 pathotypes โดยมีสัดส่วนไอโซเลท: pathotype เท่ากับ 6.2:1 แสดงว่ามีความหลากหลายของเชื้อราในจังหวัดพิษณุโลกและพื้นที่ใกล้เคียงไม่มากนัก แต่พบว่าเชื้อราที่มีความรุนแรงมาก เพราะพันธุ์ข้าวทดสอบที่มียีนต้านทานโรคใหม่ สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคใหม่ได้เพียง 20 ไอโซเลทจาก 80 ไอโซเลท

2.5 การปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคใหม่ในประเทศไทย

การใช้พันธุ์ข้าวต้านทานโรคใหม่เป็นวิธีการป้องกันกำจัดโรคที่มีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อสาเหตุโรคใหม่เป็นเชื้อราที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง ทำให้เชื้อรามีโอกาสกลายพันธุ์เกิดสายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีความรุนแรง และสามารถเข้าทำลายพันธุ์ข้าวต้านทานโรคใหม่พันธุ์เดิมได้ ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคใหม่ โดยใช้ยีนต้านทานที่สามารถต้านทานต่อเชื้อราได้หลายสายพันธุ์ หรือ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคใหม่โดยการรวมยีนต้านทานโรคใหม่หลายๆ ยีนไว้ร่วมกัน จึงเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคใหม่ได้อย่างยั่งยืน โดยทั่วไปการปรับปรุงพันธุ์ข้าวด้วยวิธีแบบดั้งเดิมจะใช้ระยะเวลานาน ที่สำคัญในขั้นตอนการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคใหม่เป็นขั้นตอนที่ต้องใช้แรงงานและค่าใช้จ่ายสูง ต้องอาศัยสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม และจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ประมาณ 8 ปี จึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำให้ไม่สามารถปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้ทันตามความต้องการของเกษตรกร ปัจจุบันมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ โดยนำมาช่วยคัดเลือกลักษณะความต้านทาน แทนการคัดเลือกจาก phenotype ซึ่งผลที่ได้มีความแม่นยำเนื่องจากการคัดเลือกที่ genotype หรือยีนที่ควบคุมลักษณะดังกล่าวโดยตรง (ศรีสวัสดิ์ ชันทอง และคณะ. 2553)

สมใจ สาลีโท และคณะ (2553) พัฒนาสายพันธุ์ข้าวเหนียวให้ต้านทานโรคไหม้ ได้ข้าวเหนียวสายพันธุ์ดีเด่น RGD334-3-11-1-1-147-1KPS-3 ซึ่งคัดเลือกได้จากการผสมกลับระหว่างข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ใช้เป็นพันธุ์แม่ และพันธุ์เจ้าหอมนิลใช้เป็นพันธุ์พ่อ โดยผสมกลับไปหาพันธุ์ กข6 จำนวน 4 ครั้ง ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (Marker assisted selection, MAS) ลักษณะต้านทานโรคไหม้ ดำเนินการทดลองที่หน่วยค้นหาและใช้ประโยชน์จากยีนข้าว ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม เมื่อปี พ.ศ. 2545 และคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้องการที่ศูนย์วิจัยข้าวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ข้าวสายพันธุ์ใหม่ที่ได้เป็นข้าวเหนียวไวต่อช่วงแสง ออกดอกประมาณวันที่ 22 ตุลาคม เก็บเกี่ยว 22 พฤศจิกายน ความสูงเฉลี่ย 144 เซนติเมตร จำนวน 9 รวงต่อกอ ในสภาพแปลงทดลองของศูนย์วิจัยข้าวให้ผลผลิตเฉลี่ย 642 กิโลกรัมต่อไร่ และในแปลงนาเกษตรกรให้ผลผลิตเฉลี่ย 538 กิโลกรัมต่อไร่ ข้าวเปลือกสีน้ำตาล เมล็ดข้าวกล้องยาว 6.99 มิลลิเมตร รูปร่างเรียวยาว อุณหภูมิแป้งสุกต่ำ ข้าวแข็งเหนียวนุ่ม ไม่มีกลิ่นหอม คุณภาพการสีดีมากโดยได้ข้าวเต็มเมล็ด ต้านทานต่อโรคไหม้ได้ดีกว่าพันธุ์ กข6 แต่อ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้งและเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเหมือนพันธุ์ กข6 มีเสถียรภาพในการให้ผลผลิตสูง ปรับตัวได้ดีในหลายสภาพแวดล้อม และสามารถนำไปปลูกในพื้นที่ต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง

พูนศักดิ์ เมฆวิวัฒนากาญจน์ และคณะ (2554) พัฒนาข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานต่อโรคไหม้ด้วยวิธีการผสมกลับ (backcross) โดยใช้ข้าวจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ IR77955-14-17, IR77955-22-53, IR77955-24-75, IR77955-24-88 และ IR77955-30-13 ซึ่งเป็นข้าวลูกผสมระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์เจ้าหอมนิล (JHN) หรือ DHL279 ซึ่งเป็นพันธุ์ถ่ายยีนต้านทานโรคไหม้ และทำการผสมกลับไปยังพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จึงมีลักษณะต่างๆ เหมือนพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ทำการผสมกลับไปยังพันธุ์รับทั้ง 5 สายพันธุ์ จำนวน 3 ครั้ง ในแต่ละช่วงทดสอบความต้านทานของสายพันธุ์ข้าวด้วยการทดสอบโรคไหม้ในระยะกล้าด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 20 สายพันธุ์ และตรวจหาต้นที่มียีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมาย RM246, RM319 และ RM212 สำหรับคัดเลือกต้นที่มียีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซม 1 และใช้เครื่องหมาย AP10, RM224 และ RM144 สำหรับคัดเลือกต้นที่มียีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซม 11 จนได้ประชากรข้าว BC₃F₁ จำนวน 20 สายพันธุ์ นำไปปลูกเร่งช่อดำ และคัดเลือกข้าวสายพันธุ์ผสมกลับจนได้ชั่วที่ 5-6 (BC₃F₅₋₆) ที่ต้านทานโรคไหม้ ศึกษาพันธุ์เบื้องต้นจำนวน 105 สายพันธุ์ ส่งเปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสถานี และในแปลงนาเกษตรกร ทั้งชุดต้านทานโรคไหม้อายุเบา 30 สายพันธุ์ และอายุปาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลาง 43 สายพันธุ์ ในปี 2551-2553 จากการเปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสถานี พบชุดต้านทานโรคไหม้มีอายุเบาจำนวน 6 สายพันธุ์ให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐาน (กข15) ตั้งแต่ 2-10 เปอร์เซ็นต์ และชุดต้านทานโรคไหม้มีอายุปานกลางจำนวน 9 สายพันธุ์ พบว่าให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ตั้งแต่ 0.1 – 11 เปอร์เซ็นต์ ในฤดูในปี 2553 พบข้าวชุดต้านทานโรคไหม้มีอายุเบาจำนวน 6 สายพันธุ์ให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐาน (กข15) ตั้งแต่ 11–34 เปอร์เซ็นต์ และข้าวชุดต้านทานโรคไหม้มีอายุปานกลางจำนวน 9 สายพันธุ์ พบว่าให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ตั้งแต่ 1.6–9 เปอร์เซ็นต์

สมใจ สาลีโท และคณะ (2554) พัฒนาสายพันธุ์ข้าวเหนียวอายุเบาให้ต้านทานต่อโรคไหม้ได้ ข้าวเหนียวสายพันธุ์ดีเด่น KKN97057-7-1-1-6-4-NKI-1-1 ซึ่งคัดเลือกได้จากการผสมกลับระหว่างข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 เป็นพันธุ์แม่ กับข้าวเหนียวพันธุ์หางยี 71 เป็นพันธุ์พ่อ โดยผสมกลับไปหาพันธุ์ กข6 จำนวน 2 ครั้ง ที่ศูนย์วิจัยข้าวขอนแก่น ข้าวสายพันธุ์นี้เป็นข้าวเหนียวไวต่อช่วงแสง ออกดอกประมาณวันที่ 2 ตุลาคม เก็บเกี่ยวประมาณวันที่ 2 พฤศจิกายน ความสูงต้นเฉลี่ย 148 เซนติเมตร จำนวนรวง 10 รวงต่อกอ ให้ผลผลิตเฉลี่ยในสภาพแปลงทดลองของศูนย์วิจัยข้าว 557 กิโลกรัมต่อไร่ และให้ผลผลิตเฉลี่ยในสภาพแปลงนาเกษตรกร 532 กิโลกรัมต่อไร่ ข้าวเปลือกสีน้ำตาล เมล็ดดียว รูปร่างเรียวยาว ข้าวกล้องยาว 7.36 มิลลิเมตร อุณหภูมิแป้งสุกต่ำ ข้าวแข็งเหนียวนุ่ม มีกลิ่นหอม คุณภาพการสีดีมาก ได้ข้าวเต็มเมล็ดและต้นข้าวร้อยละ 61 ลักษณะเด่น คือ มีอายุเบากว่าพันธุ์ กข12 ประมาณ 1 สัปดาห์ เหมาะสำหรับพื้นที่นาก่อนข้างคอนซึ่งไม่เหมาะสมกับพันธุ์ กข12 ก่อนข้างต้านทานต่อโรคไหม้ในหลายพื้นที่ คุณภาพการหุงต้มและรับประทานดี มีกลิ่นหอม เป็นที่ยอมรับของเกษตรกร แต่มีข้อควรระวัง คือ อ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้งและเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

อนุชาติ กษสฤทธิย์ และคณะ (2556) พัฒนาสายพันธุ์ข้าวเจ้าอายุเบาไวต่อช่วงแสงให้ต้านทานต่อโรคไหม้ โดยผสมระหว่างพันธุ์ IR77955-24-75-284 เป็นพันธุ์แม่ กับพันธุ์ DHL-279 ที่มียืนต้านทานโรคไหม้เป็นพันธุ์พ่อ ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานีในฤดูปี พ.ศ. 2546 ทำการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบปกติ (conventional breeding) ร่วมกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection, MAS) จนได้สายพันธุ์ UBN03007-47-7-7-26-35-19 ซึ่งเป็นข้าวเจ้าไวต่อช่วงแสง ความสูงเฉลี่ย 157 เซนติเมตร จำนวน 9 รวงต่อกอ ให้ผลผลิตเฉลี่ยในสภาพแปลงทดลองของศูนย์วิจัยข้าว 517 กิโลกรัมต่อไร่ และให้ผลผลิตเฉลี่ยในสภาพแปลงนาเกษตรกร 431 กิโลกรัมต่อไร่ ข้าวเปลือกสีฟาง เมล็ดข้าวกล้องยาว 7.80 มิลลิเมตร รูปร่างเรียวยาว ปริมาณ amylose ต่ำ อุณหภูมิแป้งสุกต่ำ คุณภาพข้าวสุกเหนียว นุ่ม มีกลิ่นหอม ลักษณะเด่น คือ ต้านทานต่อโรคไหม้ทั้งใบไหม้และไหม้คอรวง อายุเบา ให้ผลผลิตเฉลี่ยในสภาพแปลงนาเกษตรกร สูงกว่าพันธุ์ กข15 คิดเป็น 24 เปอร์เซ็นต์

2.5.1 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสาเหตุโรคใหม่กับพันธุ์ข้าวต้านทาน

การเกิดโรคในพืชเป็นผลมาจากปฏิกริยาระหว่างพืชและเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งพืชอาจต้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรค และเช่นเดียวกันเชื้อสาเหตุโรคอาจเข้าทำลายพืชหรือไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้ การเกิดโรคคือปฏิกริยาระหว่างยีนที่อยู่ในพืชและยีนที่อยู่ในเชื้อสาเหตุโรค เรียกทฤษฎีนี้ว่า gene for gene hypothesis ถูกค้นพบและเสนอโดย Flor (1971) สรุปได้ว่าหากมียีนหนึ่งที่ควบคุมปฏิกริยาความต้านทาน (resistance gene, R gene) ในพืชย่อมมีอีกยีนหนึ่งที่คู่กันทำหน้าที่ควบคุมปฏิกริยาก่อโรค (avirulence, AVR gene) ในเชื้อสาเหตุโรค และการแสดงออกของความต้านทาน (resistant) จะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อยีนที่เข้าคู่กันทั้งในพืชและในเชื้อสาเหตุโรคเป็นยีนเด่น (dominant gene) เท่านั้น หากยีนใดยีนหนึ่งเป็นยีนด้อย (recessive gene) จะแสดงความไม่ต้านทานโรคหรืออ่อนแอต่อโรค (susceptible) ดังนั้นแม้ว่าต้นพืชจะมียีนต้านทานโรคใหม่อยู่ 1 ยีนหรือมีมากกว่าก็ตาม พืชจะถูกเชื้อเข้าทำลายได้ก็ต่อเมื่อถูกเชื้อโรคที่มียีนแบบ recessive gene เข้าทำลาย ตัวอย่างเช่น ในเชื้อสาเหตุโรคใหม่มี AVR-Pi-ta ซึ่งเป็น dominant gene เข้าทำลายข้าว ในพันธุ์ข้าวต้องมียีนต้านทานโรคใหม่ Pi-ta ที่เป็น dominant gene เช่นกัน จึงจะเกิดปฏิกริยาแบบ compatible ทำให้พืชมีความต้านทานโรคเกิดขึ้น (Jia. et al., 2009) ซึ่งเชื้อราสาเหตุโรคใหม่นั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถปรับตัวให้เข้าทำลายพืชได้ในระยะเพียงไม่กี่ชั่วอายุ สามารถปรับเปลี่ยนจากยีนที่เป็น dominant gene ให้เป็น recessive gene เพื่อเข้าทำลายพืชได้ (Valent and Chumley. 1994; คำนิน กาสะดี. 2541)

2.5.2 ยีนต้านทานโรคใหม่ของข้าว

ปัจจุบันได้มีการค้นพบยีนต้านทานโรคใหม่ในข้าวประมาณ 96 ยีนกระจายอยู่ทั่วจีโนมข้าว พบมากบริเวณโครโมโซมที่ 2, 6, 11 และ 12 และมียีนต้านทานโรคใหม่ 9 ยีนที่ได้ทำการโคลนยีนและหาลำดับเบสแล้ว ได้แก่ ยีน Pib (Wu et al., 2004), Pi-ta (Bryan et al., 2000), Pik-h (Sharma et al., 2005), Pi37 (Lin et al., 2007), Piz-5 และ Piz-t (Zhou et al., 2005), Pi9 (Qu et al., 2006), Pid2 (Chen et al., 2006) และ Pi36 (Liu et al., 2007)

Prasad et al. (2009) วิเคราะห์ประชากรข้าว near isogenic lines (NILs) ซึ่งได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ C101LAC ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคใหม่ *M. grisea* สูง และข้าวอินดิกาพันธุ์ Samba Mahsuri (BPT 5204) เป็นพันธุ์ข้าวที่ปลูกทั่วประเทศอินเดีย มีเมล็ดเรียวยาวปานกลาง ให้อัตราผลตอบแทนสูงและมีคุณภาพดีแต่อ่อนแอต่อโรคใหม่ ทดสอบการเกิดโรคและสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคใหม่ พบการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคใหม่ในประชากรข้าวช่วงที่ 2 ในอัตราส่วน 3:1 (ต้านทาน:อ่อนแอ) วิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) พบยีนต้านทานโรคใหม่ *Pi1(t)* มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM224 บนโครโมโซม 11

Koide et al. (2011) เก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุโรคใหม่ใหม่ในประเทศฟิลิปปินส์จำนวน 23 ไอโซเลท จำแนกเชื้อสาเหตุออกเป็น 16 pathotypes ซึ่งมีเชื้อ 11 pathotypes แสดงการเกิด

รูปแบบปฏิกิริยาที่แตกต่างกันในอัลลีลของยีน *Pik* (*Pik*, *Pik-m*, *Pik-h* และ *Pik-p*) และ *Pil* ใน การศึกษานี้พบยีน *Pi19(t)* มีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้หลายไอโซเลต พบว่ามีความ เชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM27937 และ RM1337 และมีตำแหน่งอยู่บน โครโมโซม 12

Zeng *et al.* (2011) พบยีน *Pia* บนโครโมโซม 11 ในข้าวพันธุ์ Aichi Asahi แสดงความ ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้จากทุกมณฑลในประเทศจีนยกเว้นมณฑลเจียงซู ตรวจสอบความ รุนแรงของการเกิดโรคโดยใช้เชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมในประเทศจีน 612 ไอโซเลต และ วิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้และการกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุล ใน ประชากรข้าวช่วงที่ 2 (F_2) จำนวน 800 ต้น ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ Aichi Asahi และพันธุ์ Kasalath พบยีนต้านทาน *Pia-1*, *Pia-2*, *Pia-3* และ *Pia-4* มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย A17, A25, A26 และ A27 และยังพบว่า ยีน *Pia-3* เป็นยีนที่สำคัญที่สุดสำหรับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pia* บนโครโมโซม 11

ตารางที่ 2.1 ตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ที่เชื่อมโยงกับเครื่องหมายดีเอ็นเอบนโครโมโซมข้าว

Chr.	Gene	Marker name	Map position (cM)	References
1	<i>Pi24(t)</i>	K5	64.4	Sallaud <i>et al.</i> , 2003
	<i>Pitp(t)</i>	RM246	114.1	Barman <i>et al.</i> , 2004
	<i>Pi35(t)</i>	RM1216, RM1003	132.0–136.6	Nguyen <i>et al.</i> , 2006
2	<i>Pid(t)1</i>	G1314A, G45	87.5–89.9	Chen <i>et al.</i> , 2004
	<i>Pi25(t)</i>	RG520	157.9	Sallaud <i>et al.</i> , 2003
	<i>Pib</i>	RM138, RM166, RM208, RM266	154.1	Fjellstrom <i>et al.</i> , 2004
	<i>Pitq5</i>	RG522, RG446	150.5–157.9	Tabien <i>et al.</i> , 2000
	<i>Pi-g(t)</i>	RM166, RM208		Zhou <i>et al.</i> , 2004
4	<i>Pi39(t)</i>	RM3843, RM5473	107.4–108.2	Terashima <i>et al.</i> , 2008
	<i>Pi46(t)</i>	RM6748, RM5473		Matsushita <i>et al.</i> , 2011
5	<i>Pi26(t)</i>	RG313	22.5–24.7	Sallaud <i>et al.</i> , 2003
6	<i>Pid(t)2</i>	RM527, RM3	65.8	Chen <i>et al.</i> , 2004
	<i>Pitq1</i>	C236, RZ508	103.0–124.4	Tabien <i>et al.</i> , 2000
	<i>Pi8</i>	Amp-3	–	Pan <i>et al.</i> , 1996

ดัดแปลงจาก Koide *et al.* (2009) และ Miah *et al.* (2012)

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) ตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ที่เชื่อมโยงกับเครื่องหมายดีเอ็นเอบนโครโมโซมข้าว

Chr.	Gene	Marker name	Map position (cM)	References
6	<i>Pigm(t)</i>	C26348	65.8	Deng <i>et al.</i> , 2006
	<i>Piz</i>	RM527		RoyChowdhury <i>et al.</i> , 2012
	<i>Pi40(t)</i>	RM3330, RM527	54.1–61.6	Jeung <i>et al.</i> , 2007
	<i>Pi27(t)</i>	Est-2	51.9	Sallaud <i>et al.</i> , 2003
8	<i>Pi29(t)</i>	RZ617, RGA-IR86	69	Sallaud <i>et al.</i> , 2003
	<i>Pi33</i>	RM72, RM44	45.4	Berruyer <i>et al.</i> , 2003
	<i>Pi36</i>	RM5647	21.6–25.2	Liu <i>et al.</i> , 2005
9	<i>Pi15</i>	CRG5, CRG2	31.3–34.9	Lin <i>et al.</i> , 2007
	<i>Pi5(t)</i>	S04G03	31.3–33.0	Jeon <i>et al.</i> , 2003
10	<i>Pi28(t)</i>	RZ500	114.7	Sallaud <i>et al.</i> , 2003
11	<i>Pia</i>	<i>yca72</i>	36	Kwon <i>et al.</i> , 2008; Zeng <i>et al.</i> , 2011
	<i>PiCO39(t)</i>	RGA8, RZ141, RGACO39	49.1	Chauhan <i>et al.</i> , 2002
	<i>Pilm2</i>	RZ536	56.2–117.9	Tabien <i>et al.</i> , 2000
	<i>Pi30(t)</i>	OpZ11-f, RGA-IG14	59.4–60.4	Sallaud <i>et al.</i> , 2003
	<i>Pi34</i>	C1172-RG702	79.1–91.4	Zenbayashi <i>et al.</i> , 2002
	<i>Pi38</i>	RM206, RM21	79.1–88.7	Gowda <i>et al.</i> , 2006
	<i>Pi44(t)</i>	AF ₃₄₉ , AF ₃₄₈	91.4–117.9	Chen <i>et al.</i> , 1999
	<i>Pik-h</i>	RM224, RM1233, RM144	101.9	Sharma <i>et al.</i> , 2005; Fjellstrom <i>et al.</i> , 2004
	<i>Pil</i>	RM224, RM6094	112.1–117.9	Hittalmani <i>et al.</i> , 2000
	<i>Pil(t)</i>	RM224, RM6094	–	Fuentes <i>et al.</i> , 2008
	<i>Pi18(t)</i>	RZ536	117.9	Ahn <i>et al.</i> , 2000
	<i>Pik-s</i>	RM144, RM224, RM1233	115.1–117.3	Fjellstrom <i>et al.</i> , 2004
	<i>Pi47</i>	RM206, RM224	–	Huang <i>et al.</i> , 2011
	<i>Pikm</i>	RM224, RM144	–	Jia <i>et al.</i> , 2009

ตัดแปลงจาก Koide *et al.* (2009) และ Miah *et al.* (2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) ตำแหน่งของยีนต้านทานโรคใหม่ที่เชื่อมโยงกับเครื่องหมายดีเอ็นเอบนโครโมโซมข้าว

Chr.	Gene	Marker name	Map position (cM)	References
12	<i>Pitq6</i>	RG869, L102	29.2–47.5	Tabien <i>et al.</i> , 2000
	<i>Pi31(t)</i>	O10-800	44.3	Sallaud <i>et al.</i> , 2003
	<i>Pi32(t)</i>	AF6	47.5	Sallaud <i>et al.</i> , 2003
	<i>Pi-ta</i>	YL153/YL154	50.4	Jia <i>et al.</i> , 2009
	<i>Pita-2</i>	RM155, RM7102	50.4	Fjellstrom <i>et al.</i> , 2004
	<i>Pi19(t)</i>	RM27973, RM1337	–	Koide <i>et al.</i> , 2011
	<i>Pi20(t)</i>	RM1337, RM5364, RM7102	51.5–51.8	Li <i>et al.</i> , 2008
	<i>Pi48</i>	RM5364, RM7102	–	Huang <i>et al.</i> , 2011

ดัดแปลงจาก Koide *et al.* (2009) และ Miah *et al.* (2012)

2.6 เครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ชิ้นส่วนหรือบริเวณของดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมหรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ ใช้เป็นเครื่องหมายติดตามหน่วยพันธุกรรม หรือยีนของสิ่งมีชีวิตและสามารถถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่งได้ ใช้งบชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิต เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะได้เนื่องจาก พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ หรือ ลำดับเบสในโมเลกุลดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์และมีความแตกต่างกัน (polymorphism) (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552) เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพมาก ผลที่ได้ถูกต้องและแม่นยำมากกว่าการใช้ลักษณะรูปร่างหรือสัณฐานของพืช (morphological marker) ที่มักผันแปรไปตามสภาพแวดล้อม (ปิยะดา ตันตสวัสดิ์, 2554)

ปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในงานด้านพันธุศาสตร์ และการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมาก เช่น ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ใช้เพื่อติดตามหาพื้นที่ควบคุมลักษณะที่ดีต่างๆ ใช้เป็นข้อมูลสำหรับวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนและสร้างแผนที่ยีน เป็นต้น ซึ่งแผนที่ของยีนที่ควบคุมลักษณะที่ดีต่างๆ เป็นข้อมูลสำคัญช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์ทราบถึงจำนวน ตำแหน่ง และอิทธิพลของยีนที่มีความสำคัญ เพื่อเป็นแนวทางในการผนวกรวมยีนเหล่านั้นเพื่อสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ได้อย่างรวดเร็ว เครื่องหมายดีเอ็นเอที่นำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านพืชมีหลายประเภท ได้แก่ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP), Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment

Length Polymorphism (AFLP) และ Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ microsatellite โดยการเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ และคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละประเภท (จุฑาพร แสงประจักษ์. 2555)

2.6.1 Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)

เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) สามารถตรวจสอบโดยอาศัยหลักการเข้าสู่ (hybridization) ของดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับชิ้นดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ศึกษา ข้อดีของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ คือ การตรวจสอบแบบเจาะจงตำแหน่งที่แน่นอนบนโครโมโซม สามารถทำซ้ำได้ผลเหมือนเดิม สามารถแยกแยะแถบดีเอ็นเอแบบข่มร่วมกัน (co-dominance) ทำให้สามารถตรวจสอบ heterozygous ได้ แต่มีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ ชิ้นตอนยุ่งยาก ซับซ้อน ใช้เวลานาน และค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานสูง (สุริพร เกตุงาม. 2546)

Yu *et al.* (1996) สร้างแผนที่ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-1(t)* ซึ่งได้รับจากข้าวพันธุ์ LAC23 ทดสอบการเกิดโรคและวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานในประชากรผสมกลับชั่วที่ 6 (BC_6F_3) และวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) ในประชากร nearly isogenic line (NILs) หรือ BC_6F_4 พบยีน *Pi-1(t)* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 11 มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RZ536 โดยมีระยะห่าง 14 ± 4.5 cM สร้างแผนที่ยีนต้านทานโรคไหม้ยีนที่สอง โดยใช้ประชากรข้าว Double haploid (DH) ที่ผสมระหว่างพันธุ์ Apure ซึ่งต้านทานโรคไหม้ และพันธุ์ IRAT177 ซึ่งอ่อนแอต่อโรคไหม้ พบยีนต้านทานโรคไหม้มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 12 โดยอยู่ระหว่างเครื่องหมาย RG457 และ RG869 มีระยะห่าง 13.5 ± 4.3 และ 17.7 ± 4.5 cM ตามลำดับ ยีนที่พบบนโครโมโซม 12 อาจเป็น allelic กันกับยีน *Pi-ta* (หรือ *Pi-4(t)*) ในข้าวพันธุ์ Tetep ซึ่งมีรายงานว่ามีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RG869 โดยมีระยะห่าง 15.4 ± 4.7 cM

