

การถ่ายทอดพันธุกรรมและการระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าว  
พันธุ์ดอกพยอมไร่ (GS23774)

GENETIC INHERITANCE AND MAPPING OF BLAST RESISTANT GENE IN  
DAWK PA-YAWM RAI VARIETY (GS23774)



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาเกษตรศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2566

KMITL-2023-AG-M-065-411

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

GENETIC INHERITANCE AND MAPPING OF BLAST RESISTANT GENE IN  
DAWK PA-YAWM RAI VARIETY (GS23774)



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

2023

KMITL-2023-AG-M-065-411

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2023

SCHOOL OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การถ่ายทอดพันธุกรรมและการระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่ (GS23774)
ชื่อนักศึกษา	สุพิศรา จันทศรี
รหัสประจำตัว	60604006
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เกษตรศาสตร์
พ.ศ.	2566
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.นงลักษณ์ เกรินทวงศ์

### บทคัดย่อ

โรคไหม้ข้าวมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* เป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของข้าวทั่วโลก การควบคุมโรคไหม้ข้าวโดยใช้พันธุ์ต้านทานจัดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ดังนั้นการค้นหาลักษณะระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ยีนใหม่จึงเป็นการเตรียมพร้อมที่มีความสำคัญอย่างมากในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ ซึ่งแหล่งพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้ที่ดีคือข้าวพันธุ์พื้นเมือง งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความต้านทานโรคไหม้ของข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่ (GS23774) โดยปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้แต่ละไอโซเลททั้งหมด 25 ไอโซเลทลงบนข้าวดอกพยอมไร่ และพันธุ์ข้าวควบคุม 3 พันธุ์ คือ ข้าวดอกมะลิ 105 (อ่อนแอต่อโรคไหม้) เจ้าหอมนิล และ IR64 (ต้านทานต่อโรคไหม้) การประเมินความต้านทานโรคไหม้ของข้าวหลังจากปลูกเชื้อ พบว่าข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่สามารถต้านทานต่อเชื้อราจำนวน 18 ไอโซเลท ต้านทานปานกลางต่อเชื้อราจำนวน 5 ไอโซเลท และอ่อนแอต่อเชื้อราจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ CCO56004 และ THL191 ข้าวดอกพยอมไร่จึงมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลท จากนั้นทดสอบการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวข้าวที่ 2 จำนวน 730 ต้น ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์พื้นเมืองพันธุ์ดอกพยอมไร่ โดยปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้ทั้ง 25 ไอโซเลท และประเมินโรคหลังปลูกเชื้อ 7 วัน พบต้นที่มีความต้านทานต่อโรคไหม้จำนวน 524 ต้น และอ่อนแอต่อโรคไหม้จำนวน 206 ต้น การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ต่อลักษณะอ่อนแอต่อโรคไหม้ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 3:1 โดยมีค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 0.045 แสดงว่าข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่มียีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานมากกว่าหนึ่งยีน การระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR ทั้งหมด 230 เครื่องหมาย พบ 79 เครื่องหมายสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อกับแม่ได้ การคัดเลือกเครื่องหมายที่แยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและอ่อนแอต่อโรคไหม้ด้วยวิธี Bulk Segregant Analysis (BSA) พบ 2

เครื่องหมาย คือ RM518 และ RM6314 การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ทั้ง 2 เครื่องหมายในประชากรข้าวข้าวที่ 2 จำนวน 730 ต้น มีอัตราส่วนระหว่างมีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (A): มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่ (H): มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (B) เป็น 1:2:1 ด้วยค่า Chi square มีค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 0.05 (df=2.0) และ 0.5 (df=2.0) สำหรับเครื่องหมาย RM518 และ RM6314 ตามลำดับ การระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้จากเปอร์เซ็นต์การรวมตัวใหม่ของยีน โดยเลือกใช้ประชากรข้าวที่มี phenotype อ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจนจำนวน 206 ต้น พบว่าเครื่องหมาย RM518 และ RM6314 มีระยะห่างจากยีนต้านทานโรคไหม้ระยะทาง 9.2 cM และ 20.38 cM ตามลำดับ จากนั้นสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้โปรแกรม MAPMAKER พบว่าเครื่องหมาย RM518 และ RM6314 มีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 4 โดยมีระยะทาง 2.2 cM และ 16.2 cM ตามลำดับ จากผลการศึกษาพบว่าข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ดอกพยอมไร่ (GS23774) มีลักษณะความต้านทานแบบกว้างต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ เนื่องจากสามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลท มียีนหลักในการควบคุมลักษณะต้านทานอยู่บนโครโมโซมที่ 4 จึงสามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษา || เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Genetic Inheritance and Mapping of Blast Resistant Gene in Dawk Pa-yawm Rai Variety (GS23774)
Student Name	Suphattra Janthasri
Student ID	60604006
Degree	Master of Science
Department	Agriculture
Year	2023
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Nonglak Parinthawong

### Abstract

Rice blast disease, caused by pathogenic fungi *Pyricularia oryzae*, is an economically important disease of rice worldwide. Controlling rice blast disease using resistant varieties is the most appropriate way. The screening and mapping of blast resistant gene in landrace rice cultivars were important in breeding for the resistant varieties, wherewith the genetic resource of average blast resistant genes was obtained from landrace rice cultivars. In this study, the genetic inheritance of blast disease resistance gene of Dawk Pa-yawm Rai variety (GS23774) was analyzed. Each of the 25 blast isolates was inoculated on Dawk Pa-yawm Rai and 3 rice control cultivars included KDML105 (susceptible) Jao Hom Nin and IR64 (resistance). Evaluation of rice blast resistance after inoculation showed that Dawk Pa-yawm Rai variety was highly resistant to 18 blast isolates, moderately resistant to 5 isolates and susceptible to isolate CCO56004 and THL191. Therefore, Dawk Pa-yawm Rai variety was broad spectrum resistance to many blast isolates. The segregation of blast resistant in 730 F<sub>2</sub> plants from a cross between KDML105 and Dawk Pa-yawm Rai variety were evaluated by inoculation with a mixture of 25 blast isolates and the disease reactions were scored 7 days after inoculation. The disease assessment revealed 524 F<sub>2</sub> plants were resistant and 206 F<sub>2</sub> plant were susceptible. The segregation of resistance and susceptible phenotypes does not fit to the ratio 3:1 ( $p=0.045$ ), suggested that the resistant phenotype of the Dawk Pa-yawm Rai variety against tested blast isolates was controlled by more than one gene.

The location of the blast resistance gene was identified using 230 SSR markers, 79 markers showed polymorphism between parents. The SSR markers that showed different between resistance and susceptible to blast disease including RM518 and RM6314 were selected using BSA method. The distribution of 2 SSR markers in 730 F<sub>2</sub> plants for the ratio of the susceptible parent allele (A): both parent alleles (H): resistant parent allele (B) showed a goodness of fit to the 1:2:1 with the Chi square value of 0.05 (df=2.0) and 0.5 (df=2.0) for the RM518 and RM6314, respectively. The location of blast resistant gene from recombination frequency using 206 F<sub>2</sub> plants that showed the susceptible phenotype to blast disease was calculated. The results showed that the marker RM518 and RM6314 were linked to the blast resistant gene at the distance 9.2 cM and 20.38 cM, respectively. Therefrom, the mapping of blast resistant gene using MAPMAKER software was analyzed and showed that the markers RM518 and RM6314 were linked to the blast resistant gene on chromosome 4 at a distance of 2.2 cM and 16.2 cM, respectively. The results of the genetic inheritance and mapping of blast resistant gene indicate that Dawk Pa-yawm Rai variety was broad spectrum resistance to multiple fungal isolates of blast pathogen. Which at least 1 blast resistant gene was mapped on the chromosome 4. Therefore, Dawk Pa-yawm Rai variety can be used as genetic resource in the breeding program for resistance to rice blast disease.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีข้าพเจ้าขอขอบคุณ ผศ.ดร. นงลักษณ์ เภรินทวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และแนวทางการแก้ไขปัญหาที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์ของข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ชัชวาล จันทราสุริยรัตน์ ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. พรหมมาศ คูหากาญจน์ ผศ.ดร. ช่อแก้ว อนิลบล และ ดร. มัทธนา ตันชัย กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ศรีเมฆ ชาวโพงพาง นักวิจัยธนาคารทรัพยากรชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือเพื่อใช้ในการวิจัย ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ คุณเพ็ญภา จันทร์นวล คุณรุ่งอรุณ พูนสิน คุณประติภา ประดับไพโร คุณวารีย์ เหล่าเพิ่มสุข คุณวัชรินทร์ สุขศิริ และคุณสาธิตา ถึงทรัพย์ ที่ให้คำแนะนำ และช่วยเหลือข้าพเจ้าเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าเป็นอย่างยิ่ง ที่คอยเป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนข้าพเจ้าในการทำงานวิจัย และวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุพัตรา จันทศรี

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	X
สารบัญตารางผนวก.....	XI
สารบัญภาพ.....	XII
สารบัญภาพผนวก.....	XIII
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
1.3 สถานที่ดำเนินงาน.....	2
1.4 ขั้นตอนของการศึกษา.....	3
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>4</b>
2.1 ข้าว.....	4
2.1.1 ข้าวดอกมะลิ 105.....	5
2.1.2 ข้าวพื้นเมืองไทย.....	6
2.1.3 ข้าวดอกพยอมไร่ (GS23774).....	7
2.2 โรคไหม้ข้าว (Rice blast disease).....	7
2.3 วงจรการเกิดโรค.....	8
2.4 ลักษณะอาการและการแพร่ระบาดของโรคไหม้.....	9
2.5 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในข้าว.....	10
2.6 แหล่งของความต้านทานโรคไหม้และยีนต้านทานโรคไหม้.....	12
2.7 การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการปรับปรุงพันธุ์.....	14
2.7.1 Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD).....	14
2.7.2 Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP).....	14
2.7.3 Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP).....	15

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.7.4 Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ microsatellite.....	15
2.8 การสร้างแผนที่พันธุกรรม.....	17
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>20</b>
3.1 อุปกรณ์และวัสดุการวิจัย.....	20
3.1.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้ทดสอบ.....	20
3.1.2 ปุ๋ยเคมี.....	20
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อรา.....	20
3.1.4 สารเคมี.....	20
3.1.5 ดีเอ็นเอมาตรฐาน.....	21
3.1.6 เครื่องหมายดีเอ็นเอ.....	21
3.1.7 อุปกรณ์.....	21
3.2 วิธีการวิจัย.....	22
3.2.1 ศึกษาความต้านทานของข้าวพันธุ์ดอกพะยอมไรต่อประชากรเชื้อรา.....	22
3.2.1.1 การประเมินความต้านทานโรคไหม้.....	22
3.2.1.2 การเตรียมสารแขวนลอยโคนิเดียของเชื้อสาเหตุโรคไหม้.....	22
3.2.1.3 การปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้บนต้นกล้าข้าว.....	22
3.2.1.4 วิธีประเมินการเกิดโรค.....	23
3.2.2 การผสมพันธุ์เพื่อผลิตข้าวลูกผสม.....	24
3.2.2.1 การผสมพันธุ์ข้าวเพื่อผลิตลูกผสมชั่วที่ 1 (F <sub>1</sub> - hybrid).....	24
3.2.2.2 การสร้างประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 (F <sub>2</sub> population).....	25
3.2.3 การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าว.....	25
3.2.4 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ในประชากรข้าวชั่ว ที่ 2 (F <sub>2</sub> population).....	26
3.2.4.1 การคัดเลือกเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่าง ระหว่างพ่อและแม่ได้.....	26

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.4.2 การคัดเลือกเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้.....	28
3.2.4.3 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายในประชากรข้าวข้าวที่ 2 (F <sub>2</sub> population).....	30
3.2.5 สร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้จากเปอร์เซ็นต์การรวมตัวใหม่ของยีน (% recombination).....	30
3.2.6 การสร้างแผนที่เพื่อระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MAPMAKER.....	30
3.2.6.1 จัดกลุ่มความเชื่อมโยงของแต่ละเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้.....	30
3.2.6.2 จัดลำดับการวางตัวของแต่ละเครื่องหมายกับตำแหน่งของยีนในแต่ละกลุ่มที่ถูกแบ่ง.....	31
3.2.6.3 คำนวณหาระยะห่างระหว่างแต่ละเครื่องหมายและยีนต้านทานโรคไหม้.....	31
3.2.6.4 ตรวจสอบความถูกต้องของผลที่คำนวณได้.....	31
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....</b>	<b>31</b>
4.1 ความต้านทานของข้าวพันธุ์ดอกพยอมไรต่อประชากรเชื้อราจำนวน 25 ไอโซเลท.....	32
4.2 การผสมพันธุ์ข้าวเพื่อผลิตข้าวลูกผสม.....	34
4.2.1 ลักษณะของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F <sub>1</sub> - hybrid).....	34
4.2.2 ประชากรข้าวข้าวที่ 2 (F <sub>2</sub> population).....	34
4.3 การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวข้าวที่ 2 (F <sub>2</sub> population).....	35
4.4 การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ได้.....	37
4.5 คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างลักษณะต้านทานและลักษณะอ่อนแอต่อเชื้อโรคไหม้ได้.....	37

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.6 การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ในประชากรข้าวข้าวที่ 2 (F <sub>2</sub> population).....	40
4.7 สร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้จากเปอร์เซ็นต์การรวมตัวใหม่ของ ยีน (% recombination).....	54
4.8 การสร้างแผนที่เพื่อระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MAPMAKER.....	59
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....</b>	<b>62</b>
เอกสารอ้างอิง.....	64
ภาคผนวก.....	71
ประวัติผู้เขียน.....	92



# สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	เชื้อสาเหตุโรคไหม้ 25 ไอโซเลทที่ใช้ในการทดสอบความต้านทานโรคและแหล่งที่มา.....	23
4.1	ปฏิกิริยาก่อโรคบนข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่ ขาวดอกมะลิ 105 เจ้าหอมนิล และ IR64 หลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 25 ไอโซเลท ทำการทดลอง 2 ครั้ง.....	33
4.2	การเปรียบเทียบลักษณะของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (พันธุ์แม่) และพันธุ์ดอกพยอมไร่ (พันธุ์พ่อ).....	35
4.3	ผลประเมินการเกิดโรคด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 25 ไอโซเลท บนประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F <sub>2</sub> ) จำนวน 730 ต้น.....	36
4.4	อัตราการกระจายตัวของลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ 25 ไอโซเลทในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F <sub>2</sub> population) จำนวน 730 ต้น.....	37
4.5	เครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อกับแม่จำนวน 79 เครื่องหมาย และผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA).....	38
4.6	ผลการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุล SSR เครื่องหมาย RM518 และ RM6314 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 จำนวน 730 ต้น.....	41
4.7	อัตราการกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F <sub>2</sub> ) จำนวน 730 ต้น.....	54
4.8	การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR บนโครโมโซมที่ 4 ในประชากรข้าว 206 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ และเปอร์เซ็นต์การรวมตัวใหม่ของยีนต้านทานโรคไหม้.....	55

# สารบัญตารางผนวก

ตารางผนวกที่

หน้า

1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายโมเลกุล SSR จำนวน 230 เครื่องหมายที่ครอบคลุมทั้ง 12 โครโมโซมของข้าว.....	76
---	--	----



# สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	ลักษณะของโคนิเดียของเชื้อรา <i>Pyricularia oryzae</i> .....8
2.2	วงจรการเกิดโรคของเชื้อสาเหตุโรคไหม้.....9
2.3	ลักษณะอาการของโรคไหม้ที่พบที่ใบในระยะกล้า (ก) ระยะแตกกอ (ข) และระยะคอรวง (ค).....10
3.1	เกณฑ์ให้คะแนนการเกิดโรคตามระดับคะแนนของ Roumen <i>et al.</i> (1997).....24
4.1	รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมายที่วิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) เลข 1 คือ พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์แม่, 2 คือ พันธุ์ดอกพยอมไร่ (GS23774) เป็นพันธุ์พ่อ, 3 คือ ประชากร F <sub>2</sub> T <sub>1</sub> กลุ่มต้านทาน (resistant), 4 คือ ประชากร F <sub>2</sub> T <sub>1</sub> กลุ่มอ่อนแอ (susceptible), 5 คือ ประชากร F <sub>2</sub> T <sub>2</sub> กลุ่มต้านทาน (resistant), 6 คือ ประชากร F <sub>2</sub> T <sub>2</sub> กลุ่มอ่อนแอ (susceptible), 7 คือ ประชากร F <sub>2</sub> T <sub>3</sub> กลุ่มต้านทาน (resistant) และ 8 คือ ประชากร F <sub>2</sub> T <sub>3</sub> กลุ่มอ่อนแอ (susceptible).....40
4.2	แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้และระยะห่างระหว่างเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 4 ของข้าว เมื่อวิเคราะห์ในประชากรข้าว 206 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์การรวมตัวใหม่ (recombination) ของยีนต้านทานโรคไหม้และวาดแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapChart.....59
4.3	แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ และระยะห่างระหว่างเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 4 ของข้าวเมื่อวิเคราะห์ในประชากรข้าว 206 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ โดยคำนวณหาระยะห่างของแต่ละเครื่องหมายและยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MAPMAKER และวาดแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapChart.....61

# สารบัญภาพผนวก

ภาพผนวกที่	หน้า
1	เครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่าง พันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ได้จำนวน 79 เครื่องหมาย จากเครื่องหมายทั้งหมด 230 เครื่องหมายที่ครอบคลุมทั้ง 12 โครโมโซมข้าว.....85
2	รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM518 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ( $F_2$ population) จำนวน 730 ต้น P1 คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ P2 คือ พันธุ์ดอกพยอมไร่ (GS23774) M คือ 10 bp DNA ladder.....86
3	รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM6314 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ( $F_2$ population) จำนวน 730 ต้น P1 คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ P2 คือ พันธุ์ดอกพยอมไร่ (GS23774) M คือ 10 bp DNA ladder.....89

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากประชากรส่วนใหญ่ของโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก ในปี พ.ศ. 2565 ประเทศไทยส่งออกข้าวมากเป็นอันดับ 2 ของโลก ปริมาณการส่งออกรวม 7.7 ล้านตัน มูลค่า 138,452 ล้านบาท (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2565) โรคไหม้ข้าวเป็นโรคที่มีความสำคัญและสร้างความเสียหายต่อผลผลิตข้าวทั่วโลก มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* เชื้อราสามารถเข้าทำลายต้นข้าวในทุกระยะการเจริญเติบโตในส่วนที่อยู่เหนือดิน (Goto, 1965) โรคนี้อาจมีชื่อเรียกต่างกัน เช่น โรคไหม้ โรคไหม้คอรวง โรคเน่าคอรวงหรือโรคข้อลำต้นเน่า โดยเรียกตามระยะการเจริญเติบโตของข้าวเมื่อถูกเชื้อเข้าทำลาย ในปี พ.ศ. 2564 พบพื้นที่ระบาด จำนวน 12 จังหวัด ได้แก่ น่าน พะเยา แพร่ ลำปาง อุทัยธานี นครราชสีมา สกลนคร อุบลราชธานี จันทบุรี นครศรีธรรมราช ปัตตานี และสงขลา พื้นที่ระบาดจำนวน 1,299 ไร่ โดยเฉพาะในพื้นที่อำเภอร่องขวาง จังหวัดแพร่ พบการระบาดของโรคไหม้ในระยะข้าวแตกกอ และพื้นที่เสียหายประมาณ 25 – 40 เปอร์เซ็นต์ (กรมการข้าว, 2564) เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตข้าวของพื้นที่จังหวัดแพร่ย้อนหลัง 10 ปี (พ.ศ. 2554 และ พ.ศ. 2564) พบว่าผลผลิตข้าวลดลงเกือบ 10,000 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2564) ซึ่งโรคไหม้อาจเป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของความเสียหายของผลผลิตข้าว

การควบคุมโรคไหม้ในข้าวโดยใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีการที่เหมาะสมมากที่สุดวิธีหนึ่ง เนื่องจากให้ผลคุ้มค่าในระยะยาว ช่วยลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรค ส่งผลให้ต้นทุนในการปลูกข้าวลดลง และลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้ (พูนศักดิ์ และคณะ, 2550) อย่างไรก็ตามพันธุ์ต้านทานมักจะสูญเสียความต้านทานในระยะต่อมา เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคไหม้มีการปรับตัวทำให้มีโอกาสกลายพันธุ์เกิดสายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีความรุนแรงและสามารถเข้าทำลายพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้พันธุ์เดิมได้ (Sreewongchai et al., 2010) ดังนั้นการค้นหาและระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ยีนใหม่จึงเป็นการเตรียมพร้อมที่มีความสำคัญอย่างมากในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทาน เป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวและสามารถช่วยลดการใช้สารเคมี โดยสามารถคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้หลายลักษณะพร้อมๆ กัน ทั้งลักษณะเชิงคุณภาพและปริมาณ ช่วยลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ ทำให้ได้ข้าวสายพันธุ์ใหม่เร็วขึ้นและได้ผลตอบแทนในระยะยาวมากกว่า (สุรีพร, 2556) ปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในงานด้านพันธุศาสตร์ และการปรับปรุงพันธุ์พืช

อย่างมาก เช่น ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ใช้เพื่อติดตามหาถิ่นที่ควบคุมลักษณะที่ดีต่างๆ ใช้เป็นข้อมูลสำหรับวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนและสร้างแผนที่ยีน เป็นต้น ซึ่งแผนที่ของยีนที่ควบคุมลักษณะที่ดีต่างๆ เป็นข้อมูลสำคัญช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์ทราบถึงจำนวนตำแหน่ง และอิทธิพลของยีนที่มีความสำคัญ เพื่อเป็นแนวทางในการผนวกรวมยีนเหล่านั้นเพื่อสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ได้อย่างรวดเร็ว เครื่องหมายดีเอ็นเอที่นำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านพืชมีหลายประเภท ได้แก่ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Restriction Fragment Length Polymorphisms (RELFP), Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) และ Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ microsatellite โดยการเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ และคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละประเภท (จุฑาทพร, 2555) เครื่องหมาย SSR เป็นหนึ่งในเครื่องหมายโมเลกุลที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าว เนื่องจากมีความแม่นยำสูง และเป็นเครื่องหมายที่มีความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งโมเลกุลเครื่องหมายบนจีโนม (สุรินทร์, 2549)

ข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่ (GS23774) เป็นข้าวเจ้าพื้นเมือง มีความไวต่อช่วงแสง แหล่งรวบรวมอยู่ในอำเภอมือง จังหวัดตรัง (ฉวีวรรณ, 2543) ข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่ เป็น 1 ใน 4 พันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานโรคไหม้ได้ในระดับสูงโดยไม่พบอาการของโรค เมื่อทดสอบความต้านทานโดยปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 29 ไอโซเลท (Salih *et al.*, 2013)

งานวิจัยนี้ศึกษาปฏิกิริยาของยีนต้านทานโรคไหม้ต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้และระบุตำแหน่งของยีนต้านทานต่อโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ดอกพยอมไร่ (GS23774) ซึ่งยีนที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมของไทยให้ต้านทานต่อโรคไหม้อย่างยั่งยืน ซึ่งจะส่งผลให้ประเทศไทยส่งออกข้าวหอมได้มากขึ้นในอนาคต

## 1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

- 1.2.1 เพื่อศึกษาปฏิกิริยาของยีนต้านทานโรคไหม้ในพันธุ์ข้าวดอกพยอมไร่ ต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย
- 1.2.2 เพื่อศึกษาการถ่ายทอดพันธุกรรมควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ในพันธุ์ข้าวดอกพยอมไร่ไปสู่รุ่นลูก
- 1.2.3 เพื่อระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว

## 1.3 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการโรคพืช สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

โรงเรียนปลูกและทดลองข้าว ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

#### 1.4 ขั้นตอนของการศึกษา

ศึกษาปฏิบัติการการก่อโรคของเชื้อสาเหตุโรครไหม้ 25 ไอโซเลทบนข้าวพื้นเมืองพันธุ์ดอกพยอมไร่ เพื่อ ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรครไหม้ของข้าวพื้นเมืองพันธุ์ดอกพยอมไร่ ที่ต้านทานโรครไหม้มาผสมกับพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่มีลักษณะดีแต่ไม่ต้านทานโรครไหม้เพื่อ สร้างประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 และ 2 จากนั้นนำประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 ไปทดสอบความต้านทานโรครไหม้ ทำการคัดเลือกเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ได้และนำไปใช้แยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอต่อเชื้อราสาเหตุโรครไหม้ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) และทำการตรวจสอบยืนยันต้านทานโรครไหม้ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ผ่านการคัดเลือกและนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติร่วมกับข้อมูลฟีโนไทป์เพื่อสร้างแผนที่ยีนต้านทานโรครไหม้บนโครโมโซมข้าว

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ข้าว

ข้าวเป็นพืชล้มลุกใบเลี้ยงเดี่ยว จัดอยู่ในวงศ์เดียวกับพืชจำพวกหญ้า (Family Gramineae หรือ Poaceae) ถูกจัดอยู่ในสกุล (Genus) *Oryza* มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oryza sativa* เป็นพืชชนิดเดียวที่เติบโตได้ทั้งในบริเวณที่ไม่มีน้ำขังจนถึงบริเวณที่มีน้ำขังลึกถึง 4 เมตร และทนทานต่อทุกสภาพภูมิประเทศในโลก ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากประชากรส่วนใหญ่ของโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก ในปี พ.ศ. 2565 ประเทศไทยส่งออกข้าวมากเป็นอันดับ 2 ของโลก ปริมาณการส่งออกรวม 7.7 ล้านตัน มูลค่า 138,452 ล้านบาท (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2565) สายพันธุ์ของพืชตระกูลข้าวที่มีอยู่บนโลกนี้มีมากถึง 120,000 สายพันธุ์ แต่พันธุ์ที่รู้จักและนำมาปลูกสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ *Oryza sativa* นิยมเพาะปลูกในทวีปเอเชีย และ *Oryza glaberrima* ที่นิยมเพาะปลูกในทวีปแอฟริกา แต่ข้าวที่ปลูกและซื้อขายกันในตลาดโลกเกือบทั้งหมดเป็นข้าวจากทวีปเอเชีย แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามลักษณะพื้นที่ปลูกดังนี้

1) ข้าวอินดิกา (Indica) หรือข้าวเจ้า เป็นข้าวที่มีลักษณะเมล็ดเรียวยาวรี ลำต้นสูง ตั้งชื่อมาจากแหล่งที่ค้นพบครั้งแรกในประเทศอินเดีย เป็นข้าวที่นิยมเพาะปลูกในทวีปเอเชีย ตั้งแต่ จีน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ไทย อินโดนีเซีย ไปจนถึงอินเดียและศรีลังกา ในเมืองไทยข้าวอินดิกานิยมเพาะปลูกในบริเวณที่ราบลุ่มตอนใต้ของแม่น้ำเจ้าพระยาและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วแทนข้าวเหนียวที่เคยปลูก ซึ่งคนไทยสมัยนั้นเรียกข้าวอินดิกาที่มาจากต่างประเทศว่า “ข้าวของเจ้า” แล้วเรียกกันสั้นลงเหลือเพียง “ข้าวเจ้า” มาถึงทุกวันนี้

2) ข้าวจาปอนิกา (Japonica) เป็นข้าวที่ปลูกอยู่ในญี่ปุ่น จีนตอนเหนือ ไต้หวัน และเกาหลี ลักษณะเด่นของข้าวชนิดนี้ มีเมล็ดป้อม สั้น ค่อนข้างกลม เมื่อบริโภคแล้วไม่มีกลิ่น เกาะตัวกันคล้ายข้าวเหนียว ลำต้นเตี้ย ใบตั้ง และแตกกอดี

3) ข้าวจาวานิกา (Javanica) เป็นข้าวลักษณะเมล็ดป้อมใหญ่สันนิษฐานว่าเป็นข้าวพันธุ์ผสมระหว่างข้าวอินดิกาและจาปอนิกา นิยมเพาะปลูกใน อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน หมู่เกาะริวกิว และญี่ปุ่น แต่ไม่ค่อยได้รับความนิยมนักเพราะให้ผลผลิตต่ำ ประเทศต่างๆ ในโลกต่างก็มีการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวใหม่ เพิ่มพื้นที่การเพาะปลูกข้าวและวิธีการปลูกข้าวให้ได้ปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้น (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2566)

