การปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานโรคไหม้โดยวิธีผสมกลับในประชากรผสมกลับรอบที่ 3 และ 4

IMPROVEMENT OF KDML105 FOR RESISTANCE TO RICE BLAST DISEASE BY BACKCROSS METHOD IN BC_3 AND BC_4 GENERATIONS

รุ่งอรุณ พูนสิน

RUNGARUN POONSIN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาเกษตรศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2565

KMITL-2022-AR-M-065-367

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

IMPROVEMENT OF KDML105 FOR RESISTANCE TO RICE BLAST DISEASE BY BACKCROSS METHOD IN BC_3 AND BC_4 GENERATIONS

RUNGARUN POONSIN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURE

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2022

KMITL-2022-AR-M-065-367

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2022

FACULTY 0F AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานโรคไหม้ โดยวิธีผสมกลับในประชากรผสมกลับรอบที่ 3 และ 4
นักศึกษา	นางสาว รุ่งอรุณ พูนสิน
รหัสประจำตัว	58604017
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เกษตรศาสตร์
พ.ศ.	2565
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงลักษณ์ เภรินทวงค์

บทคัดย่อ

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้เป็นเป้าหมายที่สำคัญอย่างหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของไทย ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) เป็นข้าวที่มีกลิ่นหอมและมีคุณภาพการหุงต้มดี แต่พบว่าเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ การวิจัยนี้ทำการศึกษาความต้านทานโรคไหม้ของข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) ต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ 25 ไอโซเลท และประเมินความต้านทานโรคหลังปลูกเชื้อ 7 วัน พบว่าข้าวพันธุ์ห้วยมีศักยภาพต้านทานต่อเชื้อราทุกไอโซเลทได้ในระดับสูง และทำการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีนต้านโรคจำนวน 8 ยีน ในข้าวพันธุ์ห้วย พบยีนต้านทานโรคไหม้ 2 ยีน คือ *Pigm(t)* และ *Pi54* (*Pikh*) ดังนั้นข้าวพันธุ์ห้วยจึงเป็นแหล่งพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้ที่สำคัญ สามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ได้ โครงการวิจัยเรื่อง การปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ต้านทานโรคไหม้ด้วยยีนต้านทานจากข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย ประจำปี พ.ศ. 2558 จึงได้ทำการผสมระหว่างข้าวพันธุ์ห้วย (พันธุ์ให้) กับขาวดอกมะลิ 105 (พันธุ์รับ) และผสมกลับไปหาพันธุ์รับ ได้ข้าวลูกผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 2 (BC_2F_2) งานวิจัยนี้จึงได้นำข้าวลูกผสม BC_2F_2 จำนวน 283 ต้น ปลูกทดสอบการเกิดโรคไหม้โดยใช้เชื้อราจำนวน 25 ไอโซเลท เพื่อคัดเลือกต้นที่มีลักษณะต้านทาน ผลการทดสอบพบอัตราส่วนการกระจายตัวของพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าว BC_2F_2 อัตราส่วน 3:1 (R:S) แสดงถึงลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ห้วยถูกควบคุมด้วยยีนหลัก (major gene) จำนวน 1 ยีน โดยยีนควบคุมความต้านทานเป็นยีนเด่น จากนั้นทำการคัดเลือกต้นที่มีระดับการเกิดโรค 0 – 2 เพื่อสร้างประชากรข้าวลูกผสมกลับครั้งที่ 3 (BC_3) และครั้งที่ 4 (BC_4) พร้อมทั้งใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro OSR19 และ RM457 ช่วยในการคัดเลือกลักษณะความหอม ลักษณะอะไมโลสต่ำ และลักษณะต้านทานโรคไหม้ ตามลำดับ จากการดำเนินงานสามารถสร้างประชากรข้าวลูกผสมกลับครั้งที่ 4 ชั่วที่ 1 (BC_4F_1) ที่มีลักษณะที่ต้องการจำนวน 2 ต้น และปล่อยให้มีการผสมตัวเองเพื่อสร้างเมล็ดพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประชากรลูกผสมกลับครั้งที่ 4 ชั่วที่ 2 (BC_4F_2) ได้จำนวนเมล็ดทั้งหมด 50 เมล็ด ซึ่งจะนำไปใช้เพื่อการพัฒนาพันธุ์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Improvement of KDML105 resistance to rice blast disease by backcross method for BC_3 and BC_4 generations
Student	Miss Rungarun Poonsin
Student ID Degree	58604017
Program	Agriculture
The year	2022
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Nonglak Parinthawong

ABSTRACT

Breeding of rice for blast resistance variety is one of the main objectives of the rice breeding program in Thailand. Khao Dawk Mali 105 (KDML105) is a premium rice as its natural aroma and good cooking quality. However, KDML105 is susceptible to blast disease. A Thai indigenous rice variety, Huai (GS19769) has been reported to show high resistance to blast disease. In this research, blast disease resistance assessment on Huai variety was conducted by inoculation each of 25 blast isolates. The result showed that Huai has ability to resist all tested isolates. Eight blast resistance genes in Huai variety were investigated using PCR technique with gene specific primers and 2 resistance genes included *Pig(m(t)* and *Pi54* (*Pikh*) were found. The results revealed that Huai variety is a good resource for blast resistant characters and should be suitable as resistance donor for blast resistance breeding program. Therefore, the populations of BC_2F_2 between Huai and KDML105 from the previous research project "Improvement of Blast Disease Resistance in KDML105 Rice Using Huai Variety of Thai Indigenous Rice" were subjected to continue in this study. A total of the 283 seeds of BC_2F_2 were screened for blast resistance lines after inoculation of mix 25 blast isolates. The segregation of the genetic control of blast resistance showed a goodness of fit to the ratio 3:1. The result suggested that 1 major resistance gene controlled resistant phenotype. A total of 34 BC_2F_2 lines that show resistance phenotype were tested for amylose content using DNA marker, OSR19 and also chemical technique. Other DNA markers, Naro and RM457, were also used to prove the aromatic and blast resistance characters in BC_2F_2 before generating the BC_3F_1. The blast resistant screening showed that all 6 BC_3F_1 were resistant and therefore were used to generate BC_4F_1. Total of 2 BC_4F_1 plants which carrying all 3 desirable traits; blast resistance, low amylose and aromatic properties were obtained, and produced 50 BC_4F_2 to be used as source for further blast resistance breeding program.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. นงลักษณ์ เภรินทวงค์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาได้ให้คำปรึกษาทั้งในด้านการศึกษา การทำงานวิจัย คำแนะนำ ตลอดจนตรวจแก้วิทยานิพนธ์ให้สำเร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ปัฐวิภา สงกุมาร ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. ธีรวัฒน์ ศรุตโยภาส และ รศ.ดร. พรหมมาศ คูหากาญจน์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ ในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้อันเป็นประโยชน์ให้ข้าพเจ้าได้นำไปประยุกต์ใช้ในการดำเนินงานวิจัย และจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ พี่ๆ และน้อง ๆ ห้องปฏิบัติการโรคไหม้ข้าว สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกๆคน ที่ให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนเป็นกำลังใจที่ดีให้แก่ข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่มอบทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 และสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (สวก.)

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้ความรัก กำลังใจ และการสนับสนุนกำลังทรัพย์ จนกระทั่งสำเร็จการศึกษา และสำเร็จเป็นวิทยานิพนธ์เล่มนี้

รุ่งอรุณ พูนสิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย……....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……....	III
กิตติกรรมประกาศ……..…...	IV
สารบัญ……...	V
สารบัญตาราง……....	X
สารบัญตารางผนวก…….....	XI
สารบัญภาพ……	XII
บทที่ 1 บทนำ……..……....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……....…….....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....……	2
1.3 สถานที่ดำเนินงาน……...	3
1.4 วิธีดำเนินการศึกษา…….....	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……...	4
2.1 ข้าวและความสำคัญ……..……	4
2.2 ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML105)……..…….....	5
2.3 โรคไหม้ของข้าว (Rice Blast Disease) …….....	6
2.3.1 ประวัติ…….....	6
2.3.2 ลักษณะอาการ การเข้าทำลาย และการแพร่ระบาดของโรคไหม้……	6
2.3.2.1 ลักษณะอาการของโรคไหม้.....….....	6
2.3.2.2 การเข้าทำลาย.....……...	7
2.3.2.3 การแพร่ระบาด……..……...	7
2.3.3 ความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว……..……	9
2.4 แหล่งความต้านทานโรคไหม้……..…	10
2.5 ข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769)……..….....	12
2.6 พันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะการหุงต้มและความหอมในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105……..……...….....	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6.1 คุณภาพการหุงต้ม..... 13
2.6.2 ความหอมของข้าวและสารหอมในข้าว..... 15
2.7 การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีผสมกลับ (backcross: BC) 19
2.8 การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืช..... 20

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย..... 22
3.1 อุปกรณ์และวัสดุการวิจัย..... 22
3.1.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้ทดสอบ..... 22
3.1.2 ปุ๋ยเคมี..... 22
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อรา..... 22
3.1.4 สารเคมี..... 22
3.1.5 ดีเอ็นเอมาตรฐาน..... 23
3.1.6 เครื่องหมายดีเอ็นเอ..... 23
3.1.7 อุปกรณ์..... 23
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย..... 24
3.2.1 การประเมินลักษณะต้านทานโรคไหม้บนข้าวพื้นเมืองพันธุ์ห้วย..... 24
3.2.1.1 การเตรียมข้าวสำหรับทดสอบ..... 24
3.2.1.2 การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรคไหม้..... 24
3.2.1.3 การปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้..... 27
3.2.1.4 การประเมินความต้านทานโรคไหม้..... 27
3.2.2 การตรวจสอบปริมาณอะไมโลสโดยวิธีเคมี..... 27
3.2.3 การตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้บนข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย และข้าวพันธุ์แนะนำของไทย..... 28
3.2.3.1 การสกัดดีเอ็นเอใบข้าว..... 28
3.2.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR..... 28
3.2.4 การสร้างประชากรข้าวลูกผสมและการคัดเลือกลูกผสม ในประชากร BC_2F_2..... 31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ผู้ให้ (donor) และการสร้างประชากร BC_2F_2..... 31
3.2.4.2 การคัดเลือก BC_2F_2 ที่ต้านทานโรคไหม้..... 32
3.2.4.3 การคัดเลือกประชากร BC_2F_2 ที่มีลักษณะความหอมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro ด้วยเทคนิค Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)..... 32
3.2.4.4 การคัดเลือกประชากร BC_2F_2 ที่มีลักษณะอะไมโลสต่ำโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ OSR19 ด้วยเทคนิค Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)..... 34
3.2.4.5 การคัดเลือกประชากร BC_2F_2 ที่มีลักษณะต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM457 ด้วยเทคนิค Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)..... 35
3.2.5 การสร้างประชากรข้าวผสมกลับครั้งที่ 3 ชั่วที่ 1 (BC_3F_1) และการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคไหม้ 36
3.2.5.1 การสร้างประชากร BC_3F_1..... 36
3.2.5.2 การทดสอบความต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าว BC_3F_1..... 36
3.2.4 การสร้างประชากรข้าวผสมกลับครั้งที่ 4 ชั่วที่ 1 (BC_4F_1) และการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคไหม้ 37
3.2.5.1 การสร้างประชากร BC_4F_1..... 37
3.2.5.2 การทดสอบความต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าว BC_4F_1..... 37

บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 38
4.1 การทดสอบความต้านทานโรคไหม้ของข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย..... 38
4.2 การตรวจสอบปริมาณอะไมโลสโดยวิธีเคมี..... 38
4.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน..... 38
4.2.2 การตรวจสอบปริมาณอะไมโลส..... 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 การตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้บนข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย
และข้าวพันธุ์แนะนำของไทย..... 41
4.4 ผลการสร้างประชากรข้าวลูกผสมและการคัดเลือกลูกผสมในประชากร
รุ่น BC_2F_2..... 47
4.4.1 ประชากรข้าวลูกผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 2 (BC_2F_2)..... 47
4.4.2 ผลการประเมินความต้านทานโรคไหม้บนข้าว BC_2F_2 โดยการ
ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้..... 47
4.4.3 ผลการคัดเลือกประชากร BC_2F_2 ที่มีลักษณะความหอม
โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro ด้วยเทคนิค Polyacrylamide
Gel Electrophoresis (PAGE)..... 48
4.4.4 การคัดเลือกประชากร BC_2F_2 ที่มีลักษณะอะไมโลสต่ำ
โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ OSR19 ด้วยเทคนิค Polyacrylamide
Gel Electrophoresis (PAGE)..... 49
4.4.5 การคัดเลือกประชากร BC_2F_2 ที่มีลักษณะต้านทาน
โรคไหม้โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM457 ด้วยเทคนิค
Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)..... 49
4.5 การสร้างประชากรข้าวลูกผสมกลับครั้งที่ 3 ชั่วที่ 1 (BC_3F_1) และ
การคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคไหม้..... 50
4.6 การสร้างประชากรข้าวลูกผสมกลับครั้งที่ 4 ชั่วที่ 1 (BC_4F_1) และ
การคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคไหม้..... 51

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 53
5.1 การทดสอบความต้านทานโรคไหม้ของข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย..... 53
5.2 การตรวจสอบปริมาณอะไมโลสโดยวิธีเคมี..... 54
5.3 การตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้บนข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย
และข้าวพันธุ์แนะนำของไทย..... 54
5.4 การคัดเลือกประชากรข้าวลูกผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 2 (BC_2F_2)..... 55
5.4.1 การประเมินความต้านทานโรคไหม้โดยการปลูกเชื้อราสาเหตุ
โรคไหม้..... 55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.4.2 การคัดเลือกลักษณะความหอมในประชากร BC_2F_2 ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro……...…….. 55
5.4.3 การคัดเลือกลักษณะอะไมโลสต่ำในประชากร BC_2F_2 ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ OSR19……. 56
5.4.4 การคัดเลือกลักษณะความต้านทานโรคไหม้ในประชากร BC_2F_2 ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM457…….. 56
5.5 การสร้างประชากรข้าวลูกผสมกลับครั้งที่ 3 และ 4 (BC_3 และ BC_4)..... 56
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง……..... 58
บรรณานุกรม……..…… 59
ภาคผนวก……..... 68
ประวัติผู้เขียน……..… 77

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การแบ่งประเภทของข้าวตามปริมาณอะไมโลส.....	14
2	รายชื่อและแหล่งที่มาเชื้อสาเหตุโรคไหม้ *P. oryzae* จำนวน 25 ไอโซเลท ที่ใช้ในการทดสอบการเกิดโรค.....	26
3	การแบ่งประเภทของข้าวตามปริมาณอะไมโลส.....	28
4	รายชื่อข้าวพันธุ์แนะนำของไทยจำนวน 40 พันธุ์ และ ความต้านทานโรคไหม้.....	29
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์และขนาดของผลผลิต PCR ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา.....	31
6	ระดับความรุนแรงของโรคบนข้าวพันธุ์ห้วย ขาวดอกมะลิ 105 เจ้าหอมนิล และพันธุ์ IR64 ที่ 7 วัน หลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ทีละไอโซเลท จำนวน 25 ไอโซเลท.....	39
7	รายชื่อพันธุ์ข้าวและเปอร์เซ็นต์ของพันธุ์ข้าวที่ตรวจพบยีนต้านทาน 8 ยีน ด้วยเทคนิค PCR.....	43
8	อัตราการกระจายตัวของลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 25 ไอโซเลทในประชากรข้าว BC_2F_2 จำนวน 283 ต้น.....	48
9	ระดับความรุนแรงของโรคบนข้าวขาวดอกมะลิ 105 เจ้าหอมนิล IR64 และ BC_3F_1 หลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ จำนวน 25 ไอโซเลท 7 วัน	51
10	ระดับความรุนแรงของโรคบนข้าวขาวดอกมะลิ 105 เจ้าหอมนิล IR64 และ BC_4F_1 หลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ จำนวน 25 ไอโซเลท 7 วัน.....	52
11	จำนวนประชากรผสมแต่ละรุ่น.....	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตารางผนวก

ตารางผนวกที่		หน้า
1	ข้อมูลการทดสอบความต้านทานโรคไหม้ของประชากรข้าวลูกผสมกลับ BC_2F_2 จำนวน 283 ต้น.....	74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะอาการของโรคไหม้ข้าวบน ก) ใบ ข) ข้อต่อลำต้น ค) รวงข้าวและคอรวง	7
2	วงจรชีวิต (Life cycle) ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้	8
3	การระบาดของโรคไหม้คอรวงในแปลงปลูกจังหวัดนครราชสีมาในปี 2562	8
4	แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้และระยะห่างเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 11 ของข้าว ประชากรรุ่นที่ 2 (F_2) ระหว่าง KDML105 x GS19769	13
5	โครงสร้างของ 2-acetyl-1-pyrroline (2AP)	16
6	กระบวนการเกิดสาร 2AP ในข้าวหอม	17
7	โครงสร้างและตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *Badh2*	18
8	ลักษณะอาการของโรคไหม้และระดับคะแนนการเกิดโรค 7 ระดับ	26
9	แผนการดำเนินงานสร้างประชากรข้าวลูกผสมกลับระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ สายพันธุ์ห้วย	37
10	กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณะไมโลส กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร	40
11	เปอร์เซ็นต์ปริมาณอะไมโลสในข้าวขาวมะลิ 105 ข้าวพื้นเมืองไทย พันธุ์ห้วย และพันธุ์พิษณุโลก 2	41
12	รูปแบบดีเอ็นเอของยีนต้านทานโรคไหม้	42
13	จำนวนพันธุ์ข้าวที่พบยีนต้านทานโรคไหม้	43
14	ยีนที่พบในข้าวพื้นเมืองไทยพันธ์ห้วย และข้าวพันธุ์แนะนำของไทย	46
15	การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro ช่วยในการคัดเลือกลักษณะความหอม	48
16	การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ OSR19 ช่วยในการคัดเลือกลักษณะอะไมโลสต่ำ	49
17	การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM457 ช่วยในการคัดเลือกลักษณะความต้านทานโรคไหม้	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก โดยประชากรโลกประมาณร้อยละ 60 บริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก (staple food) โดยเฉพาะประชากรที่อาศัยในเขตร้อน – กึ่งร้อนในทวีปเอเชีย นอกจากนี้ข้าวยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมากชนิดหนึ่งของประเทศไทย เกษตรกรทุกภาคของประเทศปลูกข้าวเพื่อบริโภคและจำหน่าย ในปี พ.ศ. 2564 ประเทศไทยมีเนื้อที่เพาะปลูกข้าว 62.599 ล้านไร่ ผลผลิต 26.019 ล้านตัน และ ผลผลิตต่อไร่ 416 กิโลกรัม โดยส่งออกข้าว 6.12 ล้านตันข้าวสาร มูลค่าการส่งออก 107,758 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2564) พันธุ์ข้าวไทยที่มีชื่อเสียงและได้รับความนิยมจากชาวไทยและชาวต่างประเทศ คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (Khao Dawk Mali 105) เนื่องจากมีคุณลักษณะเด่น คือ เป็นข้าวที่มีคุณภาพในการหุงต้มดี มีปริมาณแป้งอะไมโลส (amylose) ต่ำ เมื่อหุงเป็นข้าวสุกจึงมีลักษณะนุ่มเหนียว และที่สำคัญมีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์ อย่างไรก็ตามการผลิตข้าวสายพันธุ์นี้ให้ได้คุณภาพและปริมาณที่ต้องการยังมีปัญหาอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากข้าวพันธุ์นี้มีลักษณะด้อยหลายประการ คือไม่สามารถต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูหลายชนิด โดยเฉพาะโรคไหม้ของข้าว (rice blast disease) ซึ่งสาเหตุดังกล่าวทำให้ผลผลิตข้าวเสียหายเป็นอย่างมาก (ลัดดาวัลย์. 2550)

โรคไหม้ของข้าวเกิดจากเชื้อราสาเหตุ *Pyricularia oryzae* Sacc. มีชื่อเรียกในระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศว่า *Magnaporthe oryzae* (Hebert) Barr. เป็นเชื้อราที่มีความสำคัญและเป็นปัญหาต่อการปลูกข้าวในหลายพื้นที่ เนื่องจากเชื้อราสามารถเข้าทำลายข้าวได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง พบว่าโรคที่เกิดจากเชื้อราชนิดนี้สร้างความเสียหายรุนแรงต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิตข้าว โดยสามารถทำให้ผลผลิตข้าวลดลงได้ตั้งแต่ร้อยละ 11 – 90 (Zeigler *et al*. 1994) โดยเฉพาะโรคไหม้ที่เกิดในระยะข้าวออกรวง จะส่งผลทำให้ผลผลิตสูญเสียอย่างมากอาจถึงขึ้นที่เกษตรกรไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ (พูนศักดิ์ และคณะ. 2550) โดยประเทศไทยพบมีการระบาดของโรคไหม้ครั้งใหญ่ในระยะออกรวงในปี พ.ศ. 2535 สร้างความเสียหายครอบคลุมพื้นที่ 1.2 ล้านไร่ ทำให้ผลผลิตข้าวเสียหายถึง 60 เปอร์เซ็นต์ มูลค่าความเสียหายประมาณ 436 ล้านบาท (Disthaporn. 1994)

วิธีการป้องกันโรคไหม้ที่มีประสิทธิภาพสูง คือ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานต่อโรค ทั้งนี้พบว่าเชื้อราโรคไหม้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อค่อนข้างมาก มักพบปัญหาเสมอว่า ภายหลังจากการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคและแมลงศัตรูแล้วเมื่อนำไปปลูกเพียงไม่กี่ปีพันธุ์ดังกล่าวจะสูญเสียความต้านทานไป ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อสาเหตุโรคไหม้มีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับตัวและมีวิวัฒนาการให้สามารถเข้าทำลายข้าวพันธุ์ต้านทานได้ (Sreewongchai *et al.* 2010) ดังนั้นจำเป็นต้องมีการปรับปรุงข้าวให้ต้านทานโรคและแมลงศัตรูอยู่เสมอ โดยใช้แหล่งของความต้านทานใหม่ๆ ในประเทศไทยนับว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพของพันธุ์ข้าวประเทศหนึ่ง โดยเฉพาะในข้าวป่าและข้าวพันธุ์พื้นเมือง ถือเป็นแหล่งพันธุกรรมของความต้านทาน จะเห็นได้ว่ามีการใช้ข้าวป่าและข้าวพันธุ์พื้นเมืองในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคอยู่บ่อยครั้ง โดยเฉพาะในข้าวพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ทนต่อโรคและแมลงศัตรูได้ดี และสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี อย่างไรก็ตามพบว่าข้าวพันธุ์เหล่านี้มักให้ผลผลิตต่ำ มีลักษณะทางคุณภาพไม่ตรงต่อความต้องการของผู้บริโภค ส่งผลให้เกษตรกรไม่ค่อยยอมรับ ดังนั้นในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่ดี นอกจากจะต้องปรับปรุงให้มีลักษณะที่ต้านทานโรคแล้ว ต้องคำนึงถึงลักษณะทางคุณภาพ ที่ดีเพื่อให้ตรงต่อความต้องการของเกษตรกรและผู้บริโภคด้วย ปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมกลับเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวและเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มผลผลิต (Duwayri *et al.* 2000) เนื่องจากวิธีการผสมกลับเป็นการถ่ายทอดลักษณะที่ต้องการเพียงหนึ่งหรือสองลักษณะเข้าไปให้พันธุ์พืชที่ดีอยู่แล้ว (กฤษฎา. 2551) อีกทั้งการนำเทคโนโลยีทางชีวภาพมาใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ เช่น การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอมาช่วยในการคัดเลือก เนื่องจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นการคัดเลือกจากลักษณะทางจีโนไทป์ สภาพแวดล้อมจึงไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของเครื่องหมายดีเอ็นเอ ทำให้สามารถปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ และรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้มีความต้านทานต่อโรคไหม้ โดยใช้แหล่งพันธุกรรมจากข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยด้วยวิธีผสมกลับ เพื่อสร้างประชากรข้าว BC_3 และ BC_4 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือกลักษณะทางคุณภาพ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้อย่างยั่งยืนในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาปฏิกิริยาต้านทานโรคไหม้ของข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วยต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทยรวมทั้งลักษณะทางคุณภาพของข้าวพันธุ์ห้วย

1.2.2 เพื่อศึกษายีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองและพันธุ์ข้าวแนะนำอื่นๆ ของประเทศไทย

1.2.3 เพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานโรคไหม้โดยวิธีผสมกลับโดยใช้ข้าวพื้นเมืองพันธุ์ห้วยเป็นพันธุ์ให้ความต้านทาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

ห้องปฏิบัติการโรคพืช ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

1.4 วิธีดำเนินการศึกษา

ศึกษาปฏิกิริยาการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ จำนวน 25 ไอโซเลทบนข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย เพื่อทดสอบความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ของข้าวพันธุ์ห้วย ทำการศึกษายีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วยและข้าวแนะนำพันธุ์ต่างๆ ของประเทศไทย โดยการสกัดดีเอ็นเอ และนำมาตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนต้านทานโรคไหม้จำนวน 8 ยีน ด้วยเทคนิค PCR ทำการตรวจสอบลักษณะทางคุณภาพการหุงต้มของข้าวพันธุ์ห้วยโดยการตรวจสอบปริมาณอะไมโลสโดยวิธีเคมี และสร้างประชากรข้าวลูกผสมกลับโดยใช้ประชากรข้าว BC_2F_2 ที่ได้จากการผสมกลับระหว่างข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์พื้นเมืองพันธุ์ห้วย ที่ต้านทานโรคไหม้และผ่านการคัดเลือกลักษณะทางคุณภาพ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ มาผสมกับพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เพื่อสร้างประชากรข้าวลูกผสมกลับครั้งที่ 3 และ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้าวและความสำคัญ

