ศักยภาพในการก่อโรคของเชื้อรา *Pyricularia oryzae* บนข้าวพื้นเมืองต้านทานโรคไหม้พันธุ์ยั้งมอง

ABILITY IN DISEASE CAUSING OF *PYRICULARIA ORYZAE* ON BLAST RESISTANT RICE VARIETY, YANG MAWNG

วัชรีพร สุขศิริ

WATCHAREEPORN SUKSIRI

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเกษตรศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2565

KMITL-2022-AG-M-065-368

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABILITY IN DISEASE CAUSING OF *PYRICULARIA ORYZAE* ON BLAST RESISTANT RICE VARIETY, YANG MAWNG

WATCHAREEPORN SUKSIRI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

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-AG-M-065-368

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2022

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ศักยภาพในการก่อโรคของเชื้อรา *Pyricularia oryzae* บนข้าวพื้นเมืองต้านทานโรคไหม้พันธุ์ยั้งมอง
นักศึกษา	วัชรีพร สุขศิริ
รหัสประจำตัว	60604011
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เกษตรศาสตร์
พ.ศ.	2565
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร. นงลักษณ์ เภรินทวงค์

บทคัดย่อ

ข้าวพันธุ์ยั้งมอง (GS20874) เป็นข้าวพื้นเมืองของไทยที่มีศักยภาพในการต้านทานต่อเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ได้ดี สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลท แต่พบว่ามีเชื้อราบางไอโซเลทที่สามารถก่อโรคได้บนข้าวสายพันธุ์ยั้งมอง ซึ่งชี้ให้เห็นถึงศักยภาพในการก่อโรคของเชื้อราที่ก่อโรคได้มีความแตกต่างจากเชื้อราไอโซเลทที่ไม่สามารถก่อโรคได้ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการสำรวจและรวบรวมเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ในประเทศไทย ได้เชื้อราบริสุทธิ์จำนวน 49 ไอโซเลท ปลูกเชื้อที่รวบรวมได้ลงบนข้าวพันธุ์ยั้งมองเพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่มีความสามารถในการก่อโรคและไม่ก่อโรค เมื่อประเมินการเกิดโรคของเชื้อราหลังการปลูกเชื้อ 7 วัน พบว่าเชื้อราจำนวน 4 ไอโซเลท สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง คือ ไอโซเลท SKN2008 60867 ไอโซเลท UBN2010 196171 ไอโซเลท RBR55003 และไอโซเลท PLK40.4 ในขณะที่เชื้อราจำนวน 45 ไอโซเลท ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ จากนั้นปลูกเชื้อรา *P. oryzae* ลงบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (NILs) เพื่อระบุยีนก่อโรคของเชื้อรา พบว่ายีนก่อโรคที่พบมากที่สุดคือ ยีนในกลุ่ม *AVR-Pik* จากนั้นเลือกเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 ที่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง และเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ไปศึกษาการแสดงออกของยีนก่อโรค *AVR-Pik* ร่วมกับยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา *P. oryzae* บนข้าวพันธุ์ยั้งมองด้วยเทคนิค quantitative realtime RT-PCR พบว่าเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 มีการแสดงออกของยีน *AVR–Pik* และยีน *MoHrip1* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อราสูงกว่าเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 และพบว่าการแสดงออกของยีนต้านทาน *Pik* มีการแสดงออกไม่แตกต่างกันในข้าวพันธุ์ยั้งมองที่ปลูกเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 หรือไอโซเลท Chiangrai34.1 ตั้งแต่เวลา 12 ชั่วโมง ต่อเนื่องไปจนถึงที่เวลา 48 ชั่วโมง การศึกษาชนิดของสารทุติยภูมิที่สังเคราะห์โดยเชื้อรา *P. oryzae* ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography – Mass Spectrometry

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(LC–MS) พบสาร picolinic acid และสาร tenuazonic acid ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคไหม้ของเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 และไอโซเลท Chiangrai34.1 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Ability in Disease Causing of *Pyricularia oryzae* on Blast Resistant Rice Variety, Yang Mawng
Student	Watchareeporn Suksiri
Student ID.	60604011
Degree	Master of Science
Program	Agriculture
Year	2022
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Nonglak Parinthawong

ABSTRACT

Thai indigenous rice variety, Yang Mawng (GS20874) is highly and broad-spectrum resistant to the infection of *P. oryzae*. However, some isolates were able to cause blast disease on Yang Mawng varietie. This indicates the different potential of the fungi to cause blast disease on Yang Mawng. In this study, 49 isolates of *P. oryzae* were obtained from disease epidermic areas in various regions of Thailand. Each isolate of *P. oryzae* was inoculated on Yang Mawng variety and the isolates that were able and unable to cause blast disease at 7 days after inoculation then were selected. The result showed that 4 isolates including SKN2008 60867, UBN2010 196171, RBR55003 and PLK40.4 were moderately virulent, while 45 isolates were unable to infect Yang Mawng variety. Examination of the *AVR* gene of each fungal isolate was conducted on 31 near isogenic lines (NILs) and the result revealed that the most frequently occurring genes were *AVR-Pik*. The fungal isolate, PLK40.4 and Chiangrai34.1, were further used for gene expression analysis of *AVR-Pik* together with other genes in Yang Mawng variety using quantitative realtime RT-PCR. Expression of *AVR-Pik* and *MoHrip1* in the isolate PLK40.4 was higher than Chiangrai34.1 and expression of resistance gene, *Pik,* was no different when Yang Mawng variety was inoculated with each isolate. Analysis of secondary metabolites of isolates PLK40.4 and Chiangrai34.1 using Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC–MS) revealed that picolinic acid and tenuazonic acid was detected in PLK40.4 and Chiangrai34.1 culture filtrate, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีข้าพเจ้าขอขอบคุณ ผศ.ดร. นงลักษณ์ เภรินทวงค์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และแนวทางแก้ไขปัญหาที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ปัฐวิภา สงกุมาร ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. พรหมมาศ คูหากาญจน์ และ ดร. มัทธนา ตันชัย กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้ความรู้และคำแนะนำทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อราโรคไหม้ที่ใช้ในการทดสอบ

ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณเพ็ญนภา จันทร์นวล คุณรุ่งอรุณ พูนสิน คุณประดิภา ประดับไพร คุณวารีเหล่าเพิ่มสุข และคุณสุพัตรา จันทศรี ที่ให้คำแนะนำ และช่วยเหลือข้าพเจ้าเสมอมา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบคุณบิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้า ที่คอยเป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนในการทำงานวิจัย และวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

วัชรีพร สุขศิริ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย……...	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……..	III
กิตติกรรมประกาศ……	IV
สารบัญ…….	V
สารบัญตาราง……...	IX
สารบัญตารางผนวก……..…….….....	X
สารบัญภาพ…….……..	XI
บทที่ 1 บทนำ……...	1
1.1 ความสำคัญและที่มา……..……..	1
1.2 วัตถุประสงค์……..……..	2
1.3 สถานที่ดำเนินงาน……	2
1.4 วิธีการดำเนินการศึกษา…….....	2
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……...	3
2.1 โรคไหม้ของข้าว (Rice blast disease)……	3
2.2 เชื้อราสาเหตุโรคไหม้……...	4
2.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคไหม้……..……..	4
2.4 ลักษณะอาการของโรคไหม้……...	6
2.5 การแพร่ระบาดของโรคไหม้……	6
2.6 การเข้าทำลายพืชของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้…….	7
2.6.1 วงจรการเกิดโรคไหม้……	7
2.6.2 ยีนก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้…….	8
2.6.3 สารทุติยภูมิของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค……...	9
2.7 ข้าวที่เป็นแหล่งของความต้านทานโรคไหม้……	10
2.7.1 ข้าวพื้นเมือง……..	10
2.7.2 ข้าวไร่……...	12
2.7.3 ข้าวพันธุ์ยั้งมอง…….	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย…… 14

3.1 อุปกรณ์และวัสดุการวิจัย…….. 14

3.1.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการวิจัย…… 14

3.1.2 ปุ๋ยเคมี…… 14

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อรา…….. 14

3.1.4 สารเคมี…….. 14

3.1.5 ดีเอ็นเอมาตรฐาน……... 15

3.1.6 อุปกรณ์……... 15

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย……. 17

3.2.1 รวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จากพื้นที่ปลูกข้าวของไทย…… 17

3.2.2 การปลูกเชื้อ *P. oryzae* ที่รวบรวมได้ลงบนข้าวพันธุ์ยั้งมอง……. 17

3.2.2.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดสอบ…….. 17

3.2.2.2 การเตรียมสารแขวนลอยโคนิเดียของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้…….. 17

3.2.2.3 การปลูกเชื้อรา *P. oryzae* บนต้นข้าว……... 18

3.2.2.4 การประเมินการเกิดโรค……. 18

3.2.3 การปลูกเชื้อ *P. oryzae* บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (Near Isogenic Lines ; NILs) เพื่อศึกษารูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรค (pathotype) ของเชื้อรา……...…….. 19

3.2.3.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดสอบ……... 19

3.2.3.2 การเตรียมสารแขวนลอยโคนิเดียของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้…… 19

3.2.3.3 การปลูกเชื้อรา *P. oryzae* บนต้นข้าว…….…….. 20

3.2.3.4 การคำนวณค่าดัชนีความรุนแรงของเชื้อ (Virulence index, VI)…….. 20

3.2.3.5 การคำนวนค่าดัชนีความต้านทาน (Resistance Index; RI) ของข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว……..…….. 20

3.2.3.6 การวิเคราะห์การจัดกลุ่มข้อมูลด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10p…… 21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.4 การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา *P. oryzae* บนข้าว……..……. 21
3.2.4.1 การเตรียมพันธุ์ข้าว……..……. 21
3.2.4.2 การเตรียมอาร์เอ็นเอ และการเตรียม complementary DNA (cDNA)……..…….. 21
3.2.4.3 ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคไหม้ด้วยเทคนิค quantitative realtime RT-PCR ……..... 24
3.2.5 การศึกษาชนิดของสารทุติยภูมิที่สังเคราะห์โดยเชื้อรา *P. oryzae*……. 26
บทที่ 4 ผลการทดลอง……. 28
4.1 รวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จากพื้นที่ปลูกข้าวของไทย…….. 28
4.2 ผลการปลูกเชื้อที่รวบรวมได้บนข้าวพันธุ์ยั้งมองเพื่อคัดเลือกไอโซเลทเชื้อราที่สามารถและไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมอง……... 30
4.3 ผลการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (NILs) เพื่อระบุยีนก่อโรคของเชื้อรา……..…… 31
4.4 การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา *P. oryzae* บนข้าวพันธุ์ยั้งมอง…….. 36
4.5 การศึกษาชนิดของสารทุติยภูมิที่สังเคราะห์โดยเชื้อรา *P. oryzae*…… 39
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง……. 43
5.1 การปลูกเชื้อ *P. oryzae* ที่รวบรวมได้ลงบนข้าวพันธุ์ยั้งมองเพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถและไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมอง……...… 43
5.2 การปลูกเชื้อ *P. oryzae* บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (Near Isogenic Lines ; NILs) เพื่อระบุยีนก่อโรคของเชื้อรา…… 44
5.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา *P. oryzae* บนข้าวพันธุ์ยั้งมอง……..……. 45
5.4 การศึกษาชนิดของสารทุติยภูมิที่สังเคราะห์โดยเชื้อรา *P. oryzae*……. 47
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง……... 49
บรรณานุกรม…… 51
ภาคผนวก……. 58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ประวัติผู้เขียน…….... 66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	รายชื่อพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (NILs) จำนวน 31 สายพันธุ์ ยีนต้านทานโรคไหม้ และสายพันธุ์ผู้ให้…….....……..…….....…….	22
3.2	ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษายีนของเชื้อรา *P. oryzae* ที่สัมพันธ์กับการก่อโรคไหม้ และยีนต้านทานในข้าว…….……..…...	25
3.3	โปรแกรม gradient ที่ใช้ในการแยกสารของ Liquid Chromatography...……..	27
4.1	เชื้อรา *P. oryzae* ที่ใช้ในการทดลอง 49 ไอโซเลท และแหล่งที่มา…....……..	28
4.1	เชื้อรา *P. oryzae* ที่ใช้ในการทดลอง 49 ไอโซเลท และแหล่งที่มา (ต่อ)……...…….…...	29
4.2	ค่าดัชนีความรุนแรง (Virulence index; VI) ของเชื้อราบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (NILs)…….……..	33
4.3	ค่าดัชนีความต้านทาน (Resistance index; RI) ของข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (NILs) 31 สายพันธุ์ ต่อเชื้อรา 49 ไอโซเลท…….…..…	34
4.4	สารทุติยภูมิที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 และเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC–MS……..	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตารางผนวก

ตารางผนวกที่		หน้า
1	ข้อมูลระดับคะแนนการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (NILs)……..……...……...	62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะของ conidia ของเชื้อรา *Pyricularia oryzae*……..…….	4
2.2	ลักษณะอาการของโรคไหม้ที่พบในใบ (ก) คอรวง (ข) และแปลงปลูกข้าว (ค)……..……..	7
3.1	ลักษณะอาการโรคไหม้และระดับคะแนนการเกิดโรค 7 ระดับ…….....	19
4.1	ลักษณะอาการของข้าวพันธุ์ยั้งมองภายหลังการปลูกเชื้อราไอโซเลท RBR55001 (ก) ไอโซเลท UBN2010 195171 (ข) ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิลภายหลังการปลูกเชื้อราไอโซเลท RBR55001 (ค) และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ภายหลังการปลูกเชื้อราไอโซเลท RBR55001 (ง) เป็นเวลา 7 วัน……..……	30
4.2	เชื้อรา *Pyricularia oryzae* จำนวน 49 ไอโซเลท ที่ก่อโรคไม่รุนแรงหรือไม่ก่อโรค (ระดับคะแนน 0 – 2) บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวจำนวน 31 สายพันธุ์……....	32
4.3	แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 49 ไอโซเลท ตามรูปแบบปฏิริยาการก่อโรคเมื่อทดสอบบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10p วิเคราะห์ similarity ด้วย SimInt เลือกใช้ Canberra เพื่อวิเคราะห์ค่า coefficient และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วย SAHN กลุ่ม A คือ เชื้อราจำนวน 22 ไอโซเลท ที่ก่อโรครุนแรงและสามารถเข้าทำลายข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวได้หลายสายพันธุ์ กลุ่ม B คือ เชื้อราจำนวน 27 ไอโซเลท ที่ก่อโรคไม่รุนแรงบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว……..…	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.4	ระดับการแสดงออกของยีน *AVR – Pik* ในข้าวพันธุ์ยั้งมองหลังจากการปลูกเชื้อรา *P. oryzae* ไอโซเลท PLK40.4 ที่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง และเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ ที่เวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ด้วยวิธี quantitative realtime RT-PCR ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนสัมพันธ์กับยีน *MGG_40S* สัญลักษณ์ * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) ระหว่างเชื้อ 2 ไอโซเลท……	37
4.5	ระดับการแสดงออกของยีน *MoHrip1* ในข้าวพันธุ์ยั้งมองหลังจากการปลูกเชื้อรา *P. oryzae* ไอโซเลท PLK40.4 ที่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง และเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ ที่เวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ด้วยวิธี quantitative realtime RT-PCR ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนสัมพันธ์กับยีน *MGG_40S* สัญลักษณ์ * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) ระหว่างเชื้อ 2 ไอโซเลท……..	38
4.6	ระดับการแสดงออกของยีน *Pik* ในข้าวพันธุ์ยั้งมองหลังจากการปลูกเชื้อรา *P. oryzae* ไอโซเลท PLK40.4 ที่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง และเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ ที่เวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ด้วยวิธี quantitative realtime RT-PCR ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนสัมพันธ์กับยีน *Actin1*……..	39
4.7	โครมาโทรแกรมของสารทุติยภูมิของเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC–MS พบสาร picolinic acid ที่นาทีที่ 1.823 (เส้นประสีแดง)……..….....	41
4.8	โครงสร้างของสาร picolinic acid ที่ตรวจพบในสารสกัดจากเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC–MS……..…….....	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.9	โครมาโทรแกรมของสารทุติยภูมิของเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC–MS พบสาร tenuazonic acid ที่นาทีที่ 9.144 (เส้นประสีแดง)……..	42
4.10	โครงสร้างของสาร tenuazonic acid ที่ตรวจพบในสารสกัดจากเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC–MS……..	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

เชื้อรา *Pyricularia oryzae* เป็นสาเหตุโรคไหม้ข้าวซึ่งเป็นโรคที่มีความสำคัญ และพบการแพร่ระบาดเป็นประจำในพื้นที่ปลูกข้าว เชื้อราสาเหตุโรคไหม้สามารถเข้าทำลายข้าวได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง เมื่อเชื้อราเข้าทำลายข้าวในระยะกล้า ใบจะมีแผลจุดสีน้ำตาลมีลักษณะคล้ายรูปตาสีเทาอยู่ตรงกลาง ถ้าแผลลุกลามรวมกันจะทำให้ต้นกล้าข้าวแห้งและตาย ขนาดของแผลที่ใบในระยะแตกกอจะใหญ่กว่าที่พบในระยะกล้า ใบจะมีลักษณะเป็นแผลช้ำสีน้ำตาลดำ ระยะคอรวงพบแผลช้ำสีน้ำตาลที่คอรวง ทำให้รวงหักง่าย เมล็ดลีบ รวงข้าวได้รับความเสียหายเป็นอย่างมาก (กรมการข้าว. 2563ก) เชื้อรา *P. oryzae* เข้าทำลายข้าวได้เมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมคือ มีความชื้นสูง และอุณหภูมิอยู่ในช่วง 22 – 25 องศาเซลเซียส โดยเชื้อราสาเหตุโรคไหม้เป็นเชื้อราที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (Mekwatanakarn *et al.* 2000) มีการพัฒนาปรับตัวได้อย่างรวดเร็วในการเข้าทำลายข้าว ซึ่งอาจส่งผลให้พันธุ์ข้าวที่เคยต้านทานต่อโรคไหม้สูญเสียความต้านทานลงได้ ในประเทศไทยข้าวพันธุ์พื้นเมืองจัดเป็นแหล่งพันธุกรรมของยีนที่มีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวมีคุณภาพดี และมีความต้านทานต่อโรคได้ โดยข้าวพันธุ์พื้นเมืองมีลักษณะความต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง (broad spectrum resistance) สามารถต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลท จากงานวิจัยของ Salih *et al.* (2013) พบว่าข้าวพันธุ์ยั้งมองเป็นข้าวพื้นเมืองของไทยที่มีความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ได้ในระดับดีมีลักษณะความต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง (broad spectrum resistance) สามารถต้านทานเชื้อรา *P. oryzae* ได้ 29 ไอโซเลท อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อรา *P. oryzae* บางไอโซเลทสามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่ก่อโรคได้บนข้าวพันธุ์ยั้งมองมีศักยภาพที่แตกต่างจากเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่ไม่สามารถก่อโรคได้

เชื้อราสาเหตุโรคไหม้มีกลไกในการก่อโรคในข้าว เช่น ปลดปล่อยโปรตีน (effector protein) ซึ่งเป็นผลผลิตมาจากยีนก่อโรคที่มีอยู่ในเชื้อรา (*AVR* gene) เพื่อใช้ในการก่อโรค ยีนก่อโรคจะมีการแสดงออกโดยการถอดรหัสและแปลรหัสได้ Avirulence protein หรือ effector protein คือโปรตีนที่จำเป็นต่อการเข้าทำลายพืชของเชื้อ หรือการสังเคราะห์สารพิษต่างๆ ที่มีคุณสมบัติเป็นสารทุติยภูมิออกมาเพื่อทำลายเนื้อเยื่อพืชอาศัย และช่วยให้การเข้าทำลายพืชมีความรุนแรงมากขึ้น สารพิษที่เชื้อราสังเคราะห์ขึ้นจึงมีความสัมพันธ์กับการก่อโรคของเชื้อรา (Wolpert *et al.* 2002) ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับกลไกในการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จึงทำให้ทราบความสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเชื้อราที่ใช้ในการเข้าทำลายข้าวสายพันธุ์ต้านทานและจะนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้อย่างอย่างมีประสิทธิภาพ

งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาศักยภาพของเชื้อราที่สามารถก่อโรคได้บนข้าวพันธุ์ยั้งมอง โดยคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่สามารถก่อโรคและไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองและนำไปทดสอบบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (NILs) ซึ่งเป็นข้าวที่มีฐานพันธุกรรมมาจากข้าวพันธุ์ Lijiangxintuanheigu (LTH) โดยแต่ละสายพันธุ์จะมียีนต้านทานโรคไหม้เพียงยีนเดียวเพื่อระบุยีนก่อโรคที่มีอยู่ในเชื้อรา จากนั้นศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับการก่อโรคของเชื้อรา และศึกษาชนิดของสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่สังเคราะห์โดยเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่สามารถก่อโรคและไม่สามารถก่อโรคบนข้าวสายพันธุ์ยั้งมอง ซึ่งข้อมูลที่ได้มีความสำคัญกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อรวบรวมและคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จากพื้นที่ปลูกข้าวของประเทศไทยที่สามารถก่อโรคและไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมอง

1.2.2 เพื่อศึกษารูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรค (pathotype) ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (NILs)

1.2.3 เพื่อระบุยีนที่มีการแสดงออกสัมพันธ์กับความสามารถในการก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมอง

1.2.4 เพื่อศึกษาชนิดของสารทุติยภูมิที่สังเคราะห์ขึ้นโดยเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่สามารถก่อโรคและไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมอง

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการโรคพืช ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

1.4 วิธีการดำเนินการศึกษา

รวบรวมและเก็บตัวอย่างใบข้าวที่แสดงอาการของโรคไหม้จากพื้นที่ปลูกข้าวของประเทศไทย เพื่อแยกเชื้อรา *Pyricularia oryzae* บริสุทธิ์ ปลูกเชื้อรา *P. oryzae* ลงบนข้าวพันธุ์ยั้งมองเพื่อคัดเลือกเชื้อราที่สามารถก่อโรค และไม่สามารถก่อโรคได้ แล้วปลูกเชื้อรา *P. oryzae* ที่ผ่านการคัดเลือกลงบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว ซึ่งเป็นข้าวที่แต่ละสายพันธุ์มียีนต้านทานโรคไหม้เพียงยีนเดียวเพื่อระบุยีนก่อโรคในเชื้อราแต่ละไอโซเลท จากนั้นศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา *P. oryzae* บนข้าวพันธุ์ยั้งมองด้วยเทคนิค quantitative realtime RT-PCR และสกัดสารทุติยภูมิของเชื้อรานำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC–MS) เพื่อศึกษาชนิดของสารทุติยภูมิที่เชื้อราสังเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคไหม้ข้าว (Rice blast disease)