### 2.1.1 ขาวดอกมะลิ 105

ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์ข้าวหอมที่ได้จากการนำข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากนาเกษตรกรอำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา โดยนายสุนทร สีหะเนิน เป็นผู้รวบรวมในปี พ.ศ. 2493 - 2494 จำนวน 199 รวง มาปลูกเพื่อศึกษาพันธุ์ ได้ข้าวรวงที่ 105 ที่มีลักษณะพิเศษ คือเมื่อนำมาหุงต้มมีกลิ่นหอม และเมล็ดอ่อนนุ่ม จึงนำไปคัดเลือกแบบคัดพันธุ์บริสุทธิ์ในปี พ.ศ. 2498 ที่สถานีทดลองข้าว โคกสำโรง จังหวัดลพบุรี ในปี พ.ศ. 2500 นำเข้าแปลงเปรียบเทียบพันธุ์ท้องถิ่นในภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในปี พ.ศ. 2502 ได้รับการพิจารณาจากคณะกรรมการพิจารณาพันธุ์ให้ขยายพันธุ์ และส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเป็นพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เมื่อวันที่ 25 พฤษภาคม พ.ศ. 2502 (กรมการข้าว, 2563) ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีลักษณะประจำพันธุ์คือ เป็นข้าวที่มีลักษณะไวต่อช่วงแสง (photoperiod sensitive) คือออกดอกในช่วงวันที่กลางคืนยาวนานกว่ากลางวัน ซึ่งจะอยู่ในช่วงเดือนกันยายนถึงมกราคม การแตกกอดี ต้นสูงประมาณ 140 – 150 เซนติเมตร ให้ผลผลิตเฉลี่ย 499 กิโลกรัมต่อไร่ เมล็ดข้าวเปลือกมีลักษณะเมล็ดเรียวยาว ก้นงอน สีฟาง ขนาดเมล็ดข้าวยาว 7.5 มิลลิเมตร กว้าง 2.1 มิลลิเมตร หนา 1.8 มิลลิเมตร เป็นข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสต่ำประมาณ 12 – 18 เปอร์เซ็นต์จึงทำให้ข้าวสุก มีลักษณะเหนียวนุ่ม นอกจากนี้ยังพบว่า ข้าวพันธุ์นี้มีกลิ่นหอม ทำให้ข้าวสายพันธุ์นี้เป็นที่ต้องการของตลาด แต่ข้อจำกัดของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 คือผลผลิตค่อนข้างต่ำ ลำต้นอ่อนล้มง่าย ไม่ต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูข้าวทุกชนิด โดยเฉพาะโรคไหม้ พบว่าสร้างความเสียหายต่อผลผลิตข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นอย่างมาก และเป็นข้าวไวต่อช่วงแสง ซึ่งสามารถเพาะปลูกได้เพียงปีละ 1 ครั้งและในช่วงฤดูนาปีเท่านั้น (วาสนา, 2538)

ในปี พ.ศ. 2541 สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (International Rice Research Institute, IRRI) ร่วมมือกับศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ดำเนินการปรับปรุงพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานต่อโรคไหม้ โดยรักษาคุณภาพเมล็ดและการหุงต้มที่ดีเช่นเดียวกับพันธุ์เดิมไว้ และมีการปรับตัวได้ดีในสภาพนาน้ำฝนในภาคเหนือตอนบนและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ดำเนินการผสมพันธุ์ข้าวที่ IRRI ประเทศฟิลิปปินส์ พันธุ์ IR70179-45-1-1-1 เป็นพันธุ์พ่อที่มีลักษณะความต้านทานโรคไหม้ และมีการปรับตัวได้ดีในนาน้ำฝน โดยผ่านการคัดเลือกจากการปลูกทดสอบในศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี และพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์แม่ ปลูกประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 ( $F_1$  - hybrid) และชั่วที่ 2 ( $F_2$ ) โดยคัดเลือกต้นที่ต้านทานโรคไหม้และมีความหอมผสมกลับไปยังพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 1 ( $BC_1F_1$ ) ทำการทดสอบความต้านทานและความหอม คัดเลือกและนำไปปลูกในนาข้าว ผสมกลับอีกครั้งจนได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 2 ( $BC_2F_1$ ) และรุ่นต่อไป ในปี พ.ศ. 2545 คัดเลือกพันธุ์ที่สามารถต้านทานโรคไหม้ได้ดี และนำมาทดสอบคุณภาพการหุงต้มได้ข้าวอายุเบาที่มีคุณสมบัติเหมือนข้าวดอกมะลิ 105 จำนวน 19 สายพันธุ์ นำมาทดสอบการให้ผลผลิตเบื้องต้นในฤดูแล้งและฤดูฝนของปี พ.ศ. 2546-2547 ทั้งภายในสถานีและในแปลง

นาเกษตรกรจนได้พันธุ์ข้าว IR77924-62-71-1-2 ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์เป็นที่ยอมรับของเกษตรกร มีลักษณะเด่นคือ เป็นข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง อายุตกกกล้าถึงออกดอกประมาณ 100-110 วัน มีความต้านทานโรคไหม้ที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือของประเทศไทย คุณภาพเมล็ด การหุงต้ม เหมือนพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (บุญรัตน์ และคณะ, 2548)

### 2.1.2 ข้าวพื้นเมืองไทย

ข้าวพันธุ์พื้นเมืองหรือข้าวพื้นบ้าน กำเนิดจากการเพาะพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่แข็งแรงทนแล้งทนฝน เหมาะสมกับดินในท้องที่โดยการคัดเลือกของชาวนาในท้องถิ่น ปลูกแล้วจึงเก็บเมล็ดพันธุ์ไว้ส่งต่อจากลูกสืบหลาน อีกส่วนหนึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของข้าวตามธรรมชาติ เมื่อเพาะปลูกข้าวหลายๆพันธุ์ในท้องนาเดียวกัน ข้าวสายพันธุ์เดิมที่มีการผสมกันเป็นข้าวพันธุ์ใหม่ ข้าวพันธุ์ใหม่ที่เกิดมาจะถูกเก็บรักษาพันธุ์ไว้หว่านนาในฤดูต่อไป ข้อดีของข้าวพันธุ์พื้นเมืองคือ มีความหลากหลายของพันธุ์ค่อนข้างสูง คุณภาพเมล็ดดี มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม มีความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืช เช่น โรคไหม้ ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการสูญเสียผลผลิตข้าวในแต่ละปี เป็นต้น ลักษณะเหล่านี้เป็นฐานพันธุกรรมที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ได้พันธุ์ดีในอนาคต ถ้าพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีคุณภาพได้สูญเสียพันธุ์ไป ก็ไม่สามารถสร้างพันธุ์ข้าวที่มีคุณภาพดีที่ตรงตามความต้องการของตลาดได้

พันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทยทั้งหมดที่เก็บรวบรวมจาก 76 จังหวัด โดยจำแนกชื่อเบื้องต้นมีชื่อไม่ซ้ำกันพบทั้งหมด 5,928 ชื่อพันธุ์ จากความหลากหลายของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของประเทศไทยทำให้คาดเดาได้อาจจะมีพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทยมากกว่านี้เพราะยังมีอีกหลายตัวอย่างที่ยังไม่ทราบชื่อ และที่เก็บรวบรวมไว้ยังไม่ได้ทำการประเมินลักษณะประจำพันธุ์หรือจำแนกชื่อพันธุ์ พันธุ์ข้าวพื้นเมืองของไทยเหล่านี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างมากและมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้ (ฉวีวรรณ, 2543)

รุ่งอรุณ และ นงลักษณ์ (2561) ทำการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานต่อโรคไหม้ โดยการนำพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะดีไปผสมกับพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคไหม้ ข้าวพันธุ์ห้วย (GS19769) เป็นข้าวพื้นเมืองของไทยที่สามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมที่ดีที่มีลักษณะต้านทานโรคไหม้ข้าว มีรายงานการค้นพบยีนต้านทานมากกว่า 1 ตำแหน่ง โดยพบ 1 ตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 11 ผลการทดสอบความต้านทานโรคไหม้ของข้าวพันธุ์ห้วย โดยใช้เชื้อที่เป็นตัวแทนจากพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคไหม้ทุกภาคของประเทศไทย จำนวน 25 ไอโซเลท ปลูกเชื้อลงบนข้าวพันธุ์ห้วย ข้าวดอกมะลิ 105 (อ่อนแอต่อโรคไหม้) เจ้าหอมนิล และ IR64 (ต้านทานต่อโรคไหม้) และประเมินความต้านทาน หลังการปลูกเชื้อ 7 วัน พบว่าข้าวพันธุ์ห้วยต้านทานเชื้อราทุกไอโซเลทได้ในระดับสูง โดยพบการเกิดโรคที่ระดับ 0 ยกเว้นไอโซเลท PLK40.4 พบปฏิกิริยาการเกิดโรคที่ระดับ 2 จากการแบ่งระดับคะแนน 0 – 6 (0 หมายถึง ต้านทานโรค และ 6 หมายถึง อ่อนแอต่อโรค) สรุปได้ว่าข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วยสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรค

ใหม่ได้หลากหลายสายพันธุ์ ดังนั้นข้าวพันธุ์ห้วยจึงเป็นแหล่งพันธุกรรมที่ดีในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้

### 2.1.3 ข้าวดอกพยอมไร่ (GS23774)

ข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่ เป็นข้าวเจ้าพื้นเมือง มีความไวต่อช่วงแสง ลำต้นเขียว ใบยาว ชูรวงดี เมล็ดเรียวยาว ข้าวเปลือกสีฟางกันจุด แหล่งรวบรวมอยู่ในอำเภอเมือง จังหวัดตรัง (ฉวีวรรณ, 2543) ข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่ เป็น 1 ใน 4 พันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานโรคไหม้ได้ในระดับสูงโดยไม่พบอาการของโรคจากการทดสอบของ Salih *et al.* (2013) จำแนกพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้จากพันธุ์ข้าวของไทยทั้งหมด 311 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นข้าวพื้นเมืองจำนวน 263 ตัวอย่าง ข้าวที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์แล้วจำนวน 43 ตัวอย่าง และข้าวป่าจำนวน 5 ตัวอย่าง ตรวจสอบความต้านทานโดยปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 29 ไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดพิษณุโลก อุบลราชธานี ขอนแก่น เชียงราย หนองคาย ชัยภูมิ และอุดรธานี จากการตรวจสอบพบพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 35 ตัวอย่าง แบ่งเป็นข้าวพื้นเมือง จำนวน 25 ตัวอย่าง ข้าวที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์แล้วจำนวน 9 ตัวอย่างและข้าวป่าจำนวน 1 ตัวอย่าง ในจำนวนพันธุ์พื้นเมือง 25 ตัวอย่าง พบว่ามีพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานโรคไหม้ได้ในระดับสูงมากกว่าพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ หมายเลข GS23107 (กำเพ็ญ) GS19769 (ห้วย) GS20874 (ยังมอ) และ GS23774 (ดอกพยอมไร่) โดยไม่พบอาการของโรคบนพันธุ์ข้าวทั้ง 4 ตัวอย่าง

### 2.2 โรคไหม้ข้าว (Rice blast disease)

โรคไหม้ของข้าวเกิดจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* เป็นโรคที่มีความสำคัญก่อให้เกิดความเสียหายและมีการระบาดของโรคอย่างกว้างขวางในประเทศไทย โดยเฉพาะในพื้นที่ปลูกข้าวภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งพันธุ์ส่วนใหญ่นิยมปลูกเป็นข้าวพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค เช่น ข้าว กข15 กข6 ปทุมธานี 1 และขาวดอกมะลิ 105 โดยเฉพาะแปลงที่ปลูกข้าวแน่นเกินและใส่ปุ๋ยไนโตรเจนสูงเกิน (กรมการข้าว, 2564) เชื้อราโรคไหม้สามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของต้นข้าว ตั้งแต่ในระยะต้นกล้า จนถึงระยะออกรวงโดยเฉพาะในระยะออกรวงทำให้มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดน้อยลง น้ำหนักและขนาดของเมล็ดลดลง (Goto, 1965) เชื้อรา *Pyricularia oryzae* มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ส่วนในระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเรียกว่า *Magnaporthe oryzae* (Couch and Kohn, 2002) เชื้อรานี้จะสร้างส่วนขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเรียกว่า โคนิเดีย (conidia) บนก้านชูโคนิเดีย (conidiophore) เป็นกลุ่มบนเนื้อเยื่อพืช ก้านชูโคนิเดียมีผนังกัน โคนิเดียมีรูปร่างลักษณะเป็นแบบ pyriform หรือ obclavate ปลายยอดของโคนิเดียแหลม (tapering) ภายในโคนิเดียแบ่งออกเป็น 3 เซลล์ มี 2 ผนังกันเซลล์ (septate) บางครั้งผนังกันเซลล์อาจเว้า (constrict) เล็กน้อย (ภาพที่ 2.1) โคนิเดียของเชื้อจะมีลักษณะ

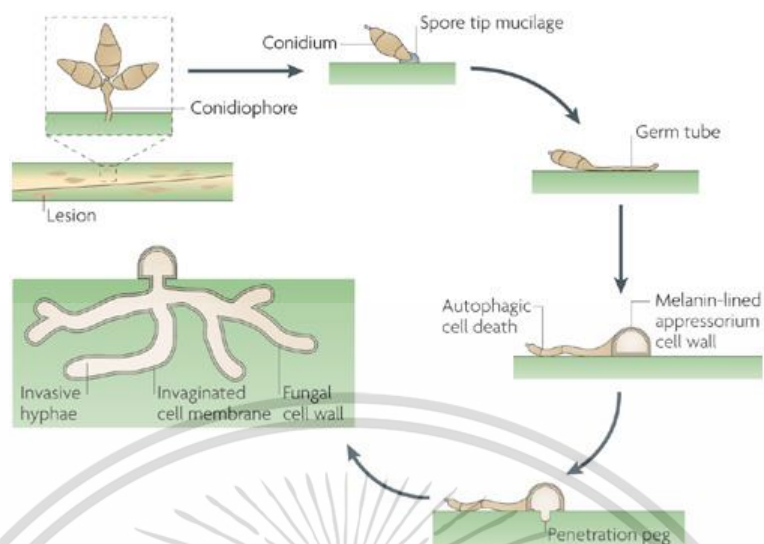
ใสไม่มีสี (hyaline) แต่ละไอโซเลทมีขนาดโคนิเดียแตกต่างกันโดยมีขนาดประมาณ 18.50 – 27.40 x 5.60 – 9.20 ไมโครเมตร (Waktola, 2022) โดยเชื้อราชนิดนี้มีรูปแบบการดำรงชีพแบบ hemibiotrophic คือในช่วงชีวิตแรกมีการดำรงชีพแบบ biotrophic ได้รับสารอาหารจากเซลล์พืชที่มีชีวิต และในช่วงชีวิตที่สองมีการดำรงชีพแบบ necrotrophic ได้รับสารอาหารจากเซลล์พืชที่ตายแล้ว (Kankanala *et al.*, 2009)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของโคนิเดียของเชื้อรา *Pyricularia oryzae*  
ที่มา : Kato *et al.* (2000)

### 2.3 วงจรการเกิดโรค

เชื้อสาเหตุโรคใหม่จะสร้างโคนิเดียและปลิวไปในอากาศ เมื่อโคนิเดียของเชื้อราตกลงบนส่วนต่างๆ ของข้าว (attachment) โคนิเดียจะเริ่มงอก (germination) ภายในระยะเวลา 30 – 90 นาที เมื่อพบสภาพแวดล้อมเหมาะสม ได้แก่ ความชื้นในอากาศสูง และอุณหภูมิอยู่ในช่วง 25 – 30 องศาเซลเซียส มีการเจริญของเส้นใยและทำการยึดเกาะที่ผิวใบข้าว ประมาณ 2 – 4 ชั่วโมงหลังจากนั้นเชื้อราจะสร้าง appressorium และใช้อวัยวะปลายแหลมที่เรียกว่า penetration peg แทงแทรกตัวเข้าไปในใบข้าว เชื้อราเจริญโดยใช้อาหารในข้าว ภายหลังจากเชื้อราเข้าทำลายประมาณ 7 วัน ข้าวจะแสดงบาดแผลที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคใหม่ (lesion) (ภาพที่ 2.2) การเข้าทำลายของเชื้อมักเกิดขึ้นในช่วงเวลากลางคืนซึ่งอุณหภูมิค่อนข้างเย็นและมีความชื้นสูง (พูนศักดิ์, 2548)



ภาพที่ 2.2 วงจรการเกิดโรคของเชื้อสาเหตุโรคไหม้

ที่มา : Wilson and Talbot (2009)

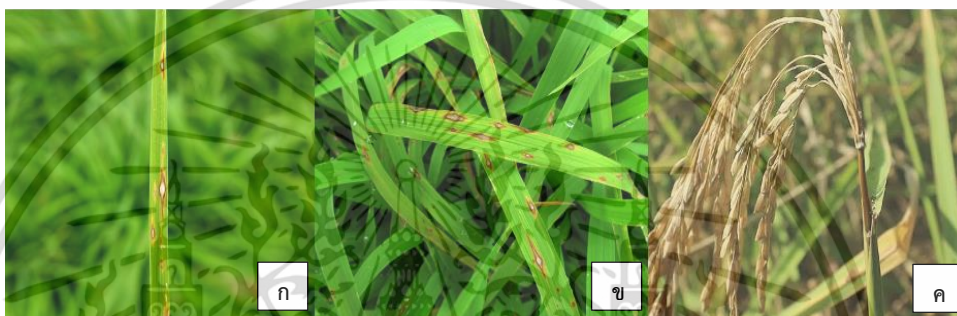
## 2.4 ลักษณะอาการและการแพร่ระบาดของโรคไหม้

เชื้อราสาเหตุโรคไหม้สามารถเข้าทำลายข้าวได้ทุกระยะตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง โดยเชื้อจะสร้างโคนิเดียปลิวไปในอากาศ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมได้แก่ ความชื้นในอากาศสูง อุณหภูมิอยู่ในช่วง 25 – 30 องศาเซลเซียส เมื่อสปอร์ตกลงบนใบข้าวในสภาพที่ใบข้าวเปียกชื้นนานกว่า 10 ชั่วโมงขึ้นไปจะพบการระบาดของโรคไหม้ โดยที่สปอร์จะเริ่มงอกเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมเพียง 30 – 90 นาที โดยอาศัยน้ำที่เกาะอยู่ที่ผิวใบข้าวในการงอกเส้นใยและใช้เวลาประมาณ 2 – 4 ชั่วโมงสร้าง appressorium เพื่อทำหน้าที่ยึดเกาะที่ผิวใบข้าวและใช้อวัยวะปลายแหลมที่เรียกว่า penetration peg แทรกตัวเข้าไปในเนื้อเยื่อใบและเจริญใช้อาหารในใบข้าว (พูนศักดิ์, 2548) โดยแบ่งอาการของโรคตามอายุของข้าวออกเป็น 3 ระยะ (ภาพที่ 2.3)

1) ระยะกล้า ที่ใบมีแผลจุดสีน้ำตาล ลักษณะคล้ายรูปตามีสีเทาอยู่ตรงกลางแผล ความกว้างของแผลประมาณ 2 – 5 มิลลิเมตร และความยาวประมาณ 10 – 15 มิลลิเมตร จุดแผลนี้สามารถขยายลุกลามจนแผลรวมกันทั่วบริเวณใบ ในกรณีที่โรครุนแรงต้นกล้าข้าวจะแห้งและตาย

2) ระยะแตกกอ อาการของโรคจะพบที่ใบ กาบใบ ข้อต่อของใบ และข้อต่อของลำต้น ขนาดของแผลจะใหญ่กว่าที่พบในระยะกล้า แผลที่ลุกลามติดต่อกันบริเวณข้อต่อใบจะมีลักษณะเป็นแผลซ้ำสีน้ำตาลดำ และใบมักหลุดจากกาบใบเสมอ

3) ระยะคอรวง ถ้าข้าวเริ่มออกรวงและถูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้เข้าทำลายจะทำให้เมล็ดลีบ แต่ถ้าเชื้อราเข้าทำลายตอนรวงข้าวแก่ใกล้เก็บเกี่ยว คอรวงจะปรากฏรอยแผลซ้ำสีน้ำตาล ทำให้รวงหักง่าย รวงข้าวจะได้รับความเสียหายมาก (กรมการข้าว, 2563) การแพร่ระบาดของโรคส่วนมากพบในแปลงที่ต้นข้าวหนาแน่นทำให้อับลม ถ้าใส่ปุ๋ยอัตราสูงและมีสภาพแห้งในตอนกลางวันและชื้นจัดในตอนกลางคืน น้ำค้างยาวนานถึงตอนสายราว 9 โมงเช้า อากาศค่อนข้างเย็น อุณหภูมิประมาณ 22 – 25 องศาเซลเซียส ลมแรงจะช่วยให้โรคแพร่กระจายได้ดี (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2552)



ภาพที่ 2.3 ลักษณะอาการของโรคไหม้ที่พบที่ใบในระยะกล้า (ก) ระยะแตกกอ (ข) และระยะคอรวง (ค)

ที่มา : ห้องปฏิบัติการโรคไหม้ข้าว ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## 2.5 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในข้าว

เชื้อสาเหตุโรคไหม้เป็นเชื้อราที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม และมีความแปรปรวนมากกว่าเชื้อราชนิดอื่น มีการเปลี่ยนแปลงได้อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาไม่กี่ชั่วอายุ เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม พบว่ามีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์และการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศทำให้เกิดเชื้อสายพันธุ์ใหม่ๆ ส่งผลให้เชื้อราสามารถเข้าทำลายข้าวที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ในระยะเวลาไม่ผ่านการศึกษาระชากรเชื้อโรคไหม้ในประเทศไทยของ Mekwatanakarn *et al.* (2000) พบว่าเชื้อโรคไหม้ในประเทศไทยมีความแปรปรวนและหลากหลายมากกว่าแหล่งปลูกข้าวอื่นๆ ของโลก เชื้อรามีความแตกต่างกันไปตามแหล่งปลูกข้าว ฤดูปลูก และระยะการเจริญเติบโตของข้าว

อัจฉราพร และพูนศักดิ์ (2552) เก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่ทำให้เกิดอาการบนข้าวต่างสายพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก และแปลงนาเกษตรกรบริเวณภาคเหนือตอนล่างในระหว่างฤดูปลูก พ.ศ. 2550 -2551 โดยเก็บจากนิเวศนาชลประทานและน่าน้ำฝน ในข้าวพื้นเมืองและข้าวไร่ รวบรวมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้ทั้งหมด 80 ไอโซเลท แยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำมาทดสอบกับชุดข้าว Near Isogenic Lines

(NILs) ของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) ที่มีฐานพันธุกรรมคล้ายกันแต่มียืนต้นทานโรคไหม้ที่แตกต่างกันสายพันธุ์ละ 1 ยืน รวมทั้งหมดจำนวน 18 สายพันธุ์ เพื่อจำแนก pathotype ของเชื้อรา พบว่าที่ความเหมือน 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถจำแนกเชื้อราได้ จำนวน 13 pathotype โดยมีสัดส่วนไอโซเลท: pathotype เท่ากับ 6:2:1 แสดงว่ามีความหลากหลายของเชื้อราในจังหวัดพิษณุโลกและพื้นที่ใกล้เคียงไม่มากนัก แต่พบว่าเชื้อราที่มีความรุนแรงมากเพราะพันธุ์ข้าวทดสอบที่มียืนต้นทานโรคไหม้ สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้เพียง 20 ไอโซเลท จาก 80 ไอโซเลท

เพ็ญญา และคณะ (2557) วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ (*Pyricularia grisea*) จำนวน 19 ไอโซเลท ซึ่งเก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทยด้วยเครื่องหมาย *Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) จำนวน 14 เครื่องหมาย โดยมีค่า Polymorphism information content (PIC) อยู่ระหว่าง 0 ถึง 0.8 จัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยวิธี SAHN สามารถจัดกลุ่มได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม 1 คิดเป็น 73 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อทั้งหมด ซึ่งเป็นเชื้อจากบริเวณภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง กลุ่ม 2 คิดเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อทั้งหมด เป็นเชื้อจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ และพบเชื้อจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือแยกออกเป็นเชื้อเดี่ยวในกลุ่ม 3 และ 4 โดยพบว่าความสัมพันธ์ของพันธุกรรมเชื้อไม่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มีการระบาดของโรคไหม้ และบริเวณที่มีการระบาดของโรคในจังหวัดเดียวกันมีจำนวนเชื้อเข้าทำลายข้าวมากกว่า 1 ไอโซเลท

Kawasaki *et al.* (2016) ศึกษาความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในประเทศญี่ปุ่น จำนวน 310 ไอโซเลท โดยการทดสอบความรุนแรงบนข้าว 25 พันธุ์ สามารถแบ่งเชื้อได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม I เป็นเชื้อที่ก่อโรคบนข้าวที่มียืนต้นทาน *Pik Pik-h Pik-p Pik-m Pil* และ *Pi7(1)* กลุ่ม IIa เป็นเชื้อที่ก่อโรคบนข้าวที่มียืนต้นทาน *Pia Pii Pi3* และ *Pi5(t)* และกลุ่ม IIb เชื้อที่ก่อโรคบนข้าวที่มียืนต้นทาน *Pik Pik-h Pik-p Pik-m Pil Pi7(1) Pia Pit Pi3* และ *Pi5(t)* โดยเชื้อในกลุ่ม I พบทางตอนเหนือของญี่ปุ่น กลุ่ม IIb พบที่ภาคกลางของญี่ปุ่น ในขณะที่กลุ่ม IIa พบได้ในแหล่งปลูกข้าวทั่วไปของญี่ปุ่น

วาริ และคณะ (2561) เก็บตัวอย่างในพื้นที่ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ในปี พ.ศ. 2560 รวมทั้งหมด 131 ตำแหน่ง โดยแบ่งออกเป็น ภาคเหนือ 8 จังหวัด ภาคกลาง 2 จังหวัด ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 16 จังหวัด และภาคใต้ 1 จังหวัด แยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี single conidia isolation การศึกษาลักษณะสัณฐานของ เชื้อ *P. oryzae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ RFA พบว่าโคโลนีของเชื้อมีการเจริญหลากหลาย ทั้งแบบมีขอบขรุขระ และขอบเรียบ โคโลนีของเชื้อมีตั้งแต่สีขาวจนถึงสีเทาดำ

Waktola (2022) เก็บตัวอย่างข้าวในเมืองปะเวและเมืองจะแวงของประเทศเอธิโอเปีย ในปี ค.ศ. 2020 และ ค.ศ. 2021 จำนวน 72 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี single conidia isolation

ได้จำนวน 45 ไอโซเลท และศึกษาลักษณะของเชื้อ *Pyricularia oryzae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า โคลนินของเชื้อมีการเจริญหลากหลาย มีทั้งแบบขอบเรียบ และขอบขรุขระ โคลนินของเชื้อมีสีขาว สีขาวอมเทา สีน้ำตาลเข้ม และสีดำ จากการวัดขนาดของโคนินเดียวพบว่าไอโซเลท Po56/779A มีขนาดความยาวและความกว้างของโคนินเดียวมากที่สุดอยู่ที่ 27.40 ไมโครเมตร และ 9.20 ไมโครเมตร ตามลำดับ และไอโซเลท Po4/744A มีขนาดความยาวและความกว้างของโคนินเดียวน้อยที่สุดอยู่ที่ 18.50 ไมโครเมตร และ 5.60 ไมโครเมตร ตามลำดับ

## 2.6 แหล่งของความต้านทานโรคไหม้และยีนต้านทานโรคไหม้

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ได้ข้าวพันธุ์ดีไม่ว่าจะเป็นการเพิ่มผลผลิต เพิ่มคุณภาพ หรือเพิ่มความต้านทานโรคหรือแมลง นอกจากจะต้องอาศัยวิธีการปรับปรุงพันธุ์ การผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ รวมไปถึงการทดสอบพันธุ์ที่เหมาะสม วัตถุประสงค์ที่สำคัญที่ขาดไม่ได้คือเชื้อพันธุ์ข้าว ยิ่งเชื้อพันธุ์ข้าวมีฐานทางพันธุกรรมกว้างและแปรปรวนมากเท่าใด โอกาสและความสำเร็จที่จะได้พันธุ์ตามต้องการก็จะมีมากขึ้น (วิชา, 2544) ความต้านทานต่อโรคไหม้ของยีนต้านทานแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ ลักษณะต้านทานแบบบางส่วน (partial resistance) และลักษณะต้านทานแบบสมบูรณ์ (complete resistance)

1) ลักษณะต้านทานแบบบางส่วน เป็นความต้านทานที่ถูกควบคุมด้วยยีนรอง หรือถูกควบคุมด้วยยีนหลายยีน ซึ่งเป็นลักษณะทางปริมาณ ทำให้ความต้านทานที่เกิดขึ้นเป็นแบบไม่จำเพาะต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ โดยมีลักษณะการควบคุมความต้านทานต่อเชื้ออย่างไม่สมบูรณ์ ทำให้เชื้อยังสามารถเข้าทำลายข้าวได้ แต่ไม่สามารถทำความเสียหายโดยสิ้นเชิง ยีนต้านทานแต่ละยีนทำหน้าที่ลดการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในระดับที่แตกต่างกัน (Ezuka, 1979) เป็นความต้านทานต่อโรคไหม้ที่คงทนอยู่ได้นาน โดยที่เชื้อสามารถเข้าทำลายได้ในระดับหนึ่ง (Bonman *et al.*, 1992) การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานแบบบางส่วนนี้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะพัฒนาพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานแบบยั่งยืน แต่การคัดเลือกข้าวให้มีความต้านทานต่อโรคไหม้ที่ถูกควบคุมด้วยยีนรองนั้น ในทางปฏิบัติทำได้ยาก เนื่องจากความต้านทานมาจากการแสดงออกของยีนหลายๆ ตัว อีกทั้งลักษณะความต้านทานแบบนี้ส่งผลให้พืชมีความต้านทานต่อเชื้อในระดับปานกลางจนถึงต่ำ และสามารถแปรเปลี่ยนได้เนื่องจากได้รับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม

2) ลักษณะต้านทานแบบสมบูรณ์ ถูกควบคุมด้วยยีนหลักที่มีผลในการแสดงออกของความต้านทานอย่างชัดเจน และมีความต้านทานที่จำเพาะกับสายพันธุ์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ โดยยีนจะยับยั้งการแสดงออกของเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ ทำให้พืชไม่แสดงออกถึงอาการของโรค (Koide *et al.*, 2009) ยีนต้านทานหลักจะป้องกันไม่ให้อาการดำเนินชีวิตของเชื้อราเป็นไปอย่างสมบูรณ์ อีกทั้งยังลดการสร้างสปอร์ของเชื้อ และป้องกันวิวัฒนาการปรับตัวของเชื้อ (Babujee and Gnanamanickam, 2000)

ยีนต้านทานโรคไหม้ที่พบนั้นร้อยละ 45 มาจากข้าวสายพันธุ์จาปอนิกา ร้อยละ 51 มาจากข้าวสายพันธุ์อินดิกา และร้อยละ 4 มาจากข้าวสายพันธุ์ป่า โดยส่วนใหญ่พบในข้าวพันธุ์ปลูกของเอเชีย โดยเฉพาะพันธุ์ข้าวจากจีนและญี่ปุ่น และยีน *Pi9*, *Pi54rh*, *Pi40(t)*, และ *Pirf2-1(t)* ที่พบในข้าวสายพันธุ์ป่า *O. minuta*, *O. rhizomatis*, *O. australiensis*, และ *O. rufipogon* ตามลำดับ (Wang et al., 2014)

เมทินี และคณะ (2552) ตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib*, *Pi-21* และ *Pi-ta* บนโครโมโซม 2, 6 และ 12 ตามลำดับ ในข้าวพื้นเมืองไทยจำนวน 110 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนต้านทานโรคไหม้ทั้ง 3 ยีน พบว่าข้าวพื้นเมืองของไทยจำนวน 79 ตัวอย่าง มียีนต้านทานโรคไหม้อย่างน้อยหนึ่งยีน และมีข้าวพื้นเมือง 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ข้าวขาวใหญ่ (D001) ข้าวตะหมาย (D016) และข้าวเหนียวแพรวไร่ (D058) ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ทั้ง 3 ยีน

อภิชาติ และคณะ (2552) ได้ประเมินเชื้อที่เป็นตัวแทนของประชากรเชื้อโรคไหม้จำนวน 120 สายพันธุ์ โดยพบว่าข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล (JHN) และ IR64 เป็นสายพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะความต้านทานแบบกว้าง (broad spectrum resistance) ต่อเชื้อโรคไหม้ที่ทดสอบ ซึ่งข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์ได้มีการนำมาพัฒนาเป็นประชากรสำหรับการหาตำแหน่งยีนที่เป็น Recombinant Inbred Lines จำนวน 587 สายพันธุ์จากคู่ผสม JHNxKDML105 และประชากร Double Haploid จำนวน 111 สายพันธุ์จากคู่ผสม AzucenaxIR64 ซึ่งสามารถวิเคราะห์และพบตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวเจ้าหอมนิลบนโครโมโซม 1 และ 11 โดยอยู่ระหว่างโมเลกุลเครื่องหมาย RM212 – RM319 และ RM139 – RM144 ตามลำดับ ส่วนยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าว IR64 นั้นวางตัวอยู่บนโครโมโซม 2 และ 12 โดยอยู่ใกล้กับโมเลกุลเครื่องหมาย RM208 และ RM179 ตามลำดับ

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

Teerasan et al. (2022) คัดเลือกพันธุ์ข้าวจากทั่วโลกจำนวน 451 พันธุ์ ประกอบด้วยพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของไทยจำนวน 363 พันธุ์ พันธุ์ข้าวของไทยจำนวน 21 พันธุ์ พันธุ์ข้าวของญี่ปุ่นจำนวน 43 พันธุ์ และพันธุ์ข้าวต่างๆ จากประเทศทั่วโลกจำนวน 24 พันธุ์ คัดเลือกโดยใช้เทคนิค PCR โดยใช้เครื่องหมายจำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้จำนวน 10 ยีน ได้แก่ *Pi9*, *Piz-t*, *Pi50*, *Pigm(t)*, *Pid2*, *Pid3*, *Pia*, *Pik*, *Pi54* และ *Pita* ผลการวิจัยพบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองของไทยและพันธุ์ของไทยจำนวน 382 พันธุ์ (ร้อยละ 99.48) มียีนต้านทานโรคไหม้อย่างน้อยหนึ่งยีน พบค่าความถี่ของยีนต้านทานโรคไหม้ข้าวอยู่ในช่วง 9.64–87.76 เปอร์เซ็นต์ โดยยีน *Pid3* มีค่าความถี่สูงสุด และยีน *Pi54* มีค่าความถี่ต่ำสุด ในพันธุ์ข้าวของ

ญี่ปุ่นพบยีน 2 ยีน ได้แก่ *Pik* และ *PI9* และพันธุ์ข้าวต่างๆ จากประเทศทั่วโลกพบยีนต้านทานโรคไหม้ *PI9* และ *PI54*

Wang *et al.* (2022) รายงานการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ 114 ยีน แต่มียีนต้านทานเพียง 36 ยีนเท่านั้นที่ได้รับการโคลน (clone) ยีนต้านทานโรคไหม้มากกว่าครึ่งหนึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 6, 11 และ 12 โดยพบยีนต้านทานโรคไหม้ประมาณร้อยละ 64 และยังพบยีนต้านทานโรคไหม้กระจายตัวอยู่เกือบทุกโครโมโซมของข้าว แต่โครโมโซม 3 และ 7 มีการพบการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้น้อย

## 2.7 การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการปรับปรุงพันธุ์

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection) และปรับปรุงพันธุ์ข้าวนั้นสามารถที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (Conventional breeding) โดยจะใช้ประโยชน์จากข้อมูลการวางตำแหน่งของยีนบนแผนที่จีโนมข้าว ซึ่งเป็นการหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอและลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจ เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หรือเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในงานด้านพันธุศาสตร์ และการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมาก เช่น ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ใช้เพื่อติดตามหายีนที่ควบคุมลักษณะที่ดีต่างๆ ใช้เป็นข้อมูลสำหรับวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนและสร้างแผนที่ยีน เป็นต้น ซึ่งแผนที่ของยีนที่ควบคุมลักษณะที่ดีต่างๆ เป็นข้อมูลสำคัญช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์ทราบถึงจำนวน ตำแหน่ง และอิทธิพลของยีนที่มีความสำคัญ เพื่อเป็นแนวทางในการผนวกรวมยีนเหล่านั้นเพื่อสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ได้อย่างรวดเร็ว เครื่องหมายดีเอ็นเอที่นำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านพืชมีหลายประเภท ได้แก่ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), Restriction Fragment Length Polymorphisms (RELP), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) และ Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ microsatellite โดยการเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ และคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละประเภท (จุฑาทพร, 2555)

### 2.7.1 Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ short nucleotide sequence ประมาณ 10 เบส เป็นไพรเมอร์ (primer) เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ primer นั้นสามารถจับได้โดยอาศัยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ข้อดีของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้คือทำได้ง่ายและประหยัดต้นทุนในการดำเนินงาน ใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นในปริมาณน้อย แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้เป็นแบบ dominant marker จึงไม่สามารถตรวจสอบ heterozygous ได้ (สุรินทร์, 2552)

### 2.7.2 Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)

เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) สามารถตรวจสอบโดยอาศัยหลักการเข้าคู่ (hybridization) ของดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับชิ้นดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ศึกษา ข้อดีของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้คือ การตรวจสอบแบบเจาะจงตำแหน่งที่แน่นอนบนโครโมโซม สามารถทำซ้ำได้ผลเหมือนเดิม สามารถแยกแยะแถบดีเอ็นเอแบบข่มร่วมกัน (co-dominance) ทำให้สามารถตรวจสอบ heterozygous ได้แต่มีข้อจำกัดที่สำคัญคือขั้นตอนซับซ้อน ใช้เวลานาน และค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานสูง (สุริพร, 2546)

### 2.7.3 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

เป็นเครื่องหมายที่รวมหลักการของ RFLP และ RAPD เข้าด้วยกันโดยการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) จากนั้นนำ adapter ของเอนไซม์มาเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ แล้วนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้หลักการ PCR ข้อดีของเครื่องหมายชนิดนี้คือพบ polymorphism สูงต่อการทำแต่ละครั้ง แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้เป็นแบบ dominant marker และที่สำคัญมีความยากในการเก็บข้อมูลและจำนวนขั้นตอนการทำที่ซับซ้อน (สุรินทร์, 2552)

### 2.7.4 Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ microsatellite

เครื่องหมาย SSR หรือ microsatellite เป็นหนึ่งในเครื่องหมายโมเลกุลที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ข้าว เนื่องจากมีความแม่นยำสูง เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบจำเพาะ ตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละ 1 ตำแหน่ง (single-locus marker) ลำดับเบสซ้ำๆ ท่อนสั้นๆ หรือแบบ microsatellite พบได้มากมายและกระจายตัวอยู่ทั่วจีโนม โดยลำดับเบสของ microsatellite มักเป็นลำดับเบสจำเพาะ มีเพียงตำแหน่งเดียวในจีโนม (unique sequence) ดังนั้นถ้าสามารถหาลำดับเบสที่อยู่สองข้างของบริเวณ microsatellite นำมาออกแบบสังเคราะห์ primer สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR จะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่จำเพาะเพียงบริเวณเดียว และเนื่องจาก microsatellite เป็นบริเวณที่มีการกลายพันธุ์โดยการลดลงหรือเพิ่มขึ้นของจำนวนชุดได้ง่าย การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่รวมเอาส่วนของ microsatellite ไว้ภายใน จะทำให้มีโอกาสได้ขนาดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เนื่องจากจำนวนชุดที่ไม่เท่ากัน การตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย microsatellite จึงพบ polymorphism ค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังสามารถแสดงแถบดีเอ็นเอแบบ co-dominance ทำให้สามารถตรวจสอบ heterozygous ได้ (สุรินทร์, 2552)

ศิริภา และคณะ (2552) ค้นหาคำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด microsatellite ค้นหาคำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อโอโซ

เลข B1-2 จากประชากรข้าว recombinant inbred lines (RILs) จำนวน 252 สายพันธุ์ซึ่งได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 กับพันธุ์เจ้าหอมนิล จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตโรคและรูปแบบอัลลีลของเครื่องหมาย microsatellite พบว่ายีนต้านทานโรคใหม่แบบจำเพาะในพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 8 ใกล้กับเครื่องหมาย RM72

Kumbhar *et al.* (2013) วิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ในประชากรข้าวข้าวที่ 2 จำนวน 147 ต้นที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ EK70 และพันธุ์ RDN98-2-3-5-14 ด้วยเครื่องหมาย RM204 มีค่า Chi square เท่ากับ 0.88 แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคใหม่เป็นไปตามอัตราส่วน 1:2:1 แสดงว่ามียีนต้านทานโรคใหม่ที่ควบคุมความต้านทานเพียงยีนเดียว

Parinthawong *et al.* (2015) ค้นหาพันธุกรรมควบคุมลักษณะและการระบุยีนต้านทานโรคใหม่ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย จากเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าวในภาคต่างๆ ของประเทศไทย จำนวน 19 ไอโซเลท ทดสอบการเกิดโรคบนประชากรข้าวข้าวที่ 2 จำนวน 250 ต้น ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่อ่อนแอต่อโรคใหม่ และข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) ซึ่งต้านทานโรคใหม่ พบการกระจายตัวของลักษณะต้านทาน : อ่อนแอโรคใหม่ในอัตราส่วน 15:1 แสดงว่าข้าวพันธุ์ห้วยมียีนหลักในการต้านทานโรคใหม่ 2 ยีนและตรวจพบว่า 1 ใน 2 ยีนนี้มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 11 มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM224 และ RM144 โดยมีระยะห่างจากเครื่องหมายทั้งสองเป็นระยะทาง 20 cM

Farahzadi *et al.* (2020) นำเครื่องหมาย SSR จำนวน 10 เครื่องหมายที่จำเพาะต่อโรคใหม่ โดยใช้พันธุ์ข้าวอินดิกาจำนวน 30 พันธุ์ ทำการประเมินความต้านทานโรคใหม่ โดยปลูกเชื้อ *Magnaporthe oryzae* ลงบนต้นข้าวในระยะที่มีใบ 3 หรือ 4 ใบ จากการวิเคราะห์พบว่า เครื่องหมาย RM204 มีค่า Polymorphic information content (PIC) สูงสุดคือ 0.60 และเครื่องหมาย RM413 มีค่า PIC ต่ำสุดคือ 0.081 และจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยวิธี UPGMA สามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม และพบเครื่องหมาย RM277 และ RM8225 เป็นเครื่องหมายที่สามารถคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคใหม่ในรัฐมอแซนแดรอนและรัฐกิลันของประเทศอิหร่านได้

Meena *et al.* (2022) ค้นหายีนต้านทานโรคใหม่จำนวน 10 ยีน ได้แก่ *Piz*, *Piz-t*, *Pita*, *Pita-2*, *Pib*, *Pi2*, *Pi9*, *Pik*, *Pik-p*, *Pik-h* และ *Pii* ในข้าวจำนวน 45 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR จำนวน 26 เครื่องหมายที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนต้านทานโรคใหม่ จากการตรวจสอบพบว่า เครื่องหมาย RM279 มีค่า Polymorphic information content (PIC) สูงสุดคือ 0.88 และเครื่องหมาย RM449 มีค่า PIC ต่ำสุดคือ 0.50 และจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยวิธี UPGMA สามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่ม และพบยีนต้านทานโรคใหม่ *Pik-h* ในข้าวจำนวน 44 พันธุ์ คิดเป็น 97.8 เปอร์เซ็นต์ของพันธุ์ข้าวทั้งหมดที่ทำการตรวจสอบ

## 2.8 การสร้างแผนที่พันธุกรรม

แผนที่พันธุกรรม (linkage map) หรือเส้นทางบนโครโมโซมที่วาดขึ้นโดยใช้ข้อมูลจากพ่อแม่ที่แตกต่างกัน แสดงถึงตำแหน่งและระยะห่างของแต่ละเครื่องหมายตลอดเส้นทางที่เปรียบเสมือนหลักกิโลเมตรบอกระยะทางบนถนนทางหลวง ประโยชน์ของแผนที่พันธุกรรมเพื่อระบุตำแหน่งที่สนใจบนโครโมโซม ซึ่งจะอาศัยหลักของยีนและเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีการกระจายตัวอยู่ในรูปแบบต่างๆ ผ่านการเกิด crossing-over ในระหว่างขบวนการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ (meiosis) ทำให้สามารถตรวจสอบการกระจายตัวในรุ่นลูก ยีนหรือเครื่องหมายที่อยู่ใกล้กันจะมีการถ่ายทอดไปด้วยกันไม่แยกออกจากกันโดยจะมีสภาพเหมือนในลักษณะเช่นเดียวกันกับพ่อแม่ ในขณะที่ยีนหรือเครื่องหมายที่อยู่ห่างกันจะมีการกระจายตัวแยกจากกันขึ้นกับระยะห่างระหว่างกัน ความถี่ในการเกิดการรวมตัวใหม่ของยีน (recombination) สามารถนำมาใช้คำนวณระยะห่างระหว่างยีนหรือเครื่องหมายได้ โดยความถี่ของการเกิดจะมีน้อยเมื่อยีนหรือเครื่องหมายอยู่ใกล้กันบนโครโมโซม แต่จะมีมากเมื่ออยู่ห่างกัน เมื่อยีนหรือเครื่องหมายทั้งสองที่มีความถี่ของการเกิดการรวมตัวใหม่ของยีนมากกว่าหรือเท่ากับ 50% หมายความว่าเครื่องหมายทั้งสองแยกกลุ่มกัน โดยทั้งสองเครื่องหมายอาจจะอยู่ห่างกันมากในโครโมโซมเดียวกันหรืออยู่คนละโครโมโซมกันก็ได้ ค่าความถี่ของการเกิดการรวมตัวใหม่ของยีน 1 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1 centiMorgan (cM) (ธานี, 2555)

การคำนวณการเกาะกลุ่มและลำดับของเครื่องหมายดีเอ็นเอจะต้องมีการแปลงข้อมูลแถบดีเอ็นเอให้เป็นข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ หรือสามารถคำนวณได้เองถ้ามีเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวนไม่มาก การเกาะกลุ่มกันของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่คำนวณด้วยคอมพิวเตอร์นั้นมีหลักการของ odds ratio คือการเปรียบเทียบระหว่างอัตราส่วนของการเกาะกลุ่มกับการแยกกลุ่ม แล้วค่าที่ได้จะถูกนำมาแสดงเป็นค่า logarithm ของอัตราส่วนดังกล่าว ซึ่งจะเรียกว่าค่า logarithm of odds (LOD) โดยค่า LOD ที่มากกว่า 3 จะใช้เป็นค่ามาตรฐานในการสร้างแผนที่พันธุกรรม ค่า LOD เท่ากับ 3 ของระหว่างสองเครื่องหมายดีเอ็นเอหมายถึงโอกาสที่เครื่องหมายทั้งสองจะเกาะกลุ่มกันเป็น 1,000 เท่าของค่าโอกาสที่จะไม่เกาะกลุ่มกัน (1,000 : 1 ของ linkage : no linked) โปรแกรมที่สามารถใช้สำหรับการคำนวณเช่น โปรแกรม MapMaker และ JoinMap เป็นต้น (สุรินทร์, 2552)

การทำแผนที่ยีนหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ควบคุมลักษณะปริมาณ (QTL mapping) หรือการวิเคราะห์ QTL เป็นการหาความสัมพันธ์ของข้อมูล phenotype และ genotype ในประชากรที่สร้างขึ้น แต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอจะแบ่งกลุ่มของประชากรตามค่า genotype ของตำแหน่งบนแผนที่พันธุกรรม กลุ่มที่ได้จะขึ้นอยู่กับชนิดของประชากรและเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ เมื่อกลุ่มที่แบ่งออกมีค่าเฉลี่ยของลักษณะที่ต้องการหาตำแหน่งยีนมีความแตกต่างกันทางสถิติจะแสดงถึงการปรากฏของยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการ ส่วนเครื่องหมายที่แบ่งกลุ่มประชากรแล้วค่าเฉลี่ยของลักษณะที่ต้องการหาตำแหน่ง

ยีนไม่แตกต่างกันจะแสดงถึงการที่เครื่องหมายที่อยู่บริเวณนั้นไม่มีความสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการ โปรแกรมที่สามารถใช้ในการวิเคราะห์เช่น MapMaker, nQTL, JoinMap และ QTL cartographer เป็นต้น (ธานี, 2555)

เพ็ญภา (2557) สร้างแผนที่ยีนต้านทานโรคไหม้ โดยนำประชากรข้าวข้าวที่ 2 ที่ได้มาจากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ห้วย จำนวน 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ อย่างชัดเจนมาคำนวณหาค่าระยะห่างของแต่ละเครื่องหมายและระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MapMaker และวาดแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapChart จัดกลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอและยีนต้านทานโรคไหม้ที่มีความใกล้ชิดกันที่ค่า logarithm of odds (LOD) =3.0 พบเครื่องหมายที่มีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ห้วย (GS19769) คือ เครื่องหมาย RM144 RM224 RM5926 และ RM6094 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 11 โดยมีระยะห่างจากเครื่องหมาย RM144 และ RM224 เป็นระยะทางเท่ากันคือ 13.7 cM ห่างจากเครื่องหมาย RM5926 เป็นระยะทาง 17.1 cM และห่างจากเครื่องหมาย RM6094 เป็นระยะทาง 20.5 cM

ศิริพร (2560) วิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้โดยวิธีทดสอบการเกิดโรคในประชากรข้าวข้าวที่ 2 ที่ได้มาจากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ยิ้มมอง พบต้นที่แสดงความอ่อนแอจำนวน 48 ต้น เมื่อใช้ข้อมูล phenotype และ genotype ของประชากรทั้ง 48 ต้น มาสร้างแผนที่ยีนต้านทานโรคไหม้ ทำการจัดกลุ่มและคำนวณหาค่าระยะห่างของแต่ละเครื่องหมายและระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MapMaker และวาดแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapChart จัดกลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอและยีนต้านทานโรคไหม้ที่มีความใกล้ชิดกันที่ค่า logarithm of odds (LOD) =3.0 พบว่ายีนต้านทานโรคไหม้ห่างจากเครื่องหมาย RM543 เป็นระยะทาง 21.2 cM ห่างจากเครื่องหมาย RM431 เป็นระยะห่าง 10.5 cM และห่างจากเครื่องหมาย RM443 เป็นระยะห่าง 3.2 cM โดยมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 1

Zheng *et al.* (2020) ระบุตำแหน่งยีนต้านทาน โดยทดสอบปฏิกิริยาการเกิดโรคไหม้บนข้าว introgression lines (ILs) จำนวน 1,160 พันธุ์ จากการทดสอบพบว่าข้าว ILs จำนวน 33 พันธุ์ แสดงความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ ซึ่งหนึ่งในนั้นคือพันธุ์ IL1043 สามารถต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ได้ถึง 28 ไอโซเลท ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pic1(t)* มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM527 บนโครโมโซม 6

Korinsak *et al.* (2022) ระบุตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ โดยใช้เชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 17 ไอโซเลท ที่รวบรวมจากประเทศไทยและลาว นำมาทดสอบลงบนประชากรข้าว Recombinant Inbred Lines (RILs) จำนวน 587 สายพันธุ์ ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์เจ้าหอมนิล และพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 เพื่อระบุตำแหน่งยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความต้านทานโรคไหม้

พบ *qBSRLs* ซึ่งควบคุมลักษณะความต้านทานแบบกว้าง โดยวางตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 1 และ 11 และ *qRSRLs* ซึ่งควบคุมลักษณะความต้านทานแบบเฉพาะ วางตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 8 และ 12

Korinsak *et al.* (2023) ระบุตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรครไหม้ที่ใบและคอรวง โดยใช้เชื้อราสาเหตุโรครไหม้จำนวน 23 ไอโซเลท ที่แยกเชื้อได้จากใบและคอรวง นำมาทดสอบลงบนประชากรข้าว Double Haploid จำนวน 111 สายพันธุ์ ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ IR64 และพันธุ์ Azucena พบยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรครไหม้ที่ใบ โดยยีนมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 1, 2, 4, 7, 8, 10, 11 และ 12 ในขณะที่ยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรครไหม้ที่คอรวง พบยีนอยู่บนโครโมโซมที่ 1, 6, 10 และ 12



## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์และวัสดุการวิจัย

##### 3.1.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้ทดสอบ

- 3.1.1.1 ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105
- 3.1.1.2 ข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ดอกพยอมไร่
- 3.1.1.3 ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล เป็นพันธุ์ต้านทานโรคไหม้
- 3.1.1.4 ข้าวพันธุ์ IR64 เป็นพันธุ์ต้านทานโรคไหม้

##### 3.1.2 ปุ๋ยเคมี

- 3.1.2.1 ปุ๋ยสูตร 46-0-0 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O)

##### 3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อรา

- 3.1.3.1 Potato dextrose agar (PDA)
- 3.1.3.2 Rice flour agar (RFA)

##### 3.1.4 สารเคมี

- 3.1.4.1 absolute ethyl alcohol (Merck, Germany)
- 3.1.4.2 acetic acid (VWR international S.A.S., France)
- 3.1.4.3 acrylamide solution 40 % (29:1:0.9) (Merck, Germany)
- 3.1.4.4 agarose gel (Vivantis, Malaysia)
- 3.1.4.5 ammonium persulphate (APS, Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.4.6 bromophenol blue (Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.4.7 boric acid (VWR international, UK)
- 3.1.4.8 chloroform (VWR international S.A.S, France)
- 3.1.4.9 clear view (Tri-V international, USA)
- 3.1.4.10 ethyl alcohol (Merck, Germany)
- 3.1.4.11 ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA) (EMD chemicals, Germany)
- 3.1.4.12 formaldehyde (Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.4.13 gelatin (Gelita AG, Germany)
- 3.1.4.14 Glass Bond (National diagnostics, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.4.15 Terra PCR Direct (Clontech Laboratories, USA)
- 3.1.4.16 tetramethylethylenediamine (TEMED) (EMD chemicals, Germany)
- 3.1.4.17 Tris (hydroxymethyl) aminomethane (EMD chemicals, Germany)
- 3.1.4.18 silver nitrate (Merck, Germany)
- 3.1.4.19 sodium hydroxide (Merck, Germany)
- 3.1.4.20 urea (Ajax Finechem, Australia)
- 3.1.5 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 10 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, UK)
- 3.1.6 เครื่องหมายดีเอ็นเอ เครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่ครอบคลุมทั้ง 12 โครโมโซมของข้าว จำนวนทั้งหมด 230 เครื่องหมาย (<http://www.gramene.org>)
- 3.1.7 อุปกรณ์
  - 3.1.7.1 กล้อง stereo microscope
  - 3.1.7.2 กระบะปลูก ขนาด กว้าง 7 หลุม ยาว 12 หลุม
  - 3.1.7.3 กระถางปลูกขนาด 10 นิ้ว
  - 3.1.7.4 เครื่องแก้วและบีกเกอร์ขนาดต่างๆ
  - 3.1.7.5 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, BP221S, Germany)
  - 3.1.7.6 เครื่องปั่นสารและให้ความร้อน (Wisestir, MSH-20A, Korea)
  - 3.1.7.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Eppendorf Model 5418, USA)
  - 3.1.7.8 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Biometra, Germany)
  - 3.1.7.9 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Eppendorf, Model 6132, Germany)
  - 3.1.7.10 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (SchottcG 842, Germany)
  - 3.1.7.11 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (ConsortGermany)
  - 3.1.7.12 ชุด Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Bio-Active, UK)
  - 3.1.7.13 ชุดอุปกรณ์สำหรับเลี้ยงเชื้อ
  - 3.1.7.14 ชุดอุปกรณ์สำหรับผสมพันธุ์ข้าว
  - 3.1.7.15 ไมโครปิเปต (Gilson, France)
  - 3.1.7.16 เม็ด bead
  - 3.1.7.17 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Mettmert, SV-1422, Germany)
  - 3.1.7.18 อุปกรณ์สำหรับปลูกเชื้อ
  - 3.1.7.19 PCR plate (Thermoscientific, UK)
  - 3.1.7.20 Tip ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.1.7.21 microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และ 2 มิลลิลิตร

## 3.2 วิธีการวิจัย

### 3.2.1 ศึกษาความต้านทานของข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่ต่อประชากรเชื้อรา

#### 3.2.1.1 การเตรียมต้นกล้าข้าว

ปลูกข้าวพื้นเมืองพันธุ์ดอกพยอมไร่ ข้าวดอกมะลิ 105 เจ้าหอมนิล และ IR64 โดยเพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวทั้ง 4 พันธุ์ในกระตาะขีที่ชุ่มน้ำ เมื่อข้าวเริ่มงอก ย้ายลงเพาะในกระบะปลูกขนาดกว้าง 3 หลุม ยาว 4 หลุม โดยแต่ละพันธุ์จะปลูกจำนวน 3 หลุม หลุมละ 2 ต้น เมื่อข้าวมีอายุ 14 วันทำการประเมินความต้านทานโรคใหม่ต่อเชื้อสาเหตุโรคใหม่จำนวน 25 ไอโซเลท

#### 3.2.1.2 การเตรียมสารแขวนลอยโคโคนิดีของเชื้อราสาเหตุโรคใหม่

เตรียมสารแขวนลอยโคโคนิดีจากเชื้อราสาเหตุโรคใหม่โดยนำเชื้อรามาล้างบนอาหารเลี้ยงเชื้อ RFA ปลอ่ยให้เชื้อราเจริญเป็นเวลา 8 – 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำเชื้อรามากกระตุ้นให้เกิดการสร้างโคโคนิดีโดยใช้น้ำกลั่นหยดลงบนผิวหน้าอาหารปริมาณ 200 ไมโครลิตร แล้วใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลลูบบริเวณเส้นใยบนผิวหน้าอาหาร เป็นการทำลายเส้นใยเพื่อกระตุ้นให้เชื้อราสร้างโคโคนิดี แล้วบ่มให้เชื้อราสร้างโคโคนิดีเป็นเวลา 2 วัน จะได้โคโคนิดีเป็นจำนวนมาก จากนั้นเก็บโคโคนิดีของเชื้อราด้วยการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขูดโคโคนิดีให้หลุดออกจากเส้นใย กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วปรับความเข้มข้นโคโคนิดีให้ได้  $1 \times 10^5$  โคโคนิดีต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 24 มิลลิลิตร และผสมสารละลายเจลาตินความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 6 มิลลิลิตร เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยึดเกาะของโคโคนิดี

#### 3.2.1.3 การปลูกเชื้อสาเหตุโรคใหม่บนต้นกล้าข้าว

ปลูกเชื้อสาเหตุโรคใหม่บนกล้าข้าวตามวิธีของ Roumen *et al.* (1997) โดยปลูกเชื้อสาเหตุโรคใหม่ 25 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.1) ที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^5$  โคโคนิดีต่อมิลลิลิตร เตรียมปริมาณ 24 มิลลิลิตร และผสมสารละลายเจลาตินความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 6 มิลลิลิตรต่อกระบะปลูกขนาดกว้าง 7 หลุม ยาว 12 หลุม ใช้วิธีปลูกเชื้อโดยฉีดยาลงบนใบข้าวอายุ 2 สัปดาห์ที่ปลูกอยู่ในถาดหลุม หลังจากปลูกเชื้อใช้กล่องที่ปิดด้วยพลาสติกสีดำครอบถาดข้าวไว้และให้ความชื้นโดยบ่มในห้องอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายไปเก็บในโรงเรือน และทำการฉีดพ่นด้วยน้ำเปล่าในช่วงเวลากลางวันในทุกๆ 4 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการก่อโรคของเชื้อรา