2.6.2 Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้หลักการ short nucleotide sequence ประมาณ 10 เบสเป็นไพรเมอร์ (primer) เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ primer นั้นสามารถจับได้ โดยอาศัยหลักการ Polymerase chain reaction (PCR) ข้อดีของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ คือ ทำได้ง่าย และประหยัดต้นทุนในการดำเนินงาน ใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นในปริมาณน้อย แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้เป็นแบบ dominant marker จึงไม่สามารถตรวจสอบ heterozygous ได้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552)

2.6.3 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

เป็นเครื่องหมายที่รวมหลักการของ RFLP และ RAPD เข้าด้วยกัน โดยการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) จากนั้นนำ adapter ของเอนไซม์มาเชื่อมต่อกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ แล้วนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นโดยใช้หลักการ PCR ข้อดีของเครื่องหมายชนิดนี้ คือ พบ polymorphism สูงต่อการทำแต่ละครั้ง แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้เป็นแบบ dominant marker และที่สำคัญมีความยุ่งยากในการเก็บข้อมูล และจำนวนขั้นตอนการทำที่ซับซ้อน (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552)

2.6.4 Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ microsatellite

เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบจำเพาะ ตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละ 1 ตำแหน่ง (single-locus marker) ลำดับเบสซ้ำๆ ท่อนสั้นๆ หรือแบบ microsatellite พบได้มากมายและกระจายตัวอยู่ทั่วจีโนม โดยลำดับเบสของ microsatellite มักเป็นลำดับเบสจำเพาะ มีเพียงจุดเดียวในจีโนม (unique sequence) ดังนั้นถ้าสามารถหาลำดับเบสที่อยู่สองข้างของส่วน microsatellite นำมาออกแบบสังเคราะห์ primer สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR จะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่จำเพาะเพียงบริเวณเดียว และเนื่องจาก microsatellite เป็นส่วนที่มีการกลายพันธุ์โดยการลดลงหรือเพิ่มขึ้นของจำนวนชุดซ้ำได้ง่าย การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่รวมเอาส่วนของ microsatellite ไว้ภายใน จะทำให้มีโอกาสได้ขนาดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่ไม่เท่ากัน การตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย microsatellite จึงพบ polymorphism ค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังสามารถแสดงแถบดีเอ็นเอแบบ co-dominance ทำให้สามารถตรวจสอบ heterozygous ได้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552)

ศิริภา ก่ออินทร์ศักดิ์ และคณะ (2552) ค้นหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด microsatellite ค้นหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไอโซเลท BI-2 จากประชากรข้าว recombinant inbred lines (RILs) จำนวน 252 สายพันธุ์ ซึ่งได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 กับพันธุ์เจ้าหอมนิล จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโรคและรูปแบบอัลลีลของเครื่องหมาย microsatellite พบว่ายีนต้านทานโรคไหม้แบบจำเพาะในพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 8 ใกล้กับโมเลกุลเครื่องหมาย RM72 แม้ว่าบริเวณดังกล่าวเคยมีการพบยีนต้านทาน แต่ข้อมูลในปัจจุบันยังไม่สามารถยืนยันได้ว่า ยีนที่ค้นพบครั้งนี้เป็นยีนเดียวกันกับยีนที่รายงานไว้แล้วหรือไม่ การศึกษาจึงนับได้ว่าเป็นการค้นพบยีนใหม่ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในข้าวหอมมะลิของไทย

He *et al.* (2012) รายงานว่าข้าวพันธุ์ Yuejingsimiao 2 (YJ2) เป็นข้าวที่มีลักษณะดีหลายประการ คือ มีคุณภาพดี ให้ผลผลิตสูง และมีความต้านทานต่อ *M. grisea* พันธุ์ YJ2 แสดงความต้านทาน 100 เปอร์เซ็นต์ ในประชากรเชื้อราที่เก็บจากมณฑลทกวางตุง เสฉวน เหลียวหนิง และเฮยหลงเจียงในประเทศจีน ซึ่งเป็นความต้านทานที่สูงกว่าในพันธุ์ Sanhuangzhan 2 และ 28zhan ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานโรคไหม้ วิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2) และชั่วที่ 4 (F_4) พบว่าความต้านทานในพันธุ์ YJ2 ถูกควบคุมโดยยีนต้านทานหลายตัวทั้งที่เป็นแบบ dominant และ recessive วิเคราะห์ตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

microsatellite ที่ตั้งอยู่บนโครโมโซม 2, 6, 8, และ 12 ด้วยวิธี bulk segregant analysis ในประชากรข้าว F_4 พบมีการกระจายตัวแบบ recessive ในอัตราส่วน 1:3 (ต้านทาน:อ่อนแอ) พบยีนต้านทานแบบ recessive บนโครโมโซมที่ 8 อยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM3452 และ RM1345 โดยมีระยะห่าง 3.2 และ 2.7 cM ตามลำดับ พบว่าไม่เคยมีรายงานพบยีนต้านทานโรคไหม้ในช่วงตำแหน่งนี้ยีนที่พบจึงน่าจะเป็น ยีนใหม่โดยถูกกำหนดให้เป็นยีน *pi55(t)*

RoyChowdhury *et al.* (2012) ศึกษาและค้นหายีน *Pi-z* ในพันธุ์ข้าวจำนวน 111 เชื้อพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย simple sequence repeat (SSR) ได้แก่ RM527, AP4791, AP5659-1 และ AP5659-5 ที่มีความเชื่อมโยงกับยีน *Pi-z* และทดสอบการเกิดโรคโดยใช้เชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่ก่อโรคไม่รุนแรง (avirulent) 1 สายพันธุ์ คือ IB1k และก่อโรครุนแรง (virulent) 2 สายพันธุ์ คือ IB33 และ IB49 พบว่าในพันธุ์ข้าวจำนวน 111 เชื้อพันธุ์ข้าว มี 73 เชื้อพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-z*



บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และวัสดุการวิจัย

3.1.1 พันธุ์ข้าวทดสอบ

- 3.1.1.1 ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวคุณภาพดีแต่อ่อนแอต่อโรคไหม้
- 3.1.1.2 ข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769)
- 3.1.1.3 ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล ใช้เป็นพันธุ์ทดสอบเปรียบเทียบ

3.1.2 ธาตุอาหารพืช

- 3.1.2.1 ปุ๋ยสูตร 46-0-0 ($N-P_2O_5-K_2O$)
- 3.1.2.2 ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ($N-P_2O_5-K_2O$)

3.1.3 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา

- 3.1.3.1 Rice Flour Agar (RFA)
 - 3.1.3.1.1 Rice flour
 - 3.1.3.1.2 Yeast extract (Svichem, India)
 - 3.1.3.1.3 Agar powder (Biomark, India)
- 3.1.3.2 Yeast Extract Glucose (YEG)
- 3.1.3.3 Water Agar (WA)

3.1.4 สารปฏิชีวนะ

- 3.1.4.1 Amoxicillin (Zhongshan, China)

3.1.5 สารเคมี

- 3.1.5.1 acetic acid (VWR international S.A.S., France)
- 3.1.5.2 acrylamide solution 40 % (29:1:0.9) (Merck, Germany)
- 3.1.5.3 agarose gel (Vivantis, Malaysia)
- 3.1.5.4 ammonium persulphate (APS, Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.5.5 bromophenol blue (Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.5.6 boric acid (VWR international, UK)
- 3.1.5.7 β -mercaptoethanol (Merck, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.5.8 chloroform (VWR international S.A.S., France)
- 3.1.5.9 ethyl alcohol (Merck, Germany)
- 3.1.5.10 ethidium bromide (Vivantis, Malaysia)
- 3.1.5.11 ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA), EMD chemicals, Germany)
- 3.1.5.12 formaldehyde (Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.5.13 formamide (AppliChem, Germany)
- 3.1.5.14 gelatin (Gelita AG, Germany)
- 3.1.5.15 Gel Save (AppliChem, Germany)
- 3.1.5.16 Glass Bond (National diagnostics, USA)
- 3.1.5.17 isoamyl alcohol (Merck, Germany)
- 3.1.5.18 isopropanol (Merck, Germany)
- 3.1.5.19 KAPA Plant PCR Buffer (2X)-contain MgCl₂ and dNTPs
- 3.1.5.20 KAPA Plant DNA Polymerase (2.5 U/μL)
- 3.1.5.21 mineral oil (Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.5.22 phenol (Merck, Germany)
- 3.1.5.23 polyvinylpyrrolidone (PVP, Sigma-Aldrich, USA)
- 3.1.5.24 N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine (TEMED, EMD chemicals, Germany)
- 3.1.5.25 Tris (hydroxymethyl) aminomethane (EMD chemicals, Germany)
- 3.1.5.26 silver nitrate (Merck, Germany)
- 3.1.5.27 sodium acetate (Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.5.28 sodium chloride (Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.5.29 sodium dodecyl sulfate (SDS, EMD chemicals, Germany)
- 3.1.5.30 sodium hydroxide (Merck, Germany)
- 3.1.5.31 urea (Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.5.32 xylene cyanol (Asia Pacific Specialty chemicals, Australia)

3.1.6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

- 3.1.6.1 10 bp DNA Ladder (invitrogen, USA)
- 3.1.6.2 20 bp DNA Ladder (invitrogen, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.7 เครื่องหมายดีเอ็นเอ

3.1.7.1 เครื่องหมาย microsatellite ที่ครอบคลุมทั้ง 12 โครโมโซมของข้าว จำนวน ทั้งหมด 232 เครื่องหมาย (<http://www.gramene.org>)

3.1.7.2 เครื่องหมาย *Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) จำนวน 14 เครื่องหมาย ที่ครอบคลุมทั้ง 7 โครโมโซมของเชื้อสาเหตุโรดใหม่ (ตารางที่ 4.1)

3.1.8 อุปกรณ์

- 3.1.8.1 กล้อง stereo microscope
- 3.1.8.2 กระบะปลูก ขนาด กว้าง 7 หลุม ยาว 12 หลุม
- 3.1.8.3 กระจกปลูกขนาด 10 นิ้ว
- 3.1.8.4 เครื่องแก้วและบีกเกอร์ขนาดต่างๆ
- 3.1.8.5 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, BP221S, Germany)
- 3.1.8.6 เครื่องปั่นสารและให้ความร้อน (Wisestir, MSH-20A, Korea)
- 3.1.8.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Eppendorf, Model 5418, USA)
- 3.1.8.8 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Biometra, Germany)
- 3.1.8.9 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Eppendorf, Model 6132, Germany)
- 3.1.8.10 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Schott, cG 842, Germany)
- 3.1.8.11 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Consort, Germany)
- 3.1.8.12 ชุด Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Bio-Active, UK)
- 3.1.8.13 ชุดอุปกรณ์สำหรับเลี้ยงเชื้อ
- 3.1.8.14 ชุดอุปกรณ์สำหรับผสมพันธุ์ข้าว
- 3.1.8.15 ไมโครปิเปต (Gilson, France)
- 3.1.8.16 เม็ด bead
- 3.1.8.17 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Mettler, SV-1422, Germany)
- 3.1.8.18 อุปกรณ์สำหรับปลูกเชื้อ
- 3.1.8.19 PCR plate (Thermoscientific, UK)
- 3.1.8.20 Tip ขนาดต่างๆ
- 3.1.8.21 microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 3.1.8.22 Harris Uni-Core™ (Ted Pella, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้

3.2.1.1 การรวบรวมและการแยกเชื้อสาเหตุโรคไหม้

เก็บรวบรวมเชื้อราจากพื้นที่ปลูกข้าวที่พบว่ามีภาวะระบาดของโรคไหม้ จากบริเวณภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก ภาคกลาง และภาคใต้ของประเทศไทย ทำการแยกเชื้อราให้ได้สปอร์เดี่ยว และเก็บเชื้อราในรูปแบบเส้นใยแห้งบนกระดาษกรองตามวิธีของ Sirithunya *et al.* (2008) การดำเนินงานทุกขั้นตอนจะต้องปลอดเชื้อ (aseptic technique) เริ่มจากการทำ moist chamber โดยตัดกระดาษทิชชูแล้ววางลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เทน้ำกลั่นลงบนกระดาษทิชชูปริมาณ 5 มิลลิลิตร วางแผ่นสไลด์ 1 แผ่นบนกระดาษทิชชู นำชิ้นส่วนตัวอย่างวางบนสไลด์ที่เตรียมไว้แล้วปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อสร้าง conidia ตรวจสอบ conidia ด้วยกล้อง stereo microscope ใช้แท่งแก้วปลายแหลมเกี่ยวที่ conidia นำมาวางบนอาหาร Water agar (WA) แยกแต่ละ conidia ให้อยู่ห่างกัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาส่องด้วยกล้อง stereo microscope เพื่อตรวจหา conidia ที่งอกแล้ว จากนั้นใช้เข็มเย็บเย็บตัดตรงส่วนปลายของเส้นใยที่งอกจาก conidia ย้ายลงอาหาร Rice Flour Agar (RFA) เก็บ stock เชื้อรา โดยนำกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร วางลงบนอาหาร RFA จากนั้นวางชิ้นส่วนของเชื้อสาเหตุโรคไหม้บนกระดาษกรอง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน นำกระดาษกรองออกจากอาหาร ทำให้แห้งในโหลสุญญากาศ เมื่อแห้งแล้วตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร นำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.1.2 การเตรียมดีเอ็นเอเชื้อรา

สกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 19 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.1) โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร RFA นาน 4 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตรเจาะที่ปลายเส้นใย นำชิ้นส่วนเชื้อราที่เจาะย้ายลงในอาหารเหลว Yeast Extract Glucose (YEG) เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน กรองเอาแต่เส้นใยเชื้อราด้วยกระดาษกรองเพื่อสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Matsumoto *et al.* (1999) บดเส้นใยเชื้อราด้วยไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแข็ง นำผงแข็งปริมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม lysis buffer ปริมาณ 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน (vortex) จากนั้นนำหลอดบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนปริมาณ 600 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microtube ใหม่ เติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาณ 600 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดูดส่วนใสด้านบนปริมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดใหม่ เติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดูดส่วนใสด้านบนปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

300 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microtube ใหม่ เติม 3 M sodium acetate ปริมาณ 30 ไมโครลิตร และ absolute ethyl alcohol ปริมาณ 600 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบาๆ บ่มทิ้งไว้ข้ามคืน ที่ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งให้เหลือตะกอนดีเอ็นเอที่ก้นหลอดด้านล่าง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 400 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งให้เหลือตะกอนดีเอ็นเอ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 1X TE buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.1 เชื้อสาเหตุโรคใหม่ 19 ไอโซเลทที่ใช้ในการทดสอบความต้านทานโรคและแหล่งที่มา

จังหวัด	ไอโซเลท
กรุงเทพฯ	BKK55003, BKK55004
ฉะเชิงเทรา	CCO55002
ราชบุรี	RBR55001, RBR55004
ชัยภูมิ	CPM55002, CPM55003
ขอนแก่น	KKN61119, KKN7357
หนองคาย	NYK13502
อุบลราชธานี	UBN11351, UBN195167
สุรินทร์	SRN54002
พิษณุโลก	THL191, THL84, PLK 1.1, PLK 40.4
เชียงราย	CRI 43.1
พัทลุง	PL3

3.2.1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

โดยใช้ชุด KAPA3G Plant PCR Kits (Kapa Biosystems, USA) ซึ่งเป็นชุด Kit ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอก่อน ใช้ primer ของเครื่องหมาย MGM จำนวน 14 เครื่องหมาย (ตารางที่ 4.1) ในปฏิกิริยา PCR เตรียมส่วนประกอบ (master mix) ปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH₂O 3.32 ไมโครลิตร, KAPA Plant PCR Buffer (2X) ที่มี MgCl₂ และ dNTPs 5 ไมโครลิตร, ส่วนผสมระหว่าง Forward Primer (5 μM) และ Reverse Primer (5 μM) 0.6 ไมโครลิตร, KAPA Plant DNA Polymerase (2.5 U/μL) 0.08 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอของเชื้อราความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรปริมาณ 1 ไมโครลิตร (ตารางที่ 3.1) โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 40 รอบ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที จำนวน 1 รอบ เมื่อครบจำนวนรอบนำไปตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

3.2.1.4 การวิเคราะห์ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR

วิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบผลด้วยการย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate (AgNO_3) ตามวิธีการของ Benbouza *et al.* (2006) โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.2.1.4.1 การเตรียม chamber และกระจก

ทำความสะอาด chamber ด้วย ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้ง เช็ดกับ chamber ด้วย Gel Save เพื่อป้องกัน acrylamide gel เกาะติดกับ chamber โดยใช้กระดาษ kimwipes เช็ดท้ายเช็ด ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง ด้วยกระดาษ kimwipes แผ่นเดิม เพื่อเกลี่ยสารให้ทั่ว chamber สำหรับกระจกเช็ดด้วย ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้ง เช็ดด้วย Glass Bond ปริมาณ 1,000 ไมโครลิตร โดยใช้กระดาษ kimwipes และเช็ด ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง โดยใช้กระดาษ kimwipes แผ่นเดิม เพื่อเกลี่ยสารให้ทั่วกระจก นำ chamber และกระจกมาประกอบเข้าชุดโดยวางกระจกทับลงบน chamber ที่มี spacer วางไว้ตรงขอบทั้งสองข้างของ chamber เพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่าง chamber กับกระจก ใช้ clamp หนีบกระจกเข้ากับ chamber

3.2.1.4.2 การเตรียม acrylamide gel

เตรียม acrylamide gel โดยมีส่วนประกอบคือ acrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ที่ประกอบด้วย 40 % acrylamide solution ปริมาณ 7.5 มิลลิลิตร ยูเรีย 21.03 กรัม และ 10X TBE 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เติมน้ำ 10% APS (ammonium persulphate) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร และ TEMED (N,N,N',N' -tetramethylethylenediamine) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบาๆ เท acrylamide gel ลงในช่องว่างระหว่างกระจกกับ chamber จนเต็ม เสิบหวีด้านที่ไม่มีซี่แหลมลงไปด้านบนให้ลึก 0.5 เซนติเมตร ตั้งทิ้งไว้รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง

3.2.1.4.3 Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

ประกอบชุด PAGE (Bio-Active, UK) และต่อเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (electrophoresis power supply) ใช้ 1X TBE buffer ปริมาณ 1,500 มิลลิลิตร เป็นตัวกลาง ดึงหรือออก ใช้ปิเปตใส่ฟองอากาศบริเวณขอบเจลออก ทำการ pre-run โดยใช้กำลังไฟที่ 70 วัตต์ นาน 30 นาที ระหว่างนี้เตรียมตัวอย่าง โดยเติม sequencing dye ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงในผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหมุนเหวี่ยงให้รวมอยู่กันตลอด เสิบหวีให้ด้านบนแหลมปักลงบนผิวหน้าของเจล หยอดตัวอย่าง ปริมาณ 2 ไมโครลิตรต่อช่อง ปล่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระแสไฟฟ้า (run gel) โดยใช้กำลังไฟที่ 45 วัตต์ นาน 5 นาที ดึงหัวออก run gel ต่อ นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที

3.2.1.4.4 การย้อมสีแถบดีเอ็นเอ

ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate ตามวิธีการของ Benbouza *et al.* (2006) โดยมีขั้นตอนดังนี้ 1) fixation ด้วยสารละลายปริมาณ 2 ลิตร ที่ประกอบด้วย absolute alcohol 10 เปอร์เซ็นต์ และ acetic acid 0.5 เปอร์เซ็นต์ แช่นาน 5 นาที 2) impregnation ด้วยสารละลายปริมาณ 2 ลิตร ที่ประกอบด้วย silver nitrate (AgNO_3) ปริมาณ 3 กรัม และ formaldehyde 37 เปอร์เซ็นต์ แช่นาน 7 นาที 3) ล้างโดยการนำเจลที่ติดกับกระจกจมลงในน้ำกลั่นแล้วยกขึ้นทันที 4) development ด้วยสารละลายปริมาณ 2 ลิตร ที่ประกอบด้วย sodium hydroxide (NaOH) ปริมาณ 30 กรัม และ formaldehyde 37 เปอร์เซ็นต์ แช่นาน 3-5 นาที หรือ จนแถบดีเอ็นเอปรากฏ 5) หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายปริมาณ 2 ลิตร ที่ประกอบด้วย absolute alcohol 10 เปอร์เซ็นต์ และ acetic acid 0.5 เปอร์เซ็นต์ แช่นาน 2 นาที

3.2.1.5 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อรา

วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.10 โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความต่าง (dissimilarity) ของ Canberra และจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยวิธี SAHN เพื่อสร้างเป็นแผนภาพแสดงความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคใหม่ วิเคราะห์หาค่า polymorphic information content (PIC) เพื่อประเมินคุณสมบัติของเครื่องหมาย microsatellite โดยใช้สูตร (Zheng *et al.*, 2008)

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n p_{ij}^2$$

โดย n คือ จำนวนอัลลีลของเครื่องหมาย i และ P_{ij} คือ ความถี่ของอัลลีล j สำหรับเครื่องหมาย i

3.2.2 การวิเคราะห์การกระจายตัวของยีน และการสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว

3.2.2.1 การสร้างประชากรข้าว

3.2.2.1.1 การสร้างประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 - hybrid)

ผสมระหว่างพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ใช้เป็นพันธุ์แม่ (female parent) และข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) ใช้เป็นพันธุ์พ่อ (male parent) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว (Salih *et al.*, 2013) จากงานวิจัยในโครงการค้นหา ยีนต้านทานโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *P. grisea* จากแหล่งพันธุกรรมข้าวพื้นเมืองของประเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการเชิงพาณิชย์เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไทย เริ่มจากในช่วงเวลาเย็นก่อนผสมพันธุ์ 1 วันเตรียมช่อดอกฝ้ายแม่ (KDML105) โดยการทำให้มันเพศผู้ (emasculatation) โดยเลือกช่อดอกในระยะโผล่ช่อดอก (heading) ใช้กรรไกรตัดดอกที่ผสมตัวเองไปแล้วบริเวณปลายช่อดอกและดอกอ่อนเกินไปบริเวณโคนช่อดอกทิ้ง เหลือไว้เฉพาะดอกที่จะพร้อมผสมในวันถัดไปประมาณ 20 ดอกต่อช่อ สังเกตได้จากอับละอองเกสรอยู่ในตำแหน่งประมาณครึ่งของความยาวกาบหุ้มดอก จากนั้นใช้กรรไกรตัดปลายกาบหุ้มดอกประมาณ 1 ใน 3 เฉียงทำมุมประมาณ 45 องศาใช้ปลายเข็มหมุดเขี่ยอับเกสรเพศผู้ (anther) ออกจากกาบหุ้มดอก ด้วยความระมัดระวัง ฟันดอกเพศเมียด้วยน้ำเปล่าเพื่อให้ความชุ่มชื้นแก่ดอก คลุมด้วยขวดพลาสติกเจาะรู ช่วงเช้าของวันถัดไปตรวจสอบดอกฝ้ายแม่ที่เตรียมไว้อีกครั้งว่าไม่มีอับเกสรเพศผู้หลงเหลืออยู่นำเกสรเพศผู้จากดอกข้าวพันธุ์พ่อ (GS19769) มาถ่ายลงบนยอดเกสรเพศเมีย (stigma) โดยอาจนำทั้งช่อดอกมาเคาะไถ่ๆ ยอดเกสรเพศเมียเพื่อให้ละอองเกสร (pollen grain) ตกลงบนยอดเกสรเพศเมีย หรือคีบอับละอองเกสร (anther) ใส่ไว้ในกาบดอกเพศเมียที่เตรียมไว้ ผูกป้ายชื่อไว้กับช่อดอกระบุชื่อพันธุ์พ่อและแม่พร้อมระบุวันที่ทำการผสมพันธุ์ (fertilization) ปล่อยให้มีการผสมพันธุ์ และเก็บเกี่ยวเมล็ดหลังจากวันที่ผสมพันธุ์แล้ว 30 วัน ระยะพักตัวของข้าวประมาณ 8 สัปดาห์

3.2.2.1.2 การสร้างประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2)

เพาะเมล็ดข้าวลูกผสม F_1 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์แม่และข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) ซึ่งเป็นพันธุ์พ่อ ในกระดวยที่ขุ่นน้ำเมื่อข้าวเริ่มงอก ย้ายลงเพาะในถาดหลุมเพื่อให้ต้นกล้าแข็งแรง เมื่อข้าวอายุ 2 สัปดาห์ (มีใบประมาณ 3-4 ใบ) ย้ายลงกระถางขนาด 10 นิ้ว โดยใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ($N-P_2O_5-K_2O$) รองก้นหลุม และใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 ($N-P_2O_5-K_2O$) ผสม 15-15-15 ($N-P_2O_5-K_2O$) เมื่อข้าวอายุ 1, 2 และ 3 เดือน ในปริมาณที่พอเหมาะ เร่งให้ข้าวออกดอกโดยนำข้าวอายุประมาณ 2.5-3 เดือนเข้าห้องมืดเพื่อควบคุมช่วงแสง ในช่วงเวลา 17.00 - 8.00 นาฬิกา จนข้าวเริ่มตั้งท้อง ปล่อยให้มีการผสมตัวเองตามธรรมชาติ (selfed) บันทึกลักษณะประจำพันธุ์ในแต่ละช่วงอายุของข้าว ทั้งในข้าวลูกผสม F_1 และข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อและแม่ เก็บเมล็ดพันธุ์ (F_2 - seeds) ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เพื่อทำลายระยะพักตัวของเมล็ด ปลูกประชากรข้าว F_2 เพาะเมล็ดพันธุ์ข้าว F_2 (F_2 - seeds) จำนวน 250 เมล็ดในกระดวยที่ขุ่นน้ำ เมื่อข้าวเริ่มงอก ย้ายลงเพาะในกระบะปลูกขนาด กว้าง 7 หลุม ยาว 12 หลุม ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 ($N-P_2O_5-K_2O$) 1 ครั้ง ประมาณ 125 กรัม ต่อกระบะ ใส่ปุ๋ยที่ 7 และ 14 วัน หลังปลูกลงกระบะแล้ว

3.2.2.2 การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะด้านทานโรคไหม้โดยวิธีทดสอบการเกิดโรคในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2)