ข้าว (rice) เป็นพืชผสมตัวเองจัดอยู่ในวงศ์ (family) Gramineae สกุล (genus) *Oryza* จัดเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญเป็นอันดับต้นๆ ของโลก ประชากรมากกว่าครึ่งของโลกโดยเฉพาะประชากรในทวีปเอเชียบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก แต่ละปีทั่วโลกต้องการข้าวอย่างน้อย 617 ล้านตัน ข้าวที่ปลูกเป็นอาหาร (cultivated species) ถูกแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ข้าวเอเชีย (*Oryza sativa* L.) และข้าวแอฟริกา (*Oryza glaberrima* Steud.) ส่วนที่เหลืออีก 21 ชนิดเป็นข้าวป่า (wild species) ซึ่งเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ข้าวที่นิยมปลูกเพื่อบริโภคมีอยู่ 2 ชนิด คือข้าวแอฟริกา (*Oryza glaberrima* Steud.) และข้าวเอเชีย (*O. sativa* L.) โดยข้าวที่ทำการค้าขายกันในตลาดโลกส่วนใหญ่เป็นข้าวเอเชีย ซึ่งสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามลักษณะทรงกอ เมล็ด และแหล่งปลูกเป็น 3 กลุ่ม คือ ข้าวอินดิกา มีลักษณะเมล็ดยาวรีเป็นข้าวที่ปลูกในเอเชียเขตร้อนรวมทั้งประเทศไทย ข้าวจาโปนิกา มีลักษณะเมล็ดป้อมกลมรี รวงแน่น ปลูกในเขตอบอุ่น เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี และข้าวจาวานิกา เป็นข้าวที่มีลักษณะเมล็ดป้อมใหญ่ รวงยาว ปลูกในประเทศอินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ แต่ไม่ได้รับความนิยม เพราะให้ผลผลิตต่ำ (ปิยะนันท์. 2543) พื้นที่ปลูกข้าวกระจายอยู่ในทุกทวีป ยกเว้นทวีปแอนตาร์คติก โดยคิดเป็นพื้นที่ประมาณ 958 ล้านไร่ (สงกรานต์ และ บริบูรณ์. 2545) ผลผลิตข้าวทั่วโลกอยู่ที่ประมาณ 480 ล้านตันต่อปี โดยประมาณร้อยละ 90 มีการผลิตและบริโภคอยู่ในทวีปเอเชีย เช่น จีน ญี่ปุ่น อินเดีย ปากีสถาน เวียดนาม และไทย (Muthayya *et al.* 2014)

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการผลิตและส่งออกข้าวเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก ในปี พ.ศ. 2563 ประเทศไทยมีเนื้อที่ปลูกข้าว 61.281 ล้านไร่ ผลผลิต 25.522 ล้านตัน มีปริมาณการส่งออก 5.72 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่า 115,915 ล้านบาท ตลาดส่งออกหลัก ได้แก่ แอฟริกาใต้ สหรัฐอเมริกา (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. 2564) จัดเป็นประเทศที่มีการส่งออกข้าวเป็นอันดับ 3 ของโลก รองจากประเทศอินเดีย และเวียดนาม โดยเฉพาะพันธุ์ข้าวหอมของไทยที่มีการส่งออก ร้อยละ 59.9 ของปริมาณการผลิตข้าวหอมมะลิของโลก โดยข้าวหอมมะลิถือเป็นข้าวระดับพรีเมี่ยมชนิดหนึ่งเพราะมีความหอมและความนุ่มอยู่ด้วยกัน จึงมีราคาสูงกว่าข้าวชนิดอื่นๆ ซึ่งพันธุ์ข้าวหอมที่ประเทศไทยส่งออกมากที่สุดคือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML105)

ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (Thai Jasmine Rice) เป็นข้าวปลูกชนิด *O. sativa* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มอินดิกา เป็นพันธุ์ข้าวที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย ได้จากการนำข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากนาเกษตรกร อำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 199 รวง มาปลูกเพื่อศึกษาพันธุ์และได้ข้าวรวงที่ 105 มีลักษณะกลิ่นหอมคล้ายใบเตย เป็นพันธุ์ข้าวที่ปลูกที่ใดในโลกไม่ได้คุณภาพดีเท่ากับปลูกในประเทศไทย พื้นที่ปลูกข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่เหมาะสม ได้แก่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลางบางพื้นที่ โดยข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์ข้าวที่ทำให้ข้าวไทยเป็นสินค้าส่งออกที่รู้จักไปทั่วโลก รัฐบาลจึงได้ประกาศให้ขยายพันธุ์ส่งเสริมการปลูกในปี พ.ศ. 2502 เป็นต้นมา ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีลักษณะประจำพันธุ์คือ เป็นข้าวที่มีลักษณะไวต่อช่วงแสง (photoperiod sensitive) คือ ออกดอกในช่วงวันที่กลางคืนยาวนานกว่ากลางวัน ซึ่งจะอยู่ในช่วงเดือนกันยายนถึงมกราคม การแตกกอดี ต้นสูงประมาณ 140 – 150 เซนติเมตร เมล็ดข้าวเปลือกมีลักษณะเมล็ดเรียวยาว ให้ผลผลิตเฉลี่ย 499 กิโลกรัมต่อไร่ เมล็ดข้าวเปลือกมีลักษณะเมล็ดเรียวยาว ขนาดเมล็ดข้าวกล้อง ยาว 7.5 มิลลิเมตร กว้าง 2.1 มิลลิเมตร หนา 1.8 มิลลิเมตร ลักษณะเมล็ดข้าวเปลือกมีลักษณะเมล็ดเรียวยาว ก้นงอน สีฟาง เป็นข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสต่ำ คือ ประมาณ 12 – 18 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้ข้าวสุกมีลักษณะเหนียว นุ่ม นอกจากนั้นยังพบว่าข้าวพันธุ์นี้มีกลิ่นหอม ทำให้ข้าวสายพันธุ์นี้เป็นที่ต้องการของตลาด แต่ข้อจำกัดของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 คือ ผลผลิตค่อนข้างต่ำ ลำต้นอ่อนล้มง่าย ไม่ต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูข้าวทุกชนิด โดยเฉพาะโรคไหม้ พบว่าสร้างความเสียหายต่อผลผลิตข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นอย่างมาก และเป็นข้าวไวต่อช่วงแสง ซึ่งสามารถเพาะปลูกได้เพียงปีละ 1 ครั้ง ในช่วงฤดูนาปีเท่านั้น (วาสนา. 2538) ปัจจุบันมีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมมะลิให้มีความต้านทานต่อโรคและแมลง

ในปี พ.ศ. 2541 สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (International Rice Research Institute, IRRI) ร่วมมือกับศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ดำเนินการปรับปรุงพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานต่อโรคไหม้ โดยรักษาคุณภาพเมล็ดและการหุงต้มที่ดีเช่นเดียวกับพันธุ์เดิมไว้ และมีการปรับตัวได้ดีในสภาพนาน้ำฝน ในภาคเหนือตอนบนและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ดำเนินการผสมพันธุ์ข้าวที่ IRRI ประเทศฟิลิปปินส์ พันธุ์ IR70179-45-1-1-1 เป็นพันธุ์พ่อที่มีลักษณะความต้านทานโรคไหม้ และมีการปรับตัวได้ดีในนาน้ำฝน โดยผ่านการคัดเลือกจากการปลูกทดสอบในศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์แม่ ปลูกประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1- hybrid) และชั่วที่ 2 (F_2) โดยคัดเลือกต้นที่ต้านทานโรคไหม้และมีความหอม ผสมกลับไปยังพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC_1F_2) ทำการทดสอบความต้านทานและความหอม คัดเลือกและนำไปปลูกในนาข้าว ผสมกลับอีกครั้งจนได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 2 (BC_2F_2) และรุ่นต่อๆ ไป ในปี พ.ศ. 2545 คัดเลือกพันธุ์ที่สามารถต้านทานโรคไหม้ได้ดี และนำมาทดสอบคุณภาพการหุงต้ม ได้ข้าวอายุเบาที่มีคุณสมบัติเหมือนขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 19 สายพันธุ์ นำมาทดสอบการให้ผลผลิตเบื้องต้นในฤดู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้งและฤดูฝน ของปี พ.ศ. 2546 – 2547 ทั้งภายในสถานีและในแปลงนาเกษตรกร จนได้พันธุ์ข้าว IR77924-62-71-1-2 ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์เป็นที่ยอมรับของเกษตรกร มีลักษณะเด่น คือ เป็นข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง อายุตกกล้าถึงออกดอกประมาณ 100 – 110 วัน มีความต้านทานโรคไหม้ที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือของประเทศไทย คุณภาพเมล็ด การหุงต้ม เหมือนพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (บุญรัตน์ และคณะ. 2548) และเมื่อวันที่ 6 มีนาคม 2550 คณะกรรมการพิจารณาพันธุ์ กรมการข้าว มีมติให้ข้าวพันธุ์ IR77924-62-71-1-2 เป็นพันธุ์รับรอง ชื่อ กข33 (หอมอุบล 80) เพื่อแนะนำให้เกษตรกรปลูก (สำนักงานวิจัยและพัฒนาข้าว. 2557)

2.3 โรคไหม้ของข้าว (Rice Blast Disease)

2.3.1 ประวัติ

โรคไหม้ของข้าวเกิดจากเชื้อราสาเหตุ *Pyricularia oryzae* Sacc. มีชื่อเรียกในระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศว่า *Magnaporthe oryzae* (Hebert) Barr. จัดเป็นโรคที่มีความสำคัญก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมาก โรคนี้พบครั้งแรกในประเทศจีนในปี ค.ศ. 1637 ในประเทศไทยมีรายงานว่าพบโรคนี้ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2496 โดยแผนกโรควิทยา กองพืชพันธุ์ กรมกสิกรรม โดยเกิดกับข้าวพันธุ์หอมเศรษฐี ที่สถานีทดลองเกษตรกลางบางเขน และบริเวณใกล้สถานีรถไฟมักกะสัน โดยสันนิษฐานว่าโรคนี้อาจติดมากับฟางข้าวที่มาจากประเทศญี่ปุ่นสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 (ชวาลา. 2531)

2.3.2 ลักษณะอาการ การเข้าทำลาย และการแพร่ระบาดของโรคไหม้

2.3.2.1 ลักษณะอาการของโรคไหม้

ลักษณะอาการของโรคปรากฏบนส่วนของต้นข้าวที่อยู่เหนือดิน คือ ใบ กาบใบ ข้อต่อของใบ ข้อของลำต้น คอรวง และระแง้ (ภาพที่ 1) แบ่งลักษณะอาการของโรคไหม้ตามอายุของต้นข้าวได้เป็น 3 ระยะ (กรมวิชาการเกษตร. 2545)

ก. ระยะกล้า ใบมีแผล จุดสีน้ำตาลคล้ายรูปตา มีสีเทาอยู่ตรงกลางแผลความกว้างของแผลประมาณ 2 – 5 มิลลิเมตร และความยาวประมาณ 10 – 15 มิลลิเมตร แผลสามารถขยายลุกลามและกระจายทั่วบริเวณใบ ถ้าโรครุนแรงกล้าข้าวจะแห้งฟุบตาย อาการคล้ายถูกไฟไหม้

ข. ระยะแตกกอ อาการพบได้ที่ใบ ข้อต่อของใบ และข้อต่อของลำต้น ขนาดแผลจะใหญ่กว่าที่พบในระยะกล้า แผลลุกลามติดต่อกันได้ที่บริเวณข้อต่อ ใบจะมีลักษณะแผลช้ำสีน้ำตาลดำ และมักหลุดจากกาบใบเสมอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค. ระยะออกรวง (โรคไหม้คอรวง) ถ้าข้าวเพิ่งจะเริ่มให้รวง เมื่อถูกเชื้อราเข้าทำลาย เมล็ดจะลีบหมด แต่ถ้าเป็นโรคตอนรวงข้าวแก่ใกล้เก็บเกี่ยว จะปรากฏรอยแผลช้ำสีน้ำตาลที่บริเวณคอรวง ทำให้เปราะหักง่าย รวงข้าวร่วงหล่นเสียหายมาก

ภาพที่ 1 ลักษณะอาการของโรคไหมข้าวบน ก) ใบ ข) ข้อต่อลำต้น ค) รวงข้าวและคอรวง
ที่มา IRRI (2002)

2.3.2.2 การเข้าทำลาย

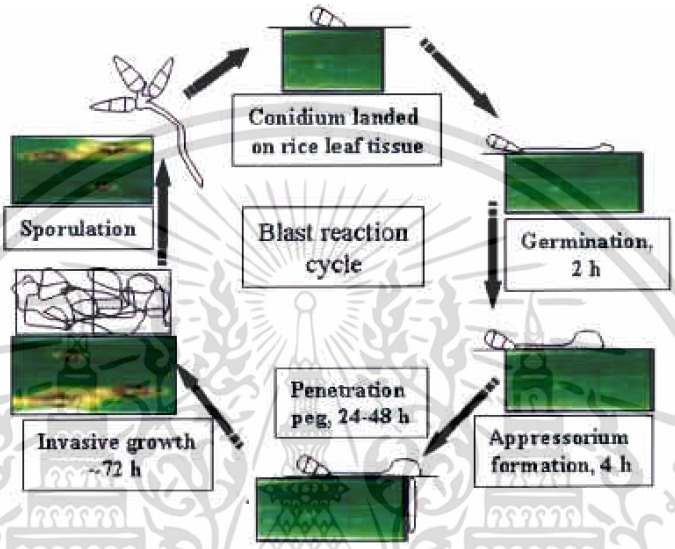
การเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ สามารถเข้าทำลายข้าวได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของข้าวตั้งแต่ระยะต้นกล้าไปจนถึงระยะออกรวง หลังจากที่เชื้อสร้างโคนิเดีย (conidia) สัมผัสกับส่วนต่างๆ ของข้าว (attachment) เมื่อมีเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมได้แก่ ความชื้นในอากาศสูง อุณหภูมิอยู่ในช่วง 25 – 30 องศาเซลเซียส โคนิเดียจะเริ่มงอก (germination) ภายในชั่วโมงแรกของการที่เชื้อสัมผัสกับพืช จากนั้นเชื้อจะมีการเจริญของเส้นใยและทำการยึดเกาะ (hooking) ภายในเวลาประมาณ 2 – 4 ชั่วโมง และสร้าง appressorium และใช้อวัยวะปลายแหลมที่เรียกว่า penetration peg แทงแทรกตัวเข้าไปยังผนังเซลล์พืช มีการสร้างเส้นใย infection hyphae ซึ่งสามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วทั่วใบข้าวใช้เวลาประมาณ 72 ชั่วโมงหลังจากถูกเชื้อเข้าทำลาย (ภาพที่ 2) (พูนศักดิ์. 2548; Roy-Barman and Chattoo. 2005)

2.3.2.3 การแพร่ระบาด

เชื้อรามีส่วนขยายพันธุ์ที่เรียกว่าโคนิเดีย (conidia) สามารถแพร่กระจายไปตามดิน น้ำ ลม ติดไปกับเศษฟางข้าว และชิ้นส่วนพืช พบว่าโรคนี้แพร่ระบาดเป็นประจำในช่วงเดือนมิถุนายน – ตุลาคม และ พฤศจิกายน – เมษายน โดยเฉพาะในแปลงที่ปลูกข้าวที่มีข้าวจำนวนหนาแน่น ทำให้อับลม ในแปลงปลูกที่ใช้พันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อโรค ในช่วงที่มีฝนตก อากาศค่อนข้างเย็น อุณหภูมิประมาณ 22 – 25 องศาเซลเซียส สภาพอากาศแห้งในตอนกลางวัน และชื้นจัดในตอนกลางคืน หรือมีความชื้นสัมพัทธ์ค่อนข้างสูง ตั้งแต่ 90% ขึ้นไป หากมีลมแรงจะช่วยให้โรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แพร่กระจายได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าใส่ปุ๋ยที่มีไนโตรเจนสูง ยังส่งผลต่อการเข้าทำลายของเชื้อราโรคไหม้ (กรมวิชาการเกษตร. 2543) ถ้าเกิดการระบาดอย่างรุนแรงโดยเฉพาะในระยะที่ข้าวเริ่มออกรวงจะทำให้รวงข้าวลีบทั้งรวงไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ (สำนักงานวิจัยและพัฒนาข้าว. 2552) โดยพบว่าเชื้อราโรคไหม้สามารถสร้างความเสียหายรุนแรงต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิตข้าว ทำให้ผลผลิตข้าวลดลงได้ตั้งแต่ร้อยละ 11 – 90 (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 วงจรชีวิต (Life cycle) ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

ที่มา Roy-Barman and Chattoo. (2005)

ภาพที่ 3 การระบาดของโรคไหม้คอรวงในแปลงปลูกจังหวัดนครราชสีมาในปี 2562

ที่มา มติชนออนไลน์ (2562)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 ความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว

เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวมีความแปรปรวนทางพันธุกรรม มีการเปลี่ยนแปลงได้อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาไม่กี่ชั่วอายุ (Ou. 1985) ซึ่งอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ แต่สาเหตุหลัก คือ การกลายพันธุ์ของเชื้อทำให้เกิดสายพันธุ์เชื้อใหม่ๆ เช่น การกลายพันธุ์ของ conidia เชื้อรา ทำให้มีความผิดปกติของรูปร่างลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีน *SMO1* ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการก่อโรคของเชื้อรา (Shi and Leung. 1995 อ้างโดย พูนศักดิ์. 2548) การเกิด transposable element ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดสั้นๆ ที่สามารถเคลื่อนย้ายเข้าออกในจีโนมของพืชได้ อาจทำให้เชื้อสาเหตุโรคไหม้เกิดการกลายพันธุ์ได้ รวมไปถึงการเคลื่อนย้ายประชากรของเชื้อราจากแหล่งปลูกข้าวหนึ่งไปสู่อีกแหล่งหนึ่ง ทำให้ตรวจพบสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่แตกต่างจากที่มีอยู่เดิมในพื้นที่ ด้วยสาเหตุเหล่านี้ทำให้เกิดการระบาดของโรคไหม้อยู่เป็นประจำ เมื่อนักปรับปรุงพันธุ์ได้พัฒนาพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้พันธุ์ใหม่ เชื้อราก็สามารถปรับตัวเพื่อเข้าทำลายข้าวพันธุ์ใหม่ได้ในระยะเวลาไม่นาน (พูนศักดิ์. 2548) ในประเทศไทยมีการรวบรวมเชื้อราโรคไหม้ในพื้นที่ระบาดในปีต่างๆ เพื่อทำการศึกษาความหลากหลายของเชื้อราโรคไหม้

พูนศักดิ์ และคณะ (2550) ตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทย โดยใช้พันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวมาจำแนกสายพันธุ์เชื้อรา และทำการปลูกพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ที่แตกต่างกันในแปลงทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี และศูนย์วิจัยข้าวขอนแก่น ภาคเหนือ ที่ศูนย์วิจัยข้าวแพร่ ภาคเหนือตอนล่างที่ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก และภาคใต้ที่ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง เก็บตัวอย่างเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่เข้าทำลายใบข้าวและคอรวง ในปี พ.ศ. 2545 – 2548 แยกเชื้อให้ได้ conidia เดี่ยวจนได้เชื้อบริสุทธิ์ นำไปทดสอบความรุนแรงในการเข้าทำลายของเชื้อบนพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว 18 สายพันธุ์ จากเชื้อจำนวน 2,476 ไอโซเลท สามารถจำแนกเชื้อได้จำนวน 623 รูปแบบการเกิดโรค (pathotype) แสดงให้เห็นว่าประชากรเชื้อสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทยมีความหลากหลายสูง pathotype ของเชื้อราที่พบประจำมีความรุนแรงน้อยกว่า pathotype ที่หายาก และพบว่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยมีจำนวน pathotype ของเชื้อราที่เข้าทำลายข้าวมากที่สุดในพันธุ์ข้าวทดสอบ

อัจฉราพร และ พูนศักดิ์ (2552) เก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่ทำให้เกิดอาการบนข้าวต่างสายพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก และแปลงนาเกษตรกรบริเวณภาคเหนือตอนล่างในระหว่างฤดูปลูก พ.ศ. 2550 – 2551 โดยเก็บจากนิเวศนาชลประทานและนาน้ำฝน ในข้าวพื้นเมืองและข้าวไร่ รวบรวมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้ทั้งหมด 80 ไอโซเลท แยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำมาทดสอบกับชุดข้าว Near Isogenic Lines (NILs) ของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) ที่มีฐานพันธุกรรมคล้ายกันแต่มียีนต้านทานโรคไหม้ที่แตกต่างกันสายพันธุ์ละ 1 ยีน รวมทั้งหมดจำนวน 18 สายพันธุ์ เพื่อจำแนก pathotype ของเชื้อรา พบว่าที่ความเหมือน 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถจำแนกเชื้อราได้จำนวน 13 pathotype โดยมีสัดส่วนไอโซเลท:pathotype เท่ากับ 6.2:1 แสดงว่ามีความหลากหลายของเชื้อราใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จังหวัดพิษณุโลกและพื้นที่ใกล้เคียงไม่มากนัก แต่พบว่าเชื้อรามีความรุนแรงมาก เพราะพันธุ์ข้าวทดสอบที่มียีนต้านทานโรคไหม้ สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้เพียง 20 ไอโซเลท จาก 80 ไอโซเลท

2.4 แหล่งความต้านทานโรคไหม้

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ได้ข้าวพันธุ์ดีไม่ว่าจะเป็นการเพิ่มผลผลิต เพิ่มคุณภาพ หรือเพิ่มความต้านทานโรคหรือแมลง นอกจากจะต้องอาศัยวิธีการปรับปรุงพันธุ์ การผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ รวมไปถึงการทดสอบพันธุ์ที่เหมาะสม วัตถุดิบที่สำคัญที่ขาดไม่ได้ คือ เชื้อพันธุ์ข้าว ยิ่งเชื้อพันธุ์ข้าวมีฐานทางพันธุกรรมกว้างและแปรปรวนมากเท่าใด โอกาสและความสำเร็จที่จะได้พันธุ์ตามต้องการก็จะมีมากขึ้น (วิชา. 2544) ประเทศไทยอยู่ในเขตศูนย์กลางของความแปรผันทางพันธุกรรมของข้าว มีความหลากหลายของพันธุ์ข้าวในแหล่งปลูกข้าวต่างๆ ทั้งข้าวปลูก ข้าวพื้นเมือง และข้าวป่า มากกว่า 3,500 พันธุ์ ที่มีลักษณะต่างกัน (สงกรานต์ และ บริบูรณ์. 2545) เป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีลักษณะที่ดีบางอย่าง เช่น ความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่เลวร้าย (Phattarakul. 2008) ความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรู (Oupkaew *et al*. 2011) และมีโภชนาการที่เป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค (Prom-u-thai and Rerkasem. 2004; Pintasen *et al*. 2007; Saenchai *et al*. 2012) พบยีนต้านทานโรคไหม้กว่าร้อยละ 45 มาจากข้าวสายพันธุ์จาโปนิกา ร้อยละ 51 มาจากข้าวสายพันธุ์อินดิกา และร้อยละ 4 มาจากข้าวสายพันธุ์ป่า โดยส่วนใหญ่พบในข้าวพันธุ์ปลูกของเอเชีย โดยเฉพาะพันธุ์ข้าวจากจีนและญี่ปุ่น นอกจากนั้นยังพบยีน *Pi9 Pi54rh Pi40(t)* และ *Pirf2-1(t)* ในข้าวสายพันธุ์ป่า *O. minuta O. rhizomatis O. australiensis* และ *O. rufipogon* ตามลำดับ (*Wang et al*. 2014) ในขณะเดียวกันพบว่าในข้าวพันธุ์พื้นเมืองของไทย ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่ผ่านการคัดเลือกโดยเกษตรกรและสืบทอดกันมาหลายชั่วอายุ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างมาก สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง ทนต่อโรคและแมลงศัตรู (วิชา. 2544) ซึ่งลักษณะที่ดีดังกล่าวเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคต (ฉวีวรรณ. 2543) นอกจากนั้นยังเป็นแหล่งพันธุกรรมที่สำคัญสำหรับการนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์อีกด้วย

Zhu *et al.* (2004) พบข้าวพื้นเมืองของประเทศจีนพันธุ์ Q14 แสดงความต้านทานโรคไหม้มียีน *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 เครื่องหมาย สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ คือ เครื่องหมาย RM151 และ RM259 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 1 เลือกใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประชากรข้าว F_2 จำนวน 155 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ เมื่อตรวจสอบการกระจายตัวของเครื่องหมาย พบยีนต้านทานโรคไหม้ถูกควบคุมด้วยยีนเพียงยีนเดียว ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM151 และ RM259 เป็นระยะทาง 11.9 และ 9.7 centiMorgans (cM) ตามลำดับ

ศรีสวัสดิ์ (2552) ค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* และ *Pi-b* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 201 พันธุ์ ข้าวป่าจำนวน 19 พันธุ์ และข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 24 พันธุ์ โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* พบข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* จำนวน 69 พันธุ์ โดยพบในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 57 พันธุ์ ข้าวป่าจำนวน 1 พันธุ์ และข้าวต้านทานโรคไหม้ จำนวน 11 พันธุ์ และพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-b* ในพันธุ์ข้าวพื้นเมืองจำนวน 75 พันธุ์ ข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 6 พันธุ์ และไม่พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-b* ในข้าวป่า

เมทินี และคณะ (2552) ตรวจสอบยีนต้านโรคไหม้ *Pib Pi-2t* และ *Pi-ta* บนโครโมโซม 2 6 และ 12 ตามลำดับ ในข้าวพื้นเมืองไทยจำนวน 110 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อยีนต้านทานโรคไหม้ทั้ง 3 ยีน พบว่าข้าวพื้นเมืองของไทยจำนวน 79 ตัวอย่าง มียีนต้านทานโรคไหม้อย่างน้อยหนึ่งยีน และมีข้าวพื้นเมือง 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ข้าวขาวใหญ่ (D001) ข้าวตะหมาย (D016) และข้าวเหนียวแพร่ไร่ (D058) ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ทั้ง 3 ยีน

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 ยีนต้านทานที่พบเป็นยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง (broad spectrum)

กฤตกิตติศักดิ์ และคณะ (2554) ค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9 Pi36* และ *Pigm(t)* ในข้าวพื้นเมืองไทยจำนวน 203 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนต้านทานโรคไหม้ดังกล่าว จากการตรวจสอบพบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองของไทยทั้งหมด 203 พันธุ์มียีนต้านทานโรคไหม้อย่างน้อยหนึ่งยีน และมีข้าวพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 42 พันธุ์มียีนต้านทานโรคไหม้ทั้ง 3 ยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Huang *et al*. (2011) ค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ยีนใหม่ *Pi47* และ *Pi48* บนโครโมโซม 11 และ 12 ตามลำดับ ในข้าวพื้นเมืองพันธุ์ Xiangzi 3150 (XZ3150) ซึ่งมีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ *M. grisea* ที่เก็บรวบรวมจากมณฑลยูนานในประเทศจีน ค้นหาและสร้างแผนที่ระบุยีนต้านทานโรคไหม้ในพันธุ์ข้าว 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