ตารางที่ 3.1 เชื้อสาเหตุโรคใหม่ 25 ไอโซเลทที่ใช้ในการทดสอบความต้านทานโรคและแหล่งที่มา

จังหวัด	ไอโซเลท
กรุงเทพฯ	BKK55001 BKK55003
ฉะเชิงเทรา	CCO55002 CCO55004
เชียงราย	CRI 34.1
ขอนแก่น	KKN61067 KKN7357
หนองคาย	NKI47181
พัทลุง	PL1 PL2
พิษณุโลก	PLK 40.4 THL191 THL794
ราชบุรี	RBR55001 RBR55003
สกลนคร	SKN60867
สุรินทร์	SRN54002 SRN54005 SRN54007
อุบลราชธานี	UBN11308 UBN11351 UBN13515 UBN195167 UBN196171 UBN207129

#### 3.2.1.4 วิธีประเมินการเกิดโรค

หลังการปลูกเชื้อ 7 วัน ทำการเก็บผลการทดลอง โดยประเมินปฏิกิริยาต่อโรคของเชื้อราและให้คะแนนการเกิดโรคโดยใช้ระดับคะแนนการเกิดโรค 7 ระดับของ Roumen *et al.* (1997) ดังนี้ (ภาพที่ 3.1)

0 คือ ไม่ปรากฏแผล

1 คือ แผลจุดกลมสีน้ำตาลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร

2 คือ เกิดแผลกลมหรือยาวรีเล็กน้อยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.5 – 1 มิลลิเมตร

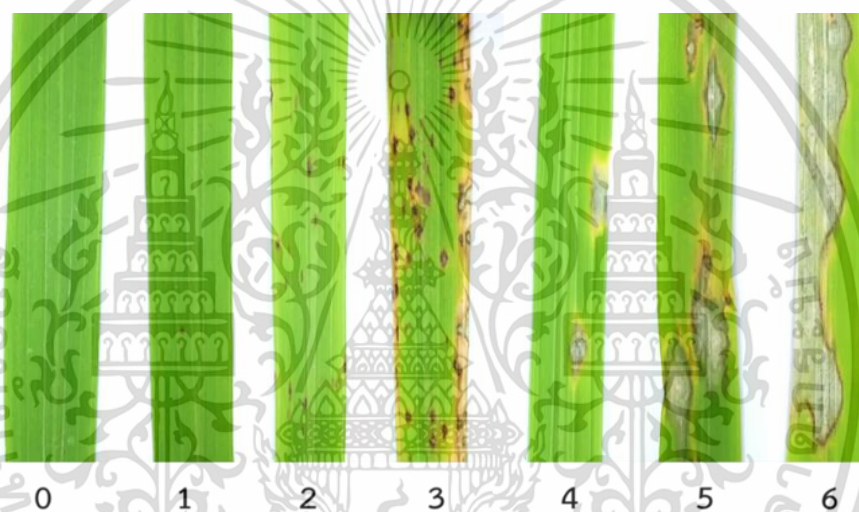
3 คือ เกิดแผลจุดเล็ก ขนาดประมาณ 1 – 3 มิลลิเมตร มีจุดสีเทาตรงกลางแผล

4 คือ เกิดแผลจุดขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร หรือยาวกว่า แผลเป็นสีเทามีขอบแผลสีน้ำตาล

5 คือ เกิดแผลสีเทาเกาะกันเป็นกลุ่ม มีขอบแผลสีน้ำตาล เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค

6 คือ เกิดแผลลุกลามยาวติดต่อกันเป็นสีเทา ไม่มีขอบแผลที่แน่นอนเป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค

แบ่งความต้านทานออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ระดับ 0 1 และ 2 เป็นกลุ่มที่แสดงความต้านทานโรคไหม้ในระดับสูง ในระดับ 3 และ 4 เป็นกลุ่มที่แสดงความต้านทานโรคไหม้ในระดับปานกลาง และในระดับ 5 และ 6 เป็นกลุ่มที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้



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

ที่มา : ห้องปฏิบัติการโรคไหม้ข้าว ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### 3.2.2 การผสมพันธุ์เพื่อผลิตข้าวลูกผสม

#### 3.2.2.1 การผสมพันธุ์ข้าวเพื่อผลิตลูกผสมชั่วที่ 1 ( $F_1$ - hybrid)

ผสมข้ามพันธุ์โดยใช้พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) เป็นพันธุ์แม่ (female parent) และข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ดอกพยอมไร่ (GS23774) เป็นพันธุ์พ่อ ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ที่ผ่านการตรวจสอบแล้วจากงานวิจัยในโครงการค้นหาพันธุกรรมต้านทานโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *P. oryzae* จากแหล่งพันธุกรรมข้าวพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย (Salih *et al.*, 2013) เริ่มจากการเตรียมช่อดอกฝ่ายแม่ (KDML105) ในช่วงเวลาเย็นก่อนผสมพันธุ์ 1 วัน โดยการทำหมันเพศผู้ (emasculatation)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยเลือกช่อดอกในระยะโผล่ช่อดอก (heading) ใช้กรรไกรตัดดอกที่ผสมตัวเองไปแล้วบริเวณปลายช่อดอกและดอกอ่อนเกินไปบริเวณโคนช่อดอกทิ้ง เหลือไว้เฉพาะดอกที่จะพร้อมผสมในวันถัดไปประมาณ 20 ดอกต่อช่อ สังเกตได้จากอับละอองเกสรอยู่ในตำแหน่งประมาณครึ่งของความยาวกาบหุ้มดอก จากนั้นใช้กรรไกรตัดปลายกาบหุ้มดอกประมาณ 1 ใน 2 ของกาบหุ้มดอกเฉียงทำมุมประมาณ 45 องศาใช้ปลายหมุดเขี่ยอับเกสรเพศผู้ (anther) ทั้งหมดจำนวน 6 อับเกสรออกจากกาบหุ้มดอกด้วยความระมัดระวัง ฟันดอกเพศเมียด้วยน้ำเปล่าเพื่อให้ความชุ่มชื้นแก่ดอก คลุมด้วยขวดพลาสติกเจาะรู ตรวจสอบดอกฝ่ายแม่ที่เตรียมไว้อีกครั้งในช่วงเช้าของวันถัดไปว่าไม่มีอับเกสรตัวผู้หลงเหลืออยู่ นำเกสรเพศผู้จากดอกข้าวพันธุ์พ่อ มาถ่ายลงบนยอดเกสรเพศเมีย (stigma) โดยอาจนำทั้งช่อดอกมาเคาะไถ่ๆ ยอดเกสรเพศเมียเพื่อให้ละอองเกสร (pollen grain) ตกลงบนยอดเกสรเพศเมีย หรือคืออับละอองเกสร (anther) ใส่ไว้ในกาบดอกเพศเมียที่เตรียมไว้ ผูกป้ายชื่อไว้กับช่อดอก ระบุชื่อพันธุ์พ่อและแม่พร้อมระบุวันที่ทำการผสมพันธุ์ (hybridization) ปล่อยให้มีการผสมพันธุ์ และเก็บเกี่ยวเมล็ดหลังจากวันที่ผสมพันธุ์แล้วประมาณ 30 วัน และนำเมล็ด ( $F_1$  - seed) มาทำลายการพักตัวของเมล็ดโดยการตากแดด 2 สัปดาห์แล้วนำมาเก็บไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 6 สัปดาห์ และนำไปปลูกเพื่อขยายให้ได้ประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ต่อไป

### 3.2.2.2 การสร้างประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 ( $F_2$ population)

เพาะเมล็ดข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ( $F_1$  - hybrid seed) ที่ได้จากการผสมข้าม ในกระดาดชิกชูที่ชุ่มน้ำ เมื่อข้าวเริ่มงอก ย้ายลงเพาะในถาดหลุมเพื่อให้ต้นกล้าแข็งแรง เมื่อข้าวอายุ 2 สัปดาห์ (มีใบประมาณ 3 - 4 ใบ) ย้ายลงกระถางขนาด 10 นิ้ว และใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 เมื่อข้าวอายุ 1 2 และ 3 เดือนในปริมาณที่เหมาะสม เมื่อข้าวเริ่มตั้งท้อง ปล่อยให้มีการผสมตัวเองตามธรรมชาติ (selfed) บันทึกลักษณะประจำพันธุ์ในแต่ละช่วงอายุของข้าว ทั้งในข้าวลูกผสม ( $F_1$  - hybrid) และข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อและแม่ เก็บเมล็ดพันธุ์ ( $F_2$  - seed) ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เพื่อทำลายระยะพักตัวของเมล็ดเพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวชั่วที่ 2 ( $F_2$  - seed) ในกระดาดชิกชูที่ชุ่มน้ำ เมื่อข้าวเริ่มงอก ย้ายลงเพาะในกระบะปลูกขนาดกว้าง 7 หลุม ยาว 12 หลุม ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 จำนวน 2 ครั้ง ครั้งแรกใส่ปุ๋ยประมาณ 5 กรัมต่อกระบะ หลังจากทำการย้ายกล้าแล้ว และใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 ประมาณ 1 กรัมต่อกระบะ หลังจากต้นกล้าข้าวมีอายุ 7 วัน ทำการทดสอบความต้านทานโรคไหม้ เมื่อข้าวมีอายุ 14 วัน

### 3.2.3 การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าว

วิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ( $F_2$  population) จากข้อมูล phenotype ที่ได้ ด้วยการทดสอบ Chi square โดยวิเคราะห์การกระจายตัว

ของประชากรข้าวข้าวที่ 2 ว่าเป็นไปตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel (ฟังก์ชัน CHISQ.TEST) โดยกำหนดให้ระดับคะแนนการเกิดโรค 0 – 4 หมายถึงลักษณะต้านทาน และ 5 – 6 หมายถึงลักษณะอ่อนแอ

### 3.2.4 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ในประชากรข้าวข้าวที่ 2 ( $F_2$ population)

#### 3.2.4.1 การคัดเลือกเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้

คัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพ่อและแม่ จากจำนวนเครื่องหมาย SSR ทั้งหมด 230 เครื่องหมายที่ครอบคลุมโครโมโซมข้าวทั้ง 12 โครโมโซม (ตารางผนวกที่ 1)

#### การสกัดดีเอ็นเอใบข้าว

สกัดดีเอ็นเอข้าวพันธุ์พ่อ คือ ข้าวพื้นเมืองพันธุ์ดอกพยอมไร่ และข้าวพันธุ์แม่ คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia) ตามขั้นตอน ดังนี้ นำใบข้าวมาบดด้วยไนโตรเจนเหลว และแบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม buffer PL ปริมาตร 280 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายใส่หลอด microtube หลอดใหม่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เติม buffer PB ปริมาตร 600 ไมโครลิตร (ก่อนใช้นำมาอุ่นในเครื่อง hot air oven ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติม absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ดูดสารละลายใส่ใน column ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เท Wash buffer ที่ทิ้งแล้ว ปั่นเหวี่ยงอีกรอบ เซลล์ดีเอ็นเอออกจาก column โดยการเติม Elution buffer (ก่อนใช้นำมาอุ่นในเครื่อง hot air oven ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร รอ 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อเก็บสารละลายดีเอ็นเอ วิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เตรียมดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา PCR

#### การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR นำดีเอ็นเอที่ปรับความเข้มข้นเป็น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 10

ไมโครลิตรประกอบด้วย ดีเอ็นเอความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร น้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 5.9 ไมโครลิตร 10X *Taq* polymerase buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร dNTPs ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร  $MgCl_2$  ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร *Taq* polymerase (1 ยูนิต/ไมโครลิตร) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ส่วนผสมระหว่าง Forward Primer (5 ไมโครโมลาร์) และ Reverse Primer (5 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร โดยกำหนดอุณหภูมิและจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ และ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที จำนวน 1 รอบ นำไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

การวิเคราะห์ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR

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

#### 1) การเตรียม chamber และกระจก

ทำความสะอาดแผ่นกระจกและ chamber ด้วย ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ให้ทั่วทั้งแผ่น จากนั้นเช็ดแผ่นกระจกด้วย ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 992.5 ไมโครลิตร ที่ผสมด้วย glass bond ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร และ acetic acid ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เช็ดให้ทั่วกระจก แล้วเช็ดตามด้วย ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้งให้ทั่วกระจก ส่วน chamber เช็ดด้วย clear view ให้ทั่ว chamber และเช็ดตามด้วย ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง เมื่อเช็ดกระจกเสร็จแล้วให้นำกระจกและ chamber มาประกบกัน โดยคั่นด้วย spacer ขนาดความหนา 0.5 มิลลิเมตร โดยวาง spacer ที่ด้านริมกระจก ทั้ง 2 ด้าน แล้วใช้คลิปหนีบกระจกบริเวณส่วนของ spacer ทั้ง 2 ข้างเพื่อยึดกระจกก่อนเทเจล

#### 2) การเตรียม acrylamide gel

เตรียม acrylamide gel โดยมีส่วนประกอบคือ acrylamide gel ที่ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย acrylamide solution ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 7.5 มิลลิลิตร ยูเรีย 21.03 กรัม และ 10X TBE ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติม Ammonium persulphate ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบาๆ เท acrylamide gel ลงในช่องว่างระหว่างกระจกกับ chamber จนเต็ม ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ เสียบหวีด้านที่ไม่มีซี่

แหลมลงปาด้านบนให้ลึก 0.5 เซนติเมตร เพื่อให้เกิดช่องว่าง วางทิ้งไว้ในแนวราบ ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อเจลแข็งตัวแล้วทำความสะอาดกระจกและเช็ดยูเรียส่วนเกินออก

### 3) การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

ประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส เต็ม 1X TBE buffer ลงในช่องด้านบนและช่องด้านล่าง เสร็จแล้วทำการ pre-run โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 70 วัตต์ หรือประมาณ 1600 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที แล้วปิดเครื่อง ปล่อยให้ยูเรียส่วนเกินออกโดยใช้ไมโครปิเปต และเสียบหัวด้านซีแหลมปกลงบนผิวหน้าของเจล เตรียมตัวอย่างโดยเติม sequencing dye ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงในผลผลิต PCR ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หยอดตัวอย่าง ปริมาณ 2 ไมโครลิตรต่อช่อง พร้อมทั้ง DNA standard marker ขนาด 10 คู่เบส ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ปล่อยให้กระแสไฟฟ้าโดยใช้กำลังไฟที่ 45 วัตต์ นาน 5 นาที ดึงหรือออก ปล่อยให้กระแสไฟฟ้าอีกครั้งนาน 2 ชั่วโมง เมื่อเสร็จแล้วแยกกระจกและ chamber ออกจากกัน

### 4) การตรวจสอบผลด้วยการย้อม Silver staining

ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate ตามวิธีการของ Benbouza *et al.* (2006) โดยมีขั้นตอนดังนี้ 1) fixation ด้วย สารละลายปริมาณ 2 ลิตร ที่ประกอบด้วย absolute alcohol 10 เปอร์เซ็นต์ และ acetic acid 0.5 เปอร์เซ็นต์ แช่นาน 5 นาที 2) impregnation ด้วย สารละลายปริมาณ 2 ลิตร ที่ประกอบด้วย silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) ปริมาณ 3 กรัม และ formaldehyde 37 เปอร์เซ็นต์ แช่นาน 7 นาที 3) ล้างโดยการนำเจลที่ติดกับกระจกจุ่มลงในน้ำกลั่นแล้วยกขึ้นทันที 4) development ด้วยสารละลายปริมาณ 2 ลิตร ที่ประกอบด้วย Sodium hydroxide (NaOH) ปริมาณ 30 กรัม และ formaldehyde 37 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 3 มิลลิลิตร แช่นาน 3 – 5 นาที หรือจนแถบดีเอ็นเอปรากฏ 5) หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายปริมาณ 2 ลิตร ที่ประกอบด้วย absolute alcohol 10 เปอร์เซ็นต์ และ acetic acid 0.5 เปอร์เซ็นต์ แช่นาน 2 นาที แล้วผึ่งเจลให้แห้ง

3.2.4.2 การคัดเลือกเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้

คัดเลือกเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอต่อโรคไหม้ได้ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) โดยใช้ดีเอ็นเอรวมของประชากร 8 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ ดีเอ็นเอของพันธุ์แม่ กลุ่มที่ 2 คือ ดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อ กลุ่มที่ 3 คือ ดีเอ็นเอรวมของประชากร  $F_2T_1$  ที่แสดงความต้านทาน (resistant) ระดับ 0 กลุ่มที่ 4 คือ ดีเอ็นเอรวมของประชากร  $F_2T_1$  ที่แสดงความอ่อนแอ (susceptible) ระดับ 5 และ 6 กลุ่มที่ 5 คือ ดีเอ็นเอรวมของประชากร  $F_2T_2$  ที่แสดงความต้านทาน (resistant) ระดับ 0 กลุ่มที่ 6 คือ ดีเอ็นเอรวมของประชากร  $F_2T_2$  ที่แสดงความอ่อนแอ (susceptible) ระดับ 5 และ 6 กลุ่มที่ 7 คือ ดีเอ็นเอรวมของประชากร  $F_2T_3$

ที่แสดงความต้านทาน (resistant) ระดับ 0 กลุ่มที่ 8 คือ ดีเอ็นเอรวมของประชากร  $F_2T_3$  ที่แสดงความอ่อนแอ (susceptible) ระดับ 5 และ 6 และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR วิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบผลด้วยการย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate ( $AgNO_3$ ) กำหนดเครื่องหมายให้กับการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค PAGE ดังนี้

- A หมายถึง มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (อ่อนแอต่อโรคไหม้)
- B หมายถึง มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (ต้านทานต่อโรคไหม้)
- H หมายถึง มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่

3.2.4.3 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอต่อโรคไหม้ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ( $F_2$  population)

ใช้เครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอต่อโรคไหม้ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR เพื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ในประชากรข้าวชั่วที่ 2

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ใช้ชุด Terra PCR Direct (Clontech Laboratories, USA) นำใบข้าวพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์แม่ ใบข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่ (GS23774) ซึ่งเป็นพันธุ์พ่อ และประชากรข้าวชั่วที่ 2 ทั้งหมด มาตัดให้ได้เนื้อใบข้าวรูปร่างกลมเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 มิลลิเมตร ใช้เนื้อเยื่อจำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงใน PCR plate เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 10 ไมโครลิตรประกอบด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 2.2 ไมโครลิตร Terra PCR Direct Buffer (2X) ที่มี  $MgCl_2$  และ dNTPs ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ส่วนผสมของ Forward Primer (5 ไมโครโมลาร์) และ Reverse Primer (5 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร และ Terra PCR Direct Polymerase Mix (1.25 ยูนิต/ไมโครลิตร) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร โดยกำหนดอุณหภูมิและจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 40 รอบ 5) ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 1 รอบ เมื่อครบจำนวนรอบนำไปตรวจสอบผลด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate และกำหนดเครื่องหมายให้กับผลของการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค PAGE ดังนี้

- A หมายถึง มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (อ่อนแอต่อโรคไหม้)
- B หมายถึง มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (ต้านทานต่อโรคไหม้)

H หมายถึง มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่

วิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะด้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวข้าวที่ 2 (F<sub>2</sub> population) จากข้อมูลที่ได้ซึ่งเป็นข้อมูล genotype ด้วยการทดสอบ Chi square โดยวิเคราะห์การกระจายตัวของประชากรว่าเป็นไปตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel (ฟังก์ชัน CHISQ.TEST) โดยกำหนดให้ A หมายถึงมีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ B หมายถึงมีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ และ H หมายถึงมีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่

3.2.5 การสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนด้านทานโรคไหม้จากเปอร์เซ็นต์การรวมตัวใหม่ของยีน (% recombination)

การหาระยะทางระหว่างตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะด้านทานโรคไหม้ใช้หลักการคำนวณหาความถี่ของการเกิดการรวมตัวใหม่ของยีน (recombination) หรือความถี่ของการเกิดครอสซิงโอเวอร์ (crossing over) โดยคู่ของยีนที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้กันบนโครโมโซมจะมีความถี่ของการเกิดการรวมตัวใหม่ของยีนต่ำ ส่วนคู่ของยีนที่มีตำแหน่งอยู่ห่างกันบนโครโมโซมจะมีความถี่ของการเกิดการรวมตัวใหม่ของยีนสูง โดยมีค่าความถี่ของการเกิดการรวมตัวใหม่ของยีนสูงสุดไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ ค่าความถี่ของการเกิดการรวมตัวใหม่ของยีน 1 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1 centiMorgan (cM) ซึ่งเป็นหน่วยของระยะห่างระหว่างยีนบนแผนที่ยีน (mapping function) ในการทดลองนี้ใช้ข้อมูล phenotype และ genotype ของประชากรที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจนมีการเกิดโรคที่ระดับ 5 และ 6 เนื่องจากเป็นประชากรที่มี phenotype ถูกต้องแน่นอน จึงเป็นประชากรที่เหมาะสมสำหรับนำมาวิเคราะห์เพื่อระบุตำแหน่งที่ตั้งของยีนด้านทานโรคไหม้ นำข้อมูล phenotype และ genotype ของแต่ละเครื่องหมายจากการทดสอบการเกิดโรคมาร่วมกัน คำนวณหาความถี่ของการเกิดการรวมตัวใหม่ของยีนด้านทานโรคไหม้ และค่าความถี่การเกิดการรวมตัวใหม่ของยีนของแต่ละคู่ของเครื่องหมายเพื่อวาดแผนที่ระบุตำแหน่งยีนด้านทานโรคไหม้โดยใช้สูตรดังนี้ (Morgan, 2008)

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

3.2.6 การสร้างแผนที่เพื่อระบุตำแหน่งของยีนด้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MAPMAKER

สร้างแผนที่พันธุกรรมระบุตำแหน่งของยีนด้านทานโรคไหม้ และเครื่องหมาย SSR ด้วยโปรแกรม MAPMAKER/EXP version 3.0b (Lincoln *et al.*, 1993) ตามหลักการดังนี้

3.2.6.1 จัดกลุ่มความเชื่อมโยงของแต่ละเครื่องหมายกับยีนด้านทานโรคไหม้

โดยกำหนดระดับมาตรฐานให้สอดคล้องกับระดับความน่าเชื่อถือและลักษณะของข้อมูลที่คำนวณค่ามาตรฐานของโปรแกรมจะอยู่ที่ logarithm of odds (LOD) = 3.0

3.2.6.2 จัดลำดับการวางตัวของแต่ละเครื่องหมายกับตำแหน่งของยีนในแต่ละกลุ่มที่ถูกแบ่ง โดยเลือกลำดับการวางตัวของเครื่องหมายที่มีค่า likelihood สูงที่สุด คือ มีค่า likelihood = 0.00

3.2.6.3 คำนวณหาระยะห่างระหว่างแต่ละเครื่องหมายและยีนด้านทานโรคใหม่ โดยเลือก Kosambi function ระยะห่างที่ได้มีหน่วยเป็น centiMorgan (cM)

3.2.6.4 ตรวจสอบความถูกต้องของผลที่คำนวณได้

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

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 ความต้านทานของข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่ต่อประชากรเชื้อราจำนวน 25 ไอโซเลท

ศึกษาความต้านทานของข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่ต่อประชากรเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ทั้ง 25 ไอโซเลท เพื่อตรวจสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ของข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่ โดยการปลูกข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่ และพันธุ์ข้าวที่เป็นพันธุ์ควบคุม 3 พันธุ์ (ข้าวดอกมะลิ 105 เจ้าหอมนิล และ IR64) ทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้แต่ละไอโซเลทรวม 25 ไอโซเลทลงบนกล้าข้าว และประเมินความต้านทานโรคไหม้ของข้าวหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน บันทึกผลตามเกณฑ์ให้คะแนนการเกิดโรคไหม้โดยใช้ระดับคะแนนการเกิดโรค 7 ระดับ (Roumen *et al.*, 1997) พบว่าข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่แสดงความสามารถในการต้านทานสูงต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ (ระดับ 0 – 2) จำนวน 18 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท BKK55001 BKK55003 CCO55003 KKN61067 KKN7357 NKI47181 RBR55001 RBR55003 UBN195167 CRI34.1 PL1 PL2 SRN54002 SRN54005 THL794 UBN13515 UBN196171 และ UBN207129 แสดงความสามารถในการต้านทานปานกลางต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ (ระดับ 3 – 4) จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท SKN60867 UBN11308 PLK40.4 SRN54007 และ UBN11351 และแสดงความอ่อนแอ (ระดับ 5 – 6) ต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้อไอโซเลท CCO56004 และ THL191 (ตารางที่ 4.1) ข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่จึงเป็นข้าวที่มีลักษณะความต้านทานแบบกว้างต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ เนื่องจากสามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลทที่มาจากพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคไหม้ ซึ่งเป็นการยืนยันงานวิจัยของ Salih *et al.* (2013) ที่ทำการจำแนกพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้จากพันธุ์ข้าวของไทยทั้งหมด 311 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นข้าวพื้นเมืองจำนวน 263 ตัวอย่าง ข้าวที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์แล้วจำนวน 43 ตัวอย่าง และข้าวป่าจำนวน 5 ตัวอย่าง ตรวจสอบความต้านทานโดยปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 29 ไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดพิษณุโลก อุบลราชธานี ขอนแก่น เชียงราย หนองคาย ชัยภูมิ และอุดรธานี พบพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 35 พันธุ์ แบ่งเป็นข้าวพื้นเมือง จำนวน 25 พันธุ์ ข้าวที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์แล้วจำนวน 9 พันธุ์และข้าวป่าจำนวน 1 พันธุ์ ข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่คือหนึ่งในประชากรของข้าวพื้นเมืองที่ต้านทานต่อโรคไหม้

ตารางที่ 4.1 ปฏิกริยาต่อโรคบนข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่ ขาวดอกมะลิ 105 เจ้าหอมนิล และ IR64 หลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 25 ไอโซเลท จากการทดลอง 2 ครั้ง

ลำดับที่	ไอโซเลท	พันธุ์ข้าว							
		ดอกพยอมไร่		ขาวดอกมะลิ 105		เจ้าหอมนิล		IR64	
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
1	BKK55001	0*	0	3	3	0	0	0	1
2	BKK55003	1	0	6	6	2	0	0	0
3	CCO55002	0	2	6	6	0	0	2	2
4	CCO56004	6	6	5	5	0	0	0	0
5	KKN61067	2	2	6	6	0	0	0	0
6	KKN7357	0	0	6	6	1	0	0	0
7	NKI47181	0	0	6	6	0	0	0	0
8	RBR55001	0	0	6	6	0	0	0	0
9	RBR55003	0	0	6	6	0	0	0	0
10	SKN60867	3	3	6	6	0	0	0	0
11	UBN11308	3	3	3	3	2	1	1	0
12	UBN195167	2	2	6	6	0	0	0	0
13	CRI34.1	0	0	6	6	0	0	0	0
14	PL1	0	1	0	1	2	1	0	0
15	PL2	0	0	1	2	2	2	0	0
16	PLK40.4	3	3	6	6	0	0	0	0
17	SRN54002	0	0	6	6	0	0	0	0
18	SRN54005	0	0	6	6	0	0	0	0
19	SRN54007	2	3	6	6	0	0	0	0
20	THL191	5	5	6	6	0	0	0	0
21	THL794	1	2	6	6	0	0	0	0
22	UBN11351	3	4	6	6	0	0	0	0
23	UBN13515	0	2	6	5	0	0	0	0
24	UBN196171	0	0	6	6	0	0	0	0
25	UBN207129	0	0	6	5	0	0	0	0

\*0 - 6 คือ ระดับคะแนนการเกิดโรค 7 ระดับ (Roumen *et al.*, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 การผสมพันธุ์ข้าวเพื่อผลิตข้าวลูกผสม

### 4.2.1 ลักษณะของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ( $F_1$ - hybrid)

ลักษณะของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) เป็นข้าวเจ้าที่ไวต่อช่วงแสง มีขนบนแผ่นใบ ลำต้นมีสีเขียว แผ่นใบและกาบใบเป็นสีเขียว ลิ่นใบมีสีขาวมีลักษณะ 2 ยอด หูใบและสีข้อต่อใบสีเขียวอ่อน ปล้องสีเขียว ทรงกอตั้งตรง ยอดเกสรเพศเมียและยอดกาบดอกสีขาว ยอดเกสรตัวผู้สีเหลือง กลีบรองดอกสีเขียว ความแข็งแรงของลำต้นปานกลาง ความยาวลำต้นข้าวเมื่ออายุ 60 วัน สูงประมาณ 140 เซนติเมตร คอรวงยาว มีขนบนเปลือกเมล็ด เปลือกเมล็ดมีสีฟาง เมล็ดไม่มีหางข้าว

ลักษณะของข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่ (GS23774) เป็นข้าวเจ้า ข้าวไร่พันธุ์พื้นเมืองที่ไวต่อช่วงแสง ใบมีสีเขียวเข้ม ใบยาวค่อนข้างแคบ ลำต้นสีเขียว มีขนบนแผ่นใบ แผ่นใบและกาบใบเป็นสีเขียว ลิ่นใบมีสีขาว หูใบและสีข้อต่อใบสีเขียว ปล้องสีเขียว ทรงกอตั้งตรง ยอดเกสรเพศเมียและยอดกาบดอกสีขาว ยอดเกสรตัวผู้สีเหลือง กลีบรองดอกสีเขียว ลำต้นแข็งแรง ความยาวของลำต้นสูงประมาณ 150 เซนติเมตร คอรวงยาว ลักษณะรวงกระจาย มีการชुरวงดี ข้าวเปลือกสีฟางก้นจุด มีหางข้าว มีขนบนเปลือกของเมล็ด

ลักษณะของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ( $F_1$  - hybrid) ต้นที่ 1 ใบและลำต้นสีเขียว มีขนบนแผ่นใบ แผ่นใบและกาบใบเป็นสีเขียว ลิ่นใบมีสีขาว หูใบและสีข้อต่อใบสีเขียว ปล้องสีเขียว ทรงกอตั้งตรง ยอดเกสรเพศเมียและยอดกาบดอกสีขาว ยอดเกสรตัวผู้สีเหลือง กลีบรองดอกสีเขียว ลำต้นแข็งแรง ความยาวของลำต้นสูงประมาณ 150 เซนติเมตร คอรวงยาว ลักษณะเมล็ดเหมือนกับพันธุ์แม่ มีขนบนเปลือกเมล็ด เปลือกเมล็ดมีสีฟาง เมล็ดไม่มีหางข้าว

ลักษณะของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ( $F_1$  - hybrid) ต้นที่ 2 ใบและลำต้นสีเขียวเข้ม มีขนบนแผ่นใบ แผ่นใบและกาบใบเป็นสีเขียว ลิ่นใบมีสีขาว หูใบและสีข้อต่อใบสีเขียว ปล้องสีเขียว ทรงกอตั้งตรง ยอดเกสรเพศเมียและยอดกาบดอกสีขาว ยอดเกสรตัวผู้สีเหลือง กลีบรองดอกสีเขียว ลำต้นแข็งแรง ความยาวของลำต้นสูงประมาณ 150 เซนติเมตร คอรวงยาว ลักษณะเมล็ดเหมือนกับพันธุ์พ่อ เมล็ดสีฟางก้นจุด มีขนบนเปลือกเมล็ด เปลือกเมล็ดมีสีฟาง เมล็ดมีหางข้าว

ลักษณะของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ( $F_1$  - hybrid) ต้นที่ 3 ใบและลำต้นสีเขียวเข้ม มีขนบนแผ่นใบ แผ่นใบและกาบใบเป็นสีเขียว ลิ่นใบมีสีขาว หูใบและสีข้อต่อใบสีเขียว ปล้องสีเขียว ทรงกอตั้งตรง ยอดเกสรเพศเมียและยอดกาบดอกสีขาว ยอดเกสรตัวผู้สีเหลือง กลีบรองดอกสีเขียว ลำต้นแข็งแรง ความยาวของลำต้นสูงประมาณ 150 เซนติเมตร คอรวงยาว ลักษณะเมล็ดเหมือนกับพันธุ์พ่อ เมล็ดสีฟางก้นจุด มีขนบนเปลือกเมล็ด เปลือกเมล็ดมีสีฟาง เมล็ดมีหางข้าว (ตารางที่ 4.2)

### 4.2.2 ประชากรข้าวชั่วที่ 2 ( $F_2$ population)

จากการผสมพันธุ์ข้าวระหว่างพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ใช้เป็นพันธุ์แม่ (female parent) และข้าวพันธุ์พื้นเมืองพันธุ์ดอกพยอมไร่ (GS23774) ใช้เป็นพันธุ์พ่อ (male parent) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าว

ด้านทานโรคไหม้ ได้ข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ( $F_1$  - hybrid) จำนวน 3 เมล็ด นำมาปลูกและปล่อยให้มีการผสมตัวเองตามธรรมชาติ (selfed) ลูกผสมชั่วที่ 1 ต้นที่ 1 ( $F_1T_1$ ) ได้เมล็ดจำนวน 244 เมล็ด ลูกผสมชั่วที่ 1 ต้นที่ 2 ( $F_1T_2$ ) ได้เมล็ดจำนวน 236 เมล็ด และลูกผสมชั่วที่ 1 ต้นที่ 3 ( $F_1T_3$ ) ได้เมล็ดจำนวน 250 เมล็ด รวมได้เมล็ดจากข้าวลูกผสม  $F_1$  ได้จำนวน 730 เมล็ด ( $F_2$  - seed) เมื่อนำไปปลูกจะได้ประชากรข้าว  $F_2$  ( $F_2$  - plant) จำนวน 730 ต้น

**ตารางที่ 4.2** การเปรียบเทียบลักษณะของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (พันธุ์แม่) และพันธุ์ดอกพยอมไร่ (พันธุ์พ่อ)

พันธุ์ข้าว	สีของลำต้น	สีของใบ	สีข้าวเปลือก	หางข้าว	ความสูงของต้น (ซม.)
ข้าวดอกมะลิ 105	สีเขียว	สีเขียว	สีฟาง	ไม่มี	140
ดอกพยอมไร่	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้ม	สีฟางก้นจุด	มี	150
ข้าวลูกผสม $F_1T_1$	สีเขียว	สีเขียว	สีฟาง	ไม่มี	150
ข้าวลูกผสม $F_1T_2$	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้ม	สีฟางก้นจุด	มี	150
ข้าวลูกผสม $F_1T_3$	สีเขียวเข้ม	สีเขียวเข้ม	สีฟางก้นจุด	มี	150

#### 4.3 การกระจายตัวของลักษณะด้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ( $F_2$ population)

ผลการทดสอบการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 25 ไอโซเลท บนกล้าข้าวจำนวน 730 ต้น ที่มีอายุ 14 วัน โดยแยกเป็นประชากรข้าว  $F_2$  ที่ได้จากข้าวลูกผสม  $F_1T_1$  แสดงความต้านทานโรคไหม้ระดับสูง (ระดับ 0 1 และ 2) จำนวน 101 ต้น ด้านทานโรคไหม้ในระดับปานกลาง (ระดับ 3 และ 4) จำนวน 75 ต้น และอ่อนแอต่อโรคไหม้ (ระดับ 5 และ 6) จำนวน 68 ต้น ประชากรข้าว  $F_2$  ที่ได้จากข้าวลูกผสม  $F_1T_2$  แสดงความต้านทานโรคไหม้ระดับสูง (ระดับ 0 1 และ 2) จำนวน 114 ต้น ด้านทานโรคไหม้ในระดับปานกลาง (ระดับ 3 และ 4) จำนวน 55 ต้น และอ่อนแอต่อโรคไหม้ (ระดับ 5 และ 6) จำนวน 67 ต้น และประชากรข้าว  $F_2$  ที่ได้จากข้าวลูกผสม  $F_1T_3$  แสดงความต้านทานโรคไหม้ระดับสูง (ระดับ 0 1 และ 2) จำนวน 102 ต้น ด้านทานโรคไหม้ในระดับปานกลาง (ระดับ 3 และ 4) จำนวน 77 ต้น และอ่อนแอต่อโรคไหม้ (ระดับ 5 และ 6) จำนวน 71 ต้น (ตารางที่ 4.3) ดังนั้นผลประเมินการเกิดโรคของประชากรข้าว  $F_2$  ทั้งหมด 730 ต้น แบ่งเป็นต้นที่แสดงลักษณะด้านทานโรคไหม้จำนวน 524 ต้น และต้นที่แสดงลักษณะอ่อนแอต่อโรคไหม้จำนวน 206 ต้น นำข้อมูลที่ได้จากการประเมินการเกิดโรคไหม้มาวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะด้านทานโรคไหม้ว่าเป็นไปตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) โดยทดสอบหาค่า Chi square เนื่องจากประชากรที่ศึกษาเป็นประชากรข้าวชั่วที่ 2

หากความต้านทานโรครุใหม่ที่ศึกษาถูกควบคุมด้วยยีนเพียงยีนเดียว การกระจายตัวของยีนควบคุมลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อโรครุใหม่จะมีสัดส่วนต้านทาน (resistance, R): อ่อนแอ (susceptible, S) เท่ากับ 3:1

การวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนควบคุมลักษณะต้านทานในอัตราส่วน 3:1 (R:S) พบค่าสถิติ Chi square เท่ากับ 4.034 เมื่อเปรียบเทียบกับตาราง Chi square ที่ degree of freedom (df) เท่ากับ 1 พบว่ามีค่าความน่าจะเป็น (probability, p) เท่ากับ 0.045 แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรครุใหม่ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 3:1 (R:S) เป็นไปได้ว่าลักษณะต้านทานโรครุใหม่ในข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่ต่อเชื้อราที่นำมาทดสอบ 25 ไอโซเลท ถูกควบคุมด้วยยีนต้านทานมากกว่าหนึ่งยีน (ตารางที่ 4.4) ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Singh *et al.* (2020) ที่ได้ทำการวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรครุใหม่ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 จำนวน 320 ต้น จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ HUR 4-3 กับพันธุ์ Tetep ทดสอบการเกิดโรครุด้วยเชื้อสาเหตุโรครุใหม่ไอโซเลท LB-TN-2 ผลวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรครุใหม่ พบว่ามี การกระจายตัวของยีนต้านทานโรครุใหม่ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 3:1 (R:S) และผลการวิเคราะห์พบว่ามียีนต้านทานโรครุใหม่ที่ควบคุมความต้านทานมากกว่าหนึ่งยีน

**ตารางที่ 4.3** ผลประเมินการเกิดโรครุด้วยเชื้อสาเหตุโรครุใหม่จำนวน 25 ไอโซเลท บนประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F<sub>2</sub>) จำนวน 730 ต้น

ประชากร	จำนวนต้น ที่ประเมิน	ต้านทาน** (ต้น)						อ่อนแอ (ต้น)	
		0*	1	2	3	4	5	6	
F <sub>2</sub> T <sub>1</sub>	244	74	8	19	54	21	44	24	
F <sub>2</sub> T <sub>2</sub>	236	90	11	13	47	8	25	42	
F <sub>2</sub> T <sub>3</sub>	250	86	3	13	62	15	31	40	
รวม	730	250	22	45	163	44	100	106	

\*0 – 6 คือระดับคะแนนการเกิดโรครุตามวิธีของ Roumen *et al.* (1997)

\*\*0 – 2 จัดอยู่ในกลุ่มต้านทาน 3 – 4 จัดอยู่ในกลุ่มต้านทานปานกลาง และ 5 – 6 จัดอยู่ในกลุ่มอ่อนแอต่อโรครุใหม่ (Sallaud *et al.*, 2003)

**ตารางที่ 4.4** อัตราการกระจายตัวของลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อราสาเหตุโรครไหม้ 25 ไอโซเลท  
ในประชากรข้าวข้าวที่ 2 ( $F_2$  population) จำนวน 730 ต้น

ประชากร (ต้น)	Expected ratio	Expected		Observed		$\chi^2$ *	$p$
		No.	No.	No.	No.		
$F_2$ (730)	3:1	R**	S	R	S	4.034	0.045
		547.5	182.5	524	206		

\*ค่าสถิติ Chi square ( $\chi^2$ ) = 0.045, df=1

\*\*R คือ Resistant (ต้านทาน), S คือ Susceptible (อ่อนแอ),  $p$  คือ probability

#### 4.4 การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ได้

คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ได้ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเครื่องหมาย SSR ครอบคลุมทั้ง 12 โครโมโซมข้าวจำนวน 230 เครื่องหมาย ด้วยปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบผลด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate พบเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ได้จำนวน 79 เครื่องหมาย คิดเป็น 34.35 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งตามโครโมโซมได้ดังนี้ โครโมโซม 1 จำนวน 9 เครื่องหมาย โครโมโซม 2 จำนวน 6 เครื่องหมาย โครโมโซม 3 จำนวน 7 เครื่องหมาย โครโมโซม 4 จำนวน 6 เครื่องหมาย โครโมโซม 5 จำนวน 5 เครื่องหมาย โครโมโซม 6 จำนวน 6 เครื่องหมาย โครโมโซม 7 จำนวน 6 เครื่องหมาย โครโมโซม 8 จำนวน 8 เครื่องหมาย โครโมโซม 9 จำนวน 4 เครื่องหมาย โครโมโซม 10 จำนวน 6 เครื่องหมาย โครโมโซม 11 จำนวน 9 เครื่องหมาย และโครโมโซม 12 จำนวน 7 เครื่องหมาย (ภาพผนวกที่ 1)

#### 4.5 คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างลักษณะต้านทานและลักษณะอ่อนแอต่อเชื้อโรครไหม้ได้

นำเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้จำนวน 79 เครื่องหมาย นำมาคัดเลือกเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างลักษณะต้านทานและลักษณะอ่อนแอต่อโรครไหม้ได้ ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) โดยใช้ดีเอ็นเอรวมของประชากร 8 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ ดีเอ็นเอของพันธุ์แม่ กลุ่มที่ 2 คือ ดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อ กลุ่มที่ 3 คือ ดีเอ็นเอรวมของประชากร  $F_2T_1$  ที่แสดงความต้านทาน (resistant) ระดับ 0 กลุ่มที่ 4 คือ ดีเอ็นเอรวมของประชากร  $F_2T_1$  ที่แสดงความอ่อนแอ (susceptible) ระดับ 5 และ 6 กลุ่มที่ 5 คือ ดีเอ็นเอรวมของ

ประชากร  $F_2T_2$  ที่แสดงความต้านทาน (resistant) ระดับ 0 กลุ่มที่ 6 คือ ดีเอ็นเอรวมของประชากร  $F_2T_2$  ที่แสดงความอ่อนแอ (susceptible) ระดับ 5 และ 6 กลุ่มที่ 7 คือ ดีเอ็นเอรวมของประชากร  $F_2T_3$  ที่แสดงความต้านทาน (resistant) ระดับ 0 และกลุ่มที่ 8 คือ ดีเอ็นเอรวมของประชากร  $F_2T_3$  ที่แสดงความอ่อนแอ (susceptible) ระดับ 5 และ 6 นำดีเอ็นเอของแต่ละกลุ่มมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบผลจากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลด้วยสารละลาย silver nitrate วิเคราะห์ผลโดยการแปลงรูปแบบดีเอ็นเอเป็นข้อมูล A B และ H โดยกำหนดให้ A คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ B คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ H คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่ (ตารางที่ 4.5) พบเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ จำนวน 2 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM518 และ RM6314 ซึ่งทั้ง 2 เครื่องหมายมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 4 มีการแสดงผลของเครื่องหมายเรียงตามกลุ่ม 1 ถึง 8 คือ ABBABABA (ภาพที่ 4.1)

**ตารางที่ 4.5** เครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อกับแม่จำนวน 79 เครื่องหมาย และผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA)

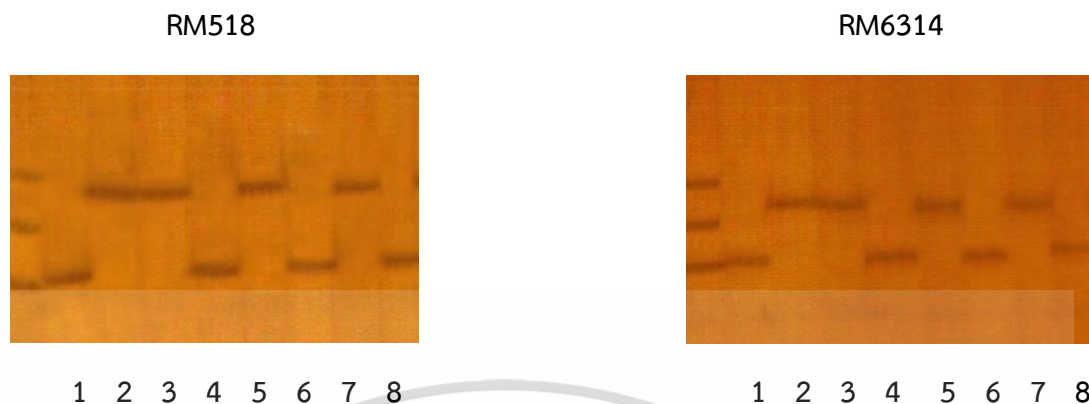
Chromosome	Marker	BSA score band	Chromosome	Marker	BSA score band	
1	RM84	ABHHHHHHH*	3	RM251	ABHHHHHHH	
	RM1	ABBHHAHH		RM338	ABHHHHHHH	
	RM259	ABHHHHHHH		RM16	ABHHHHHHH	
	RM129	ABHHHHHHH		RM571	ABHHHHHHH	
	2	RM5	ABHHHHHHH	4	RM518	ABBABABA
		RM128	ABHHHHHHH		RM5688	ABBHHHHA
		RM543	ABHHHHHHH		RM6314	ABBABABA
		RM431	ABHHHHHHH		RM564	ABHHHHHHH
RM414		ABHHHHHHH	RM280		ABHHHHHHH	
RM405		ABHHHHHHH	RM559		ABHHHHHHH	
RM53		ABHHHHHHH	5		RM13	ABHHHHHHH
RM465	ABHHHHHHH	RM437		ABHHHHHHH		
RM341	ABBHHHHH	RM5140		ABHHHHHHH		
RM6	ABHHHHHHH	RM1054		ABHHHHHHH		
RM425	ABHHHHHHH	RM334		ABHHHHHHH		
3	RM489	ABHHHHHHH	6	RM510	ABHHHHHHH	
	RM545	ABHHHHHHH		RM225	ABBHHHHH	
	RM7	ABHHHHHHH		RM8226	ABHAAHHH	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

Chromosome	Marker	BSA score band	Chromosome	Marker	BSA score band
6	RM564	ABHHHHHHH	10	RM7217	ABHHHHHHH
	RM454	ABHHHHHHH		RM216	ABHHHHHHH
	RM494	ABHHHHHHH		RM258	ABHHHHBH
7	RM1253	ABHHHHHHH	RM3123	ABHAAHHHH	
	RM11	ABHHHHHHH	RM484	ABHHHHHHH	
	RM10	ABHHHHHHH	11	RM1812	ABHHHHHHH
	RM455	ABHHHHHHH		RM5599	ABHHHHHHH
8	RM118	ABHHHHHHH	RM552	ABHHHHHHH	
	RM134	ABHHHHHHH	RM536	ABHHHAHA	
	RM2819	ABHHHHHHH	RM287	ABHHHHHHH	
	RM8243	ABHHHHHHH	RM4601	ABHHHHHHH	
	RM25	ABHHHHHHH	RM206	ABHHHHHHH	
	RM8264	ABHHHHHHH	RM224	ABHHHHHHB	
	RM284	ABHHHHHHH	RM144	ABHHHHHHH	
	RM556	ABHHHHHAA	12	RM19	ABHHHHHHH
	RM433	ABHBHHHHH		RM101	ABBHHHHHH
	RM3778	ABHHHHHHH	RM1261	ABHHHHHHA	
9	RM105	ABHAAHHHH	RM309	ABHHHHHHH	
	RM3912	ABHHHHHHH	RM463	ABHHHHHHH	
	RM1553	ABHHHHHHH	RM3739	ABHHHHHHH	
	RM201	ABHHHHHHH	RM17	ABHHHHHHH	
10	RM474	ABHHHHHHH			

\*ผลของเครื่องหมายดีเอ็นเอเรียงตามกลุ่ม 1 ถึง 8 โดย A คือผลผลิตขั้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่, B คือ มีผลผลิตขั้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ และ H คือ มีผลผลิตขั้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่



ภาพที่ 4.1 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมายที่วิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) เลข 1 คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์แม่, 2 คือ พันธุ์ดอกพยอมไร่ (GS23774) เป็นพันธุ์พ่อ, 3 คือ ประชากร  $F_2T_1$  กลุ่มต้านทาน (resistant), 4 คือ ประชากร  $F_2T_1$  กลุ่มอ่อนแอ (susceptible), 5 คือ ประชากร  $F_2T_2$  กลุ่มต้านทาน (resistant), 6 คือ ประชากร  $F_2T_2$  กลุ่มอ่อนแอ (susceptible), 7 คือ ประชากร  $F_2T_3$  กลุ่มต้านทาน (resistant) และ 8 คือ ประชากร  $F_2T_3$  กลุ่มอ่อนแอ (susceptible)

#### 4.6 การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ในประชากรข้าวชั้วที่ 2 ( $F_2$ population)

ใช้ไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุล SSR เครื่องหมาย RM518 และ RM6314 ซึ่งทั้ง 2 เครื่องหมายมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 4 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบผลจากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate แทนค่าผลของรูปแบบดีเอ็นเอด้วยตัวอักษร A B และ H ผลการวิเคราะห์ของเครื่องหมาย RM518 ในประชากรข้าว  $F_2$  จำนวน 730 ต้น พบผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (A) จำนวน 175 ต้น ผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (B) จำนวน 159 ต้น และพบผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่ (H) จำนวน 396 ต้น (ภาพผนวกที่ 2) และผลการวิเคราะห์ของเครื่องหมาย RM6314 ในประชากรข้าว  $F_2$  จำนวน 730 ต้น พบผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (A) จำนวน 173 ต้น ผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (B) จำนวน 176 ต้น และพบผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่ (H) จำนวน 381 ต้น (ตารางที่ 4.6, ภาพผนวกที่ 3)

จากนั้นวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR เครื่องหมาย RM518 และ RM6314 ในประชากรข้าวชั้วที่ 2 ว่าเป็นไปตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) โดยทดสอบหาค่า chi square วิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายในอัตราส่วน 1:2:1 นั่นคือ มีผลขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (B): มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่ (H): มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (A) ผลการวิเคราะห์พบค่าสถิติ Chi square สำหรับการกระจายตัวของเครื่องหมายในอัตราส่วน 1:2:1 (B:H:A) ของเครื่องหมาย RM518 ในประชากรข้าว  $F_2$  จำนวน 730 ต้น มีค่าเท่ากับ 5.967 เมื่อเปรียบเทียบกับตาราง

Chi square ที่ df เท่ากับ 2 พบว่ามีค่า  $p$  เท่ากับ 0.051 หรืออยู่ระหว่าง  $0.05 < p < 0.1$  และเครื่องหมาย RM6314 มีค่าเท่ากับ 1.428 เมื่อเปรียบเทียบกับตาราง Chi square ที่ df เท่ากับ 2 พบว่ามีค่า  $p$  เท่ากับ 0.489 หรืออยู่ระหว่าง  $0.5 > p > 0.25$  แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของเครื่องหมาย RM518 และ RM6314 เป็นไปตามสัดส่วน 1:2:1 (B:H:A) (ตารางที่ 4.7) ซึ่งใช้วิธีเดียวกับงานวิจัยของศิริพร (2560) ที่ได้ทำการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย RM543 RM431 และ RM443 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 จำนวน 228 ต้น จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ยิ้มมอง ผลการวิเคราะห์พบว่าค่าสถิติ Chi square ของเครื่องหมาย RM543 มีค่าเท่ากับ 1.99 เครื่องหมาย RM431 มีค่าสถิติ Chi square เท่ากับ 7.57 และเครื่องหมาย RM443 มีค่าสถิติ Chi square เท่ากับ 1.69 แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นไปตามสัดส่วน 1:2:1 (B:H:A) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kumbhar *et al.* (2013) ที่ได้วิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 จำนวน 147 ต้นที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ EK70 และพันธุ์ RDN98-2-3-5-14 ด้วยเครื่องหมาย RM204 พบค่า Chi square เท่ากับ 0.88 แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของเครื่องหมายเป็นไปตามอัตราส่วน 1:2:1 แสดงว่ามียีนต้านทานโรคไหม้ที่ควบคุมความต้านทานเพียงยีนเดียว

**ตารางที่ 4.6** ผลการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุล SSR เครื่องหมาย RM518 และ RM6314 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 จำนวน 730 ต้น

F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype		F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype	
		RM518	RM6314			RM518	RM6314
1	5*	A**	A	15	3	H	H
2	5	A	A	16	6	A	A
3	3	H	H	17	0	B	B
4	5	A	A	18	3	H	H
5	4	H	H	19	5	H	H
6	3	H	H	20	0	B	B
7	3	H	H	21	6	A	A
8	0	B	B	22	0	B	B
9	3	H	H	23	0	B	B
10	2	H	H	24	2	H	H
11	0	B	B	25	3	H	H
12	0	B	B	26	3	H	H
13	5	H	H	27	3	H	H
14	6	A	A	28	4	H	H

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype		F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype	
		RM518	RM6314			RM518	RM6314
29	0	B	B	59	0	B	H
30	3	H	H	60	0	B	B
31	3	H	H	61	0	B	B
32	3	H	H	62	0	H	H
33	5	A	A	63	0	B	B
34	3	H	H	64	3	H	H
35	5	A	A	65	3	H	H
36	0	B	B	66	0	H	H
37	2	H	H	67	3	H	H
38	0	B	B	68	5	A	H
39	0	H	H	69	6	A	A
40	2	H	H	70	0	B	B
41	4	A	A	71	5	A	A
42	0	B	H	72	5	A	A
43	2	H	H	73	0	B	B
44	5	A	H	74	0	H	H
45	5	A	A	75	5	A	A
46	0	B	B	76	3	H	H
47	2	H	H	77	3	H	H
48	0	B	H	78	3	H	H
49	5	A	A	79	0	B	B
50	0	B	H	80	0	B	B
51	0	B	B	81	6	A	A
52	0	B	H	82	0	B	B
53	6	A	A	83	3	H	H
54	0	B	B	84	3	H	H
55	4	H	H	85	0	B	H
56	5	A	A	86	5	A	A
57	0	B	B	87	0	H	H
58	0	B	B	88	6	A	A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype		F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype	
		RM518	RM6314			RM518	RM6314
89	5	A	H	119	6	A	A
90	0	H	H	120	0	B	B
91	0	B	B	121	5	A	A
92	3	H	H	122	3	H	H
93	3	H	H	123	3	H	H
94	0	H	H	124	4	H	H
95	0	B	B	125	3	H	H
96	0	H	H	126	6	A	A
97	6	A	A	127	4	H	A
98	3	H	H	128	0	H	H
99	0	B	B	129	4	H	H
100	2	H	H	130	3	H	H
101	3	H	H	131	0	H	H
102	4	H	H	132	0	B	B
103	0	B	B	133	0	B	B
104	5	A	A	134	5	B	B
105	0	H	H	135	1	H	H
106	5	A	A	136	6	A	A
107	0	B	B	137	5	A	A
108	5	H	B	138	3	H	H
109	5	A	A	139	3	H	H
110	0	H	H	140	2	H	H
111	3	H	H	141	0	H	H
112	0	B	B	142	6	A	A
113	1	H	H	143	2	B	B
114	5	A	A	144	0	H	H
115	6	A	A	145	0	B	B
116	6	A	A	146	2	B	H
117	5	A	A	147	1	H	H
118	0	B	B	148	3	H	H

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype		F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype	
		RM518	RM6314			RM518	RM6314
149	2	H	H	179	5	A	H
150	1	H	H	180	3	H	H
151	5	A	A	181	4	H	H
152	0	B	B	182	5	A	H
153	3	H	H	183	3	H	H
154	2	H	H	184	4	H	H
155	0	H	H	185	0	B	B
156	5	B	H	186	5	A	A
157	0	H	H	187	3	H	H
158	5	A	A	188	6	A	A
159	2	H	H	189	6	A	A
160	0	H	H	190	0	H	H
161	3	H	H	191	3	H	H
162	5	B	B	192	4	H	H
163	0	B	B	193	0	B	B
164	0	B	B	194	4	H	H
165	0	H	H	195	2	H	H
166	0	B	H	196	5	A	H
167	0	B	B	197	4	H	H
168	5	A	A	198	2	H	H
169	6	A	A	199	4	H	H
170	6	A	A	200	0	B	B
171	6	A	A	201	5	A	A
172	5	A	A	202	0	B	B
173	0	H	H	203	2	H	H
174	0	B	B	204	3	H	H
175	0	B	B	205	3	H	H
176	4	H	H	206	4	H	H
177	2	B	B	207	3	H	H
178	3	H	H	208	5	H	H

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype		F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype	
		RM518	RM6314			RM518	RM6314
209	4	H	H	239	3	H	H
210	6	A	A	240	1	B	B
211	3	H	H	241	6	A	A
212	4	A	A	242	6	A	H
213	1	H	H	243	5	A	A
214	6	A	A	244	3	H	H
215	3	H	H	245	6	A	A
216	1	B	B	246	0	B	B
217	3	H	H	247	0	B	B
218	3	H	H	248	5	A	H
219	3	H	H	249	3	H	H
220	4	H	H	250	6	A	A
221	5	B	B	251	3	H	H
222	6	A	A	252	6	A	A
223	5	A	A	253	6	A	A
224	3	H	H	254	6	A	A
225	3	H	H	255	0	B	B
226	0	B	B	256	0	B	B
227	5	A	A	257	1	B	B
228	4	H	A	258	6	A	A
229	5	A	A	259	3	H	H
230	3	H	H	260	5	A	A
231	2	H	H	261	2	H	H
232	3	H	H	262	5	A	H
233	4	H	H	263	2	H	H
234	1	H	H	264	6	A	A
235	5	A	A	265	6	A	A
236	0	B	B	266	0	B	B
237	2	H	H	267	6	A	A
238	0	B	B	268	5	A	A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype		F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype	
		RM518	RM6314			RM518	RM6314
269	0	B	B	299	3	H	H
270	4	A	A	300	3	H	H
271	3	H	H	301	0	B	B
272	5	A	A	302	2	H	H
273	5	A	A	303	6	A	A
274	5	A	A	304	0	B	B
275	0	B	B	305	0	B	B
276	3	H	H	306	3	H	H
277	0	B	B	307	3	H	H
278	6	A	A	308	4	A	A
279	0	B	B	309	0	B	B
280	3	H	H	310	2	H	H
281	0	H	H	311	3	H	H
282	3	H	H	312	0	B	B
283	6	A	A	313	3	H	H
284	5	A	H	314	3	H	H
285	4	H	H	315	3	H	H
286	3	H	H	316	3	H	H
287	6	A	A	317	0	B	B
288	0	B	B	318	0	B	B
289	5	A	A	319	3	H	H
290	4	H	H	320	3	H	H
291	0	B	B	321	4	A	H
292	0	B	B	322	0	H	H
293	0	B	B	323	4	H	H
294	3	H	H	324	2	H	H
295	3	H	H	325	0	H	H
296	0	B	B	326	1	H	H
297	1	H	H	327	2	H	B
298	3	H	H	328	1	H	H