3.2.2.2.1 การเตรียมสารแขวนลอย conidia ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร RFA เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปล่อยให้เชื้อราเจริญเป็นเวลา 10 วัน นำเชื้อรามาระตุ้นให้เกิดการสร้าง conidia โดยการจุดที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณเส้นใยบนผิวหน้าอาหารให้ขาดด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล บ่มที่อุณหภูมิห้อง เปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ ปล่อยให้เชื้อราสร้าง conidia เป็นเวลา 2 วัน จะได้ conidia เป็นจำนวนมาก เตรียมสารแขวนลอย conidia ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้น conidia ให้ได้ 5×10^5 conidia ต่อมิลลิลิตร เติมน้ำเจลาติน 0.5 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเจลาตินมีความหนืดสูงเมื่อพ่นหมอกสารแขวนลอย conidia ที่ผสมเจลาตินลงบนใบข้าว เจลาตินจะจับตัวเป็นฟิล์มปกคลุมแผ่นใบข้าว ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยึดเกาะของ conidia เชื้อรา

3.2.2.2.2 การปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้บนกล้าข้าว

ปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้ตามวิธีของ Roumen *et al.* (1997) ด้วยสารแขวนลอย conidia ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 19 ไอโซเลท ที่ความเข้มข้น 5×10^5 conidia ต่อมิลลิลิตร เตรียมปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อกระบะปลูก พ่นหมอกบนใบข้าวที่มีอายุ 2 สัปดาห์ หลังจากปลูกเชื้อแล้วนำต้นกล้าข้าวไปบ่มในห้องที่มีอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส และมีความชื้นสูงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นย้ายไปเก็บในโรงเรือนที่มีความชื้นสูง ฉีดพ่นด้วยน้ำเปล่าในช่วงเวลากลางวันในทุกๆ 4 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มความชื้น การทดลองนี้จะทำการปลูกเชื้อ 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 2 ปลูกเชื้อในวันที่ 3 หลังจากปลูกเชื้อครั้งแรก

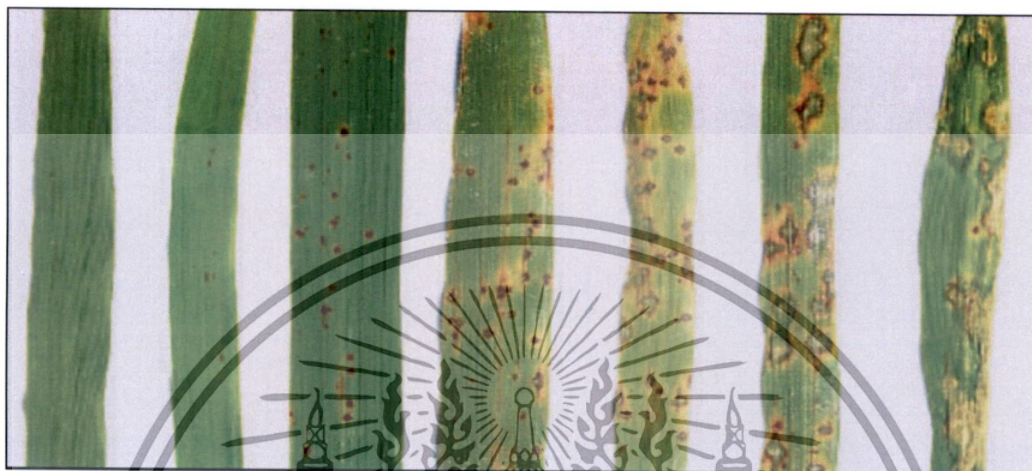
3.2.2.2.3 วิธีประเมินการเกิดโรคในประชากรข้าวข้าวที่ 2 (F_2)

ตรวจสอบความต้านทานโรคของข้าวหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 7 วัน บันทึกผลตามเกณฑ์ให้คะแนนการเกิดโรคตามระดับคะแนนของ Roumen *et al.* (1997) โดยมีระดับคะแนนดังนี้

- ระดับ 0 ไม่มีแผลปรากฏ
- ระดับ 1 แผลจุดกลมสีน้ำตาลเล็กๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร ไม่มีจุดเทาตรงกลางแผล
- ระดับ 2 แผลกลม หรือ รียาวเล็กน้อย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร ไม่มีจุดเทาตรงกลางแผล
- ระดับ 3 แผลจุดเล็กๆ ขนาดประมาณ 1-3 มิลลิเมตร และมีจุดเทาตรงกลางแผล
- ระดับ 4 แผลจุดเล็กๆ ขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตรหรือยาวกว่า แผลเป็นสีเทาและมีขอบสีน้ำตาล
- ระดับ 5 แผลสีเทาเกาะกันเป็นกลุ่ม มีขอบแผลสีน้ำตาล เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค
- ระดับ 6 แผลลุกลามติดต่อกันมีสีเทาไม่มีขอบแผลที่แน่นอน เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบ่งความต้านทานออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ระดับ 0, 1 และ 2 เป็นกลุ่มที่แสดงความต้านทานโรคไหม้ในระดับสูง ในระดับ 3 และ 4 เป็นกลุ่มที่แสดงความต้านทานโรคไหม้ในระดับปานกลาง และในระดับ 5 และ 6 เป็นกลุ่มที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ (Sallaud *et al.*, 2003) (ภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 เกณฑ์ให้คะแนนการเกิดโรคตามระดับคะแนนของ Roumen *et al.* (1997)

3.2.2.2.4 การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าว วิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าว F_2 จากข้อมูลที่ได้ ซึ่งเป็นข้อมูล phenotype ด้วยวิธีการทดสอบ Chi square โดยวิเคราะห์การกระจายตัวของประชากรว่าเป็นไปตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2007 (ฟังก์ชัน CHISQ.TEST)

3.2.2.3 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2)

3.2.2.3.1 การคัดเลือกเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้

คัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพ่อและแม่ได้ จากจำนวนเครื่องหมาย microsatellite ทั้งหมด 230 เครื่องหมายที่ครอบคลุมทั้ง 12 โครโมโซมข้าว

3.2.2.3.1.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

โดยใช้ชุด KAPA3G Plant PCR Kits (Kapa Biosystems, USA) เครื่องหมาย microsatellite ทั้งหมด 230 เครื่องหมายใช้เป็น primer ในปฏิกิริยาเอกลูกซึ่งเมื่อเสร็จของปฏิกิริยาแล้วจะนำเอาผลิตภัณฑ์ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการตรวจหาไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PCR นำใบข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์แม่ และใบข้าวพันธุ์ห้วย (GS19769) ซึ่งเป็นพันธุ์พ่อ มาเจาะด้วย Harris UNI-CORE™ ได้เนื้อเยื่อรูปร่างกลมเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 มิลลิเมตร ใช้น้ำเนื้อเยื่อจำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงใน PCR plate เตรียมส่วนผสม (master mix) ปฏิกริยา PCR ในปริมาตร 10 ไมโครลิตรประกอบด้วย dH₂O 4.32 ไมโครลิตร, KAPA Plant PCR Buffer (2X) ที่มี MgCl₂ และ dNTPs 5 ไมโครลิตร, ส่วนผสมระหว่าง Forward Primer (5 µM) และ Reverse Primer (5 µM) 0.6 ไมโครลิตร และ KAPA Plant DNA Polymerase (2.5 U/µL) 0.08 ไมโครลิตร โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 40 รอบ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 1 รอบ เมื่อครบจำนวนรอบนำไปตรวจสอบผลด้วยเทคนิค PAGE

3.2.2.3.1.2 การวิเคราะห์ผลจากการทำปฏิกริยา PCR

วิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบผลโดยการย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate ตามวิธีการของ Benbouza *et al.* (2006) ตามวิธีการข้อ 3.2.1.4

3.2.2.3.2 การคัดเลือกเครื่องหมาย **microsatellite** ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้

นำเครื่องหมาย **microsatellite** ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ได้มาคัดเลือกด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) เพื่อค้นหาเครื่องหมาย **microsatellite** สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ โดยใช้ดีเอ็นเอรวมของประชากร 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือดีเอ็นเอของพันธุ์แม่ กลุ่มที่ 2 ดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อ กลุ่มที่ 3 ดีเอ็นเอของประชากร F₂T₁ ที่แสดงความต้านทาน (resistant) ระดับ 0 กลุ่มที่ 4 ดีเอ็นเอของประชากร F₂T₁ ที่แสดงความอ่อนแอ (susceptible) ระดับ 5 และ 6 กลุ่มที่ 5 ดีเอ็นเอของประชากร F₂T₂ ที่แสดงความต้านทาน (resistant) ระดับ 0 และกลุ่มที่ 6 ดีเอ็นเอของประชากร F₂T₂ ที่แสดงความอ่อนแอ (susceptible) ระดับ 5 และ 6

3.2.2.3.2.1 การเตรียมดีเอ็นเอข้าว

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB method ตามขั้นตอนดังนี้ ตัดตัวอย่างใบข้าวใส่ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณครึ่งหลอด เติม CTAB extraction buffer หลอดละ 700 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นด้วยเม็ด bead (2 เม็ด) นาน 2 นาที นำหลอดบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติม chloroform : isoamyl (24:1) 700 ไมโครลิตร แล้วพลิกหลอดไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนปริมาณ 400 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microtube ใหม่ เติม isopropanol (แช่ -

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20 องศาเซลเซียส ก่อนใช้งาน) ปริมาณ 400 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบาๆ บั่นเหยียงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งให้เหลือตะกอนดีเอ็นเอที่ก้นหลอดด้านล่าง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 400 ไมโครลิตร บั่นเหยียงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งให้เหลือตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอซ้ำอีก 2 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 1X TE buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร วิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เตรียมดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำไปเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา PCR

3.2.2.3.2.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

โดยใช้ชุด KAPA3G Plant PCR Kits (Kapa Biosystems, USA) ใช้ primer ของเครื่องหมาย microsatellite ในปฏิกิริยา PCR เตรียมส่วนประกอบ (master mix) ปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 10 ไมโครลิตรประกอบด้วย dH₂O 3.32 ไมโครลิตร, KAPA Plant PCR Buffer (2X) ที่มี MgCl₂ และ dNTPs 5 ไมโครลิตร, ส่วนผสมระหว่าง Forward Primer (5 μM) และ Reverse Primer (5 μM) 0.6 ไมโครลิตร, KAPA Plant DNA Polymerase (2.5 U/μL) 0.08 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอของเชื้อราความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 40 รอบ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 1 รอบ เมื่อครบจำนวนรอบนำไปตรวจสอบผลด้วยเทคนิค PAGE

3.2.2.3.2.3 การวิเคราะห์ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR

วิเคราะห์ผลด้วยวิธีเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบผลด้วยการย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate ตามวิธีการของ Benbouza *et al.* (2006) ตามวิธีการข้อ 3.2.1.4 ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR กำหนดเครื่องหมายดังนี้

A คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (parent 1, P1)

B คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (parent 2, P2)

H คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่

3.2.2.3.3 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ที่

สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอในประชากรข้าวช้าวที่ 2 (F₂)

ใช้เครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็น primer ในปฏิกิริยา PCR เพื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าว F_2 ทั้งหมด 250 ต้น

3.2.2.3.3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ใช้ชุด KAPA3G Plant PCR Kits (Kapa Biosystems, USA) นำใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์แม่ และใบข้าวพันธุ์ห้วย (GS19769) ซึ่งเป็นพันธุ์พ่อ และประชากรข้าว F_2 ทั้งหมด 250 ต้น มาเจาะด้วย Harris UNICORE™ ๒ ได้เนื้อเยื่อรูปร่างกลมเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 มิลลิเมตร ใช้เนื้อเยื่อจำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงใน PCR plate เตรียมส่วนประกอบ (master mix) ปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH_2O 4.32 ไมโครลิตร, KAPA Plant PCR Buffer (2X) ที่มี $MgCl_2$ และ dNTPs 5 ไมโครลิตร, ส่วนผสมของ Forward Primer (5 μM) และ Reverse Primer (5 μM) 0.6 ไมโครลิตร และ KAPA Plant DNA Polymerase (2.5 U/ μL) 0.08 ไมโครลิตร โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 40 รอบ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 1 รอบ เมื่อครบจำนวนรอบนำไปตรวจสอบผลด้วยเทคนิค PAGE

3.2.2.3.3.2 การวิเคราะห์ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR

วิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบผลโดยการย้อมสีแลบอดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate ตามวิธีการของ Benbouza *et al.* (2006) ตามวิธีการข้อ 3.2.1.4 ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR กำหนดเครื่องหมายดังนี้

A คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (parent 1, P1)

B คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (parent 2, P2)

H คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่

3.2.2.3.3.3 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายใน

ประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2) ทั้งหมด 250 ต้น

วิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายจากข้อมูลที่ได้ ซึ่งเป็นข้อมูลทาง genotype ด้วยการทดสอบ Chi square โดยวิเคราะห์การกระจายตัวในประชากรข้าว F_2 ทั้งหมด 250 ต้น ของแต่ละเครื่องหมายว่าเป็นตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2007 (ฟังก์ชัน CHISQ.TEST)

3.2.2.4 สร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนด้านทานโรคใหม่ จากเปอร์เซ็นต์รีคอมบิเนชัน (recombination)

สร้างแผนที่ยีนด้านทานโรคใหม่ โดยการคำนวณหาค่าความถี่ของการเกิด recombination หรือความถี่ของการเกิดครอสซิงโอเวอร์ (crossing over) ซึ่งโอกาสเกิด recombination มีความสัมพันธ์โดยตรงกับระยะทางระหว่างยีนในโครโมโซมเดียวกัน ค่าความถี่ของการเกิด recombination 1 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1 centiMorgans (cM) ซึ่งเป็นหน่วยของระยะห่างระหว่างยีนบนแผนที่ยีน (mapping function) ในการทดลองนี้ใช้ข้อมูล phenotype และ genotype ของประชากรเพียง 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคใหม่อย่างชัดเจนพบการเกิดโรคที่ระดับ 5 และ 6 เนื่องจากเป็นประชากรที่มี phenotype ถูกต้องแน่นอน จึงเป็นประชากรที่เหมาะสมสำหรับนำมาวิเคราะห์เพื่อระบุตำแหน่งที่ตั้งของยีนด้านทานโรคใหม่ในการศึกษานี้ นำข้อมูล phenotype และ genotype ของแต่ละเครื่องหมายจากการทดสอบการเกิดโรคมารวมกัน คำนวณหาค่าความถี่ของการเกิด recombination ของยีนด้านทานโรคใหม่ และค่าความถี่การเกิด recombination ของแต่ละคู่ของเครื่องหมายเพื่อวาดแผนที่ระบุตำแหน่งยีนด้านทานโรคใหม่ โดยใช้สูตรดังนี้ (Morgan, 2008)

$$\text{recombination frequency} = \frac{\text{number of recombinant progeny}}{\text{total number of progeny}} \times 100 \%$$

3.2.2.5 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite เพื่อยืนยันจำนวนและระบุตำแหน่งของยีนด้านทานโรคใหม่

จากเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้ นำมาคัดเลือกหาเครื่องหมายที่มีตำแหน่งตั้งอยู่บนโครโมโซมเดียวกันกับเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ โดยทำการคัดเลือกเครื่องหมาย microsatellite อื่น ที่มีตำแหน่งตั้งอยู่ใกล้และไกลกับเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ นำเครื่องหมายที่คัดเลือกมาวิเคราะห์เพื่อช่วยยืนยันความแม่นยำในการจัดกลุ่มของเครื่องหมายดีเอ็นเอ และระบุตำแหน่งที่แน่นอนของยีนด้านทานโรคใหม่บนโครโมโซมข้าว วิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าว F₂ จำนวน 15 ต้นที่แสดงลักษณะอ่อนแอต่อโรคใหม่อย่างชัดเจน เป็นประชากรที่มี phenotype ที่ถูกต้องแน่นอน วิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite โดยดำเนินการตามข้อ 3.2.2.3.1 ถึงข้อ 3.2.2.4

3.2.2.6 การสร้างแผนที่เพื่อระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม

MAPMAKER

สร้างแผนที่พันธุกรรมระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ และ เครื่องหมาย microsatellite ด้วยโปรแกรม MAPMAKER/EXP version 3.0b (Lincoln *et al.*, 1993) ตามหลักการดังนี้

3.2.2.6.1 จัดกลุ่มความเชื่อมโยงของแต่ละเครื่องหมายและยีนต้านทานโรคไหม้ โดยกำหนดระดับมาตรฐานให้สอดคล้องกับระดับความน่าเชื่อถือและลักษณะของข้อมูลที่คำนวณ ค่ามาตรฐานของโปรแกรมจะอยู่ที่ $\logarithm\ of\ odds\ (LOD) = 3.0$

3.2.2.6.2 จัดลำดับการวางตัวของแต่ละเครื่องหมาย และตำแหน่งของยีนในแต่ละกลุ่มที่ถูกแบ่งจากข้อ 3.2.2.6.1 โดยเลือกลำดับการวางตัวของเครื่องหมายที่มีค่า likelihood สูงที่สุด คือ มีค่า $likelihood = 0.00$

3.2.2.6.3 คำนวณหาระยะห่างของแต่ละเครื่องหมายและยีนต้านทานโรคไหม้ โดยเลือก Kosambi function ระยะห่างที่ได้มีหน่วยเป็น centiMorgans (cM)

3.2.2.6.4 ตรวจสอบความถูกต้องของผลที่คำนวณได้ วาดแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapChart version 2.2 (Voorrips, 2002) โดยนำข้อมูลระยะห่างของแต่ละเครื่องหมายจากโปรแกรม MAPMAKER มาคำนวณระยะห่างเป็นแบบผลบวกสะสม (accumulative distance) ในโปรแกรม Microsoft Excel หลีกจากนั้นคัดลอกข้อมูลที่เตรียมไว้ เข้าโปรแกรม MapChart เลือก file ตามด้วย new วางข้อมูล และเลือก chart โปรแกรมจะสร้างแผนที่พันธุกรรมให้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้

วิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ จำนวน 19 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.1) ซึ่งเก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าวที่พบว่ามีการระบาดของโรคไหม้ในประเทศไทย โดยสุ่มเลือกเครื่องหมาย *Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) จำนวน 14 เครื่องหมาย ที่ครอบคลุมทั้ง 7 โครโมโซมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ โดยแบ่งเป็นโครโมโซมละ 2 เครื่องหมายใช้เป็น primer ในปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบผลจากปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate จากเครื่องหมาย MGM ที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 14 เครื่องหมาย พบ 13 เครื่องหมายสามารถแยกความแตกต่างของพันธุกรรมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้ ในขณะที่เครื่องหมาย MGM57 ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 2 ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้โดยแสดงแถบดีเอ็นเอที่เท่ากันขนาด 210 คู่เบส ทั้ง 19 ไอโซเลทของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ (ภาพที่ 4.1) เครื่องหมาย MGM จำนวน 13 เครื่องหมาย มีค่า polymorphic information content (PIC) อยู่ระหว่าง 0.1 ถึง 0.8 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.38 แสดงถึงความมีศักยภาพของเครื่องหมาย MGM ในการใช้เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของพันธุกรรมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ (ตารางที่ 4.1)

วิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.10 โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความต่าง (dissimilarity) ของ Canberra และจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยวิธี SAHN เพื่อสร้างเป็นแผนภาพแสดงความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ จากค่าสัมประสิทธิ์ความต่างที่ 90 เปอร์เซ็นต์ สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้จาก 19 ไอโซเลทได้จำนวน 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่ม 1 คิดเป็น 73 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่ศึกษา ประกอบด้วยเชื้อรา 14 ไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อราที่ระบาดบริเวณภาคเหนือ ได้แก่ PLK1.1, PLK40.0, THL84, THL191 และ CRI34.1 เชื้อราที่ระบาดบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ CPM55003, KKN61119, KKN7357 และ SRN54002 และเชื้อราที่ระบาดบริเวณภาคกลาง ได้แก่ BKK55003, BKK55004, CC055002, RBR55002 และ RBR55004 กลุ่ม 2 คิดเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อราที่ศึกษา ประกอบด้วยเชื้อรา 3 ไอโซเลท เป็นเชื้อราที่ระบาดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ NKI13502 และ UBN11351 และเชื้อราที่ระบาดบริเวณภาคใต้ ได้แก่ PL3 นอกจากนี้พบเชื้อราที่ระบาดบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือถูกจัดกลุ่มแยกออกเป็นเชื้อเดี่ยว ในกลุ่ม 3 และ 4 ได้แก่ UBN195167 และ CPM55002 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.2)

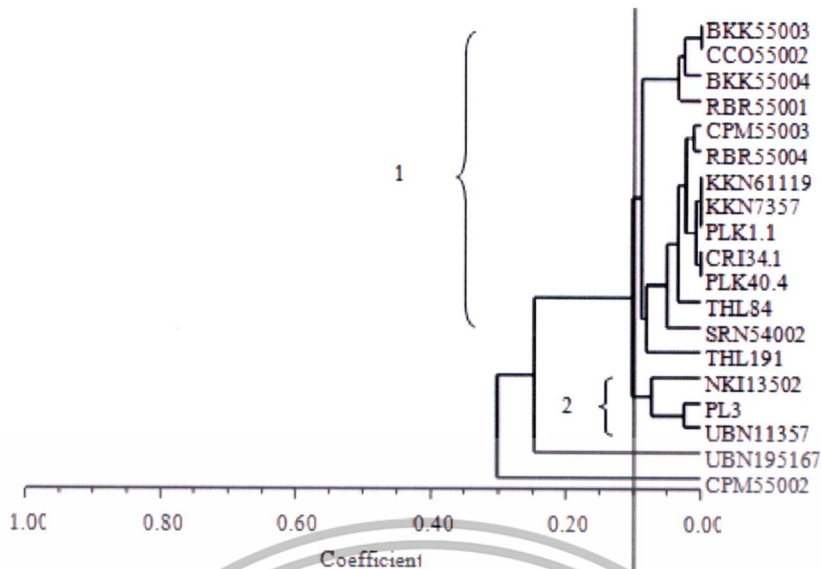
ตารางที่ 4.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ของเครื่องหมายโมเลกุล MGM และค่า polymorphic information content (PIC)

Chr.	เครื่องหมาย	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' - 3')		PIC
		Forward	Reverse	
1	MGM446	TTGGGATCTTCGGTAAGACG	GCCGACAAGACACTGAATGA	0.101
1	MGM35	GTTGAATTACCTTTCGGACTGG	AAGGACTTTGCTCAGACCGTAG	0.803
2	MGM185	AATGCTTCGAGGTCCAGT	GCTTATCGACGGCGTATTG	0.189
2	MGM57	GATACGGATGCGGTAGAGGA	GCCTATTCTGAGCTTCGTG	0.000
3	MGM436	GACCTTTATCGGATGCGTGT	CACACAGTGGCCATCTAACG	0.196
3	MGM209	TCACCTCAACTGCAGTCAT	GTTGCCGCTGTTGTTGAATA	0.285
4	MGM246	CCGGATGTCACCTACCACT	CCTTGTTTTCCCCCTGTGTA	0.484
4	MGM87	GTCCACCGCTTAAACACTGC	CTCCACTCGCTATGCACGTA	0.285
5	MGM119	GGGTCCGTCAGTGAACATA	ACGGCTTGAACCCAATACAG	0.706
5	MGM177	TGACTCGACCTGACATCTGC	TTCTGGGACTGTTTCATGG	0.196
6	MGM400	GGCATTACCCAAGAAGCAAA	CTCGTTGCAGATGGTGATGA	0.101
6	MGM269	GATGGCCAGGTCAGCTTTT	ACTCTTTGCAGCCATGGAAC	0.640
7	MGM282	TTGGCTGGCAAGACAGTTAAT	GGGCTTTGTCTATTCCAGCA	0.562
7	MGM286	CGGCTGTGGTTTAACGATTT	CCATCAGGATCCATGAACAC	0.488



ภาพที่ 4.1 รูปแบบดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุโรคใหม่ 19 ไอโซเลท จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ของเครื่องหมาย MGM209 และ MGM57 (1 คือ BKK55003, 2 คือ BKK55004, 3 คือ CCO55002, 4 คือ CPM55002, 5 คือ CPM55003, 6 คือ KKN61119, 7 คือ KKN7357, 8 คือ NKI13502, 9 คือ RBR55001, 10 คือ RBR55004, 11 คือ SRN54002, 12 คือ THL191, 13 คือ THL84, 14 คือ CRI34.1, 15 คือ PLK1.1, 16 คือ PLK40.4, 17 คือ PL3, 18 คือ UBN195167, 19 คือ UBN11351 และ M คือ 20 bp DNA ladder)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ (Dendrogram) ของเชื้อสายพันธุ์โรครใหม่ 19 ไอโซเลท วิเคราะห์โดยวิธี SAHN จากเครื่องหมาย MGM จำนวน 13 เครื่องหมาย

4.2 การกระจายตัวของยีน และแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรครใหม่บนโครโมโซมข้าว

4.2.1 การสร้างประชากรข้าว

4.2.1.1 ประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 - hybrid)