Li *et al*. (2012) ตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1* ในข้าวพื้นเมืองของมณฑลยูนาน จำนวน 173 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมาย MRG4766 ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด simple sequence repeat (SSR) พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 64 พันธุ์ คิดเป็น 36.99 เปอร์เซ็นต์ของพันธุ์ข้าวทั้งหมดที่ทำการตรวจสอบ พบว่าพันธุ์ข้าวที่มียีน *Pi1* มีการกระจายอยู่ทั่วไปในมณฑลยูนาน และพบว่ายีน *Pi1* มีความถี่ของการกระจายตัวสูงมากคิดเป็น 41.03 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณพื้นที่ปลูกข้าวทางตอนใต้ของมณฑลยูนานในประเทศจีน

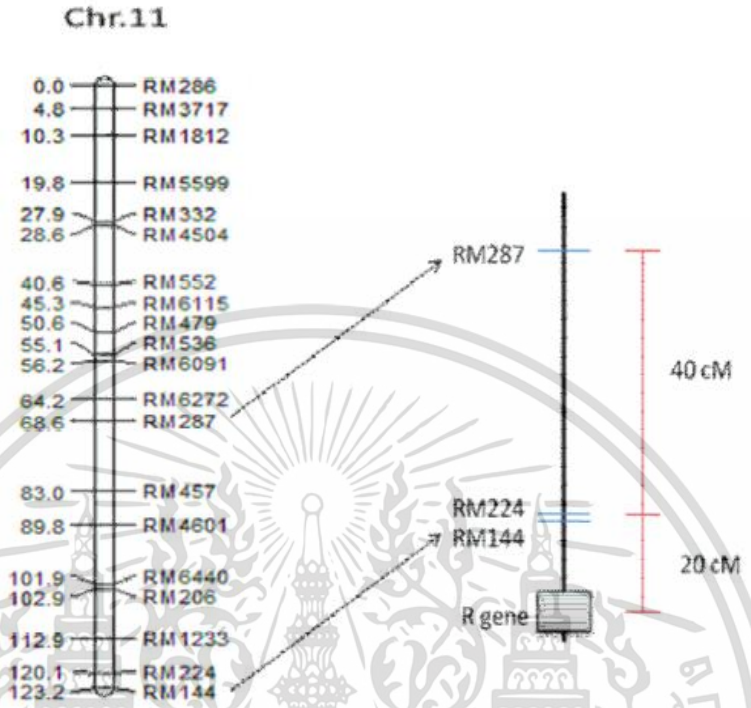
2.5 ข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769)

ข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย เป็นข้าวเจ้าที่ใช้ปลูกเป็นข้าวนาสวนในบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย เป็นข้าวไวต่อช่วงแสง ต้นสูงประมาณ 150 เซนติเมตร แผ่นใบมีสีเขียวและมีสีม่วงที่ปลายใบ ไม่มีขนใบ มีกาบใบสีเขียวเส้นม่วง ลิ้นใบมี 2 ยอด สีขาว และมีความยาว 2.5 เซนติเมตร หูใบ และข้อต่อใบมีสีม่วง ทรงกอแผ่ ยอดดอกและกลีบรองดอกมีสีม่วง คอรวงยาว ข้าวเปลือกสีฟาง ลักษณะเด่น คือ ต้านทานโรคไหม้ (วิชา. 2544)

Parinthawong *et al*. 2015 ค้นหาพันธุกรรมควบคุมลักษณะและการระบุยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย โดยใช้เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าวในภาคต่างๆ ของประเทศไทย จำนวน 19 ไอโซเลท ทดสอบการเกิดโรคบนประชากรข้าวชั่วที่ 2 จำนวน 250 ต้น ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ และข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) ซึ่งต้านทานโรคไหม้ พบการกระจายตัวของลักษณะต้านทาน: อ่อนแอโรคไหม้ในอัตราส่วน 15:1 แสดงว่าข้าวพันธุ์ห้วยมียีนหลักในการต้านทานโรคไหม้มากกว่า 1 ยีน และตรวจพบยีนต้านทาน 1 ยีน มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 11 มีความเชื่อมโยงกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องหมาย SSR RM224 และ RM144 โดยมีระยะห่างจากเครื่องหมายทั้งสองเป็นระยะ 20 cM (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้และระยะห่างเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 11 ของข้าว ประชากรรุ่นที่ 2 (F_2) ระหว่าง KDML105 x GS19769

ที่มา Parinthawong *et al*. (2015)

2.6 พันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะการหุงต้มและความหอมในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่ดีนั้น จะต้องคำนึงถึงผลผลิตและคุณภาพควบคู่กันไป เนื่องจากคุณภาพนั้นเป็นตัวกำหนดมูลค่าของข้าว ซึ่งข้าวจะมีราคาสูงเมื่อมีคุณภาพที่ดี คุณภาพที่ดีของข้าวข้าวนั้นประกอบด้วย คุณภาพการหุงต้มและรับประทาน และลักษณะพิเศษอีกลักษณะคือ กลิ่นหอมของข้าว ถ้าข้าวนั้นมีคุณลักษณะดังกล่าว จะเป็นที่ต้องการของผู้บริโภคอย่างมาก

2.6.1 คุณภาพการหุงต้ม

ลักษณะคุณภาพการหุงต้มของข้าว เป็นลักษณะที่เป็นเป้าหมายสำคัญของการปรับปรุงพันธุ์ข้าว เนื่องจากเป็นคุณภาพที่ผู้บริโภคมักใช้ในการตัดสินใจเลือกซื้อ ทั้งนี้เพราะความชอบข้าวสุกของแต่ละคนแตกต่างกัน ลักษณะคุณภาพการหุงต้มถูกกำหนดโดยปริมาณอะไมโลสของแป้งในเอนโดสเปิร์มจัดเป็นตัวหลักสำคัญในการกำหนดคุณภาพการหุงต้ม โดยทั่วไปนิยมแบ่งประเภทของข้าวโดยถือเอาปริมาณอะไมโลสเป็นหลัก ข้าวเหนียวมีปริมาณอะไมโลเพ็คตินมาก แต่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะไมโลสปนอยู่เล็กน้อย ส่วนข้าวเจ้ามีปริมาณอะไมโลสปนอยู่ประมาณ 10 – 34 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณอะไมโลสเป็นสาเหตุที่ทำให้ข้าวสุกมีความเหนียวลดลงหรือร่วนมากขึ้น และยังทำให้ข้าวนุ่มน้อยลงด้วย (กรมวิชาการเกษตร. 2545) วิธีการจำแนกพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสแตกต่างกันในปัจจุบันนิยมใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลสในเมล็ด โดยทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำแป้งกับสารละลายไอโอดีน (Juliano *et al*. 1981) และนำมาเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน ดังตารางที่ 1 วิธีการนี้ค่อนข้างมีความคลาดเคลื่อน และมีอิทธิพลของอะไมโลเพ็คตินเข้ามาเกี่ยวข้อง ใช้ระยะเวลานาน และจะต้องทำหลังจากการเก็บเกี่ยวผลผลิตข้าวแล้ว (ชลธิดา และคณะ. 2563) ทำให้เกิดความล่าช้าในการปรับปรุงพันธุ์

ตารางที่ 1 การแบ่งประเภทของข้าวตามปริมาณอะไมโลส

ประเภทข้าว	ปริมาณอะไมโลส (%)	ลักษณะ
ข้าวเหนียว	0 – 2	
ข้าวเจ้า		
ข้าวอะไมโลสต่ำ	10 – 19	เหนียว-นุ่ม
ข้าวอะไมโลสปานกลาง	20 – 25	ค่อนข้างร่วนไม่แข็ง
ข้าวอะไมโลสสูง	26 – 34	ร่วน แข็ง

ที่มา กรมวิชาการเกษตร (2545)

ปัจจุบันมีแนวทางช่วยให้การคัดเลือกมีความแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้นคือการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมายช่วยในการคัดเลือก หรือที่เรียกว่า marker-assisted selection (MAS) มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับตรวจสอบลักษณะดังกล่าว และมีการนำไปใช้ประโยชน์ในการติดตามการถ่ายทอดยีนไปยังรุ่นลูก (สุรีพร. 2556) ลักษณะปริมาณอะไมโลสถูกกำหนดด้วยยีนหลักที่เรียกว่า *Waxy* gene ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 6 ยีนนี้ประกอบด้วย 14 exon และ 13 intron (Wang *et al*. 1990; Aoki *et al*. 2006) ปัจจุบันมีการค้นพบรูปแบบของยีน *Waxy* 3 แอลลีล คือ Wx^a Wx^b และ *wx* ทั้ง 3 แอลลีล ทำหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสเอนไซม์ granule-bound starch synthase (GBSS) ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 609 ตัว หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Waxy protein ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญมากในกระบวนการสร้างอะไมโลส ข้าวแต่ละชนิดจะมีปริมาณอะไมโลสต่างกันเป็นผลมาจากความแตกต่างของแอลลีลใน *Waxy* gene โดย Wx^a จะพบมากในกลุ่มข้าวชนิดอินดิกาและ Wx^b พบมากในกลุ่มข้าวชนิดจาโปนิกา (Mikami *et al*. 2008) ซึ่งพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะปริมาณอะไมโลสต่ำถูกควบคุมด้วยยีนด้อย (ปาริฉัตร. 2555) ความแตกต่างของปริมาณอะไมโลสในข้าวเป็นผลเนื่องมาจากความผันแปรที่ตำแหน่ง 5’ splice site ของ leader intron ในยีน *waxy* พันธุ์ข้าวที่มี Wx^a allele มีลำดับเบส AGGTATA ที่ 5’ splice site ของ intron 1 มีผลทำให้ Wx

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

transcript ในปริมาณสูง ส่งผลให้พันธุ์ข้าวที่มีลำดับเบสนี้มีปริมาณอะไมโลส ในระดับปานกลางถึงสูง ในขณะที่พันธุ์ข้าวที่มี Wx^b allele มีลำดับเบส AGTTATA ที่ 5' splice site ของ intron 1 ซึ่งเปลี่ยนแปลงจากเบสของ G เป็น T มีผลทำให้การแสดงออกของ GBSS ลดลง ดังนั้น พันธุ์ข้าวที่มีลำดับเบสนี้จะมีปริมาณอะไมโลสต่ำ Li *et al*. (1995) ศึกษาการแสดงออกของยีน *waxy* พบว่าการแสดงออกของยีนนั้นถูกควบคุมในระดับการถอดรหัสและจากการวิเคราะห์ลำดับของเบส waxy พบว่าส่วนของ intron 1 มีบทบาทส่งเสริมการแสดงออกของยีนนี้ ทำให้มีบทบาทสำคัญในการควบคุมปริมาณหรือความเข้มข้นของโปรตีน waxy และปริมาณอะไมโลสในเมล็ดข้าว เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน *Waxy* สำหรับใช้จำแนกพันธุ์ข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสแตกต่างกัน ส่วนใหญ่จะเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสสูง (Wx^a) ออกจากข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสต่ำ (Wx^b) (Gao *et al*. 2012; Zhou *et al*. 2018)

Lanceras *et al.* (2000) ศึกษาพันธุกรรมที่ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะคุณภาพการหุงต้มและรับประทานในข้าวประชากรลูกผสมข้ามระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ CT9993 พบตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะปริมาณอะไมโลส 4 ตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 3 4 6 และ 7 โดยข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีตำแหน่งที่สัมพันธ์กับลักษณะอะไมโลสอยู่ 2 ตำแหน่ง คือ บนโครโมโซมที่ 6 ระหว่างยีน *waxy* กับเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM204 และโครโมโซมที่ 7 ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ OSR22 กับ RM10

ปาริฉัตร (2555) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ OSR19 ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite marker) ช่วยในการคัดเลือกลักษณะปริมาณอะไมโลสต่ำ โดยจะจำแนกความแตกต่างที่ตำแหน่ง $CT_{(n)}$ ในยีน *waxy* ซึ่งตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 6 ในข้าวลูกผสมข้ามระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่เป็นข้าวคุณภาพดี กับพันธุ์ Qiqnizhan ที่มีศักยภาพในการให้ผลผลิตสูง พบว่าเครื่องดีเอ็นเอ OSR19 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ต้นที่มีพันธุกรรมแบบเฮทเทอโรไซกัส และต้นที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือน Qiqnizhan

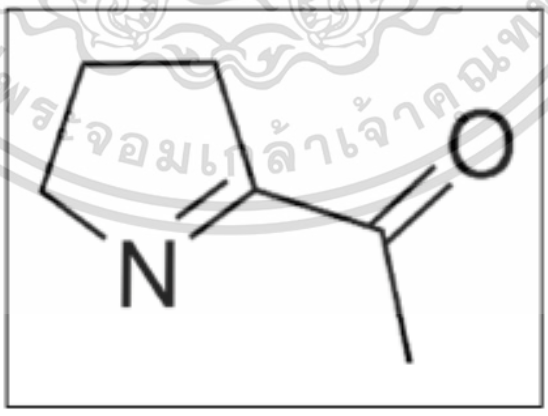
2.6.2 ความหอมของข้าวและสารหอมในข้าว

ข้าวที่มีกลิ่นหอมเป็นกลุ่มข้าวที่ได้รับความนิยมมากในปัจจุบัน เนื่องจากข้าวหอมเป็นข้าวที่มีคุณภาพในการบริโภค มีความนุ่มมีกลิ่นหอม ทำให้ได้รับความนิยมและเกิดความต้องการในการบริโภคข้าวหอมที่เพิ่มมากขึ้น (รัตนา และคณะ. 2559) แต่ความสามารถในการผลิตข้าวหอมทำได้ต่ำ เนื่องจากพันธุ์ข้าวหอมส่วนใหญ่มีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมต่ำ การทนโรคและแมลงต่ำ อีกทั้งยังพบว่าข้าวหอมบางสายพันธุ์สามารถเพาะปลูกได้เพียงฤดูเดียว ข้าวหอมเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในกลุ่มของเกษตรกร พ่อค้า และ ผู้บริโภคมาเป็นเวลาช้านาน คือ ข้าวหอมมะลิของประเทศไทย และข้าวบาสมาติ (Basmati) ของอินเดีย และ ปากีสถาน ถือเป็นข้าวหอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคมากที่สุด (Sakthivel *et al*. 2009) นอกจากนั้นยังมีข้าวหอมอีกหลายสายพันธุ์ เช่น ข้าวพันธุ์ Malagkit Sungsong และ Milagrosa ของประเทศฟิลิปปินส์ พันธุ์ Seratus Malam ของประเทศอินโดนีเซีย พันธุ์ Goolarah ของประเทศออสเตรเลีย พันธุ์ Hieri ของประเทศญี่ปุ่น พันธุ์ Della และ Dellmont ของ ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นต้น (วาสนา. 2538; Sakthivel *et al*. 2009) สำหรับประเทศไทยมีพันธุ์ข้าวหอมที่นิยมปลูกอีกหลายพันธุ์ เช่น ปทุมธานี 1 กข33 กข6 และหอมชลสิทธิ์ เป็นต้น ลักษณะความหอมในข้าวถือเป็นลักษณะพิเศษที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีผลต่อการบริโภคและเป็นตัวกำหนดราคาข้าวทั้งในตลาดภายในประเทศ และต่างประเทศ (Sakthivel *et al*. 2009) และยังทำให้ข้าวหอมมีมูลค่าสูงกว่าข้าวทั่วไป

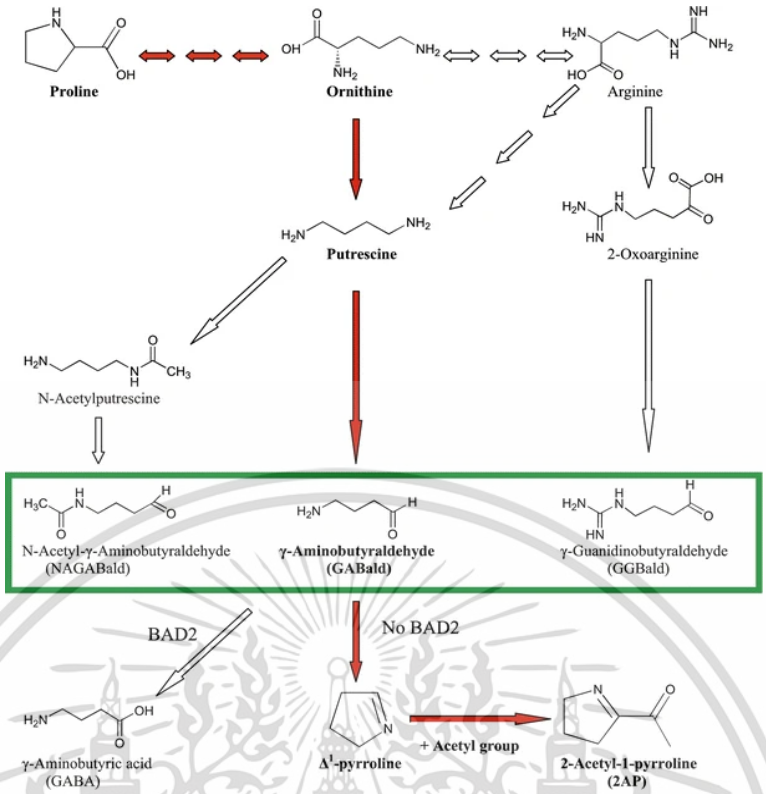
กลิ่นหอมในข้าว มีกลิ่นหอมคล้ายกลิ่นข้าวโพดคั่วหรือกลิ่นใบเตย (Buttery *et al*. 1983) เกิดจากการผสมผสานของสารหอมระเหยหลายชนิด แต่กลิ่นหอมหลักที่พบในข้าวหอมเกิดจากสาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) เป็นสารประกอบในกลุ่ม pyrrole มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวน 5 เหลี่ยม และมีพันธะระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจน เป็นพันธะคู่ 1 พันธะ และมีหมู่ acetyl เกาะกับคาร์บอนตำแหน่งที่สอง มีสูตรโมเลกุล คือ C_6H_9NO (ภาพที่ 5) พบว่า 2AP ถูกสังเคราะห์ในวิถี polyamine โดย มีกรดอะมิโน proline เป็นสารตั้งต้น และถูกควบคุมด้วยยีนด้อย *badh* ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4 และ 8 ในสภาพปกติ ยีน *Badh* จะทำหน้าที่เปลี่ยนสาร GABald เป็นสาร GABA แต่ถ้ายีนดังกล่าวเกิดการกลายพันธุ์ ส่งผลให้สังเคราะห์เอนไซม์ได้ไม่สมบูรณ์ข้าวจะเปลี่ยนสาร GABald เป็นสาร 2AP (ภาพที่ 6) จึงทำให้ข้าวมีกลิ่นหอม ปัจจุบัน ปริมาณ 2AP ถูกนำมาใช้เป็นมาตรฐานในการกำหนดการซื้อขายข้าวหอม ตัวอย่างเช่น ข้าวหอมมะลิทุ่งกุลาร้องไห้ต้องมีปริมาณสาร 2AP ในปริมาณ 0.1 ไมโครกรัมต่อกรัมขึ้นไป (กรมทรัพย์สินทางปัญญา. 2550)



ภาพที่ 5 โครงสร้างของ 2-acetyl-1-pyrroline (2AP)

ที่มา Bradbury e*t al*. (2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

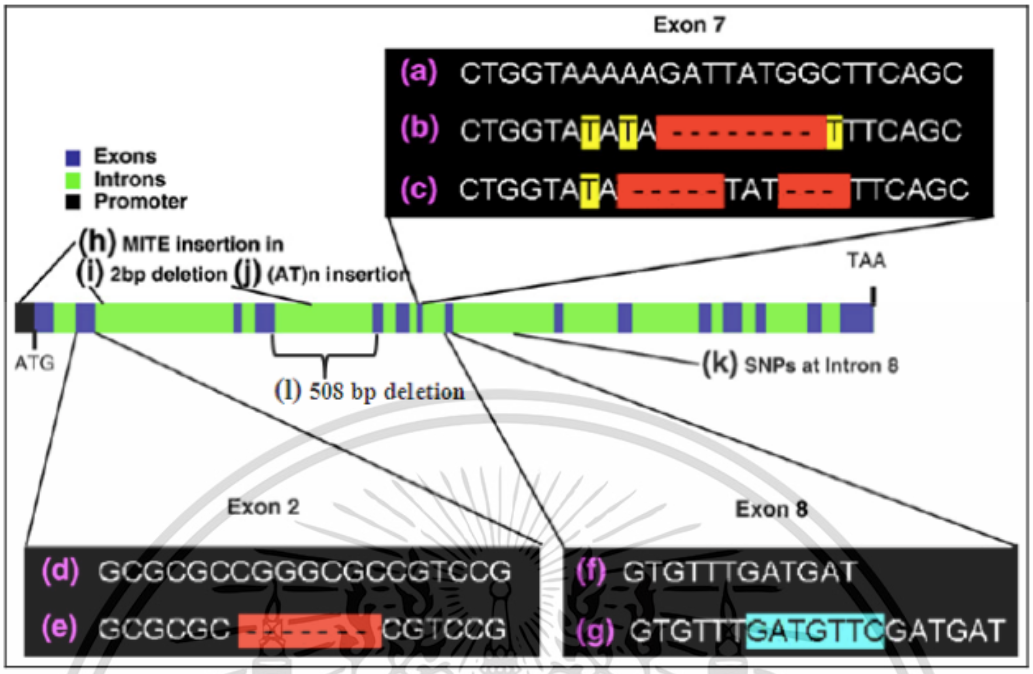


ภาพที่ 6 กระบวนการเกิดสาร 2AP ในข้าวหอม

ที่มา Bradbury et *al*. (2008)

การค้นพบตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะความหอมในข้าวเป็นครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2535 โดย Ahn *et al*. (1992) รายงานว่า ลักษณะความหอมถูกควบคุมด้วยยีนด้อย (recessive gene) มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 8 ใกล้ชิดกับเครื่องหมายโมเลกุล RFLP clone RG28 ต่อมามีรายงานการวางตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะความหอมในข้าวหอมอีกหลายครั้ง โดยส่วนใหญ่รายงานว่า ลักษณะความหอมถูกควบคุมด้วยยีนด้อย (*badh*) และมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 8 (Bradbury *et al*. 2005; Wanchana *et al*. 2005; Shi *et al*. 2008) โดยเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *Badh* ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) ซึ่งมีหน้าที่เปลี่ยนสาร GABald เป็นสาร GABA ข้าวที่มียีนเด่น Badh (dominant gene) ไม่มีกลิ่นหอม แต่เมื่อเกิดการกลายพันธุ์ เช่น การขาดหายของลำดับเบสจำนวน 8 เบส บริเวณ exon 7 ของยีน *Badh2* ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเป็นตำแหน่งหยุดก่อนกำหนด (premature stop codon) และสังเคราะห์กรดอะมิโนได้เพียง 251 ตัว (ภาพที่ 7) ทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์ไม่สมบูรณ์ และไม่สามารถเปลี่ยนสาร GABald เป็นสาร GABA ได้ จึงทำให้ข้าวมีกลิ่นหอม (Bradbury *et al*. 2005; Wanchana *et al*. 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 7 โครงสร้างและตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *Badh2*
ที่มา ดัดแปลงจาก Sakthivel *et al.* (2009)

ปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่ตำแหน่งยีน *badh2* เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection) ข้าวหอมได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความแม่นยำสูง และลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ให้สั้นลง เช่น การปรับปรุงพันธุ์ข้าว II-32B ให้มีกลิ่นหอม โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล badh2-E7 ช่วยในการคัดเลือกร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับและมีข้าวพันธุ์ Yixiang B เป็นสายพันธุ์ให้ จนได้ข้าวสาย พันธุ์คล้าย II-32B ที่มีกลิ่นหอม (Jin *et al.* 2010)

กมลวรรณ และคณะ (2553) ปรับปรุงพันธุ์โดยการคัดเลือกร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว IR57514 ให้มีกลิ่นหอมและคุณภาพการหุงต้มคล้ายข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยทุกครั้งที่มีการผสมกลับจะใช้เครื่องหมายโมเลกุล aro marker ในการคัดเลือกลักษณะความหอมของยีน *badh2* จนได้ประชากร BC_3F_3 ที่มีกลิ่นหอมเหมือนข้าวขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 12 สายพันธุ์

ปาริฉัตร (2555) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro1 ช่วยในการคัดเลือกลักษณะความหอม ในข้าวลูกผสมข้ามระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับพันธุ์ Qiqnizhan ในลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) ชั่วที่ 3 (F_3) และ ชั่วที่ 4 (F_4) พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro1 สามารถแยกลักษณะทางพันธุกรรมแบบโฮโมไซกัส และ เฮทเทอโรไซกัสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรค โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการในชั่วแรกๆ เป็นการลดระยะเวลาในการดำเนินการ เนื่องจากสามารถคัดเลือกได้ในระยะต้นกล้า และสามารถลดจำนวนต้นที่ต้องปลูก เนื่องจากมีการคัดเลือกต้นที่ไม่ต้องการทิ้งไปก่อน

2.7 การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีผสมกลับ (backcross: BC)

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีผสมกลับ (backcross: BC) นิยมใช้เมื่อมีพืชพันธุ์ดีอยู่แล้วแต่ยังขาดลักษณะบางลักษณะ เช่น ความต้านทานต่อโรคหรือแมลงศัตรู จึงนำเอาพันธุ์หรือสายพันธุ์ดีดังกล่าวมาใช้เป็นพันธุ์รับ (recurrent parent) นำไปผสมพันธุ์กับพันธุ์หรือสายพันธุ์อื่นที่มีลักษณะที่ต้องการอยู่เป็นพันธุ์ให้ (donor parent) เมื่อได้ F_1 แล้วจึงผสมกลับไปหาพันธุ์รับ คัดเลือกหาต้นที่มีลักษณะที่ต้องการ การผสมกลับแต่ละครั้งลูกผสมที่ได้ในแต่ละรุ่นจะมีสัดส่วนจีโนมของพันธุ์รับ (recurrent parent) เท่ากับ 2m – (1/2)m เมื่อ m เป็นจำนวนครั้งของการผสมกลับ (Babu *et al*. 2004) จากสูตรดังกล่าว อาจใช้เป็นแนวทางประกอบการตัดสินใจจำนวนครั้งของการผสมกลับ โดยปกติแล้วจำนวนการผสมกลับมีตั้งแต่ 3 – 10 ครั้ง ถ้าถึง 10 ครั้งลูกที่ได้อาจเหมือนกับพันธุ์รับ (recurrent parent) เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสิ้นสุดการผสมกลับครั้งสุดท้ายแล้วยีนที่ต้องการถ่ายทอดจะยังคงอยู่ในสภาพ heterozygous ต้องปล่อยให้มีการผสมตัวเองต่ออีกหนึ่งชั่วจึงจะมี homozygous genotype ที่ต้องการเกิดขึ้น เมื่อทำการคัดเลือกต่อก็จะได้ข้าวพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะต่างๆ ของพันธุ์รับอยู่ พร้อมทั้งลักษณะใหม่จากพันธุ์ให้ด้วย

วิธีการผสมกลับนับเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดลักษณะทางคุณภาพที่ดีจากพันธุ์หนึ่งไปยังอีกพันธุ์หนึ่งอย่างได้ผล เหมาะสำหรับกับการปรับปรุงพันธุ์พืชในลักษณะของความต้านทานโรค วิธีการผสมกลับจะให้ผลเป็นที่พอใจก็ต่อเมื่อมีพันธุ์รับที่ดี ลักษณะที่ถ่ายทอดจากพันธุ์ให้จะต้องคงที่หลังจากผสมกลับไปหลายๆ ครั้ง และจะต้องแสดงออกให้เห็น นอกจากนี้แล้วจำนวนครั้งของการผสมกลับจะต้องมากพอที่จะรักษาลักษณะของพันธุ์รับไว้ได้ (สุทัศน์. 2552)

การตรวจสอบเพื่อพิสูจน์ว่า ข้าวสายพันธุ์ผู้ให้ถูกควบคุมด้วยยีนข่มหรือยีนแฝงนั้นทำได้โดยการนำไปผสมข้ามกับพันธุ์ที่ไม่มีลักษณะนั้นอยู่ เช่น พันธุ์ที่มีลักษณะต้านทานโรค ถ้านำไปผสมกับพันธุ์ที่ไม่ต้านทานโรคแล้วลูกที่ได้แสดงความต้านทานออกมา ก็อาจสันนิษฐานได้ว่าพันธุ์ให้นั้นถูกควบคุมโดยยีนข่ม แต่ถ้าปรากฏว่ารุ่นลูกที่ได้ไม่ต้านทานโรคก็แสดงว่ายีนนั้นถูกควบคุมด้วยยีนแฝงในพันธุ์ให้ ส่วนการพิสูจน์ว่ามียีนควบคุมกี่คู่ต้องปล่อยให้ผสมตัวเองอีก 1 ครั้ง แล้วดูอัตราส่วนการกระจายตัวของลูกผสมรุ่น F_2 เช่นถ้ามีลักษณะต้านทานโรค:ไม่ต้านทานโรคเท่ากับ 3:1 ก็แสดงว่ามียีนควบคุมเพียงคู่เดียว (Allard. 1999) เป็นต้น

ธนกร (2561) ปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานโรคไหม้โดยใช้พันธุกรรมความต้านทานจากข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิลด้วยวิธีผสมกลับ พบว่าสายพันธุ์ผสมกลับชั่วที่ BC_2F_8 มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะทางการเกษตร องค์ประกอบผลผลิต และคุณภาพการหุงต้มรับประทานคล้ายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และสามารถต้านทานโรคไหม้แบบกว้างได้ในทุกพื้นที่

2.8 การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืช

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือ ในระดับต่างสปีชีส์ (สุรินทร์. 2552) สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์และมีความแตกต่าง (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลดีเอ็นเอ จึงทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกันและสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ (จุฑาพร. 2555)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวในปัจจุบัน ได้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีปกติ (conventional breeding) ซึ่งการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection: MAS) จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการคัดเลือก และสามารถคัดเลือกต้นพืชที่มีจีโนไทป์ที่ต้องการได้อย่างแม่นยำ อีกทั้งยังสามารถร่นระยะเวลาของการปรับปรุงพันธุ์ได้ โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ co-dominant marker และ dominant marker ซึ่ง co-dominant marker จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่สามารถแยกต้นที่มีพันธุกรรมเป็น homozygous และ heterozygous เช่น เครื่องหมายดีเอ็นเอ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) สามารถตรวจสอบโดยอาศัยหลักการเข้าคู่ (hybridization) ของดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับชิ้นดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ศึกษา ข้อดีของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ คือ การตรวจสอบแบบเจาะจงตำแหน่งที่แน่นอนบนโครโมโซม สามารถทำซ้ำได้ผลเหมือนเดิม สามารถแยกแสดงแถบดีเอ็นเอแบบข่มร่วมกัน (co-dominance) ทำให้สามารถตรวจสอบ heterozygous ได้ แต่มีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ ขั้นตอนยุ่งยาก ซับซ้อน ใช้เวลานาน และค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานสูง

เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR (Simple Sequence Repeat) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบจำเพาะตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละ 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 จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำให้มีโอกาสได้ขนาดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่ไม่เท่ากัน การตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย microsatellite จึงพบ polymorphism ค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังสามารถแสดงแถบดีเอ็นเอแบบ co-dominance ทำให้สามารถตรวจสอบ heterozygous ได้ (สุรินทร์. 2552) ส่วน dominant marker นั้น จะปรากฏแถบดีเอ็นเอเมื่อต้นพืชมีพันธุกรรมเป็น homozygous เครื่องหมายชนิดนี้จึงไม่สามารถแยก homozygous และ heterozygous ออกจากกันได้ (Collard *et al*. 2005) เช่น เครื่องหมายดีเอ็นเอ RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยหลักการการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) พืชแต่ละชนิดมีการเรียงตัวของลำดับเบสที่แตกต่างกัน เมื่อนำมาตรวจสอบโดยวิธี PCR โดยใช้ primer ที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม หาก primer มีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอของพืชจะเกิดการจำลองตัวเอง หากพันธุ์พืชตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบมีความแตกต่างกัน การจำลองตัวเองก็จะแตกต่างกันไปด้วย จะทำให้ได้ชิ้นและขนาดของดีเอ็นเอแตกต่างกัน สามารถบ่งบอกความแตกต่างของพืชแต่ละสายพันธุ์ได้

เครื่องหมายดีเอ็นเอ AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วมาแยกด้วยเทคนิค denaturing polyacrylamide gel electrophoresis แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น เรียกว่า ลายพิมพ์ AFLP (AFLP fingerprint) ความแตกต่างของลายพิมพ์จะทำให้จำแนกสายพันธุ์พืชได้ (วริศรา. 2560)

Jongdee *et al*. (2008) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์ กข6 ให้ต้านทานโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ทนแล้ง ทนน้ำท่วม และทนเค็ม ซึ่งสามารถรักษาลักษณะที่ดีของข้าวพันธุ์รับไว้เช่นเดิม

Wongsaprom *et al*. (2010) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการรวมลักษณะความต้านทานโรคไหม้แบบกว้างในข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล เพื่อถ่ายทอดลักษณะดังกล่าวให้ข้าวพันธุ์ กข6 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับ (marker-assisted backcrossing, MAB) สามารถถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคไหม้จากข้าวเจ้าหอมนิลให้กับข้าวพันธุ์ กข6 ได้

อมรรัตน์ และคณะ (2558) ปรับปรุงพันธุ์ข้าวแบบผสมกลับร่วมกับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกลักษณะความหอม โดยผสมข้ามระหว่างข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 และข้าวพันธุ์บาสมาติ 370 ซึ่งเป็นข้าวที่มีกลิ่นหอม เพื่อสร้างประชากรชั่วที่ 1 (F_1) จากนั้นผสมกลับไปยังข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 จนกระทั่งถึงชั่ว BC_2F_2 จากนั้นใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro 1 ช่วยคัดเลือกต้นที่มียีนกลิ่นหอม ในแปลงประชากรชั่ว BC_2F_2 ทั้งหมด 192 ต้น สามารถคัดเลือกได้ต้นที่มีกลิ่นหอมจำนวน 28 ต้น และมี 1 สายพันธุ์ที่มีผลผลิตต่อต้นสูงกว่าพันธุ์พ่อแม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และวัสดุการวิจัย

3.1.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้การทดสอบ

3.1.1.1 ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

3.1.1.2 ข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย

3.1.1.3 ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1

3.1.1.4 ข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2

3.1.1.5 ข้าวพันธุ์ IR64 เป็นพันธุ์ต้านทานโรคไหม้

3.1.1.6 ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล เป็นพันธุ์ต้านทานโรคไหม้

3.1.1.7 ข้าวพันธุ์แนะนำของประเทศไทย จำนวน 38 พันธุ์ (ตารางที่ 4)

3.1.2 ปุ๋ยเคมี

3.1.2.1 ปุ๋ยสูตร 46-0-0 (N-P_2O_5-K_2O)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อรา

3.1.3.1 Potato dextrose broth (PDB)

3.1.3.2 Rice Flour Agar (RFA)

3.1.4 สารเคมี

3.1.4.1 absolute ethyl alcohol (Merck, Germany)

3.1.4.2 acetic acid (VWR international S.A.S., France)

3.1.4.3 acrylamide solution 40 % (29:1:0.9) (Merck, Germany)

3.1.4.4 agarose gel (Vivantis, Malaysia)

3.1.4.5 ammonium persulphate (APS, Ajax Finechem, Australia)

3.1.4.6 bromophenol blue (Ajax Finechem, Australia)

3.1.4.7 boric acid (VWR international, UK) 3.1.6.8 methanol

3.1.4.9 ethyl alcohol (Merck, Germany

3.1.4.10 ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA), EMD chemicals, Germany)

3.1.4.11 formaldehyde (Ajax Finechem, Australia)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4.12 gelatin (Gelita AG, Germany)

3.1.4.13 Glass Bond (National diagnostics, USA)

3.1.4.14 Terra PCR Direct (Clontech Laboratories, USA)

3.1.4.15 Tris (hydroxymethyl) aminomethane (EMD chemicals, Germany)

3.1.4.16 silver nitrate (Merck, Germany)

3.1.4.17 sodium acetate (Ajax Finechem, Australia)

3.1.4.18 sodium chloride (Ajax Finechem, Australia)

3.1.4.19 sodium dodecyl sulfate (SDS, EMD chemicals, Germany)

3.1.4.20 sodium hydroxide (Merck, Germany)

3.1.4.20 urea (Ajax Finechem, Australia)

3.1.5 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.1.5.1 10 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, UK)

3.1.5.2 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, UK)

3.1.5.3 1 kb DNA Ladder (Thermo scientific, USA)

3.1.6 เครื่องหมายดีเอ็นเอ

3.1.6.1 เครื่องหมาย RM457 โมเลกุลชนิด simple sequence repeat (SSR) ใช้ในการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้

3.1.6.2 เครื่องหมาย OSR19 ใช้ในการตรวจสอบยีนอะไมโลสต่ำในข้าว

3.1.6.3 เครื่องหมาย Naro ใช้ในการตรวจสอบยีนหอมในข้าว

3.1.7 อุปกรณ์

3.1.7.1 กล้อง Stereo microscope

3.1.7.2 กระบะปลูก ขนาด กว้าง 7 หลุม ยาว 12 หลุม

3.1.7.3 กระถางปลูกขนาด 10 นิ้ว

3.1.7.4 เครื่องแก้วต่างๆ

3.1.7.5 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, BP221S, Germany)

3.1.7.6 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Biometra, Germany)

3.1.7.7 เครื่องปั่นสารและให้ความร้อน (Wisestir, MSH-20A, Korea)

3.1.7.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบธรรมดา (Eppendrof, Model 5418, USA)

3.1.7.9 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Eppendrof, Model 6132, Germany)

3.1.7.10 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Schott, CG 842, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.7.11 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Consort, Germany)

3.1.7.12 เครื่องถ่ายภาพเจล (Bio-Helix, BP001CU, Taiwan)

3.1.7.13 Agarose Gel Electrophoresis (Biorad, PAC200, USA)

3.1.7.14 ชุด Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Bio-Active, UK)

3.1.7.15 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.7.16 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

3.1.7.17 ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส

3.1.7.18 ตู้ดูดควัน (fume hood)

3.1.7.19 ตู้ปลอดเชื้อ

3.1.7.20 ตู้อบความร้อนแห้ง (hot air oven)

3.1.7.21 ไมโครปิเปต (Gilson, France)

3.1.7.22 ไมโครเวฟ

3.1.7.23 สไลด์นับเซลล์ (hemocytometer)

3.1.7.24 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) (Tomy, SX-700-79, Japan)

3.1.7.25 หลอด microtube ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร

3.1.7.26 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, SV-1422, Germany)

3.1.7.27 Tip ขนาด 10 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

3.1.7.28 PCR plate (Thermoscientific, UK)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การประเมินลักษณะต้านทานโรคไหม้บนข้าวพื้นเมืองพันธุ์ห้วย

3.2.1.1 การเตรียมข้าวสำหรับทดสอบ

เพาะเมล็ดข้าวเมืองไทยพันธุ์ห้วย ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล และ ข้าวพันธุ์ IR64 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบที่ต้านทานต่อโรคไหม้ โดยเพาะเมล็ดในกระดาษทิชชูที่ชุ่มน้ำ เป็นเวลา 2 – 3 วัน เมื่อข้าวเริ่มงอกย้ายต้นกล้าลงในถาดหลุมขนาดกว้าง 7 เซนติเมตร ยาว 18 เซนติเมตร (จำนวนหลุม 4 × 4 หลุม) โดยใช้ 1 หลุม ต่อ 1 พันธุ์ พันธุ์ละ 2 ต้น ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 ปริมาณ 5 กรัมต่อกระบะ เมื่อข้าวมีอายุได้ 7 วัน ทำการใส่ปุ๋ยยูเรียอีกครั้ง ในปริมาณ 1 กรัมต่อกระบะ

3.2.1.2 การเตรียมเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

เตรียมเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ *Pyricularia oryzae* จำนวน 25 ไอโซเลท ที่เก็บรวบรวมจากภูมิภาคที่มีการระบาดของโรคไหม้ของประเทศไทย (ตารางที่ 2) โดยนำกระดาษกรองที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีเส้นใยเชื้อรา (working stock) ที่ผ่านการแยกเชื้อแบบสปอร์เดี่ยว และเก็บในรูปเส้นใยแห้งบนกระดาษกรอง มาเลี้ยงบนอาหาร Rice Flour Agar (RFA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปล่อยให้เชื้อราเจริญเป็นเวลา 8 – 12 วัน กระตุ้นให้เชื้อราสร้างสปอร์ตามวิธีของ Sreewongchai *et al.* (2009) โดยเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาณ 500 ไมโครลิตรต่อเพลท ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลลูบทำลายเส้นใยเชื้อราบริเวณผิวหน้าอาหาร (scraping) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน จะได้สปอร์ของเชื้อราเป็นจำนวนมาก เตรียมสปอร์แขวนลอยโดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และขูดสปอร์บนหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล กรองสารแขวนลอยสปอร์ผ่านผ้าขาวบาง แล้วนับจำนวนสปอร์ด้วย haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10 เท่า ปรับความหนาแน่นของสปอร์ให้ได้ 1×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 24 มิลลิลิตร และผสมสารละลายเจลาติน 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 6 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยึดเกาะของโคนิเดียกับใบข้าว เพื่อใช้ในการทดสอบโรคไหม้ข้าวในขั้นตอนต่อไป

3.2.1.3 การปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้บนต้นข้าว ตามวิธีของ Sreewongchai *et al.* (2009) โดยใช้เครื่องปั๊มลม (air brush pressure) ฉีดพ่นใส่ต้นข้าวในระยะกล้าที่มีอายุ 14 วัน แล้วใช้กล่องพลาสติกสีดำครอบถาดข้าว นำไปเก็บในห้องมืด ที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีความชื้นมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปไว้ในสภาพโรงเรือนและทำการฉีดพ่นด้วยน้ำวันละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 3 วัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการก่อโรค

3.2.1.4 การประเมินความต้านทานโรคไหม้

ประเมินปฏิกิริยาการก่อโรคของเชื้อราหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน ให้คะแนนการเกิดโรคโดยใช้ระดับคะแนนการเกิดโรค 7 ระดับ ตามวิธีของ Roumen *et al.* (1997) (ภาพที่ 8) โดยมีระดับคะแนนดังนี้

ระดับ 0 คือ ไม่ปรากฏแผล

ระดับ 1 คือ แผลจุดกลมสีน้ำตาลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร

ระดับ 2 คือ เกิดแผลกลมหรือยาวรีเล็กน้อยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.5 – 1 มิลลิเมตร

ระดับ 3 คือ เกิดแผลจุดเล็กขนาดประมาณ 1 – 3 มิลลิเมตร มีจุดสีเทาตรงกลางแผล

ระดับ 4 คือ เกิดแผลจุดขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร หรือยาวกว่า แผลเป็นสีเทามีขอบแผลสีน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับ 5 คือ เกิดแผลสีเทาเกาะกันเป็นกลุ่มและมีขอบแผลสีน้ำตาลเป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค

ระดับ 6 คือ เกิดแผลลุกลามยาวติดต่อกันเป็นสีเทาไม่มีขอบแผลที่แน่นอนเป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค

แบ่งความต้านทานออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ระดับ 0 – 2 เป็นกลุ่มที่แสดงความต้านทานโรคไหม้ในระดับสูง ในระดับ 3 – 4 เป็นกลุ่มที่แสดงความต้านทานโรคไหม้ในระดับปานกลาง และในระดับ 5 – 6 เป็นกลุ่มที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ (Sallaud *et al*. 2003)

ภาพที่ 8 ลักษณะอาการของโรคไหม้และระดับคะแนนการเกิดโรค 7 ระดับ
ที่มา เสาวลักษณ์ และคณะ (2554)

ตารางที่ 2 รายชื่อและแหล่งที่มาของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ *P. oryzae* จำนวน 25 ไอโซเลท ที่ใช้ในการทดสอบการเกิดโรค

พื้นที่การระบาด	**ไอโซเลท**
ภาคเหนือ	Chiangrai 34.1, THL191, THL794, PLK40.4
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	KKN2008 7357, KKN2009 61067, NKI47181, SKN2008 60867, SRN54002, SRN54005, SRN54007, UBN2009 207129, UBN2010 11351, UBN2010 13515, UBN2010 195167, UBN2010 195171, UBN2009 11308
ภาคกลาง	BKK55001, BKK55003, CCO55002, CCO55004, RBR55001, RBR55003
ภาคใต้	PL1, PL2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 การตรวจสอบปริมาณอะไมโลสโดยวิธีเคมี

1) การเตรียมตัวอย่าง ดัดแปลงจากวิธีของ Juliano (1971) โดยบดตัวอย่างเมล็ดข้าว ปริมาณ 0.2 กรัม ใส่ในหลอดแก้ว เติมสารละลายเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 20 มิลลิลิตร นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ดูดสารละลายที่ผสมมา 1,000 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดแก้ว เติมสารละลายกรดอะซิติก (acetic acid) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาณ 200 ไมโครลิตร เติมสารละลายไอโอดีน ปริมาณ 400 ไมโครลิตร จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 20 นาที ตรวจวัดปริมาณอะไมโลสด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 620 นาโนเมตร และวัดค่าการดูดกลืนแสง

2) การเตรียมสารละลายมาตรฐานอะไมโลสสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน โดยการชั่งอะไมโลสบริสุทธิ์ ปริมาณ 0.04 กรัม ใส่ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ไม่ควรให้อะมิโลสเกาะข้างหลอด เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากัน

3) การสร้างกราฟมาตรฐาน โดยดูดสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้จากข้อ 2 ปริมาตร 1 2 3 4 และ 5 มิลลิลิตร ใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 70 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรที่มีสารละลายมาตรฐานตามลำดับ และเติมสารละลายไอโอดีน 2 มิลลิลิตร ในทุกขวด จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 8 16 24 32 และ 40 เขย่าสารละลายให้เข้ากันทิ้งไว้ 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และนำค่าที่อ่านได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณอะมิโลสกับค่าดูดกลืนแสง

4) นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างในข้อ 1) มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน คิดเป็นร้อยละของปริมาณอะไมโลส แล้วจำแนกประเภทของข้าวตามตารางที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 การแบ่งประเภทของข้าวตามปริมาณอะไมโลส

ประเภทข้าว	ปริมาณอะไมโลส (เปอร์เซ็นต์)	ลักษณะ
ข้าวเหนียว	1 – 2	เหนียวมาก
ข้าวเจ้าอะไมโลสต่ำมาก	3 – 9	เหนียว
ข้าวเจ้าอะไมโลสต่ำ	10 – 19	เหนียว นุ่ม
ข้าวเจ้าอะไมโลสปานกลาง	20 – 25	ค่อนข้างร่วน แข็ง
ข้าวเจ้าอะไมโลสสูง	> 25	ร่วน แข็ง

ที่มา: Juliano (1971)

3.2.3 การตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้บนข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย และข้าวพันธุ์แนะนำของไทย

3.2.3.1 การสกัดดีเอ็นใบข้าว

สกัดดีเอ็นเอใบข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย และข้าวพันธุ์แนะนำของไทย (ตารางที่ 4) ด้วยชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia) ตามวิธีการที่บริษัทแนะนำ โดยบดใบข้าวด้วยไนโตรเจนเหลว และแบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม buffer PL ปริมาณ 280 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม Proteinase K ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ผสมโดยการพลิกหลอดไปมา นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ใน waterbath shaker นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายใส่ microtube หลอดใหม่ปริมาณ 300 ไมโครลิตร เติม buffer PB (ทำให้อุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส) ปริมาณ 600 ไมโครลิตรอีกครั้ง ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติม absolute ethanol ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ดูดสารละลายใส่ใน column ครั้งละ 650 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วทำซ้ำกับสารละลายที่เหลือ หลังจากนั้นล้าง column ด้วย Wash buffer ปริมาณ 650 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เท Wash buffer ทิ้งแล้วปั่นเหวี่ยงอีกรอบ ชะดีเอ็นเอออกจาก column โดยการเติม Elution buffer (ทำให้อุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส) ปริมาณ 50 ไมโครลิตร รอ 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อเก็บสารละลายดีเอ็นเอ เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ใช้ไพรเมอร์ ที่จำเพาะต่อยีนต้านทานของข้าว จำนวน 8 เครื่องหมาย (ตารางที่ 5) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR โดยนำดีเอ็นเอที่ปรับความเข้มข้นเป็น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH_2O ปริมาณ 5.1 ไมโครลิตร PCR buffer ความเข้มข้น 10X ปริมาณ 1 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$MgCl_2$ ความเข้มข้น 2.5 mM ปริมาณ 1 ไมโครลิตร dNTPs ความเข้มข้น 0.5 mM ปริมาณ 0.8 ไมโครลิตร *Taq* polymerase ความเข้มข้น 5u/µl ปริมาณ 0.1 ไมโครลิตร ส่วนผสมระหว่าง forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น 5 µM ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอของข้าว ความเข้มข้น 10 ng/µl ปริมาณ 1 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง PCR Thermal Cycler (Biometra, Germany) โดยสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นาน 1 รอบ 2) denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที นาน 1 รอบ 3) annealing ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของแต่ละไพร์เมอร์ (ตารางที่ 5) นาน 15 วินาที 4) extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ และขั้นตอน final extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

การวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR โดยนำผลผลิต PCR ปริมาณ 3 ไมโครลิตร ผสมกับ Loading Buffer (Bio-Helix, Taiwan) ความเข้มข้น 6X ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดสารละลายลงในหลุมของ agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที โดยใช้สารละลาย TAE buffer ความเข้มข้น 0.5X เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้าและตรวจดูแถบ DNA ด้วยเครื่อง BluPAD (Bio-Helix, BP001CU, Taiwan)

ตารางที่ 4 รายชื่อข้าวพันธุ์แนะนำของไทยจำนวน 40 พันธุ์ และความต้านทานโรคไหม้

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ข้าว	พื้นที่การเพาะปลูก	การแสดงออกต่อโรคไหม้ข้าว *
1	กข27	ภาคกลาง	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
2	กข41	ภาคเหนือ	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
3	กข6	ภาคเหนือและภาคอีสาน	อ่อนแอต่อโรคไหม้ข้าว
4	กข43	-	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
5	กข59	ภาคเหนือ	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
6	กข7	-	อ่อนแอต่อโรคไหม้ข้าว
7	กข61	ภาคกลางและภาคเหนือ	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
8	เจ้าขาวเชียงใหม่	ภาคเหนือ	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
9	พิษณุโลก 1	ภาคกลางและภาคเหนือ	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
10	คลองหลวง 1	ภาคกลาง	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
11	กข31	ภาคกลาง	อ่อนแอต่อโรคไหม้ข้าว
12	พิษณุโลก 60	-	อ่อนแอต่อโรคไหม้ข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ข้าว	พื้นที่การเพาะปลูก	การแสดงออกต่อโรคไหม้ข้าว *
13	สุพรรณบุรี 1	-	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
14	เหนียวอุบล 1	-	อ่อนแอต่อโรคไหม้ข้าว
15	สุพรรณบุรี 2	ภาคกลาง ตะวันออกและตะวันตก	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
16	สุพรรณบุรี 3	ภาคกลาง	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
17	พิษณุโลก 2	ภาคกลาง	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
18	สุพรรณบุรี 60	ภาคกลาง ตะวันออกและตะวันตก	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
19	สุพรรณบุรี 90	ภาคกลาง	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
20	สกลนคร	ภาคอีสาน	อ่อนแอต่อโรคไหม้ข้าว
21	ชัยนาท 1	-	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
22	ปทุมธานี 1	ภาคกลาง	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
23	เล็บนกปัตตานี	ภาคใต้	อ่อนแอต่อโรคไหม้ข้าว
24	พลายงามปราจีนบุรี	ภาคกลางและภาคตะวันออก	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
25	ปราจีนบุรี 2	ภาคกลาง	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
26	สังข์หยดพัทลุง	ภาคใต้	อ่อนแอต่อโรคไหม้ข้าว
27	หางยี 71	ภาคอีสาน	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
28	ข้าวหอมแดง	ภาคอีสาน	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
29	กว.ก.1	ภาคเหนือและภาคอีสาน	อ่อนแอต่อโรคไหม้ข้าว
30	กข8	ภาคอีสาน	ไม่มีรายงาน
31	หอมชลสิทธิ์	ภาคกลาง	ไม่มีรายงาน
32	กขผ3	ภาคกลาง	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
33	กว.ก.2	ภาคเหนือและภาคอีสาน	อ่อนแอต่อโรคไหม้ข้าว
34	กข29	ภาคเหนือและภาคกลาง	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
35	สันป่าตอง 1	ภาคเหนือ	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
36	แพร่ 1	ภาคเหนือ	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
34	กข29	ภาคเหนือและภาคกลาง	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
35	สันป่าตอง 1	ภาคเหนือ	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
36	แพร่ 1	ภาคเหนือ	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว
37	กข10	ภาคเหนือ	อ่อนแอต่อโรคไหม้ข้าว
38	กข14	ภาคเหนือ	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ข้าว	พื้นที่การเพาะปลูก	การแสดงออกต่อโรคไหม้ข้าว *
39	ขาวดอกมะลิ 105	ภาคอีสาน	อ่อนแอต่อโรคไหม้ข้าว
40	เจ้าหอมนิล	ภาคอีสาน	ต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว

*** ที่มา:** กรมการข้าว (2559)

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา และขนาดของผลผลิต PCR

R genes	Chrs.	DNA marker	Sequence (5'-3')	Tm (C)	Exp. Size (bp)
Pi9	6	pB8	F-CCCAATCTCCAATGACCCATAAC R- CCGGACTAAGTACTGGCTTCGATA	56	500
Pi54	11	Pi54 MAS	F-CAATCTCCAAAGTTTTCAGG R- GCTTCAATCACTGCTAGACC	55	261
Pia	11	-	F-GAGCAATGCCCAATCTCCAG R- TTTACCGTTCACTGACGCAG	60	906
Pi50	6	-	F-CTTGACATCCAAACCGCACC R- TAGGCCTAGCCAATTTTTGCC	60	1172
Pigm(t)	6	S29747	F-CAGTGAAACGAACGCTATG R- AATAGGAAGGGTTGATGTTG	56	555
Pi-ta	12	Pi-ta	F-AGCAGGTTATAAGCTAGGCC R- CTACCAACAAGTTCATCAAA	58	1024
Pik	11	-	F-GGAAAGCTGATATGTTGTCG R- ACTCGGAGTCGGAGAGTCAG	58	1144
Pib	2	NSb	F-ATCAACTCTGCCACAAAATCC R- CCCATATCACCACTTGTTCCCC	57	629

3.2.4 การสร้างประชากรข้าวลูกผสมและการคัดเลือกลูกผสมในประชากรรุ่น BC_2F_2

3.2.4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ผู้ให้ (donor) และการสร้างประชากร BC_2F_2

ได้ต้นลูกผสมกลับ BC_2F_1 จากโครงการวิจัยเรื่อง การปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ต้านทานโรคไหม้ด้วยยีนต้านทานจากข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย ประจำปี พ.ศ. 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวน 1 ต้น ที่ผ่านการตรวจสอบลักษณะความต้านทานโรคไหม้ และมีลักษณะความหอม และลักษณะอะไมโลสต่ำ เหมือนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเครื่องหมาย DNA จากนั้นปล่อยให้มีการผสมตัวเองเพื่อสร้างประชากร BC_2F_2

3.2.4.2 การคัดเลือก BC_2F_2 ที่มีความต้านทานโรคไหม้

1) เตรียมต้นข้าวสำหรับทดสอบ

เพาะเมล็ดข้าว BC_2F_2 ร่วมกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล และ พันธุ์ IR64 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบที่ต้านทานต่อโรคไหม้ ในกระดาษทิชชูที่ชุ่มน้ำ เป็นเวลา 2 – 3 วัน เมื่อข้าวเริ่มงอกย้ายต้นกล้าลงในถาดหลุมขนาดกว้าง 7 เซนติเมตร ยาว 18 เซนติเมตร (จำนวนหลุม 7 × 12 หลุม) โดยใช้ 1 หลุม ต่อ 1 พันธุ์ พันธุ์ละ 2 ต้น ใส่ปุ๋ยสูตร 46 – 0 – 0 ปริมาณ 5 กรัมต่อกระบะ เมื่อข้าวมีอายุได้ 7 วัน ทำการใส่ปุ๋ยยูเรียอีกครั้ง ในปริมาณ 1 กรัมต่อกระบะ

2) การปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้

เตรียมเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ *Pyricularia oryzae* จำนวน 25 ไอโซเลท (ตามวิธีการในข้อ 3.2.1.2) ปรับความหนาแน่นของสปอร์ของเชื้อแต่ละไอโซเลทให้ได้ 1×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 3.2 มิลลิลิตร นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อแต่ละไอโซเลทผสมรวมกัน และผสมสารละลายเจลาติน 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 20 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยึดเกาะของโคนิเดียกับใบข้าว จะได้สารละลายเพื่อใช้ในการทดสอบโรคไหม้ข้าว ตามวิธีการในข้อ 3.2.1.3

3) การประเมินความต้านทานโรคไหม้ (ตามวิธีการในข้อ 3.2.1.4) และทำการคัดเลือกต้นที่แสดงความต้านทานด้วยระดับคะแนน 0 (ไม่แสดงอาการ) 1 และ 2 (แสดงอาการเล็กน้อย)

4) การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวลูกผสมกลับรุ่นที่ BC_2F_2 โดยวิเคราะห์จากข้อมูลทาง phenotype ด้วยการทดสอบ Chi square โดยวิเคราะห์การกระจายตัวในประชากรว่าเป็นตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel

3.2.4.3 การคัดเลือกประชากร BC_2F_2 ที่มีลักษณะความหอม โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro ด้วยเทคนิค Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

1) การเพิ่มดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Terra PCR Direct (ClontechLaboratories,USA) โดยตัดใบข้าวให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มิลลิเมตร จำนวน 2 – 3 ชิ้น ลงใน PCR plate จากนั้นเตรียมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยให้มีปริมาณรวมทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2X plant PCR buffer ความเข้มข้น 1X ปริมาณ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครลิตร, ส่วนผสมระหว่าง ไพร์เมอร์ Naro1F; 5/-AGGTTGCATTTACTGGGAG-3/ และ Naro1R; 5/-TGGCTA CTAGAAT GATGCT-3/ ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, Terra PCR direct polymerase mix ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร และ Sterile distilled H_2O ปริมาณ 2.8 ไมโครลิตร นำ PCR plate ใส่ลงในเครื่อง PCR (thermal cycler) โดยสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย 1) initial denaturation ที่อุณหภูมิ 98°C นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ 2) denaturation step ที่อุณหภูมิ 98°C นาน 10 วินาที 3) annealing step ที่อุณหภูมิ 55°C นาน 15 วินาที 4) extension step ที่อุณหภูมิ 68°C นาน 30 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 34 รอบ และ 5) final extension step ที่อุณหภูมิ 68°C เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 1 รอบ เมื่อครบจำนวนรอบนำไปตรวจสอบผลด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamidegel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบผลด้วยการย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silvernitrate ($AgNO_3$) ตามวิธีการของ Benbouza *et al.* (2006)

2) การเตรียม chamber และกระจก โดยทำความสะอาดกระจกแผ่นแต็มและกระจกแผ่น chamber ด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้กระดาษทิชชูเช็ดให้ทั่วทั้งแผ่น จากนั้นใช้กระดาษคิมไวพ์ (kimwipes paper) เช็ดกระจกแผ่นเต็มด้วยสารละลาย absolute ethanol ปริมาตร 992.5 ไมโครลิตร ที่ผสมด้วย glass bond (National diagnostics, USA) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร และ acetic acid ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ให้ทั่วกระจก แล้วเช็ดตามด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้งให้ทั่วกระจก เช็ดกระจกแผ่น chamber ด้วยน้ำยาเคลือบกระจก (clear view, USA) ให้ทั่ว และเช็ดตามด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้งให้ทั่ว เมื่อเช็ดเสร็จแล้วให้นำกระจกแผ่นเต็ม และกระจกแผ่น chamber มาประกบกัน โดยคั่นด้วย spacer โดยวาง spacer ที่ขอบกระจกทั้ง 2 ด้าน แล้วใช้คลิปหนีบกระจกบริเวณส่วนของ spacer ทั้ง 2 ข้าง เพื่อยึดกระจกก่อนเทเจล

3) การเตรียม acrylamide gel มีส่วนประกอบคือ acrylamide gel ที่ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย acrylamide solution ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 7.5มิลลิลิตร ยูเรีย ปริมาณ 21.03 กรัม และ 10X TBE ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เติม APS (ammonium persulphate) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ TEMED (N,N,N´,N´– tetramethylethylenediamine) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบาๆ เท acrylamide gel ลงในช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสองแผ่นจนเต็ม ระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ เสียบหวีด้านที่ไม่มีซี่แหลมลงไปด้านบนให้ลึก 0.5 เซนติเมตร เพื่อให้เกิดช่องวางทิ้งไว้ในแนวราบ ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อเจลแข็งตัวแล้วทำความสะอาดกระจกและเช็ดยูเรียส่วนเกินออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยการประกอบกระจกเข้ากับชุด PAGE (Bio-Active, UK) และต่อเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (electrophoresis power supply) เติม 1X TBE buffer ลงในช่องด้านบน และช่องด้านล่าง เสร็จแล้วทำการ pre-run โดยใช้ กระแสไฟฟ้าที่ 70 วัตต์ หรือประมาณ 1,600 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ทำการไล่ฟองอากาศโดยใช้ไมโครปิเปต และเสียบหวีด้านแหลมปักลงบนผิวหน้าของเจล หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตรต่อช่อง พร้อมทั้ง DNA standard marker ขนาด 10 คู่เบส ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ปล่อยกระแสไฟฟ้าโดยใช้กำลังไฟที่ 45 วัตต์ นาน 5 นาที ดึงหวีออกปล่อยกระแสไฟฟ้าต่อนาน 2 ชั่วโมง เมื่อเสร็จแล้วทำการแยกกระจกแผ่นเต็มและกระจกแผ่น chamber ออกจากกัน

5) การตรวจสอบผลด้วยการย้อม Silver staining ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate ตามวิธีการของ Benbouza *et al*. (2006) โดยมีขั้นตอน ดังนี้ 1) fixation ด้วยสารละลายปริมาณ 2 ลิตร ที่ประกอบด้วย absolute ethanol ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และ acetic acid ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที 2) impregnation ด้วยสารละลายปริมาณ 2 ลิตร ที่ประกอบด้วย silver nitrate ($AgNO_3$) ปริมาณ 3 กรัม และ formaldehyde 37 เปอร์เซ็นต์ แช่นาน 7 นาที 3) ล้างโดยการนำเจลที่ติดกับกระจกจุ่มลงในน้ำกลั่นแล้วยกขึ้นทันที 4) development ด้วยสารละลายปริมาณ 2 ลิตรที่ประกอบด้วย sodium hydroxide (NaOH) ปริมาณ 300 กรัม และ formaldehyde 37 เปอร์เซ็นต์ แช่นาน 3 – 5 นาที หรือจนแถบดีเอ็นเอปรากฏ 5) หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายปริมาณ 2ลิตร ที่ประกอบด้วย absolute alcohol 10 เปอร์เซ็นต์ และ acetic acid 0.5 เปอร์เซ็นต์ แช่นาน 2 นาที แล้วผึ่งเจลให้แห้ง

6) การวิเคราะห์ผลที่ได้จากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยตรวจสอบผลจากขนาดดีเอ็นเอที่ปรากฏ โดยกำหนดเครื่องหมายดังนี้

A คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (parent 1, P1)

B คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (parent 2, P2)

H คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่

3.2.4.4 การคัดเลือกประชากร BC_2F_2 ที่มีลักษณะอะไมโลสต่ำ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ OSR19 ด้วยเทคนิค Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

เพิ่มดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Terra PCR Direct (ClontechLaboratories,USA) โดยตัดใบข้าวให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มิลลิเมตร จำนวน 2 – 3 ชิ้น ลงใน PCR plate จากนั้นเตรียมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยให้มีปริมาณรวมทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2X plant PCR buffer ความเข้มข้น 1X ปริมาณ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโครลิตร, ส่วนผสมระหว่าง ไพร์เมอร์ OSR19F; 5/-GCTACAAATACCCACACC-3/ และ OSR19R; 5/-CAACACAAGC AGAGAAGTGAAGC-3/ ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, Terra PCR direct polymerase mix ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร และ Sterile distilled H_2O ปริมาณ 2.8 ไมโครลิตร นำ PCR plate ใส่ลงในเครื่อง PCR (thermal cycler) โดยสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย 1) initial denaturation ที่อุณหภูมิ 98°C นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ 2) denaturation step ที่อุณหภูมิ 98°C นาน 10 วินาที 3) annealing step ที่อุณหภูมิ 55°C นาน 15 วินาที 4) extension step ที่อุณหภูมิ 68°C นาน 30 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 34 รอบ และ 5) final extension step ที่อุณหภูมิ 68°C เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 1 รอบ เมื่อครบจำนวนรอบนำไปตรวจสอบผลด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบผลด้วยการย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silvernitrate ($AgNO_3$) ตามวิธีการของ Benbouza *et al.* (2006) ในข้อ 3.2.4.3

3.2.4.5 การคัดเลือกประชากร BC_2F_2 ที่มีลักษณะต้านทานโรคไหม้ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM457 ด้วยเทคนิค Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

ตรวจยืนยันความต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าว BC_2F_2 ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยนำประชากร BC_2F_2 ที่ผ่านการคัดเลือกในข้อ 3.2.4.3 และ 3.2.4.4 มาคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM457 เพิ่มดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Terra PCR Direct (ClontechLaboratories,USA) โดยตัดใบข้าวให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 มิลลิเมตร จำนวน 2 – 3 ชิ้น ลงใน PCR plate จากนั้นเตรียมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยให้มีปริมาณรวมทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2X plant PCR buffer ความเข้มข้น 1X ปริมาณ 5 ไมโครลิตร, ส่วนผสมระหว่าง ไพร์เมอร์ RM457F; 5/-CTCCAGCATGGCCT TTCTAC-3/ และ RM457R; 5/-ACCTGATGGTCAAAGATGGG-3/ ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร, Terra PCR direct polymerase mix ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร และ Sterile distilled H_2O ปริมาณ 2.8 ไมโครลิตร นำ PCR plate ใส่ลงในเครื่อง PCR (thermal cycler) โดยสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย 1) initial denaturation ที่อุณหภูมิ 98°C นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ 2) denaturation step ที่อุณหภูมิ 98°C นาน 10 วินาที 3) annealing step ที่อุณหภูมิ 55°C นาน 15 วินาที 4) extension step ที่อุณหภูมิ 68°C นาน 30 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 34 รอบ และ 5) final extension step ที่อุณหภูมิ 68°C เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 1 รอบ เมื่อครบจำนวนรอบนำไปตรวจสอบผลด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีการของ Benbouza *et al.* (2006) ในข้อ 3.2.4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คัดเลือกเฉพาะต้นที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย เป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคไหม้ ที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อของคู่ผสมระหว่างข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการสร้างประชากรข้าว BC_2F_2 หลังจากเสร็จขั้นตอนการคัดเลือกในข้อนี้ต้นข้าวที่คัดเลือกได้ตามลักษณะพันธุกรรมที่มีลักษณะทางคุณภาพเหมือนพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ทั้ง 2 ลักษณะ และมีลักษณะต้านทานโรคไหม้เหมือนข้าวพันธุ์ห้วย เพื่อใช้เป็นพันธุ์พ่อในการสร้างประชากรข้าวผสมกลับรุ่นถัดไป

3.2.5 การสร้างประชากรข้าวผสมกลับครั้งที่ 3 ชั่วที่ 1 (BC_3F_1) และการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคไหม้

3.2.5.1 การสร้างประชากร BC_3F_1

นำข้าวลูกผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 2 (BC_2F_2) ที่ผ่านการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคไหม้ ตามข้อ 3.2.4 มาใช้เป็นสายพันธุ์พ่อ (ผู้ให้) ผสมกลับไปยังพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งใช้เป็นพันธุ์แม่ (ผู้รับ) โดยเตรียมช่อดอกพันธุ์แม่ (KDML105) ในช่วงเวลาเย็นก่อนวันผสม ด้วยการทำหมันเกสรเพศผู้ (emasculation) โดยเลือกช่อดอกในระยะโผล่ช่อดอก (heading) ใช้กรรไกรตัดดอกที่ผสมตัวเองบริเวณปลายช่อดอกและดอกอ่อนเกินไปบริเวณโคนช่อดอกทิ้ง เหลือไว้เฉพาะดอกที่พร้อมผสมในวันถัดไปประมาณ 20 ดอกต่อช่อ สังเกตจากอับละอองเกสรอยู่ในตำแหน่งประมาณครึ่งของความยาวกาบหุ้มดอก จากนั้นใช้กรรไกรตัดปลายกาบหุ้มดอกประมาณ 1 ใน 3 เฉียงทำมุมประมาณ 45 องศา เขี่ยอับเกสรเพศผู้ (anther) ออก ฉีดพ่นดอกเพศเมียด้วยน้ำเปล่าเพื่อให้ความชื้นแก่ดอก และคลุมช่อดอกด้วยถุงกระดาษ วันรุ่งขึ้นนำละอองเกสรเพศผู้จากต้นที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อที่ 3.2.4 มาถ่ายลงบนยอดเกสรเพศเมีย (stigma) ของต้นพันธุ์แม่โดยการคีบอับเกสรเพศผู้ใส่ไว้ในกาบดอกเพศเมียที่เตรียมไว้ และคลุมช่อดอกด้วยถุงกระดาษ ผูกป้ายชื่อไว้กับช่อดอก ระบุชื่อพันธุ์พ่อ และแม่พร้อมระบุวันที่ทำการผสม (fertilization) หลังจากการผสมนาน 4 – 5 สัปดาห์ เก็บเมล็ดที่ได้จากการผสมมาทำลายการพักตัวของเมล็ด โดยการผึ่งแดด 1 สัปดาห์

3.2.5.2 การทดสอบความต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าว BC_3F_1

เพาะเมล็ดข้าว BC_3F_1 ร่วมกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล และพันธุ์ IR64 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบที่ต้านทานต่อโรคไหม้ ในกระดาษทิชชูที่ชุ่มน้ำ เป็นเวลา 2 – 3 วัน เมื่อข้าวเริ่มงอกย้ายต้นกล้าลงในถาดหลุมขนาดกว้าง 7 เซนติเมตร ยาว 18 เซนติเมตร โดยใช้ 1 หลุม ต่อ 1 พันธุ์ พันธุ์ละ 1 ต้น ใส่ปุ๋ยสูตร 46 – 0 – 0 ปริมาณ 5 กรัมต่อกระบะ เมื่อข้าวมีอายุได้ 7 วัน ทำการใส่ปุ๋ยยูเรียอีกครั้ง ในปริมาณ 1 กรัมต่อกระบะ ทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้ จำนวน 25 ไอโซเลท (ตามวิธีการในข้อ 3.2.1.2) ปรับความหนาแน่นของสปอร์ของเชื้อแต่ละไอโซเลทให้ได้ 1×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 1.6 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อแต่ละไอโซเลทผสมรวมกัน และผสมสารละลายเจลาติน 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยึดเกาะของโคนิเดียกับใบข้าว จะได้สปอร์แขวนลอยปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบโรคไหม้ข้าว ตามวิธีการในข้อ 3.2.1.3 ประเมินความต้านทานโรคไหม้ ตามวิธีการในข้อ 3.2.1.4 และทำการคัดเลือกต้นที่แสดงความต้านทานด้วยระดับคะแนน 0 (ไม่แสดงอาการ) 1 และ 2 (แสดงอาการเล็กน้อย) ใช้เป็นพันธุ์พ่อในการสร้างประชากรข้าวผสมกลับรุ่นถัดไป

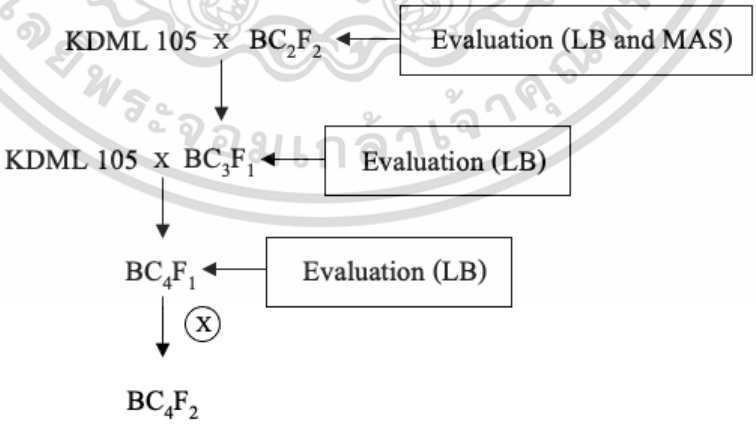
3.2.6 การสร้างประชากรข้าวผสมกลับครั้งที่ 4 ชั่วที่ 1 (BC_4F_1) และการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคไหม้

3.2.6.1 การสร้างประชากร BC_4F_1

นำข้าวลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือก ตามข้อ 3.2.5 มาใช้เป็นสายพันธุ์พ่อ (ผู้ให้) ผสมกลับไปยังพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งใช้เป็นพันธุ์แม่ (ผู้รับ) ตามวิธีการผสมในข้อ 3.2.5.1 หลังจากการผสมนาน 4 – 5 สัปดาห์ เก็บเมล็ดที่ได้จากการผสมมาทำลายการพักตัวของเมล็ดโดยการผึ่งแดด 1 สัปดาห์

3.2.6.2 การทดสอบความต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าว BC_4F_1

เพาะเมล็ดข้าว BC_4F_1 ร่วมกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์เปรียบเทียบที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล และ พันธุ์ IR64 เมื่อข้าวอายุครบ 14 วัน ทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 25 ไอโซเลท ตามวิธีการในข้อ 3.2.5.2 คัดเลือกต้นที่แสดงความต้านทานด้วยระดับคะแนน 0 (ไม่แสดงอาการ) 1 และ 2 (แสดงอาการเล็กน้อย) จากนั้นปล่อยให้มีการผสมตัวเองตามธรรมชาติ (selfed) เพื่อสร้างประชากร BC_4F_2



หมายเหตุ LB คือ การประเมินโรคไหม้ด้วยวิธีปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

MAS คือ การประเมินด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

ภาพที่ 9 แผนการดำเนินงานสร้างประชากรข้าวลูกผสมกลับระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และสายพันธุ์ห้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การทดสอบความต้านทานโรคไหม้ของข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย

ทดสอบความต้านทานโรคไหม้ของข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย ต่อประชากรเชื้อราสาเหตุโรคจำนวน 25 ไอโซเลท (ตารางที่ 2) โดยปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้บนกล้าข้าวทดสอบ 1 ไอโซเลท ต่อข้าว 4 ต้น ทำการทดสอบ 2 ซ้ำใน 1 ครั้งการทดลอง และทำการทดลองทั้งหมด 2 ครั้ง หลังจากประเมินความต้านทานโรคไหม้เมื่อปลูกเชื้อแล้ว 7 วัน พบว่าข้าวพันธุ์ห้วยสามารถต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวได้ทั้งหมด 25 ไอโซเลท ในจำนวนนี้พบเชื้อราเพียง 1 ไอโซเลท ได้แก่ PLK40.4 ซึ่งก่อโรคไม่รุนแรง (ระดับคะแนน 2) บนข้าวพันธุ์ห้วย ในขณะที่เชื้ออีก 24 ไอโซเลท ไม่สามารถก่อโรค (ระดับคะแนน 0) บนข้าวพันธุ์ห้วยได้ (ตารางที่ 6) จากผลการทดลองพบว่าข้าวพันธุ์ห้วยมีลักษณะความต้านทานแบบกว้างต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ เนื่องจากสามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลท

เชื้อราไอโซเลท PLK40.4 ก่อโรคไม่รุนแรง (ระดับคะแนน 1) บนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวอ่อนแอต่อโรคไหม้ที่ใช้เป็นพันธุ์ทดสอบเปรียบเทียบ จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สามารถต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลท PLK40.4 ในทางตรงกันข้ามเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 สามารถก่อโรครุนแรง (ระดับคะแนน 5 – 6) บนข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวต้านทานต่อโรคไหม้ที่ใช้เป็นพันธุ์ทดสอบเปรียบเทียบ จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล ไม่สามารถต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลท PLK40.4

4.2 ผลการตรวจสอบปริมาณอะไมโลส โดยวิธีเคมี

4.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานในการเปรียบเทียบกับปริมาณอะไมโลสในเมล็ดข้าวนั้นสร้างจากอะไมโลสบริสุทธิ์ โดยเตรียมเป็นความเข้มข้นมาตรฐาน 0 8 16 24 32 และ 40 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร นำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน คำนวณสมการทำนายปริมาณอะมิโลส มีค่าความเชื่อมั่นของสมการเท่ากับ 99.6 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 10)

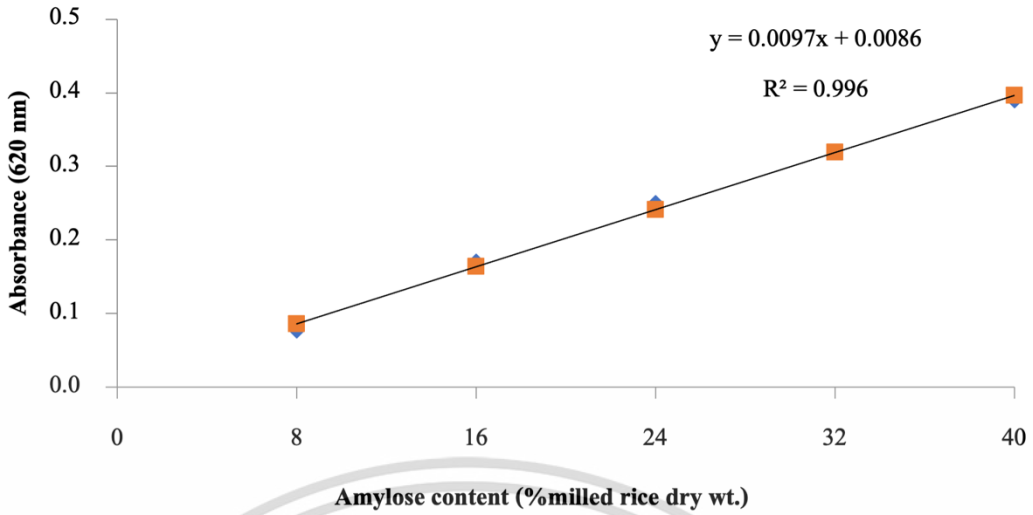
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 ระดับความรุนแรงของโรคบนข้าวพันธุ์ห้วย ขาวดอกมะลิ 105 เจ้าหอมนิล และพันธุ์ IR64 ที่ 7 วัน หลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ทีละไอโซเลทจำนวน 25 ไอโซเลท