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype		F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype	
		RM518	RM6314			RM518	RM6314
329	3	H	H	359	3	H	H
330	0	H	H	360	0	H	B
331	3	H	H	361	0	H	B
332	3	H	H	362	1	H	H
333	3	H	H	363	1	H	H
334	0	B	B	364	3	H	H
335	0	H	H	365	1	H	H
336	0	H	B	366	0	H	B
337	3	H	H	367	0	H	H
338	4	H	H	368	0	H	B
339	5	B	B	369	3	H	H
340	6	A	H	370	6	A	A
341	0	H	H	371	0	H	H
342	3	H	H	372	6	A	A
343	3	H	H	373	6	A	A
344	1	H	H	374	0	H	H
345	5	A	A	375	0	H	H
346	6	A	A	376	6	A	A
347	0	H	H	377	0	H	H
348	0	B	B	378	5	A	A
349	5	B	H	379	6	A	A
350	1	H	H	380	5	A	A
351	0	B	B	381	2	H	H
352	0	H	H	382	0	H	H
353	1	H	H	383	0	H	H
354	0	B	B	384	0	H	H
355	3	H	H	385	6	A	A
356	0	H	H	386	3	H	H
357	3	H	H	387	0	B	B
358	3	H	H	388	0	B	B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype		F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype	
		RM518	RM6314			RM518	RM6314
389	0	H	H	419	5	B	B
390	0	B	B	420	0	H	H
391	0	B	B	421	6	A	A
392	0	H	B	422	0	B	B
393	6	A	A	423	0	B	B
394	1	H	H	424	3	H	H
395	6	A	A	425	0	H	H
396	4	H	H	426	3	H	H
397	0	H	H	427	0	H	H
398	6	A	A	428	0	H	H
399	6	A	A	429	5	A	A
400	5	A	A	430	0	B	B
401	6	A	A	431	0	H	H
402	0	B	B	432	5	A	H
403	0	H	B	433	0	H	H
404	6	A	A	434	0	H	H
405	0	H	H	435	3	H	H
406	6	A	A	436	6	A	A
407	3	H	H	437	5	B	B
408	0	B	B	438	0	H	H
409	0	B	B	439	2	H	H
410	6	A	A	440	6	A	A
411	3	H	H	441	6	A	A
412	0	H	H	442	0	B	B
413	0	H	H	443	0	H	H
414	6	A	A	444	0	H	H
415	0	H	H	445	3	H	H
416	2	H	H	446	0	H	H
417	2	H	H	447	0	B	B
418	0	H	H	448	0	B	B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype		F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype	
		RM518	RM6314			RM518	RM6314
449	0	H	H	479	0	B	B
450	0	H	H	480	6	A	A
451	0	B	B	481	0	B	B
452	0	H	H	482	0	B	B
453	2	H	H	483	3	H	H
454	6	A	A	484	3	H	H
455	2	H	H	485	5	A	H
456	3	H	H	486	0	H	H
457	3	H	H	487	6	A	A
458	2	H	H	488	3	H	H
459	5	B	B	489	0	B	B
460	0	B	B	490	3	H	H
461	6	A	A	491	3	H	H
462	6	A	A	492	0	H	H
463	6	A	A	493	6	A	A
464	5	A	A	494	3	H	H
465	0	H	H	495	3	H	H
466	6	A	A	496	0	B	B
467	6	A	A	497	0	H	H
468	6	A	A	498	3	H	H
469	0	B	B	499	0	B	B
470	5	A	H	500	5	A	A
471	3	H	H	501	0	B	B
472	5	A	A	502	3	H	H
473	0	B	B	503	3	H	H
474	3	H	H	504	2	H	H
475	5	B	B	505	0	H	H
476	5	A	H	506	5	B	B
477	3	H	H	507	0	B	B
478	0	B	B	508	3	H	H

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype		F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype	
		RM518	RM6314			RM518	RM6314
509	0	B	B	539	3	H	H
510	6	A	A	540	0	B	B
511	3	H	H	541	3	H	H
512	6	A	H	542	3	H	H
513	0	B	B	543	0	H	H
514	3	H	H	544	6	A	A
515	0	H	H	545	3	H	H
516	3	H	H	546	4	A	A
517	0	H	H	547	4	H	H
518	6	A	A	548	5	B	B
519	6	A	A	549	5	A	A
520	0	H	H	550	6	A	A
521	0	B	B	551	6	A	A
522	0	B	B	552	3	H	H
523	0	H	H	553	6	A	A
524	0	B	B	554	0	B	B
525	2	H	H	555	5	B	B
526	0	B	B	556	5	A	A
527	6	A	A	557	0	B	B
528	0	B	B	558	5	A	A
529	3	H	H	559	5	A	A
530	0	H	B	560	6	A	A
531	3	H	H	561	2	H	H
532	3	H	H	562	2	H	H
533	0	B	B	563	3	H	H
534	0	B	B	564	6	A	A
535	6	A	H	565	3	H	H
536	0	B	B	566	3	H	H
537	0	B	B	567	5	B	B
538	0	H	H	568	0	H	H

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype		F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype	
		RM518	RM6314			RM518	RM6314
569	0	B	B	599	6	A	H
570	3	H	H	600	0	B	B
571	6	A	A	601	5	A	A
572	6	A	A	602	6	A	A
573	6	A	A	603	6	A	A
574	0	B	B	604	5	A	A
575	4	H	H	605	3	H	H
576	5	A	A	606	6	A	A
577	6	A	A	607	5	A	A
578	6	A	A	608	6	A	A
579	5	A	A	609	3	H	H
580	6	A	A	610	6	A	A
581	2	H	H	611	0	H	B
582	5	H	H	612	2	H	H
583	3	H	H	613	2	H	H
584	5	A	A	614	6	A	A
585	6	A	A	615	5	A	A
586	0	B	B	616	5	A	A
587	2	H	H	617	3	H	H
588	4	H	H	618	2	H	H
589	6	A	A	619	0	H	B
590	6	A	A	620	3	H	H
591	6	A	A	621	1	H	H
592	0	H	H	622	0	H	H
593	5	A	A	623	1	H	H
594	3	H	H	624	4	H	H
595	6	A	A	625	0	H	H
596	3	H	H	626	5	A	A
597	0	H	B	627	5	A	A
598	0	B	B	628	5	A	A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype		F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype	
		RM518	RM6314			RM518	RM6314
629	0	H	H	659	6	A	A
630	0	H	H	660	0	H	H
631	2	H	H	661	3	H	H
632	3	H	H	662	1	H	H
633	5	A	H	663	0	B	B
634	4	H	H	664	0	H	B
635	3	H	H	665	2	H	H
636	4	A	A	666	3	H	H
637	4	H	H	667	0	H	B
638	3	H	H	668	3	H	H
639	4	H	H	669	3	H	H
640	3	H	H	670	0	H	H
641	3	H	H	671	0	H	B
642	0	B	B	672	0	B	B
643	4	H	H	673	5	A	A
644	3	H	H	674	0	H	H
645	3	H	H	675	0	B	B
646	4	H	H	676	6	A	H
647	3	H	H	677	0	H	H
648	0	B	B	678	6	A	A
649	4	H	H	679	5	A	A
650	3	H	H	680	2	H	H
651	6	A	A	681	0	H	H
652	4	H	H	682	6	A	A
653	3	H	H	683	0	H	B
654	6	A	A	684	0	H	H
655	4	H	H	685	5	B	B
656	3	H	H	686	3	H	H
657	4	H	H	687	0	B	B
658	6	A	A	688	0	B	B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype		F <sub>2</sub> 730 ต้น	phenotype	genotype	
		RM518	RM6314			RM518	RM6314
689	0	H	B	710	3	H	H
690	0	B	B	711	3	H	H
691	3	H	H	712	3	H	H
692	3	H	H	713	3	H	H
693	0	H	H	714	0	B	B
694	0	H	H	715	3	H	H
695	3	H	H	716	0	B	B
696	5	A	A	717	0	B	B
697	0	H	B	718	3	H	H
698	0	H	B	719	3	H	H
699	2	H	H	720	0	B	H
700	0	H	B	721	3	H	H
701	3	H	H	722	0	B	H
702	5	A	A	723	0	B	H
703	0	H	H	724	6	H	H
704	0	B	B	725	0	B	B
705	5	A	A	726	0	B	B
706	0	B	B	727	3	H	H
707	0	H	H	728	0	B	B
708	5	A	H	729	0	B	B
709	0	B	B	730	0	B	B

\*0 – 6 คือระดับคะแนนการเกิดโรคตามวิธีของ Roumen *et al.* (1997)

\*\*A คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่, B คือ ผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ และ H คือ ผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่

ตารางที่ 4.7 อัตราการกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ในประชากรข้าวชู้วที่ 2 (F<sub>2</sub>) จำนวน 730 ต้น

ประชากร (จำนวนต้น)	โครโมโซม	เครื่องหมาย	Expected ratio	Expected No.			Observed No.			X <sup>2</sup> *	p
				B	H	A	B	H	A		
F <sub>2</sub> (730)	4	RM518	1:2:1	182.5	365	182.5	159	395	175	5.967	0.051
	4	RM6314	1:2:1	182.5	365	182.5	176	381	173	1.428	0.489

\*ค่าสถิติ Chi square (X<sup>2</sup>), df=2

A คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่, B คือ ผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ และ H คือ ผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่

#### 4.7 สร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้จากเปอร์เซ็นต์การรวมตัวใหม่ของยีน

โอกาสเกิดการรวมตัวใหม่ของยีน (recombination) มีความสัมพันธ์โดยตรงกับระยะทางระหว่างยีนในโครโมโซมเดียวกัน ค่าความถี่ของการเกิดการรวมตัวใหม่ของยีน 1 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1 centiMorgan (cM) ซึ่งเป็นหน่วยของระยะห่างระหว่างยีนบนแผนที่ยีน (mapping function) ในการทดลองนี้ใช้ข้อมูล phenotype และ genotype ของประชากร 206 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ อย่างชัดเจน พบการเกิดโรคที่ระดับ 5 และ 6 เป็นประชากรที่มี phenotype ถูกต้องแน่นอน จึงเป็นประชากรที่เหมาะสมสำหรับนำมาวิเคราะห์เพื่อระบุตำแหน่งที่ตั้งของยีนต้านทานโรคไหม้ พบว่าเครื่องหมาย RM518 มีร้อยละของการเกิดรีคอมบิเนชันเท่ากับ 9.2 และเครื่องหมาย RM6314 มีร้อยละของการเกิดรีคอมบิเนชันเท่ากับ 20.38 ซึ่งทั้งสองเครื่องหมายมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 4 แสดงให้เห็นว่ายีนต้านทานโรคไหม้มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM518 และ RM6314 โดยมีระยะห่างจากทั้ง 2 เครื่องหมายเป็นระยะทาง 9.2 cM และ 20.38 cM ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8, ภาพที่ 4.2) ซึ่งงานวิจัยของเพ็ญภา (2557) ใช้วิธีเดียวกันในการสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเปอร์เซ็นต์การรวมตัวใหม่ของยีนโดยใช้ประชากรข้าวชู้วที่ 2 ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ห้วย จำนวน 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ พบเครื่องหมาย RM144 และ RM224 ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 11 มีการเกิดรีคอมบิเนชันเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ายีนต้านทานโรคไหม้มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM144 และ RM224 โดยมีระยะห่างจากทั้ง 2 เครื่องหมายเป็นระยะทาง 20 cM

ตารางที่ 4.8 การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR บนโครโมโซมที่ 4 ในประชากรข้าว 206 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ และเปอร์เซ็นต์การรวมตัวของยีนต้านทานโรคไหม้

F <sub>2</sub> ต้นอ่อนแอ	phenotype	genotype		F <sub>2</sub> ต้นอ่อนแอ	phenotype	genotype	
		RM518	RM6314			RM518	RM6314
1	5*	A**	A	115	6	A	A
2	5	A	A	116	6	A	A
4	5	A	A	117	5	A	A
13	5	H	H	119	6	A	A
14	6	A	A	121	5	A	A
16	6	A	A	126	6	A	A
19	5	H	H	134	5	B	B
21	6	A	A	136	6	A	A
33	5	A	A	137	5	A	A
35	5	A	A	142	6	A	A
44	5	H	H	151	5	A	A
45	5	A	A	156	5	B	H
49	5	A	A	158	5	A	A
53	6	A	A	162	5	B	B
56	5	A	A	168	5	A	A
68	5	H	H	169	6	A	A
69	6	A	A	170	6	A	A
71	5	A	A	171	6	A	A
72	5	A	A	172	5	A	A
75	5	A	A	179	5	H	H
81	6	A	A	182	5	H	H
86	5	A	A	186	5	A	A
88	6	A	A	188	6	A	A
89	5	H	H	189	6	A	A
97	6	A	A	196	5	H	H
104	5	A	A	201	5	A	A
106	5	A	A	208	5	H	H
108	5	B	B	210	6	A	A
109	5	A	A	214	6	A	A
114	5	A	A	221	5	B	B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

F <sub>2</sub> ต้นอ่อนแอ	phenotype	genotype		F <sub>2</sub> ต้นอ่อนแอ	phenotype	genotype	
		RM518	RM6314			RM518	RM6314
222	6	A	A	339	5	B	B
223	5	A	A	340	6	H	H
227	5	A	A	345	5	A	A
229	5	A	A	346	6	A	A
235	5	A	A	349	5	B	H
241	6	A	A	370	6	A	A
242	6	H	H	372	6	A	A
243	5	A	A	373	6	A	A
245	6	A	A	376	6	A	A
248	5	H	H	378	5	A	A
250	6	A	A	379	6	A	A
252	6	A	A	380	5	A	A
253	6	A	A	385	6	A	A
254	6	A	A	393	6	A	A
258	6	A	A	395	6	A	A
260	5	A	A	398	6	A	A
262	5	H	H	399	6	A	A
264	6	A	A	400	5	A	A
265	6	A	A	401	6	A	A
267	6	A	A	404	6	A	A
268	5	A	A	406	6	A	A
272	5	A	A	410	6	A	A
273	5	A	A	414	6	A	A
274	5	A	A	419	5	B	B
278	6	A	A	421	6	A	A
283	6	A	A	429	5	A	A
284	5	H	H	432	5	H	H
287	6	A	A	436	6	A	A
289	5	A	A	437	5	B	B
303	6	A	A	440	6	A	A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

F <sub>2</sub> ต้นอ่อนแอ	phenotype	genotype		F <sub>2</sub> ต้นอ่อนแอ	phenotype	genotype	
		RM518	RM6314			RM518	RM6314
441	6	A	A	551	6	A	A
454	6	A	A	553	6	A	A
459	5	B	B	555	5	B	B
461	6	A	A	556	5	A	A
462	6	A	A	558	5	A	A
463	6	A	A	559	5	A	A
464	5	A	A	560	6	A	A
466	6	A	A	564	6	A	A
467	6	A	A	567	5	B	B
468	6	A	A	571	6	A	A
470	5	A	H	572	6	A	A
472	5	A	A	573	6	A	A
475	5	B	B	576	5	A	A
476	5	H	H	577	6	A	A
480	6	A	A	578	6	A	A
485	5	H	H	579	5	A	A
487	6	A	A	580	6	A	A
493	6	A	A	582	5	H	H
500	5	A	A	584	5	A	A
506	5	B	B	585	6	A	A
510	6	A	A	589	6	A	A
512	6	H	H	590	6	A	A
518	6	A	A	591	6	A	A
519	6	A	A	593	5	A	A
527	6	A	A	595	6	A	A
535	6	H	H	599	6	H	H
544	6	A	A	601	5	A	A
548	5	B	B	602	6	A	A
549	5	A	A	603	6	A	A
550	6	A	A	604	5	A	A

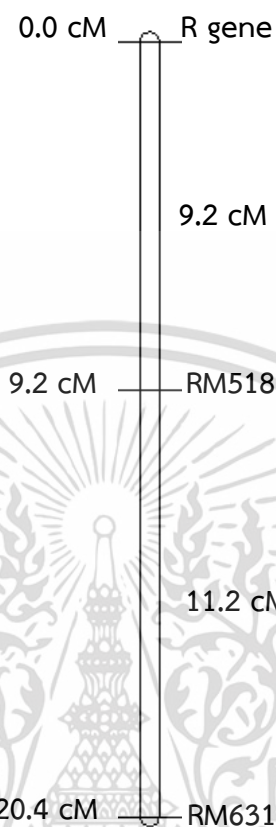
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

F <sub>2</sub> ต้นอ่อนแอ	phenotype	genotype		F <sub>2</sub> ต้นอ่อนแอ	phenotype	genotype	
		RM518	RM6314			RM518	RM6314
606	6	A	A	658	6	A	A
607	5	A	A	659	6	A	A
608	6	A	A	673	5	A	A
610	6	A	A	676	6	H	H
614	6	A	A	678	6	A	A
615	5	A	A	679	5	A	A
616	5	A	A	682	6	A	A
626	5	A	A	685	5	B	B
627	5	A	A	696	5	A	A
628	5	A	A	702	5	A	A
633	5	H	H	705	5	A	A
651	6	A	A	708	5	H	H
654	6	A	A	724	6	H	H
		% recombination				9.2	20.4

\*0 – 6 คือระดับคะแนนการเกิดโรคตามวิธีของ Roumen *et al.* (1997)

\*\*A คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่, B คือ ผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ และ H คือ ผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่



ภาพที่ 4.2 แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ และระยะห่างระหว่างเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 4 ของข้าว เมื่อวิเคราะห์ในประชากรข้าว 206 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์การรวมตัวใหม่ (recombination) ของยีนต้านทานโรคไหม้ และวาดแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapChart

#### 4.8 การสร้างแผนที่เพื่อระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MAPMAKER

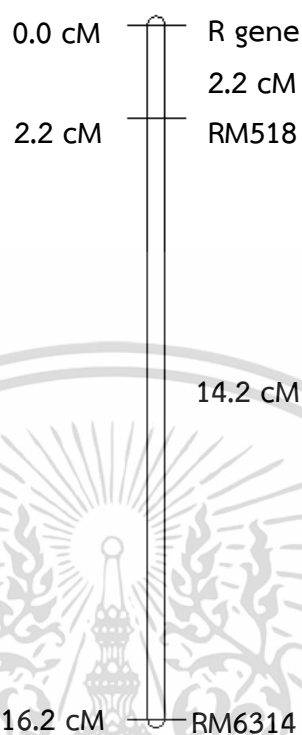
สร้างแผนที่ยีนต้านทานโรคไหม้ โดยนำข้อมูลลักษณะต้านทานโรคไหม้ที่ได้จากการทดสอบการเกิดโรคไหม้ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ซึ่งเป็นข้อมูล phenotype และข้อมูลการกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุล SSR ซึ่งเป็นข้อมูล genotype มาวิเคราะห์ร่วมกันด้วยโปรแกรม MapMaker จัดกลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอและยีนต้านทานโรคไหม้ที่มีความใกล้ชิดกันที่ค่า logarithm of odds (LOD) = 3.0 ซึ่งหมายถึงโอกาสที่เครื่องหมายที่ถูกจัดกลุ่มอยู่ด้วยกันจะไม่มีความสัมพันธ์กันเท่ากับ 0.01 หรือ 1 ใน 1,000 แสดงให้เห็นว่าการจัดกลุ่มของเครื่องหมายมีความละเอียดมาก โดยวิเคราะห์ความเชื่อมโยง 1,000 ครั้งมีเพียง

1 ครั้งนี้อาจพบว่าเครื่องหมายไม่มีความเชื่อมโยงกัน เครื่องหมายที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันคือ เครื่องหมายที่มีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้และมีระยะห่างจากยีนน้อยกว่า 50 cM และคำนวณระยะห่างของเครื่องหมายด้วย Kosambi function โดยโปรแกรมมีคำสั่ง ripple เพื่อใช้ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับการเรียงตัวของเครื่องหมาย และมีคำสั่ง error detection on เพื่อใช้ตรวจสอบความผิดพลาดที่อาจเกิดจากข้อมูล genotype ของประชากร ดังนั้นการสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้โปรแกรม MapMaker จึงมีความละเอียดและแม่นยำกว่าการคำนวณเปอร์เซ็นต์การรวมตัวใหม่ของยีน

เมื่อสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้โปรแกรม MapMaker และวาดแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapChart พบเครื่องหมายที่มีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่ คือ เครื่องหมาย RM518 และ RM6314 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 4 โดยมีระยะทาง 2.2 cM และ 16.2 cM ตามลำดับ (ภาพที่ 4.3) โดยบริเวณที่พบว่าเป็นที่ตั้งของยีนต้านทานโรคไหม้ นี้ ยังไม่เคยมีรายงานการพบยีนต้านทานโรคไหม้มาก่อน

นอกจากนี้เครื่องหมาย RM518 มีรายงานความเชื่อมโยงกับยีนควบคุมลักษณะอื่นๆ ของข้าว ได้แก่ งานวิจัยของ Li *et al.* (2019) พบเครื่องหมาย RM518 ที่มีความเชื่อมโยงกับยีน *Bph36* เป็นยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown plant hopper) และเชื่อมโยงกับยีน *qDTY<sub>4.1</sub>* ที่ควบคุมลักษณะทนแล้ง (Ramayya *et al.*, 2021) Mohammadi *et al.* (2013) รายงานว่าเครื่องหมาย RM551 และ RM518 มีความเชื่อมโยงกับยีน *qSTW4.1s* ซึ่งเป็นยีนควบคุมลักษณะทางปริมาณของน้ำหนักแห้งของฟาง ยีน *qFRSP4.1s* ซึ่งเป็นยีนควบคุมลักษณะทางปริมาณของจำนวนการติดเมล็ด ยีน *qTSP4.1s* ซึ่งเป็นยีนควบคุมลักษณะทางปริมาณของจำนวนเมล็ด และยีน *qGY4.1s* ซึ่งเป็นยีนควบคุมลักษณะทางปริมาณของผลผลิตของข้าว

เครื่องหมาย RM6314 รายงานโดย Chen *et al.* (2022) พบยีน *NGP4A* เป็นยีนที่ควบคุมลักษณะจำนวนเมล็ดต่อรวง อยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM6314 และ RM5424 โดยมีระยะห่าง 6.3 cM และ 5.0 cM ตามลำดับ แต่ยังไม่พบรายงานข้อมูลของเครื่องหมาย RM518 และ RM6314 ว่าเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ จึงยังไม่สามารถยืนยันได้ว่ายีนต้านทานของข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่นี้เป็นยีนเดียวกับที่เคยมีผู้รายงานไว้หรือไม่ งานวิจัยนี้จึงนับว่าเป็นการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ยีนใหม่ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน



ภาพที่ 4.3 แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคใหม่ และระยะห่างระหว่างเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 4 ของข้าวเมือวิเคราะห์ในประชากรข้าว 206 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ โดยคำนวณหาระยะห่างของแต่ละเครื่องหมายและยีนต้านทานโรคใหม่ด้วยโปรแกรม MAPMAKER และวาดแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapChart

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาคความต้านทานของข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่ในระยะกล้าต่อประชากรเชื้อ 25 ไอโซเลท ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าวของประเทศไทย เปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าวควบคุม 3 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวดอกมะลิ 105 เจ้าหอมนิล และ IR64 และประเมินความต้านทานโรคไหม้ของข้าวหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน พบว่าข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่แสดงความต้านทานสูงต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 18 ไอโซเลท ต้านทานปานกลางต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ จำนวน 5 ไอโซเลท และอ่อนแอต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 2 ไอโซเลท ข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่จึงเป็นข้าวที่มีลักษณะความต้านทานแบบกว้างต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ เนื่องจากสามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลท

ผลการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ โดยวิธีการประเมินการเกิดโรคในประชากรข้าว  $F_2$  ทั้งหมด 730 ต้น ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้กับข้าวพื้นเมืองพันธุ์ดอกพยอมไร่ พบต้นที่ต้านทานโรคไหม้จำนวน 524 ต้น และต้นที่อ่อนแอต่อโรคไหม้จำนวน 206 ต้น ผลการทดสอบสถิติ Chi square แสดงว่าการกระจายตัวของลักษณะต้านทาน : อ่อนแอต่อโรคไหม้ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 3:1 (R:S) แสดงว่าลักษณะต้านทานโรคไหม้ถูกควบคุมด้วยยีนมากกว่าหนึ่งยีน

ผลการระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมาย SSR ที่ครอบคลุมทั้ง 12 โครโมโซมของข้าวจำนวน 230 เครื่องหมายที่กระจายอยู่บนทุกโครโมโซมของข้าว พบเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ได้จำนวน 79 เครื่องหมาย คิดเป็น 34.35 เปอร์เซ็นต์ พบเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อโรคไหม้ทั้งหมด 2 เครื่องหมาย ได้แก่ RM518 และ RM6314 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 4 ผลการวิเคราะห์ของเครื่องหมาย RM518 ในประชากรข้าวช่วงที่ 2 จำนวน 730 ต้น พบผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (A) จำนวน 175 ต้น ผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (B) จำนวน 159 ต้น และพบผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่ (H) จำนวน 396 ต้น และผลการวิเคราะห์ของเครื่องหมาย RM6314 ในประชากรข้าว  $F_2$  จำนวน 730 ต้น พบผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (A) จำนวน 173 ต้น ผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (B) จำนวน 176 ต้น และพบผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่ (H) จำนวน 381 ต้น จากผลการวิเคราะห์ของทั้ง 2 เครื่องหมายพบค่าสถิติ Chi square ของเครื่องหมาย RM518 มีค่าเท่ากับ 5.967 มีค่า  $p$  เท่ากับ 0.051 และเครื่องหมาย RM6314 พบค่า Chi square เท่ากับ 1.428 มีค่า  $p$  เท่ากับ 0.489 แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของเครื่องหมาย RM518 และ RM6314 เป็นไปตามสัดส่วน 1:2:1 จากนั้นระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้จากเปอร์เซ็นต์การ

รวมตัวใหม่ของยีน (recombination) พบว่าเครื่องหมาย RM518 มีร้อยละของการเกิดรีคอมบิเนชันเท่ากับ 9.2 และเครื่องหมาย RM6314 มีร้อยละของการเกิดรีคอมบิเนชันเท่ากับ 20.38 แสดงให้เห็นว่ายีนต้านทานโรคไหม้มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM518 และ RM6314 โดยมีระยะห่างจากทั้ง 2 เครื่องหมายเป็นระยะทาง 9.2 cM และ 20.38 cM ตามลำดับ

ผลการคำนวณระยะห่างของแต่ละเครื่องหมาย และระยะห่างของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MAPMAKER และวาดแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapChart พบว่ายีนต้านทานโรคไหม้มีระยะห่างจากเครื่องหมาย RM518 เป็นระยะทาง 2.2 cM และห่างจากเครื่องหมาย RM6314 เป็นระยะทาง 16.2 cM ทำให้สามารถระบุได้ว่าตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ของข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่อยู่บนโครโมโซมที่ 4 แต่ยังไม่พบรายงานยีนต้านทานโรคไหม้ที่เชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM518 และ RM6314 จึงยังไม่สามารถยืนยันได้ว่ายีนต้านทานของข้าวพันธุ์ดอกพยอมไร่ที่ตรวจพบนี้เป็นยีนเดียวกับที่เคยมีผู้รายงานไว้หรือไม่ งานวิจัยนี้จึงนับว่าเป็นการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ยีนใหม่ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

## เอกสารอ้างอิง

กรมการข้าว. 2563. **กรมการข้าวเตือนระวังโรคไหม้ระบาด**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:

<http://www.ricethailand.go.th/web/index.php/mactivities/910-2020-09-21-15-46-08>.

กรมการข้าว. 2564. **สรุปสถานการณ์ศัตรูข้าว ระหว่างวันที่ 19 – 25 สิงหาคม 2564**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.ricethailand.go.th/web/>.

กฤตกิตติศักดิ์ ไพโรตริจิต อิงออน สีแก้ว ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ ธานี ศรีวงศ์ชัย และ สุรีพร เกตุงาม.

2554. “การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9*, *Pi36* และ *Piqm(t)* ในข้าวพื้นเมืองไทย โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ.” *Thai Journal of Genetics* (1): 52 – 62.

จุฑาทพร แสงประจักษ์. 2555. “การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และการปรับปรุงพันธุ์ข้าว.” *Khon Kaen Agriculture Journal* 40 : 299 – 308.

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

ธานี ศรีวงศ์ชัย. 2555. **เอกสารประกอบการสอนเรื่องการหาตำแหน่งยีนและการประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์**. กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 36 หน้า.

บุญรัตน์ จงดี สุรพงษ์ สาครรัง พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ ดวงใจ สุริยาอรุณโรจน์ และ จิระพงษ์ ใจรินทร์. 2548. **ข้าวหอมสายพันธุ์ใหม่ต้านทานโรคไหม้ IR77924-62-71-1-2**. หน้า 13 - 36. ใน **การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2548**. นครนายก.