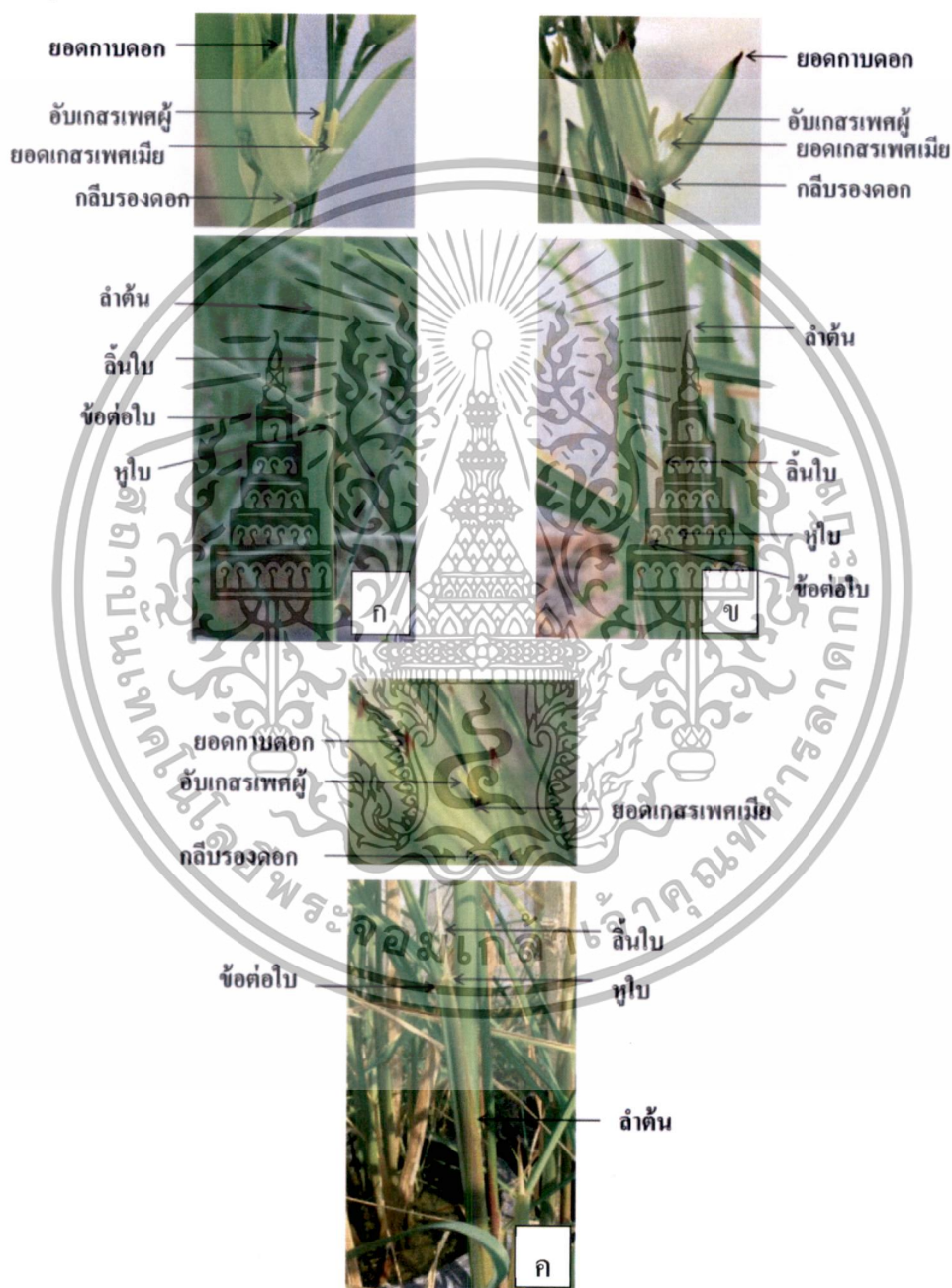
ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) เป็นข้าวเจ้า ไร่ต่อช่วงแสงอย่างอ่อน มีขนบนแผ่นใบ แผ่นใบและกาบใบเป็นสีเขียว ลิ่นใบมีสีเขียวมีลักษณะ 2 ยอด และมีความยาว 26 มิลลิเมตร หูใบและสีข้อต่อใบสีเขียวอ่อน ปล้องสีเขียว ทรงกอแผ่ ยอดเกสรเพศเมียและยอดกาบดอกสีขาว กลีบรองดอกสีเขียว ความแข็งลำต้นปานกลาง ความยาวลำต้น 150 เซนติเมตร คอรวงยาว มีขนบนเปลือกเมล็ด เปลือกเมล็ดสีฟ้า (ภาพที่ 4.3)

ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) เป็นข้าวเจ้า แบบนาสวนในอำเภอป่าซาง จังหวัดแม่ฮ่องสอน ไม่มีขนบนแผ่นใบ แผ่นใบมีสีเขียวม่วงที่ปลายใบ กาบใบสีเขียวเส้นม่วง ลิ่นใบมีสีเขียวมีลักษณะ 2 ยอด และมีความยาว 25 มิลลิเมตร หูใบและสีข้อต่อใบสีม่วง ปล้องสีเขียว ทรงกอแผ่ ยอดเกสรเพศเมียสีขาว ยอดกาบดอกและกลีบรองดอกสีม่วง ความแข็งลำต้นปานกลาง ความยาวลำต้น 150 เซนติเมตร คอรวงยาว มีขนบนเปลือกเมล็ด เปลือกเมล็ดสีฟ้า จากการสังเกตลักษณะที่พบเห็นได้ชัดเจน และพบว่ามีความแตกต่างจาก KDML105 คือ การมีสีของแผ่นใบเป็นสีเขียวปลายม่วง สีกาบใบเขียวเส้นม่วง มีสีของหูใบและข้อต่อใบเป็นสีม่วง รวมถึงสียอดกาบดอกและสีกลีบรองดอกก็ยังเป็นสีม่วง (ภาพที่ 4.3)

ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 - hybrid) ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) มีขนบนแผ่นใบ แผ่นใบมีสีเขียวเข้ม กาบใบสีม่วง ลิ่นใบมีสีเขียวมีลักษณะ 2 ยอด และมีความยาว 25 มิลลิเมตร หูใบและสีข้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อใบสีม่วงอ่อน ปล้องสีเขียว ทรงกอแผ่ ยอดเกสรตัวเมียสีม่วงดำ ยอดกาบดอกและกลีบรองดอกสีม่วง ความแข็งลำต้นปานกลาง ความยาวลำต้น 150 เซนติเมตร คอรวงยาว มีขนบนเปลือกเมล็ด เปลือกเมล็ดสีฟ้า ลักษณะที่พบว่ามีความเหมือนกับพันธุ์แม่ คือ มีขนบนแผ่นใบ ลักษณะที่พบว่ามีความเหมือนกับพันธุ์พ่อ คือ ยอดดอกและกลีบรองดอกสีม่วง และพบลักษณะที่ต่างจากพ่อและแม่ คือ แผ่นใบมีสีเขียวเข้ม กาบใบสีม่วง หูใบและสีข้อต่อใบสีม่วงอ่อน และยอดเกสรตัวเมียสีม่วงดำ (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.3 ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าว ก) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) ข) พันธุ์เมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) และ ค) ลูกผสมชั่วที่ 1 (KDML105 x GS19769)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1.2 ประชากรข้าวข้าวที่ 2 (F_2)

ผสมระหว่างพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ใช้เป็นพันธุ์แม่ (female parent) และข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) ใช้เป็นพันธุ์พ่อ (male parent) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวต้านทานโรคใหม่ ได้ข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 - hybrid) จำนวน 2 เมล็ด ปลูกและปล่อยให้มีการผสมตัวเองตามธรรมชาติ ลูกผสมชั่วที่ 1 ต้นที่ 1 (F_1T_1) ได้เมล็ดจำนวน 165 เมล็ด ลูกผสมชั่วที่ 1 ต้นที่ 2 (F_1T_2) ได้เมล็ดจำนวน 85 เมล็ด รวมได้เมล็ดจากข้าวลูกผสม F_1 จำนวน 250 เมล็ด (F_2 - seed) เมื่อนำไปปลูก จะได้ประชากรข้าว F_2 (F_2 - plant)

4.2.2 การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคใหม่โดยวิธีทดสอบการเกิดโรคในประชากรข้าวข้าวที่ 2 (F_2)

ทดสอบการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อสาเหตุโรคใหม่จำนวน 19 ไอโซเลท บนกล้าข้าวจำนวน 250 ต้น พบการแสดงออกของลักษณะความต้านทานโรคใหม่ระดับสูง (ระดับ 0, 1 และ 2) จำนวน 193 ต้น โดยแยกเป็นประชากรข้าว F_2 ที่ได้จากข้าวลูกผสม F_1T_1 (F_2T_1) จำนวน 124 ต้น และประชากรข้าว F_2 ที่ได้จากข้าวลูกผสม F_1T_2 (F_2T_2) จำนวน 69 ต้น แสดงความต้านทานโรคใหม่ในระดับปานกลาง (ระดับ 3 และ 4) จำนวน 42 ต้น โดยแยกเป็นประชากรข้าว F_2T_1 จำนวน 33 ต้น และประชากรข้าว F_2T_2 จำนวน 9 ต้น พบลักษณะที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคใหม่ (ระดับ 5 และ 6) จำนวน 15 ต้น โดยแยกเป็นประชากรข้าว F_2T_1 จำนวน 8 ต้น และประชากรข้าว F_2T_2 จำนวน 7 ต้น (ตารางที่ 4.2) ผลประเมินการเกิดโรคของประชากรข้าว F_2 ทั้งหมด 250 ต้น แบ่งเป็นต้นที่แสดงลักษณะต้านทาน 235 ต้น และต้นที่แสดงลักษณะอ่อนแอ 15 ต้น นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคใหม่ว่าเป็นตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) โดยทดสอบหาค่า Chi square เนื่องจากประชากรที่ศึกษาเป็นประชากรข้าว F_2 หากความต้านทานโรคใหม่ที่ศึกษาถูกควบคุมด้วยยีนเพียงยีนเดียว การกระจายตัวของยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคใหม่จะเท่ากับ 3:1 นั่นคือ ต้านทาน (resistance, R): อ่อนแอ (susceptible, S)

ผลการกระจายตัวของยีนควบคุมลักษณะต้านทานในอัตราส่วน 3:1 (R:S) พบค่าสถิติ Chi square เท่ากับ 48.133 เมื่อเปรียบเทียบกับตาราง Chi square ที่ degree of freedom (df) เท่ากับ 1 พบว่ามีค่าความน่าจะเป็น (Probability, P) เท่ากับ 0.000 แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคใหม่ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 3:1 (R:S) ดังนั้นจึงวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนควบคุมลักษณะต้านทานในอัตราส่วน 15:1 (R:S) พบมีค่าสถิติ Chi square เท่ากับ 0.027 เมื่อเปรียบเทียบกับตาราง Chi square ที่ df เท่ากับ 1 พบว่ามีค่า P เท่ากับ 0.870 หรือ $0.90 < P < 0.95$ แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคใหม่เป็นไปตามอัตราส่วน 15:1 (R:S) เป็นไปได้ว่าลักษณะต้านทานโรคใหม่ในข้าวพันธุ์ห้วย (GS19769) ถูกควบคุมด้วยยีนหลักที่เป็นยีนเด่นจำนวน 2 ยีน (2 major dominantly resistant genes) โดยยีนหลัก 2 ตำแหน่งนี้มีปฏิกริยาข้ามข้ามตำแหน่งระหว่างกัน (interallelic interaction) และเมื่อพิจารณาข้อมูลในตารางที่ 4.2 จะเห็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ว่าในกลุ่มที่ด้านทานมีบางส่วนแสดงความต้านทานปานกลาง แสดงว่าปฏิกริยาระหว่างยีนด้านทาน โรคใหม่ 2 ตำแหน่งนี้ในข้าวพันธุ์ห้วยเป็นแบบ (additive-addition interaction) (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.2 ผลประเมินการเกิดโรคด้วยเชื้อสาเหตุโรคใหม่ 19 ไอโซเลท บนประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2) จำนวน 250 ต้น

ประชากร	จำนวนต้น ที่ประเมิน	ด้านทาน**		ด้านทาน ปานกลาง (ต้น)		อ่อนแอ		
		(ต้น)	(ต้น)	3	4	5	6	
		0*	1	2	3	4	5	6
F_2T_1	165	75	28	21	30	3	8	0
F_2T_2	85	59	5	5	5	4	5	2
รวม	250	134	33	26	35	7	13	2

* 0-6 คือ ระดับคะแนนการเกิดโรคตามวิธีของ Roumen *et al.* (1997)

** 0-2 จัดอยู่ในกลุ่มด้านทาน 3-4 จัดอยู่ในกลุ่มด้านทานปานกลาง และ 5-6 จัดอยู่ในกลุ่มอ่อนแอต่อโรคใหม่ (Sallaud *et al.*, 2003)

ตารางที่ 4.3 อัตราการกระจายตัวของลักษณะด้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคใหม่ 19 ไอโซเลทในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2) จำนวน 250 ต้น

ประชากร (จำนวนต้น)	Expected ratio	Expected No.		Observed No.		X^2	P
		R	S	R	S		
		F_2 (250)	3:1	187.5	62.5		
F_2 (250)	15:1	234.4	15.6	235	15	0.027**	0.87

*ค่าสถิติ Chi square (X^2) = 0.05, df=1.0 (3.84, 1), ** X^2 = 0.90, df=1.0 (0.02, 1)

R คือ Resistant (ด้านทาน), S คือ Susceptible (อ่อนแอ), P คือ Probability

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F₂)

4.2.3.1 คัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้

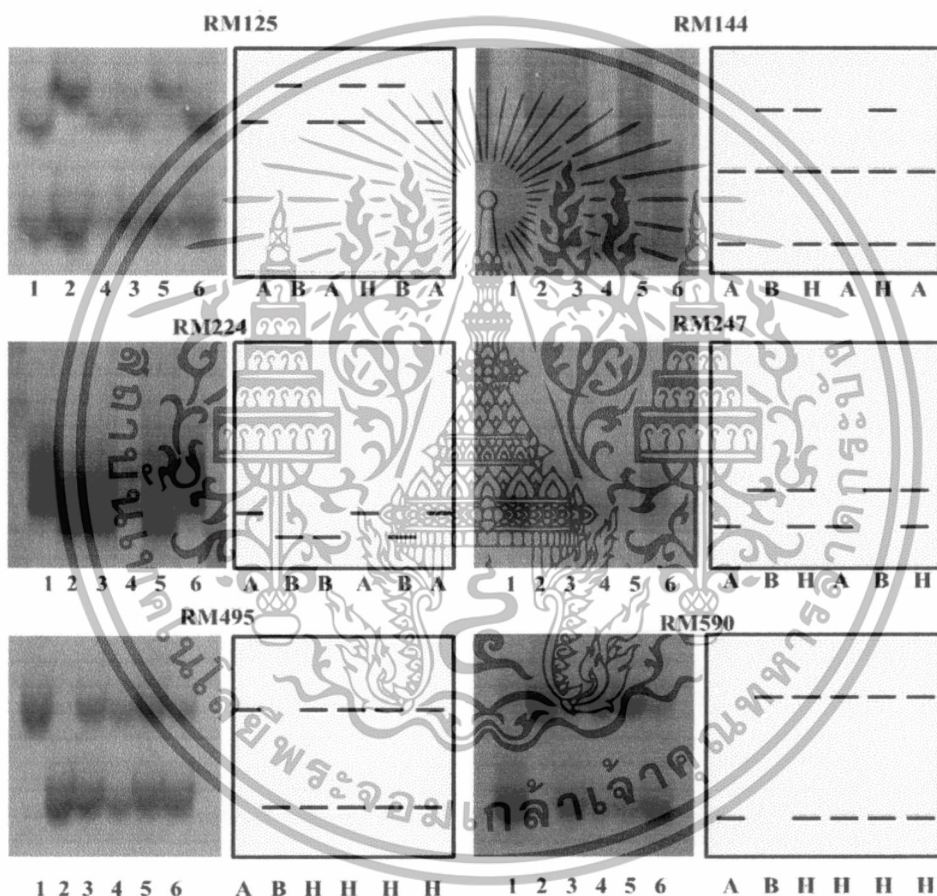
คัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพ่อและแม่ได้โดยใช้เครื่องหมาย microsatellite จำนวน 230 เครื่องหมายที่กระจายอยู่บนทุกโครโมโซมของข้าวเป็น primer ในปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบผลจากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate พบเครื่องหมาย microsatellite จำนวน 66 เครื่องหมายสามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพ่อและแม่ได้ คิดเป็น 28.44 เปอร์เซ็นต์ของเครื่องหมายทั้งหมด กระจายอยู่ทั่วจีโนมของข้าว โดยแบ่งตามโครโมโซมได้ดังนี้ โครโมโซม 1 จำนวน 5 เครื่องหมาย โครโมโซม 2 จำนวน 7 เครื่องหมาย โครโมโซม 3 จำนวน 4 เครื่องหมาย โครโมโซม 4 จำนวน 9 เครื่องหมาย โครโมโซม 5 จำนวน 7 เครื่องหมาย โครโมโซม 6 จำนวน 4 เครื่องหมาย โครโมโซม 7 จำนวน 6 เครื่องหมาย โครโมโซม 8 จำนวน 4 เครื่องหมาย โครโมโซม 9 จำนวน 4 เครื่องหมาย โครโมโซม 10 จำนวน 4 เครื่องหมาย โครโมโซม 11 จำนวน 7 เครื่องหมาย และโครโมโซม 12 จำนวน 5 เครื่องหมาย (ตารางที่ 4.4)

4.2.3.2 คัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้

นำเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้จำนวน 66 เครื่องหมายมาคัดเลือกเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) โดยใช้ดีเอ็นเอรวมของประชากร 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือดีเอ็นเอของพันธุ์แม่ กลุ่ม 2 ดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อ กลุ่มที่ 3 ดีเอ็นเอของประชากร F₂T₁ ที่แสดงความต้านทาน (resistant) ระดับ 0 กลุ่มที่ 4 ดีเอ็นเอของประชากร F₂T₁ ที่แสดงความอ่อนแอ (susceptible) ระดับ 5 และ 6 กลุ่มที่ 5 ดีเอ็นเอของประชากร F₂T₂ ที่แสดงความต้านทาน (resistant) ระดับ 0 และกลุ่มที่ 6 ดีเอ็นเอของประชากร F₂T₂ ที่แสดงความอ่อนแอ (susceptible) ระดับ 5 และ 6 นำดีเอ็นเอของแต่ละกลุ่มมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบผลจากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค PAGE ด้วย polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลด้วยสารละลาย silver nitrate วิเคราะห์แปลจรูปแบบดีเอ็นเอเป็นข้อมูล A, B และ H โดยกำหนดให้ A คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ B คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ H คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่ พบเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้จำนวน 3 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM125 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 7 มีการแสดงของเครื่องหมายเรียงตามกลุ่ม 1 ถึง 6 คือ ABHABA เครื่องหมาย RM144 อยู่บนโครโมโซมที่ 11 มีการแสดงของเครื่องหมายเรียงตามกลุ่ม 1 ถึง 6 คือ ABHABA และเครื่องหมาย RM224 อยู่บน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครโมโซมที่ 11 มีการแสดงของเครื่องหมายเรียงตามกลุ่ม 1 ถึง 6 คือ ABBABA นอกจากนี้ยังพบเครื่องหมาย microsatellite ที่มีความเป็นไปได้ว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ คือ เครื่องหมาย RM247 อยู่บนโครโมโซมที่ 12 มีการแสดงของเครื่องหมายเรียงตามกลุ่ม 1 ถึง 6 คือ ABHABH แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมาย RM247 สามารถแยกความแตกต่างของกลุ่มที่แสดงความต้านทานและความอ่อนแอได้ในประชากรข้าว F_2T_1 เท่านั้น ดังนั้นจึงเลือกใช้เครื่องหมาย RM125, RM144 และ RM224 เพื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าว F_2 จำนวน 250 ต้นต่อไป (ภาพที่ 4.4 และตารางที่ 4.4)



ภาพที่ 4.4 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมายที่วิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) เลข 1 คือ ข้าวคอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์แม่, 2 คือ พันธุ์ห้วย (GS19769) เป็นพันธุ์พ่อ, 3 คือ ประชากรข้าว F_2T_1 กลุ่มต้านทาน, 4 คือ ประชากรข้าว F_2T_1 กลุ่มอ่อนแอ, 5 คือ ประชากรข้าว F_2T_2 กลุ่มต้านทาน, 6 คือ ประชากรข้าว F_2T_2 กลุ่มอ่อนแอ, A คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่, B คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ, H คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง พ่อและแม่ได้จำนวน 66 เครื่องหมาย และผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA)

Chromosome	Marker	Primer sequences (5'-3')		BSA score band
		Forward primer	Reverse primer	
1	RM495	AATCCAAGGTGCAGAGATGG	CAACGATGACGAACAACAC	ABHHHH
	RM312	GTATGCATATTTGATAAGAG	AAGTCACCGAGTTTACCTTC	ABHAHH
	RM428	AACAGATGGCATCGTCTTCC	CGCTGCATCCACTACTGTG	ABABBB
	RM433	GATGGTTTTTCATCGGCTACG	AGTCCCAGAATGTCGTTTCG	ABBBBB
	RM472	CCATGGCCTGAGAGAGAGAG	AGCTAAATGGCCATACGGTG	ABHHHH
2	RM106	CGTCTTCATCATCGTCGCCCG	GGCCATCCCCTCGTGGATCTC	ABHHHH
	RM6	GTCCCTCCACCAATTC	TCGTCTACTGTTGGCTGCAC	ABHHHH
	RM208	TCTGCAAGCCTTGTCTGATG	TAAGTCGATCATTGTGTGGACC	ABABAA
	RM71	CTAGAGGCGAAAACGAGATG	GGGTGGGCGAGGTAATAATG	ABHHHH
	RM341	CAAGAAACCTCAATCCGAGC	CTCTCCCGATCCCAATC	ABHHHH
	RM475	CCTCACGATTTTCTCCAAC	ACGGTGGGATTAGACTGTGC	ABHHHH
	RM526	CCCAAGCAATACGTCCCTAG	ACCTGGTCATGACAAGGAGG	ABHHHH
3	RM55	CCGTCGCOGTAGTAGAGAAG	TCCCGGTTATTTAAGGCG	ABHHHH
	OSR16	AAAAGTAGCTTGCAAAGGGGA	TGCCGGCTGATCTTGTCTC	ABAAAA
	RM7	TTCGCCATGAAGTCTCTCG	CCTCCCATCATTTCGTTGTT	ABHHHB
	RM85	CCAAAGATGAAACCTGGATTG	GCACAAGGTGAGCAGTCC	ABBAAH
4	RM551	AGCCCAGACTAGCATGATTG	GAAGGCGAGAAGGATCACAG	ABHHHH
	RM471	ACGCACAAGCAGATGATGAG	GGGAGAAGACGAATGTTTC	ABHHHH
	RM252	TTCGCTGACGTGATAGGTTG	ATGACTTGATCCCGAAGACG	ABHHHH
	RM280	ACACGATCCACTTTGCGC	TGTGTCTTGAGCAGCCAGG	ABHHHH
	RM559	ACGTACACTTGGCCCTATGC	ATGGGTGTCAGTTGCTTCC	ABHHHH
	RM3524	CGGAGCTGGTCTAGCCATC	GTCTCCGCTTCTCCTACTCG	ABHHHH
	RM1136	ATGTATCCAGAGTCGCCTC	AGGACGTATTACACACGAC	ABHHHH
	RM241	GAGCCAAATAAGATCGCTGA	TGCAAGCAGCAGATTTAGTG	ABHHHH
	RM6748	ATTGGGTTTCTCATATTATG	CCAACACTCCTAAGTATTC	ABHHHH
5	RM413	GGCGATTCTTGATGAAGAG	TCCCCACCAATCTGTCTTC	ABHHHH
	RM509	TAGTGAGGGAGTGAAACGG	ATCGTCCCACAATCTCATC	ABHHHH
	RM178	TCGCGTGAAAGATAAGCGGCGC	GATCACCGTCCCTCCGCCTGC	ABBBBH
	RM2010	ATCTTCTAGGAAATCGAGGA	GTTGGCAACTGTAGTCTTG	ABHHHH

*เรียงตามกลุ่ม 1 ถึง 6 โดย A คือ มีผลผลิตชนิดเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่, B คือ มีผลผลิตชนิดเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ, H คือ มีผลผลิตชนิดเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้จำนวน 66 เครื่องหมาย และผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA)

Chromosome	Marker	Primer sequences (5'-3')		BSA score band
		Forward primer	Reverse primer	
5	RM5140	GACGAGGTTGTTTATTAGTG	CTTATTTTCACGTGTACGTT	ABBBBA*
	RM598	GAATCGCACACGTGATGAAC	ATGCGACTGATCGGTACTCC	ABHHHH
	RM3663	CATCAACCTCCACGAACATG	CTCGGTGGTGATCCTCCTC	ABHHHH
6	RM204	GTGACTGACTTGGTCATAGGG	GCTAGCCATGTCTCGTACC	ABHHHH
	RM225	TGCCCATATGGTCTGGATG	GAAAGTGGATCAGGAAGGC	ABHHHH
	RM136	GAGAGCTCAGCTGCTGCCTCTAGC	GAGGAGCGCCACGGTGTACGCC	ABBHBH
	RM7434	GGAGGAAAGGTTGGAGAAGG	TTCCCGTATCCATGAGCC	ABHHHH
7	RM125	ATCAGCAGCCATGGCAGCGACC	AGGGGATCATGTGCCGAAGGCC	ABHABA
	RM11	TCTCTCTTCCCCGATC	ATAGCGGGCGAGGCTTAG	ABHHHH
	RM4098	CGTTTGGATGAAGAAGAAGA	AGTGTTTCGTTTCGGATTAGA	ABHHHH
	RM1253	CTGAACCTTGCTGAGAATC	GACGACCTCTCCATGCTCG	ABHHHH
	RM1973	GAGTTGCAAGGATATTTTAA	TGGAGCCTAGAGAATACATA	ABHHHH
	RM1132	ATCACCTGAGAAACATCCGG	CTCCTCCACGTCAAGGTC	ABHHHH
8	RM152	GAAACCACCACCTCACCG	CCGTAGACCTTCTGAAGTAG	ABHHHH
	RM44	ACGGGCAATCCGAACAACC	TCGGGAAAACCTACCCTACC	ABHHHH
	RM38	ACGAGCTCTCGATCAGCCTA	TCGGTCTCCATGTCCCAC	ABABBH
	RM8264	ACGCTCCTCGCTTCTAC	GCACCTCACACCAGTAATTC	ABHHHH
9	RM201	CTCGTTTATTACCTACAGTACC	CTACCTCCTTCTAGACCGATA	ABHHHH
	RM205	CTGTTTCTGTATGGGAGCAG	CTGGCCCTTCACGTTTCAGTG	ABHHHH
	RM5122	CTCGCAATTTATACGTAATC	CTCACGAAATAAAATGAGTG	ABHHHH
	RM1553	AATTAGAGGGTCCACATGTC	ATTACCCTCATTTTCTACGC	ABHHHH
10	RM474	AAGATGTACGGGTGGCATT	TATGAGCTGGTGGCAATGG	ABHHHH
	RM590	CATCTCCGCTCTCCATGC	GGAGTTGGGGTCTTGTTCCG	ABHHHH
	RM7217	TTGTAGGATGACACGTGGC	CGGGATTTCAGTACCTCAG	ABAAAA
	RM3123	ATTTCCACACATCTCGCTG	GTGTCGCCGGTCAAGAAC	ABHHHH
11	RM287	TTCCCTGTTAAGAGAGAAATC	GTGTATTTGGTGAAGCAAC	ABHHHH
	RM457	CTCCAGCATGGCCTTCTAC	ACCTGATGGTCAAAGATGGG	ABHHHH

*เรียงตามกลุ่ม 1 ถึง 6 โดย A คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่, B คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ, H คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้จำนวน 66 เครื่องหมาย และผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA)