โรคไหม้ข้าวเป็นโรคที่มีความสำคัญทำให้ผลผลิตของข้าวเสียหายมาก เชื้อราสาเหตุโรคไหม้สามารถเข้าทำลายพืชได้หลายชนิดตั้งแต่ข้าว (*Oryza sativa* L.) ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) และพืชตระกูลมิลเล็ท (*Eleusine* spp., *Panicum* spp. และ *Setaria* spp.) (พูนศักดิ์ และคณะ. 2550; Klaubauf *et al.* 2014; Tosa and Chuma. 2014) ประเทศไทยพบการแพร่ระบาดของโรคไหม้ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2496 ในข้าวพันธุ์หอมเศรษฐี ที่สถานีเกษตรกลางบางเขน และบริเวณใกล้สถานีรถไฟมักกะสัน โดยแผนกโรคพืชวิทยา กองพืชพันธุ์ กรมกสิกรรม สันนิษฐานว่าโรคนี้อาจติดมากับฟางข้าวที่มาจากประเทศญี่ปุ่นสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 (ชวาลา. 2531)

ในปัจจุบันประเทศไทยพบปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อการปลูกข้าวและทำให้ผลผลิตข้าวลดลงอันเนื่องมาจากสาเหตุหลายประการ ทั้งสาเหตุจากสิ่งมีชีวิตและไม่มีชีวิต เช่น แมลงศัตรูข้าว ปัญหาน้ำท่วม ดินขาดความอุดมสมบูรณ์ ความแห้งแล้ง และการระบาดของโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส เป็นต้น โดยโรคพืชที่เป็นปัญหาที่สำคัญอย่างยิ่ง คือ โรคไหม้ของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *P. oryzae* ซึ่งเป็นโรคที่สามารถระบาดได้ในทุกพื้นที่ที่ปลูกข้าว เข้าทำลายได้ทุกส่วนของต้นข้าวตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงระยะออกรวง สร้างความเสียหายรุนแรงต่อคุณภาพ และผลผลิตของข้าว โดยในปี พ.ศ. 2562 พบการระบาดของโรคไหม้ข้าวจำนวน 10 จังหวัด ได้แก่ นครศรีธรรมราช ลำปาง กาฬสินธุ์ มหาสารคาม ชัยภูมิ สุรินทร์ ศรีสะเกษ สงขลา แพร่ และตาก คิดเป็นพื้นที่ระบาดจำนวน 509,637 ไร่ ระบาดมากในพื้นที่ที่ปลูกข้าวพันธุ์อ่อนแอต่อโรค ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 กข 15 และ กข6 (กรมการข้าว. 2562) ในปี พ.ศ. 2563 พบการระบาดของโรคไหม้ข้าวจำนวน 26 จังหวัด ได้แก่ ลำปาง แพร่ น่าน พะเยา เชียงราย อุทัยธานี ตาก ขอนแก่น อุดรธานี หนองบัวลำภู สกลนคร มุกดาหาร มหาสารคาม นครราชสีมา สุรินทร์ บุรีรัมย์ อุบลราชธานี ยโสธร บึงกาฬ นครปฐม ลพบุรี สุพรรณบุรี ชลบุรี จันทบุรี พัทลุง และสงขลา คิดเป็นพื้นที่ระบาดจำนวน 38,200 ไร่ (กรมการข้าว. 2563ข) ในปี พ.ศ. 2564 มีรายงานการระบาดของโรคไหม้ จำนวน 15 จังหวัด ได้แก่ แพร่ น่าน พะเยา อุทัยธานี ตาก ขอนแก่น อุดรธานี สกลนคร มหาสารคาม บุรีรัมย์ อุบลราชธานี ยโสธร บึงกาฬ สุพรรณบุรี และจันทบุรี คิดเป็นพื้นที่ระบาดจำนวน 3,563 ไร่ (กรมการข้าว. 2564) ในปัจจุบันพบว่าโรคไหม้ข้าวมีการแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางในพื้นที่ปลูกข้าวทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 เชื้อราสาเหตุโรคไหม้

โรคไหม้ข้าวเกิดจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ส่วนในระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมีชื่อเรียกว่า *Magnaporthe oryzae* (Couch and Kohn. 2002) จำแนกตามหมวดหมู่ได้ดังนี้ (Zhang *et al.* 2016)

Kingdom Fungi

Phylum Ascomycota

Class Sordariomycetes

Order Magnaporthales

Family Pyriculariaceae

Genus *Pyricularia*

Species *P. oryzae*

เชื้อรา *P. oryzae* (ภาพที่ 2.1) สร้างส่วนขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเรียกว่า โคนิเดีย (conidia) บนก้านชูโคนิเดีย (conidiophore) เป็นกลุ่มบนเนื้อเยื่อพืช ก้านชูโคนิเดียมีผนังกั้น โดยโคนิเดียมีรูปร่างลักษณะเป็นแบบ pyriform หรือ obclavate ปลายยอดของโคนิเดียแหลม (tapering) ภายในโคนิเดียแบ่งออกเป็น 3 เซลล์ มี 2 ผนังกั้นเซลล์ (septate) บางครั้งที่ผนังกั้นเซลล์อาจเว้า (constrict) เล็กน้อย โคนิเดียมีลักษณะใสไม่มีสี (hyaline) แต่ละไอโซเลทมีขนาดโคนิเดียแตกต่างกัน โดยมีขนาดประมาณ 20.89 – 28.14 × 7.39 – 10.50 ไมครอน (สรินนา และคณะ. 2561)

ภาพที่ 2.1 ลักษณะของ conidia ของเชื้อรา *Pyricularia oryzae*

ที่มา : Klaubauf *et al.* (2014)

2.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคไหม้

เชื้อ *P. oryzae* เป็นเชื้อราที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม และมีความแปรปรวนมากกว่าเชื้อราชนิดอื่น มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาไม่กี่ชั่ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อายุ พบว่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมมีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของเชื้อ และการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมีส่วนทำให้เกิดเชื้อสายพันธุ์ใหม่ๆ ส่งผลให้เชื้อรามีการปรับตัวได้อย่างรวดเร็วในการเข้าทำลายข้าว การศึกษาประชากรเชื้อโรคไหม้ในประเทศไทย พบว่าเชื้อโรคไหม้ในประเทศไทยมีความหลากหลายมากกว่าแหล่งปลูกข้าวอื่นๆ ของโลก เชื้อรามีความแตกต่างกันไปตามแหล่งปลูกข้าว ฤดูปลูก และระยะการเจริญเติบโตของข้าว ซึ่งจะส่งผลให้ข้าวพันธุ์ต้านทานเกิดการสูญเสียความต้านทาน รวมถึงการเคลื่อนย้ายประชากรของเชื้อราจากพื้นที่หนึ่งไปยังพื้นที่หนึ่ง ทำให้ตรวจพบสายพันธุ์เชื้อราแตกต่างจากที่มีอยู่เดิมในพื้นที่ สาเหตุเหล่านี้ทำให้เกิดการระบาดของโรคไหม้อยู่เป็นประจำ (Mekwatanakarn *et al.* 2000)

พูนศักดิ์ และคณะ (2550) ตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยโดยรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่พบในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2545 – 2548 แยกเชื้อบริสุทธิ์แล้วนำไปทดสอบความรุนแรงของเชื้อบนพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว 18 พันธุ์ จากเชื้อราทั้งหมด 2,476 ไอโซเลท สามารถจำแนกได้ 623 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ที่พบประจำจำนวน 186 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่พบไม่บ่อยจำนวน 437 สายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าประชากรเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยมีความหลากหลายสูงโดยเฉพาะในพื้นที่ปลูกข้าวภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และสายพันธุ์ที่พบประจำมีความรุนแรงน้อยกว่าสายพันธุ์ที่พบไม่บ่อย

Sirithunya *et al.* (2008) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทย โดยเก็บรวบรวมเชื้อราจากข้าว ข้าวบาร์เลย์ ข้าวป่า และหญ้า ทั้งหมด 174 ไอโซเลท มาตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD) แล้วจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อราแต่ละไอโซเลทได้เป็น 9 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม A ถึง กลุ่ม I พบว่า เชื้อราที่อยู่ในกลุ่ม B C และ H พบมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราทั้งหมดที่ศึกษา โดยเชื้อราที่อยู่ในกลุ่มดังกล่าวมีการกระจายตัวอยู่ทั่วประเทศไทย แต่เชื้อราที่อยู่ในกลุ่มอื่นๆ มีการกระจายตัวเฉพาะพื้นที่ เช่น เชื้อราที่อยู่ในกลุ่ม A กระจายตัวอยู่ในบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าอิทธิพลสิ่งแวดล้อมมีผลต่อความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ โดยพบว่าภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย มีความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้สูง

เพ็ญนภา และคณะ (2557) วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (*Magnaporthe grisea* microsatellite ; MGM) และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อรา พบว่ากลุ่มความสัมพันธ์ของพันธุกรรมเชื้อราไม่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งการระบาดของโรคไหม้ เชื้อรามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยเชื้อราที่มาจากแหล่งปลูกข้าวต่างกันมีพันธุกรรมคล้ายกัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการกระจายอย่างกว้างขวางในภาคต่างๆ ของประเทศไทย และเชื้อราที่มาจากแหล่งเดียวกันมีพันธุกรรมที่ต่างกัน แสดงให้เห็นว่าบริเวณที่มีการระบาดของโรคไหม้สามารถพบเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kawasaki *et al.* (2016) ศึกษาความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในประเทศญี่ปุ่น จำนวน 310 ไอโซเลท โดยการทดสอบความรุนแรงบนข้าว 25 พันธุ์ สามารถแบ่งเชื้อได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม I เป็นเชื้อที่ก่อโรคบนข้าวที่มียีนต้านทาน *Pik Pik-h Pik-p Pik-m Pi1* และ *Pi7(t)* กลุ่ม IIa เป็นเชื้อที่ก่อโรคบนข้าวที่มียีนต้านทาน *Pia Pii Pi3* และ *Pi5(t)* และกลุ่ม IIb เชื้อที่ก่อโรคบนข้าวที่มียีนต้านทาน *Pik Pik-h Pik-p Pik-m Pi1 Pi7(t) Pia Pii Pi3* และ *Pi5(t)* โดยเชื้อในกลุ่ม I พบทางตอนเหนือของญี่ปุ่น กลุ่ม IIb พบที่ภาคกลางของญี่ปุ่น ในขณะที่กลุ่ม IIa พบได้ในแหล่งปลูกข้าวทั่วไปของญี่ปุ่น

2.4 ลักษณะอาการของโรคไหม้

เชื้อราโรคไหม้สามารถเข้าทำลายได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าวตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงระยะคอรวง และทุกส่วนของต้นข้าว (ภาพที่ 2.2) แบ่งอาการของโรคเป็น 3 ระยะ (กรมการข้าว. 2563ก)

ระยะกล้า ที่ใบมีแผลจุดสีน้ำตาล ลักษณะคล้ายรูปตามีสีเทาอยู่ตรงกลาง แผลมีขนาดแตกต่างกันไป ความกว้างของแผลประมาณ 2 – 5 มิลลิเมตร และความยาวประมาณ 15 – 20 มิลลิเมตร จุดแผลนี้สามารถขยายลุกลามจนแผลรวมกันทั่วบริเวณใบ ในกรณีที่เป็นโรคไหม้รุนแรงต้นกล้าข้าวจะแห้งและตาย

ระยะแตกกอ อาการของโรคจะพบที่ใบ กาบใบ ข้อต่อของใบ และข้อต่อของลำต้น ขนาดของแผลจะใหญ่กว่าที่พบในระยะกล้า แผลที่ลุกลามติดต่อกันบริเวณข้อต่อใบจะมีลักษณะเป็นแผลช้ำสีน้ำตาลดำ และใบมักหลุดจากกาบใบเสมอ

ระยะคอรวง ถ้าข้าวเริ่มออกรวงและถูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้เข้าทำลายจะทำให้เมล็ดลีบ แต่ถ้าเชื้อราเข้าทำลายตอนรวงข้าวแก่ใกล้เก็บเกี่ยว คอรวงจะปรากฏรอยแผลช้ำสีน้ำตาล ทำให้รวงหักง่าย รวงข้าวจะได้รับความเสียหายมาก

2.5 การแพร่ระบาดของโรคไหม้

เชื้อโรคไหม้สามารถแพร่กระจายได้โดยลม น้ำ ดิน ชิ้นส่วนของพืชหรือเมล็ด ในแหล่งที่มีการปลูกข้าวมากกว่าปีละหนึ่งครั้งจะพบโรคไหม้แพร่ระบาดเป็นประจำ โดยเฉพาะในแหล่งที่มีการปลูกข้าวหนาแน่น การใช้พันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อโรคและการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนมากก็เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคไหม้ได้ โดยสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคทำให้เกิดการระบาดรุนแรงและเกิดการแพร่กระจายของโรคได้ดี คือ ช่วงที่มีฝนตก อากาศค่อนข้างเย็น ตอนกลางคืนมีความชื้นสูง อุณหภูมิประมาณ 22 – 25 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์สูงมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพบโรคไหม้ในพื้นที่ปลูกข้าวหากมีลมแรงจะทำให้โรคแพร่กระจายได้ดี (พูนศักดิ์ และคณะ. 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.2 ลักษณะอาการของโรคไหม้ที่พบที่ใบ (ก) คอรวง (ข) และแปลงปลูกข้าว (ค)

2.6 การเข้าทำลายพืชของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

2.6.1 วงจรการเกิดโรคไหม้

การเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จะเกิดขึ้นหลังจากโคนิเดียสัมผัสกับผิวพืช ความชื้นบนผิวใบพืชจะกระตุ้นให้โคนิเดียงอกเส้นใยสั้นๆ (germ tube) ภายในเวลา 3 ชั่วโมง บริเวณปลาย germ tube จะพัฒนาเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า appressorium ซึ่งบริเวณผิวของ appressorium จะมีการสะสมของเมลานินเพื่อช่วยเพิ่มความเหนียว และทนต่อแรงดันได้สูง แล้วส่งผ่านแรงดันให้ penetration peg ซึ่งเป็นเส้นใยเล็กๆ ที่มีลักษณะเรียวแหลมแทงผ่านเนื้อเยื่อพืชชั้น cuticle และเซลล์ epidermis โดยเส้นใย infection hyphae ที่สร้างขึ้นจาก penetration peg จะสามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในเซลล์พืช และภายใน 72 – 96 ชั่วโมง หลังการติดเชื้อแล้วจะปรากฏแผลโรคไหม้ (Wilson and Talbot. 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2 ยีนก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

เชื้อราสาเหตุโรคไหม้มีการปลดปล่อยโปรตีนซึ่งเป็นผลผลิตมาจากยีนก่อโรคที่มีอยู่ในเชื้อรา (avirulence gene, effector gene) เข้าสู่พืชเพื่อไปยับยั้งกระบวนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของพืช และอำนวยความสะดวกในการติดเชื้อ (Petit and Fudal. 2017) เชื้อก่อโรคมีกลไกในการเข้าทำลายพืชและพืชเองก็มีกลไกต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค โดยโปรตีนก่อโรค (AVR protein) ของเชื้อราจะไปกระตุ้นการทำงานของกลไกป้องกันที่ขึ้นอยู่กับการแสดงออกของยีนต้านทานโรค (*R* gene) ในพืช ยีนก่อโรคมีการแสดงออกโดยการถอดรหัสและแปลรหัสได้ Avirulence protein หรือ effector protein คือ โปรตีนที่จำเป็นต่อการเข้าทำลายพืชของเชื้อ ในกรณีที่เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวได้เนื่องจากมีการส่งสัญญาณและกระตุ้นให้ยีนต้านทานที่สามารถจดจำและเกิดปฏิสัมพันธ์ที่เข้ากันได้กับยีนก่อโรคให้ทำการถอดและแปลรหัสเป็นโปรตีนต้านทานโรค ข้าวจึงไม่เกิดโรค ซึ่งปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสาเหตุโรคไหม้กับข้าวเป็นไปตามทฤษฎี gene for gene ของ Flor (1971) ในปัจจุบันมียีนก่อโรคของเชื้อ *P. oryzae* ที่โคลนและศึกษาแล้ว 12 ยีน ได้แก่ *AVR–Pi54, AVR–Pi9, AVR–Pib, AVR–Pia, AVR–Pii, AVR–Pik/km/kp, AVR–Pizt, ACE1, AVR–Pita, AVR–CO39, PWL1* และ *PWL2* (Li *et al*. 2019)

Parinthawong and Tansian (2020) ทดสอบยีนก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 50 ไอโซเลทของประเทศไทย จากภาคเหนือ 18 ไอโซเลท ภาคตะวันออกฉียงเหนือ 16 ไอโซเลท ภาคกลาง 7 ไอโซเลท ภาคตะวันตก 1 ไอโซเลท และภาคใต้ 8 ไอโซเลท โดยปลูกเชื้อลงบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว จำนวน 31 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อราที่ทดสอบมียีนก่อโรค *AVR–Pik* (*AVR–Pikp AVR–Pikh AVR–Pikm AVR–Pi7(t)*) และ *AVR–Pita2* โดยพบยีน *AVR–Pikp* และ *AVR–Pi7(t)* ในเชื้อราที่แยกมาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 94 เปอร์เซ็นต์ ยีน *AVR–Pita2* ในเชื้อราที่แยกมาจากภาคเหนือ 83 เปอร์เซ็นต์ ยีน *AVR–Pikp, AVR–Pikh, AVR–Pi1, AVR–Pi7(t), AVR–Piz, AVR–Pi12, AVR–Pi19* และ *AVR–Pi20* ในเชื้อราที่แยกมาจากภาคใต้ 88 เปอร์เซ็นต์ และยีน *AVR–Pi9* ในเชื้อราที่แยกมาจากภาคกลาง 71 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ยังมียีนที่จำเป็นสำหรับการก่อโรคที่ไม่ใช่ Avirulence gene เช่น ยีน *Slp1* ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้สามารถยับยั้งความต้านทานของข้าวได้ โดยการยับยั้งการทำงานของ chitin elicitor binding protein (CEBiP) ที่มีหน้าที่จดจำ chitin ของเชื้อ ข้าวจึงไม่สามารถจดจำโมเลกุลของเชื้อได้ ส่งผลให้ข้าวไม่เกิดปฏิกิริยาตอบสนองด้วยการสะสมอนุมูลอิสระของออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) ที่มีคุณสมบัติเป็นพิษต่อเชื้อรา เชื้อราจึงสามารถเข้าทำลายข้าวได้ (Mentlak *et al.* 2012) และยีน *MoHrip1* ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา จะแสดงออกในระยะแรกที่เชื้อราเข้าทำลายข้าว และพบว่าเมื่อปลูกเชื้อราที่ยีน *MoHrip1* จะยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานในข้าว แต่เมื่อปลูกเชื้อที่ไม่มียีน *MoHrip1* จะมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้าว คือ ยีน *PBZ1, PAL* และ *PR1a* และมีการสังเคราะห์สารไฟโตอเล็กซิน (phytoalexin) คือ phytocasssane และ oryzalexin (Nie *et al.* 2019)

2.6.3 สารทุติยภูมิของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค

เชื้อราสาเหตุโรคไหม้มีการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) โดยสารทุติยภูมิที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อราคือ สารพิษที่ส่งผลกระทบต่อพืชโดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช หรือมีบทบาทในการทำให้เกิดโรคพืช สารพิษที่มีความจำเป็นในการก่อโรคเรียกว่า primary determinant และสารพิษที่ไม่มีความจำเป็นต่อการเกิดอาการโรคแต่ส่งเสริมให้อาการของโรครุนแรงมากขึ้นเรียกว่า secondary determinant (ณรงค์ และคณะ. 2538) โดยทั่วไปเชื้อจะสังเคราะห์สารพิษและมีความความรุนแรงเฉพาะกับพืชอาศัยเท่านั้น (Otani *et al.* 1995) สารพิษที่เชื้อสังเคราะห์ขึ้นจึงมีความสัมพันธ์กับการก่อโรคของเชื้อรา (Wolpert *et al.* 2002) เชื้อรา *P. oryzae* มีการสร้างสารพิษหลายชนิด ได้แก่ pyricularine, pyricularic acid, coumarin, pyrichalasin H, tyrosol, pyriculatol, piricularin, picolinic acid, tenuazonic acid และ pyriculol (Narayana and Suryanarayanan. 1974; Tsuneo *et al.* 1996) โดยพบว่าสารพิษเหล่านี้เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทำให้เกิดโรคไหม้

ณรงค์ และคณะ (2538) ศึกษาสารพิษของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว modified fries medium จากนั้นกรองเส้นใยเชื้อราออกจากอาหารเหลวจะได้ของเหลวที่เรียกว่า culture filtrate นำ culture filtrate ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC พบสาร tenuazonic acid เมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษบนใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่าสาร tenuazonic acid สามารถก่อให้เกิดแผลโรคไหม้ได้ และเมื่อใช้ความเข้มข้นของสาร tenuazonic acid เพิ่มขึ้นขนาดของแผลจะเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าสาร tenuazonic acid ที่เชื้อราสาเหตุโรคไหม้สังเคราะห์ขึ้นมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดอาการของโรคไหม้

Kumar *et al.* (2006) ศึกษาสารพิษของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ใน finger millet (*Eleusine coracana*) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Potato dextrose broth (PDB) แล้วกรองเส้นใยเชื้อราออก จากนั้นนำ culture filtrate ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบสาร pyrichalasin H และเมื่อนำสาร pyrichalasin H ไปทดสอบกับเมล็ด finger millet พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของเมล็ด และยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้า finger millet ได้

Tsurushima *et al.* (2009) ศึกษาสารพิษที่ได้จากเชื้อรา *P. oryzae* จำนวน 72 ไอโซเลท จากข้าว และ crabgrass (*Digitaria sanguinalis*) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร soy sauce-sucrose medium แล้วกรองเส้นใยเชื้อราออกจากนั้นนำ culture filtrate ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าเชื้อรามีการสังเคราะห์สาร pyrichalasin H ที่สามารถก่อให้เกิดอาการแผลโรคไหม้ได้ และพบว่าเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่แยกได้จากข้าวสาลีมีการสังเคราะห์สาร pyriculol และ epipyriculol ซึ่งเป็นปัจจัยที่ชักนำให้เกิดอาการโรคไหม้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jacob *et al.* (2017) ศึกษาการสร้างสาร secondary metabolite ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ โดยวิเคราะห์สารที่เชื้อสังเคราะห์ขึ้นด้วยเทคนิค HPLC พบสาร pyriculol และ pyriculariol ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดแผลบนใบข้าวได้ และศึกษาการแสดงออกของยีนพบว่ายีน *MoPSK19* เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร pyriculol และ pyriculariol ของเชื้อรา ซึ่งเมื่อทำการยับยั้งการทำงานของยีน *MoPSK19* จะทำให้เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ไม่สามารถสังเคราะห์สาร pyriculol และ pyriculariol ได้