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ พยอม โคเบลลี อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ ถนอมจิตร ฤทธิมนตรี กุลขนา เกศสุวรรณ ชนสิริน กลิ่นมณี และ สงวน เทียงดีฤทธิ. 2550. “การตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทย.” *วารสารวิชาการข้าว* 1(1): 52 – 64.

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2548. **เอกสารวิชาการ: ความหลากหลายและแนวทางการพัฒนาข้าวต้านทานโรคไหม้**. ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี: กรมวิชาการเกษตร. 61 หน้า.

เพ็ญภา ตันเซียน. 2557. “พันธุกรรมควบคุมลักษณะและการระบุตำแหน่งยีนด้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 106 หน้า.

เพ็ญภา ตันเซียน ธาณี ศรีวงศ์ชัย และ นงลักษณ์ เกรินทวงศ์. 2557. “วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมโครแซทเทลไลท์.” หน้า 400 – 406. ใน งานประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52: สาขาพืช วันที่ 4 – 7 กุมภาพันธ์ 2557. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เมทินี กัดมูข นิตยศรี แสงเดือน และ วิภา หงษ์ตระกูล. 2552. “การตรวจสอบยีนด้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทย.” Thai Journal of Genetics 2(1): 36 – 43.

รุ่งอรุณ พูนสิน และ นงลักษณ์ เกรินทวงศ์. 2561. “ความต้านทานของโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย.” หน้า 62. ใน งานประชุมวิชาการข้าวแห่งชาติ ครั้งที่ 5 ประจำปี 2561 ภายใต้หัวข้อ “การวิจัยข้าวไทย สู่ไทยแลนด์ 4.0.” กรุงเทพฯ : โรงแรมเซ็นทรา ศูนย์ราชการแจ้งวัฒนะ.

วารี เหล่าเพิ่มสุข วัชรพร สุขศิริ สุพัตรา จันทศรี ประติภา ประดับไพโร รุ่งอรุณ พูนสิน เพ็ญภา ตันเซียน และ นงลักษณ์ เกรินทวงศ์. 2561. “การศึกษาความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ของประเทศไทยที่เก็บรวบรวมใหม่.” หน้า 67. ใน งานประชุมวิชาการข้าวแห่งชาติ ครั้งที่ 5 ประจำปี 2561 ภายใต้หัวข้อ “การวิจัยข้าวไทย สู่ไทยแลนด์ 4.0” กรุงเทพฯ : โรงแรมเซ็นทรา ศูนย์ราชการแจ้งวัฒนะ.

วาสนา วรมิศร์. 2538. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมของไทย. ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 104 หน้า.

วิชา อิติประเสริฐ. 2544. ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์ : ข้าว. กรุงเทพฯ. 864 หน้า.

ศิริพร เปรมฤทธิ. 2560. “การถ่ายทอดพันธุกรรมและการระบุตำแหน่งยีนด้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ยังมอง.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 99 หน้า.

ศิริภา กออินทร์ศักดิ์ ธีรยุทธ ตูจันดา และ ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์. 2552. “การค้นหายีนด้านทานโรคไหม้ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบโมโครแซทเทลไลท์.” หน้า 1 – 2. ใน การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่ออนาคตที่ดีขึ้น. ชลบุรี : มหาวิทยาลัยบูรพา.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. 2565. สถิติการส่งออกข้าว. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:

[http://www.thairiceexporters.or.th/List\\_%20of\\_statistic.htm](http://www.thairiceexporters.or.th/List_%20of_statistic.htm).

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. 2566. ข้อมูลเกี่ยวกับข้าว. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก:

[http://www.thairiceexporters.or.th/rice\\_profile.htm](http://www.thairiceexporters.or.th/rice_profile.htm).

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2549. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ. กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 116 หน้า.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 269 หน้า.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2564. ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://www.oae.go.th/view/1/ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร/TH-TH>.

สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว. 2552. องค์ความรู้เรื่องข้าว. กรมการข้าว.[ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: <http://goo.gl/LO7FqJ>.

สุริพร เกตุงาม. 2546. “เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช.” วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 5(1): 37 – 59.

สุริพร เกตุงาม. 2556. การปรับปรุงพันธุ์พืชระดับโมเลกุล. อุบลราชธานี: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 307 หน้า.

อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ และ พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2552. “ความหลากหลายของ pathotype ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวในปี 2550/51 และยีนต้านทานกว้างขวางที่เป็นประโยชน์ในภาคเหนือตอนล่าง.” หน้า 208 - 219. ใน การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2552. กรุงเทพฯ : กรมการข้าว สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว.

อภิชาติ วรณวิจิตร ธาณี ศรีวงศ์ชัย และ ชีรยุทธ ตูจันดา. 2552. “การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ในข้าว.” หน้า 1 – 2. ใน นิทรรศการงานวิจัย “บนเส้นทางงานวิจัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ปี 2552”. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Babujee, L. and Gnanamanickam, S.S. 2000. “Molecular tools for characterization of rice blast pathogen *Magnaporthe grisea* population and molecular marker-assisted breeding for disease resistance.” *Current Science* 78(3): 248 – 257.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Benbouza, H., Jacquemin, J.M., Baudoin, J.B. and Mergeai, G. 2006. "Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels." **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment** 10(2): 77 – 81.
- Bonman, J.M., Khush, G.S. and Nelson, R.J. 1992. "Breeding rice for resistance to pests." **Annual Review of Phytopathology** 30: 507 – 528.
- Chen, Y., Yang, W., Zhao, M., Ding, G., Zhou, Y., Xie, J. and Zhang, F. 2022. "Characterization of the *NGP4A* Gene in Regulating Grain Number Per Panicle of Rice (*Oryza sativa* L.)." **Agronomy** 12(7): 1549.
- Couch B.C. and Kohn L.M. 2002. "A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae* from *M. grisea*." **Mycologia** 94: 683 – 693.
- Ezuka, A., 1979. "Breeding for and genetics of blast resistance in Japan." pp. 27 – 48. in: **IRRI, Proceedings of the rice blast workshop**, IRRI, Los Baños, Laguna, Philippines.
- Farahzadi, F., Ebrahimi, A., Zarrinnia, V. and Azizinezhad, R. 2020. "Evaluation of genetic diversity in Iranian rice (*Oryza sativa*) cultivars for resistance to blast disease using microsatellite (SSR) markers." **Agricultural Research** 9(1): 1 – 9.
- Goto, K. 1965. "Estimating losses from rice blast in Japan." pp. 195 – 202. in: **The rice blast disease proceedings of a symposium at the International Rice Research Institute**. Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, United States.
- Kankanala, P., Mosquera, G., Khang, C.H., Ponce, G.V. and Valent, B. 2009. "Cellular and molecular analyses of biotrophic invasion in rice blast disease." pp. 83 – 91. in Wang G-L. and Valent B. (eds). **Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease**. Dordrecht, Springer Netherlands.
- Kato, H., Yamamoto, M., Yamaguchi, T. 2000. "Pathogenicity, mating ability and DNA restriction fragment length polymorphisms of *Pyricularia* populations isolated from *Gramineae*, *Bambusideae* and *Zingiberaceae* plants." **Journal of General Plant Pathology** 66: 30 – 47.

- Kawasaki T. A., Hayashi N., Yanagihara S. and Fukuta, Y. 2016. "Diversity and distribution of rice blast (*Pyricularia oryzae* Cavara) races in Japan." **Plant disease** 100(4): 816 – 823.
- Koide, Y., Kobayashi, N., Xu, D. and Fukuta, Y. 2009. "Resistance gene and selection DNA marker for blast disease in rice (*Oryza sativa* L.)." **Japan Agricultural Research Quarterly** 43(4): 255 – 280.
- Korinsak, S., Wongsaprom, C., Jamboonsri, W., Sriprakhon, S., Sirithunya, K., Vanavichit, A. and Toojinda, T. 2022. "Identification of broad-spectrum resistance QTLs against rice blast fungus and their application in different rice genetic backgrounds." **Journal of Genetics** 101(1): 16.
- Korinsak, S., Sriprakhon, S., Sirithunya, K., Sriwongchai, T., Wongsaprom, C., Plabpla, P., Vanavichit, A. and Toojinda, T. 2023. "Resistance QTLs controlling leaf and neck blast disease identified in a doubled haploid rice population." **Euphytica** 219(1): 41.
- Kumbhar, V., Swami, V. and Kulkarni, S. 2013. "Effectiveness of watershed management: A means of economic development: A case study." **Journal of Mechanical and Civil Engineering** 6(6): 7 – 14.
- Li, Z., Xue, Y., Zhou, H., Li, Y., Usman, B., Jiao, X., Wang, X., Liu, F., Qin, B., Li, R. and Qiu, F. 2019. "High-resolution mapping and breeding application of a novel brown planthopper resistance gene derived from wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.)." **Rice Journal** 12(1): 41.
- Lincoln, S.E., Daly, M.J. and Lander, E.S. 1993. "Constructing Genetic Maps with MAPMAKER/EXP version3.0: A Tutorial and Reference Manual." **Cambridge: Whitehead Institute for Biomedical Research**. 47 p.
- Meena, S., Sharma, R., Singh, S.K., Kumar, A., Ramakrishnan, R.S., Sharma, S., Koutu, G.K. and Gaur, L. 2022. "Genetic diversity of farmers' varieties of rice of central India using microsatellite and blast linked markers." **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology** 32: 225 – 238.
- 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.

- Mohammadi R., Mendiolo M.S., Diaz G.Q., Gregorio G.B. and Singh R.K. 2013. “Mapping quantitative trait loci associated with yield and yield components under reproductive stage salinity stress in rice (*Oryza sativa* L.)” **Journal of Genetics** 92: 433 – 443.
- Morgan, T.H. 2008. “Genetic recombination and gene mapping.” **Nature Education** 1: 205.
- 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.
- Ramayya, P.J., Vinukonda, V.P., Singh, U.M., Alam, S., Venkateshwarlu, C., Vipparla, A.K., Dixit, S., Yadav, S., Abbai, R., Badri, J., Ram T., Padmakumari, A.P., Singh, V.K. and Kumar, A. 2021. “Marker-assisted forward and backcross breeding for improvement of elite Indian rice variety Naveen for multiple biotic and abiotic stress tolerance.” **Public Library of Science One** 16(9): 22.
- 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.
- 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.
- Sallaud, C., Lorieux, M., Roumen, E., Tharreau, D., Berruyer, R., Svestasrani, P., Garsmeur, O., Ghesquiere, A. and Notteghem, J.L. 2003. “Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy.” **Theoretical and Applied Genetics** 106(5): 794 – 803.
- Singh, R.K., Singh, P., Singh, R.P., Verma, R.L., Singh, P., Arsode, P.N., Singh, R.K. and Singh, O.N. 2020. “Inheritance of blast disease (*Magnaporthe grisea*) resistance in indica rice (*Oryza sativa* L.) CV. HUR 4-3, Tetep and their segregating generations.” **International Journal of Advanced Biological Research** 10(1): 39 – 45.

- Sreewongchai, T., Toojinda, T., Thanintorn, N., Kosawang, C., Vanavichit, A., Tharreau, D. and Sirithunya, P. 2010. "Development of elite indica rice lines with wide spectrum of resistance to Thai blast isolates by pyramiding multiple resistance QTLs." **Plant Breeding** 129: 176 – 180.
- Teerasan, W., Moonsap, P., Longya, A., Damchuay, K., Ito, S., Tasanasuwan, P., Kate-Ngam, S. and Jantasuriyarat, C. 2022. "Rice blast resistance gene profiling of Thai, Japanese and international rice varieties using gene-specific markers." **Plant Genetic Resources** 20(1): 22 – 28.
- Voorrips, R.E. 2002. "MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs." **The Journal of Heredity** 14: 77 – 78.
- Waktola, T.G. 2022. "Isolation and morphological characterization of rice pathogens *Pyricularia* and *Bipolaris*." **International Journal of Agriculture and Plant Science** 4(2): 8 – 15.
- Wang, L., Ma, Z., Zhao, J., Gu, S., Gao, L., Mukhina, Z.H., Ma, D. and Zheng, W. 2022. "Progress on mapping, cloning and application of rice blast resistance genes." **Pakistan Journal of Botany** 54(6): 2363 – 2375.
- Wang, X., Lee, S., Wang, J., Ma, J., Bianco, T. and Jia, Y. 2014. "Current Advances on Genetic Resistance to Rice Blast Disease. Rice-germplasm, genetics and improvement." **Croatia: InTech Journals**. 316 p.
- 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.
- Zheng, C., Jiang, N., Zhao, X., Yan, T., Fu, J., Li, Y., Wu, Z., Hu, X., Bai, Z., Liu, T., Xiao, G., Zhou, Y., Chen, L., Wang, K. and Yang, Y. 2020. "Identification of the blast resistance gene *Picl(t)* from Chaling common wild rice." **Journal of Phytopathology** 168(4): 211 – 219.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ก  
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 1.1 Potato Dextrose Broth (PDA) (1,000 มิลลิลิตร)

potato	200	กรัม
dextrose	20	กรัม
agar powder	20	กรัม

ต้มมันฝรั่งให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มมันฝรั่งกับน้ำกลั่นปริมาณ 500 มิลลิลิตร จนมันฝรั่งสุก กรองเอามันฝรั่งออกด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำตาล dextrose และ agar powder ต้มจนน้ำตาลและวุ้นละลาย แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 1.2 Rice Flour Agar (RFA) (1,000 มิลลิลิตร)

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

## 2. การเตรียมสารละลาย

### 2.1 10X TBE (1,000 มิลลิลิตร)

Boric acid	55.64	กรัม
Tris-HCL	109.02	กรัม
EDTA	2.92	กรัม

ผสมสารละลายที่ชั่งกับน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

### 2.2 Acrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (800 มิลลิลิตร)

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

ผสมสารละลาย 10X TBE กับ urea เมื่อละลายเข้าด้วยกันแล้วเติม acrylamide solution 40% ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 800 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองใส่ขวดสีชา

### 2.3 Sequencing dye (100 มิลลิลิตร)

formamide	40	มิลลิลิตร
0.1 % bromphenol blue	12.5	มิลลิลิตร
xylene cyanol	0.0125	กรัม
EDTA	1	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

### 2.4 10% Ammonium persulfate (APS) (20 มิลลิลิตร)

ammonium persulfate	2	กรัม
---------------------	---	------

ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 20 มิลลิลิตร ใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 2.5 Silver staining (2,000 มิลลิลิตร)

AgNO <sub>3</sub> (silver)	3	กรัม
37% formaldehyde	3	มิลลิลิตร

ละลาย AgNO<sub>3</sub> ในน้ำกลั่น 2,000 มิลลิลิตรด้วยเครื่อง magnetic stirrer 30 นาที จากนั้นเติม 37% formaldehyde ลงไปและปั่นให้เข้ากัน จากนั้นนำใส่ขวดสีชา

### 2.6 Developer staining (2,000 มิลลิลิตร)

NaOH	30	กรัม
37% formaldehyde	3	มิลลิลิตร

ละลาย NaOH ในน้ำกลั่น 2,000 มิลลิลิตรด้วยเครื่อง magnetic stirrer จนละลาย จากนั้นเติม 37% formaldehyde ลงไปและปั่นให้เข้ากัน จากนั้นนำใส่ขวดสีชา



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมายโมเลกุล SSR จำนวน 230 เครื่องหมายที่ครอบคลุม  
ทั้ง 12 โครโมโซมของข้าว

Chromosome	Marker	Primer sequence (5'-3')	
		Forward primer	Reverse primer
1	RM495	AATCCAAGGTGCAGAGATGG	CAACGATGACGAACACAACC
	RM428	AACAGATGGCATCGTCTTCC	CGCTGCATCCACTACTGTTG
	RM84	TAAGGGTCCATCCACAAGATG	TTGCAAATGCAGCTAGAGTAC
	RM1	GCGAAAACACAATGCAAAAA	GCGTTGGTTGGACCTGAC
	RM283	GTCTACATGTACCTTGTGGG	CGGCATGAGAGTCTGTGATG
	RM259	TGGAGTTTGAGAGGAGGG	CTTGTTGCATGGTGCCATGT
	RM578	GGCGTCGTGTTTTCTCTCTC	CAAAAAGGAGGAGCAGATCG
	RM312	GTATGCATATTTGATAAGAG	AAGTCACCGAGTTTACCTTC
	RM129	TCTCTCCGGAGCCAAGGCGAGG	CGAGCCACGACGCGATGTACCC
	RM5	TGCAACTTCTAGCTGCTCGA	GCATCCGATCTTGATGGG
	RM34	GAAATGGCAATGTGTGCG	GCCGGAGAACCCTAGCTC
	RM237	CAAATCCCGACTGCTGTCC	TGGGAAGAGAGCACTACAGC
	RM443	GATGGTTTTTCATCGGCTACG	AGTCCCAGAATGTCGTTTCG
	RM128	AGCTTGGGTGATTTCTTGGAAGCG	ACGACGAGGAGTCGCCGTGCAG
	RM543	CTGCTGCAGACTCTACTGCG	AAATATTACCCATCCCCCCC
	RM265	CGAGTTCGTCCAAGTGAGC	CATCCACCATTCCACCAATC
	RM472	CCATGGCCTGAGAGAGAGAG	AGCTAAATGGCCATACGGTG
	RM431	TCCTGCGAACTGAAGAGTTG	AGAGCAAAACCCTGGTTCAC
	OSR23	TGATACGTGGTACGTGACGC	TAATCGCTTCCCTACCCCTG
	RM414	ATTGCAGTCATGCAGCAGTC	ATATCTCCAATGTGGCAGGG
2	RM154	ACCCTCTCCGCTCGCCTCCTC	CTCCTCCTCTGCGACCGCTCC
	RM211	CCGATCTCATCAACCAACTG	CTTCACGAGGATCTCAAAGG
	RM405	TCACACACTGACAGTCTGAC	AATGTGGCAGTGAGGTAAG
	RM53	ACGTCTCGACGCATCAATGG	CACAAGAACTTCTCGGTAC

ที่มา : <http://www.gramene.org>

## ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

Chromosome	Marker	Primer sequence (5'-3')		
		Forward primer	Reverse primer	
2	RM71	CTAGAGGCGAAAACGAGATG	GGGTGGGCGAGGTAATAATG	
	RM452	CTGATCGAGAGCGTTAAGGG	GGGATCAAACCACGTTTCTG	
	RM521	TTCCCTTATTCTGCTCTCC	GGGATTTGCAGTGAGCTAGC	
	RM300	GCTTAAGGACTTCTGCGAACC	CAACAGCGATCCACATCATC	
	RM465	GTGCCTCCATCATCATCATC	TAGGACAAGCGAAGAAACCG	
	RM561	GAGCTGTTTTGGACTACGGC	GAGTAGCTTTCTCCCACCCC	
	RM341	CAAGAAACCTCAATCCGAGC	CTCCTCCCGATCCCAATC	
	RM475	CCTCACGATTTTCTCCAAC	ACGGTGGGATTAGACTGTGC	
	RM106	CGTCTTCATCATCGTCGCCCG	GGCCCATCCCGTCGTGGATCTC	
	RM526	CCCAAGCAATACGTCCCTAG	ACCTGGTCATGACAAGGAGG	
	RM573	CCAGCCTTTGCTCCAAGTAC	TCTTCTTCCCTGGACCACAC	
	RM6	GTCCCCTCCACCCAATTC	TCGTCTACTGTTGGCTGCAC	
	RM425	CCAACGAAGATTCGAAGCTC	CAGCACCATGAAGTCGCC	
	RM208	TCTGCAAGCCTTGTCTGATG	TAAGTCGATCATTGTGTGGACC	
	RM48	TGTCCCACTGCTTCAAGC	CGAGAATGAGGGACAAATAACC	
	RM535	ACTACATACACGGCCCTTGC	CTACGTGGACACCGTCACAC	
	3	RM60	AGTCCCATGTTCCACTTCCG	ATGGCTACTGCCTGTACTION
		RM22	GGTTTGGGAGCCATAATCT	CTGGGCTTCTTCACTCGTC
		RM489	ACTTGAGACGATCGGACACC	TCACCCATGGATGTTGTCAG
RM545		CAATGGCAGAGACCCAAAAG	CTGGCATGTAACGACAGTGG	
OSR16		AAAAGTAGCTTGCAAAGGGGA	TGCCGGCTGATCTTGTCTC	
OSR13		CATTTGTGCGTCACGGAGTA	AGCCACAGCGCCCATCTCTC	
RM7		TTCGCCATGAAGTCTCTCG	CCTCCCATCATTTGTTGTT	
RM251		GAATGGCAATGGCGCTAG	ATGCGGTTCAAGATTGATC	
RM563		CGACCCTAGGGTTTCTCC	CTCGACGTCGTGGAAAGC	
RM282		CTGTGTCGAAGGCTGCAC	CAGTCTGTGTTGCAGCAAG	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

Chromosome	Marker	Primer sequence (5'-3')	
		Forward primer	Reverse primer
3	RM338	CACAGGAGCAGGAGAAGAGC	GGCAAACCGATCACTCAGTC
	RM156	GCCGCACCCTCACTCCCTCCTC	TCTTGCCGGAGCGCTTGAGGTG
	RM16	CGCTAGGGCAGCATCTAAA	AACACAGCAGGTACGCGC
	RM426	ATGAGATGAGTTCAAGGCC	AACTCTGTACCTCCATCGCC
	RM55	CCGTCGCCGTAGTAGAGAAG	TCCCGTTATTTAAGGCG
	RM416	GGGAGTTAGGGTTTTGGAGC	TCCAGTTTCACACTGCTTCG
	RM571	GGAGGTGAAAGCGAATCATG	CCTGCTGCTTTTCATCAGC
	RM514	AGATTGATCTCCATTCCCC	CACGAGCATATTACTAGTGG
	RM442	CTTAAGCCGATGCATGAAGG	ATCCTATCGACGAATGCACC
	RM85	CCAAAGATGAAACCTGGATTG	GCACAAGGTGAGCAGTCC
4	RM307	GTACTACCGACCTACCGTTCAC	CTGCTATGCATGAACTGCTC
	RM551	AGCCCAGACTAGCATGATTG	GAAGGCGAGAAGGATCACAG
	RM518	CTCTTCACTCACTCACCATGG	GCAGTGCCAACCATCTGTG
	RM5688	ATCCATCTGGAGCAAGCAAC	ATCTGGTCACCCTTTGCTTG
	RM6314	GATTCGTGTCGGTTGTCAAG	GGTTCAGGGACGAATTTAG
	RM471	ACGCACAAGCAGATGATGAG	GGGAGAAGACGAATGTTTGC
	RM7396	GCTCCCTGCAACGAGATAAG	TAGAATCGCTGTGATCTGCG
	RM3524	CGGAGCTGGTCTAGCCATC	GTCTCCGTCTTCTCACTCG
	RM564	CATGGCCTTGTGTATGCATC	ATGCAGAGGATTGGCTTGAG
	RM1136	ATGTCATCCAGAGTCGCCTC	AGGACGTATTCACACACGAC
	RM241	GAGCCAAATAAGATCGCTGA	TGCAAGCAGCAGATTTAGTG
	RM317	CATACTTACCAGTTCACCGCC	CTGGAGAGTGTGAGCTAGTTGA
	RM252	TTCGCTGACGTGATAGGTTG	ATGACTTGATCCCGAGAACG
	RM6748	ATTGGGTTTCTCATATTATG	CCAACACTCCTAACTAGTTC
	RM3335	TAATCCACTGTGTCATTTAA	ACCATCATCTTGACCTAGT
	RM303	GCATGGCCAAATATTAAAGG	GGTTGGAAATAGAAGTTCGGT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

Chromosome	Marker	Primer sequence (5'-3')	
		Forward primer	Reverse primer
4	RM6441	CGAAAGGTCGGCATCTTTC	ATGGCAATGATACGGAGGAG
	RM124	ATCGTCTGCGTTGCGGCTGCTG	CATGGATCACCGAGCTCCCCC
	RM280	ACACGATCCACTTTGCGC	TGTGTCTTGAGCAGCCAGG
	RM559	ACGTACACTTGGCCCTATGC	ATGGGTGTCAGTTTGCTTCC
5	RM507	CTTAAGCTCCAGCCGAAATG	CTCACCTCATCATCGCC
	RM2010	ATCTTCTAGGAAATCGAGGA	GTTGGCAACTGTAGTCTTG
	RM413	GGCGATTCTTGGATGAAGAG	TCCCCACCAATCTTGTCTTC
	RM7444	AATGGTACTACCGCCAGTGC	GGATTGTGATGTTCTGAGG
	RM13	TCCAACATGGCAAGAGAGAG	GGTGGCATTGATTCCAG
	RM437	ACACCAACCAGATCAGGGAG	TGCTCGTCAATGGTGAGTTC
	RM5994	CAGGCACTGCAGCATGTC	AGGCTCGGCGAGATATTCTC
	RM5140	GACGAGGTTGTTTATTAGTG	CTTATTTCACGTGTACGTT
	RM598	GAATCGCACACGTGATGAAC	ATGCGACTGATCGGTACTCC
	RM509	TAGTGAGGGAGTGGAAACGG	ATCGTCCCCACAATCTCATC
	RM459	CTGCAATGCTGCATGACC	CACCTTCTCTGCAGACCAG
	RM39	GCCTCTCTCGTCTCCTTCT	AATTCAAAGTGGGTGGC
	RM3663	CATCAACCTCCACGAACATG	CTCGGTGGTGATCCTCCTC
	RM188	TCCGCCTCTCCTCTCGCTTCCC	GCAACGCACAACCGAACCGAGC
	RM161	TGCAGATGAGAAGCGGCGCCTC	TGTGTCATCAGACGGCGCTCCG
	RM6313	ATCCAGATCCACTTTGACCG	GGAGGACTTCTACCATCCTTG
	RM178	TCGCGTGAAAGATAAGCGGCGC	GATCACCGTTCCTCCGCCTGC
	RM1054	TGCATATGTACCGCAACCTC	TTTCTGCATGATCCCCTCTG
	RM87	CCTCTCCGATACACCGTATG	GCGAAGGTACGAAAGGAAAG
	RM334	GTTCAAGTTCAGTGCCACC	GACTTTGATCTTTGGTGGACG
6	RM133	TTGGATTGTTTTGCTGGCTCGC	GGAACACGGGGTCGGAAGCGAC
	RM170	TCGCGCTTCTCCTCGTCGACG	CCCCTTGCAGAGGAAGCAGCC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

Chromosome	Marker	Primer sequence (5'-3')	
		Forward primer	Reverse primer
6	RM510	AACCGGATTAGTTTCTCGCC	TGAGGACGACGAGCAGATTC
	RM204	GTGACTGACTTGGTCATAGGG	GCTAGCCATGCTCTCGTACC
	RM225	TGCCCATATGGTCTGGATG	GAAAGTGGATCAGGAAGGC
	RM276	CTCAACGTTGACACCTCGTG	TCCTCCATCGAGCAGTATCA
	RM6701	AGAGTGGCAAGAACAAATTC	ACAGATGCACTGATCCTGAC
	RM136	GAGAGCTCAGCTGCTGCCTTAGC	GAGGAGCGCCACGGTGTACGCC
	RM8226	TTAGGATACGGCTTCTAGGC	CGTAATTGTTGCATATGGTG
	RM564	CATGGCCTTGTGTATGCATC	ATGCAGAGGATTGGCTTGAG
	RM7551	TCACCTCCTTCTGCCATCTC	CTAACTCACCTCCAGCCTGC
	RM3827	GGACGGATTGTAGGTAGGAC	CCTTTCTTCAATCTGCATTC
	RM7434	GGAGGAAAGGTTGGAGAAGG	TTTCCCGTATTCCATGAGCC
	RM5371	GGCTAGCTTTAGCTGCGTTG	ACCCAGATCGAAACAACCTGC
	RM454	CTCAAGCTTAGCTGCTGCTG	GTGATCAGTGCACCATAGCG
	RM162	GCCAGCAAACCAGGGATCCGG	CAAGGTCTTGTGCGGCTTGCGG
	RM461	GAGACCGGAGAGACAACCTGC	TGATGCGGTTTGACTGCTAC
	RM494	GGGAGGGGATCGAGATAGAC	TTTAACCTTCCCTCCGCTCC
	RM400	ACACCAGGCTACCCAACTC	CGGAGAGATCTGACATGTGG
	RM141	CACCACCACCACCACGCCTCTC	TCTTGGAGAGGAGGAGGCGCGG
	7	RM436	ATTCCTGCAGTAAAGCACGG
RM295		CGAGACGAGCATCGGATAAG	GATCTGGTGGAGGGGAGG
RM4098		CGTTTGGATGAAGAAGAAGA	AGTGTTTCGTTCCGATTAGA
RM125		ATCAGCAGCCATGGCAGCGACC	AGGGGATCATGTGCCGAAGGCC
RM501		GCCCAATTAATGTACAGGCG	ATATCGTTTAGCCGTGCTGC
RM6872		GGATGAACACTGATGATGGC	ACCTCCACCACGATATCCAC
RM1253		CTGAACCTTGCTGAGAACTC	GACGACCTCTCCATGCTCG
RM11		TCTCCTCTTCCCCGATC	ATAGCGGGCGAGGCTTAG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