Chromosome	Marker	Primer sequences (5'-3')		BSA score band
		Forward primer	Reverse primer	
	RM206	CCCATGCGTTTAACTATTCT	CGTTCATCGATCCGTATGG	ABHHHH*
	RM224	ATCGATCGATCTTCACGAGG	TGCTATAAAAGGCATTCGGG	ABBABA
	RM144	TGCCCTGGCGCAAATTTGATCC	GCTAGAGGAGATCAGATGGTAGTGCATG	ABHAHA
	RM3717	AGCTCTACCTTTGCTGTCGG	AACTCCCTAGACCCACCTGC	ABHHHH
	RM4601	CATACATGTGAACCTGACTG	CTAGCTTAGCATCTCCTCAA	ABHHHH
12	RM415	CTTCGATCCATCATCCATGG	ATTGCTGTACGCAGTTTCGG	ABHHHH*
	RM247	TAGTGCCGATCGATGTAACG	CATATGGTTTTGACAAAGCG	ABHABH
	RM235	AGAAGCTAGGGCTAACGAAC	TCACCTGGTCAGCCTCTTTC	ABBBBB
	RM1261	GTCCATGCCCAAGACACAAC	GTTACATCATGGGTGACCCC	ABHHHH
	RM1103	CAGCTGCTGCTACTACCCG	CTACTCCACGTCCATGCATG	ABBBBB

*เรียงตามกลุ่ม 1 ถึง 6 โดย A คือ มีผลผลิตชนิดเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่, B คือ มีผลผลิตชนิดเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ, H คือ มีผลผลิตชนิดเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่

4.2.3.3 การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าวเจ้าที่ 2 (F₂)

ใช้เครื่องหมาย microsatellite RM125, RM144 และ RM224 เป็น primer ในปฏิบัติการ PCR ตรวจสอบผลจากการทำปฏิบัติการ PCR ด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate วิเคราะห์แปลงรูปแบบดีเอ็นเอเป็นข้อมูล A, B และ H โดยกำหนดให้ A คือ มีผลผลิตชนิดเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ B คือ มีผลผลิตชนิดเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ H คือ มีผลผลิตชนิดเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่ ผลการวิเคราะห์ของเครื่องหมาย RM144 ในประชากรข้าว F₂ จำนวน 250 ต้น พบผลผลิตชนิดเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่กำหนดให้เป็น A จำนวน 71 ต้น พบผลผลิตชนิดเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อกำหนดให้เป็น B จำนวน 46 ต้น และพบผลผลิตชนิดเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่กำหนดให้เป็น H จำนวน 133 ต้น ผลการวิเคราะห์ของเครื่องหมาย RM224 ในประชากรข้าว F₂ จำนวน 250 ต้น พบผลผลิตชนิดเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่กำหนดให้เป็น A จำนวน 66 ต้น พบผลผลิตชนิดเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อกำหนดให้เป็น B จำนวน 49 ต้น และพบผลผลิตชนิดเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่กำหนดให้เป็น H จำนวน 135 ต้น และผลการวิเคราะห์ของเครื่องหมาย RM125 ในประชากรข้าว F₂ จำนวน 250 ต้น พบผลผลิตชนิดเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่กำหนดให้เป็น A จำนวน 65 ต้น พบผลผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อกำหนดให้เป็น B จำนวน 55 ต้น และพบผลผลิตชนิดเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่กำหนดให้เป็น H จำนวน 130 ต้น (ตารางที่ 4.5)

จากนั้นวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย RM125, RM144 และ RM224 ในประชากรข้าว F_2 ว่าเป็นตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) โดยทดสอบค่า Chi square วิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายในอัตราส่วน 1:2:1 นั่นคือ มีผลผลิตชนิดเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (B): มีผลผลิตชนิดเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่ (H): มีผลผลิตชนิดเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (A) ผลการวิเคราะห์พบว่าค่าสถิติ Chi square สำหรับการกระจายตัวของเครื่องหมายในอัตราส่วน 1:2:1 (B:H:A) ของเครื่องหมาย RM144 มีค่าเท่ากับ 6.024 เมื่อเปรียบเทียบกับตาราง Chi square ที่ df เท่ากับ 2 พบว่ามีค่า P เท่ากับ 0.049 หรืออยู่ระหว่าง $0.025 < P < 0.05$ (ตารางที่ 4.5, ภาพที่ 4.5) เครื่องหมาย RM224 มีค่าสถิติ Chi square เท่ากับ 3.912 เมื่อเปรียบเทียบกับตาราง Chi square ที่ df เท่ากับ 2 พบว่ามีค่า P เท่ากับ 0.141 หรืออยู่ระหว่าง $0.10 < P < 0.25$ (ตารางที่ 4.5, ภาพที่ 4.6) และเครื่องหมาย RM125 มีค่าสถิติ Chi square เท่ากับ 1.200 เมื่อเปรียบเทียบกับตาราง Chi square ที่ df เท่ากับ 2 พบว่ามีค่า P เท่ากับ 0.549 หรืออยู่ระหว่าง $0.50 < P < 0.75$ แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของยีนด้านทานโรคใหม่เป็นไปตามสัดส่วน 1:2:1 (B:H:A) (ตารางที่ 4.5, ภาพที่ 4.7, ตารางผนวกที่ 1)

4.2.4 สร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนด้านทานโรคใหม่จากเปอร์เซ็นต์ recombination

โอกาสเกิด recombination มีความสัมพันธ์โดยตรงกับระยะทางระหว่างยีนในโครโมโซมเดียวกัน ค่าความถี่ของการเกิด recombination 1 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1 centiMorgans (cM) ซึ่งเป็นหน่วยของระยะห่างระหว่างยีนบนแผนที่ยีน (mapping function) ในการทดลองนี้ใช้ข้อมูล phenotype และ genotype ของประชากรเพียง 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคใหม่อย่างชัดเจน พบการเกิดโรคที่ระดับ 5 และ 6 เป็นประชากรที่มี phenotype ถูกต้องแน่นอน จึงเป็นประชากรที่เหมาะสมสำหรับนำมาวิเคราะห์เพื่อระบุตำแหน่งที่ตั้งของยีนด้านทานโรคใหม่ พบว่าเครื่องหมาย RM144 และ RM224 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 11 มีการเกิด recombination เท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่ายีนด้านทานโรคใหม่มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM144 และ RM224 โดยมีระยะห่างจากทั้ง 2 เครื่องหมายเป็นระยะทาง 20 cM และมีตำแหน่งที่ตั้งอยู่บนโครโมโซม 11 ผลของเครื่องหมาย RM125 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 7 มีการเกิด recombination เท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเครื่องหมายเป็นอิสระจากยีนด้านทานโรคใหม่อาจอยู่ห่างจากยีนด้านทานโรคใหม่มากเป็นระยะทาง 60 cM หรือไม่ได้มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมเดียวกันกับยีนด้านทานโรคใหม่ (ตารางที่ 4.6, ภาพที่ 4.11 ก) เพื่อเป็นการช่วยยืนยันถึงการมีอยู่ของจำนวนยีนและระบุตำแหน่งที่ตั้งของยีนด้านทานโรคใหม่ที่ชัดเจนขึ้น จึงทำการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ต่อไป

ตารางที่ 4.5 อัตราการกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรชั่วที่ 2 (F_2) จำนวน 250 ต้น

ประชากร (จำนวนต้น)	โครโมโซม	เครื่องหมาย	Expected ratio	Expected No.			Observed No.			χ^2	Probability
				B	H	A	B	H	A		
$F_2(250)$	11	RM144	1:2:1	62.5	125	62.5	46	133	71	6.024*	0.049
	11	RM224	1:2:1	62.5	125	62.5	49	135	66	3.912**	0.141
	7	RM125	1:2:1	62.5	125	62.5	55	130	65	1.200***	0.549

*ค่า Chi square (χ^2)=0.05, df=2.0 (5.99, 2), ** χ^2 =0.1, df=2.0 (4.61, 2), *** χ^2 =0.5, df=2.0 (1.39, 2)
A คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ B คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ H คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่

4.2.5 ยืนยันจำนวนและระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมาย microsatellite

จากผลการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าว ด้วยการทดสอบการเกิดโรคในประชากรข้าว F_2 ทั้งหมดจำนวน 250 ต้น พบว่าการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้เป็นไปตามอัตราส่วน 15:1 (R:S) เป็นไปได้ว่าลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ห้วย (GS19769) ถูกควบคุมด้วยยีนหลักที่เป็นยีนเด่นจำนวน 2 ยีน (2 major dominantly resistant genes) และผลการกระจายตัวของเครื่องหมาย RM125 บนโครโมโซม 7, RM144 และ RM224 บนโครโมโซม 11 ในประชากรข้าว F_2 ทั้งหมดจำนวน 250 ต้น พบทั้ง 3 เครื่องหมายมีการกระจายตัวของเครื่องหมายในอัตราส่วน 1:2:1 (B:H:A) เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิด recombination เพื่อสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ พบเครื่องหมาย RM144 และ RM224 มีการเกิด recombination เท่ากัน คือ 20 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่ายีนต้านทานโรคไหม้มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM144 และ RM224 บนโครโมโซม 11

เพื่อค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ที่ควบคุมความต้านทานในข้าวพันธุ์ห้วย (GS19769) ซึ่งอาจมีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM125 ที่มีตำแหน่งบนโครโมโซม 7 และ RM247 มีตำแหน่งบนโครโมโซม 12 ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่มีความเป็นไปได้ว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ (ภาพที่ 4.4) เนื่องจากสามารถแยกความแตกต่างของกลุ่มที่แสดงความต้านทานและความอ่อนแอได้ในประชากรข้าว F_2T_1 จึงคัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้ และมีตำแหน่งของเครื่องหมายบนโครโมโซม 7 จำนวน 2 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM11 และ RM1132 (ภาพที่ 4.8) และคัดเลือก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

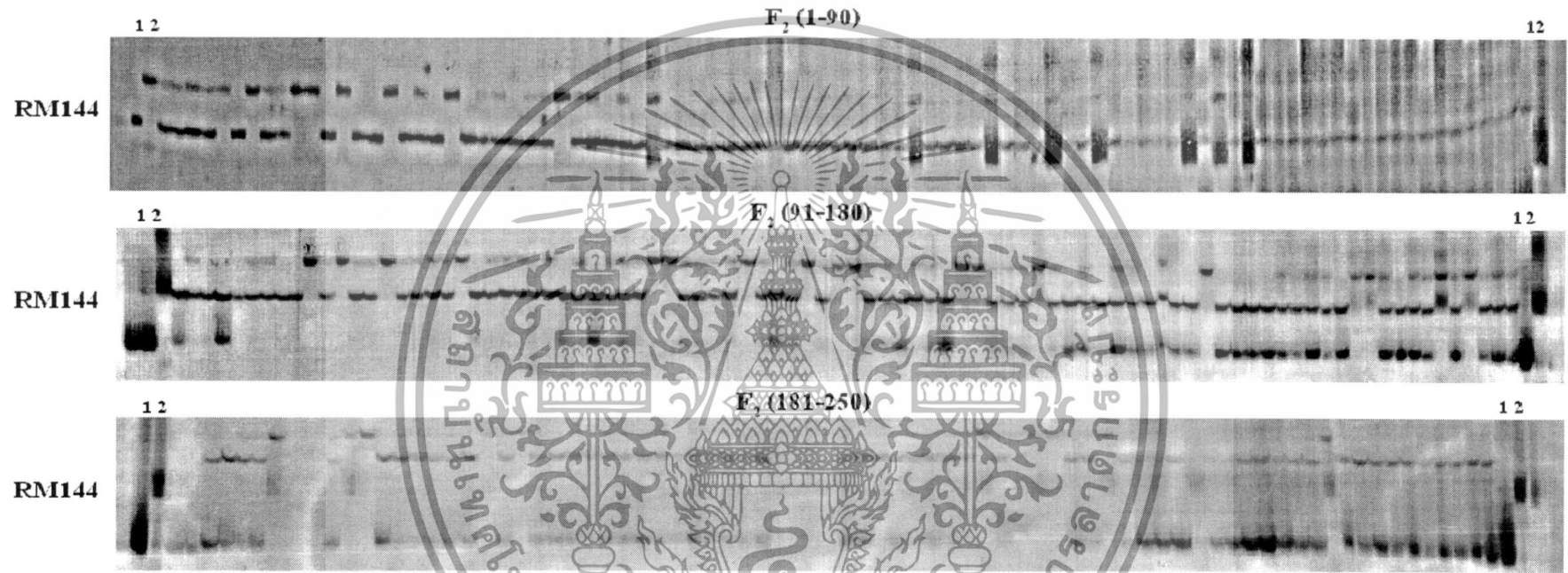
เครื่องหมายบนโครโมโซม 12 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้จำนวน 2 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM1261 และ RM235 (ภาพที่ 4.9) นำมาวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายในประชากร 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจนเป็นประชากรที่มี phenotype ที่ถูกต้องแน่นอน วิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย โดยใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบผลจากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate วิเคราะห์แปลงรูปแบบดีเอ็นเอเป็นข้อมูล A, B และ H โดยกำหนดให้ A คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ B คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ H คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิด recombination เพื่อหาระยะทางระหว่างเครื่องหมายและยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย RM11 และ RM1132 พบว่าไม่มีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ โดยมีเปอร์เซ็นต์ recombination เท่ากับ 73.33 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมายที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 12 ได้แก่ RM247, RM1261 และ RM235 มีเปอร์เซ็นต์ recombination เท่ากับ 73.33, 53.33 และ 66.66 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เนื่องจากทั้ง 3 เครื่องหมายมีเปอร์เซ็นต์ recombination มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเครื่องหมายเป็นอิสระจากยีนต้านทานโรคไหม้อาจอยู่ห่างจากยีนต้านทานโรคไหม้มาก หรือ ไม่ได้มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมเดียวกันกับยีนต้านทานโรคไหม้ (ตารางที่ 4.6)

เพื่อระบุตำแหน่งที่แน่นอนของยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซม 11 ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) จึงคัดเลือกเครื่องหมาย microsatellite บนโครโมโซม 11 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้ และมีตำแหน่งของเครื่องหมายอยู่ใกล้และอยู่ไกลจากเครื่องหมาย RM144 และ RM224 จำนวน 3 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM5926, RM6094 และ RM287 (ภาพที่ 4.10) นำมาวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายในประชากร 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจนเป็นประชากรที่มี phenotype ที่ถูกต้องแน่นอน วิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย โดยใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบผลจากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วย silver nitrate (AgNO_3) วิเคราะห์แปลงรูปแบบดีเอ็นเอเป็นข้อมูล A, B และ H โดยกำหนดให้ A คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ B คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ H คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิด recombination เพื่อหาระยะทางระหว่างเครื่องหมายและยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว ผลจากการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย RM5926, RM6094 และ RM287 พบว่ามีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ โดยพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ recombination เท่ากับ 26.67, 26.67 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) นำข้อมูล genotype ของเครื่องหมายบนโครโมโซม 11 ที่ทำการวิเคราะห์ทั้งหมดมาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูล phenotype ของประชากร 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจนเป็น

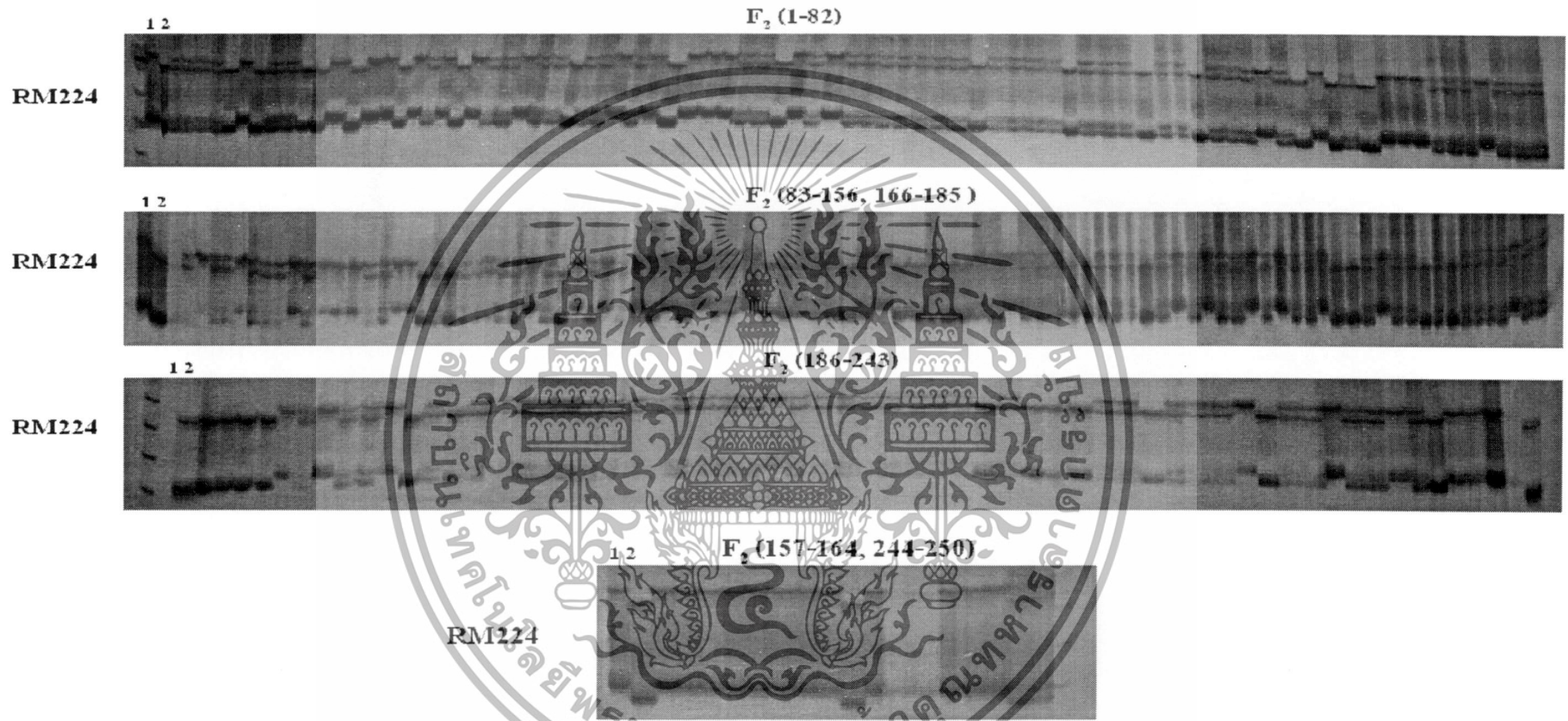
ประชากรที่มี phenotype ที่ถูกต้องแน่นอน โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์ recombination ระหว่างแต่ละคู่ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ เพื่อวาดภาพระบุตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอตามเปอร์เซ็นต์การเกิด recombination ระยะห่างบนโครโมโซมมีหน่วยเป็น centiMorgans (cM) แสดงให้เห็นว่ายีนต้านทานโรคไหม้มีตำแหน่งที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 11 มีระยะห่างจากเครื่องหมาย RM144 และ RM224 เป็นระยะทาง 20 cM มีระยะห่างจากเครื่องหมาย RM5926 เป็นระยะทาง 26.67 cM มีระยะห่างจากเครื่องหมาย RM6094 เป็นระยะทาง 33.34 cM และมีระยะห่างจากเครื่องหมาย RM287 เป็นระยะทาง 86.67 cM (ภาพที่ 4.11 ก)

4.2.6 การระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MAPMAKER

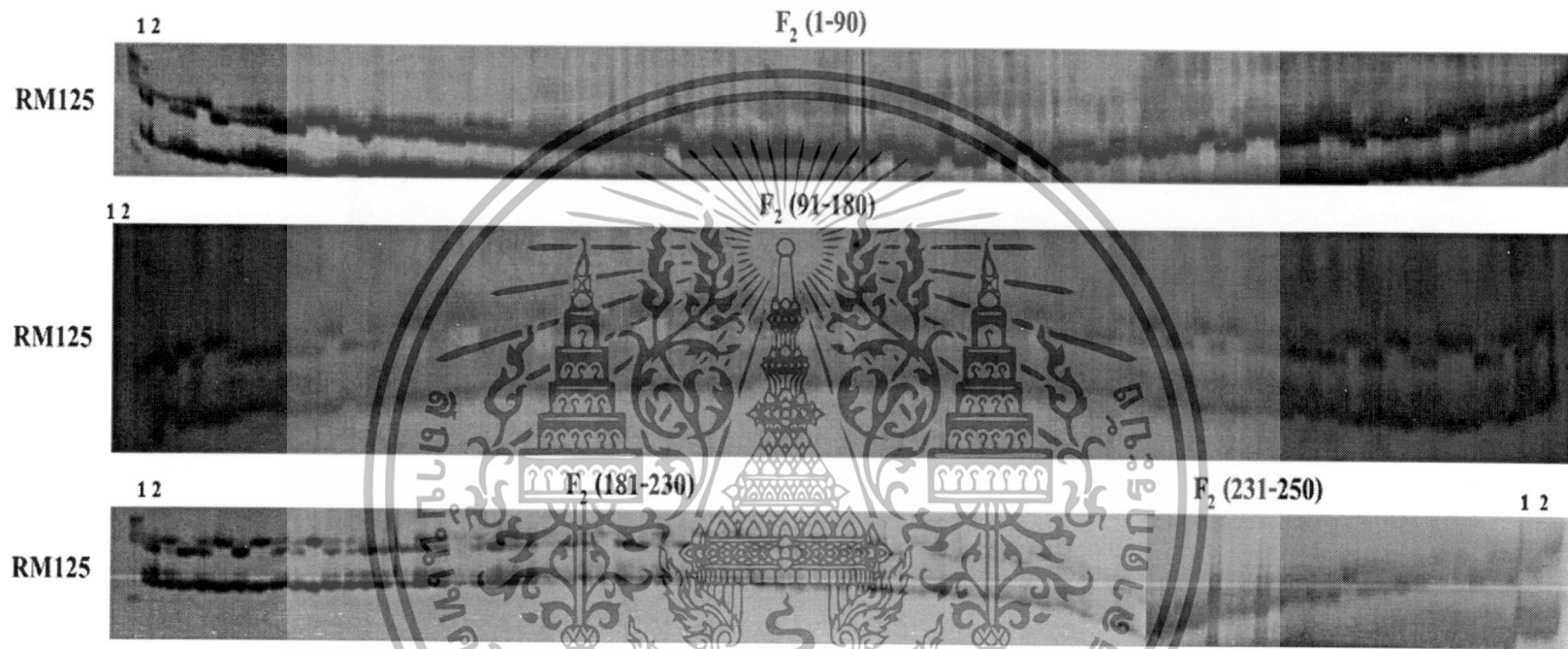
สร้างแผนที่ยีนต้านทานโรคไหม้ โดยนำข้อมูลการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ที่ได้จากการทดสอบการเกิดโรคไหม้ในประชากรข้าว F_2 ซึ่งเป็นข้อมูล phenotype และข้อมูลการกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากร 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจน ซึ่งเป็นข้อมูล genotype มาวิเคราะห์ร่วมกัน ทำการจัดกลุ่มและคำนวณหาระยะห่างของแต่ละเครื่องหมาย และระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้ ด้วยโปรแกรม MAPMAKER/EXP version 3.0b และวาดแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapChart version 2.2 จัดกลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอและยีนต้านทานโรคไหม้ที่มีความใกล้ชิดกัน ที่ค่า logarithm of odds (LOD) =3.0 พบเครื่องหมายที่มีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ห้วย (GS19769) คือ เครื่องหมาย RM144, RM224, RM5926 และ RM6094 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 11 จากการคำนวณหาระยะห่างของแต่ละเครื่องหมาย และระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้ ด้วย Kosambi function พบว่ายีนต้านทานโรคไหม้มีระยะห่างจากเครื่องหมาย RM144 และ RM224 เป็นระยะทางเท่ากันคือ 13.7 cM ห่างจากเครื่องหมาย RM5926 เป็นระยะทาง 17.1 cM และห่างจากเครื่องหมาย RM6094 เป็นระยะทาง 20.5 cM (ภาพที่ 4.11 ข)



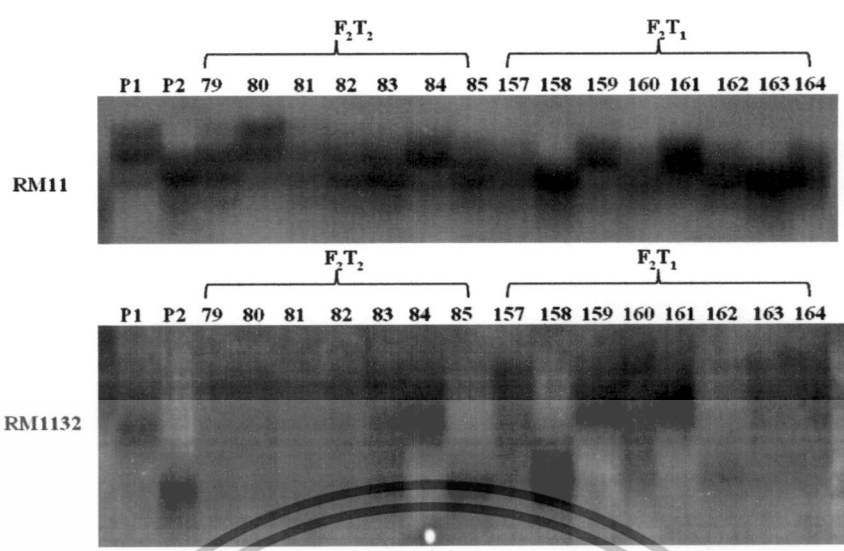
ภาพที่ 4.5 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM144 ในประชากรข้าวชวที่ 2 (F₂) จำนวน 250 ต้น ด้วย เลข 1 คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, 2 คือ พันธุ์ห้วย (GS19769)