2.7 ข้าวที่เป็นแหล่งของความต้านทานโรคไหม้

ข้าว (Rice) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในตระกูลหญ้า (Gramineae หรือ Poaceae) จัดอยู่ในสกุล (Genus) *Oryza* ข้าวที่บริโภคมี 2 ชนิด คือ ข้าวปลูกเอเชีย (*Oryza sativa*) และข้าวปลูกแอฟริกา (*Oryza glaberrima*) สำหรับข้าวปลูกเอเชียปลูกอยู่ทั่วไปในเขตร้อน และเขตอบอุ่นของโลก ส่วนข้าวปลูกแอฟริกามีแหล่งปลูกเริ่มแรกอยู่ในแอฟริกาตะวันตก สามารถแบ่งข้าวปลูกเอเชียออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ข้าวอินดิกา (Indica) เป็นข้าวที่ปลูกกันอย่างแพร่หลายในเขตร้อน โดยเฉพาะในประเทศอินเดีย ศรีลังกา ไทย และมาเลเซีย ข้าวจาปอนิกา (Japonica) ปลูกในเขตอบอุ่น คือ ประเทศญี่ปุ่น จีน เกาหลี ไต้หวัน และออสเตรเลีย และข้าวจาวานิกา (Javanica) ปลูกบริเวณไหล่เขาของฟิลิปปินส์ และมาดากัสการ์ (กองวิจัยและพัฒนาข้าว. 2541) ข้าวเป็นพืชที่มีความสำคัญเนื่องจากเป็นอาหารหลักและเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ประเทศไทยเป็นแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญมีพื้นที่การเพาะปลูกมากถึง 69 ล้านไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2563) โดยในปี พ.ศ. 2564 การส่งออกข้าวในช่วงเดือนมกราคม – กุมภาพันธ์ 2564 มีปริมาณรวม 829,277 ตัน มูลค่า 15,542.4 ล้านบาท (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. 2564)

ประเทศไทยอยู่ในเขตศูนย์กลางแหล่งกำเนิดและการแพร่กระจายของข้าว ประกอบกับสภาพพื้นที่และภูมิอากาศมีความแตกต่างกันในแต่ละภาค จึงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวในแหล่งปลูกข้าวต่างๆ ทั่วประเทศ (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว. 2552) ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าวที่พบเป็นผลมาจากการปรับตัวของพันธุ์ข้าวให้เหมาะกับสภาพแวดล้อมของท้องถิ่นนั้นๆ โดยพันธุ์ข้าวป่าและพันธุ์ข้าวพื้นเมืองนับว่าเป็นแหล่งพันธุกรรมที่ดี เป็นพันธุ์ข้าวที่เกษตรกรได้คัดเลือกและเก็บรักษาพันธุ์สืบทอดกันมาหลายชั่วอายุคน มีลักษณะที่เป็นประโยชน์ซึ่งมีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีคุณภาพดี มีลักษณะเด่นคือ มีคุณค่าทางอาหารสูง มีความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูประจำถิ่น สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี (อิงออน และคณะ. 2553)

2.7.1 ข้าวพื้นเมือง

ข้าวพันธุ์พื้นเมืองเป็นพันธุ์ข้าวปลูกดั้งเดิมหรือปลูกเฉพาะถิ่นซึ่งปลูกมาเป็นเวลานาน และมีความหลากหลายของสายพันธุ์ที่แตกต่างกันไปในแต่ละสภาพพื้นที่ซึ่งปลูกกันทั่วทุกภาคของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเทศไทย ข้าวพันธุ์พื้นเมืองมีความหลากหลายทางพันธุกรรมและเป็นแหล่งพันธุกรรมของยีนที่ดีในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวคุณภาพดี สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ และมีความต้านทานต่อโรคได้ดี ซึ่งลักษณะเช่นนี้เป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรมาก เนื่องจากใช้ต้นทุนการผลิตต่ำ และสามารถเป็นฐานพันธุกรรมที่มีประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ได้พันธุ์ข้าวที่ดีในอนาคต (เบญจวรรณ. 2555) ประเทศไทยมีข้าวพันธุ์พื้นเมืองหลายสายพันธุ์ กรมวิชาการเกษตรได้จัดตั้งโครงการรวบรวมและอนุรักษ์ทรัพยากรเชื้อพันธุ์ข้าวในปี พ.ศ. 2538 ถึง ปี พ.ศ. 2542 ดำเนินการโดยศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติ ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี ได้รวบรวมพันธุ์ข้าวปลูกทุกชนิดของประเทศไทยไว้จำนวน 23,903 ตัวอย่าง จัดเป็นพันธุ์ข้าวพื้นเมืองจำนวน 17,093 ตัวอย่าง ข้าวสายพันธุ์ต่างประเทศจำนวน 3,391 ตัวอย่าง ข้าวป่า (*Oryza* spp.) จำนวน 1,065 ตัวอย่าง และข้าวอื่นๆ (*Oryza glaberima*) จำนวน 19 ตัวอย่าง โดยการตั้งชื่อพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของเกษตรกรหรือเจ้าของพันธุ์จะตั้งตามสถานที่ แหล่งที่พบ สถานที่ที่เก็บรวบรวม ลักษณะรูปพรรณสัณฐานที่พบ จังหวัด ชื่อของคน ดอกไม้ ผลไม้ สัตว์ หรือสิ่งของ (ฉวีวรรณ. 2543)

ศรีสวัสดิ์ (2552) ได้ค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* และ *Pi-b* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 201 พันธุ์ ข้าวป่าจำนวน 19 พันธุ์ และข้าวพันธุ์ต้านทานโรคไหม้จำนวน 24 พันธุ์ พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 57 พันธุ์ ข้าวป่าจำนวน 1 พันธุ์ และข้าวพันธุ์ต้านทานโรคไหม้จำนวน 11 พันธุ์ และพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-b* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 75 พันธุ์ ข้าวพันธุ์ต้านทานโรคไหม้จำนวน 6 พันธุ์ แต่ไม่พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-b* ในข้าวป่า

อิงออน และคณะ (2553) ศึกษายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi–d2* ในข้าวพื้นเมืองของประเทศไทยจำนวน 69 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวไร่ภาคเหนือจำนวน 24 สายพันธุ์ และข้าวขึ้นน้ำภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 45 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีนต้านทาน *Pi–d2* พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi–d2* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองทุกสายพันธุ์

กฤตกิตติศักดิ์ และคณะ (2554) ค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทยจำนวน 203 พันธุ์ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีนต้านทาน *Pi9, Pi36* และ *Pigm(t)* พบยีน *Pi9* ในข้าวพื้นเมืองจำนวน 64 พันธุ์ โดยแบ่งเป็นข้าวพื้นเมืองภาคใต้จำนวน 1 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือจำนวน 16 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 47 พันธุ์ พบยีน *Pi36* ในข้าวพื้นเมืองจำนวน 18 พันธุ์ และพบยีน *Pigm(t)* ในข้าวพื้นเมืองจำนวน 201 พันธุ์ แสดงให้เห็นว่าข้าวพื้นเมืองเป็นแหล่งพันธุกรรมที่มีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีคุณภาพดีและมีความต้านทานต่อโรคไหม้ได้

สมทรง และคณะ (2554) ประเมินลักษณะต้านทานโรคไหม้ของเชื้อพันธุกรรมข้าวประมาณ 5,000 ตัวอย่าง ที่ศูนย์วิจัยข้าวทั่วประเทศในระหว่าง ปี พ.ศ. 2551–2553 พบพันธุ์ข้าวส่วนใหญ่ค่อนข้างอ่อนแอจนถึงอ่อนแอมาก มีพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานโรคไหม้ในระดับสูง คือ พันธุ์ข้าวพื้นเมือง จำนวน 50 ตัวอย่าง เช่น บักม่วย (GS. No. 07997) เหลืองทอง (GS. No. 12518) เจ้าดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(GS. No. 21648) อียี่ (GS. No. 22769) ดำหอม (GS. No. 23509) เจ้าพะแล (GS. No. 23694) หอมพวง (GS. No. 8113) เหนียวแดง (GS. No. 8161) แผ่ไร่ (GS. No. 23257) ข้าวฮ้าว (GS. No. 23258) ก่ำไร่ (GS. No. 23259) อีลายใหญ่ (GS. No. 23260) ปลาซิวแดง (GS. No. 23262) ปลาซิวขาว (GS. No. 23264) เหนียวดำ (GS. No. 23265) พญาลืมแกง (GS. No. 23269) ดอกดู่ (GS. No. 23270) และสังข์หยด (GS. No. 15101) เป็นต้น และมีพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานโรคไหม้ในระดับปานกลาง จำนวน 19 ตัวอย่าง เช่น ขาวแดง (GS. No. 23271) ขาวเกษตร (GS. No. 5467) หมากผาง (GS. No. 13905) เหลืองน้อย (GS. No. 10703) อีโพน (GS. No. 10704) หลวงประทาน (GS. No. 5462) ข้าวป้อม (GS. No. 5477) กระโชก (GS. No. 5479) ขาวคัด (GS. No. 5481) กอเดียว (GS. No. 10870) หมากผาง (GS. No. 13905) ข้าวกุ (GS. No. 13957) และจะหล่อยนะ (GS. No. 23152) เป็นต้น

Panda *et al.* (2013) สำรวจพันธุ์ข้าวพื้นเมืองในเขตเคนดราปารา ประเทศอินเดีย พบข้าวพื้นเมือง 69 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะกับการปลูกในสภาพอากาศ และสภาพแวดล้อมในเขตเคนดราปารา และยังเป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานโรคและแมลง และทนต่อสภาพน้ำท่วมขัง

Chumpol *et al.* (2018) ปลูกเชื้อโรคไหม้ 5 ไอโซเลท ได้แก่ UBN71684 NKI11397 KKN191082 SKN205327 และ KKU2016 บนข้าวพื้นเมือง 256 สายพันธุ์ พบว่าข้าวพื้นเมือง 10 สายพันธุ์ ต้านทานต่อโรคไหม้ได้สูง ได้แก่ ULR292, ULR242, ULR219, ULR162, ULR161, ULR134, ULR109, ULR098, ULR081 และ ULR066 และมี 6 สายพันธุ์ที่สามารถต้านทานต่อโรคไหม้คอรวง ได้แก่ ULR162, ULR161, ULR134, ULR109, ULR098 และ ULR081

2.7.2 ข้าวไร่

ข้าวไร่ คือ ข้าวที่มีการปลูกบนที่ไร่ ที่ดอน หรือที่สูง ไม่มีน้ำขังในพื้นที่ปลูก และส่วนใหญ่ไม่มีการพรวนดิน โดยอาศัยน้ำฝนตามฤดูกาล มักปลูกแบบหยอด พันธุ์ข้าวที่ปลูกมีทั้งข้าวเจ้าและข้าวเหนียว (กิตติชัย และคณะ. 2554) ส่วนใหญ่ปลูกในพื้นที่ภาคเหนือ เช่น เชียงราย พะเยา เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำพูน ลำปาง แพร่ พิษณุโลก เพชรบูรณ์ อุตรดิตถ์ และน่าน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น ขอนแก่น มหาสารคาม สกลนคร ชัยภูมิ ร้อยเอ็ด เลย และอุบลราชธานี ภาคตะวันตกปลูกที่จังหวัดตาก อุทัยธานี และกาญจนบุรี และภาคใต้ปลูกที่จังหวัดกระบี่ ชุมพร พังงา สงขลา สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง ตรัง ระนอง และสตูล พันธุ์ข้าวที่นิยมใช้ปลูกคือข้าวพันธุ์พื้นเมืองของแต่ละท้องถิ่น โดยเป็นข้าวที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง แต่ละสายพันธุ์จะมีลักษณะดี เช่น ความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืชในธรรมชาติ คุณภาพเมล็ด หรือทนทานสิ่งแวดล้อม เป็นต้น สามารถใช้เป็นฐานพันธุกรรม และพัฒนาข้าวให้ได้พันธุ์ที่ดีในอนาคตได้ (ชัยฤทธิ์. 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.3 ข้าวพันธุ์ยั้งมอง

ข้าวพันธุ์ยั้งมอง (GS. No. 20874) เป็นข้าวเจ้าและข้าวไร่ สถานที่เก็บรวบรวมพันธุ์ข้าว คือ อำเภอทุ่งช้าง จังหวัดน่าน ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวพันธุ์ยั้งมอง แผ่นใบไม่มีขน แผ่นใบและกาบใบมีสีเขียว ลำต้นมีความแข็งปานกลาง คอรวงยาว เปลือกเมล็ดไม่มีขน เป็นข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง ออกดอกได้ตลอดทั้งปี (ศิริพร. 2560) ข้าวพันธุ์ยั้งมองเป็นพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ที่ผ่านการคัดเลือก โดยการปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 29 ไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย 7 จังหวัด ได้แก่ พิษณุโลก อุบลราชธานี ขอนแก่น เชียงราย หนองคาย ชัยภูมิ และอุดรธานี ลงบนข้าวพื้นเมือง 263 พันธุ์ ผลการตรวจสอบพบข้าวพื้นเมืองจำนวน 25 พันธุ์ มีความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ได้ ในจำนวนนี้พบข้าวพื้นเมือง 4 พันธุ์ ที่สามารถต้านทานโรคไหม้ได้ในระดับสูง ไม่พบอาการของโรคไหม้เลย ได้แก่ GS. No. 23107 (ก่ำเฟื้อย) GS. No. 19769 (ห้วย) GS. No. 23774 (ดอกพยอมไร่) และ GS. No. 20874 (ยั้งมอง) (Salih *et al.* 2013) โดยข้าวสายพันธุ์ห้วย (GS. No. 19769) ซึ่งเป็นหนึ่งในข้าวที่สามารถต้านทานโรคไหม้ได้ดีมีการศึกษาพบว่ามียีนต้านทานมากกว่า 1 ยีน และมี 1 ยีนอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 (Parinthawong *et al.* 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และวัสดุการวิจัย

3.1.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1.1 ข้าวพันธุ์ยั้งมอง (GS. No. 20874)

3.1.1.2 ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (Near Isogenic Lines ; NILs) จำนวน 31 สายพันธุ์ เป็นข้าวที่มีฐานพันธุกรรมมาจากข้าวสายพันธุ์ Lijiangxintuanheigu (LTH)

3.1.1.3 ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวพันธุ์เปรียบเทียบที่อ่อนแอต่อโรคไหม้

3.1.1.4 ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล เป็นข้าวพันธุ์เปรียบเทียบที่ต้านทานต่อโรคไหม้

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 agar (PDA)

3.1.3.2 potato dextrose broth (PDB)

3.1.3.3 rice Flour Agar (RFA)

3.1.3.4 water Agar (WA)

3.1.4 สารเคมี

3.1.4.1 acetone (RCI Labscan, Thailand)

3.1.4.1 agarose gel (Vivantis, Malaysia)

3.1.4.2 diethyl pyrocarbonate water (DEPC water)

3.1.4.3 DNase I (Thermo scientific, USA)

3.1.4.4 chloroform (VWR international S.A.S., France)

3.1.4.5 ethanol (J.T. Baker, Malaysia)

3.1.4.6 ethyl acetate (RCI Labscan, Thailand)

3.1.4.7 ethyl alcohol (Merck, Germany)

3.1.4.8 ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt (EDTA) (EMD chemicals, Germany)

3.1.4.9 gelatin (Gelita AG, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4.10 isopropanol (Merck, Germany)

3.1.4.11 Novel Juice Supplied in 6X Loading Buffer (Bio–Helix, Taiwan)

3.1.4.12 Oligo$(dT)_{18}$ (Thermo scientific, USA)

3.1.4.13 RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo scientific, USA)

3.1.4.14 RibolockTM RNase Inhibitor (Thermo scientific, USA)

3.1.4.15 5X HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no–ROX) (Solis BioDyne, Estonia)

3.1.4.16 0.5X TAE buffer

3.1.4.17 Trizol reagent (Ambion, USA)

3.1.4.18 yeast extract powder (Himedia, India)

3.1.5 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.1.5.1 100 bp DNA Ladder (Thermo scientific, USA)

3.1.6 อุปกรณ์

3.1.6.1 กรวยกรอง (funnel)

3.1.6.2 กระถางปลูกขนาด 10 นิ้ว

3.1.6.3 กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman)

3.1.5.4 กระบอกตวง (cylinder)

3.1.6.5 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Nikon, Japan)

3.1.6.6 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Nikon, Japan)

3.1.6.7 โกร่งบดสาร

3.1.6.8 เครื่องแก้วและบีกเกอร์ขนาดต่างๆ

3.1.6.9 เครื่องจ่ายไฟฟ้า (Bio–Rad, USA)

3.1.6.10 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (SDS, IDS-703, China)

3.1.6.11 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, BSA224S-CW, Germany)

3.1.5.12 เครื่องปั่น (Mitsumaru, Thailand)

3.1.6.13 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Eppendrof, Model 5418, USA)

3.1.6.14 เครื่องปั๊มลม

3.1.6.15 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอแบบอัตโนมัติ (Tomy, Japan)

3.1.6.16 เครื่องพ่นหมอก

3.1.6.17 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Biometra, Germany)

3.1.6.18 เครื่องโรตารีอีวาโพเรเตอร์ (Buchi, R-300, Switzerland)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.6.19 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Eppendrof, Model 6132, Germany)

3.1.6.20 เครื่องอิเลคโตรโฟรีซีส

3.1.6.21 เครื่อง CFX96 TouchTM Real–Time PCR System (Bio–Rad, USA)

3.1.6.22 เครื่องถ่ายภาพเจล BluPAD (Bio–Helix, Taiwan)

3.1.5.23 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.6.24 ตู้ดูดไอสารเคมี (Fume Hood)

3.1.5.25 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Daiki Science, KBLee 1001, USA)

3.1.6.26 ตู้ปลอดเชื้อ (Bosstech, Thailand)

3.1.6.27 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

3.1.6.28 ตู้แช่ –20 องศาเซลเซียส (Panasonic, Thailand)

3.1.6.29 ตู้แช่ –80 องศาเซลเซียส (Telstar, Spain)

3.1.6.30 เตาอบไมโครเวฟ (Electrolux, Sweden)

3.1.6.31 ถาดหลุมปลูกข้าว ขนาดกว้าง 7 เซนติเมตร ยาว 18 เซนติเมตร (3 × 7 หลุม)

3.1.6.32 ถาดหลุมปลูกข้าว ขนาดกว้าง 18 เซนติเมตร ยาว 28 เซนติเมตร (7 × 12 หลุม)

3.1.6.33 โถดูดความชื้น (desiccator)

3.1.6.34 ไมโครปิเปต (Gilson, France)

3.1.6.35 อุปกรณ์สำหรับปลูกเชื้อ

3.1.6.36 อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงเชื้อ

3.1.5.37 หลอดแก้วปลายแหลม

3.1.6.38 หลอดทดลอง ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร (Biosharp, China)

3.1.5.39 ห้องนับเซลล์ (haemacytometer)

3.1.6.40 ทิปขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 รวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จากพื้นที่ปลูกข้าวของไทย

รวบรวมและเก็บตัวอย่างข้าวที่แสดงอาการของโรคไหม้ข้าวในจังหวัดต่างๆ ตรวจดูลักษณะแผลแต่ละรูปแบบแล้วนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ตามวิธีการของ Sirithunya *et al.* (2008) ให้ความชื้นตัวอย่างข้าวที่เป็นโรค โดยเตรียมกระดาษทิชชูผ่านการฆ่าเชื้อวางในจานเลี้ยงเชื้อ หยดน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนกระดาษมีความชื้นที่พอเหมาะ ตัดส่วนของข้าวที่แสดงอาการโรคให้เป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีส่วนของข้าวที่แสดงอาการของโรคไหม้ และมีส่วนที่ไม่แสดงอาการของโรคติดมาด้วย ล้างชิ้นพืชด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อและซับด้วยกระดาษทิชชูให้แห้ง นำไปวางบนกระจกสไลด์ แล้ววางบนกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจดูการสร้างโคนิเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ เมื่อพบโคนิเดียใช้หลอดแก้วปลายแหลมแตะที่โคนิเดียย้ายไปวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Water ager (WA) บ่มให้เชื้อราเจริญเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาตรวจดูการงอกของโคนิเดียภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ จากนั้นใช้มีดฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ตัดชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อลงในอาหาร WA อีกหนึ่งครั้ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 – 3 วัน ตรวจสอบว่าไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นจากนั้นย้ายเชื้อลงอาหาร Potato dextrose agar (PDA) และ Rice flour agar (RFA) ตามลำดับ และนำเชื้อมาเก็บลงบนกระดาษกรอง โดยการนำกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ RFA แล้ววางเชื้อ *P. oryzae* ลงบนกระดาษกรอง บ่มทิ้งไว้เพื่อให้เส้นใยของเชื้อราเจริญอยู่บนกระดาษกรอง นำกระดาษกรองออกจากจานเลี้ยงเชื้อ นำไปทำให้แห้งในภาชนะแก้วดูดความชื้นเป็นเวลา 10 วัน เมื่อแห้งแล้วนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.2 การปลูกเชื้อ *P. oryzae* ที่รวบรวมได้ลงบนข้าวพันธุ์ยั้งมอง

3.2.2.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดสอบ

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ ข้าวพันธุ์ยั้งมอง โดยมีข้าวพันธุ์เปรียบเทียบที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์เปรียบเทียบที่ต้านทานต่อโรคไหม้ คือ ข้าวเจ้าหอมนิล

3.2.2.2 การเตรียมสารแขวนลอยโคนิเดียของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

เตรียมสารแขวนลอยโคนิเดียจากเชื้อราสาเหตุโรคไหม้โดยนำเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ RFA ปล่อยให้เชื้อราเจริญเป็นเวลา 8 – 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำเชื้อรามากระตุ้นให้เกิดการสร้างโคนิเดียโดยใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลลูบบริเวณเส้นใยบนผิวหน้าอาหาร เป็นการทำลายเส้นใยเพื่อกระตุ้นให้เชื้อราสร้างโคนิเดีย แล้วบ่มให้เชื้อราสร้างโคนิเดียเป็นเวลา 2 วัน จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้โคนิเดียเป็นจำนวนมาก จากนั้นเก็บโคนิเดียของเชื้อราด้วยการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขูดโคนิเดียให้หลุดออกจากเส้นใย กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วปรับความเข้มข้นโคนิเดียให้ได้ 1×10^5 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 24 มิลลิลิตร ผสมกับเจลาตินความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยึดเกาะของโคนิเดีย

3.2.2.3 การปลูกเชื้อรา *P. oryzae* บนต้นข้าว

ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้บนต้นกล้าข้าวโดยเพาะข้าวที่ใช้ทดสอบเป็นเวลา 2 – 3 วัน จากนั้นย้ายต้นกล้าข้าวลงในถาดหลุมขนาดกว้าง 7 เซนติเมตร ยาว 18 เซนติเมตร (จำนวนหลุม 3 × 7 หลุม) โดยใช้ 1 หลุม ต่อ 1 พันธุ์ พันธุ์ละ 2 ต้น ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 ปริมาณ 1 กรัมต่อกระบะ หลังการปลูกข้าว 7 วัน นำสารแขวนลอยโคนิเดียไปฉีดพ่นลงบนต้นข้าวอายุ 14 วัน แล้วใช้กล่องพลาสติกสีดำครอบถาดข้าว บ่มในห้องอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ความชื้นโดยใช้เครื่องพ่นหมอกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปไว้ในโรงเรือน และฉีดพ่นน้ำทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 2 วัน ทำจำนวน 2 ซ้ำ ต่อการปลูกเชื้อ 1 ไอโซเลท

3.2.2.4 การประเมินการเกิดโรค

เก็บผลการทดลองหลังการปลูกเชื้อ 7 วัน โดยประเมินปฏิกิริยาก่อโรคของเชื้อและให้คะแนนการเกิดโรคโดยใช้ระดับคะแนนการเกิดโรค 7 ระดับ (Roumen *et al*. 1997) ดังนี้ (ภาพที่ 3.1)

0 คือ ไม่ปรากฏแผล

1 คือ แผลจุดกลมสีน้ำตาลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร

2 คือ เกิดแผลกลมหรือยาวรีเล็กน้อยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.5 –1 มิลลิเมตร ไม่มีจุดเทาตรงกลางแผล

3 คือ เกิดแผลจุดเล็กขนาดประมาณ 1 – 3 มิลลิเมตร มีจุดสีเทาตรงกลางแผล

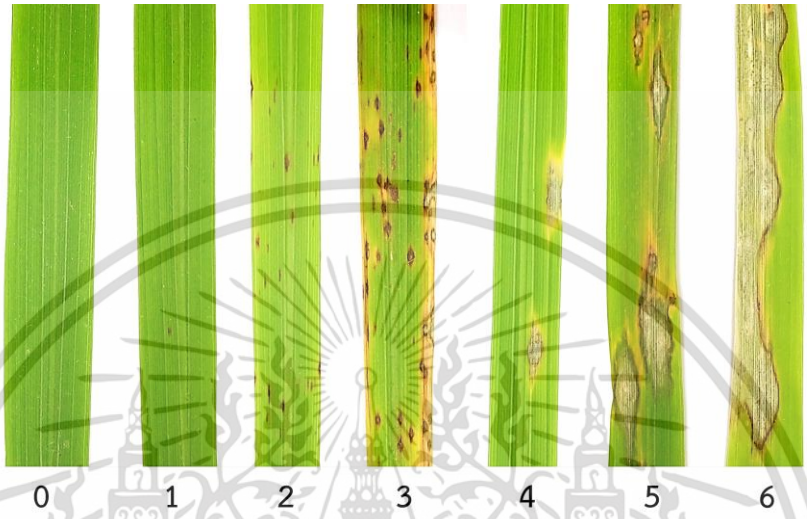
4 คือ เกิดแผลจุดขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร หรือยาวกว่าแผลเป็นสีเทาและมีขอบแผลสีน้ำตาล

5 คือ เกิดแผลสีเทาเกาะกันเป็นกลุ่ม มีขอบแผลสีน้ำตาล เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค

6 คือ เกิดแผลลุกลามยาวติดต่อกันเป็นสีเทา ไม่มีขอบแผลที่แน่นอน เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยแบ่งความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อราออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่
ระดับ 0 – 2 เป็นกลุ่มที่แสดงถึงความสามารถก่อโรคไม่รุนแรงหรือไม่ก่อโรค
ระดับ 3 – 4 เป็นกลุ่มที่แสดงถึงความสามารถก่อโรคปานกลาง
ระดับ 5 – 6 เป็นกลุ่มที่แสดงถึงความสามารถก่อโรครุนแรง



ภาพที่ 3.1 ลักษณะอาการโรคไหม้และระดับคะแนนการเกิดโรค 7 ระดับ

3.2.3 การปลูกเชื้อ *P. oryzae* บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (Near Isogenic Lines ; NILs) เพื่อศึกษารูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรค (pathotype) ของเชื้อรา

3.2.3.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดสอบ

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (NILs) จำนวน 31 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.1) เป็นข้าวที่มีฐานพันธุกรรมมาจากข้าวพันธุ์ Lijiangxintuanheigu (LTH) ได้รับความอนุเคราะห์จาก International Rice Research Institute (IRRI) โดยแต่ละสายพันธุ์จะมียีนต้านทานโรคไหม้เพียงยีนเดียว เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ยีนก่อโรคที่เชื้อราใช้ในการก่อโรคในข้าว โดยมีข้าวพันธุ์เปรียบเทียบที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์เปรียบเทียบที่ต้านทานต่อโรคไหม้ คือ ข้าวเจ้าหอมนิล ร่วมในการทดสอบ

3.2.3.2 การเตรียมสารแขวนลอยโคนิเดียของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

เตรียมสารแขวนลอยโคนิเดียจากเชื้อราสาเหตุโรคไหม้โดยนำเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ RFA ปล่อยให้เชื้อราเจริญเป็นเวลา 8 – 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำเชื้อรามากระตุ้นให้เกิดการสร้างโคนิเดียโดยใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลลูบบริเวณเส้นใยบนผิวหน้าอาหาร เป็นการทำลายเส้นใยเพื่อกระตุ้นให้เชื้อราสร้างโคนิเดีย แล้วบ่มให้เชื้อราสร้างโคนิเดียเป็นเวลา 2 วัน จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้โคนิเดียเป็นจำนวนมาก จากนั้นเก็บโคนิเดียของเชื้อราด้วยการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขูดโคนิเดียให้หลุดออกจากเส้นใย กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วปรับความเข้มข้นโคนิเดียให้ได้ 1×10^5 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ผสมกับเจลาตินความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

3.2.3.3 การปลูกเชื้อรา *P. oryzae* บนต้นข้าว

ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้บนต้นกล้าข้าวโดยการเพาะข้าวที่ใช้ทดสอบเป็นเวลา 2 – 3 วัน จากนั้นย้ายต้นกล้าข้าวลงในถาดหลุมขนาดกว้าง 18 เซนติเมตร ยาว 28 เซนติเมตร (จำนวนหลุม 7 × 12 หลุม) โดยใช้ 1 หลุม ต่อ 1 พันธุ์ พันธุ์ละ 2 ต้น ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 ปริมาณ 1 กรัม ต่อกระบะ หลังการปลูกข้าว 7 วัน แล้วนำสารแขวนลอยโคนิเดียไปฉีดพ่นลงบนต้นข้าวอายุ 14 วัน แล้วใช้กล่องพลาสติกสีดำครอบถาดข้าว บ่มในห้องอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ความชื้นโดยใช้เครื่องพ่นหมอก บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปไว้ในสภาพธรรมชาติและฉีดพ่นน้ำทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 2 วัน เก็บผลการทดลองหลังการปลูกเชื้อ 7 วัน โดยประเมินปฏิกิริยาก่อโรคของเชื้อและให้คะแนนการเกิดโรคโดยใช้ระดับคะแนนการเกิดโรค 7 ระดับ (Roumen *et al*. 1997) ตามวิธีการข้อ 3.2.2.4 ทำจำนวน 2 ซ้ำ ต่อการปลูกเชื้อ 1 ไอโซเลท

3.2.3.4 การคำนวณค่าดัชนีความรุนแรงของเชื้อ (Virulence index; VI)

การคำนวณค่าดัชนีความรุนแรงของเชื้อโรคไหม้แต่ละไอโซเลท สามารถคำนวณได้โดยนำจำนวนสายพันธุ์ข้าวที่เป็นโรคไหม้ (infected variety) เลือกใช้ผลคะแนน 5 – 6 หารด้วยจำนวนสายพันธุ์ข้าวทั้งหมดที่ทดสอบตามสูตร (เสาวลักษณ์ และคณะ. 2554)

$$VI = \frac{\text{No. of infected variety}}{\text{No. of tested variety}}$$

3.2.3.5 การคำนวนค่าดัชนีความต้านทาน (Resistance Index; RI) ของข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว

การคำนวณค่าดัชนีความต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ของข้าวแต่ละสายพันธุ์ สามารถคำนวณได้โดย นำจำนวนไอโซเลทของเชื้อราที่ไม่สามารถเข้าทำลายข้าวพันธุ์นั้นได้ (avirulence isolate) เลือกใช้ผลคะแนน 0 – 2 หารด้วยจำนวนเชื้อทั้งหมดที่ทดสอบตามสูตร (เสาวลักษณ์ และคณะ. 2554)

$$RI = \frac{\text{No. of avirulence isolate}}{\text{No. of tested isolate}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3.6 การวิเคราะห์การจัดกลุ่มข้อมูลด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10p

การวิเคราะห์การจัดกลุ่มเชื้อราโดยใช้ค่าเฉลี่ยของระดับการเกิดโรคของเชื้อรา แต่ละไอโซเลทบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc 2.10p โดยการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Similarity coefficient; SimInt) ด้วยวิธี Canberra จากนั้นจัดกลุ่มจากค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนด้วยวิธี SHAN และสร้างแผนภาพแสดงความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ด้วยวิธี Tree plot โดยในการวิเคราะห์นี้เลือกใช้ข้อมูลจากไอโซเลทที่มีข้อมูลสูญหาย (missing data) ไม่เกิน 10 ข้อมูล

3.2.4 การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา *P. oryzae* บนข้าว

3.2.4.1 การเตรียมพันธุ์ข้าว

เพาะเมล็ดข้าวพันธุ์ยั้งมองเป็นเวลา 2 – 3 วัน จากนั้นปลูกข้าวลงในถาดหลุมขนาดกว้าง 18 เซนติเมตร ยาว 28 เซนติเมตร (จำนวนหลุม 7 × 12 หลุม) ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 ปริมาณ 1 กรัมต่อกระบะ หลังปลูกข้าว 7 วัน เมื่อข้าวมีอายุ 14 วัน ปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้โดยนำสารแขวนลอยโคนิเดียฉีดพ่นลงบนต้นข้าว และเก็บตัวอย่างใบข้าวหลังจากทำการปลูกเชื้อราในชั่วโมงที่ 12 24 และ 48 โดยการทำให้เย็นทันทีในไนโตรเจนเหลวเพื่อทำการสกัดอาร์เอ็นเอ

3.2.4.2 การเตรียมอาร์เอ็นเอ และการเตรียม complementary DNA (cDNA)

การสกัดอาร์เอ็นเอ

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอโดยบดใบข้าวให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวแล้วนำเนื้อเยื่อแต่ละตัวอย่างใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Trizol reagent ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติม chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บของเหลวใสซึ่งอยู่ด้านบนใส่หลอดใหม่ ปริมาณ 500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยการเติม isopropanol ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนอาร์เอ็นเอโดยเทสารละลายออกแล้วล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยการเติม diethyl pyrocarbonate treated water (DEPC water) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 รายชื่อพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (NILs) จำนวน 31 สายพันธุ์ ยีนต้านทานโรคไหม้และสายพันธุ์ผู้ให้

พันธุ์ข้าว	ยีนต้านทาน	สายพันธุ์ผู้ให้
IRBLA–A	*Pia*	Aichi Asahi
IRBLA–C	*Pia*	CO39
IRBLI–F5	*Pii*	Fujisaka 5
IRBLKS–F5	*Pik–s*	Fujisaka 5
IRBLKS–S	*Pik–s*	Shin 2
IRBLK–Ka	*Pik*	Kanto 51
IRBLKP–K60	*Pik–p*	K60
IRBLKH–K3	*Pik–h*	K3
IRBLSH–B	*Pish*	BL1
IRBL1–CL	*Pi1*	C101LAC
IRBL3–CP4	*Pi3*	C104PKT
IRBL5–M	*Pi5(t)*	RIL249
IRBL7–M	*Pi7(t)*	RIL29
IRBL9–W	*Pi9(t)*	WHD–IS–75–1–127
IRBL12–M	*Pi12*	RIL10
IRBL19–A	*Pi19(t)*	Aichi Asahi
IRBLZ–Fu	*Piz*	Fukunishiki
IRBLZ5–CA	*Piz–5*	C101A51
IRBLZT–T	*Piz–t*	Toride 1
IRBLTA–K1	*Pita*	K1
IRBLTA–CT2	*Pita*	C105TTP2L9
IRBLB–B	*Pib*	BL1
IRBLT–K59	*Pita*	K59
IRBLSH–S	*Pish*	Shin 2
IRBLKM–TS	*Pik–m*	Tsuyuake
IRBL20–IR24	*Pi20(t)*	ARL24
IRBLTA2–PI	*Pita–2*	Pi No. 4
IRBLTA2–RE	*Pita–2*	Reiho
IRBLTA–CP1	*Pita*	C101PKT
IRBL11–ZH	*Pi11(t)*	Zhaiyeqing 8
IRBLZ5–C(R)	*Piz–5*	CO39
LTH	–	–

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอ

ตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Eppendorf, Model 6132, Germany) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A260 และ A280) โดยเจือจางอาร์เอ็นเอที่ 2:50 (อาร์เอ็นเอ 2 ไมโครลิตร และ DEPC water ปริมาตร 48 ไมโครลิตร) นำความเข้มข้นอาร์เอ็นเอที่ได้มาคำนวณและเตรียมอาร์เอ็นเอให้มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส นำอาร์เอ็นเอ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X Loading dry ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดสารละลายทั้งหมดลงในหลุมของแผ่นอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที โดยใช้สารละลาย 0.5X TAE buffer เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า และตรวจดูแถบอาร์เอ็นด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล BluPAD (Bio-Helix, Taiwan)

การกำจัดดีเอ็นเอออกจากอาร์เอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ DNase I

นำอาร์เอ็นเอที่ได้มากำจัดดีเอ็นเอปนเปื้อนโดยใช้เอนไซม์ DNase I เตรียมปฏิกิริยาในปริมาณ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X DNase I buffer ที่มี $MgCl_2$ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร DNase I ความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร อาร์เอ็นเอความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และ DEPC water ปริมาณ 7 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม 25 mM ethylene diamine tetraacetic (EDTA) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การเตรียม complementary DNA (cDNA)

นำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ด้วยชุด RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) ตามวิธีการที่บริษัทแนะนำ โดยเตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยอาร์เอ็นเอความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร เติม $Oligo(dT)_{18}$ ความเข้นข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร เติม DEPC water ปริมาณ 10 ไมโครลิตร เติม 5X Reaction Buffer ปริมาณ 4 ไมโครลิตร เติม RibolockTM RNase Inhibitor ความเข้มข้น 20 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร เติม dNTPs ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร และเติม RevertAid Reverse Transcriptase Inhibitor (Thermo Scientific, USA) ความเข้มข้น 200 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บ cDNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

คัดเลือกไพร์เมอร์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา *P. oryzae* (ตารางที่ 3.2) เตรียมปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA ที่เจือจางในสัดส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1:10 (cDNA ปริมาณ 1 ไมโครลิตรต่อน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาณ 9 ไมโครลิตร) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาณ 5.9 ไมโครลิตร 10X *Taq* polymerase buffer ปริมาณ 1 ไมโครลิตร dNTPs ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ส่วนผสมระหว่าง Forward primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และ Reverse primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และ *Taq* polymerase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.1 ไมโครลิตร โดยขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย 1) Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ 2) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที 3) Annealing ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของแต่ละไพร์เมอร์ (ตารางที่ 3.2) 4) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 30 รอบ และ 5) Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที 1 รอบ ตรวจสอบผลปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis นำผลผลิต PCR ปริมาณ 3 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X Loading Buffer (Bio-Helix, Taiwan) ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร แล้วหยอดสารละลายทั้งหมดลงในหลุมของแผ่นเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที โดยใช้สารละลาย 0.5X TAE buffer เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า และตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล BluPAD (Bio-Helix, Taiwan)

3.2.4.3 ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคไหม้ด้วยเทคนิค quantitative realtime RT-PCR

ตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative realtime RT-PCR ด้วยชุด HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX) (Solis BioDyne, Estonia) ตามวิธีการที่บริษัทแนะนำ โดยเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาในปริมาณ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX) (Solis BioDyne, Estonia) ความเข้มข้น 5X ปริมาณ 4 ไมโครลิตร Forward primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร Reverse primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาณ 13 ไมโครลิตร และ cDNA ปริมาณ 2 ไมโครลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CFX96 Connect Real-Time PCR Detection System (Bio–Rad, USA) โดยขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย 1) Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที จำนวน 1 รอบ 2) Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที 3) Annealing ใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของแต่ละไพร์เมอร์ (ตารางที่ 3.2) เป็นเวลา 20 วินาที 4) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 40 รอบ ในแต่ละยีนทำจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยโปรแกรม CFX Maestro version 1.1 แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณหาค่าการแสดงออกของยีน (relative gene expression) โดยใช้สูตรตามวิธีของ Livak and Schmittgen. (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{Relative expression} = \frac{2^{\Delta \text{Ct, target (control – sample)}}}{2^{\Delta \text{ Ct, reference (control –sample)}}}$$

Target หมายถึง ยีนที่ต้องการตรวจสอบ

Reference หมายถึง ยีน *MGG_40S* หรือ ยีน *Actin1* ในข้าว

Control หมายถึง ตัวอย่างข้าวที่ฉีดพ่นด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ

Sample หมายถึง ตัวอย่างข้าวที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อราทดสอบ

หาค่าเฉลี่ย relative expression ของยีนที่ทดสอบและวิเคราะห์ข้อมูลความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Turkey HSD โดยถ้าการแสดงออกของยีนเป็นแบบ up-regulation คือ ค่า relative expression ratio > 1 หมายถึงการแสดงออกของยีนมีการยกระดับการแสดงออกมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่างไม่ได้ปลูกเชื้อ (control)

ตารางที่ 3.2 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษายีนของเชื้อรา *P. oryzae* ที่สัมพันธ์กับการก่อโรคไหม้ และยีนต้านทานในข้าว

	ชื่อยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (5' – 3')	อุณหภูมิ annealing (องศาเซลเซียส)	ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ (คู่เบส)	เอกสารอ้างอิง
ยีนของเชื้อรา	*MoHrip1*	F: CGCAAGACGGTGGACAACA R: TGACCAGGGCGAAGGAGTAG	60	151	Nie *et al*. 2019
	AVR–Pik	F: ATGCGTGTTACCACTTTTAACAC R: TTAAAAGCCGGGCCTTTTTT	54	342	Longya *et al*. 2019
	MGG_40s	F: ACAAGCTCAAGACCCTCGTC R: GGTGGTGATGGTGAAGCAG	56	80	Omar *et al*. 2016
ยีนของข้าว	*Pik*	F: GAAGCTCTGATCAACGGTATTCC R: TCTTTGATCATCTTCGGGATACG	56	149	Zhai *et al*. 2011
	Actin1	F: CTTCATAGGAATGGAAGCTGC R: CGACCACCTTGATCTTCATGC	60	197	*

***ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ออกแบบและใช้ในงานทดลองนี้**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5 การศึกษาชนิดของสารทุติยภูมิที่สังเคราะห์โดยเชื้อรา *P. oryzae*

ศึกษาสารทุติยภูมิของเชื้อราโดยดัดแปลงวิธีการของ Tsurushima *et al.* (2005) เลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 3 วัน แล้วตัดชิ้นวุ้นบริเวณขอบโคโลนีเชื้อราจำนวน 3 ชิ้น นำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นย้ายเชื้อ ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ที่เติมใบข้าวพันธุ์ยั้งมอง 10 กรัม/ลิตร ปริมาณ 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำไปสกัดสารทุติยภูมิของเชื้อราโดยดัดแปลงวิธีการของ Jacob *et al.* (2017) ทำการกรองเส้นใยของเชื้อราออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร (Whatman) ลดปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหลือ 100 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องโรตารีอีวาโพเรเตอร์ (rotary vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปสกัดด้วยการเติมเอทิลอะซีเตต (ethyl acetate) ปริมาณ 200 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะได้สารละลาย 2 ชั้น คือ ชั้นของอาหารเลี้ยงเชื้อและชั้นของเอทิลอะซีเตต เทสารละลายชั้นของเอทิลอะซีเตตเก็บไว้ แล้วนำสารละลายชั้นของอาหารเลี้ยงเชื้อสกัดซ้ำให้ครบ 3 รอบ แล้วนำสารละลายในชั้นของเอทิลอะซีเตตทั้ง 3 รอบ ไปกำจัดเอทิลอะซีเตตออกด้วยเครื่องโรตารีอีวาโพเรเตอร์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้เหลือสารละลายปริมาณ 5 มิลลิลิตร ทำให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบที่ได้ ละลายสารสกัดหยาบที่สกัดได้ในเมทานอล 1 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC–MS) ทดสอบโดยใช้เครื่อง Liquid chromatograph–quadrupole time – of – flight mass spectrometer (LC – QTOF MS), 1290 Infinity II LC–6545 Quadrupole–TOF (Agilent Technologies, USA) สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ ใช้คอลัมน์ Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD ยาว 150 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 2.1 มิลลิเมตร และขนาดอนุภาค (particle size) 1.8 ไมโครเมตร โดยอุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณของตัวอย่างที่ฉีดคือ 2 ไมโครลิตร ใช้เฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) A คือ Water และ B คือ Acetonitrile ใช้โปรแกรม gradient ในการแยกสาร โดยมีอัตราการไหล (flow rate) ที่ 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที (ตารางที่ 3.3) ใช้เวลาตรวจวัด 62 นาทีต่อตัวอย่าง วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยใช้โปรแกรม MassHunter Qualitative Analysis Software B.08.00A และเปรียบเทียบสารที่พบกับฐานข้อมูล Library METLIN database

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 โปรแกรม gradient ที่ใช้ในการแยกสารของ Liquid Chromatography

Time (min)	water	Acetonitrile	Flow rate (mL/min)
0	95%	5%	0.2
5	95%	5%	0.2
6	75%	25%	0.2
30	75%	25%	0.2
31	65%	35%	0.2
50	65%	35%	0.2
51	100%	0%	0.2
60	100%	0%	0.2
62	95%	5%	0.2
62	95%	5%	0.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 รวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จากพื้นที่ปลูกข้าวของไทย