ไอโซเลท	พันธุ์ข้าว							
	ห้วย		ขาวดอกมะลิ 105		IR64		เจ้าหอมนิล	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
BKK55001	0*	0	4	3	0	0	0	0
BKK55003	0	0	6	6	0	0	0	0
CCO56002	0	0	5	4	0	0	0	0
CCO56004	0	0	4	5	0	0	0	0
CRI34.1	0	0	5	4	0	0	0	0
KKN61067	0	0	6	6	0	0	0	0
KKN7357	0	0	6	6	0	0	0	0
NKI47181	0	0	6	6	0	0	0	0
PL1	0	0	0	0	0	0	0	0
PL2	0	0	3	4	0	0	0	0
PLK40.4	2	2	1	1	0	0	6	5
RBR55001	0	0	5	6	0	0	0	0
RBR55003	0	0	3	4	0	0	0	0
SKN60867	0	0	0	6	0	0	0	0
SRN54002	0	0	6	6	0	0	0	0
SRN54005	0	0	6	6	0	0	0	0
SRN54007	0	0	5	6	0	0	0	0
THL191	0	0	6	6	0	0	0	0
THL794	0	0	1	4	0	0	0	0
UBN11308	0	0	0	3	0	0	0	0
UBN11351	0	0	4	2	1	0	0	1
UBN13515	0	0	5	6	0	0	1	0
UBN195167	0	0	2	5	0	0	0	0
UBN196171	0	0	5	6	0	0	0	0
UBN207129	0	0	5	6	0	0	0	0

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

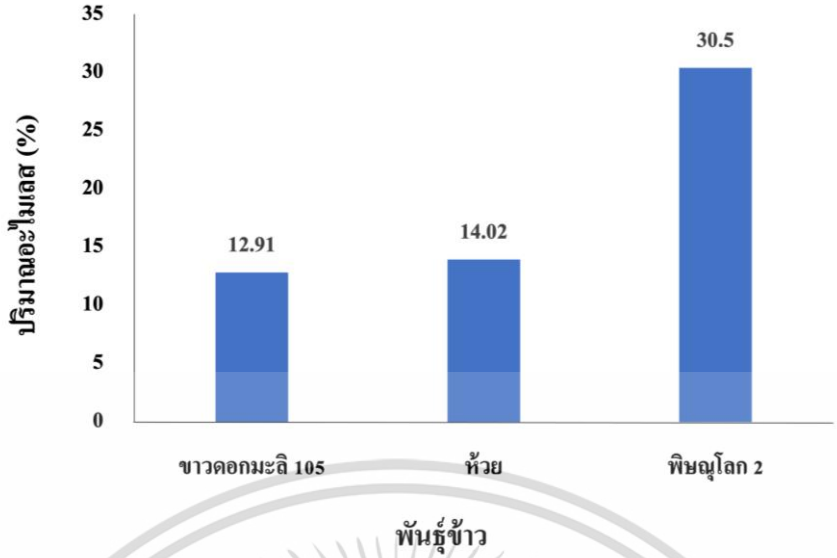


ภาพที่ 10 กราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณะไมโลส กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

4.2.2 การตรวจสอบปริมาณะไมโลส

จากผลการตรวจสอบความอ่อนนุ่มของเมล็ดข้าวพันธุ์ห้วย โดยการตรวจสอบปริมาณะไมโลส ด้วยวิธีเคมี และตรวจสอบผลด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 620 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (ข้าวที่มีความอ่อนนุ่ม) และข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 (ข้าวที่มีความแข็ง) เป็นพันธุ์ทดสอบเปรียบเทียบ จากการตรวจสอบพบปริมาณะไมโลสในข้าวพันธุ์ห้วย 14.02 เปอร์เซ็นต์ พบปริมาณะไมโลสในข้าวขาวดอกมะลิ 105 (ข้าวที่มีความอ่อนนุ่ม) และข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 (ข้าวที่มีความร่วนแข็ง) ที่ใช้เป็นพันธุ์ทดสอบเปรียบเทียบ 12.91 และ 30.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 11) เมื่อเปรียบเทียบกับตารางการแบ่งประเภทของข้าว (ตารางที่ 3) พบว่าข้าวพันธุ์ห้วยจัดอยู่ในกลุ่มข้าวที่มีปริมาณะไมโลสต่ำเหมือนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 11 เปอร์เซ็นต์ปริมาณอะไมโลสในข้าวขาวมะลิ 105 ข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย และพันธุ์พิษณุโลก 2

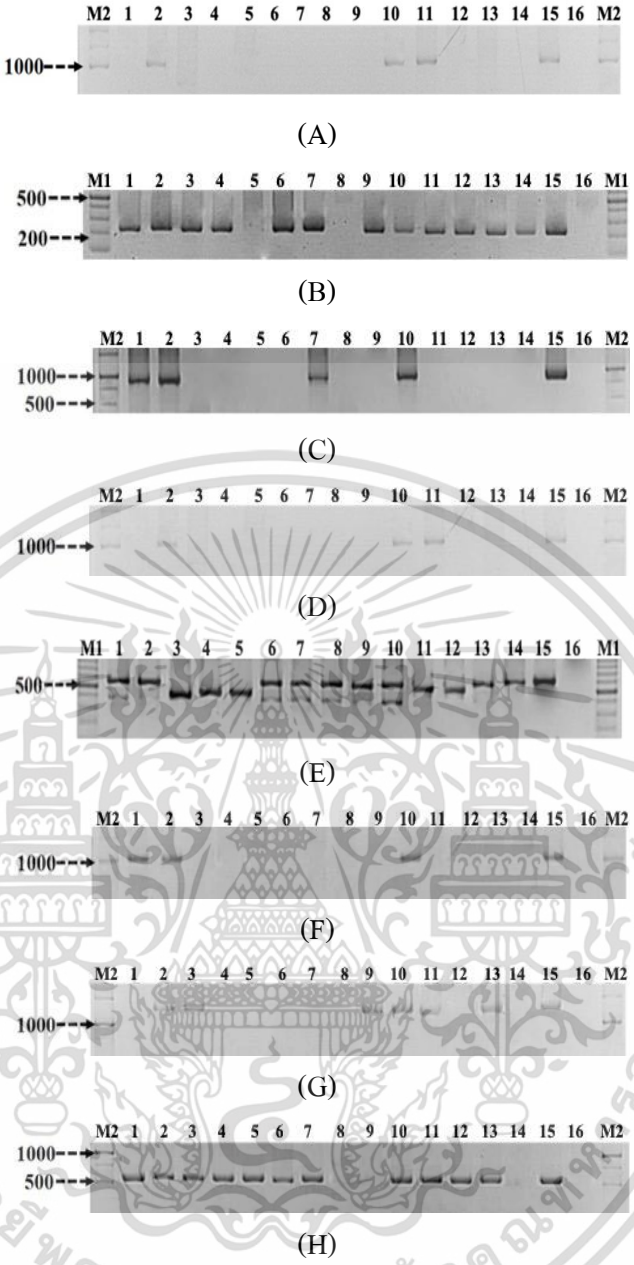
4.3 การตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้บนข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย และข้าวพันธุ์แนะนำของไทย

จากการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้จำนวน 8 ยีน ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย และข้าวพันธุ์แนะนำของไทยจำนวน 40 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค PCR และไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib Pi-ta Pi9 Pi50 Pigm(t) Pi54 Pia* และ *Pik* (ภาพที่ 12) พบว่าในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วยมียีนต้านทาน 2 ยีน คือยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* และ *Pigm(t)* ในขณะที่ข้าวพันธุ์แนะนำแต่ละพันธุ์นั้นตรวจพบยีนต้านทานอย่างน้อย 1 ยีน โดยพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* จำนวนมากที่สุด ในข้าวพันธุ์แนะนำจำนวน 38 พันธุ์ คิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ของพันธุ์ข้าวที่ตรวจสอบ ในขณะที่พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi50* จำนวนน้อยที่สุด ในข้าวพันธุ์แนะนำจำนวน 6 พันธุ์ คิดเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ของพันธุ์ข้าวที่ตรวจสอบ (ภาพที่ 13 และตารางที่ 7) จากการทดลองยังทราบว่าข้าวพันธุ์หางยี 71 และพันธุ์สันป่าตอง 1 มีจำนวนยีนต้านทานโรคไหม้มากที่สุด พบจำนวน 7 ยีน ได้แก่ ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54 Pia Pi50 Pigm(t) Pi-ta Pik* และ *Pib* ในขณะที่ข้าวพันธุ์ กข31 และ กข29 พบยีนต้านทานโรคไหม้เพียงยีนเดียว คือ ยีน *Pib* และ *Pi54*(*Pikh*) ตามลำดับ (ภาพที่ 14)

ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ใช้เป็นพันธุ์ทดสอบเปรียบเทียบเนื่องจากอ่อนแอต่อโรคไหม้ ตรวจพบยีนต้านทานโรคไหม้จำนวน 3 ยีนได้แก่ ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9 Pi54* และ *Pib*

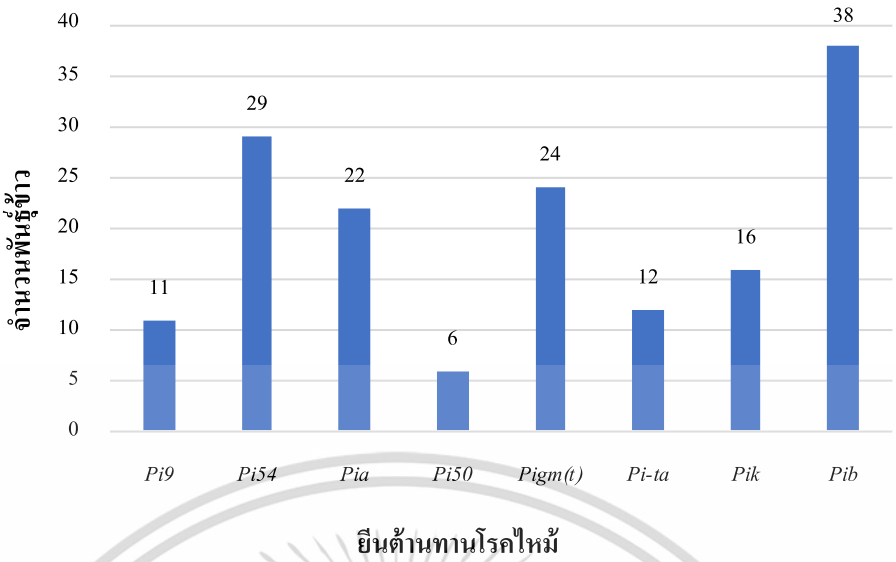
ในข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล ที่ใช้เป็นพันธุ์ทดสอบเปรียบเทียบ เนื่องจากต้านทานต่อโรคไหม้ ตรวจพบยีนต้านทานโรคไหม้จำนวน 6 ยีนได้แก่ ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib Pi9 Pigm(t) Pi54*(*Pikh*) *Pia* และ *Pik*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 12 รูปแบบดีเอ็นเอของยีนต้านทานโรคไหม้เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis; *Pi9* (a), *Pi54* (b), *Pia* (c), *Pi50* (d), *Pigm(t)* (e), *Pi-ta* (f), *Pik* (g) และ *Pib* (h) (M1 คือ 100 bp DNA ladder; M2 คือ 1 kb DNA ladder; 1 – 13 คือ พันธุ์ข้าวแนะนำ; สังข์หยดพัทลุง, หางยี 71, ข้าวหอมแดง, กว.ก. 1, กข8, หอมชลสิทธิ์, กขผ.3, กว.ก. 2, กข29, สันป่าตอง 1, แพร่ 1, กข10 และ กข14 ตามลำดับ; 14 คือ ข้าวพื้นเมืองไทยพันธ์ห้วย; 15 คือ possitive control ของยีนต้านทานแต่ละยีน; 16 = negative control คือ ข้าวพันธุ์ Lijiangxintuanheigu (LTH))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 13 จำนวนพันธุ์ข้าวที่ตรวจพบยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction

ตารางที่ 7 รายชื่อพันธุ์ข้าวและเปอร์เซ็นต์ของพันธุ์ข้าวที่ตรวจพบยีนต้านทาน 8 ยีน ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction

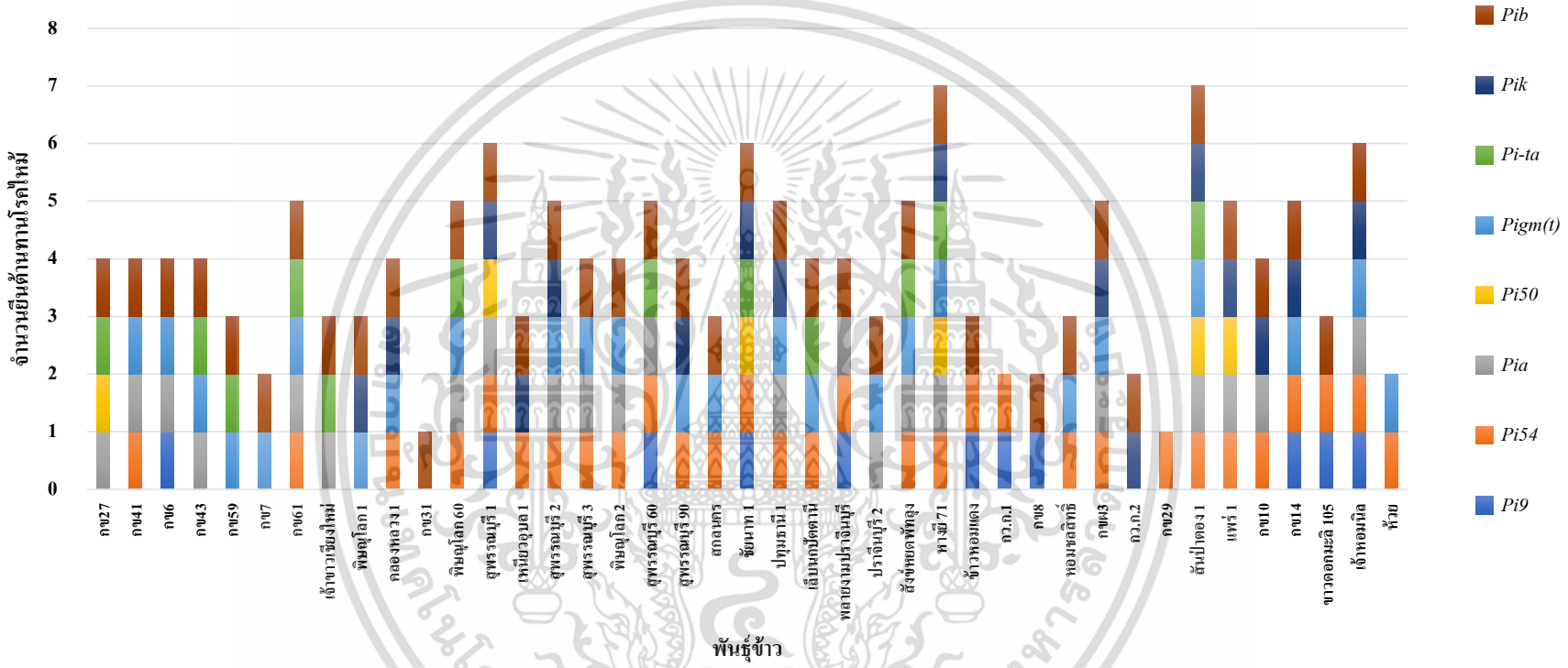
ยีนต้านทาน	โครโมโซม	พันธุ์ข้าว	จำนวน (%)
Pib	2	กข27, กข41, กข6, กข43, กข59, กข7, กข61, เจ้าขาวเชียงใหม่, พิษณุโลก 1, คลองหลวง 1, กข31, พิษณุโลก 60_1, สุพรรณบุรี 1, เหนียวอุบล 1, สุพรรณบุรี 2, สุพรรณบุรี 3, พิษณุโลก 2, สุพรรณบุรี 60, สุพรรณบุรี 90, สกลนคร, ชัยนาท 1, ปทุมธานี 1, เล็บนกปัตตานี, พลายงาม ปราจีนบุรี, ปราจีนบุรี 2, สังห์หยดพัทลุง, หางยี 71, ข้าวหอมแดง, กข8, ข้าวญี่ปุ่น กว.ก.1, หอมชลสิทธิ์, กขผ.3, สันป่าตอง 1, แพร่ 1, กข10, กข14, ขาวดอกมะลิ 105 และ เจ้าหอมนิล	95.00
Pi9	6	กข6, สุพรรณบุรี 1, สุพรรณบุรี 60, ชัยนาท 1, พลายงามปราจีน, ข้าวหอมแดง, ข้าวญี่ปุ่น กว.ก.1, กข8, กข14, ขาวดอกมะลิ 105 และ เจ้าหอมนิล	27.50
Pi50	6	กข27, สุพรรณบุรี 1, ชัยนาท 1, หางยี 71, สันป่าตอง 1 และ แพร่ 1	15.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ยีนต้านทาน	โครโมโซม	พันธุ์ข้าว	จำนวน (%)
Pigm(t)	6	กข41, กข6, กข43, กข59, กข7, พิษณุโลก 1, คลองหลวง 1, พิษณุโลก 60_1, สุพรรณบุรี 2, สุพรรณบุรี 3, พิษณุโลก 2, สุพรรณบุรี 90, สกลนคร, ปทุมธานี 1, เล็บนกปัตตานี, ปราจีนบุรี 2, สังห์หยดพัทลุง, หางยี 71, หอมชลสิทธิ์, กขผ.3, สันป่าตอง 1, กข14, เจ้าหอมนิล และ ห้วย	60.00
Pia	11	กข27, กข41, กข6, กข43, เจ้าขาวเชียงใหม่, พิษณุโลก 60_1, สุพรรณบุรี 1, สุพรรณบุรี 2, สุพรรณบุรี 3, พิษณุโลก 2, สุพรรณบุรี 60, ปทุมธานี 1, พลายงามปราจีนบุรี, ปราจีนบุรี 2, สังห์หยดพัทลุง, หางยี 71, กขผ3, สันป่าตอง 1, แพร่ 1, กข10 และ เจ้าหอมนิล	55.00
Pik	11	พิษณุโลก 1, คลองหลวง 1, สุพรรณบุรี 1, เหนียวอุบล 1, สุพรรณบุรี 2, สุพรรณบุรี 90, ชัยนาท 1, ปทุมธานี 1, หางยี 71, กขผ.3, ข้าวญี่ปุ่น กว.ก.2, สันป่าตอง 1, แพร่ 1, กข14 และ เจ้าหอมนิล	40.00
Pi54	11	กข41, กข61, คลองหลวง 1, พิษณุโลก 60_1, สุพรรณบุรี 1, เหนียวอุบล 1, สุพรรณบุรี 2, สุพรรณบุรี 3, พิษณุโลก 2, สุพรรณบุรี 60, สุพรรณบุรี 90, สกลนคร, ชัยนาท 1, ปทุมธานี 1, เล็บนกปัตตานี, พลายงามปราจีนบุรี, สังห์หยดพัทลุง, หางยี 71, ข้าวหอมแดง, ข้าวญี่ปุ่น กว.ก.1, หอมชลสิทธิ์, กขผ3, กข29, สันป่าตอง 1, แพร่ 1, กข10, กข14, ขาวดอกมะลิ 105, เจ้าหอมนิล และ ห้วย	72.50
Pi-ta	12	กข27, กข43, กข59, กข61, เจ้าขาวเชียงใหม่, พิษณุโลก 60_1, สุพรรณบุรี 60, ชัยนาท 1, เล็บนกปัตตานี, สังห์หยดพัทลุง, หางยี 71 และ สันป่าตอง 1	30.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 14 ยีนต้านทานโรคไหม้และจำนวนยีนที่พบในข้าวพื้นเมืองไทยพันธ์ห้วย และข้าวพันธุ์แนะนำของไทยจำนวน 40 พันธุ์ เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction

4.4 ผลการสร้างประชากรข้าวผสมกลับและการคัดเลือกประชากร BC_2F_2

4.4.1 ประชากรข้าวผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 2 (BC_2F_2)

ประชากรข้าวผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 2 (BC_2F_2) จำนวน 283 ต้น ได้รับจากโครงการวิจัย เรื่อง การปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ต้านทานโรคไหม้ด้วยยีนต้านทานจากข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย ประจำปี พ.ศ. 2558 ซึ่งได้มาจากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวพันธุ์ห้วย (donor) ซึ่งเป็นข้าวที่มีรายงานเบื้องต้นว่าเป็นข้าวสายพันธุ์ที่ต้านทานโรคไหม้ในประเทศไทยได้ดี และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อเชื้อโรคไหม้ ได้ประชากรลูกผสมรุ่นที่ 1 (F_1) สร้างสายพันธุ์ผสมกลับครั้งที่ 1 ชั่วที่ 1 (BC_1F_1) โดยนำลูกผสม F_1 ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ได้เมล็ดพันธุ์ประชากรผสมกลับ BC_1F_1 ปลูกทดสอบความต้านทานโรคไหม้ และคัดเลือกต้นกล้าข้าวที่แสดงความต้านทานโรคไหม้ ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ได้เมล็ดพันธุ์ประชากรผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 1 (BC_2F_1) ปลูกทดสอบความต้านทานโรคไหม้ และคัดเลือกต้นกล้าข้าวที่แสดงความต้านทานโรคไหม้ ย้ายปลูกในกระถางและปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อเก็บรวบรวมเมล็ดพันธุ์ประชากรผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 2 (BC_2F_2)

4.4.2 ผลการประเมินความต้านทานโรคไหม้บนข้าว BC_2F_2 โดยการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

จากการทดสอบความต้านทานโรคไหม้ของประชากรข้าวผสมกลับ BC_2F_2 จำนวน 283 ต้น ด้วยการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 25 ไอโซเลท (ตารางที่ 2) พบต้นที่แสดงลักษณะต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ระดับสูง (ระดับคะแนน 0 1 และ 2) จำนวน 34 ต้น แสดงลักษณะต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในระดับปานกลาง (ระดับคะแนน 3 และ 4) จำนวน 152 ต้น และพบประชากรข้าวผสมกลับ BC_2F_2 จำนวน 97 ต้น แสดงลักษณะอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ (ระดับคะแนน 5 และ 6) จัดกลุ่มตามลักษณะที่แสดงออกในประชากรผสมกลับ BC_2F_2 ดังนี้ กลุ่ม (resistance, R) คือ ต้นที่แสดงลักษณะต้านทาน (ระดับคะแนน 0 – 4) จำนวน 186 ต้น และกลุ่ม (susceptible, S) คือ ต้นที่แสดงลักษณะอ่อนแอจำนวน 97 ต้น วิเคราะห์อัตราการกระจายตัวของพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ พบว่าการกระจายตัวของพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้เป็นไปตามอัตราส่วน 3:1 (R:S) พบค่าสถิติ Chi square เท่ากับ 12.9 เมื่อเปรียบเทียบกับตาราง Chi square ที่ degree of freedom (df) เท่ากับ 1 พบว่ามีค่าความน่าจะเป็น (Probability, *P*) <0.005 ซึ่งหมายถึงมีความน่าจะเป็นน้อยกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ที่การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวผสมกลับ BC_2F_2 จะไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 3:1 (R:S) (ตารางที่ 8) เป็นไปได้ว่าลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ห้วย (GS19769) ถูกควบคุมด้วยยีนหลัก (major gene) จำนวน 1 ยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 อัตราการกระจายตัวของลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 25 ไอโซเลท ในประชากรข้าวลูกผสมกลับ BC_2F_2 จำนวน 283 ต้น

ประชากร (จำนวนต้น)	Expected ratio	Expected No.		Observed No.		χ^2	*P*
		R	S	R	S		
BC_2F_2 (283 ต้น)	3:1	212.25	70.75	186	97	12.9*	<0.005[a]

*ค่า Chi square (χ^2) df = 1

[a] ค่า P เท่ากับ 0.005 หมายถึง มีความน่าจะเป็น 0.5 % ที่จะเกิดการปฏิเสธสมมติฐานที่ว่าการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากรเป็นไปตามอัตราส่วน 3:1 (R:S)

R คือ Resistant (ต้านทาน), S คือ Susceptible (อ่อนแอ), *P* คือ Probability

4.4.3 ผลการคัดเลือกประชากร BC_2F_2 ที่มีลักษณะความหอม โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro ด้วยเทคนิค Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

คัดเลือกลักษณะความหอมในประชากร BC_2F_2 ที่ต้านทานโรคไหม้ที่มีระดับการเกิดโรค 0 – 2 จำนวน 23 ต้น (กล้าข้าวตาย 11 ต้นจาก 34 ต้น) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro พบประชากรข้าวลูกผสมกลับ BC_2F_2 จำนวน 6 ต้น มีขนาดแถบดีเอ็นเอ 236 คู่เบส เหมือนกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ประชากรจำนวน 6 ต้น มีขนาดแถบดีเอ็นเอ 240 คู่เบส เหมือนกับพันธุ์ห้วย และ ชัยนาท 1 และพบประชากรจำนวน 11 ต้น แสดงลักษณะทางพันธุกรรมแบบเฮทเทอโรไซกัส คือพบดีเอ็นเอขนาด 236 และ 240 คู่เบส (ภาพที่ 15)

ภาพที่ 15 การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro (236 คู่เบส) คัดเลือกลักษณะความหอมในข้าว BC_2F_2 (M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน; หมายเลข 1 คือพันธุ์เปรียบเทียบ ชัยนาท 1; หมายเลข 2 คือพันธุ์พ่อ ห้วย; หมายเลข 3 คือพันธุ์แม่ ขาวดอกมะลิ 105; หมายเลข 4 – 26 คือลูกผสมกลับ BC_2F_2 ต้นที่ 1 – 23; A หมายถึง มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนพันธุ์แม่; B หมายถึง มีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนพันธุ์พ่อ; H คือลักษณะทางพันธุกรรมแบบเฮทเทอโรไซกัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.4 ผลการคัดเลือกประชากร BC_2F_2 ที่มีลักษณะอะไมโลสต่ำ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ OSR19 ด้วยเทคนิค Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกลักษณะอะไมโลสต่ำ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ OSR19 เพื่อคัดเลือกต้นที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จากประชากรข้าว BC_2F_2 ที่ผ่านการทดสอบความต้านทานโรค (score 0 – 2) จำนวน 23 ต้น โดยมีข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวที่มีลักษณะอะไมโลสต่ำ และใช้เป็นพันธุ์แม่ ข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย ใช้เป็นพันธุ์พ่อ และมีข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 ซึ่งเป็นข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสสูง มาใช้ในการเปรียบเทียบ พบว่า ประชากรข้าว BC_2F_2 ทั้ง 23 ต้น มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์แม่ และเหมือนกับข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วยซึ่งเป็นพันธุ์พ่อ โดยพบลักษณะแถบดีเอ็นเอมีขนาด 123 คู่เบส ในขณะที่แถบดีเอ็นเอของพันธุ์พิษณุโลก 2 นั้นมีขนาดแถบดีเอ็นเอที่ต่ำกว่า (ภาพที่ 16)