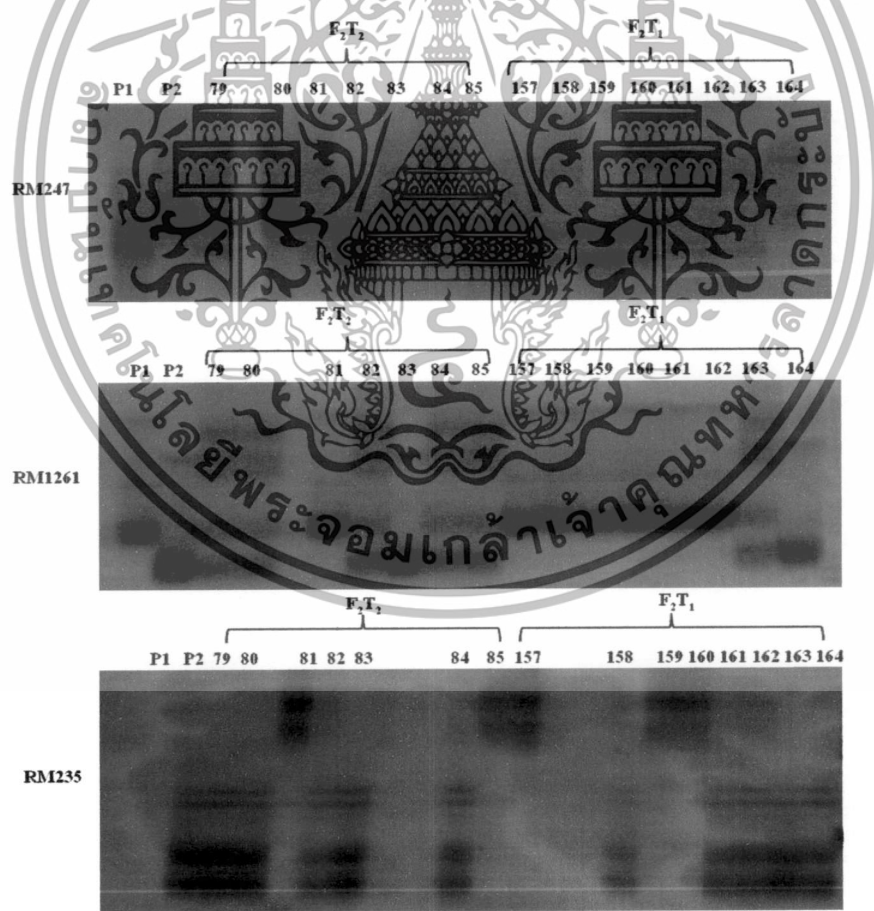
ภาพที่ 4.6 รูปแบบตีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM224 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F₂) จำนวน 250 ต้น คัดย เลข 1 คือ พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105, 2 คือ พันธุ์ห้วย (GS19769)



ภาพที่ 4.7 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องยนต์ RM125 ในประชากรข้าวชี้วัดที่ 2 (F_2) จำนวน 250 ต้น ด้วย เลข 1 คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, 2 คือ พันธุ์ห้วย (GS19769)

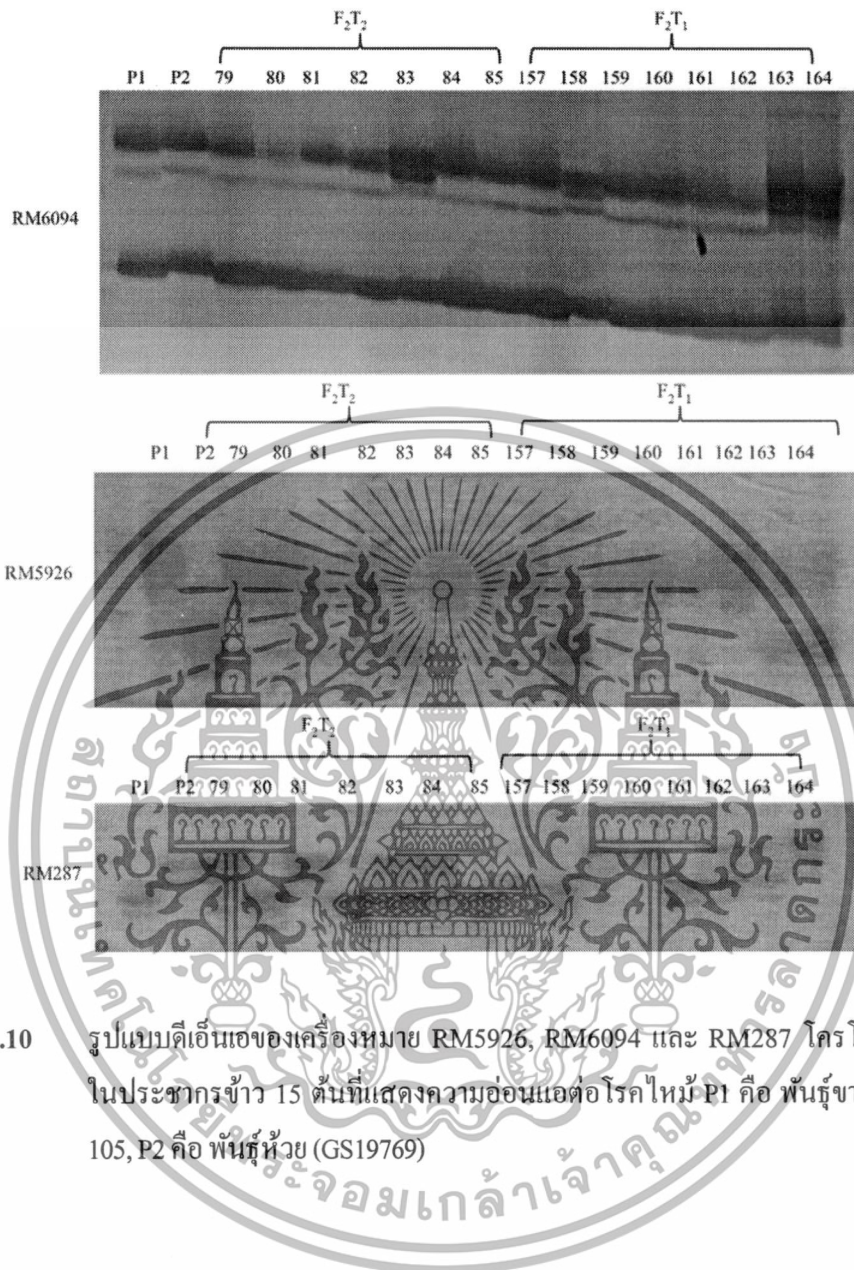


ภาพที่ 4.8 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM11 และ RM1132 โครโมโซม 7 ในประชากรข้าว 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ P1 คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, P2 คือ พันธุ์ห้วย (GS19769)



ภาพที่ 4.9 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM247, RM1261 และ RM235 โครโมโซม 12 ในประชากรข้าว 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ P1 คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, P2 คือ พันธุ์ห้วย (GS19769)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 รูปแบบตีเอ็นของเครื่องหมาย RM5926, RM6094 และ RM287 โคโรโมโซม 11 ในประชากรข้าว 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ P1 คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, P2 คือ พันธุ์ห้วย (GS19769)

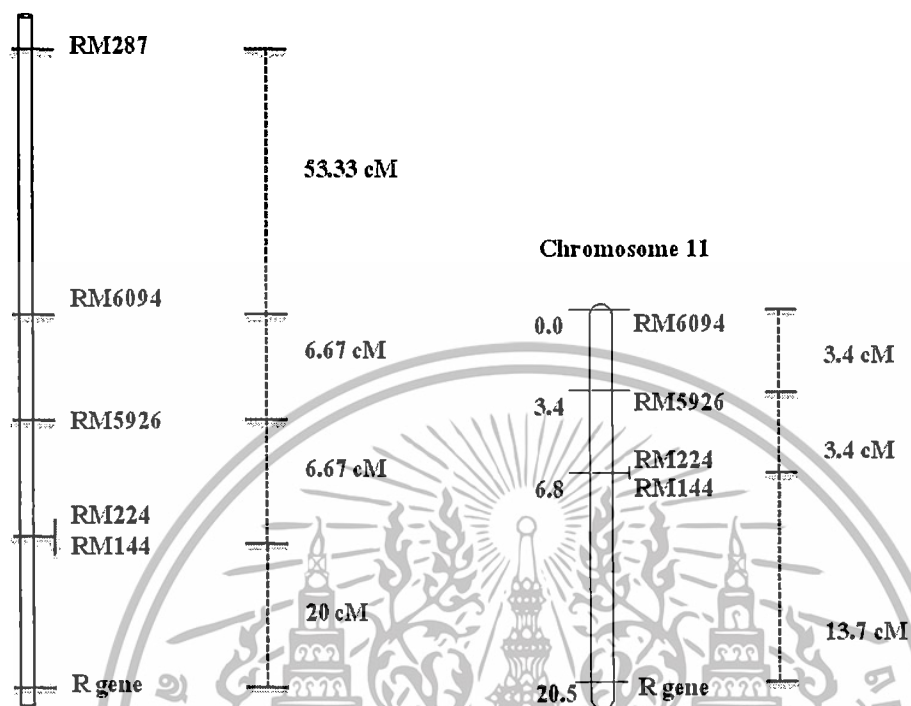
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าว 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ และเปอร์เซ็นต์การเกิด recombination ของยีนต้านทานโรคไหม้

		ประชากรข้าว F ₂ จำนวน 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้																	
		F ₂ T ₁ (8 ต้น)								F ₂ T ₂ (7 ต้น)									
โครโมโซม	เครื่องหมาย	P1	P2	157	158	159	160	161	162	163	164	79	80	81	82	83	84	85	% recombination
genotype	7 RM125	A	B	H	H	A	H	A	H	A	H	H	A	A	H	H	A	H	60
	7 RM11	A	B	H	B	A	B	A	H	B	H	H	A	H	H	H	A	H	73.33
	7 RM1132	A	B	H	B	A	H	A	B	H	H	H	H	H	H	H	A	B	80
	11 RM287	A	B	A	A	B	B	A	H	H	B	B	A	B	A	H	H	A	60
	11 RM224	A	B	A	B	A	A	A	A	H	H	A	A	A	A	A	A	A	20
	11 RM144	A	B	A	B	A	A	A	A	H	H	A	A	A	A	A	A	A	20
	11 RM6094	A	B	A	H	A	A	A	A	H	H	A	A	A	A	H	A	A	26.67
	11 RM5926	A	B	A	B	A	A	A	A	H	H	A	A	A	A	H	A	A	26.67
	12 RM247	A	B	A	H	A	H	H	H	H	B	H	B	H	A	B	H	A	73.33
	12 RM1261	A	B	A	A	A	A	A	A	H	B	H	H	A	H	B	H	H	53.33
12 RM235	A	B	A	B	A	A	B	B	B	B	B	B	B	A	B	B	B	A	66.66
phenotype		5	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	5	5	5	6	

A คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่, B คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ, H คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่

Chromosome 11



ภาพที่ 4.11 แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ และระยะห่างระหว่างเครื่องหมายบนโครโมโซม 11 ของข้าว วิเคราะห์ในประชากรข้าว 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 19 ไอโซเลท ก) จำนวนเปอร์เซ็นต์ recombination ของยีนต้านทานโรคไหม้และระหว่างแต่ละคู่ของเครื่องหมายคือ เอ็นเอ ข) จำนวนหา ระยะห่างของแต่ละเครื่องหมายและยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MAPMAKER และวาดแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapChart

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

วิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ด้วยเครื่องหมาย *Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) จำนวน 14 เครื่องหมาย ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่ได้รับการพัฒนาขึ้นโดย Zheng *et al.* (2008) ได้พัฒนาเครื่องหมาย MGM จำนวน 313 เครื่องหมาย โดยใช้ประชากรเชื้อที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างเชื้อสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลท Guy11 และ 2539 สามารถระบุตำแหน่งของเครื่องหมาย MGM ได้ 176 เครื่องหมาย ซึ่งมีตำแหน่งครอบคลุมทั้ง 7 โครโมโซมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ และได้สร้างฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์พร้อมระบุตำแหน่งของแต่ละเครื่องหมายบนโครโมโซมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ไว้เรียบร้อยแล้ว (<http://ibi.zju.edu.cn/pgl/MGM/index.html>)

ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้จากเครื่องหมาย MGM จำนวน 14 เครื่องหมายพบจำนวน 13 เครื่องหมายสามารถแยกความแตกต่างของพันธุกรรมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้ ในขณะที่เครื่องหมาย MGM57 ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ โดยแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน คือ 210 คู่เบส ในประชากรเชื้อรา 19 ไอโซเลท แสดงให้เห็นว่าบริเวณที่มีการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในปฏิกิริยา PCR ด้วย primer ของเครื่องหมาย MGM57 เป็นบริเวณที่มีจำนวนซ้ำของ microsatellite ที่ไม่เท่ากันในเชื้อสาเหตุโรคไหม้ทั้ง 19 ไอโซเลท (ภาพที่ 4.1) เครื่องหมาย MGM จำนวน 13 เครื่องหมาย มีค่า PIC อยู่ระหว่าง 0.1 ถึง 0.8 ค่าเฉลี่ยค่า PIC เท่ากับ 0.38 แสดงถึงควมมีศักยภาพของเครื่องหมาย MGM ในการใช้เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของพันธุกรรมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ มีความใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Zheng *et al.* (2008) ได้พัฒนาเครื่องหมาย MGM จำนวน 313 เครื่องหมายและพบค่า polymorphic information content (PIC) ของแต่ละเครื่องหมาย ตั้งแต่ 0.20 ถึง 0.89 ค่าเฉลี่ยของค่า PIC เท่ากับ 0.53 (ตารางที่ 4.1)

ผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี SAHN โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความต่างของ Canberra พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความต่างที่ 90 เปอร์เซนต์ สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 19 ไอโซเลทได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม 1 คิดเป็น 73 เปอร์เซนต์ของประชากรเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่ศึกษา ประกอบด้วยเชื้อรา 14 ไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อราที่ระบาดบริเวณภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย กลุ่ม 2 คิดเป็น 15 เปอร์เซนต์ของประชากรเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่ศึกษา ประกอบด้วยเชื้อรา 3 ไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อราที่ระบาดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ของประเทศไทย และพบว่าเชื้อสาเหตุโรคไหม้จากบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการจัดกลุ่มแยกออกเป็นเชื้อเดี่ยว ในกลุ่ม 3 และ 4 (ภาพที่ 4.2)

เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม 1 เป็นเชื้อราที่เก็บจากจังหวัดพิษณุโลก เชียงราย ชัยภูมิ ขอนแก่น สุรินทร์ กรุงเทพฯ ฉะเชิงเทรา และราชบุรี แสดงให้เห็นว่าเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่มีพันธุกรรมเหมือนกันมีการกระจายอย่างกว้างขวางในพื้นที่ปลูกข้าวของประเทศไทย ซึ่งอาจเกิดจากการเคลื่อนย้ายของประชากรเชื้อรา ตามรายงานของ พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ (2548) มีความเป็นไปได้ว่าประชากรของเชื้อสาเหตุโรคไหม้มีการเคลื่อนย้ายข้ามพื้นที่ที่มีลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน และการเคลื่อนย้ายของประชากรของเชื้อราทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้

นอกจากนี้ พบว่าเชื้อราที่เก็บจากจังหวัดเดียวกันในพื้นที่ใกล้เคียงกัน เช่น เชื้อสาเหตุโรคไหม้ ไอโซเลท UBN195167 และ UNB11357 เป็นเชื้อราที่เก็บจากจังหวัดอุบลราชธานี เช่นเดียวกับกรณีของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ ไอโซเลท CPM55002 และ CPM55003 เป็นเชื้อราที่เก็บจากจังหวัดชัยภูมิ เชื้อสาเหตุโรคไหม้ทั้ง 4 ไอโซเลทถูกจัดแยกกลุ่มกัน โดยพบว่าเชื้อสาเหตุโรคไหม้ ไอโซเลท UBN195167 และ CPM55002 ถูกจัดกลุ่มแยกออกเป็นเชื้อเดี่ยวในกลุ่มที่ 3 และ 4 ตามลำดับ เชื้อสาเหตุโรคไหม้ ไอโซเลท UNB11357 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 และเชื้อสาเหตุโรคไหม้ ไอโซเลท CPM55003 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 แสดงให้เห็นว่าเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บจากจังหวัดเดียวกันพื้นที่ใกล้เคียงกันมีพันธุกรรมของเชื้อที่ต่างกัน และบริเวณที่มีการระบาดของโรคไหม้ในจังหวัดเดียวกัน พื้นที่ใกล้เคียงกันมีจำนวนเชื้อราเข้าทำลายข้าวปลูกได้มากกว่า 1 ไอโซเลท สอดคล้องกับงานวิจัยของ เสาวลักษณ์ อัคราช และคณะ (2554) ที่รายงานว่าเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บจากจังหวัดเดียวกัน มีความหลากหลายของระดับความรุนแรงในการก่อโรคไหม้แตกต่างกัน ไม่สามารถจัดกลุ่มร่วมกันได้ และเชื้อราที่เข้าทำลายข้าวจากบริเวณแหล่งเดียวกันมีมากกว่า 1 เชื้อพันธุ์ (race) ในงานวิจัยนี้ยังพบว่าเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่พบระบาดในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีความหลากหลายมากกว่าบริเวณพื้นที่ปลูกข้าวแหล่งอื่น เนื่องจากสามารถจัดกลุ่มแยกกันในกลุ่มที่ 1 ถึง 4 ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ และคณะ (2550) ที่รายงานว่าเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ (pathotype) มากที่สุด

5.2 การกระจายตัวของยีน และแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว

5.2.1 ลักษณะประจำพันธุ์

ลักษณะประจำพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (KDML105) ที่ปลูกและใช้ในการทดลองพบว่า มีความคล้ายคลึงกับลักษณะที่มีรายงานไว้โดย สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว (2553) โดยเฉพาะลักษณะ ดังนี้ กาบใบและใบสีเขียว มีขนใบ ลิ่นใบสีขาวรูปร่างแหลมมี 2 ยอด หูใบและข้อต่อใบสีเขียวอ่อน ปลายยอดดอกสีขาว ยอดเกสรเพศเมียสีขาว ต้นข้าวแข็งแรงปานกลาง (มีลัมบัง) คอรวงยาว มีขนบนเปลือกเมล็ด เปลือกเมล็ดสีฟาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะประจำพันธุ์ห้วย (GS19769) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของไทย พบปลูกในอำเภอป่า จังหวัดแม่ฮ่องสอน เป็นพันธุ์ข้าวที่ยังไม่พบมีรายงานลักษณะประจำพันธุ์ข้าว ด้วยเหตุนี้จึงเห็นว่าลักษณะของพันธุ์ข้าวที่ได้ศึกษาและรายงานไว้ในงานวิจัยนี้ จะเป็นฐานข้อมูลที่สำคัญและเป็นประโยชน์ต่อโครงการอนุรักษ์พันธุ์ข้าวพื้นเมืองของไทย และการนำไปประยุกต์ใช้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคได้ จากการสังเกตลักษณะที่พบเห็นได้ชัดเจน และพบว่าลักษณะประจำพันธุ์ห้วย (GS19769) มีความแตกต่างจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 คือ การมีสีของแผ่นใบเป็นสีเขียวปลายม่วง สีกาบใบเขียวเส้นม่วง มีสีของหูใบและข้อต่อใบเป็นสีม่วง รวมถึงสียอดกาบดอกและสีกลีบรองดอกก็ยังเป็นสีม่วง

ลักษณะประจำพันธุ์ข้าวลูกผสม F_1 เนื่องจากเป็นข้าวลูกผสม F_1 ดังนั้นลักษณะที่พบเห็นจึงมีความเหมือนทั้งในพันธุ์พ่อและแม่ โดยลักษณะที่พบว่ามีเหมือนทั้งกับพันธุ์แม่ คือ มีขนบนแผ่นใบ ลักษณะที่พบว่ามีเหมือนทั้งกับพันธุ์พ่อ คือ ยอดดอกและกลีบรองดอกสีม่วง และพบลักษณะที่ต่างจากพ่อและแม่ คือ แผ่นใบมีสีเขียวเข้ม กาบใบสีม่วง หูใบและสีข้อต่อใบสีม่วงอ่อน และยอดเกสรตัวเพศสีม่วงดำ (ภาพที่ 4.3) ซึ่งลักษณะทาง phenotype ที่พบเป็นลักษณะที่บ่งบอกได้ว่าข้าว F_1 ที่ได้เป็นข้าวลูกผสม F_1 ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769)

5.2.2 การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคใหม่ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2)

ทดสอบการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อสาเหตุโรคใหม่จำนวน 19 ไอโซเลท บนกล้าข้าวพบการแสดงออกของลักษณะความต้านทานโรคใหม่ในประชากรข้าว F_2 จำนวน 250 ต้น แบ่งเป็นต้นที่แสดงลักษณะต้านทานจำนวน 235 ต้น และต้นที่แสดงลักษณะอ่อนแอจำนวน 15 ต้น วิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคใหม่ว่าเป็นตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) เนื่องจากประชากรที่ศึกษาเป็นประชากรข้าว F_2 หากความต้านทานโรคใหม่ที่ศึกษาถูกควบคุมด้วยยีนเพียงยีนเดียว จะพบการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคใหม่ในอัตราส่วน 3:1 (R:S) ตัวอย่างงานวิจัยของ Prasad *et al.* (2009) วิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคใหม่ในประชากร F_2 จำนวน 184 ต้น ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวพันธุ์ Samba Mahsuri (BPT5204) และ C101LAC ทดสอบการเกิดโรคด้วยเชื้อสาเหตุโรคใหม่ไอโซเลท DRR 001 วิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคใหม่ พบมีการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคใหม่เป็นไปตามอัตราส่วน 3:1 (R:S) แสดงว่ามียีนต้านทานโรคใหม่ที่ควบคุมความต้านทานเพียงยีนเดียว วิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคใหม่ด้วยเครื่องหมาย microsatellite จัดกลุ่มของเครื่องหมายและหาระยะทางระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคใหม่ พบยีนต้านทานโรคใหม่ $Pi-1(t)$ มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 11 แต่จากผลการทดลองนี้พบว่าการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคใหม่ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 3:1 (R:S) แสดงให้เห็นว่าลักษณะต้านทานโรคใหม่ในข้าวพันธุ์ห้วยไม่ได้ถูกควบคุมด้วยยีนเพียงยีนเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM144 และ RM224 จากผลของการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ด้วยการทดสอบการเกิดโรคในประชากรข้าว F₂ ทั้งหมด 250 ต้น ที่พบว่า การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้เป็นไปตามอัตราส่วน 15:1 (R:S) เป็นไปได้ว่าลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ห้วย (GS19769) ถูกควบคุมด้วยยีนหลักที่เป็นยีนเด่นจำนวน 2 ยีน (2 major dominant resistant genes) ดังนั้นเพื่อค้นหา ยีนต้านทานโรคไหม้ที่ควบคุมความต้านทานในข้าวพันธุ์ห้วย (GS19769) จึงคัดเลือกเครื่องหมายที่มีตำแหน่งของเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 7 จำนวน 2 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM11 และ RM1132 เครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 12 จำนวน 2 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM1261 และ RM235 และเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 11 จำนวน 3 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM287, RM5926 และ RM6094 นำมาวิเคราะห์การกระจายตัวในประชากร 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจน พบการเกิดโรคที่ระดับ 5 และ 6 เนื่องจากเป็นประชากรที่มี phenotype ที่ถูกต้องแน่นอน จึงเป็นประชากรที่เหมาะสมสำหรับนำมาวิเคราะห์เพื่อระบุตำแหน่งที่ตั้งของยีนต้านทานโรคไหม้ในการศึกษานี้ เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิด recombination พบว่าเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 7 ได้แก่ เครื่องหมาย RM125, RM11 และ RM1132 เครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 11 ได้แก่ เครื่องหมาย RM287 เครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 12 ได้แก่ เครื่องหมาย RM247, RM1261 และ RM235 ทั้ง 7 เครื่องหมายไม่มีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ ในขณะที่เครื่องหมาย RM144, RM224, RM6094 และ RM5926 พบว่ามีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ ซึ่งตำแหน่งที่ตั้งของเครื่องหมายอยู่บนโครโมโซมที่ 11 จากผลการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ทั้งหมด ช่วยระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ที่ควบคุมความต้านทานโรคไหม้ในการศึกษานี้ โดยพบว่ายีนต้านทานโรคไหม้ 1 ตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 11 และมีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM144, RM224, RM5926 และ RM6094

5.2.4 แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้

จากการวาดแผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเปอร์เซ็นต์ recombination ของยีนต้านทานโรคไหม้ และเปอร์เซ็นต์ recombination ระหว่างแต่ละคู่ของเครื่องหมาย สามารถระบุถึงตำแหน่งที่ตั้งของยีนต้านทานโรคไหม้และระยะห่างระหว่างเครื่องหมายได้ ซึ่งผลที่ได้มีความแตกต่างกันเล็กน้อย เนื่องจากการสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MAPMAKER มีการจัดกลุ่มของเครื่องหมายด้วยค่า logarithm of odds (LOD) = 3.0 ซึ่งหมายถึงโอกาสที่เครื่องหมายที่ถูกจัดกลุ่มอยู่ด้วยกันจะไม่มี ความเชื่อมโยงกันเท่ากับ 0.01 หรือ 1 ใน 1000 แสดงให้เห็นว่าการจัดกลุ่มของเครื่องหมายมีความละเอียดมาก วิเคราะห์ความเชื่อมโยง 1000 ครั้งมีเพียง 1 ครั้ง ที่อาจพบว่าเครื่องหมายไม่มีความเชื่อมโยงกัน เครื่องหมายที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือ เครื่องหมายที่มีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ และมีระยะห่างจากยีนน้อยกว่า 50 cM ซึ่ง ได้แก่ เครื่องหมาย RM144, RM224, RM5926 และ

เอเจนซี่พัฒนาข้าวหอมมะลิเจ้าคุณหมื่น
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

RM6094 การจัดเรียงตัวของแต่ละเครื่องหมายบนโครโมโซม เลือกผลการคำนวณที่แสดงค่า likelihood ที่สูงที่สุด คือ เท่ากับ 0.00 และการคำนวณระยะห่างของเครื่องหมายด้วย Kosambi function โปรแกรมมีคำสั่ง ripple เพื่อใช้ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับการเรียงตัวของเครื่องหมาย และมีคำสั่ง error detection on เพื่อใช้ตรวจสอบความผิดพลาดที่อาจเกิดจากค่า genotype ของประชากร ดังนั้นการสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้โปรแกรม MAPMAKER จึงมีความละเอียดและแม่นยำกว่าการคำนวณเปอร์เซ็นต์ recombination

จากแผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้โปรแกรม MAPMAKER พบว่ายีนต้านทานโรคไหม้มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM144, RM224, RM5926 และ RM6094 โดยมีระยะห่างจากเครื่องหมาย RM144 และ RM224 เป็นระยะทางเท่ากันคือ 13.7 cM ห่างจากเครื่องหมาย RM5926 เป็นระยะทาง 17.1 cM และห่างจากเครื่องหมาย RM6094 เป็นระยะทาง 20.5 cM ยีนต้านทานโรคไหม้มีตำแหน่งตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 11 โดยบริเวณที่พบว่าเป็นที่ตั้งของยีนต้านทานโรคไหม้ นี้เคยมีรายงานพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1* ซึ่งอยู่ระหว่างเครื่องหมาย RZ536 และ RM144 โดยมีระยะห่าง 9.7 cM และ 6.8 cM ตามลำดับ (Liu *et al.*, 2003) พบยีน *Pi-1(t)* ซึ่งอยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM224 และ RM6094 โดยมีระยะห่าง 0 cM และ 23.8 cM ตามลำดับ (Fuentes *et al.*, 2008) พบยีน *Pik* อยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM224 และ RM144 โดยมีระยะห่าง 2.9 cM และ 1.2 cM ตามลำดับ (Jia *et al.*, 2009) พบยีน *Pik-h* อยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM224 และ RM144 โดยมีระยะห่าง 0 cM และ 4 cM ตามลำดับ ยีน *Pik-s* อยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM224 และ RM144 โดยมีระยะห่าง 0 cM และ 2.7 cM ตามลำดับ (Fjellstrom *et al.*, 2004) และพบยีน *Pi-18* มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM224 โดยมีระยะห่าง 11.4 cM (Ahn *et al.*, 2000)

นอกจากนี้เครื่องหมาย RM144 ที่มีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ห้วย (19769) ยังมีความเชื่อมโยงกับ quantitative trait loci (QTL) ที่ต้านทานโรคไหม้หลายยีนด้วยกัน ได้แก่ *qLB12-1* อยู่ระหว่าง RM21 และ RM144, *qNB21-1* อยู่ระหว่าง RM206 และ RM144, *qLB11-3* อยู่ระหว่าง RM206 และ RM144 และ *qNB11-3* อยู่ระหว่าง RM254 และ RM144 (อภิชาติ เนินพลับ และคณะ. 2549) และ Shi *et al.* (2010) รายงานพบตำแหน่งยีน *qtl11-10-4* และ *qtl11-11-1* อยู่ระหว่าง RM27385 และ RM144 ตำแหน่งยีน *qtl11-9-2*, *qtl11-9-2* และ *qtl11-10-4* อยู่ระหว่าง RM27386 และ RM144 ตำแหน่งยีน *qtl11-10-4* และ *qtl11-10-4* อยู่ระหว่าง RM27389 และ RM144 และยังมีการพบตำแหน่งยีน *qBFR-11a* อยู่ระหว่าง RM5474 และ RM144 ตำแหน่งยีน *qBFR-11b* อยู่ระหว่าง RM144 และ RM1341 (Sabouri *et al.*, 2011) และยังพบว่าเครื่องหมาย RM144 และ RM114 นี้มีความเชื่อมโยงกับยีนที่ควบคุมลักษณะอื่นๆ อีก ได้แก่ ยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* เป็นเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง พบยีน *Xa22(t)* อยู่ระหว่าง RM144 และ RM224 (Wang *et al.*, 2003) ยีน *Xa-4* มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM144 (Nguyen *et al.*, 2005) และยีน *Xa35(t)* มีความเชื่อมโยงกับ

เครื่องหมาย RM144 โดยมีระยะห่าง 1.8 cM (Guo *et al.*, 2010) เครื่องหมาย RM144 ยังมีความเชื่อมโยงกับยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown plant hopper, BPH) (Sana *et al.*, 2004) และนอกจากนี้เครื่องหมาย RM144 ยังมีความเชื่อมโยงกับยีนที่ควบคุมลักษณะอื่นๆ เช่น ยีน *qCTP11* ซึ่งเป็นยีน QTL ที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณของความทนต่ออากาศหนาวเย็น (Baruah *et al.*, 2009) ยีน *tgw11* ซึ่งเป็นยีน QTL ที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณของน้ำหนักเมล็ด (Oh *et al.*, 2011) ยีน *qGT-11* ซึ่งเป็นยีน QTL ที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณของคุณภาพเมล็ดข้าวมีตำแหน่งของยีนอยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM144 และ RM1341 (Sabouri. 2009) แม้ว่าบริเวณใกล้เคียงเคยมีการพบยีนต้านทานโรคไหม้ แต่ข้อมูลในปัจจุบันยังไม่สามารถยืนยันได้ว่ายีนที่ค้นพบในงานวิจัยนี้เป็นยีนเดียวกับที่เคยรายงานไว้หรือไม่ งานวิจัยนี้จึงนับว่าเป็นการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ยีนใหม่ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

โรคไหม้เกิดจากเชื้อราสาเหตุ *Pyricularia grisea* เป็นเชื้อราที่มีความสำคัญและเป็นปัญหาต่อการปลูกข้าวในหลายพื้นที่ของประเทศไทย ทำความเสียหายอย่างมากต่อผลผลิตข้าว โดยเฉพาะพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย แนวทางการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพ คือ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวอ่อนแอให้ต้านทานโรคไหม้ แต่เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคไหม้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถปรับตัวให้เข้าทำลายพันธุ์ข้าวต้านทานได้ ส่งผลให้พันธุ์ข้าวต้านทานเดิมสูญเสียความต้านทานลงได้ ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาค้นหา และระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ที่สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์ (pathotypes) ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าวในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ของประเทศไทย จำนวน 19 ไอโซเลท วิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ด้วยเครื่องหมาย *Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) จำนวน 14 เครื่องหมาย พบเครื่องหมาย microsatellite จำนวน 13 เครื่องหมายสามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อราได้ มีค่า PIC (polymorphic information content) ของแต่ละเครื่องหมายอยู่ระหว่าง 0.1 ถึง 0.8 เมื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อราที่ค่าสัมประสิทธิ์ความต่าง 90 เปอร์เซ็นต์ สามารถจัดกลุ่มของเชื้อราได้จำนวน 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่ม 1 ประกอบด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 14 ไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่ระบาดบริเวณภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง กลุ่ม 2 ประกอบด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 3 ไอโซเลท เป็นเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่ระบาดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ นอกจากนี้พบเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่ระบาดบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือถูกจัดกลุ่มแยกออกเป็นเชื้อเดี่ยว ในกลุ่ม 3 และ 4 จากผลการทดลองพบว่าเชื้อที่มีพันธุกรรมเหมือนกันมีการกระจายอย่างกว้างขวางในพื้นที่ปลูกข้าวของประเทศไทย บริเวณที่พบว่ามีกระบาดของโรคไหม้ในจังหวัดเดียวกันพื้นที่ใกล้เคียงกันมีจำนวนเชื้อเข้าทำลายข้าวปลูกได้มากกว่า 1 ไอโซเลท และเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่ระบาดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าบริเวณพื้นที่ปลูกข้าวแหล่งอื่น

ศึกษาปฏิกริยาของยีนต้านทานโรคไหม้โดยทดสอบการเกิดโรคในประชากรข้าว F_2 จำนวน 250 ต้น ที่ได้มาจากการผสมระหว่างพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่อ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้กับข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) ซึ่งเป็นแหล่งพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้ พบการกระจายตัวของลักษณะต้านทาน : อ่อนแอโรคไหม้ในอัตราส่วน 15:1 และในกลุ่มที่แสดงความต้านทาน (15 ใน 16 ส่วน) มีระดับความต้านทานแตกต่างกัน แสดงว่าความต้านทานต่อโรคไหม้ใน

ข้าวพันธุ์ห้วยจากถูกควบคุมด้วยยีนหลักด้านทานโรคใหม่ที่เป็นอิสระต่อกันจำนวน 2 ยีน (two non-linkage major resistant genes) โดยยีน 2 ตำแหน่งนี้มีปฏิริยาระหว่างกันแบบผลบวก-ผลบวก (additive-additive interaction)

การระบุตำแหน่งของยีนด้านทานโรคใหม่โดยใช้เครื่องหมาย microsatellite คัดเลือกเครื่องหมาย microsatellite จาก 230 เครื่องหมายที่ครอบคลุมทุกโครโมโซมข้าว พบ 66 เครื่องหมายสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้ จากนั้นคัดเลือกด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) พบเครื่องหมาย microsatellite เพียง 3 เครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ชัดเจน ได้แก่ เครื่องหมาย RM125, RM144 และ RM224 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 7, 11 และ 11 ตามลำดับ ศึกษาปฏิริยาระหว่างยีนด้านทานโรคใหม่โดยใช้เครื่องหมาย microsatellite ทั้ง 3 เครื่องหมายในประชากรข้าว F_2 จำนวน 250 ต้น พบการกระจายตัวของเครื่องหมายในอัตราส่วน 1:2:1 คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (B): มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่ (H): มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (A) เครื่องหมาย RM144 มีค่า Chi square เท่ากับ 6.024 เมื่อเปรียบเทียบกับตารางที่ df เท่ากับ 2 พบว่ามีค่า Probability (P) เท่ากับ 0.049 หรืออยู่ระหว่าง $0.025 < P < 0.05$ เครื่องหมาย RM224 มีค่า χ^2 เท่ากับ 3.912 เมื่อเปรียบเทียบกับตาราง df เท่ากับ 2 พบว่ามีค่า P เท่ากับ 0.141 หรืออยู่ระหว่าง $0.10 < P < 0.25$ และเครื่องหมาย RM125 มีค่า Chi square เท่ากับ 1.200 เมื่อเปรียบเทียบกับตารางที่ df เท่ากับ 2 พบว่ามีค่า P เท่ากับ 0.549 หรืออยู่ระหว่าง $0.50 < P < 0.75$ แสดงว่าเครื่องหมาย RM125, RM144 และ RM224 สามารถตรวจพบ (detected) ยีนด้านทานโรคใหม่ได้เพียงยีนเดียว เมื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย RM11 และ RM1132 บนโครโมโซม 7 เครื่องหมาย RM287, RM5926 และ RM6094 บนโครโมโซม 11 และเครื่องหมาย RM247, RM235 และ RM1261 บนโครโมโซม 12 เพื่อใช้ยืนยันตำแหน่งของยีนด้านทานโรคใหม่ โดยเลือกใช้ประชากรข้าวที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคใหม่อย่างชัดเจนจำนวน 15 ต้น สำหรับนำมาวิเคราะห์เพื่อระบุตำแหน่งยีนด้านทานโรคใหม่ในการศึกษานี้ วาดแผนที่ระบุตำแหน่งยีนด้านทานโรคใหม่ด้วยเปอร์เซ็นต์ recombination พบเครื่องหมาย RM144, RM224, RM5926 และ RM6094 มีความเชื่อมโยงกับยีนด้านทานโรคใหม่ โดยพบว่ายีนด้านทานโรคใหม่มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM144 และ RM224 มากที่สุดในระยะห่างเท่ากัน 20 cM ทำการจัดกลุ่มและคำนวณหาระยะห่างของแต่ละเครื่องหมาย และระยะห่างของยีนด้านทานโรคใหม่ ด้วยโปรแกรม MAPMAKER และวาดแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapChart พบยีนด้านทานโรคใหม่มีตำแหน่งที่ตั้งอยู่บริเวณปลายโครโมโซม 11 มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM144, RM224, RM5926 และ RM6094 โดยมีระยะห่างจากเครื่องหมาย RM144 และ RM224 เท่ากันคือ 13.7 cM ห่างจากเครื่องหมาย RM5926 17.1 cM และห่างจากเครื่องหมาย RM6094 20.5 cM จากผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคใหม่ประกอบกับผลการศึกษาปฏิริยาระหว่างยีน และการระบุตำแหน่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของยีนต้านทานโรคไหม้ แสดงว่าข้าวพันธุ์ห้วยมีความต้านทานต่อโรคไหม้แบบกว้าง (broad spectrum) สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลต โดยมียีนหลักเป็นยีนข่ม 2 ตำแหน่งที่เป็นอิสระต่อกันควบคุมความต้านทาน โดยเครื่องหมาย RM144, RM224, RM5926 และ RM6094 สามารถตรวจพบยีนต้านทานโรคไหม้ 1 ตำแหน่ง อยู่บริเวณปลายโครโมโซม 11 ดังนั้น ข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) ซึ่งเป็นแหล่งความต้านทานโรคไหม้ที่สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ได้ หรือนำข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) ไปใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการศึกษาค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ เนื่องจากงานวิจัยนี้พบว่าในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วยมียีนหลัก 2 ยีนควบคุมความต้านทานโรคไหม้แต่สามารถระบุตำแหน่งของยีนได้เพียงตำแหน่งเดียวบนโครโมโซม 11 และในการศึกษาควรเลือกใช้ประชากรที่มีการกระจายตัว ในจำนวนมากขึ้นจะช่วยเพิ่มความแม่นยำในการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กฤตกิตติศักดิ์ ไพโรตริจิตต์, อิงออน สีแก้ว, ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์, ธานี ศรีวงษ์ชัย และสุรีพร เกตุงาม. 2554. “การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9, Pi36, Pigm(t)* ในข้าวพื้นเมืองไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ.” **Thai Journal of Genetics** 4(1): 52-62.

จุฑาพร แสงประจักษ์. 2555. “การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ข้าว.” **แก่นเกษตร** 40: 299-308.

ฉวีวรรณ วุฒิญาโณ. 2543. **เอกสารวิชาการพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทย**. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร. 215 หน้า

ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ และสุรีพร เกตุงาม. 2552. “โรคไหม้ในข้าวและสถานการณ์ปัจจุบันของงานวิจัยด้านยีนต้านทานโรคไหม้.” **แก่นเกษตร** 37: 69-78.

ดำเนิน กะละดี. 2541. **เทคโนโลยีการปรับปรุงพันธุ์พืช**. เชียงใหม่: มิ่งเมือง. 256 หน้า

บุญรัตน์ จงดี, สุรพงษ์ สาครรังค์, พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์, ดวงใจ สุริยาอรุณโรจน์ และจิระพงศ์ ใจรินทร์. 2548. “ข้าวหอมสายพันธุ์ใหม่ต้านทานโรคไหม้ IR77924-62-71-1-2.” หน้า 13-36.

ใน การประชุมทางวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว. นครนายก.

บุญหงส์ จงคิด. 2549. **ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 184 หน้า

ปิยะดา ตันตสวัสดิ์. 2554. **การปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ต้านทานศัตรูพืช**. นครราชสีมา: โคราชมาร์เก็ตติ้งแอนด์โปรดักส์ซัน. 197 หน้า

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์, วราพงษ์ ชมาฤกษ์, จิระพงศ์ ใจรินทร์, อุไรวรรณ คชสถิต, อนุชาติ คชสถิต, บุญรัตน์ จงดี, สมใจ สาลีโท, วีระศักดิ์ หอมสมบัติ, อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ และพนินิภา ยาใจ. 2554. “ความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้กับการพัฒนาข้าวต้านทานโรคไหม้.” หน้า 249-266. ใน การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2554. กรุงเทพฯ: โรงแรมอมารี แอร์พอร์ต.

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์, พะยอม โคเบลล์, อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ, ถนอมจิตร ฤทธิมนตรี, กุลชญา เกศสุพรรณ, ชนสิริน กลิ่นมณี และสงวน เทียงดีฤทธิ. 2550. “การตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทย.” **วารสารวิชาการข้าว** 1(1): 52-64.

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2548. **โรคไหม้ข้าว : ความหลากหลายและแนวทางการพัฒนาข้าวต้านทานโรคไหม้**. อุบลราชธานี: กรมวิชาการเกษตร. 61 หน้า

เมทินี กัดมูข, นิตย์ศรี แสงเดือน และวิภา หงษ์ตระกูล. 2552. “การตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทย.” **Thai Journal of Genetics** 2(1): 36-43.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น มิอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิชา ชาติประเสริฐ และคณะสถาบันวิจัยข้าว สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ กรมวิชาการเกษตร.

2544. **ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์:** ข้าว. กรุงเทพฯ : ชุมนุมนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 682 หน้า

ศรีสวัสดิ์ ชันทอง, ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ และสุธีพร เกตุงาม. 2553. “โรคใหม่และการปรับปรุงข้าวต้านทานโรคใหม่โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก.” **Thai Journal of Genetics** 3(2): 106-119.

ศิริภา กออินทร์ศักดิ์, ธีรยุทธ ตูจันดา และ ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์. 2552. “การค้นหายีนต้านทานโรคใหม่ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบไมโครแซทเทลไลท์.” หน้า 1-6. ใน **การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 35**. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.

สงกรานต์ จิตรากร และบริบูรณ์ สมฤทธิ์. 2544. “พัฒนาการพันธุ์ข้าวไทย.” หน้า 29-76. ใน **วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับข้าวไทย**. กรุงเทพฯ:สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

สงกรานต์ จิตรากร. 2544. “ข้าวกับวิถีชีวิตคนไทย.” หน้า 13-28. ใน **วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับข้าวไทย**. กรุงเทพฯ:สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

สมใจ สาลีโท และคณะทำงาน โครงการวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวนาข้าวฝนภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือตอนบน. 2553. RGD334-3-11-1-1-147-1KPS-3 : ข้าวเหนียวต้านทานโรคใหม่สายพันธุ์ดีเด่นสำหรับนาข้าวฝนภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. หน้า 185-198. ใน **เอกสารประกอบการประชุมวิชาการข้าว เนื่องในโอกาสวันข้าวและชาวนาแห่งชาติ ปี 2553**. กรุงเทพฯ

สมใจ สาลีโท และคณะทำงาน โครงการวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวนาข้าวฝนภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือตอนบน. 2554. KKN97057-7-1-1-6-4-NKI-1-1: ข้าวเหนียวหอมอายุเบาต้านทานต่อโรคใหม่สำหรับนาข้าวฝนภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. หน้า 26-24. ใน **การประชุมวิชาการข้าวและัญพืชเมืองหนาวครั้งที่ 2 ปี 2554**. กรุงเทพฯ: ณ โรงแรมอมารีแอร์พอร์ตคอนเมือง.

สมทรง โชติชื่น, เกษม สุนทรจารย์, อภิชาติ ลาวัณย์ประเสริฐ, วาสนา พันธุ์เพ็ง, กัญญา เชื้อพันธุ์, สุนันทา วงศ์ปิยชน, วัชร สุขวิวัฒน์, อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ, นลินี เจียงวรรณนะ, ปิยะพันธ์ ศรีคุ้ม, รณชัย ช่างศรี, เปรมฤดี ปินทยา, ปรีดา เสียงใหญ่, พันนิภา ยาใจ, วันชัย โรจนหัสตินทร์, สุวัฒน์ เจียรระคองมัน และดวงใจ สุริยาอรุณโรจน์. 2554. “แหล่งพันธุกรรมข้าวเพื่อการใช้ประโยชน์.” หน้า 88-100. ใน **การประชุมวิชาการข้าวและัญพืชเมืองหนาวประจำปี 2554**. กรุงเทพฯ: โรงแรมอมารีแอร์พอร์ต.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สมทรง โชติชื่น. 2550. “การอนุรักษ์และใช้ประโยชน์เชื้อพันธุกรรมข้าว : อดีต ปัจจุบัน และอนาคต.” หน้า 262-274. ใน การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวประจำปี 2550. ปทุมธานี : พิพิธภัณฑ์การเกษตรเฉลิมพระเกียรติฯ.
- สำนักงานวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. 2557. “พันธุ์ข้าว.” องค์ความรู้เรื่องข้าว. [Online]. Available : <http://www.brrd.in.th/rkb/varieties/index.php.htm>.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2556. “สถิติการนำเข้าส่งออก.” ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร. [Online]. Available : http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export.php
- สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. 2553. ข้าวขาวดอกมะลิ 105. กรุงเทพฯ:กรมการข้าว. 45 หน้า
- สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว. 2552. องค์ความรู้ด้านศัตรูข้าว. กรุงเทพฯ : กรมการข้าว.
- สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2556. “สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญ และแนวโน้ม ปี 2557.” ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร [Online]. Available; http://www.oae.go.th/download/journal/trends_FEB2557.pdf
- สุรินทร์ ปิยะโชคณกุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 269 หน้า
- สุรีพร เกตุงาม. 2546. “เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช.” วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 5(2): 37-50.
- เสาวลักษณ์ อัคราช, ประภา ศรีพิจิตต์ และธานี ศรีวงศ์ชัย. 2554. “การวิเคราะห์จัดกลุ่มความต้านทานเชื้อโรคใหม่ของข้าวพันธุ์ปรับปรุงด้วยเชื้อที่เก็บรวบรวมใหม่” หน้า581-588. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.
- อนุชาติ กชสถิต และคณะทำงาน โครงการวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวนาสวนน้ำฝนภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระยะที่ 2.2556. UBN03007-47-7-7-26-35-19: ข้าวเจ้าสายพันธุ์ดีเด่นอายุเบาต้านทานโรคไหม้. หน้า 56-71. ใน การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองครั้งที่ 30 ปี 2556. กรุงเทพฯ: โรงแรมมารวยการ์เด็น.
- อภิชาติ เนินพลับ,อภิชาติ วรณวิจิตร, ชีรยุทธ ตูจินดา,ปัทมา ศิณธิ์ธัญญา, สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง, แสงชัย ศรีประโคน และชนากานต์ งามพรหม. 2549. “การทำแผนที่ลักษณะทางปริมาณของความต้านทานต่อโรคใบไหม้และคอรวงไหม้ในประชากรคู่ผสมจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวเจ้าหอมนิล.” หน้า 79-84. ใน การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวประจำปี 2549. เพชรบุรี: ณ โรงแรมลองบีช ชะอำ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ และพูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2552. “ความหลากหลายของ pathotype ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว ในปี 2550/51 และยีนต้านทานกว้างขวางที่เป็นประโยชน์ในภาคเหนือตอนล่าง.” หน้า 208-219. ใน การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวประจำปี 2552. ชลบุรี: ณ โรงแรมซีบีซี จอมเทียน รีสอร์ท พัทยา.
- อิงออน สีแก้ว, ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ และสุริพร เกตุงาม. 2553. “การค้นหายีนต้านทานต่อโรคไหม้ในข้าว (*Pi-d2*) ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยด้วยเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ.” วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น 15(2): 123-131.
- Ahn, S.N., Y.K. Kim, H.C. Hong, S.S. Han, S.J. Kwon, H.C. Choi, H.P. Moon and S.R. McCouch. 2000. “Molecular mapping of a new gene for resistance to rice blast (*Pyricularia grisea* Sacc.)” **Euphytica** 116: 17-22.
- Barman, S.R., M. Gowda, R.C. Venu and B.B. Chattoo. 2004. “Identification of a major blast resistance gene in the rice cultivar “Tetep”.” **Plant Breeding** 123: 300-302.
- Baruah, A.R., N.I. Oka, M. Adachi, Y. Oguma, Y. Tokizono, K. Onishi and Y. Sano. 2009. “Cold tolerance at the early growth stage in wild and cultivated rice.” **Euphytica** 165:459–470.
- Benbouza, H., J.M. Jacquemin, J.P. Baudoin and G. Mergeai. 2006. “Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels.” **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment** 10(2): 77–81.
- Berruyer, R., H. Adreit, J. Milazzo, S. Gaillard, A. Berger, W. Diogh, M.H. Lebrun and D. Tharreau. 2003. “Identification and fine mapping of *Pi33*, the rice resistance gene corresponding to the *Magnaporthe grisea* virulence gene *ACE1*.” **Theoretical and Applied Genetics** 107(6): 1139-1147.
- Bryan, G.T., K.S. Wu, L. Farrall, H.P. Hershey, S.A. McAdams, K.N. Faulk, G.K. Donaldson, R.Tarchini and B.Valent. 2000. “A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*.” **Plant Cell** 12(11):2033–2046.
- Chauhan, S., M.L. Farman, H.B. Zhang and A. Leong. 2002. “Genetic and physical mapping of a rice blast resistance locus, *PiCO39(t)*, that corresponds to the avirulence gene *AVRI-CO39* of *Magnaporthe grisea*.” **Molecular Genetics and Genomics** 267: 603-612.
- Chen, D.H., M.D. Viña, T. Inukai, D.J. Mackill, P.C. Ronald and R.J. Nelson. 1999. “Molecular mapping of the blast resistance gene, *Pi44(t)*, in a line derived from a durably resistant rice cultivar.” **Theoretical and Applied Genetics** 98: 1046-1053.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Chen, X.W., S.G. Li, J.C. Xu, W.X. Zhai, Z.Z. Ling, B.T. Ma, Y.P. Wang, W.M. Wang, G. Cao, Y.Q. Ma, J.J. Shang, X.F. Zhao, K.D. Zhou and L.H. Zhu. 2004. "Identification of two blast resistance genes in a rice variety, Digu." **Phytopathology** 152: 77-85.
- Chen, J., R. Henny, P. Devanand and C. Chao. 2006. "AFLP analysis of nephthytis (*Syngonium podophyllum* Schott) selected from somaclonal variants." **Plant Cell Report** 24(12):743-749.
- Dean, R.A., N.J. Talbot, D.J. Ebbole, M.L. Farman, T.K. Mitchell, M.J. Orbach, M. Thon, R. Kulkarni, J.R. Xu, H. Pan, N.D. Read, Y.H. Lee, I. Carbone, D. Brown, Y.Y. Oh, N. Donofrio, J.S. Jeong, D.M. Soanes, S. Djonovic, E. Kolomiets, C. Rehmeier, W. Li, M. Harding, S. Kim, M.H. Lebrun, H. Bohnert, S. Coughlan, J. Butler, S. Calvo, L.J. Ma, R. Nicol, S. Purcell, C. Nusbaum, J.E. Galagan and B.W. Blrren. 2005. "The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*." **Nature** 434: 980-986.
- Deng, Y., X. Zhu, Y. Shen and Z. He. 2006. "Genetic characterization and new mapping of the blast resistance locus *Pigm(t)* tightly linked to *Pi2* and *Pi9* in a broad-spectrum resistant Chinese variety." **Theoretical and Applied Genetics** 113: 705-713.
- Disthaporn, S. 1994. "Current rice blast epidemics and their management in Thailand." pp. 333-442. In Zeigler, R.S., S.A. Leong and P.S. Teng (eds.). **Rice Blast Disease**. U.K.: CAB International.
- Fjellstrom, R., C.A.C. Bormans, A.M. McClung, M.A. Marchetti, A.R. Shank and W.D. Park. 2004. "Development of DNA markers suitable for marker assisted selection of three *Pigenes* conferring resistance to multiple *Pyricularia grisea* pathotypes." **Crop Science Society of America** 44: 1790-1798.
- Fuentes, J.L., F.J. Correa-Victoria, F. Escobar, G. Prado, G. Aricapa, M.C. Duque and J. Tohme. 2008. "Identification of microsatellite markers linked to the blast resistance gene *Pi-1(t)* in rice." **Euphytica** 160: 295-304.
- Gowda, M., S.R. Barman and B.B. Chattoo. 2006. "Molecular mapping of a novel blast resistance gene *Pi38* in rice using SSLP and AFLP markers." **Plant Breeding** 125(6):596-599.
- Guo, S.B., D.P. Zhang and X.H. Lin. 2010. "Identification and mapping of a novel bacterial blight resistance gene *Xa35(t)* originatd from *Oryza minuta*." **Scientia Agricultura Sinica** 43(13): 2611-2618.
- Huang, H., L. Huang, G. Feng, S. Wang, Y. Wang, J. Liu, N. Jiang, W. Yan, L. Xu, P. Sun, Z. Li, S. Pan, X. Liu, Y. Xiao, E. Liu, L. Dai and G.L. Wang. 2011. "Molecular mapping of the