การสำรวจและรวบรวมเชื้อรา *P. oryzae* ในแหล่งที่มีการระบาดของโรคไหม้ข้าวในประเทศไทยได้เชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 49 ไอโซเลท โดยเป็นเชื้อราที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี จำนวน 10 ไอโซเลท เชื้อราที่ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จำนวน 2 ไอโซเลท เชื้อราที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) จำนวน 1 ไอโซเลท เชื้อราที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวพัทลุงจำนวน 2 ไอโซเลท เชื้อราที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน 1 ไอโซเลท เชื้อราที่รวบรวมโดยห้องปฏิบัติการโรคพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังจำนวน 9 ไอโซเลท และเชื้อราที่เก็บรวบรวมใหม่ในการทดลองนี้จากฤดูปลูกปี พ.ศ. 2561 – 2562 จำนวน 24 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 เชื้อรา *P. oryzae* ที่ใช้ในการทดลอง 49 ไอโซเลท และแหล่งที่มา

จังหวัด	ไอโซเลท	แหล่งที่มา
อุบลราชธานี	UBN2010 11351	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
	UBN2009 11308	
	UBN2010 13515	
	UBN2009 207129	
	UBN2010 195167	
	UBN2010 195171	
หนองคาย	NKI2010 47181	
สกลนคร	SKN2008 60867	
ขอนแก่น	KKN2008 7357	
	KKN2009 61067	
เชียงราย	Chiangrai34.1	ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
พิษณุโลก	PLK40.4	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

จังหวัด	ไอโซเลท		แหล่งที่มา
พิษณุโลก	THL191		สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
พัทลุง	PL1 PL2		ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
เชียงใหม่	THL794		ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
กรุงเทพฯ	BKK55001	BKK55003	ห้องปฏิบัติการโรคพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ราชบุรี	RBR55001	RBR55003	
สุรินทร์	SRN54002	SRN54005	
	SRN54007	SRN62108	
ฉะเชิงเทรา	CCO55002	CCO56004	
ลำปาง	LPG61004	LPG61005	
	LPG61011		
ตาก	TAK61002		
เพรชบูรณ์	PNB61005	PNB61008	
พัทลุง	PL61003	PL61017	
สกลนคร	SKN61009	SKN62103	
อุทัยธานี	UTI61101	UTI61106	
เชียงราย	CRI61010		
กระบี่	KPT61002		
พะเยา	PYO61001		
แม่ฮ่องสอน	MSN61005	MSN61008	
แพร่	PRE61016		
อุบลราชธานี	UBN61016		
อุดรธานี	UDN61008		
ขอนแก่น	KKN62107	KKN62112	
มหาสารคาม	MKM62101		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการปลูกเชื้อราที่รวบรวมได้บนข้าวพันธุ์ยั้งมองเพื่อคัดเลือกไอโซเลทเชื้อราที่สามารถ และไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมอง

จากการปลูกเชื้อแต่ละไอโซเลทจำนวน 49 ไอโซเลท บนข้าวพันธุ์ยั้งมอง และข้าวสายพันธุ์เปรียบเทียบได้แก่ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์อ่อนแอต่อโรคไหม้ และข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิลซึ่งเป็นข้าวต้านทานโรคไหม้ และประเมินความรุนแรงของโรคเมื่อปลูกเชื้อแต่ละไอโซเลทไปแล้ว 7 วัน พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 45 ไอโซเลท ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ คือ CCO56004, KKN2009 61067, KKN2008 7537, RBR55001, SRN54007, THL794, UBN2010 13515, UBN2009 207129, UBN2010 195167, UBN2009 11308, NKI2010 47181, BKK55001, BKK55003, Chiangrai34.1, UBN2010 11351, LPG61004, TAK61002, PNB61005, PL61003, PL61017, PL1, PL2, LPG61005, LPG61011, PNB61008, UTI61101, UTI61106, CRI61010, KPT61002, PYO61001, MSN61005, MSN61008, PRE61016, SRN54005, SRN54002, THL191, CCO55002, UBN61016, UDN61008, SKN61009, KKN62107, SRN62108, SKN62103, KKN62112 และ MKM62101 เชื้อราจำนวน 4 ไอโซเลท สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง คือ SKN2008 60867, UBN2010 195171, RBR55003 และ PLK40.4 ในขณะที่ไม่พบเชื้อราที่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับรุนแรง โดยข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แสดงความอ่อนแอต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้มีระดับคะแนน 5 – 6 และข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิลแสดงความต้านทานโรคไหม้มีระดับคะแนน 0 – 2 (ภาพที่ 4.1)

ภาพที่ 4.1 ลักษณะอาการของข้าวพันธุ์ยั้งมองภายหลังจากการปลูกเชื้อราไอโซเลท RBR55001 (ก) ไอโซเลท UBN2010 195171 (ข) ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิลภายหลังการปลูกเชื้อราไอโซเลท RBR55001 (ค) และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ภายหลังจากการปลูกเชื้อราไอโซเลท RBR55001 (ง) เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (NILs) เพื่อระบุยีนก่อโรคของเชื้อรา

จากการทดสอบปฏิกิริยาก่อโรคของเชื้อรา 49 ไอโซเลท บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว 31 สายพันธุ์ โดยให้ระดับคะแนน 0 – 6 โดยคะแนน 0 – 2 คือข้าวแสดงความต้านทาน เป็นผลมาจากปฏิกิริยาระหว่าง *R* gene และ *AVR* gene คะแนน 3 – 4 คือข้าวแสดงลักษณะต้านทานปานกลาง และคะแนน 5 – 6 ข้าวแสดงความอ่อนแอ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่เกิดปฏิกิริยาระหว่าง *R* gene และ *AVR* gene จากนั้นนำผลคะแนน 5 – 6 ที่เกิดจากการปลูกเชื้อไปคำนวณค่าดัชนีความรุนแรง (Virulence Index; VI) ของเชื้อราแต่ละไอโซเลท โดยคัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่มีผลคะแนน 5 – 6 บนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอไปคำนวณ พบว่าเชื้อรา 49 ไอโซเลท มีค่า VI อยู่ระหว่าง 0 ถึง 0.55 (ตารางที่ 4.2)

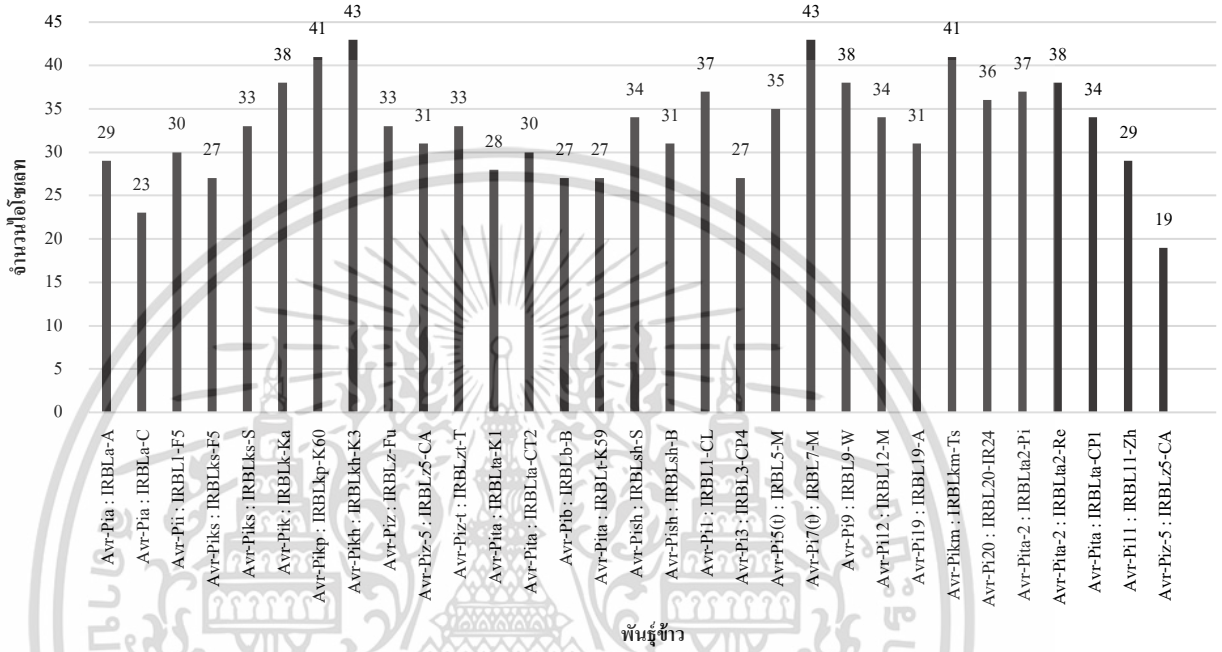
ในจำนวนเชื้อราที่ทดสอบทั้งหมด พบว่าเชื้อราไอโซเลท UBN2010 13515 ซึ่งเป็นไอโซเลทที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ มีค่า VI ของการทดสอบบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว คือ 0.55 ค่าดัชนีความรุนแรงของเชื้อราที่ก่อโรคบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวมากที่สุดของเชื้อราไอโซเลท UBN2010 13515 แสดงให้เห็นว่าเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงสามารถเข้าทำลายข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวได้หลายสายพันธุ์แต่ไม่สามารถเข้าทำลายข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ และจากผลการทดสอบบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว ระบุว่าเชื้อราไอโซเลท UBN2010 13515 มียีนก่อโรค *AVR–Piks, AVR–Pikp, AVR–Pikh, AVR–Pish, AVR–Pi7(t), AVR–Pikm, AVR–Pi20* และ *AVR–Pita* ซึ่งข้าวพันธุ์ยั้งมองอาจมียีนต้านทาน (*R* gene) คือ *Piks, Pikp, Pikh, Pish, Pi7(t), Pikm, Pi20* และ *Pita* ที่เข้าคู่กันและทำปฏิกิริยากันได้ จึงทำให้ไม่เกิดโรค และพบเชื้อราที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวได้ (ระดับคะแนน 0 – 2) โดยมีค่าดัชนีความรุนแรงเท่ากับ 0.00 มีจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ BKK55001, PL61003 และ RBR55001

จากการวิเคราะห์ค่าดัชนีความต้านทาน (Resistance Index; RI) ของข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว โดยใช้ผลคะแนนระหว่าง 0 – 2 ของข้าวแต่ละสายพันธุ์ที่ตอบสนองต่อเชื้อ 49 ไอโซเลท ผลการวิเคราะห์พบว่ามีค่าระหว่าง 0.38 – 0.87 จากผลการทดสอบพบว่าข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวสายพันธุ์ IRBLkh-K3 ที่มียีนต้านทาน *Pikh* และ IRBL7-M ที่มียีนต้านทาน *Pi7(t)* มีค่า RI สูงที่สุดเท่ากัน คือ 0.87 และข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวสายพันธุ์ IRBLz5-CA ที่มียีนต้านทาน *Piz-5* มีค่า RI ต่ำที่สุด คือ 0.38 (ตารางที่ 4.3) ดัชนีความต้านทานของข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว แสดงให้เห็นว่ายีนที่มีศักยภาพต้านทานต่อเชื้อราที่ทดสอบได้มากที่สุด คือ ยีนต้านทาน *Pikh* และ *Pi7(t)* แสดงให้เห็นว่าประชากรเชื้อราที่ทดสอบทั้ง 49 ไอโซเลทนี้ส่วนใหญ่มียีนก่อโรคในกลุ่ม *AVR–Pik* (ภาพที่ 4.2)

จากการปลูกเชื้อ *P. oryzae* ลงบนข้าวพันธุ์ยั้งมองเพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถและไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมอง และทดสอบปฏิกิริยาก่อโรคของเชื้อราบนข้าวที่มียีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้านทานเดี่ยว พบว่าเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง มียีนก่อโรค *AVR–Pi1* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *AVR–Pik* และเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ มียีน *AVR–Pi1* (*AVR–Pik*) เช่นเดียวกัน จึงเลือกศึกษาการแสดงออกของยีน *AVR–Pik* ที่สัมพันธ์กับการก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมอง



ภาพที่ 4.2 เชื้อรา *Pyricularia oryzae* จำนวน 49 ไอโซเลท ที่ก่อโรคไม่รุนแรงหรือไม่ก่อโรค (ระดับคะแนน 0 – 2) บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวจำนวน 31 สายพันธุ์

เมื่อวิเคราะห์ระดับคะแนนและสร้างแผนภาพ Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อแต่ละไอโซเลทด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10p วิเคราะห์ similarity ด้วย SimInt เลือกใช้ Canberra เพื่อวิเคราะห์ค่า coefficient และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วย SAHN (ภาพที่ 4.3) เชื้อแต่ละสายพันธุ์มีรูปแบบของการก่อให้เกิดโรคต่อพันธุ์ข้าวต่างกัน สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 49 ไอโซเลทได้ 2 กลุ่ม คือ

กลุ่ม A พบเชื้อจำนวน 22 ไอโซเลท ได้แก่ NKI2010 47181, RBR55003, LPG61011, UBN61016, THL794, UBN2010 13515, CCO56004, UBN2009 11308, KKN2009 61067, PL2, UBN2010 195171, CCO55002, LPG61004, UDN61008, TAK61002, UBN2010 11351, SRN54002, PLK40.4, THL191, Chiangrai34.1, SRN54005 และ KKN2008 7537 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันเป็นเชื้อที่ก่อโรครุนแรง และสามารถเข้าทำลายข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวได้หลายสายพันธุ์ เชื้อราที่ก่อโรคบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวมากที่สุด และมีค่าดัชนีความรุนแรงมากที่สุดเท่ากับ 0.55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คือ เชื้อราไอโซเลท UBN2010 13515 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้ ซึ่งเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 ที่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง และเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้เช่นเดียวกัน

กลุ่ม B พบเชื้อจำนวน 27 ไอโซเลท ได้แก่ BKK55001, UTI61106, UTI61101, MSN61008, MKM62101, KKN62112, SKN62103, SRN62108, KKN62107, PRE61016, MSN61005, RBR55001, CRI61010, KPT61002, PYO61001, PNB61008, BKK55003, UBN2009 207129, PL1, PL61017, SRN54007, PNB61005, LPG61005, SKN61009, SKN2008 60867, PL61003 และ UBN2010 195167 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันเป็นเชื้อที่ก่อโรคไม่รุนแรงบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว โดยพบว่าเชื้อรากลุ่มที่ไม่ก่อโรคบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวและมีค่าดัชนีความรุนแรงเท่ากับ 0.00 มีจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ BKK55001, RBR55001 และ PL61003 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้

ตารางที่ 4.2 ค่าดัชนีความรุนแรง (Virulence index; VI) ของเชื้อราบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (NILs)

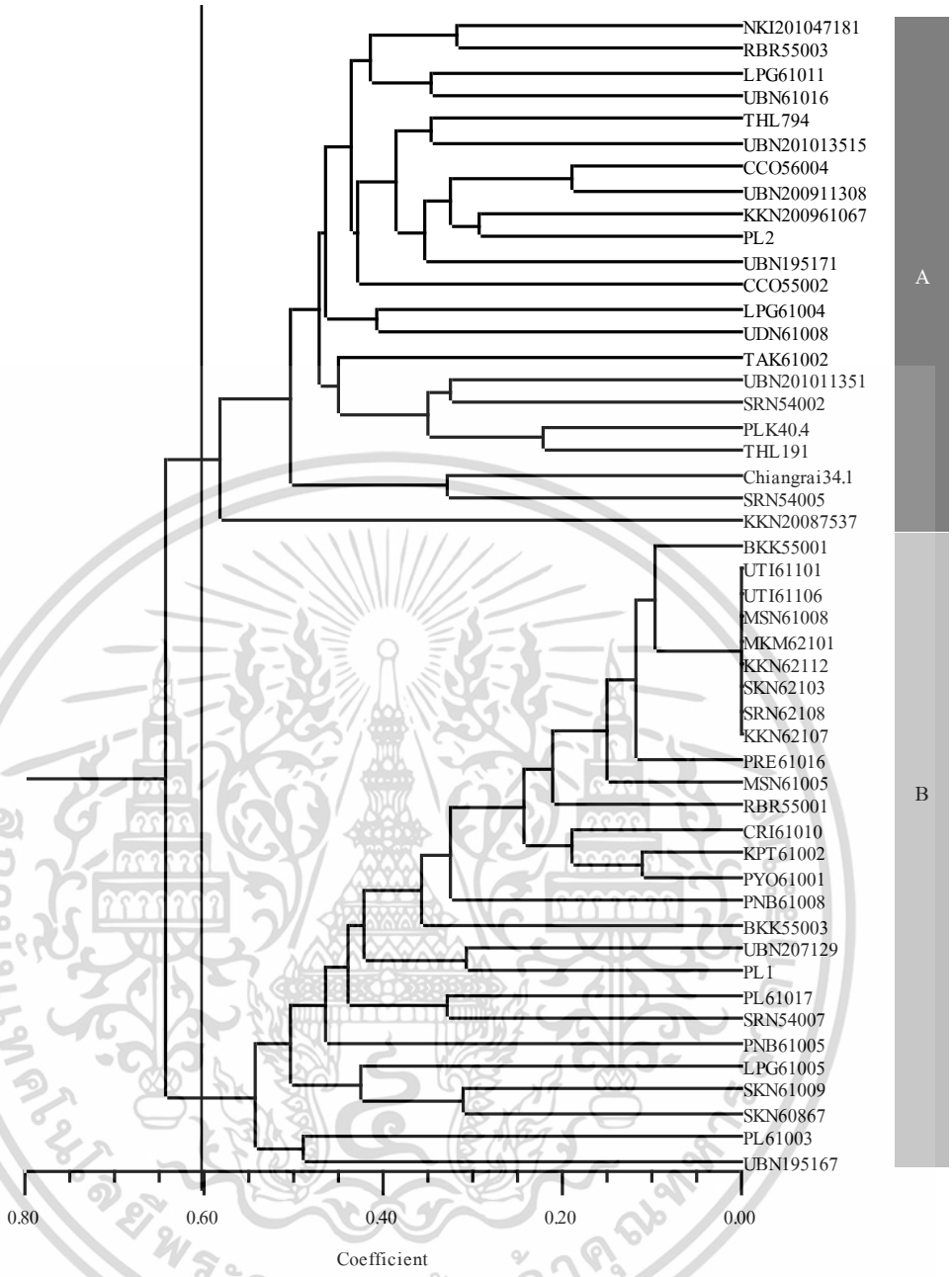
ลำดับที่	ไอโซเลท	VI	ลำดับที่	ไอโซเลท	VI
1	UBN2010 13515	0.55	15	UBN2010 11351	0.10
2	PLK40.4	0.42	16	BKK55003	0.06
3	TAK61002	0.35	17	CCO56004	0.06
4	THL794	0.29	18	KKN2009 61067	0.06
5	LPG61004	0.23	19	LPG61011	0.06
6	CCO55002	0.19	20	PL2	0.06
7	UDN61008	0.19	21	SRN54007	0.06
8	THL191	0.16	22	UBN195167	0.06
9	UBN61016	0.16	23	KKN2008 7537	0.03
10	Chiangrai34.1	0.13	24	SKN61009	0.03
11	PNB61005	0.13	25	SRN54005	0.03
12	PNB61008	0.13	26	BKK55001	0.00
13	RBR55003	0.10	27	PL61003	0.00
14	SRN54002	0.10	28	RBR55001	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ค่าดัชนีความต้านทาน (Resistance index; RI) ของข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (NILs) 31 สายพันธุ์ ต่อเชื้อรา 49 ไอโซเลท

ลำดับที่	NILs	*R* gene	RI	ลำดับที่	NILs	*R* gene	RI
1	IRBLa–A	*Pia*	0.59	17	IRBLsh–B	*Pish*	0.63
2	IRBLa–C	*Pia*	0.46	18	IRBL1–CL	*Pi1*	0.75
3	IRBL1–F5	*Pii*	0.61	19	IRBL3–CP4	*Pi3*	0.55
4	IRBLks–F5	*Piks*	0.55	20	IRBL5–M	*Pi5(t)*	0.71
5	IRBLks–S	*Piks*	0.67	21	IRBL7–M	*Pi7(t)*	0.87
6	IRBLk–Ka	*Pik*	0.77	22	IRBL9–W	*Pi9*	0.77
7	IRBLkp–K60	*Pikp*	0.83	23	IRBL12–M	*Pi12*	0.69
8	IRBLkh–K3	*Pikh*	0.87	24	IRBL19–A	*Pi19*	0.63
9	IRBLz–Fu	*Piz*	0.67	25	IRBLkm–Ts	*Pikm*	0.83
10	IRBLz5–CA	*Piz–5*	0.63	26	IRBL20–IR24	*Pi20*	0.73
11	IRBLzt–T	*Piz–t*	0.67	27	IRBLta2–Pi	*Pita–2*	0.75
12	IRBLta–K1	*Pita*	0.57	28	IRBLta2–Re	*Pita–2*	0.77
13	IRBLta–CT2	*Pita*	0.61	29	IRBLta–CP1	*Pita*	0.69
14	IRBLb–B	*Pib*	0.55	30	IRBL11–Zh	*Pi11*	0.59
15	IRBLt–K59	*Pita*	0.55	31	IRBLz5–CA	*Piz–5*	0.38
16	IRBLsh–S	*Pish*	0.69				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 49 ไอโซเลท ตามรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคเมื่อทดสอบบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10p วิเคราะห์ similarity ด้วย SimInt เลือกใช้ Canberra เพื่อวิเคราะห์ค่า coefficient และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วย SAHN กลุ่ม A คือ เชื้อราจำนวน 22 ไอโซเลท ที่ก่อโรครุนแรงและสามารถเข้าทำลายข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว ได้หลายสายพันธุ์ กลุ่ม B คือ เชื้อราจำนวน 27 ไอโซเลท ที่ก่อโรคไม่รุนแรงบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา *P. oryzae* บนข้าวพันธุ์ยั้งมอง

ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา *P. oryzae* บนข้าวพันธุ์ยั้งมอง รวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานในข้าวด้วยเทคนิค quantitative realtime RT-PCR โดยคัดเลือกเชื้อราที่เป็นตัวแทนในกลุ่มไอโซเลทเชื้อราที่สามารถ และไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมอง ได้แก่ เชื้อราไอโซเลท PLK40.4 ที่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง และเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ ตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากการปลูกเชื้อราลงบนข้าวพันธุ์ยั้งมอง โดยยีนที่ทำการศึกษา มีจำนวน 3 ยีน ได้แก่ 1) ยีน *MoHrip1* ซึ่งเป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน hypersensitive response inducing protein 1 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา และยังมีบทบาทเป็น pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) ไปกระตุ้นให้เกิดกระบวนการต้านทานในข้าว 2) ยีน *AVR – Pik* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา (avirulence gene, *AVR* gene) สังเคราะห์โปรตีน (effector protein) เพื่อไปยับยั้งกระบวนการต้านทานในข้าว และ 3) ยีน *Pik* เป็นยีนต้านทานโรคไหม้ข้าว (resistance gene, *R* gene) ซึ่งเป็นยีนเด่น สังเคราะห์โปรตีนต้านทาน (R protein) เพื่อต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค