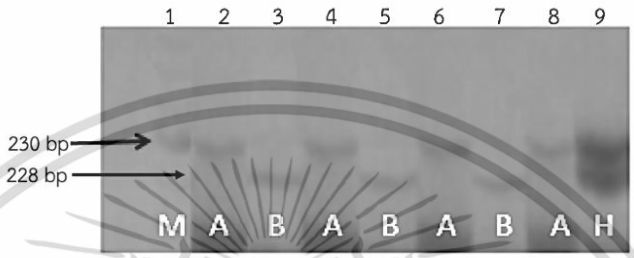
ภาพที่ 16 การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ OSR19 ที่มีขนาด 123 คู่เบส คัดเลือกลักษณะอะไมโลสต่ำในข้าว BC_2F_2 (M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน; หมายเลข 1 คือพันธุ์แม่ ขาวดอกมะลิ 105; หมายเลข 2 คือพันธุ์พ่อ ห้วย; หมายเลข 3 คือพันธุ์เปรียบเทียบ พิษณุโลก 2; หมายเลข 4 – 26 คือ ลูกผสมกลับ BC_2F_2

4.4.5 ผลการคัดเลือกประชากร BC_2F_2 ที่มีลักษณะต้านทานโรคไหม้ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM457 ด้วยเทคนิค Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

ข้าวลูกผสมกลับ BC_2F_2 จำนวน 6 ต้น ที่ได้จากการคัดเลือกลักษณะทางคุณภาพโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก จากข้อ 4.4.1.2 และ 4.4.1.3 มียีนควบคุมลักษณะความหอมและลักษณะอะไมโลสต่ำเหมือนกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ถูกนำมาคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM457 เพื่อยืนยันลักษณะความต้านทานโรคไหม้ โดยงานวิจัยก่อนหน้าพบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM457 เป็นเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างของลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในประชากรข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_1 ระหว่างข้าวพันธุ์ห้วยและพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคไหม้ พบว่าข้าวลูกผสมกลับ BC_2F_2 จำนวน 2 ต้น แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 228 คู่เบสเหมือนข้าวพันธุ์ห้วย (พันธุ์พ่อ) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคไหม้ ข้าวลูกผสมกลับ BC_2F_2 จำนวน 3 ต้น แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 230 คู่เบสเหมือนข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (พันธุ์แม่) ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรคไหม้ และพบข้าวลูกผสมกลับ BC_2F_2 จำนวน 1 ต้น แสดงลักษณะทางพันธุกรรมแบบเฮทเทอโรไซกัส มีขนาดแถบดีเอ็นเอ 228 และ 230 คู่เบส (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM457 (228 คู่เบส) ช่วยในการคัดเลือกลักษณะความต้านทานโรคไหม้ ในข้าว BC_2F_2 (หมายเลข 1 คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน; หมายเลข 2 คือ พันธุ์แม่ ขาวดอกมะลิ 105; หมายเลข 3 คือ พันธุ์พ่อ ห้วย; หมายเลข 4 – 9 คือ ลูกผสมกลับ BC_2F_2; A คือ ลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนพันธุ์แม่; B คือ ลักษณะทางพันธุกรรมที่ เหมือนพันธุ์พ่อ; H คือ ลักษณะทางพันธุกรรมแบบเฮทเทอโรไซกัส)

4.5 การสร้างประชากรข้าวผสมกลับชั่วที่ 3 รุ่นที่ 1 (BC_3F_1) และการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคไหม้

จากข้าวลูกผสมกลับ BC_2F_2 จำนวน 2 ต้น ที่แสดงลักษณะต้านทานโรคไหม้ทั้งทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ ผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ได้ประชากรข้าวลูกผสมกลับครั้งที่ 3 ชั่วที่ 1 (BC_3F_1) จำนวน 11 เมล็ด หลังจากเพาะเมล็ดพบว่ามีเมล็ดงอก จำนวน 6 ต้น นำไปทดสอบความต้านทานโรคไหม้ด้วยการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 25 ไอโซเลท พบการแสดงออกของลักษณะต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ระดับสูง (ระดับคะแนน 0 – 2) จำนวน 3 ต้น (ตารางที่ 9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 ระดับความรุนแรงของโรคบนข้าวขาวดอกมะลิ 105 เจ้าหอมนิล IR64 และ BC_3F_1 หลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ จำนวน 25 ไอโซเลท 7 วัน

พันธุ์/ต้นที่ใช้ทดสอบ		ระดับการเกิดโรค
ขาวดอกมะลิ 105		6
เจ้าหอมนิล		1
IR64		0
ต้นลูกผสมกลับ BC_3F_1 ต้นที่	1	2
	2	4
	3	2
	4	1
	5	3
	6	5

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

4.6 การสร้างประชากรข้าวผสมกลับครั้งที่ 4 ชั่วที่ 1 (BC_4F_1) และการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคไหม้

นำข้าวลูกผสมกลับ BC_3F_1 จำนวน 3 ต้น ที่แสดงลักษณะต้านทานโรคไหม้ทำการผสมกลับไปหาข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ได้เมล็ดพันธุ์ประชากรลูกผสมกลับครั้งที่ 4 ชั่วที่ 1 (BC_4F_1) จำนวน 22 เมล็ด หลังจากเพาะเมล็ดพบว่ามีเมล็ดงอก จำนวน 8 ต้น นำไปทดสอบความต้านทานโรคไหม้ด้วยการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 25 ไอโซเลท พบการแสดงออกของลักษณะต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ระดับสูง (ระดับคะแนน 0 – 2) จำนวน 2 ต้น (ตารางที่ 10) ปล่อยให้มีการผสมตัวเองตามธรรมชาติ ได้เมล็ดพันธุ์ประชากรลูกผสมกลับครั้งที่ 4 ชั่วที่ 2 (BC_4F_2) จำนวน 50 เมล็ด (ตารางที่ 11)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 ระดับความรุนแรงของโรคบนข้าวขาวดอกมะลิ 105 เจ้าหอมนิล IR64 และ BC_4F_1 หลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ จำนวน 25 ไอโซเลท 7 วัน

พันธุ์/ต้นที่ใช้ทดสอบ		ระดับการเกิดโรค
ขาวดอกมะลิ 105		6
เจ้าหอมนิล		0
IR64		0
ต้นลูกผสมกลับ BC_3F_1 ต้นที่	1	5
	2	4
	3	3
	4	2
	5	6
	6	2
	7	4
	8	3

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

ตารางที่ 11 จำนวนประชากรข้าวผสมแต่ละรุ่น

ประชากรรุ่นที่	จำนวน	จำนวนที่รอดชีวิต
BC_3F_1	11	6
BC_4F_1	22	8
BC_4F_2	50	N/A

N/A หมายถึง ยังไม่ปรากฏข้อมูล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การทดสอบความต้านทานโรคไหม้ของข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย

ข้าวพันธุ์ห้วยมีลักษณะความต้านทานแบบกว้างต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีความหลากหลายของพื้นที่การระบาดของโรคไหม้ในประเทศไทย สอดคล้องกับรายงานของ Parinthawong *et al.* (2015) ที่รายงานว่า ข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วยเป็นข้าวที่สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้จำนวน 19 ไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างโรคไหม้ข้าวจากพื้นที่ที่แตกต่างกันในประเทศไทย แบ่งออกเป็นเชื้อราจากภาคเหนือ 5 ไอโซเลท เชื้อราจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 8 ไอโซเลท เชื้อราจากภาคกลาง 5 ไอโซเลท และเชื้อราจากภาคใต้ 1 ไอโซเลท ไอโซเลทเหล่านี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงโดยได้รับการยืนยันว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อสาเหตุโรคไหม้ จากการตรวจสอบความหลากหลายด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ *Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) (Tansian *et al.* 2014)

จากผลการทดสอบพบว่าเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 ก่อโรคไม่รุนแรง (ระดับคะแนน 2) บนข้าวพันธุ์ห้วย รายงานของ นวรัตน์ (2557) ได้ศึกษาปฏิกิริยาก่อโรคในเชื้อราโรคไหม้ ไอโซเลท PLK40.4 บนข้าว NILs (Near isogenic line) จากข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบถึงยีนก่อโรค (Avirulence gene) โดยพบว่าเชื้อไอโซเลท PLK40.4 มียีนก่อโรค *AVR-Pish AVR-Pib AVR-Pia AVR-Pii AVR-Pi5(t) AVR-Pi1 AVR-Pikh AVR-Pi9(t) AVR-Pi12(t)* และ *AVR-Pita* จากผลการทดสอบบนข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล พบว่าเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 สามารถก่อโรครุนแรง (ระดับคะแนน 5 – 6) แสดงให้เห็นว่าในเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 มียีนก่อโรคที่สามารถหลีกหนีการตรวจจับของยีนต้านทานในข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิลที่มีรายงานพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pish* และ *Pi7* ในข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล (Chaipanya *et al.* 2017) ซึ่งยีนต้านทาน *Pi7* จัดอยู่ในกลุ่มยีนต้านทาน *Pik* ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงและมีบทบาทสำคัญในการต้านทานโรคไหม้ข้าวของประเทศไทย Longya *et al.* (2019) รายงานว่ายีนต้านทาน *Pi7* สามารถตรวจจับยีนก่อโรค *AVR-PikD* ในเชื้อราได้ จึงทำให้ข้าวไม่เป็นโรค ในทางตรงกันข้ามยีนก่อโรค *AVR-PikA AVR-PikC AVR-PikE* และ *AVR-PikF* สามารถหลีกหนีการตรวจจับของยีนต้านทาน *Pi7* ได้ เชื้อราจึงสามารถก่อโรคได้

จากรายงานจึงสันนิษฐานได้ว่าเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 อาจมียีนก่อโรค *AVR-Pik* แอลลีล *AVR-PikA AVR-PikC AVR-PikE* หรือ *AVR-PikF* จึงสามารถหลีกหนีการตรวจจับของยีนต้านทาน *Pi7* ในข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิลได้ อย่างไรก็ตามยีนก่อโรคในเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 ถูกตรวจจับได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยยีนต้านทานในข้าวพันธุ์ห้วย เนื่องจากเชื้อราก่อโรคไม่รุนแรงบนข้าวพันธุ์ห้วย (ระดับคะแนน 2) ดังนั้นยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ห้วยจึงไม่ใช่ยีนต้านทาน *Pi7*

5.2 การตรวจสอบปริมาณอะไมโลส โดยวิธีเคมี

ปริมาณอะไมโลสมีผลโดยตรงต่อความเหนียวนุ่มของแป้งสุก โดยพบว่าข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสสูงเมื่อหุงเป็นข้าวสุกจะมีความเหนียวนุ่มน้อยหรือข้าวสุกจะมีความร่วนแข็ง ส่วนข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสต่ำ เมื่อหุงเป็นข้าวสุกจะมีความเหนียวนุ่ม เนื่องจากคุณสมบัติของอะไมโลสเมื่อต้มให้สุกแล้วจะมีการคืนตัวเปลี่ยนแปลงจากสภาพละลายน้ำได้ไปเป็นของแข็ง ดังนั้นข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสสูงจึงสามารถคืนตัวได้มากกว่าข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสต่ำ (งามชื่น. 2531) จากการที่ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวมีลักษณะข้าวสุกนุ่มเหนียว จึงสอดคล้องกับการทดลองการตรวจสอบปริมาณอะไมโลสในข้าวพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีเปอร์เซ็นต์อะไมโลส 12.91 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของข้าวที่มีลักษณะเหนียวนุ่ม ในทำนองเดียวกัน พบว่าข้าวพันธุ์ห้วย มีเปอร์เซ็นต์อะไมโลส 14.02 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นไปได้ว่าลักษณะข้าวสุกของข้าวพันธุ์ห้วยนั้นจะมีลักษณะที่เหนียวนุ่ม เช่นเดียวกันกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

5.3 การตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้บนข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย และข้าวพันธุ์แนะนำของไทย

จากการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้จำนวน 8 ยีน ได้แก่ *Pib Pi-ta Pi9 Pi50 Pigm(t) Pi54 Pia* และ *Pik* ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย พบว่ามียีนต้านทานเพียง 2 ยีน คือ *Pigm(t)* และ *Pi54* (*Pikh*) ซึ่งตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 6 และ 11 ตามลำดับ สอดคลองกับรายงานของ Parinthawong *et al.* (2015) ที่รายงานว่าข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) ซึ่งต้านทานโรคไหม้ มีการกระจายตัวของลักษณะต้านทานและอ่อนแอโรคไหม้ของประชากรข้าวลูกผสมรุ่นที่ 2 (F_2) ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวพันธุ์ KDML105 x GS19769 (donor) ในอัตราส่วน 15:1 แสดงว่าข้าวพันธุ์ห้วยมียีนหลักในการต้านทานโรคไหม้มากกว่า 1 ยีน และตรวจพบว่ายีนต้านทาน 1 ยีน มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 11

จากการตรวจสอบพันธุ์ข้าวแนะนำของไทย จำนวน 40 พันธุ์ พบว่า พันธุ์หางยี 71 และพันธุ์สันป่าตอง 1 มีจำนวนยีนต้านทานโรคไหม้มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของกรมการข้าวที่รายงานว่า ข้าวทั้งสองสายพันธุ์เป็นข้าวที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคไหม้ (กองวิจัยและพัฒนาข้าว. ไม่ระบุปี พ.ศ.)ในขณะที่ข้าวพันธุ์ กข31 และ กข29 พบยีนต้านทานโรคไหม้เพียงยีนเดียว สอดคล้องกับการรายงานของกรมการข้าวรายงานว่าข้าวพันธุ์ กข31 จัดอยู่ในกลุ่มข้าวที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ ในทางตรงกันข้ามกลับพบว่า ข้าวพันธุ์ กข29 นั้น จัดอยู่ในกลุ่มข้าวที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคไหม้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่กลับพบยีนต้านทานเพียงชนิดเดียว จึงเป็นไปได้ว่า กข29 อาจมียีนต้านทานตัวอื่นๆ ที่ไม่ได้นำมาศึกษา

ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์ข้าวที่มีความอ่อนแอต่อโรคไหม้ ตรวจพบยีนต้านทานโรคไหม้ จำนวน 3 ยีนได้แก่ ยีน *Pib Pi9* และ *Pi54* ซึ่งเป็นยีนที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2 6 และ 11 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานการค้นพบยีนต้านทานของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่โครโมโซมคู่ 6 และ 11 มาก่อน ข้อมูลที่ได้จึงเป็นข้อมูลใหม่และอาจต้องการการตรวจสอบเพิ่มเติม ในขณะที่มีรายงานการค้นพบตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่พบยีน *Pib* ซึ่งเป็นยีนที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 2 เช่นเดียวกัน และยังมีรายงานพบยีนต้านทานจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งพบอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 8 พบว่ายีนดังกล่าวมีลักษณะต้านทานแบบเฉพาะ (Korinsak *et al*. 2011; Korinsak *et al.* 2009c.) การค้นพบนี้จึงเป็นการยืนยันว่าข้าวขาวดอกมะลิ 105 แม้ว่าจะเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค ก็สามารถมีความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคบางสายพันธุ์ได้

5.4 การคัดเลือกประชากรข้าวลูกผสมกลับชั่วที่ 2 รุ่นที่ 2 (BC_2F_2)

5.4.1 การประเมินความต้านทานโรคไหม้โดยการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

จากการทดสอบความต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวลูกผสมกลับชั่วที่ 2 รุ่นที่ 2 (BC_2F_2) โดย Parinthawong *et al*. (2015) ที่รายงานการกระจายตัวของลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อโรคไหม้ของประชากรข้าวลูกผสมรุ่นที่ 2 (F_2) ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 x ข้าวพันธุ์ห้วย ในอัตราส่วน 15:1 แสดงว่าข้าวพันธุ์ห้วยมียีนหลักในการต้านทานโรคไหม้มากกว่า 1 ยีน และตรวจพบยีนต้านทานอย่างน้อย 1 ยีน มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM224 และ RM144 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 11 โดยยีนต้านทานโรคไหม้มีระยะห่างจากเครื่องหมายทั้ง 2 เป็นระยะ 20 cM ดังนั้น จึงอาจมีการถ่ายทอดยีนควบคุมลักษณะความต้านทานโรคไหม้ของข้าวพันธุ์ห้วยมาให้ประชากรข้าวลูกผสมกลับชั่วที่ 2 รุ่นที่ 2 (BC_2F_2) เพียงยีนเดียว คือ ยีนที่เกี่ยวข้องกับเครื่องหมาย RM457 บนโครโมโซมที่ 11

5.4.2 การคัดเลือกลักษณะความหอมในประชากร BC_2F_2 ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro ช่วยคัดเลือกลักษณะความหอม พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าว สามารถจำแนกความแตกต่างในประชากร BC_2F_2 ได้ โดยพบว่าลักษณะความหอมมีการกระจายตัวของจีโนไทป์ในอัตราส่วน 1:2:1 แสดงให้เห็นว่าลักษณะความหอมถูกควบคุมด้วยยีนด้อย ซึ่งสอดคล้องกับงานของปาริฉัตร (2555) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอคัดเลือกลักษณะความหอมในประชากรชั่วที่ 2 และ 3 จากการผสมข้ามระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับพันธุ์ Qiqnizhan สามารถคัดเลือกต้นที่มีพันธุกรรมที่มีลักษณะความหอมได้ โดยลักษณะดังกล่าวไม่มีการกระจายในรุ่นต่อไป เนื่องจากทั้งสองลักษณะถูกควบคุมด้วยยีนแฝง และสอดคล้องกับการทดลองของ จันจิรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และคณะ (2557) ที่ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในคัดเลือกลักษณะความหอมในประชากรข้าวลูกผสมระหว่าง ปทุมธานี 1 กับ CH4 พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ได้ โดยพบว่ามีการกระจายตัวของจีโนไทป์ของพันธุกรรมควบคุมลักษณะความหอมในอัตราส่วน 1:2:1

5.4.3 การคัดเลือกลักษณะอะไมโลสต่ำในประชากร BC_2F_2 ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ OSR19

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ OSR 19 ถูกนำมาใช้ช่วยคัดเลือกลักษณะอะไมโลสต่ำในข้าวลูกผสมอย่างแพร่หลายหลาย เนื่องจากลักษณะปริมาณอะไมโลสต่ำมีผลต่อคุณภาพของข้าวอย่างมาก โดยวิธีการดั้งเดิมค่อนข้างมีความคลาดเคลื่อน และมีอิทธิพลของอะไมโลเพ็คตินเข้ามาเกี่ยวข้อง ใช้ระยะเวลาค่อนข้างนาน และจะต้องทำหลังจากการเก็บเกี่ยวผลผลิตข้าวแล้วจึงทำให้เกิดความล่าช้าของการปรับปรุงพันธุ์ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือกจึงสามารถช่วยร่นระยะเวลา เนื่องจากสามารถคัดเลือกได้ในระยะต้นกล้า และสามารถลดจำนวนต้นที่ต้องปลูกลง เนื่องจากมีการคัดเลือกต้นที่ไม่ต้องการทิ้งไปก่อน จากการทดลองพบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าว สามารถตรวจสอบลักษณะอะไมโลสต่ำในข้าวลูกผสมได้ โดยพบว่า ประชากร BC_2F_2 ทุกต้นมีลักษณะอะไมโลสต่ำ เหมือนกับพันธุ์แม่คือพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในขณะที่พันธุ์พ่อก็พบลักษณะอะไมโลสต่ำเช่นเดียวกัน

5.4.4 การคัดเลือกลักษณะความต้านทานโรคไหม้ในประชากร BC_2F_2 ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM457

เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM457 สามารถแยกความแตกต่างของลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในประชากรข้าวลูกผสมกลับ BC_2F_2 ได้ ข้าวลูกผสมกลับ BC_2F_2 จำนวน 2 ต้น ที่แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 228 คู่เบสเหมือนข้าวพันธุ์ห้วย (พันธุ์พ่อ) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคไหม้ คือ ต้นที่มียีนต้านทานโรคไหม้ที่เกี่ยวข้องกับเครื่องหมาย RM457 ซึ่งมีตำแหน่งที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 11 ซึ่งยีนต้านทานโรคไหม้ที่รายงานว่ามีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 11 ได้แก่ *Pia PiCO39(t) Pik Pikh (Pi54) Pikm Pikp Piks Pi1 Pi7(t) Pi18(t) Pi30(t) Pi34 Pi38* และ *Pi44(t)* (Devanna *et al.* 2022)

5.5 การสร้างประชากรข้าวลูกผสมกลับครั้งที่ 3 และ 4 (BC_3 และ BC_4)

เมล็ดที่สร้างได้ในประชากรข้าว BC_3 จำนวน 11 เมล็ด หลังจากเพาะเมล็ดพบว่ามีเมล็ดงอกเพียง จำนวน 6 เมล็ด เนื่องจากเมล็ดอาจยังไม่พ้นระยะการพัก หรืออาจเกิดจากความไม่สมบูรณ์ของเมล็ด เมื่อนำไปทดสอบความต้านทานโรคไหม้ด้วยการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ พบว่ามีต้นที่มีลักษณะต้านทานโรคไหม้จำนวน 3 ต้น ส่วนต้นที่เหลือมีลักษณะอ่อนแอต่อโรคไหม้ เช่นเดียวกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในขณะเดียวกันก็พบว่า เมล็ดที่สร้างได้ในประชากรข้าว BC_4 จำนวน 22 เมล็ด หลังจากเพาะเมล็ดพบว่ามีเมล็ดงอก จำนวน 8 ต้น เมื่อนำไปทดสอบความต้านทานโรคไหม้ด้วยการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ พบว่ามีต้นที่มีลักษณะต้านทานโรคไหม้จำนวน 3 ต้น ส่วนต้นที่เหลือมีลักษณะอ่อนแอต่อโรคไหม้ ซึ่งอาจเกิดจากเมล็ดดังกล่าวได้รับการผสมตัวเองจึงทำให้ได้เมล็ดที่พันธุกรรมอ่อนแอต่อโรคไหม้เช่นเดียวกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 หรือเกิดจากการจับคู่กันของยีนแฝงจึงทำให้ต้นดังกล่าวแสดงลักษณะที่อ่อนแอต่อโรคไหม้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบความต้านทานโรคของข้าวพันธุ์ห้วยต่อประชากรเชื้อ 25 ไอโซเลทที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าวในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ พบว่าข้าวพันธุ์ห้วยแสดงความต้านทานระดับสูงต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ มีเพียงเชื้อรา PLK.40.4 เพียงไอโซเลทเดียวที่สามารถเข้าทำลายข้าวพันธุ์ห้วยได้ในระดับที่ไม่รุนแรง แสดงให้เห็นว่า ข้าวพื้นเมืองพันธุ์ห้วยเป็นข้าวที่มีลักษณะความต้านทานแบบกว้างต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ เนื่องจากสามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลท และจากการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้บนข้าวพันธุ์ห้วย พบว่าข้าวพันธุ์ห้วยมียีนต้านทาน 2 ยีน คือ *Pigm(t)* และ *Pi54* (*Pikh*) ซึ่งตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 6 และ 11 ตามลำดับ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานโรคไหม้ด้วยวิธีผสมกลับ และการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกลักษณะทางคุณภาพ และลักษณะความต้านทานโรคไหม้ ได้เมล็ดพันธุ์ประชากร BC_4F_2 จำนวน 50 เมล็ด ซึ่งเป็นประชากรข้าวลูกผสมกลับที่ได้รับการถ่ายทอดพันธุกรรมควบคุมลักษณะความต้านทานโรคไหม้ จากข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย โดยมีศักยภาพต้านทานต่อเชื้อราได้ในระดับสูง และมีลักษณะทางคุณภาพ เหมือนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 คือ มีความอ่อนนุ่มและมีความหอม

ข้อเสนอแนะ

1. ข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วยเป็นแหล่งพันธุกรรมที่สำคัญของยีนต้านทานโรคไหม้ ดังนั้นจึงควรมีการเก็บรักษา และอนุรักษ์ข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วยไว้เพื่อไม่ให้สูญหายไปจากประเทศ เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้อย่างยั่งยืน

2. ข้าวลูกผสมกลับชั่วที่ BC_4F_2 ควรได้รับการพัฒนาต่อยอดเพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ที่มีประสิทธิภาพ เพื่อความสำเร็จในการป้องกันและควบคุมโรคไหม้ข้าวควรมีการรวมยีนต้านทานโรคไหม้หลาย ๆ ยีน ในข้าว เพื่อเพิ่มศักยภาพในการต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้มากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กมลวรรณ เรียบร้อย ธีรยุทธ ตู้จินดา อุไรรณ คชสถิต และ สุรีพร เกตุงาม. 2553. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวทนแล้ง IR57514 ให้มีคุณภาพการหุงต้มคล้ายข้าวขาวดอกมะลิ 105. ใน **การประชุมวิชาการข้าวแห่งชาติครั้งปฐมฤกษ์ "ขับเคลื่อนงานวิจัยข้าวไทยสู่นวัตกรรม"**. วันที่ 15 – 17 ธันวาคม 2553 ณ อาคารสารนิเทศ 50 ปี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

กองวิจัยและพัฒนาข้าว. ไม่ระบุปี. **องค์ความรู้เรื่องข้าว**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://webold.ricethailand.go.th/rkb3/Varieties.htm. สืบค้นเมื่อ : 12 กรกฎาคม 2565

กรมทรัพย์สินทางปัญญา. 2550. **การขึ้นทะเบียนสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ข้าวหอมมะลิทุ่งกุลาร้องไห้ ทะเบียนเลขที่ สช 50100022 ประกาศ วันที่ 24 ตุลาคม พ.ศ. 2550**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.ipthailand.go.th/th/gi-011/item/22-สช-50100022-ข้าวหอมมะลิทุ่งกุลาร้องไห้-2.html. สืบค้นเมื่อ : 9 กรกฎาคม 2565

กรมวิชาการเกษตร. 2545. **ลักษณะและคุณค่าพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทย**. เอกสารวิชาการ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 76 หน้า.