Chromosome	Marker	Primer sequence (5'-3')	
		Forward primer	Reverse primer
7	RM7110	GGCGATCTCTGTGTTTATTG	ATTAACCGTTGAGATGGTG
	RM533	GCAACTGCTCTACGCCTCTC	CCTGAGGCTTCACCTACTCG
	RM10	TTGTCAAGAGGAGGCATCG	CAGAATGGGAAATGGGTCC
	RM455	AACAACCCACCACCTGTCTC	AGAAGGAAAAGGGCTCGATC
	RM1973	GAGTTGCAAGGATATTTTAA	TGGAGCCTAGAGAATACATA
	RM1132	ATCACCTGAGAAACATCCGG	CTCCTCCCACGTCAAGGTC
	RM234	ACAGTATCCAAGGCCCTGG	CACGTGAGACAAAGACGGAG
	RM118	CCAATCGGAGCCACCGGAGAGC	CACATCCTCCAGCGACGCCGAG
	RM134	ACAAGGCCCGGAGAGGATTCCG	GCTCTCCGGTGGCTCCGATTGG
	RM6650	AGCAGTCTCTGTTCGCGC	GACGACGACGACGATGACG
	RM172	TGCAGCTGCGCCACAGCCATAG	CAACCACGACACCGCCGTGTTG
	RM428	AACAGATGGCATCGTCTTCC	CGCTGCATCCACTACTGTTG
	8	RM408	CAACGAGCTAACTTCCGTCC
RM152		GAAACCACCACACCTCACCG	CCGTAGACCTTCTTGAAGTAG
RM38		ACGAGCTCTCGATCAGCCTA	TCGGTCTCCATGTCCAC
RM2819		AATGTTGCTAGATTTAAAAC	CAGTAGGATATCTTACAACC
RM8243		CTCGTGCAACCATTATATTC	ACCTTAGCTGTCCTGAATTG
RM25		GGAAAGAATGATCTTTTCATGG	CTACCATCAAACCAATGTTC
RM544		TGTGAGCCTGAGCAATAACG	GAAGCGTGTGATATCGCATG
RM44		ACGGGCAATCCGAACAACC	TCGGGAAAACCTACCCTACC
RM404		CCAATCATTAAACCCCTGAGC	GCCTTCATGCTTCAGAAGAC
RM3153		CGGTTCTTTTCACATGGTCG	ATCACAACAAGCTCGACGTG
RM8264		ACGCTCCTCGTTTCTAC	GCACCTCACACCAGTAATTC
RM339		GTAATCGATGCTGTGGGAAG	GAGTCATGTGATAGCCGATATG
RM195		AGAAAGAGAGGCCGTCGGCGGC	GGGCTCACCCCAAACCTGCAG
RM284		ATCTCTGATACTCCATCCATCC	CCTGTACGTTGATCCGAAGC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

Chromosome	Marker	Primer sequence (5'-3')	
		Forward primer	Reverse primer
8	RM556	ACTCCAAACCTCACTGCACC	TAGCACACTGAACAGCTGGC
	RM256	GACAGGGAGTGATTGAAGGC	GTTGATTTCCCAAGGGC
	RM6948	GGTAAGTTGTCGGTTGCCTC	ACGTCCATACCAGGTCAAGC
	RM433	TGCGCTGAACTAAACACAGC	AGACAAACCTGGCCATTAC
	RM3778	AGCTCGCGCAAGAGATGG	CCGCAAAAGTCTAGTTTGCC
	RM447	CCCTTGCTGTCTCCTCTC	ACGGGCTTCTTCTCCTCTC
9	RM316	CTAGTTGGGCATACGATGGC	ACGCTTATATGTTACGTCAAC
	RM444	GCTCCACCTGCTTAAGCATC	TGAAGACCATGTTCTGCAGG
	RM524	TGAAGAGCAGGAACCGTAGG	TCTGATATCGGTTCCCTCGG
	RM105	GTCGTCGACCCATCGGAGCCAC	TGGTCGAGGTGGGGATCGGGTC
	RM3912	TGTGTGTGCCCGATCTAC	CCTCTCGATGAGCATTCC
	RM409	CCGTCTCTTGCTAGGGATTC	GGGGTGTTTTGCTTTCTCTG
	RM5122	CTCGCAATTTATAACGTAATC	CTCACGAAATAAAATGAGTG
	RM3600	TGCCCCACACATGATGAGC	AACGGGCAAGAGATCTTCTG
	RM410	GCTCAACGTTTCGTTCTCTG	GAAGATGCGTAAAGTGAACGG
	RM1553	AATTAGAGGGTCCACATGTC	ATTACCCTCATTTTCTACGC
	RM288	CCGGTCAGTTCAAGCTCTG	ACGTACGGACGTGACGAC
	RM201	CTCGTTTATTACCTACAGTACC	CTACCTCCTTTCTAGACCGATA
	RM6971	TTTGCGAACTAGACAAGGCC	GCGTCATTCTCGACGAGC
	RM215	CAAATGGAGCAGCAAGAGC	TGAGCACCTCCTTCTCTGTAG
	RM205	CTGGTTCTGTATGGGAGCAG	CTGGCCCTTACAGTTTCAGTG
10	RM474	AAGATGTACGGGTGGCATTCC	TATGAGCTGGTGAGCAATGG
	RM7217	TTTGTAGGATGACACGTGGC	CGGGATTTTACGTACCTCACG
	RM222	CTTAAATGGGCCACATGCG	CAAAGCTCCGGCCAAAAG
	RM216	GCATGGCCGATGGTAAAG	TGTATAAAACCACACGGCCA
	RM4455	CTCTCAAAGAACTAGGACTC	GAGAAGGTATGATAACCAAT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

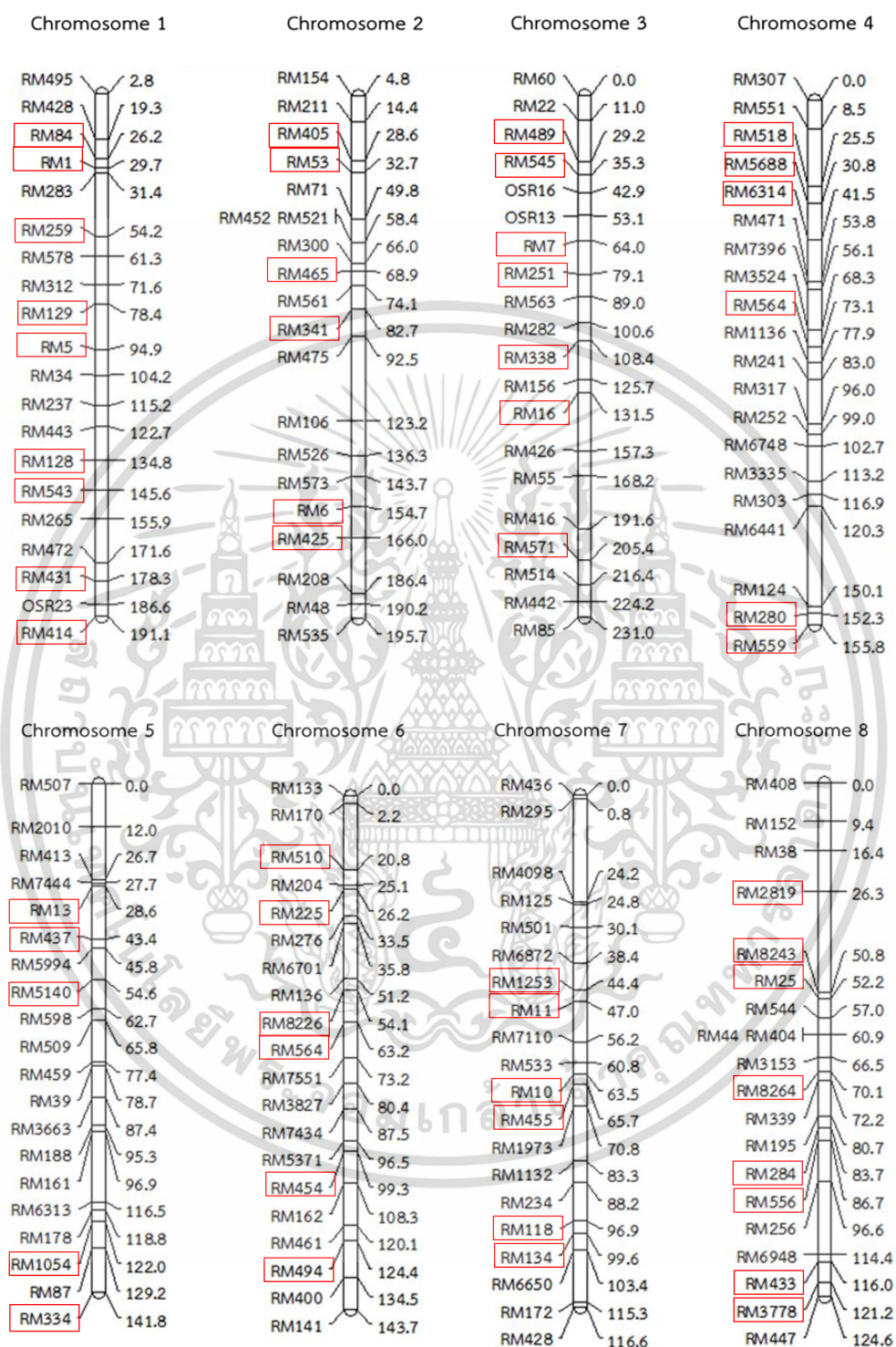
Chromosome	Marker	Primer sequence (5'-3')	
		Forward primer	Reverse primer
10	RM239	TACAAAATGCTGGGTACCCC	ACATATGGGACCCACCTGTC
	RM596	ATCTACACGGACGAATTGCC	AGAAGCTTCAGCCTCTGCAG
	RM467	GGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC	CTCCTGACAATTCAACTGCG
	RM271	TCAGATCTACAATTCCATCC	TCGGTGAGACCTAGAGAGCC
	RM8202	AAGAATTGGTCAATAAGAGTGG	TTCTCTTACC GGAGGATG
	RM258	TGCTGTATGTAGCTCGACC	TGGCCTTTAAAGCTGTCGC
	RM171	AACGCGAGGACACGTA CTTAC	ACGAGATACGTACGCCTTTG
	RM3123	ATTTCCCACACATCTCGCTG	GTGTCGCCGGTCAAGAAC
	RM484	TCTCCCTCCTCACCATTGTC	TGCTGCCCTCTCTCTCTC
	RM590	CATCTCCGCTCTCCATGC	GGAGTTGGGGTCTTGTCG
11	RM286	GGCTTCATCTTTGGCGAC	CCGGATTCACGAGATAAACTC
	RM3717	ATCCCTTTCCCTCAACCAAATCC	AGCAAGCTCTACCTTTGCTGTGC
	RM1812	CAGCTAGTGAGCTCCTAGTG	GCTAACCCACCAACTTATTC
	RM5599	ACCCAACAACACAAAGAGGC	GGTGAATGTGTTGCTGTTGG
	RM332	GCGAAGGCGAAGGTGAAG	CATGAGTGATCTCACTCACCC
	RM4504	TAATTGATGAGCTTGATGTA	AGAGAGATTTTATGAAACCA
	RM552	CGCAGTTGTGGATTTCA GTG	TGCTCAACGTTTGACTGTCC
	RM6115	CGCCATAGTCGATGACATTGTACG	CAACGTGTCGCTTTAACACAACC
	RM479	CCCCTTGCTAGCTTTTG GTC	CCATACCTCTCTCCTCCCC
	RM536	TCTCTCCTCTGTTTGGCTC	ACACACCAACACGACCACAC
	RM6091	GCTGTCCTGTCTTGAATCC	TGGTAGGCTGGTGACATGC
	RM6272	AACATCTACTCCGCCACCAC	CAGCAAGCAGATGGTGCC
	RM287	TTCCCTGTTAAGAGAGAAATC	GTGTATTTGGTGAAAGCAAC
	RM457	CTCCAGCATGGCCTTTCTAC	ACCTGATGGTCAAAGATGGG
	RM4601	CATACATGTGAACCTGACTG	CTAGCTTAGCATCTCTCAA
	RM6440	ATTGCTGGTCTATCGGCAAC	TGTCTCAGTTGGGTCTGCTC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

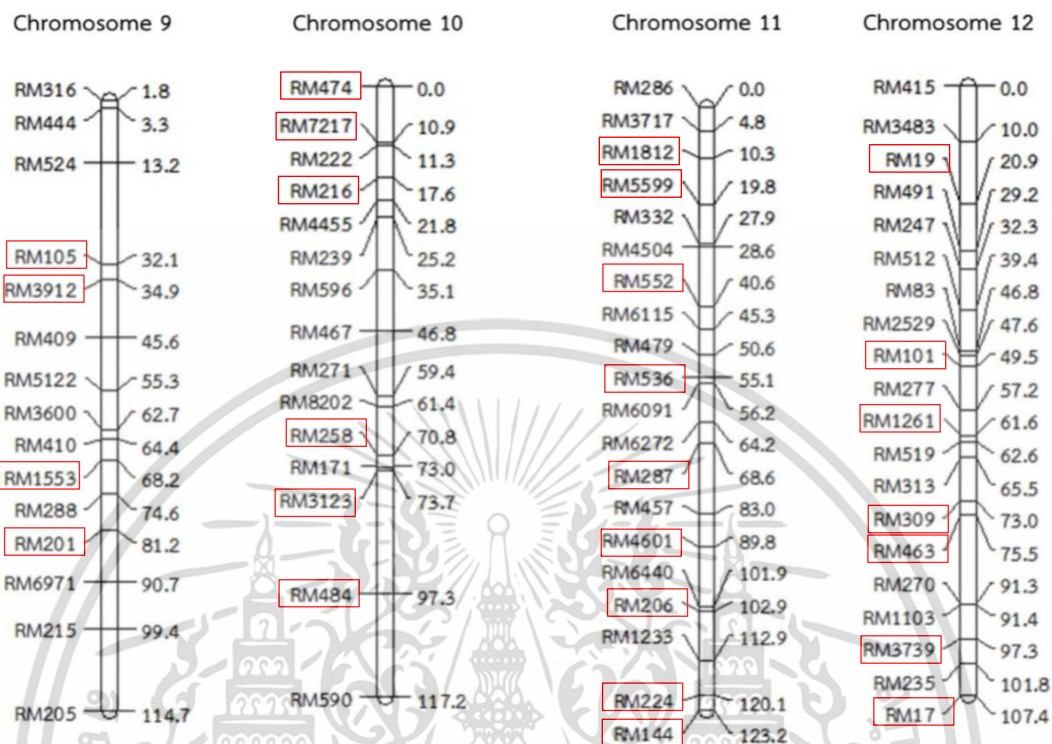
## ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

Chromosome	Marker	Primer sequence (5'-3')	
		Forward primer	Reverse primer
11	RM206	CCCATGCGTTTAACTATTCT	CGTTCCATCGATCCGTATGG
	RM1233	GTGTAAATCATGGGCACGTG	AGATTGGCTCCTGAAGAAGG
	RM224	ATCGATCGATCTTCACGAGG	TGCTATAAAAGGCATTCTGGG
	RM144	TGCCCTGGCGCAAATTTGATCC	GCTAGAGGAGATCAGATGGTAGTGCATG
12	RM415	CTTCGATCCATCATCCATGG	ATTGCTGTACGCAGTTTCGG
	RM3483	CCTAGCTTTCAGGAGCAAG	CCCACAATGAGAAACAGTTG
	RM19	CAAAAACAGAGCAGATGAC	CTCAAGATGGACGCCAAGA
	RM491	ACATGATGCGTAGCGAGTTG	CTCTCCCTTCCCAATTCCTC
	RM247	TAGTGCCGATCGATGTAACG	CATATGGTTTTGACAAAGCG
	RM512	CTGCCTTTCTTACCCCTTC	AACCCCTCGCTGGATTCTAG
	RM83	ACTCGATGACAAGTTGAGG	CACCTAGACACGATCGAG
	RM2529	CATTAATCAGTGGGACTG	AGGCATTTCTGATATGATC
	RM101	AAGTAGTGGTCGAAGTGTGTATCG	GGTGAATGGTCAAGTGACTTAGG
	RM277	CGGTCAAATCATCACCTGAC	CAAGGCTTGAAGGGAAG
	RM1261	GTCCATGCCCAAGACACAAC	GTTACATCATGGGTGACCCC
	RM519	AGAGAGCCCCTAAATTTCCG	AGGTACGCTCACCTGTGGAC
	RM313	TGCTACAAGTGTCTTCAGGAC	GCTCACCTTTTGTGTTCCAC
	RM309	GTAGATCACGCACCTTCTGG	AGAAGGCCTCCGGTGAAG
	RM463	TTCCCCTCCTTTTATGGTGC	TGTTCTCCTCAGTCACTGCG
	RM270	GGCCGTTGGTTCTAAAATC	TGCGCAGTATCATCGGCGAG
	RM1103	CAGCTGCTGCTACTACCCG	CTACTCCACGTCCATGCATG
	RM3739	AGTTGCGCAGCTAATCGATC	AAGATCCAACGGGTTCTGTG
	RM235	AGAAGCTAGGGCTAACGAAC	TCACCTGGTCAGCCTCTTTC
	RM17	TGCCCTGTTATTTCTTCTCTC	GGTGATCCTTCCCATTTCA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

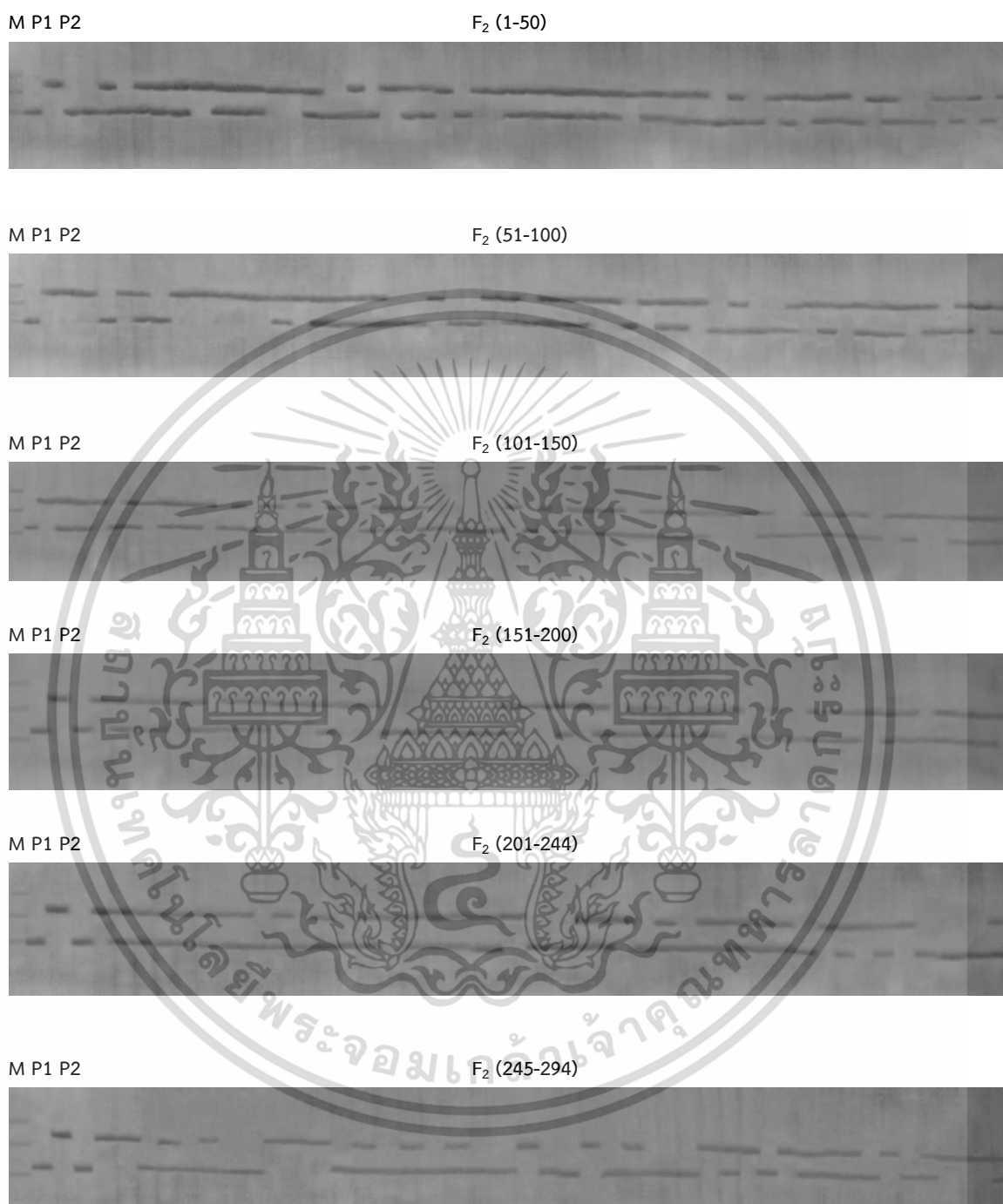


ภาพผนวกที่ 1 เครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ได้จำนวน 79 เครื่องหมาย จากเครื่องหมายทั้งหมด 230 เครื่องหมายที่ครอบคลุมทั้ง 12 โครโมโซมข้าว



ภาพผนวกที่ 1 (ต่อ)

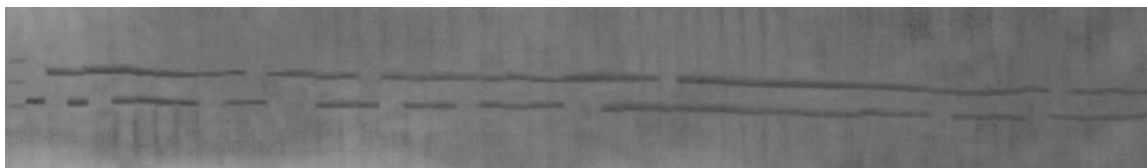
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 2 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM518 ในประชากรข้าวข้าวที่ 2 ( $F_2$  population) จำนวน 730 ต้น P1 คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ P2 คือ พันธุ์ดอกพยอมไร่ (GS23774) M คือ 10 bp DNA ladder

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

M P1 P2

F<sub>2</sub> (295-344)

M P1 P2

F<sub>2</sub> (345-394)

M P1 P2

F<sub>2</sub> (395-444)

M P1 P2

F<sub>2</sub> (445-480)

M P1 P2

F<sub>2</sub> (481-530)

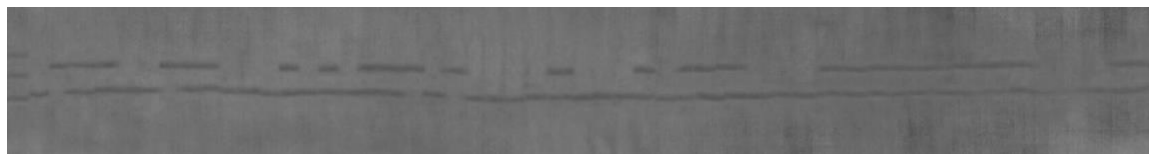
M P1 P2

F<sub>2</sub> (531-580)

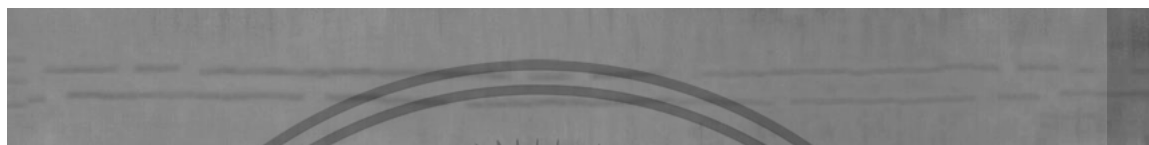
ภาพผนวกที่ 2 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

M P1 P2

F<sub>2</sub> (581-630)

M P1 P2

F<sub>2</sub> (631-680)

M P1 P2

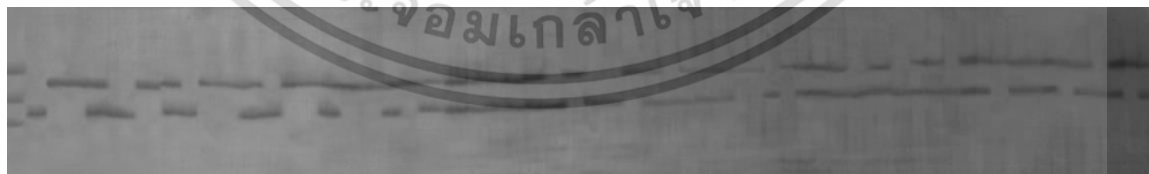
F<sub>2</sub> (681-730)

ภาพผนวกที่ 2 (ต่อ)

M P1 P2

F<sub>2</sub> (1-50)

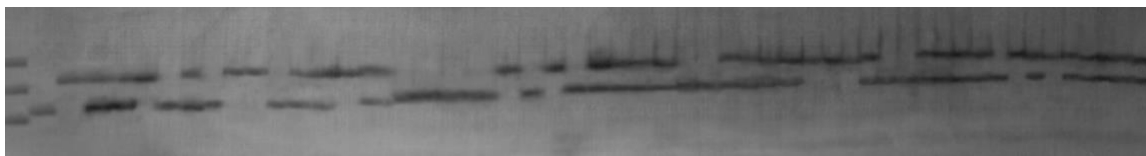
M P1 P2

F<sub>2</sub> (51-100)

**ภาพผนวกที่ 3** รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM6314 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F<sub>2</sub> population) จำนวน 730 ต้น P1 คือ คีอ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ P2 คือ พันธุ์ดอกพยอมไร่ (GS23774) M คือ 10 bp DNA ladder

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

M P1 P2

F<sub>2</sub> (101-150)

M P1 P2

F<sub>2</sub> (151-200)

M P1 P2

F<sub>2</sub> (201-244)

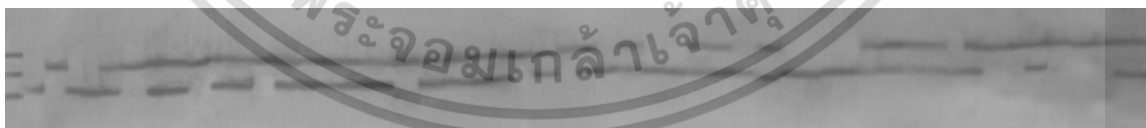
M P1 P2

F<sub>2</sub> (245-294)

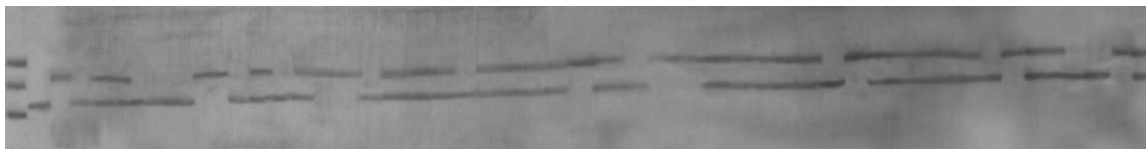
M P1 P2

F<sub>2</sub> (295-344)

M P1 P2

F<sub>2</sub> (345-394)

M P1 P2

F<sub>2</sub> (395-444)

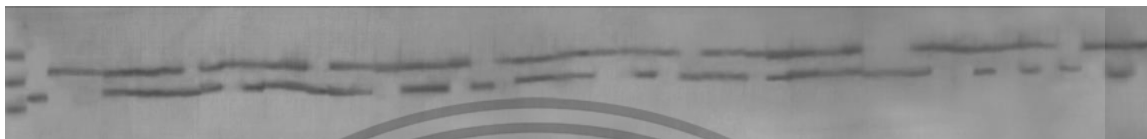
### ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

M P1 P2

F<sub>2</sub> (445-480)

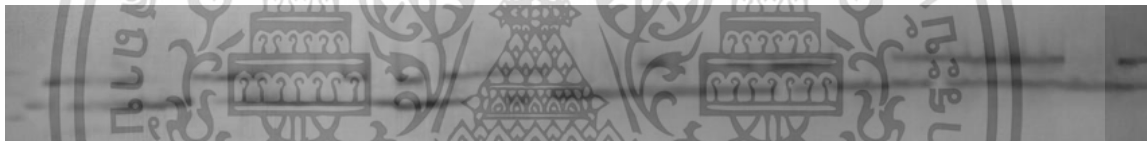
M P1 P2

F<sub>2</sub> (481-530)

M P1 P2

F<sub>2</sub> (531-580)

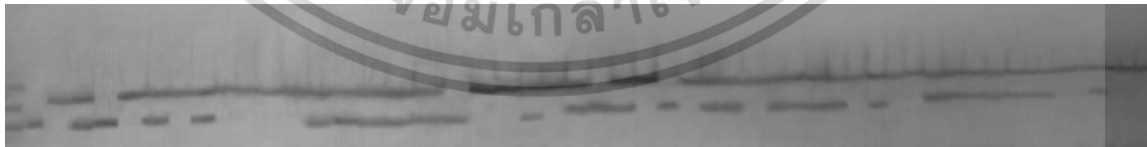
M P1 P2

F<sub>2</sub> (581-630)

M P1 P2

F<sub>2</sub> (631-680)

M P1 P2

F<sub>2</sub> (681-730)

ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติผู้เขียน

- ชื่อ-นามสกุล นางสาวสุพัตรา จันทศรี
- วัน เดือน ปีเกิด 16 ธันวาคม พ.ศ. 2537 ที่ปราจีนบุรี
- ที่อยู่ปัจจุบัน 120 หมู่ 7 ตำบลบ้านซ่อง อำเภอพนมสารคาม จังหวัดฉะเชิงเทรา 24120
- ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2560 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเกษตรศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- ผลงานทางวิชาการ **Janthasri, S. and Parinthawong, N. (2020). Blast resistance evaluation and genetic inheritance of gene controlling leaf blast resistance in Dawk Pa-yawm Rai variety (GS23774). *International Journal of Agricultural Technology* 16(1): 49-54.**