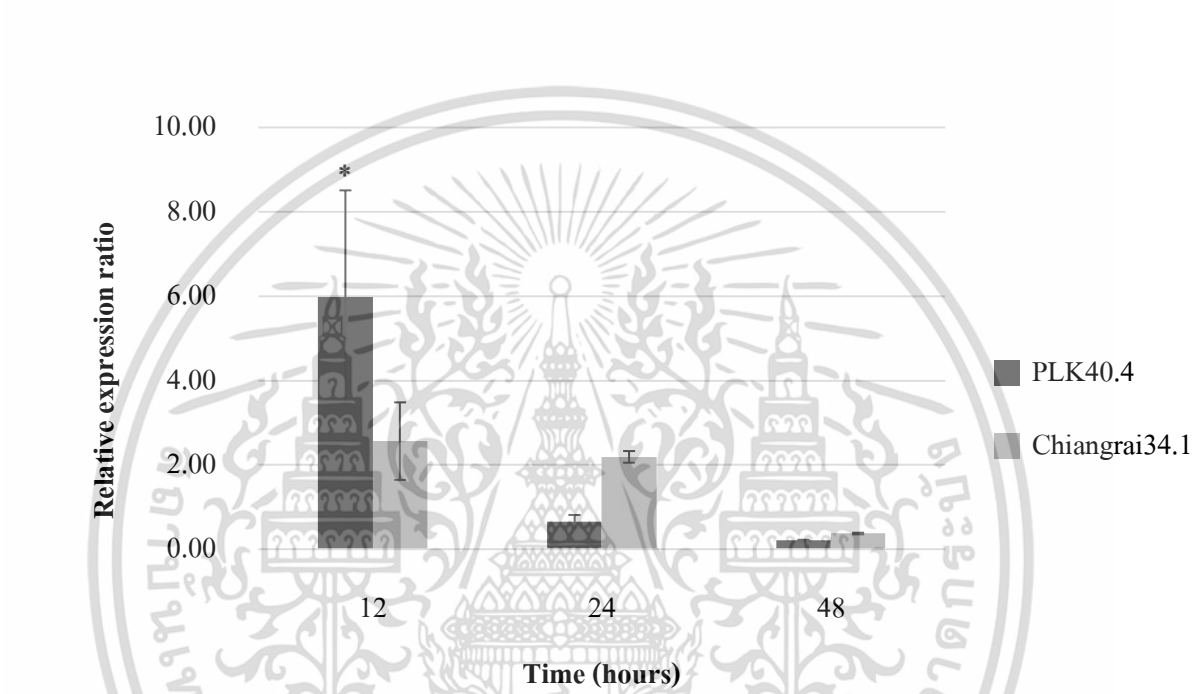
การศึกษาการแสดงออกของยีน *AVR – Pik* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา จากการทดลองพบว่า เชื้อราไอโซเลท PLK40.4 ที่ก่อโรครุนแรงปานกลาง มีการแสดงออกของยีนสูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง และมีการแสดงออกของยีนสูงกว่าเชื้อราไอโซเลท Chiangrai 34.1 ที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมอง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) หลังจากนั้นที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เชื้อราไอโซเลท PLK40.4 มีการแสดงออกของยีนที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง เช่นเดียวกันเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ที่มีการแสดงออกของยีนที่เวลา 12 ชั่วโมง และมีการแสดงออกของยีนที่ลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงที่เวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.4)

การศึกษาการแสดงออกของยีน *MoHrip1* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องการก่อโรคของเชื้อราโดยการสร้างโปรตีน hypersensitive response inducing protein 1 จากการทดลองพบว่า เชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลท มีการแสดงออกของยีนที่เวลา 12 ชั่วโมง และมีการแสดงออกอย่างต่อเนื่องไปจนถึงเวลา 24 ชั่วโมง โดยที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อราไอโซเลท PLK40.4 ที่ก่อโรครุนแรงปานกลาง มีการแสดงออกของยีนสูงกว่าเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) หลังจากนั้นที่เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อราไอโซเลท PLK40.4 และ เชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 มีการแสดงออกของยีนที่ลดลง (ภาพที่ 4.5)

การศึกษาการแสดงออกของยีน *Pik* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานในข้าว จากการทดลองพบว่า ในข้าวพันธุ์ยั้งมองที่ปลูกเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ที่ไม่สามารถก่อโรคบน

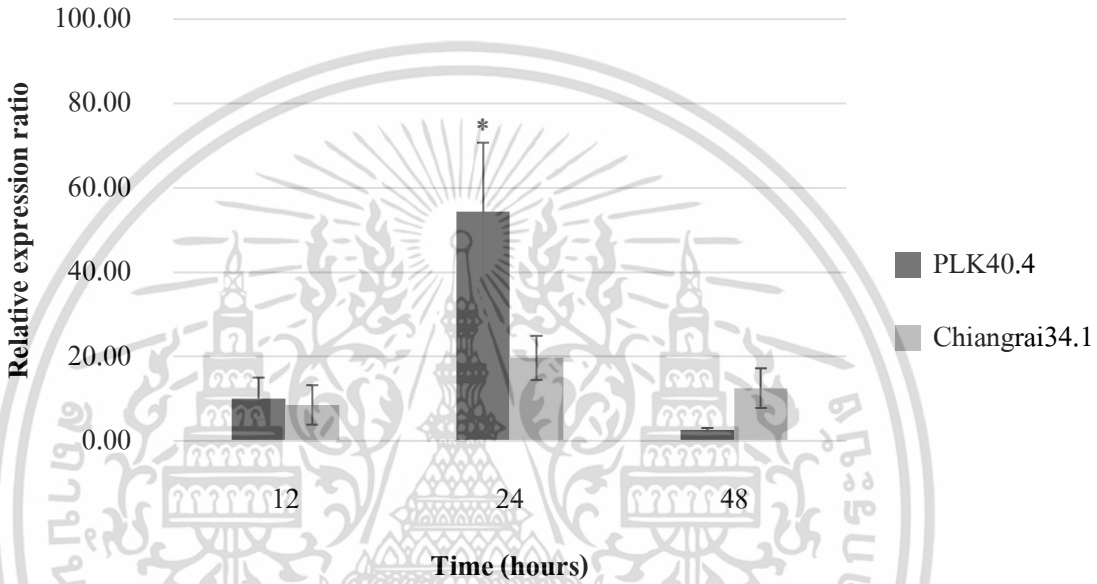
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้าวพันธุ์ยั้งมองมีการแสดงออกของยีนที่เวลา 12 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อรา และมีการแสดงออกอย่างต่อเนื่องไปจนถึงที่เวลา 48 ชั่วโมง ในขณะที่ข้าวพันธุ์ยั้งมองที่ปลูกด้วยเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 ที่ก่อโรครุนแรงปานกลาง ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ไม่มีการยกระดับการแสดงออกของยีน แต่พบการยกระดับแสดงออกของยีนที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยพบว่าการแสดงออกของยีนที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังจากการปลูกเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 และไอโซเลท Chiangrai34.1 มีการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) (ภาพที่ 4.6)



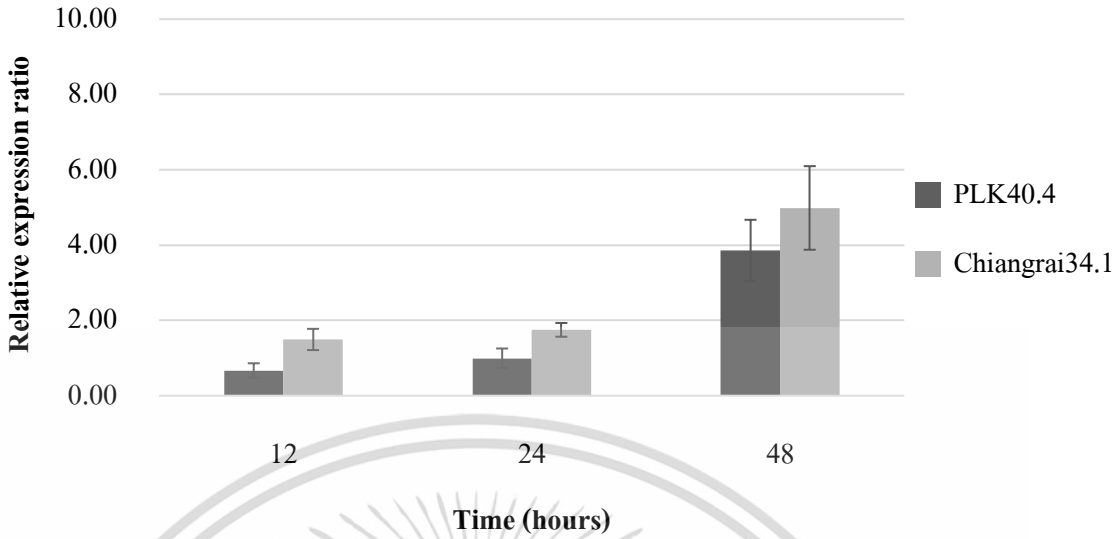
ภาพที่ 4.4 ระดับการแสดงออกของยีน *AVR – Pik* ในข้าวพันธุ์ยั้งมองหลังจากการปลูกเชื้อรา *P. oryzae* ไอโซเลท PLK40.4 ที่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง และเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ ที่เวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ด้วยวิธี quantitative realtime RT-PCR ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนสัมพันธ์กับยีน *MGG_40S* สัญลักษณ์ * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) ระหว่างเชื้อ 2 ไอโซเลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 ระดับการแสดงออกของยีน *MoHrip1* ในข้าวพันธุ์ยั้งมองหลังจากการปลูกเชื้อรา *P. oryzae* ไอโซเลท PLK40.4 ที่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง และเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ ที่เวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ด้วยวิธี quantitative realtime RT-PCR ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนสัมพันธ์กับยีน *MGG_40S* สัญลักษณ์ * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) ระหว่างเชื้อ 2 ไอโซเลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ระดับการแสดงออกของยีน *Pik* ในข้าวพันธุ์ยั้งมองหลังจากการปลูกเชื้อรา *P. oryzae* ไอโซเลท PLK40.4 ที่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง และเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ ที่เวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ด้วยวิธี quantitative realtime RT-PCR ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนสัมพันธ์กับยีน *Actin1*

4.5. การศึกษาชนิดของสารทุติยภูมิที่สังเคราะห์โดยเชื้อรา *P. oryzae*

วิเคราะห์สารทุติยภูมิที่สังเคราะห์โดยเชื้อรา *P. oryzae* ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC–MS) สารที่ถูกแยกด้วยคอลัมน์จะถูกทำให้แตกตัวเป็นไอออนด้วยเทคนิค Electrospray ionization (ESI) วิเคราะห์สารที่ได้โดยการเปรียบเทียบความเหมือนของสารที่ได้กับฐานข้อมูล Library METLIN database จะทำให้ทราบน้ำหนักโมเลกุลและโครงสร้างทางเคมีของสารเพื่อเป็นการยืนยันชนิดของสารที่เชื้อราสังเคราะห์ได้

ศึกษาสารทุติยภูมิของเชื้อรา 2 ไอโซเลท คือ เชื้อราไอโซเลท PLK40.4 ที่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง และเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ โดยหลังจากนำอาหารเลี้ยงเชื้อราไปสกัดด้วยเอทิลอะซีเตต ได้ปริมาณสารสกัดหยาบจากอาหารเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 เท่ากับ 15.3 มิลลิกรัม และไอโซเลท Chiangrai34.1 เท่ากับ 25.9 มิลลิกรัม

ผลการวิเคราะห์สารทุติยภูมิพบสาร picolinic acid และสาร tenuazonic acid (ตารางที่ 4.4) เมื่อวิเคราะห์สารที่สกัดจากเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 และเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 หลังจากที่สารถูกแยกด้วยคอลัมน์สารจะถูกทำให้กลายเป็นไอออน จากนั้นวิเคราะห์ไอออนในโหมดไอออน

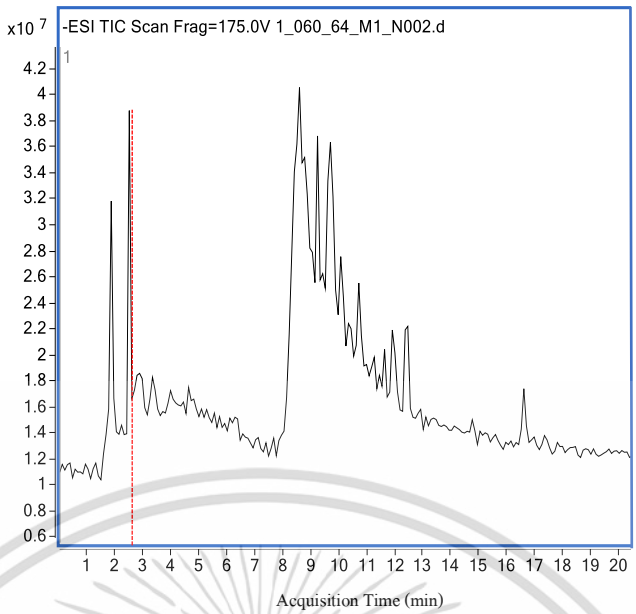
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บวกและไอออนลบ การใช้โหมดไอออนบวกในการวิเคราะห์ไม่พบสารทุติยภูมิที่เกี่ยวกับการก่อโรคไหม้ข้าว และการใช้โหมดไอออนลบในการวิเคราะห์สารสกัดหยาบจากเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 พบสารทุติยภูมิที่เกี่ยวกับการก่อโรคไหม้ข้าว คือ สาร picolinic acid ที่นาทีที่ 1.823 มีสูตรเคมี คือ $C_6H_5NO_2$ ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไพริดีนคาร์บอกซิลลิค (Pyridine carboxylic acids) มีหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) อยู่ที่ตำแหน่งที่ 2 (ภาพที่ 4.7 และ ภาพที่ 4.8) และเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 พบสารทุติยภูมิที่เกี่ยวกับการก่อโรคไหม้ข้าวและมีรายงานความสามารถยับยั้งการเจริญของต้นกล้าข้าวได้ คือ สาร tenuazonic acid ที่นาทีที่ 9.144 เมื่อวิเคราะห์ในโหมดไอออนบวก มีสูตรเคมี คือ $C_{10}H_{15}NO_3$ อยู่ในกลุ่มของสารประกอบที่เรียกว่า pyrroline ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีวงแหวนไพโรลีน (pyrroline ring) ส่วนการใช้โหมดไอออนลบในการวิเคราะห์ไม่พบสารทุติยภูมิที่เกี่ยวกับการก่อโรคไหม้ข้าว (ภาพที่ 4.9 และ ภาพที่ 4.10)

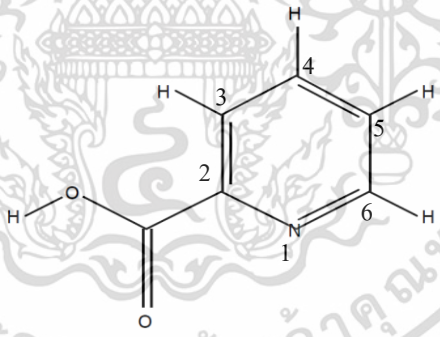
ตารางที่ 4.4 สารทุติยภูมิที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 และเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC–MS

Isolates	Compound Identification	Formula	Mass	RT (min.)
PLK40.4	Picolinic acid	$C_6 H_5 NO_2$	123.0323	1.823
Chiangrai34.1	Tenuazonic acid	$C_{10} H_{15} NO_3$	197.1051	9.144

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

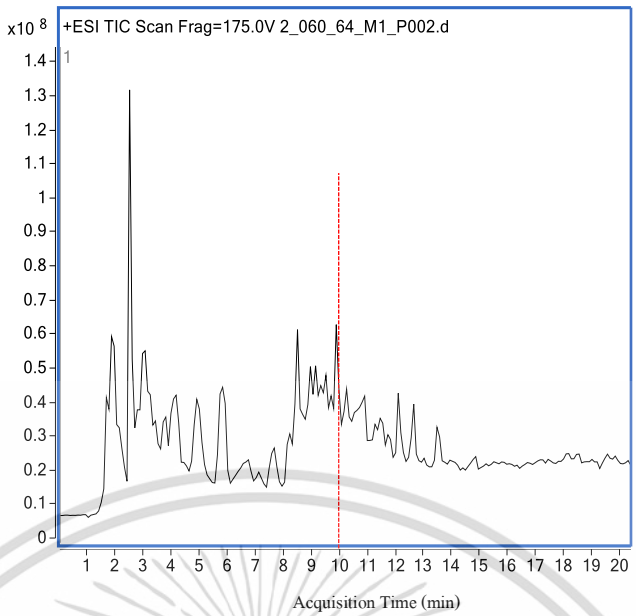


ภาพที่ 4.7 โครมาโทรแกรมของสารทุติยภูมิของเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC–MS พบสาร picolinic acid ที่นาทีที่ 1.823 (เส้นประสีแดง)

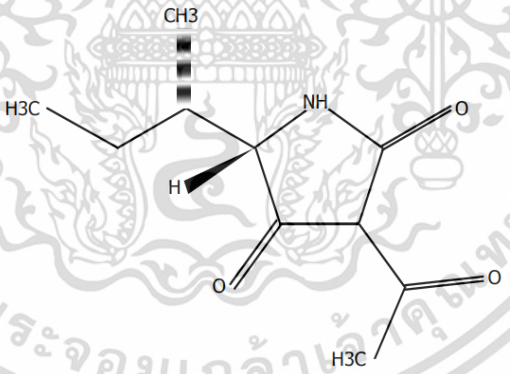


ภาพที่ 4.8 โครงสร้างของสาร picolinic acid ที่ตรวจพบในสารสกัดจากเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC–MS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 โครมาโทรแกรมของสารทุติยภูมิของเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC–MS พบสาร tenuazonic acid ที่นาทีที่ 9.144 (เส้นประสีแดง)



ภาพที่ 4.10 โครงสร้างของสาร tenuazonic acid ที่ตรวจพบในสารสกัดจากเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC–MS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การปลูกเชื้อ *P. oryzae* ที่รวบรวมได้ลงบนข้าวพันธุ์ยั้งมองเพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถและไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมอง

จากผลการปลูกเชื้อที่รวบรวมได้บนข้าวพันธุ์ยั้งมองของเชื้อราจำนวน 49 ไอโซเลท นำมาตรวจสอบความสามารถในการก่อโรคไหม้ พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 45 ไอโซเลท ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ และพบเชื้อราจำนวน 4 ไอโซเลท ที่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง คือ SKN2008 60867, UBN2010 196171, RBR55003 และ PLK40.4 ในขณะที่ไม่พบเชื้อราที่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับรุนแรง จะเห็นได้ว่าข้าวพันธุ์ยั้งมองเป็นข้าวที่มีลักษณะความต้านทานแบบกว้างต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ เนื่องจากสามารถต้านทานเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลท ตามรายงานของ Salih *et al.* (2013) ที่ตรวจสอบความต้านทานโรคไหม้พันธุ์ข้าวของไทยจำนวน 311 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นข้าวพื้นเมืองจำนวน 263 ตัวอย่าง ข้าวที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์แล้วจำนวน 43 ตัวอย่าง และข้าวป่าจำนวน 5 ตัวอย่าง โดยปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 29 ไอโซเลท ผลการตรวจสอบพบพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 35 สายพันธุ์ แบ่งเป็นข้าวพื้นเมือง 25 สายพันธุ์ ข้าวที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์จำนวน 9 สายพันธุ์ และข้าวป่าจำนวน 1 สายพันธุ์ โดยข้าวพันธุ์ยั้งมองเป็นหนึ่งในข้าวพื้นเมืองที่ต้านทานโรคไหม้ได้ในระดับดี

ผลการทดสอบการก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองที่ได้จากงานวิจัยนี้แตกต่างจากรายงานของศิริพร (2560) ที่ได้ศึกษาการก่อโรคไหม้ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 13 ไอโซเลท บนข้าวพันธุ์ยั้งมอง โดยปลูกเชื้อราลงบนข้าวพันธุ์ยั้งมอง และประเมินการเกิดโรคไหม้หลังการปลูกเชื้อ 7 วัน จากรายงานดังกล่าว พบว่าเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 และ UBN195167 สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับรุนแรง เชื้อราไอโซเลท BKK55001, BKK55003, Chiangrai34.1, CC055002, SRN54002, SRN54005, THL191 และ UBN11351 สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง และเชื้อราไอโซเลท RBR55002, PL1 และ PL2 ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ โดยงานวิจัยนี้พบว่าเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง และเชื้อราไอโซเลท UBN195167, BKK55001, BKK55003, Chiangrai34.1, CC055002, SRN54002, SRN54005, THL191 และ UBN11351 ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 การปลูกเชื้อ *P. oryzae* บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (Near Isogenic Lines ; NILs) เพื่อระบุยีนก่อโรคของเชื้อรา

การทดสอบปฏิกิริยาก่อโรคของเชื้อรา 49 ไอโซเลท บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว 31 สายพันธุ์ พบว่ามีค่า VI อยู่ระหว่าง 0 – 0.55 ในจำนวนเชื้อราที่ทดสอบทั้งหมด เชื้อราไอโซเลท UBN2010 13515 ซึ่งเป็นไอโซเลทที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ มีค่า VI คือ 0.55 ค่าดัชนีความรุนแรงของเชื้อราที่ก่อโรคบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวมากที่สุดของเชื้อราไอโซเลท UBN2010 13515 แสดงให้เห็นว่าเป็นเชื้อที่มีความรุนแรงสามารถเข้าทำลายข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวได้หลายสายพันธุ์แต่ไม่สามารถเข้าทำลายข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ และจากผลการทดสอบบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว สามารถระบุยีนก่อโรคในเชื้อราไอโซเลท UBN2010 13515 ได้ 8 ยีน ได้แก่ ยีน *AVR–Piks, AVR–Pikp, AVR–Pikh, AVR–Pish, AVR–Pi7(t), AVR–Pikm, AVR–Pi20* และ *AVR–Pita* ซึ่งแสดงว่าข้าวพันธุ์ยั้งมองอาจมีโปรตีนที่เป็นผลผลิตของยีนต้านทาน (resistance gene; *R* gene) ที่สามารถจดจำและเกิดปฏิสัมพันธ์ที่เข้ากันได้กับโปรตีนที่เป็นผลผลิตของยีนก่อโรค (avirulence genes; *AVR* gene) ของเชื้อราจึงทำให้ไม่เกิดโรค