กฤตกิตติศักดิ์ ไพรตรีจิตต์ อิงออน สีแก้ว ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ ธานี ศรีวงศ์ชัย และ สุรีพร เกตุงาม 2554. การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9 Pi36* และ *Pigm(t)* ในข้าวพื้นเมืองไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ. **Thai Journal of Genetics** 4(1) : 52 – 62.

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2551. **ปรับปรุงพันธุ์พืช : พื้นฐานวิธีการและแนวคิด**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 464 หน้า.

งามชื่น คงเสรี. 2531. คุณภาพการหุงต้มและรับประทานและปัจจัยที่เกี่ยวข้อง. หน้า 94 – 105 ใน **การปรับปรุงคุณภาพข้าวสำหรับผู้ดำเนินธุรกิจโรงสี**. สถาวิจัยข้าว. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

จันทร์จิรา โรหิตเสถียร ธานี ศรีวงศ์ชัย ประภา ศรีพิจิตต์ และ รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2557. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือกลักษณะความหอมและปริมาณอะไมโลสต่ำในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวแบบบันทึกประวัติ. หน้า 869 – 875. ใน **การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 15**. วันที่ 28 มีนาคม 2557 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น.

จุฑาพร แสงประจักษ์. 2555. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ข้าว. **แก่นเกษตร** 40 : 299 – 308.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉวีวรรณ วุฒิญาโณ. 2543. **เอกสารวิชาการข้าวพื้นเมืองไทย**. พิมพ์ครั้งที่ 1. ศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติ : ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 215 หน้า.

ชลธิดา ชลธิศชโลทร นภา ตั้งเตรียมจิตมั่น เบญจวรรณ ชิวปรีชา และ อรสา สุริยาพันธ์. 2563. ปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์อะไมโลส ในตัวอย่างข้าวเจ้าด้วยวิธีจับกับไอโอดีน. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี** 28(11) : 1929 – 1941.

ชวาลา บุรณศิริ. 2531. **โรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา**. กรุงเทพฯ, คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 199 หน้า.

ธนกร วังสว่าง. 2561. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานโรคไหม้โดยใช้พันธุกรรมความต้านทานจากข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิลด้วยวิธีผสมกลับ. หน้า 43. ใน **การประชุมวิชาการข้าวแห่งชาติ ครั้งที่ 5**. กรุงเทพฯ.

นวรัตน์ ใจหอม. 2557. “**การประเมินความหลากหลายของเชื้อราโรคไหม้ข้าว (*Pyricularia grisea*) ที่เก็บรวบรวมในประเทศไทย**.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาเกษตรศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

มติชนออนไลน์. 2562. **ชาวนาโคราชทุกข์หนัก ประสบปัญหาโรคไหม้คอรวงข้าวระบาด เสียหายแล้ว 18,000 ไร่**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://www.matichon.co.th/region/news_1744608. สืบค้นเมื่อ : 12 กรกฎาคม 2565

บุญรัตน์ จงดี สุรพงษ์ สาคะรังค์ พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ ดวงใจ สุริยาอรุณโรจน์ และ จิระพงศ์ ใจรินทร์. 2548. ข้าวหอมสายพันธุ์ใหม่ต้านทานโรคไหม้ IR77924-62-71-1-2. หน้า 13 – 36. ใน **การประชุมทางวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว**. นครนายก.

ปาริฉัตร รัตนผล. 2555. “การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสง ผลผลิตสูง และเมล็ดมีคุณภาพดีโดยวิธีบันทึกประวัติ ร่วมกับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก.” วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปิยะนันท์ อึ้งทรงธรรม. 2543. **สายพันธุ์ข้าว : ครอบครัวข้าว**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก :http://nutrition.anamai.moph.go.th/temp/files/ K-center/morning54/4.pdf. สืบค้นเมื่อ : 12 กรกฎาคม 2565

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ พะยอม โคเบลลี่ อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ ถนอมจิตร์ ฤทธิ์มนตรี กุลชนา เกศสุวรรณ์ ชนสิริน กลิ่นมณี และ สงวน เที่ยงดีฤทธิ์. 2550. การตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทย. **วารสารวิชาการข้าว** 1(1) : 52 – 64.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พูนศักดิ์ เมวัฒนากาญจน์. 2548. **โรคไหม้ข้าว : ความหลากหลายและแนวทางการพัฒนาข้าวต้านทานโรคไหม้**. กลุ่มวิจัยศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4. 61 หน้า.

เมทินี กลัดมุข นิตย์ศรี แสงเดือน และวิภา หงษ์ตระกูล. 2552. การตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทย. **Thai Journal of Genetics** 2(1) : 36 – 43.

รัตนา ม่วงรัตน์ จารุวรรณ จินดากุล และ วรณัฐ อินปันบุตร. 2559. การสกัดร่วมกับการกักเก็บสารหอม 2-Acetyl-1-Pyrroline จากใบเตยด้วยแป้งข้าวเจ้าที่ผ่านการเกิดเจลาติไนเซชันภายใต้สภาวะหม้อนึ่งอัดไอเพื่อใช้เคลือบข้าวขาวพิจิตร. **วารสารเกษตร** 33(2) : 299 – 310.

ลัดดาวัลย์ กรรณนุช. 2550. **ข้าว การผลิตและการค้า.** กรมการข้าว. กรุงเทพฯ.

วาสนา วรมิศร์. 2538. **การปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมของไทย**. ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรละสหกรณ์. 104 หน้า.

วิชา ธิติประเสริฐ. 2544. **ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์ : ข้าว.** กรุงเทพฯ. 864 หน้า.

วริศรา สุวรรณ. 2560. **การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจสอบสายพันธุ์พืช**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://rae.mju.ac.th/acticleDetail.aspx?qid=634. สืบค้นเมื่อ: 12 กรกฎาคม 2565

ศรีสวัสดิ์ ขันทอง. 2552. “การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* และ *Pi-b* ในข้าวป่าและข้าวพื้นเมืองไทย.” ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต. ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

สงกรานต์ จิตรากร และ บริบูรณ์ สมฤทธิ์. 2545. พัฒนาการพันธุ์ข้าวไทย. หน้า 1 – 32. ใน **เกษตรก้าวหน้า**. กรุงเทพฯ : สำนักงานส่งเสริมและฝึกอบรมมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. 2564. **สถานการณ์การส่งออกข้าวไทย**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.thairiceexporters.or.th/Local%20news/News_2015/news_090215-1.html. สืบค้นเมื่อ: 21 กรกฎาคม 2565

สำนักงานวิจัยและพัฒนาข้าว. 2557. **องค์ความรู้เรื่องข้าว**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : http://www.brrd.in.th/rkb/varieties/index.php.htm. สืบค้นเมื่อ: 12 กรกฎาคม 2565

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2564. **สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2563**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก : https://www.oae.go.th/assets/portals/1/files/trend2563-Final-Download.pdf. สืบค้นเมื่อ: 21 กรกฎาคม 2565

สุทัศน์ ศรีวันพงศ์. 2552. **การปรับปรุงพันธุ์พืช**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 269 หน้า.

สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 269 หน้า.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุรีพร เกตุงาม. 2556. **การปรับปรุงพันธุ์พืชระดับโมเลกุล**. อุบลราชธานี: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 307 หน้า.

เสาวลักษณ์ อัคราช ประภา ศรีพิจิตต์ และ ธานี ศรีวงศ์ชัย. 2554. การวิเคราะห์จัดกลุ่มความต้านทานเชื้อโรคไหม้ของข้าวพันธุ์ปรับปรุงด้วยเชื้อที่เก็บรวบรวมใหม่. หน้า 581 – 588. ใน **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49**. กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

อมรรัตน์ ม้ายอง ธานี ศรีวงศ์ชัย และ ประภา ศรีพิจิตต์. 2558. การถ่ายทอดลักษณะความหอมสู่ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 โดยการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับร่วมกับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือก. หน้า 629 – 634. ใน **รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ และ พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2552. ความหลากหลายของ pathotype ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวในปี 2550/51 และยีนต้านทานกว้างขวางที่เป็นประโยชน์ในภาคเหนือตอนล่าง. หน้า 208 – 219. ใน **การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวประจำปี 2552**. กรุงเทพฯ : สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว.

Ahn, S.N., Bollich, C.N. and Tanksley, S.D. 1992. RFLP tagging of a gene for aroma in rice. **Theoretical and Applied Genetics** 84(7 – 8) : 825 – 828.

Allard, R.W. 1999. **Principles of Plant Breeding**. 2nd ed. Wiley Inc, New York.

Aoki, N., Umemoto, T., Yoshida, S., Ishii, T., Kamijima, O., Matsukura, U. and Inouchi, N. 2006. Genetic analysis of long chain synthesis in rice amylopectin. **Euphytica** 151(2) : 225 – 234.

Babu, R., Nair, S.K., Prasanna, B.M. and Gupta, H.S. 2004. Integrating marker assisted selection in crop breeding – Prospects and challenges. **Current Science** 87(5) : 607 – 619.

Benbouza, H., Jacquemin, J.M., Baudoin, J.P. and Mergeai, G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**. 10(2) : 77 – 81.

Bradbury, L. M., Gillies, S. A., Brushett, D. J., Waters, D. L. and Henry, R. J. 2008. Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice. **Plant Molecular Biology** 68(4) : 439 – 449.

Bradbury, L.M.T., T.L. Fitzgerald, R.J. Henry, Q.S. Jin, and D.L.E. Waters. 2005. The gene for fragrance in rice. **Plant Biotechnology Journal** 3 : 363 – 370.

Buttery, R.G., Ling, L.C., Juliano, B.O. and Turnbaugh, J.G. 1983. Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 31(4) : 823 – 826.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chaipanya, C., M.Y. Telebanco-Yanoria, B. Quime, A. Longya, S. Korinsak, S. Korinsak, T. Toojinda, A. Vanavichit, C. Jantasuriyarat and B. Zhou. 2017. Dissection of broad-spectrum resistance of the Thai rice variety Jao Hom Nin conferred by two resistance genes against rice blast. **Rice** 10 : 18 – 28.

Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B. and Pang, E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. **Euphytica** 142(1 – 2) : 169 – 196.

Devanna, B. N., Jain, P., Solanke, A. U., Das, A., Thakur, S., Singh, P. K. and Sharma, T. R. 2022. Understanding the dynamics of blast resistance in rice-*Magnaporthe oryzae* interactions. **Journal of Fungi** 8(6) : 584.

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.

Duwayri, M., D.V. Tran, and V.N. Nguyen. 2000. Reflections on yield gaps in rice production: How to narrow the gaps. pp. 26 – 46. In Papademetriou M.K., Dent F.J. and Herath E.M. (eds.). **Bridging the Rice Yield Gap in the Asia Pacific Region**. Bangkok.

Gao, J., Vasanthan, T., Hoover, R. and Li, J. 2012. Structural modification of waxy, regular, and high – amylose maize and hulless barley starches on partial acid hydrolysis and their impact on physicochemical properties and chemical modification. **Starch – Starke** 64(4) : 313 – 325.

Haung, 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.

IRRI. 2002. **Standard Evaluation System for Rice (SES)**. International Rice Research Institute. Manila, Philippines. 56p.

Jin, L., Lu, Y., Shao, Y., Zhang, G., Xiao, P., Shen, S. Corkeb, H, Baoa, J. 2010. Molecular marker assisted selection for improvement of the eating, cooking and sensory quality of rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Cereal Science** 5(1) : 159 – 164.

Jongdee, B., Pantuwan, G. and Toojinda, T. 2008. Integration of conventional and marker-assisted selections (MAS) under rainfed lowland rice breeding program for north and northeast

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thailand. p. 451. In **Rice and Temperate Cereal Crops Annual Conference (2008)**. Bangkok. Thailand.

Juliano, B. O. 1991. A simplified assay for milled rice amylose. **Cereal Science** 16 : 334.

Juliano, B. O., C. M. Perez, A. B. Blakeney, T. Castillo, N. Kongseree, B. Laignelet, E. T. Lapis, V. V. S. Murty, C. M. Paule and B. D. Webb. 1981. International cooperative testing on the amylose content of milled rice. **Starch** 33(5) : 157 – 162.

Korinsak, S., Sirithunya, P., Meakwatanakarn, P., Sarkarung, S., Vanavichit, A. and Toojinda, T. 2011. Changing allele frequencies associated with specific resistance genes to leaf blast in backcross introgression lines of Khao Dawk Mali 105 developed from a conventional selection program. **Field Crops Research** 122(1) : 32 – 39.

Korinsak, S., Toojinda, T. and Jantasuriyarat, C. 2009. Identification of a new blast resistance in thai jasmine rice 'KDML105' by using microsatellite markers. pp. 11 – 16. In **Proceedings of the 35th Congress on Science and Technology of Thailand**. Burapha University, 15 – 17 October 2009. Chonburi, Thailand.

Lanceras, J. C., Huang, Z. L., Naivikul, O., Vanavichit, A., Ruanjaichon, V. and Tragoonrung, S. 2000. Mapping of genes for cooking and eating qualities in Thai jasmine rice (KDML105). **DNA Research** 7(2) : 93 – 101.

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 : 13 – 18.

Li, Y. Z., Ma, H. M., Zhang, J. L., Wang, Z. Y. and Hong, M. M. 1995. Effects of the first intron of rice *Waxy* gene on the expression of foreign genes in rice and tobacco protoplasts. **Plant Science** 108(2) : 181 – 190.

Mikami, I., Uwatoko N., Ikeda Y., Yamaguchi J., Hirano H.Y., Suzuki Y. and Sano Y. 2008 Allelic diversification at the *Wx* locus in land – races of Asian rice. **Theoretical and Applied Genetics** 116 : 979 – 989.

Muthayya, S., Sugimoto, J. D., Montgomery, S. and Maberly, G. F. 2014. An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1324(1) : 7 – 14.

Ou, S.H. 1985. Pathogen variability and host resistance in rice blast disease. **Annual Review of Phytopathology** 18(1) : 167 – 187.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Oupkaew, P., Pusadee, T., Sirabanchongkran, A., Rerkasem, K., Jamjod, S. and Rerkasem, B. 2011. Complexity and adaptability of a traditional agricultural system: case study of a gall midge resistant rice landrace from northern Thailand. **Genetic Resources and Crop Evolution** 58(3) : 361 – 372.

Parinthawong, N., Tansian, P. and Sreewongchai, T. 2015. Genetic mapping of leaf blast resistance gene in landrace rice cultivar "GS19769". **Maejo International Journal of Science and Technology** 9(2) : 278 – 287.

Phattarakul, N. 2008. **Genotypic Variation in Tolerance to Acid Soil in Local Upland Rice Varieties.** Chiang Mai University, Chiang Mai. 182p.

Pintasen, S., Prom-u-Thai, C., Jamjod, S., Yimyam, N. and Rerkasem, B. 2007. Variation of grain iron content in a local upland rice germplasm from the village of Huai Tee Cha in northern Thailand. **Euphytica** 158(1) : 27 – 34.

Prom-u-thai, C. and Rerkasem, B. 2004. Variability in bioavailable iron in hand-pounded traditional rice varieties from a highland village in northern Thailand. **International Rice Research Notes**. 29 : 47 – 48.

Roumen, E., Levy, M. and Notteghem, J.L. 1997. Characterization of the European pathogen population of *Magnaporthe grisea* by DNA finger printing and pathotype analysis. **European Journal of Plant Pathology** 103 : 363 – 371.

Roy-Barman, S. and Chattoo, B. B. 2005. Rice blast fungus sequenced. **Current Science** 89(6) : 930 – 932.

Saenchai, C., Prom-u-thai, C., Jamjod, S., Dell, B. and Rerkasem, B. 2012. Genotypic variation in milling depression of iron and zinc concentration in rice grain. **Plant and Soil** 361(1) : 271 – 278.

Sakthivel, K., Sundaram R.M., Shobha Rani N., Balachandran, S.M. and Neeraja C.N. 2009. Genetic and molecular basis of fragrance in rice. **Biotechnology Advances** 27 : 468 – 473.

Sallaud, C., Lorieux, M., Roumen, E., Tharreau, D., Berruyer, R., Svestasrani, P., Garsmeur, O, Ghesquiere, A. and Notteghem, J.L. 2003. Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy. **Theoretical and Applied Genetics** 106(5) : 794 – 803.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shi, W., Y. Yang, S. Chen, and M. Xu. 2008. Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties. **Molecular Breeding** 22 : 185 – 192.

Shi, X., Wang, J., Bao, Y., Li, P., Xie, L., Huang, J. and Zhang, H. 2010. Identification of the quantitative trait loci in japonica rice landrace Heikezijing responsible for broad-spectrum resistance to rice blast. **Phytopathology** 100(8) : 822 – 829.

Sreewongchai, T., S.Sriprakhon, C. Wongsaprom, A. Vanavichit, T. Toojinda, D. Tharreau and P. Sirithunya. 2009. Genetic mapping of *Magnaporthe grisea* avirulence gene corresponding to leaf and panicle blast resistant QTLs in Jao Hom Nin rice cultivar. **Journal of Phytopathology** 157(6) : 338 – 343.

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.

Tansian, P., N. Jaihom and N. Parinthawong. Diversity analysis of *Avr-Pik* effectors of rice blast population collecting in Thailand between year 2007 – 2013. 2014. In **The 8th International Rice Blast Conference** Chengdu, China. 27 – 31 May 2019.

Wanchana, S., W. Kamolsukyunyong, S. Ruengphayak, T. Toojinda, S. Tragoonrung, and A. Vanavichit. 2005. A rapid construction of a physical contig across a 4.5 cM region for rice grain aroma facilitates marker enrichment for positional cloning. **Science Asia** 31 : 299 – 306.

Wang X., S. Lee, J. Wang, J. Ma, T. Bianco and Y. Jia. 2014. Current Advances on Genetic Resistance to Rice Blast Disease. pp. 196 – 217. In. Wengui, Y. and Jinsong B. (eds.). **Rice-Germplasm, Genetics and Improvement** Croatia : Intech.

Wang, Z. Y., Wu, Z. L., Xing, Y. Y., Zheng, F. G., Guo, X. L., Zhang, W. G. and Hong, M. M. 1990. Nucleotide sequence of rice *waxy* gene. **Nucleic Acids Research** 18(19) : 58 – 98.

Wongsaprom, C., Sirithunya, P., Vanavichit, A., Pantuwan, G., Jongdee, B., Sidhiwong, N., Lanceras-Siangliw, J. and Toojinda, T. 2010. Two introgressed quantitative trait loci confer a broad-spectrum resistance to blast disease in the genetic background of the cultivar RD6 a Thai glutinous jasmine rice. **Field Crop Research** 119 : 245 – 251.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zeigler, R.S., Leong, S.A. and Teng, P.S. 1994. **Rice Blast Disease**. International Rice Research Institute. 626p.

Zhou, Y., Yan, Y., Shi, M. and Liu, Y. 2018. Effect of an atmospheric pressure plasma jet on the structure and physicochemical properties of waxy and normal maize starch. **Polymers** 11(1) : 8.

Zhu, M., Wang, L. and Pan, Q. 2004. Identification and characterization of a new blast resistance gene located on rice chromosome 1 through linkage and differential analyses. **Phytopathology** 94(5) : 515 – 519.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Rice Flour Agar (RFA) (1,000 ml)

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

นำ Rice flour Yeast extract และ Agar powder ผสมกับน้ำกลั่นปริมาณ 500 มิลลิลิตร ต้มให้วุ้นละลาย แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Potato Dextrose Broth (PDA) (1,000 ml)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar powder	20	กรัม

ต้มมันฝรั่งกับน้ำกลั่นปริมาณ 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุก กรองเอามันฝรั่งออกด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำตาล Dextrose และ Agar powder ต้มจนน้ำตาลและวุ้นละลาย แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมสารละลาย

2.1 CTAB extraction buffer (50 ml)

cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) 2%	1	กรัม
5 M NaCl	14	มิลลิลิตร
0.5 M ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	2	มิลลิลิตร
1 M Tris-HCL	5	มิลลิลิตร
polyvinylpyrrolidone (PVP)	2	กรัม
β-mercaptoethanol	100	ไมโครลิตร

ละลายสารต่างๆ ในน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (25: 24: 1) (50 ml)

phenol	25	มิลลิลิตร
chloroform	24	มิลลิลิตร
isoamyl alcohol	1	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำใส่ขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.3 Acrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (800 ml)

acrylamide solution (29:1) 40 %	120	มิลลิลิตร
urea	336.56	กรัม
10X TBE	80	มิลลิลิตร

ละลาย urea กับ 10X TBE ให้เข้าด้วยกันแล้วเติม acrylamide solution 40% จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 800 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายใส่ขวดสีชา หรือภาชนะที่ไม่โดนแสง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4. 10X TBE (1,000 ml)

boric acid	55.64	กรัม
Tris-HCL	109.02	กรัม
ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	2.92	กรัม

ละลายสารต่างๆ ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 700 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2.5 1X TE buffer (50 ml)

10 mM Tris-HCl (pH 8)	1,000	ไมโครลิตร
1 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	100	ไมโครลิตร

ละลายสารต่างๆ ให้เข้ากัน ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 10% Ammonium persulfate (APS) (20 ml)

ammonium persulfate	2	กรัม

ผสม ammonium persulfate กับน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้ได้ 20 มิลลิลิตร นำใส่ในขวดแก้วดูแรนห่อด้วยฟอยล์อลูมิเนียม นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.7 Sequencing dye (50 ml)

formamide	49	มิลลิลิตร
0.1 % bromphenol blue	12.5	มิลลิลิตร
xylene cyanol	0.0125	กรัม
ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	1	มิลลิลิตร

ผสมละลายสารต่างๆ ให้เข้ากัน ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ใส่ในขวดขวดดูแรนห่อด้วยฟอยล์อลูมิเนียม นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ข้อมูลการทดสอบความต้านทานโรคไหม้ของประชากรข้าวลูกผสมกลับ BC_2F_2 จำนวน 283 ต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 การทดสอบความต้านทานโรคไหม้ของประชากรข้าวลูกผสมกลับ BC_2F_2 จำนวน 283 ต้น

ต้นที่	ระดับการเกิดโรค*	ต้นที่	ระดับการเกิดโรค	ต้นที่	ระดับการเกิดโรค	ต้นที่	ระดับการเกิดโรค
1	4	31	3	61	1	91	6
2	6	32	2	62	5	92	3
3	5	33	6	63	3	93	1
4	4	34	4	64	5	94	6
5	3	35	1	65	6	95	6
6	4	36	3	66	4	96	6
7	0	37	5	67	5	97	5
8	4	38	3	68	4	98	1
9	5	39	2	69	2	99	4
10	1	40	3	70	3	100	6
11	3	41	5	71	4	101	3
12	5	42	4	72	5	102	4
13	2	43	6	73	3	103	5
14	3	44	4	74	6	104	3
15	6	45	5	75	4	105	1
16	0	46	4	76	0	106	4
17	3	47	6	77	4	107	5
18	6	48	4	78	5	108	3
19	4	49	3	79	4	109	2
20	5	50	0	80	6	110	4
21	5	51	6	81	2	111	5
22	1	52	5	82	5	112	3
23	3	53	4	83	3	113	6
24	6	54	6	84	3	114	4
25	5	55	4	85	0	115	1
26	5	56	6	86	5	116	4
27	2	57	5	87	4	117	5
28	6	58	4	88	4	118	3
29	4	59	5	89	2	119	5
30	5	60	5	90	5	120	4

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ต้นที่	ระดับการเกิดโรค*	ต้นที่	ระดับการเกิดโรค	ต้นที่	ระดับการเกิดโรค	ต้นที่	ระดับการเกิดโรค
121	5	151	3	181	4	211	6
122	4	152	4	182	5	212	4
123	1	153	6	183	4	213	6
124	6	154	4	184	5	214	3
125	3	155	1	185	3	215	1
126	5	156	5	186	2	216	3
127	4	157	3	187	6	217	6
128	5	158	5	188	3	218	4
129	4	159	3	189	6	219	6
130	3	160	4	190	5	220	4
131	3	161	2	191	3	221	5
132	3	162	3	192	6	222	3
133	4	163	4	193	2	223	5
134	6	164	4	194	4	224	3
135	3	165	5	195	6	225	4
136	4	166	3	196	3	226	3
137	5	167	4	197	6	227	4
138	4	168	5	198	3	228	6
139	6	169	6	199	1	229	3
140	3	170	3	200	5	230	4
141	4	171	4	201	4	231	3
142	4	172	5	202	4	232	2
143	5	173	4	203	5	233	3
144	3	174	6	204	3	234	4
145	4	175	4	205	3	235	4
146	5	176	4	206	0	236	4
147	3	177	3	207	3	237	3
148	5	178	6	208	5	238	3
149	4	179	3	209	3	239	4
150	3	180	3	210	4	240	3

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ต้นที่	ระดับการเกิดโรค*	ต้นที่	ระดับการเกิดโรค	ต้นที่	ระดับการเกิดโรค	ต้นที่	ระดับการเกิดโรค
241	3	252	4	263	5	274	3
242	3	253	3	264	3	275	5
243	2	254	6	265	3	276	4
244	4	255	3	266	6	277	1
245	3	256	1	267	4	278	4
246	5	257	3	268	3	279	6
247	4	258	4	269	0	280	3
248	5	259	5	270	3	281	4
249	6	260	3	271	5	282	5
250	3	261	3	272	3	283	3
251	4	262	3	273	4		

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวรุ่งอรุณ. พูนสิน
วัน เดือน ปีเกิด	21 เมษายน พ.ศ. 2534
ที่อยู่	161/54 ซอย สุขสวัสดิ์ 86 ถนนสุขสวัสดิ์ ตำบลปากคลองบางปลากด อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ 10290
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2555 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพืชไร่ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	รุ่งอรุณ พูนสิน และ นงลักษณ์ เภรินทวงค์. 2560. การทดสอบความต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) หน้า 130 – 136. ใน **การประชุมวิชาการอารักพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 13**. กรุงเทพฯ : สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย. Poonsin, R. and N. Parinthawong. 2020. Investigation of rice blast resistant genes in Thai elite rice varieties (*Oryza sativa* L.) for improvement of broad-spectrum blast disease resistance variety. **International Journal of Agricultural Technology** 16(1) : 109 – 118.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้