- new blast resistance genes *Pi47* and *Pi48* in the durably resistant local rice cultivar Xiangzi3150.” **Phytopathology** 101: 620-626.
- He, X.Y., X.Q. Liu, L. Wang, F. Lin, Y.S. Ckeng, Z.M. Chen, Y.P. Liao and Q.H. Pan. 2012. “Identification of the novel recessive gene *Pi55(t)* conferring resistance to *Magnaporthe oryzae*.” **Science China Life Sciences** 55: 141–149.
- Hittalmani, S., A. Parco, T.V. Mew, R.S. Zeigler and N. Huang. 2000. “Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice.” **Theoretical and Applied Genetics** 100(7): 1121-1128.
- Jeon, J.S., D. Chen, G.H. Yi, G.L. Wang and P.C. Ronald. 2003. “Genetic and physical mapping of *Pi5(t)*, a locus associated with broad spectrum resistance to rice blast.” **Molecular Genetics and Genomics** 269(2): 280-289.
- Jeung, J.U., B.R. Kim, Y.C. Cho, S.S. Han, H.P. Moon, Y.T. Lee and K.K. Jena. 2007. “A novel gene, *Pi40(t)*, linked to the DNA markers derived from NBS-LRR motifs confers broad spectrum of blast resistance in rice.” **Theoretical and Applied Genetics** 115(8): 1163-1177.
- Jia, Y., F.N. Lee and A. McClung. 2009. “Determination of resistance spectra of the *Pi-ta* and *Pi-k* genes to U.S. races of *Magnaporthe oryzae* causing rice blast in a recombinant inbred line population.” **Plant Disease** 93:639-644.
- Koide, Y., M.J. Telebanco-Yanoria, F.D. Pen, Y. Fukuta and N. Kobayashi. 2011. “Characterization of rice blast isolates by the differential system and their application for mapping a resistance gene, *Pi19(t)*.” **Journal of Phytopathology** 159: 85–93.
- Koide, Y., N. Kobayashi, D. Xu and Y. Fukuta. 2009. “Resistance genes and selection DNA markers for blast disease in rice (*Oryza sativa* L.)” **Japan Agricultural Research Quarterly** 43(4): 255-280.
- Kwon, S.W., Y. Cho and Y. Kim. 2008. “Development of nearisogenic Japonica rice lines with enhanced resistance to *Magnaporthe grisea*.” **Molecular Cells** 25(3): 407-416.
- Li, J., D. Li, Y. Sun, and M. Xu. 2012. “Rice blast resistance gene *Pi1* identified by marker in 173 Yunnan rice landraces.” **Rice Genomics and Genetics** 3(3): 13-18.
- Li, W., C. Lei, Z. Cheng, Y. Jia, D. Huang, J. Wang, J. Wang, X. Zhang, N. Su, X. Guo, H. Zhai and W. Jianmin. 2008. “Identification of SSR markers for a broad-spectrum blast resistance gene *Pi20(t)* for marker assisted breeding.” **Molecular Breeding** 22: 141-149.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Lin, F., Y. Liu, L. Wang, X. Liu and Q. Pan. 2007. "A high-resolution map of the rice blast resistance gene *Pi15* constructed by sequence ready markers." **Plant Breeding** 126(3):287–290.
- Lin, F., Y. Liu, L. Wang, X. Liu and Q. Pan. 2007. "A high-resolution map of the rice blast resistance gene *Pi15* constructed by sequence ready markers." **Plant Breeding** 126(3):287–290.
- Lincoln, S.E., M.J. Daly and E.S.Lander. 1993. **Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP version 3.0: A tutorial and reference manual**. Cambridge: Whitehead Institute for Biomedical Research.
- Liu, X., F. Lin, L. Wang and Q. Pan. 2007. "The in silico map-based cloning of *Pi36*, a rice coiled-coil–nucleotide binding site–leucine-rich repeat gene that confers race specific resistance to the blast fungus." **Genetics** 176:2541–2549.
- Liu, X.Q., L. Wang, S. Chen, F. Lin and Q.H. Pan. 2005. "Genetic and physical mapping of *Pi36(t)*, a novel rice blast resistance gene located on rice chromosome 8." **Molecular Genetics and Genomics** 274(4): 394-401.
- Liu, S.P., X. Li, C.Y. Wang, X.H. Li and Y.Q. He. 2003. "Improvement of resistance to rice blast in Zhenshan 97 by molecular marker-aided selection." **Acta Botanica Sinica** 45(11): 1346-1350.
- Morgan, T.H. 2008. "Genetic recombination and gene mapping." **Nature Education** 1(1):205.
- Matsumoto, C., K. Kageyama, H. Suga and M. Hyakumachi. 1999. "Phylogenetic relationships of *Pythium* species based on ITS and 5.8S sequences of the ribosomal DNA." **Mycoscience** 40(4): 321-331.
- Matsushita, K., N. Yasuda, Thinlay, S. Koizumi, T. Ashizawa, Y. Sunohara, S. Iida, O. Ideta, H. Maeda and Y. Fujita. 2011. "A novel blast resistance locus in a rice (*Oryza sativa* L.) cultivar, Chumroo, of Bhutan." **Euphytica** 180: 273-280.
- Miah, G., M.Y. Rafii, M.R. Ismail, A.B. Puteh, H.A. Rahim, R. Asfaliza and M.A. Latif. 2012. "Blast resistance in rice: a review of conventional breeding to molecular approaches." **Molecular Biology Reports** 40(3): 2369-2388.
- Nguyen, T.T.T., S. Koizumi, T.N. La, K.S. Zenbayashi, T. Ashizawa, N. Yasuda, I. Imazaki and A. Miyasaka. 2006. "*Pi35(t)*, a new gene conferring partial resistance to leaf blast in the rice cultivar Hokkai 188." **Theoretical and Applied Genetics** 113: 697-704.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nguyen, V.P., T.L.Nguyen and C.B.Bui. 2005. "STS and microsatellite marker-assisted selection for bacterial blight resistance in rice, *Oryza sativa* L." **Omonrice** 13:18-25.

Oh, J.M., S. Balkunde, P. Yang, D.B. Yoon and S.N. Ahn. 2011. "Fine mapping of grain weight QTL, *tgw11* using near isogenic lines from a cross between *Oryza sativa* and *O. grandiglumis*." **Genes and Genomics** 33: 259-265.

Ou, S.H. 1985. **Rice Diseases**. Great Britain: The Cambrian New Ltd. 380 p.

Pan, Q., L. Wang, H. Ikchashi and T. Tanisaka. 1996. "Identification of a new blast resistance gene in the indica rice cultivar Kasalath using Japanese differential cultivars and isozyme markers." **The American Phytopathological Society** 86(10): 1071-1075.

Prasad, M.S., B.A. Kanthi, S.M. Balachandran, M. Seshumadhav, K.M. Mohan and B.C. Viraktamath. 2009. "Molecular mapping of rice blast resistance gene *Pi-1(t)* in the elite indica variety *Samba mahsuri*." **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 25: 1765-1769.

Qu, S.H., G.F. Liu, B. Zhou, M. Bellizzi, L.R. Zeng, L.Y. Dai, B. Han and G.L. Wang. 2006. "The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes an NBS-LRR protein and is a member of a multigene family in rice." **Genetics** 172(3):1901-1914.

Roumen, E., M. Levy and J.L. Notteghem. 1977. "Characterization of the European pathogen population of *Magnaporthe grisea* by DNA finger printing and pathotype analysis." **European Journal of Plant Pathology** 103: 365-371.

RoyChowdhury, M., Y. Jia, A.K. Jackson, M.H. Jia, R.G. Fjellstrom and R. Cartwright, 2012. "Analysis of rice blast resistance gene *Pi-z* in rice germplasm using pathogenicity assays and DNA markers." **Euphytica** 184: 35-46.

Sabouri, H. 2009. "QTL detection of rice grain quality traits by microsatellite markers using an indica rice (*Oryza sativa* L.) combination." **Journal of Genetics** 88(1):81-85.

Sabouri, H., A.Sabouri, M.R.Jafarzadeh and M.Mollashah. 2011. "Detection of QTLs controlling field blast resistance in rice (*Oryzasativa* L.)." **Plant Omics Journal** 4(1): 1-5.

Salih, A., T. Sreewongchai, P. Sripichitt and N. Parinthawong. 2013. "Identification of blast resistant varieties from landrace, improved and wild species of rice." **Kasetsart Journal (Natural Science)** 47: 1-7.

Sallaud, C., M. Lorieux, E. Roumen, D. Tharreau, R. Berruyer, P. Svestasrani, O. Garsmeur, A. Ghesquiere and J.L. Notteghem. 2003. "Identification of five new blast resistance genes in

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy.” **Theoretical and Applied Genetics** 106: 794-803.
- Sana, E.A., J.E. Hernandez and D.S. Brar. 2004. “Molecular tagging of genes for brown planthopper resistance introgressed from the tetraploid wild species *Oryzaminutainto* rice (*O. sativa*).” **Philippine Journal of Crop Science** 29:59.
- Sreewongchai, T., T. Toojinda, N. Thanintorn, C. Kosawang, A. Vanavichit, D. Tharreau, and P. Sirithunya. 2010. “Development of elite indica rice lines with wide spectrum of resistance to Thai blast isolates by pyramiding multiple resistance QTLs.” **Plant Breeding** 129: 176-180.
- Sharma, T.R., M.S. Madhav and B.K. Singh. 2005. “High-resolution mapping, cloning and molecular characterization of the *Pi-kh* gene of rice, which confers resistance to *Magnaporthe grisea*.” **Molecular Genetics and Genomics** 274(6): 569-578.
- Shi, X., J. Wang, Y. Bao, P. Li, L. Xie, J. Huang and H. Zhang. 2010. “Identification of the quantitative trait loci in japonica rice landrace Heikezijing responsible for broad-spectrum resistance to rice blast.” **Phytopathology** 100: 822-829.
- Sirithunya, P., T. Sreewongchai, S. Sriprakhon, T. Toojinda, S. Pimpisithavorn, C. Kosawang and P. Smitamana. 2008. “Assessment of genetic diversity in Thai isolates of *Pyriculariagrisea* by random amplification of polymorphic DNA.” **Phytopathology** 156: 196-204.
- Tabien, R.E., Z. Li, A.H. Paterson, M.A. Marchetti, J.W. Stansel and S.R.M. Pinson. 2000. “Mapping of four major rice blast resistance genes from ‘Lemont’ and ‘Teqing’ and evaluation of their combinatorial effect for field resistance.” **Theoretical and Applied Genetics** 101: 1215-1225.
- Terashima, T. S. Fukuoka, N. Saka and S. Kudo. 2008. “Mapping of a blast field resistance gene *Pi39(t)* of elite rice strain Chubu 111.” **Plant Breeding** 127:485-489.
- Valent, B. and F.G. Chumley. 1994. “Avirulence genes and mechanisms of genetic instability in the rice blast fungus.” pp. 111-134. In Zeigler, R.S., S.A. Leong and P.S. Teng (eds.). **Rice Blast Disease**. U.K.: CAB International.
- Voorrips, R.E. 2002. “MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs.” **The Journal of Heredity** 14:77-78.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Wang, C., M. Tan, X. Xu, G. Wen, D. Zhang and X.Lin. 2003. "Localizing the bacterial blight resistance gene, *Xa22(t)*, to a 100-kilobase bacterial artificial chromosome." **Phytopathology** 93(10): 1250-1262.
- Wu, J.L., P.K. Sinha, M.Varivar, K.L. Zheng, J.E. Leach, B.Courtois and H. Leung. 2004. "Association between molecular markers and blast resistance in an advanced backcross population of rice." **Theoretical and Applied Genetics** 108(6):1024–1032.
- Yu, Z., D.J. Mackill, J.M. Bonman and S.D. Tanksley. 1996. "RFLP tagging of blast resistance genes in rice." pp. 451-458. In **Proceedings of the Second International Rice Genetics Symposium**. Philippines.
- Zenbayashi, K., T.Ashizawa, T.Tani and S. Koizumi.2002."Mapping of the QTL (quantitative trait locus) conferring partial resistance to leaf blast in rice cultivar Chubu 32." **Theoretical and Applied Genetics** 104(4): 547-552.
- Zeng, X.S., X.F. Yang, Z.H. Zhao, F. Lin, L. Wang and Q.H. Pan. 2011. "Characterization and fine mapping of the rice blast resistance gene *Pta*." **Science China Life Sciences** 54: 372–378.
- Zheng, Y., G. Zhang, F. Lin, Z. Wan, G. Jin, L. Yang, Y. Wang, X. Chen, Z. Xu, X. Zhao, H. Wang, J. Lu, G. Lu and W. Wu. 2008. "Development of microsatellite markers and construction of genetic map in rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*." **Fungal Genetics and Biology** 45: 1340–1347.
- Zhou, J.H., J.L. Wang, J.C. Xu, C.L. Lei and Z.Z. Ling. 2004. "Identification and mapping of rice blast resistance gene *Pi-g(t)* in the cultivar Guangchangzhan." **Plant Pathology** 53: 191-196.
- Zhou, E., Y.Jia, F.N. Lee, M. Lin, M.Jia, J.C.Correll and R.D. Cartwright. 2005. "Evidence of the instability of a telomeric *Magnaporthe grisea* virulence gene *AVR-Pita* in the US." **Phytopathology** 95(6):118.
- Zhu, M., L. Wang and Q.H. Pan. 2004. "Identification and characterization of a new blast resistance gene located on rice chromosome 1 through linkage and differential analyses." **Phytopathology** 94: 515-519.



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การเตรียมสารละลาย

1.1) lysis buffer

50 mM	Tris-HCl (pH 7.5)
50 mM	EDTA
3 %	SDS
1 %	β -merceptoethanol

เตรียมสารละลายแยกกัน Tris-HCl (pH 7.5) และ EDTA นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นผสมสารละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 20 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เติม β -merceptoethanol ก่อนใช้งาน

1.2) phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25: 24: 1)

Phenol	25	มิลลิลิตร
Chloroform	24	มิลลิลิตร
isoamyl alcohol	1	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากัน เทใส่ขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

1.3) 1X TE buffer

10 mM Tris-HCl (pH 8)	1000	ไมโครลิตร
1 mM EDTA	100	ไมโครลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4) 6 % acrylamide gel

acrylamide solution 40 %	120	มิลลิลิตร
urea	336.56	กรัม
10X TBE	80	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย 10X TBE กับ urea เมื่อละลายเข้าด้วยกันแล้วเติม acrylamide solution 40 % ปรับปริมาตรให้ได้ 800 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองใส่ขวดที่ห่อด้วย foil

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5) Glass Bond

Glass Bond	2	มิลลิลิตร
------------	---	-----------

Water (pH 3.5)	500	มิลลิลิตร
----------------	-----	-----------

เตรียมน้ำกลั่นมาเชื้อ 500 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 3.5 ด้วย glacial acetic acid ประมาณ 50 ไมโครลิตร เติม Glass Bond ผสมให้เข้ากัน

1.6) 10X TBE buffer

Tris-HCl	109.026	กรัม
----------	---------	------

Boric acid	55.647	กรัม
------------	--------	------

EDTA	2.923	กรัม
------	-------	------

ผสมสารละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.7) CTAB extraction buffer

CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide)	2	กรัม
---	---	------

1 M Tris-HCl (pH=8)	10	มิลลิลิตร
---------------------	----	-----------

0.5 M EDTA pH 8.0	4	มิลลิลิตร
-------------------	---	-----------

5 M NaCl	28	มิลลิลิตร
----------	----	-----------

PVP 40 (polyvinylpyrrolidone)	1	กรัม
-------------------------------	---	------

0.2 % β -mercaptoethanol		
--------------------------------	--	--

ผสมสารละลาย CTAB, Tris-HCl (pH=8), EDTA pH 8.0 และ NaCl ให้เข้ากันปรับปริมาตร ให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนใช้งานดูดสารละลายมา 10 มิลลิลิตร เติม PVP 40 ผสม สารละลายให้เข้ากันโดยใช้ความร้อนและเติม β -mercaptoethanol ก่อนใช้งาน

1.8) chloroform:isoamyl alcohol (24: 1)

Chloroform	48	มิลลิลิตร
------------	----	-----------

isoamyl alcohol	2	มิลลิลิตร
-----------------	---	-----------

ผสมสารละลายให้เข้ากัน เทใส่ขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.9) sequencing dye

Formamide	49	มิลลิลิตร
0.1 % bromphenol blue	12.5	มิลลิลิตร
Xylene cyanol	0.0125	กรัม
EDTA	1	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1) Rice Flour Agar (RFA)

Rice flour	20	กรัม
Yeast extract	2	กรัม
Agar powder	20	กรัม

ผสมรวมกันปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.2) Yeast Extract Glucose (YEG)

Yeast Extract	2	กรัม
Glucose	20	กรัม

ผสมรวมกันปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.3) Water Agar (WA)

Agar powder	20	กรัม
Water	1000	มิลลิลิตร

ผสมรวมกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ข
ผลวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวชั่วที่ 2
(F₂) จำนวน 250 ต้น ด้วยเครื่องหมาย microsatellite

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 ผลวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าว F₂ จำนวน 250 ต้น ด้วยเครื่องหมาย microsatellite

	phenotype	genotype			phenotype		genotype		
		RM144	RM224	RM125			RM144	RM224	RM125
KDML105	5	A	A	A	32	0	A	A	H
Huai	0	B	B	B	33	0	B	B	B
1	0	H	H	H	34	0	A	A	A
2	0	H	H	H	35	0	A	A	H
3	0	H	H	B	36	0	A	A	H
4	0	H	H	A	37	0	H	H	H
5	0	B	B	H	38	1	H	H	H
6	0	A	A	H	39	0	H	B	A
7	0	B	B	H	40	1	A	A	H
8	0	H	H	A	41	0	H	H	H
9	0	H	H	A	42	1	H	A	A
10	2	B	B	B	43	2	H	H	H
11	0	B	B	B	44	2	H	H	A
12	0	A	A	A	45	1	H	H	H
13	0	B	B	A	46	0	H	H	A
14	0	A	A	H	47	2	H	H	B
15	0	A	A	H	48	0	H	H	H
16	0	B	B	H	49	1	H	H	H
17	0	A	A	H	50	0	B	B	A
18	0	H	H	A	51	0	H	H	B
19	0	A	A	A	52	0	H	H	A
20	0	B	B	H	53	0	H	H	A
21	0	A	A	H	54	0	H	H	B
22	0	H	H	H	55	0	B	B	A
23	2	H	H	A	56	0	H	H	B
24	0	A	A	H	57	2	H	H	A
25	0	H	H	H	58	0	H	H	H
26	0	H	H	H	59	1	B	B	H
27	0	B	B	H	60	0	A	H	A
28	0	H	H	H	61	0	H	H	H
29	0	H	H	H	62	1	B	B	H
30	0	A	A	H	63	1	H	H	H
31	0	H	H	H	64	1	A	H	A

* 0-6 คือ ระดับคะแนนการเกิดโรคตามวิธีของ Roumen *et al.* (1997)

** A คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่, B คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ, H คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ผลวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าว F_2 จำนวน 250 ต้น ด้วยเครื่องหมาย microsatellite

	phenotype		genotype			phenotype		genotype		
			RM144	RM224	RM125			RM144	RM224	RM125
65	2	H	H	A		98	0	A	A	B
66	0	H	A	H		99	0	A	A	B
67	1	H	H	A		100	0	B	B	H
68	0	B	B	B		101	2	H	H	A
69	2	A	A	H		102	1	B	B	A
70	1	B	B	A		103	0	H	H	A
71	2	H	H	B		104	0	H	H	H
72	2	B	B	B		105	0	B	H	H
73	0	A	A	H		106	1	H	H	H
74	1	A	A	H		107	0	H	H	B
75	2	A	A	H		108	0	H	A	A
76	2	H	H	B		109	2	H	H	H
77	2	H	H	B		110	0	B	B	H
78	1	H	H	H		111	2	A	A	H
79	2	A	A	H		112	0	H	H	B
80	1	H	H	H		113	2	H	A	B
81	0	H	H	H		114	0	H	H	H
82	1	H	H	A		115	0	A	A	B
83	1	H	H	H		116	1	H	H	B
84	1	A	A	B		117	1	A	A	H
85	1	H	H	H		118	1	H	H	H
86	1	H	H	B		119	1	A	A	H
87	0	A	A	H		120	2	H	H	B
88	0	A	H	H		121	1	H	H	A
89	1	H	H	H		122	2	H	H	H
90	0	H	H	H		123	2	B	B	A
91	0	A	A	A		124	3	H	B	B
92	0	H	H	H		125	3	A	H	B
93	0	A	A	H		126	3	H	H	H
94	0	A	A	H		127	3	H	H	B
95	0	A	A	A		128	4	B	B	H
96	0	H	H	B		129	3	H	H	B
97	1	H	H	H		130	3	A	A	A

* 0-6 คือ ระดับคะแนนการเกิดโรคตามวิธีของ Roumen *et al.* (1997)

** A คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่, B คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ, H คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ผลวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าว F₂
จำนวน 250 ต้น ด้วยเครื่องหมาย microsatellite

	phenotype		genotype			phenotype		genotype		
			RM144	RM224	RM125			RM144	RM224	RM125
131	3	H	B	A	164	5	H	H	H	
132	3	B	B	B	165	0	B	B	H	
133	3	H	H	H	166	1	H	H	A	
134	3	B	B	B	167	0	H	H	B	
135	3	B	B	A	168	2	A	A	B	
136	3	H	H	A	169	0	B	B	H	
137	4	H	H	A	170	0	B	B	H	
138	3	A	A	A	171	0	H	H	B	
139	3	H	H	B	172	0	A	A	B	
140	3	H	H	H	173	0	H	H	B	
141	3	A	H	H	174	1	H	H	A	
142	3	B	B	H	175	0	B	B	H	
143	3	B	B	B	176	0	H	H	B	
144	3	H	H	H	177	0	B	B	H	
145	3	H	H	H	178	0	H	H	H	
146	3	H	H	A	179	0	H	H	B	
147	3	B	B	A	180	1	H	H	A	
148	3	H	H	H	181	0	H	H	A	
149	3	A	A	H	182	0	A	A	H	
150	3	H	H	B	183	1	H	H	B	
151	3	A	A	A	184	0	H	H	A	
152	3	H	H	H	185	2	B	B	B	
153	3	H	H	B	186	0	H	B	H	
154	3	A	A	H	187	0	B	B	H	
155	3	H	H	B	188	0	B	B	B	
156	4	A	A	H	189	0	A	A	H	
157	5	A	A	H	190	0	H	H	H	
158	5	B	B	H	191	2	H	A	A	
159	5	A	A	A	192	2	H	H	A	
160	5	A	A	H	193	0	H	H	A	
161	5	A	A	A	194	0	A	A	H	
162	5	A	A	H	195	0	B	B	H	
163	5	H	H	A	196	0	H	H	B	

* 0-6 คือ ระดับคะแนนการเกิดโรคตามวิธีของ Roumen *et al.* (1997)

** A คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่, B คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ, H คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สวอนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ) ผลวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าว F_2 จำนวน 250 ต้น ด้วยเครื่องหมาย microsatellite

	phenotype		genotype			phenotype		genotype		
			RM144	RM224	RM125			RM144	RM224	RM125
197	0	B	B	H	224	0	B	B	H	
198	0	H	H	A	225	0	H	H	H	
199	0	A	H	H	226	0	H	H	H	
200	0	H	H	H	227	0	B	B	H	
201	0	A	H	A	228	0	H	H	H	
202	0	H	H	H	229	0	H	H	H	
203	0	H	H	H	230	0	H	H	H	
204	0	H	H	H	231	0	A	A	A	
205	0	H	H	H	232	0	B	B	H	
206	0	A	H	B	233	0	H	H	A	
207	0	H	H	A	234	2	H	H	B	
208	0	H	H	B	235	3	A	A	H	
209	0	H	H	A	236	3	A	H	H	
210	0	H	H	A	237	4	H	H		
211	0	A	A	A	238	3	A	A	H	
212	0	H	H	B	239	3	A	H	H	
213	0	A	H	A	240	4	B	B	H	
214	0	H	H	H	241	3	A	A	H	
215	0	H	H	H	242	4	A	A	B	
216	0	H	H	H	243	4	A	A	H	
217	0	H	H	A	244	5	A	A	H	
218	0	H	H	H	245	5	A	A	A	
219	0	H	H	H	246	6	A	A	A	
220	0	B	B	H	247	5	A	A	H	
221	1	H	H	B	248	5	A	A	H	
222	0	B	B	H	249	5	A	A	A	
223	0	B	B	A	250	6	A	A	H	

* 0-6 คือ ระดับคะแนนการเกิดโรคตามวิธีของ Roumen *et al.* (1997)

** A คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่, B คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ, H คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	เพ็ญภา ตันเชียน
วัน เดือน ปีเกิด	14 กันยายน พ.ศ. 2531
ที่อยู่ปัจจุบัน	55 หมู่ 6 ตำบลพีชอุดม อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี 12520
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2553 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ทุนวิจัยที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ภายใต้โครงการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา <i>Pyricularia grisea</i> จากแหล่งพันธุกรรมข้าวพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย ทุนสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERODCHE) กองทุนสนับสนุนการศึกษาและค้นคว้าวิจัยเพื่อทำวิทยานิพนธ์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	เพ็ญภา ตันเชียน, ธาณี ศรีวงศ์ชัย และ นงลักษณ์ เกรินทวงศ์. 2557. "วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์." หน้า 400-406. ใน การประชุมวิชาการครั้งที่ 52 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เล่มที่ 1 สาขาพืช. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้