การวิเคราะห์ค่าดัชนีความต้านทาน (Resistance Index; RI) ของข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว พบว่าข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวสายพันธุ์ IRBLkh-K3 ที่มียีนต้านทาน *Pikh* และ IRBL7-M ที่มียีนต้านทาน *Pi7(t)* มีค่า RI สูงที่สุดเท่ากัน คือ 0.84 และข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวสายพันธุ์ IRBLz5-CA ที่มียีนต้านทาน *Piz-5* มีค่า RI ต่ำที่สุดคือ 0.32 โดยดัชนีความต้านทานของข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวชี้ให้เห็นว่ายีนที่มีศักยภาพต้านทานต่อเชื้อราที่ทดสอบได้มากที่สุด คือ ยีนต้านทาน *Pikh* และ *Pi7(t)* จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อราที่ทดสอบทั้ง 49 ไอโซเลทส่วนใหญ่มียีนก่อโรคในกลุ่ม *AVR–Pik* ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกับงานวิจัยของ Parinthawong and Tansian (2020) ที่รายงานการสำรวจเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ จากภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันตก และภาคใต้ของประเทศไทย พบว่าประชากรเชื้อราที่ทดสอบจำนวน 50 ไอโซเลท ส่วนใหญ่มียีนก่อโรคในกลุ่ม *AVR–Pik* (*AVR–Pikp, AVR–Pikh, AVR–Pikm, AVR–Pi7(t)*) และ *AVR–Pita-2* โดย 94 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อราที่แยกมาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือมียีน *AVR–Pikp* และ *AVR–Pi7(t)* และงานวิจัยของ Imam *et al.* (2015) ได้ตรวจสอบยีนก่อโรคของเชื้อราจำนวน 63 ไอโซเลท ในประเทศอินเดีย พบว่าเชื้อราทุกไอโซเลทมียีนก่อโรค *AVR–Pik* และ *AVR–Pizt* ส่วนยีนที่พบน้อยที่สุด คือ *AVR–CO3* และ Lopez *et al.* (2019) ได้รวบรวมและตรวจสอบยีนก่อโรคเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศฟิลิปปินส์จำนวน 164 ไอโซเลท ยีนก่อโรคที่พบในเชื้อรามากที่สุด คือ *AVR–Pik* (81.50%) *AVR–Pita* (64.16%) และ *AVR–Pii* (47.98%) และยีนก่อโรคที่พบน้อย คือ *AVR–Pizt* (19.08%) และ *AVR–Pia* (5.20%) แสดงให้เห็นว่ายีนก่อโรคที่พบในประชากรเชื้อราที่ทดสอบส่วนใหญ่ คือ กลุ่มยีน *AVR–Pik* และมีบทบาทในการก่อโรคไหม้ในพื้นที่ต่างๆ ที่มีการปลูกข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดสอบปฏิกิริยาก่อโรคของเชื้อราไอโซเลทที่สามารถและไม่สามารถก่อโรคไหม้บนข้าวพันธุ์ยั้งมอง บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวจำนวน 31 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 ที่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง มียีนก่อโรค *AVR–Pi1* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *AVR–Pik* และเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้มียีนก่อโรค *AVR–Pi1* (*AVR–Pik*) เช่นเดียวกัน แต่ความสามารถในการก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองแตกต่างกัน ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราแต่ละไอโซเลทไม่ได้ขึ้นอยู่กับยีนก่อโรคเพียงอย่างเดียวแต่อาจมียีนอื่นๆ ที่มีอิทธิพลต่อการเกิดโรคได้นอกเหนือไปจากยีน *AVR–Pik* ในขณะที่เชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้อาจเป็นเพราะโปรตีนที่เป็นผลผลิตจากยีนก่อโรค *AVR–Pik* เกิดปฏิสัมพันธ์ที่เข้ากันได้กับโปรตีนที่เป็นผลผลิตจาก *R* gene ในข้าวพันธุ์ยั้งมอง จึงส่งผลให้ข้าวสามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคเป็นซึ่งไปตามทฤษฎี gene for gene ของ Flor (1971)

5.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา *P. oryzae* บนข้าวพันธุ์ยั้งมอง

ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา *P. oryzae* บนข้าวพันธุ์ยั้งมอง รวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานในข้าวด้วยเทคนิค quantitative realtime RT-PCR ของเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 ที่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง และเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ ตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากการปลูกเชื้อราลงบนข้าวพันธุ์ยั้งมอง

ผลศึกษาการแสดงออกของยีน *AVR–Pik* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา จากการทดลองพบว่า เชื้อราไอโซเลท PLK40.4 มีการแสดงออกของยีนสูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง และมีการแสดงออกของยีนสูงกว่าเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน *AVR–Pik* อาจเป็นปัจจัยที่สำคัญกับความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 จากรายงานของ Parinthawong and Tansian (2020) ที่สำรวจเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จากภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ของประเทศไทย พบว่าประชากรเชื้อราที่ทดสอบจำนวน 50 ไอโซเลท ส่วนใหญ่มียีนก่อโรค *AVR–Pik* แสดงให้เห็นว่ายีนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pik* มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคไหม้ข้าว โดยเชื้อราที่มียีนก่อโรค *AVR–Pik* แต่สามารถก่อโรคบนข้าวที่มียีนต้านทาน *Pik* ได้ อาจเกิดจากเชื้อรามีการปรับตัวเพื่อให้สามารถเข้าทำลายข้าวที่มียีนต้านทานได้ โดย Yoshida *et al.* (2009) รายงานว่าลำดับดีเอ็นเอของ *AVR–Pik* มีความแปรปรวนสูง และพบว่าเชื้อราในประเทศไทยที่มียีนก่อโรค *AVR–Pik* ความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (Longya *et al.* 2019) จากงานวิจัยของ Kanzaki *et al.* (2012) ศึกษาการแสดงออกของยีนก่อโรค *AVR–Pik–A* ในเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ ตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เวลา 24 และ 40 ชั่วโมง ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิค Quantitative RT-PCR พบว่าที่ 24 ชั่วโมงหลังจากการปลูกเชื้อ มีการแสดงออกของยีน *AVR–Pik-A* สูงที่สุด

การศึกษาการแสดงออกของยีน *MoHrip1* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องการก่อโรคของเชื้อราโดยการสังเคราะห์โปรตีน hypersensitive response inducing protein 1 จากการทดลองพบว่า เชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลท มีการแสดงออกของยีนที่เวลา 12 ชั่วโมง และมีการแสดงออกอย่างต่อเนื่องไปจนถึงเวลา 24 ชั่วโมง โดยที่เวลา 24 ชั่วโมง เชื้อราไอโซเลท PLK40.4 ที่ก่อโรครุนแรงปานกลาง มีการแสดงออกของยีนสูงกว่าเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมอง จากการทดลองของ Nie *et al.* (2019) ที่ได้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *MoHrip1* พบว่าเชื้อ *P. oryzae* มีการแสดงออกของยีน *MoHrip1* สูงสุดที่เวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมงหลังจากการปลูกเชื้อ และหลังจากนั้นมีการแสดงออกลดลงตามลำดับ และข้าวที่ถูกเชื้อรา *P. oryzae* ที่มียีน *MoHrip1* เข้าทำลายจะมีความรุนแรงของโรคสูงกว่าเชื้อที่ถูกทำให้ยีน *MoHrip1* กลายพันธุ์ (mutant) โดยเชื้อรา *P. oryzae* ที่มียีน *MoHrip1* จะไปยับยั้งการแสดงออกของยีน *PBZ1, PAL* และ *PR1a* ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองในข้าว แสดงให้เห็นว่ายีน *MoHrip1* อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ใช้ในการก่อโรคของเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 โดยยีน *MoHrip1* อาจมีการผลิตโปรตีนไปยับยั้งกระบวนการป้องกันตัวเองในข้าวจึงสามารถก่อให้เกิดโรคบนข้าวได้

การศึกษาการแสดงออกของยีน *Pik* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคไหม้ในข้าว จากการทดลองพบว่า ข้าวพันธุ์ยั้งมองที่ปลูกเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 มีการแสดงออกของยีนที่เวลา 12 ชั่วโมง หลังการปลูกเชื้อรา และมีการแสดงออกอย่างต่อเนื่องไปจนถึงที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยมีการแสดงออกสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าข้าวมีการสังเคราะห์ยีนต้านทาน *Pik* อย่างต่อเนื่องในขณะที่เชื้อราเข้าทำลายข้าว จึงทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ได้ ในขณะที่ข้าวพันธุ์ยั้งมองที่ปลูกเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากการปลูกเชื้อ ไม่มีการยกระดับการแสดงออกของยีน จึงอาจเป็นปัจจัยที่ทำให้เชื้อราไอโซเลท PLK40.4 สามารถก่อโรคได้ จากงานวิจัยของ Kanzaki *et al.* (2012) รายงานว่าเมื่อปลูกเชื้อที่มียีน *AVR-PikA* ลงบนข้าวที่มียีนต้านทาน *Pik* พบว่าสามารถก่อโรคไหม้ได้ในระดับรุนแรงปานกลาง ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่าเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 อาจมียีนก่อโรค *AVR-PikA* จึงทำให้สามารถก่อโรครุนแรงปานกลางได้บนข้าวพันธุ์ยั้งมอง แต่ในงานวิจัยนี้ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 มียีนก่อโรค *AVR-PikA* หรือไม่ และการก่อโรคของเชื้อราอาจจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น เชื้อรามีการสังเคราะห์โปรตีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคไปยับยั้งกระบวนการต้านทานโรคจึงทำให้เชื้อราสามารถก่อโรคบนข้าวได้ เนื่องจากเชื้อราอาจมียีนก่อโรคมากกว่า 1 ยีน จากรายงานของ Selisana *et al.* (2017) ได้ตรวจสอบยีนก่อโรคในเชื้อรา *P. oryzae* พบว่าเชื้อราไอโซเลท 5167-1 มียีน *AVR–Pik, AVR–Pizt* และ *AVR–Pi9* และเชื้อรา *P. oryzae* ยังมีความแปรปรวนสูงสามารถปรับตัวเข้าทำลายข้าวที่มียีนต้านทานในระยะเวลารวดเร็ว จากรายงานของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mekwatanakarn *et al.* (2000) ได้มีการศึกษาประชากรเชื้อโรคไหม้ในประเทศไทย พบว่าเชื้อโรคไหม้ในประเทศไทยมีความแปรปรวนและหลากหลายมากกว่าแหล่งปลูกข้าวอื่นๆ ของโลก เชื้อรามีความสามารถในการก่อโรคแตกต่างกันไปตามระยะการเจริญเติบโตของข้าว แหล่งปลูกข้าว และฤดูปลูก ส่งผลให้เชื้อรามีการปรับตัวได้อย่างรวดเร็วในการเข้าทำลายข้าว เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่มียีน *AVR-Pik* ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 113 กรดอะมิโน พบตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 46 47 48 67 และ 78 ส่งผลให้กรดอะมิโนของยีน *AVR-Pik* เปลี่ยนไปทำให้ยีน *AVR-Pik* มีรูปแบบของแอลลีลแตกต่างกันคือ *AVR-PikA, AVR-PikB, AVR-PikC, AVR-PikD, AVR-PikE* และ *AVR-PikF* (Yoshida *et al*. 2009) จากรายงานของ Longya *et al.* (2019) พบว่าเชื้อรา *P. oryzae* ในประเทศไทยมียีนก่อโรค *AVR-PikA, AVR-PikD* และ *AVR-PikE* และพบ *AVR-PikF* ซึ่งเป็นแอลลีลที่พบครั้งแรกในประเทศไทย แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *P. oryzae* ในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *AVR-Pik* สูง

5.4 การศึกษาชนิดของสารทุติยภูมิที่สังเคราะห์โดยเชื้อรา *P. oryzae*

ผลการวิเคราะห์สารทุติยภูมิของเชื้อรา *P. oryzae* ด้วยเทคนิค Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC–MS) พบว่าเชื้อรา *P. oryzae* มีการสังเคราะห์และปลดปล่อยสารที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคไหม้ ได้แก่ picolinic acid และ tenuazonic acid โดยมีรายงานว่าสาร picolinic acid และ สาร tenuazonic acid เป็นสารที่เชื้อราสังเคราะห์ในระหว่างขบวนการเข้าทำลายข้าว และเกี่ยวข้องกับความสามารถในการทำให้เกิดโรคไหม้ในข้าว (Narayana and Suryanarayanan. 1974)

งานวิจัยนี้ศึกษาชนิดของสารทุติยภูมิที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 ที่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง และเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ โดยพบว่าเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลท มีการสังเคราะห์สารที่แตกต่างกัน เชื้อราไอโซเลท PLK40.4 สังเคราะห์สาร picolinic acid โดย Pooja and Katoch. (2014) รายงานว่าสาร picolinic acid ที่สังเคราะห์โดยเชื้อรา *P. oryzae* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวและมีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดอาการโรคไหม้บนข้าวได้ จากงานวิจัยของ Lokeshwari and Suryanarayanan (1992) ทดสอบสารพิษจากเชื้อรา *P. oryzae* โดยหยดสาร picolinic acid ลงบนใบข้าวพบว่าสามารถก่อให้เกิดแผลโรคไหม้ได้เมื่อเปรียบเทียบกับใบข้าวที่ไม่ได้หยดสาร picolinic acid และ Domiciano *et al.* (2020) รายงานว่าใบข้าวที่ฉีดพ่นด้วย picolinic acid ปรากฏอาการแผลโรคไหม้ที่เหมือนกับแผลที่เกิดจากการปลูกเชื้อด้วยเชื้อรา *P. oryzae* โดยงานวิจัยนี้เชื้อราไอโซเลท PLK40.4 สังเคราะห์สาร picolinic acid สารนี้จึงอาจเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้เชื้อราไอโซเลท PLK40.4 สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับรุนแรงปานกลาง ในขณะที่เชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 สังเคราะห์สาร tenuazonic acid แต่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้อาจเป็นเพราะเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 มีการสังเคราะห์สาร tenuazonic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

acid ในปริมาณที่น้อยเกินกว่าจะสามารถก่อให้เกิดโรคได้ โดยเชื้อราแต่ละไอโซเลทสร้างสารพิษได้แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณซึ่งความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารพิษที่เชื้อราปล่อยออกมา (Wang *et al.* 1988) จากงานวิจัยของ ณรงค์ และคณะ (2538) รายงานว่าเชื้อราสาเหตุโรคไหม้มีการสังเคราะห์สาร tenuazonic acid และเมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษบนใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่าสาร tenuazonic acid สามารถก่อให้เกิดแผลโรคไหม้ได้ เมื่อใช้ความเข้มข้นของสาร tenuazonic acid เพิ่มขึ้นขนาดของแผลจะเพิ่มขึ้นอีกด้วย อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ไม่ได้ทำการตรวจสอบปริมาณสาร tenuazonic acid ที่เชื้อราสังเคราะห์ขึ้นในระหว่างการเข้าทำลายข้าวจึงยังไม่สามารถระบุได้ชัดเจนว่าการที่เชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้เกี่ยวข้องกับปริมาณของสารที่สังเคราะห์ขึ้นหรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการสำรวจและรวบรวมเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ในประเทศไทย ได้เชื้อราจำนวน 49 ไอโซเลท เป็นเชื้อราที่ได้รับความอนุเคราะห์จำนวน 25 ไอโซเลท และเชื้อราที่เก็บรวบรวมใหม่ในการทดลองนี้จำนวน 24 ไอโซเลท

ผลการศึกษาการปลูกเชื้อ *P. oryzae* ที่รวบรวมได้จำนวน 49 ไอโซเลท ลงบนข้าวสายพันธุ์ยั้งมองเพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถและไม่สามารถก่อโรคบนข้าวสายพันธุ์ยั้งมอง มีเชื้อราจำนวน 4 ไอโซเลท สามารถก่อโรคบนข้าวสายพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง คือ เชื้อราไอโซเลท SKN2008 60867, UBN2010 195171, RBR55003 และ PLK40.4 เชื้อราจำนวน 45 ไอโซเลท ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวสายพันธุ์ยั้งมองได้ และไม่พบเชื้อราที่สามารถก่อโรคบนข้าวสายพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับรุนแรง

ผลการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว เพื่อระบุยีนก่อโรคของเชื้อราจำนวน 49 ไอโซเลท จากปฏิสัมพันธ์ระหว่าง *AVR* gene ของเชื้อรา และ *R* gene ของข้าว ยีนก่อโรคที่พบมากที่สุดในประชากรเชื้อราที่ทดสอบทั้ง 49 ไอโซเลท คือ ยีนก่อโรคในกลุ่ม *AVR–Pik* จากการคำนวนค่าดัชนีความต้านทาน (Resistance Index; RI) ของข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวแต่ละสายพันธุ์ พบว่ามีค่า RI อยู่ระหว่าง 0.38 – 0.87 โดยข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวสายพันธุ์ IRBLkh-K3 ที่มียีนต้านทาน *Pikh* และข้าวสายพันธุ์ IRBL7-M ที่มียีนต้านทาน *Pi7(t)* มีค่า RI สูงที่สุดเท่ากัน คือ 0.87 และข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวสายพันธุ์ IRBLz5-CA ที่มียีนต้านทาน *Piz-5* มีค่า RI ต่ำที่สุดคือ 0.38 แสดงให้เห็นว่ายีนที่มีศักยภาพต้านทานต่อเชื้อราที่ทดสอบได้มากที่สุด คือ ยีนต้านทาน *Pikh* และ *Pi7(t)* และแสดงว่าเชื้อราที่ทดสอบส่วนใหญ่มียีนก่อโรคในกลุ่ม *AVR–Pik* ค่าดัชนีความรุนแรง (Virulence Index ; VI) ของเชื้อรา 49 ไอโซเลท อยู่ระหว่าง 0 ถึง 0.55 ในจำนวนเชื้อราที่ทดสอบทั้งหมด พบว่าเชื้อราไอโซเลท UBN2010 13515 มีค่าดัชนีความรุนแรงมากที่สุด คือ 0.55 ซึ่งสามารถเข้าทำลายข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวได้หลายพันธุ์ แต่ไม่สามารถเข้าทำลายข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ จากผลการทดลองพบว่าเชื้อราไอโซเลท UBN2010 13515 มียีนก่อโรค *AVR–Piks, AVR–Pikp, AVR–Pikh, AVR–Pish, AVR–Pi7(t), AVR–Pikm, AVR–Pi20* และ *AVR–Pita*

ผลศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา *P. oryzae* บนข้าวพันธุ์ยั้งมองของเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 ที่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับปานกลาง และเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ที่ไม่สามารถก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้ และยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวเองในข้าว ด้วยวิธี quantitative realtime RT-PCR เมื่อเปรียบเทียบแสดงออกของยีน *AVR–Pik* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา ระหว่างเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลท Chiangrai34.1 พบว่าเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 มีการแสดงออกของยีน *AVR–Pik* และยีน *MoHrip1* สูงกว่าเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ที่เวลา 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ จึงอาจเป็นปัจจัยที่ทำให้เชื้อราไอโซเลท PLK40.4 สามารถก่อโรคได้บนข้าวพันธุ์ยั้งมองได้มากกว่าเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1

สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pik* พบว่าข้าวพันธุ์ยั้งมองที่ปลูกเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 มีการแสดงออกของยีนที่เวลา 12 ชั่วโมง และมีการแสดงออกอย่างต่อเนื่องไปจนถึงที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยการแสดงออกของยีน *Pik* นี้อาจเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 ได้ ในขณะที่ข้าวพันธุ์ยั้งมองที่ปลูกเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากการปลูกเชื้อ ไม่มีการยกระดับการแสดงออกของยีน จึงอาจทำให้เชื้อราไอโซเลท PLK40.4 สามารถก่อโรคได้

ผลการศึกษาชนิดของสารทุติยภูมิที่สังเคราะห์โดยเชื้อรา *P. oryzae* ทั้งสองไอโซเลท ในสารที่สกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 พบสาร picolinic acid เป็นสารทุติยภูมิที่เกี่ยวกับการก่อโรคไหม้ข้าว และเชื้อราไอโซเลท Chiangrai34.1 พบสาร tenuazonic acid เป็นสารทุติยภูมิที่เกี่ยวกับการก่อโรคไหม้ข้าวและสามารถยับยั้งการเจริญของต้นกล้าข้าวได้ แสดงให้เห็นว่าเมื่อเชื้อรา *P. oryzae* เข้าทำลายข้าว เชื้อราจะมีการสังเคราะห์สารที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคเพื่อทำลายเซลล์ข้าวและทำให้เกิดอาการของโรคไหม้ได้

ข้อเสนอแนะ

1. ข้าวพันธุ์ยั้งมองเป็นข้าวที่สามารถต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลท จึงควรมีการอนุรักษ์ไว้เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้ในอนาคต

2. ข้อมูลการประเมินความสามารถในการก่อโรค การระบุยีนก่อโรค และระบุสารทุติยภูมิของเชื้อรา มีความสำคัญสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ โดยนักปรับปรุงพันธุ์ข้าวสามารถเลือกใช้เชื้อราในการประเมินความต้านทานโรคในข้าวที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ให้มีความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยได้ยาวนานขึ้น

3. การประเมินการเกิดโรคในข้าว ควรมีการใช้เชื้อราสาเหตุโรคไหม้หลายไอโซเลทในการทดสอบ เพื่อให้มีความหลากหลายของประชากรเชื้อราสาเหตุโรค และทำให้ได้ข้าวที่สามารถต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กรมการข้าว. 2562. **รายงานสถานการณ์ศัตรูข้าว.** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.ppsf.go.th/wordpress/wpcontent/uploads/2020/02/2562_12_11_SUMRice_pest.pdf (วันที่เข้าถึงข้อมูล : 14 มิถุนายน 2564)

กรมการข้าว. 2563ก. **กรมการข้าวเตือนระวังโรคไหม้ระบาด.** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.ricethailand.go.th/web/index.php/mactivities/9100–2020–09–21–15–46–08 (วันที่เข้าถึงข้อมูล : 14 มิถุนายน 2564)

กรมการข้าว. 2563ข. **สรุปรายงานสถานการณ์ศัตรูข้าว กรมการข้าว ระหว่างวันที่ 26 พฤศจิกายน – 2 ธันวาคม 2563 (รายงาน ณ วันที่ 3 ธันวาคม 2563).** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://brrd.ricethailand.go.th/images/pdf/Pests_of_plants/2563/November2020/pest–plant02122020.pdf (วันที่เข้าถึงข้อมูล : 14 มิถุนายน 2564)

กรมการข้าว. 2564. **สรุปรายงานสถานการณ์ศัตรูข้าว กรมการข้าว ระหว่างวันที่ 31 ธันวาคม 2563 – 6 มกราคม 2564 (รายงาน ณ วันที่ 7 มกราคม 2564).** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://obrrd.ricethailand.go.th/index.php/2016-07-15-05-32-35/727-31-2563-6-2564 (วันที่เข้าถึงข้อมูล : 14 มิถุนายน 2564)

กิตติชัย นารีนุช จิรวัฒน์ สนิทชน และ พัชริน ส่งศรี. 2554. การคัดเลือกข้าวไร่พื้นเมืองทนทานต่อสภาพแล้งต้นฤดูปลูก. **แก่นเกษตร** 39(2) : 67 – 71.

กองวิจัยและพัฒนาข้าว. 2541. **ความสำคัญของข้าว เรื่องของข้าวปลูก.** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://brrd.ricethailand.go.th/index.php/2016-07-15-05-29-43/142-2017-05-04-06-46-54 (วันที่เข้าถึงข้อมูล : 14 มิถุนายน 2564)

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชัยฤทธิ์ ดำรงเกียรติ. 2555. ข้าวไร่กับการสร้างมั่นคงทางอาหารบนพื้นที่สูง. หน้า 1 – 23. ใน **การประชุมวิชาการข้าวแห่งชาติครั้งที่ 2**. 21 – 23 ธันวาคม 2555 ณ โรงแรมสวิสโซเทล เลอ คองคอร์ด. กรุงเทพฯ.

ณรงค์ สิงห์บุระอุดม เพชรรัตน์ จันทรฑิณ และ วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2538. ความสามารถในการก่อโรคของ culture filtrate ของเชื้อรา *Pyricularia oryzae* Cav. สาเหตุโรคไหม้ของข้าว. **วารสารวิทยาสารเกษตรศาสตร์** 29 : 16 – 2.

เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม. 2555. ความหลากหลายของพันธุกรรมข้าวท้องถิ่นและการใช้ประโยชน์. หน้า 29 – 31. ใน **การประชุมวิชาการข้าวแห่งชาติครั้งที่ 2**. กรุงเทพฯ.

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

เพ็ญนภา ตันเซียน ธานี ศรีวงศ์ชัย และ นงลักษณ์ เภรินทวงค์. 2557. วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์. หน้า 400 – 406. ใน **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52 สาขาพืช.** กรุงเทพฯ.

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

ศิริพร เปรมฤทธิ์. 2560. **"การถ่ายทอดพันธุกรรมและการระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ยั้งมอง."** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สมทรง โชติชื่น เกษม สุนทราจารย์ อภิชาติ ลาวัณย์ประเสริฐ วาสนา พันธุ์เพ็ง กัญญา เชื้อพันธุ์ วัชรี สุขวิวัฒน์ สุนันวงศ์ปิยชน อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ นลินี เจียงวรรธนะ รณชัย ช่างศรี ปิยะพันธ์ ศรีคุ้ม เปรมฤดี ปินทยา ปรีดา เสียงใหญ่ พันนิภา ยาใจ วันชัย โรจนหัสดินทร์ สุวัฒน์ เจียระคงมั่น และ ดวงใจ สุริยาอรุณโรจน์. 2554. แหล่งพันธุกรรมข้าวเพื่อการใช้ประโยชน์. หน้า 88 – 101. ใน **การประชุมวิชาการข้าว เนื่องในโอกาสวันข้าวและชาวนาแห่งชาติ ครั้งที่ 2 ปี 2554.** กรุงเทพฯ.

สรินนา อ่ำรุ่ง ธิดา เดชฮวบ เนตรนภิส เขียวขำ อรอุมา เพียซ้าย วันวิสา ศิริวรรณ์ และ ศรีเมฆ ชาวโพงพาง. 2561. การจำแนกเชื้อรา *Pyricularia* species ที่แยกจากข้าวและหญ้าด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา และ Pot2 rep–PCR. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร** 49(1) : 27 – 43.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เสาวลักษณ์ อัคราช ประภา ศรีพิจิตต์ และ ธานี ศรีวงศ์ชัย. 2554. การวิเคราะห์จัดกลุ่มความต้านทานเชื้อโรคไหม้ของข้าวพันธุ์ปรับปรุงด้วยเชื้อที่เก็บรวบรวมใหม่. หน้า 581 – 588. ใน **รายงานการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 49.** กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนันสนุนการวิจัย.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2563. **ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร.** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.oae.go.th/view/1/ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร/TH–TH (วันที่เข้าถึงข้อมูล : 15 มิถุนายน 2564)

สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว. 2552. **องค์ความรู้เรื่องข้าว.** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.ricethailand.go.th/Rkb/varieties/index.php-file=content.php&id=109.htm (วันที่เข้าถึงข้อมูล : 15 มิถุนายน 2564)

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. 2564. **สถิติการส่งออกข้าว.** [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.thairiceexporters.or.th/ (วันที่เข้าถึงข้อมูล : 15 มิถุนายน 2564)

อิงออน สีแก้ว ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ และ สุรีพร เกตุงาม. 2553. การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ในข้าว (*Pi–d2*) ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยด้วยเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ. **วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น** 15(2) : 123 – 131.

Chumpol, A., Chankaew, S., Saepaisan, S., Monkham, T. and Sanitchon, J. 2018. New sources of rice blast resistance obtained from Thai indigenous upland rice germplasm. **Euphytica** 214(10) : 1 – 10.

Couch, B. C. and Kohn, L. M. 2002. A multilocus gene genalogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae* from *M. grisea*. **Mycologia** 94 : 683 – 693.

Domiciano, G. P., Cacique, I. S., Freitas, C. C., Einhardt, A. M., and Rodrigues, F. Á. 2020. Picolinic acid stress imposed on rice leaves is not alleviated by silicon. **Tropical Plant Pathology** 45(4) : 448 – 453.

Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology** 9 : 275 – 296.

Imam, J., Alam, S., Mandal, N. P., Shukla, P., Sharma, T. R. and Variar, M. 2015. Molecular identification and virulence analysis of *AVR* genes in rice blast pathogen, *Magnaporthe oryzae* from Eastern India. **Euphytica** 206(1) : 21 – 31.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jacob, S., Grötsch, T., Foster, A. J., Schüffler, A., Rieger, P. H., Sandjo, L. P. and Thines, E. 2017. Unravelling the biosynthesis of pyriculol in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Microbiology** 163(4) : 541.

Kanzaki, H., Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisaki, K., Hirabuchi, A., Alaux, L., Fournier, E., Tharreau, D. and Terauchi, R. 2012. Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae AVR-Pik* and rice *Pik* genes driven by their physical interactions. **The Plant Journal** 72(6) : 894 – 907.

Kawasaki, T. A., Hayashi, N., Yanagihara, S. และ Fukuta, Y. 2016. Diversity and distribution of rice blast (*Pyricularia oryzae* Cavara) races in Japan. **Plant Disease** 100(4) : 816 – 823.

Klaubauf, S., Tharreau, D., Fournier, E., Groenewald, J. Z., Crous, P. W., De Vries, R. P. and Lebrun, M. H. 2014. Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (Pyriculariaceae). **Studies in Mycology** 79 : 85 – 120.

Kumar, R. S., Shanthala, L., Anilkumar, T. B. and Sudharshana, L. 2006. Phytotoxins from *Pyricularia grisea* and their effect on finger millet. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology** 15(1) : 63 – 66.

Li, J., Wang, Q., Li, C., Bi, Y., Fu, X. and Wang, R. 2019. Novel haplotypes and networks of *AVR–Pik* alleles in *Magnaporthe oryzae*. **BMC Plant Biology** 19(1) : 204.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Method** 25(4) : 402 – 408.

Lokeshwari, T. S. and Suryanarayanan, S. 1992. Induction of "green islands" in rice leaves by EDTA and some toxins of *Pyricularia oryzae* Cav. **Journal of Plant Diseases and Protection** 99 : 286 – 292.

Longya, A., Chaipanya, C., Franceschetti, M., Maidment, J. H., Banfield, M. J. and Jantasuriyarat, C. 2019. Gene duplication and mutation in the emergence of a novel aggressive allele of the *AVR–Pik* effector in the rice blast fungus. **Molecular Plant–Microbe Interactions** 32(6) : 740 – 749.

Lopez, A. L. C., YliMatilla, T. and Cumagun, C. J. R. 2019. Geographic distribution of avirulence genes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in the Philippines. **Microorganisms** 7(1) : 23.

Mekwatanakarn, P., Kositratana, W., Levy, M. and Zeigler, R. S. 2000. Pathotype and avirulence gene diversity of *Pyricularia grisea* in Thailand as determined by rice lines near–isogenic for major resistance genes. **Plant Disease** 84 : 60 – 70.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mentlak, T. A., Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L. S., Otomo, I., Saitoh, H. and Talbot, N. J. 2012. Effector–mediated suppression of chitin–triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. **The Plant Cell** 24(1) : 322 – 335.

Narayana, A. and Suryanarayanan, S. 1974. Studies on the toxins of *Pyricularia*. 31–40. In **Proceedings of the Indian Academy of Sciences Section B.** India : Springer.

Nie, H. Z., Zhang, L., Zhuang, H. Q., Shi, W. J., Yang, X. F., Qiu, D. W. and Zeng, H. M. 2019. The secreted protein MoHrip1 is necessary for the virulence of *Magnaporthe oryzae*. **International Journal of Molecular Sciences** 20(7) : 1 – 17.

Omar, S. C., Bentley, M. A., Morieri, G., Preston, G. M., Gurr, S. J. 2016. Validation of reference genes for robust qRT-PCR gene expression analysis in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **PLOS ONE** 11(8) : 1 – 18.

Otani, H., Kohmoto, K. and Kodama, M. 1995. *Alternaria* toxins and their effects on host plants. **Canadian Journal of Botany** 73(1) : 453 – 458.

Panda, T., Mishra, N. and Mohanty, R. B. 2013. Diversity of some threatened indigenous rice varieties cultivated in Odisha, India. **Environment and Natural Resources Journal** 11(2) : 41 – 57.

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.

Parinthawong, N. and Tansian, P. 2020. Pathogenicity of *Pyricularia oryzae* on elite rice cultivars and geographical distribution of avirulence genes causing blast disease in Thailand. **International Journal of Agricultural Technology** 16(4) : 897-906.

Petit, H. Y. and Fudal, I. 2017. Complex interactions between fungal avirulence genes and their corresponding plant resistance genes and consequences for disease resistance management. **Frontiers in Plant Science** 8 : 1 – 8.

Pooja, K. and Katoch, A. 2014. Past, present and future of rice blast management. **Plant Science Today** 1(3) : 165 – 173.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Selisana, S. M., Yanoria, M. J., Quime, B., Chaipanya, C., Lu, G., Opulencia, R., Wang, G.L., Correll, T. J., Talbot, N.J., Mitchell, R., Leung, H. and Zhou, B. 2017. Avirulence (*AVR*) gene-based diagnosis complements existing pathogen surveillance tools for effective deployment of resistance (*R*) genes against rice blast disease. **Phytopathology** 107(6) : 711-720.

Sirithunya, P., Sreewongchai, T., Sriprakhon, S., Toojinda, T., Pimpisithavorn, S., Kosawang, C. and Smitamana, P. 2008. Assessment of genetic diversity in Thai isolates of *Pyricularia grisea* by random amplification of polymorphic DNA. **Journal of Phytopathology** 156(4) : 196 – 204.

Tosa, Y. and Chuma, I. 2014. Classification and parasitic specialization of blast fungi. **Journal of General Plant Pathology** 80(3) : 202 – 209.

Tsuneo, N., Manabu, N. and Jiro, T. 1996. Effects of two toxins and a derivative of one toxin produced by rice blast fungus on its infection to inner epidermal tissue of rice leaf sheath. **Japanese Journal of Phytopathology** 62(2) : 114 – 118.

Tsurushima, T., Don, L. D., Kawashima, K., Murakami, J., Nakayashiki, H., Tosa, Y. and Mayama, S. 2005. Pyrichalasin H production and pathogenicity of *Digitaria* specific isolates of *Pyricularia grisea*. **Molecular Plant Pathology** 6(6) : 605 – 613.

Tsurushima, T., Nakayashiki, H., Tosa, Y. and Mayama, S. 2009. Pathogenicity–related compounds produced by blast fungus. 247 – 255. in Wang G. L. and *Valent B.* **Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease.** Dordrecht : Springer.

Wang, J.L., Xu, W.Y. and Wang, Y.Y. 1988. Preparation of crude extracts of *Pyricularia oryzae* Cav. and determination of their toxicity on rice. **Rice Abstract** 14(2) : 82.

Wilson, R. A. and Talbot, N. J. 2009. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. **Nature Reviews Microbiology** 7(3) : 185 – 195.

Wolpert, T. J., Dunkle, L. D. and Ciuffetti, L. M. 2002. Host–selective toxins and avirulence determinants: what's in a name?. **Annual Review of Phytopathology** 40 : 251 – 285.

Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisawa, S., Kanzaki, H., Matsumura, H., Tosa, Y., Chuma, I., Takano, Y., Win J., Kamoun, S. and Terauchi, R. 2009. Association genetics reveals three novel

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Plant Cell** 21 : 1573 – 1591.

Zhang, H., Zheng, X. and Zhang, Z. 2016. The *Magnaporthe grisea* species complex and plant pathogenesis. **Molecular Plant Pathology** 17(6) : 796 – 804.

Zhai, C., Lin, F., Dong, Z., He, X., Yuan, B., Zeng, X. and Pan, Q. 2011. The isolation and characterization of *Pik*, a rice blast resistance gene which emerged after rice domestication. **New Phytologist** 189(1) : 321 – 334.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Water Agar (WA) (1,000 ml)

Agar powder	20	กรัม

นำ Agar powder ผสมกับน้ำกลั่นปริมาณ 500 มิลลิลิตร ต้มให้วุ้นละลาย แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Potato Dextrose Broth (PDA) (1,000 ml)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar powder	20	กรัม

ตัดมันฝรั่งให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 2 เซนติเมตร ต้มมันฝรั่งกับน้ำกลั่นปริมาณ 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุก กรองเอามันฝรั่งออกด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำตาล Dextrose และ Agar powder ต้มจนน้ำตาลและวุ้นละลาย แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ผลการประเมินปฏิกิริยาการก่อโรคของเชื้อราบนข้าวสายพันธุ์ที่มียีนต้านทานเดี่ยว (NILs)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 ข้อมูลระดับคะแนนการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (NILs)

ไอโซเลท / พันธุ์ข้าว	IRBLa-A	IRBLa-C	IRBL1-F5	IRBLks-F5	IRBLks-S	IRBLk-Ka	IRBLkp-K60	IRBLkh-K3	IRBLz-Fu	IRBLz5-CA	IRBLzt-T	IRBLta-K1	IRBLta-CT 2	IRBLb-B	IRBLt-K59	IRBLsh-S	IRBLsh-B	IRBL1-CL	IRBL3-CP4	IRBL5-M	IRBL7-M	IRBL9-W	IRBL12-M	IRBL19-A	IRBLkm-Ts	IRBL20-IR24	IRBLta2-Pi	IRBLta2-Re	IRBLta-CP1	IRBL11-Zh	IRBLz5-C(R)
BKK55001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BKK55003	4	5	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	6	0	2	2	2	3	1	0	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0
CCO55002	2	4	3	5	1	1	0	0	0	2	1	2	1	5	2	1	4	5	0	0	0	0	0	3	0	4	6	6	4	5	2
CCO56004	0	3	3	3	3	0	0	0	4	3	3	4	0	3	3	3	3	0	3	0	0	0	3	4	0	3	0	3	3	5	5
Chiangrai34.1	0	3	2	0	2	0	2	1	3	3	5	5	2	5	0	3	3	2	3	0	1	3	0	-	0	0	1	0	2	6	-
CRI61010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	1
KKN2008-7537	2	0	0	2	0	-	0	1	1	0	0	0	3	1	3	3	4	0	0	2	2	1	0	0	0	4	2	3	3	2	5
KKN61067	1	3	3	3	4	3	4	0	3	0	5	4	4	3	4	3	1	0	2	3	-	0	2	3	0	5	3	4	4	3	-
KKN62107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0
KKN62112	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0
KPT61002	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	-	1	0	0	0
LPG61004	5	2	4	4	3	0	4	1	0	3	5	5	0	0	4	6	6	0	4	0	0	3	2	5	0	2	0	3	0	4	5
LPG61005	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	2	2	1	3	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LPG61011	4	4	1	4	4	0	0	0	0	0	4	4	3	0	5	4	2	5	1	1	0	1	4	0	0	0	0	0	4	4	3

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ไอโซเลท / พันธุ์ข้าว	IRBLa-A	IRBLa-C	IRBL1-F5	IRBLks-F5	IRBLks-S	IRBLk-Ka	IRBLkp-K60	IRBLkh-K3	IRBLz-Fu	IRBLz5-CA	IRBLzt-T	IRBLta-K1	IRBLta-CT 2	IRBLb-B	IRBLt-K59	IRBLsh-S	IRBLsh-B	IRBL1-CL	IRBL3-CP4	IRBL5-M	IRBL7-M	IRBL9-W	IRBL12-M	IRBL19-A	IRBLkm-Ts	IRBL20-IR24	IRBLta2-Pi	IRBLta2-Re	IRBLta-CP1	IRBL11-Zh	IRBLz5-C(R)
MKM62101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MSN61005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MSN61008	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NKI2010 - 47181	5	3	5	6	3	0	0	0	0	0	2	6	5	4	5	3	5	2	6	3	0	3	0	4	0	1	0	0	6	0	4
PL1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	1	3
PL2	0	3	3	5	4	0	0	0	3	0	3	4	3	1	3	1	1	1	3	3	0	0	0	3	0	0	2	0	5	4	3
PL61003	1	3	0	0	2	0	0	0	3	3	1	3	3	3	0	1	0	0	3	1	1	0	-	0	3	1	0	0	0	0	-
PL61017	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	3	0	0	0	0	0	1	1	0	0	3	0	0	0	0	1	4	5
PLK40.4	5	5	4	3	4	3	-	3	4	5	4	4	3	3	5	5	3	1	5	3	4	0	3	6	5	5	5	5	5	3	5
PNB61005	0	0	0	6	3	0	1	0	0	5	3	0	6	3	6	1	3	3	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	3	1
PNB61008	6	3	3	6	6	4	3	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	6	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-
PRE61016	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	-	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PYO61001	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0
RBR55001	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	4	2	0	2	3	0	3	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ไอโซเลท / พันธุ์ข้าว	IRBLa-A	IRBLa-C	IRBL1-F5	IRBLks-F5	IRBLks-S	IRBLk-Ka	IRBLkp-K60	IRBLkh-K3	IRBLz-Fu	IRBLz5-CA	IRBLzt-T	IRBLta-K1	IRBLta-CT 2	IRBLb-B	IRBLt-K59	IRBLsh-S	IRBLsh-B	IRBL1-CL	IRBL3-CP4	IRBL5-M	IRBL7-M	IRBL9-W	IRBL12-M	IRBL19-A	IRBLkm-Ts	IRBL20-IR24	IRBLta2-Pi	IRBLta2-Re	IRBLta-CP1	IRBL11-Zh	IRBLz5-C(R)
RBR55003	6	5	0	5	1	1	0	0	3	3	2	0	3	0	1	3	3	2	3	3	0	3	0	3	0	4	0	0	1	1	4
SKN 60867	3	3	0	0	0	2	0	0	0	1	1	1	1	0	2	2	2	3	3	3	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	4
SKN61009	1	3	0	-	0	2	0	0	1	2	2	6	1	3	3	1	3	-	3	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	3	2
SKN62103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SRN54002	4	4	0	3	3	1	0	3	0	4	4	4	4	4	4	4	2	2	4	1	1	2	5	1	4	4	1	0	0	5	5
SRN54005	0	1	1	2	2	3	1	1	4	3	5	4	1	4	2	0	2	0	2	0	0	0	2	3	0	0	1	0	4	2	3
SRN54007	1	1	3	0	0	0	0	2	0	1	1	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	5	0	0	2	2	5
SRN62108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TAK61002	5	6	0	5	0	3	3	2	0	3	3	2	0	5	4	0	5	6	4	4	0	3	4	0	0	3	6	6	6	6	5
THL191	4	5	3	4	3	3	4	4	5	4	3	3	4	5	4	3	3	3	4	3	4	3	4	1	4	5	4	1	1	4	5
THL794	5	5	3	4	4	0	3	0	0	4	6	4	6	4	6	1	1	0	3	2	0	3	0	5	0	5	5	4	3	3	5
UBN195167	2	3	3	0	2	1	1	0	0	0	1	2	2	0	3	1	2	0	0	0	1	1	1	3	0	0	0	2	5	0	5
UBN2010 195171	3	3	3	3	3	3	3	0	2	3	1	2	2	1	3	2	0	0	3	3	0	0	0	4	3	3	2	2	4	4	4

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ไอโซเลท / พันธุ์ข้าว	IRBLa-A	IRBLa-C	IRBL1-F5	IRBLks-F5	IRBLks-S	IRBLk-Ka	IRBLkp-K60	IRBLkh-K3	IRBLz-Fu	IRBLz5-CA	IRBLzt-T	IRBLta-K1	IRBLta-CT 2	IRBLb-B	IRBLt-K59	IRBLsh-S	IRBLsh-B	IRBL1-CL	IRBL3-CP4	IRBL5-M	IRBL7-M	IRBL9-W	IRBL12-M	IRBL19-A	IRBLkm-Ts	IRBL20-IR24	IRBLta2-Pi	IRBLta2-Re	IRBLta-CP1	IRBL11-Zh	IRBLz5-C(R)
UBN2009 - 11308	4	3	3	3	0	0	0	0	4	3	3	3	0	3	3	3	3	0	3	3	0	0	4	3	0	0	0	0	3	3	3
UBN2010 - 11351	3	3	3	3	4	2	0	3	4	4	0	5	3	5	4	3	3	2	3	0	0	0	3	0	3	1	1	0	0	2	5
UBN2010 - 13515	6	3	6	6	0	-	0	0	5	6	6	6	6	6	6	5	2	3	5	5	0	3	5	6	0	0	3	3	0	6	6
UBN207129	0	0	0	0	2	2	2	0	1	1	1	3	3	0	3	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	-
UBN61016	3	5	3	3	1	0	0	3	5	3	3	6	4	5	3	4	3	6	1	3	3	0	2	0	0	0	-	0	0	0	3
UDN61008	6	5	4	6	2	0	0	0	4	3	0	6	0	6	6	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	-	0	0	4
UTI61101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UTI61106	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาววัชรีพร สุขศิริ
วัน เดือน ปีเกิด	6 มกราคม พ.ศ. 2538 ที่กรุงเทพมหานคร
ที่อยู่	2 หมู่ 3 ตำบลปากกราน อำเภอพระนครศรีอยุธยา จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 13000
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2559 สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	Suksiri, W. and Parinthawong, N. 2020. Investigation of blast resistance genes in a broad-spectrum resistance indigenous rice, Yang Mawng variety. **International Journal of Agricultural Technology** 16(1) : 155 – 162.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้