



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* จากแหล่ง  
พันธุกรรมข้าวพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย

Screening and Molecular Mapping of Rice Blast Resistance Gene  
Corresponding to Rice Blast Fungus (*Pyricularia grisea*) from  
Landrace Rice of Thailand

ประเภททุน กองทุนวิจัย รหัสโครงการ KREF045401

นางสาวนงลักษณ์ เกรินทวงศ์

ได้รับการสนับสนุนเงินวิจัยจาก กองทุนวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2554

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* จากแหล่ง  
พันธุกรรมข้าวพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย

Screening and Molecular Mapping of Rice Blast Resistance Gene  
Corresponding to Rice Blast Fungus (*Pyricularia grisea*) from  
Landrace Rice of Thailand

ประเภททุน กองทุนวิจัย รหัสโครงการ KREF045401

นางสาวนงลักษณ์ เกรินทวงศ์

ได้รับการสนับสนุนเงินวิจัยจาก กองทุนวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2554

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ชื่อโครงการ** การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* จากแหล่งพันธุ์กรรมข้าว พันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย

Screening and molecular mapping of rice blast resistance gene corresponding to rice blast fungus (*Pyricularia grisea*) from landrace rice of Thailand

**แหล่งเงิน** กองทุนวิจัย สจล.

**ประจำปีงบประมาณ** 2554 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 480,000 บาท

**ระยะเวลาทำการวิจัย** 2 ปี ตั้งแต่ 22 มิถุนายน พ.ศ. 2554 ถึง 21 มิถุนายน พ.ศ. 2556

**หัวหน้าโครงการ** นางสาวนงลักษณ์ เกรินทวงศ์

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยี

พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### บทคัดย่อ

เชื้อรา *Pyricularia grisea* เป็นเชื้อสาเหตุโรคไหม้ ข้าวที่มีความสำคัญและระบาดทำความเสียหายต่อผลผลิตข้าวในหลายพื้นที่ของประเทศไทย การใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพและคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ อย่างไรก็ตามพันธุ์ต้านทานมักจะสูญเสียความต้านทานในระยะต่อมา เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคไหม้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถปรับตัวเข้าทำลายพันธุ์ข้าวต้านทานภายในเวลาไม่กี่ฤดูปลูก ดังนั้นการค้นหาและระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ที่สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลากหลายสายพันธุ์จึงมีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าวในภาคต่างๆ ของประเทศไทย จำนวน 19 ไอโซเลท วิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อราด้วยเครื่องหมาย *Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) จำนวน 14 เครื่องหมาย พบ 13 เครื่องหมายสามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อราได้ โดยมีค่า Polymorphism information content (PIC) อยู่ระหว่าง 0.1 ถึง 0.8 จัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 19 ไอโซเลทได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม 1 คิดเป็น 73 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราทั้งหมด ซึ่งเป็นเชื้อราจากบริเวณภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง กลุ่ม 2 คิดเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราทั้งหมด เป็นเชื้อราจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ และพบเชื้อราจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือแยกออกเป็นเชื้อเดี่ยว ในกลุ่ม 3 และ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ไม่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งหรือบริเวณที่มีการระบาดของโรคไหม้ ในจังหวัดเดียวกันอาจมีจำนวนเชื้อเข้าทำลายข้าวมากกว่า 1 ไอโซเลท เชื้อสาเหตุโรคไหม้ทั้ง 19 ไอโซเลทถูกนำมาใช้ในการทดสอบการเกิดโรคบนประชากรข้าวชั่วที่ 2 ( $F_2$ -population) จำนวน 250 ต้น ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ และข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองหนึ่งในสี่สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคไหม้ ศึกษาปฏิกิริยาของยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าว  $F_2$  โดยประเมินการเกิดโรค 7 วัน ภายหลังปลูกเชื้อรา ทั้ง 19 ไอโซเลทที่ความเข้มข้น  $10^5$  conidia ต่อมิลลิลิตร พบการกระจายตัวของลักษณะต้านทาน:อ่อนแอโรคไหม้ในอัตราส่วน 15:1 ( $X^2 = 0.90$ ,  $df=1.0$ ) แสดงว่าข้าวพันธุ์ห้วยมียีนหลักในการต้านทานโรคไหม้ 2 ยีน (2 major resistant alleles) โดยแต่ละยีนเป็นอิสระต่อกัน (non-linkage) ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมาย microsatellite คัดเลือกเครื่องหมาย microsatellite จาก 230 เครื่องหมาย พบ 66 เครื่องหมายสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้า เมื่อผู้ใดเห็นไปใช้ประโยชน์ในการค้า

ไม่ว่ากรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แม่ได้ คัดเลือกด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) พบ 3 เครื่องหมายสามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ชัดเจน ได้แก่ เครื่องหมาย RM125, RM144 และ RM224 การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ทั้ง 3 เครื่องหมายในประชากรข้าว F<sub>2</sub> จำนวน 250 ต้น มีอัตราส่วนระหว่างมีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (A) : มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่ (H) : มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (B) เป็น 1 : 2 : 1 ด้วยค่า Chi square 0.05 (df=2.0), 0.1 (df=2.0), 0.5 (df=2.0) สำหรับเครื่องหมาย RM125, RM144 และ RM224 ตามลำดับ แสดงว่า เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 3 สัมพันธ์กับยีนควบคุมความต้านทานต่อโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ห้วย จากนั้นวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย RM11 และ RM1132 บนโครโมโซม 7 เครื่องหมาย RM287, RM5926 และ RM6094 บนโครโมโซม 11 และเครื่องหมาย RM247, RM235 และ RM1261 บนโครโมโซม 12 เพื่อใช้ยืนยันตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ โดยเลือกใช้ประชากรข้าวที่มี phenotype อ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจนจำนวน 15 ต้น สร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเปอร์เซ็นต์ recombination พบเครื่องหมาย RM144, RM224, RM5926 และ RM6094 ที่อยู่บนโครโมโซม 11 มีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ โดยทั้ง 4 เครื่องหมายมีระยะห่างจากยีนต้านทาน 20, 20, 26.67 และ 26.67 cM ตามลำดับ เมื่อสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้โปรแกรม MAPMAKER พบยีนต้านทานโรคไหม้มีตำแหน่งที่ตั้งอยู่บริเวณปลายด้านล่างโครโมโซม 11 วางตัวอยู่ใกล้กับเครื่องหมาย RM144, RM224, RM5926 และ RM6094 โดยมีระยะห่างจากเครื่องหมาย RM144 และ RM224 เท่ากันคือ 13.7 cM ห่างจากเครื่องหมาย RM5926 เป็นระยะทาง 17.1 cM และห่างจากเครื่องหมาย RM6094 เป็นระยะทาง 20.5 cM จากผลการวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ประกอบกับผลการศึกษาปฏิกิริยาของยีนและการระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ พบว่าข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วยเป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรคไหม้แบบกว้าง (broad spectrum) สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลท โดยมียีนหลัก 2 ยีนที่เป็นอิสระต่อกันควบคุมความต้านทาน และตรวจพบว่า 1 ใน 2 ยีนนี้มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 11 ข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วยจึงเป็นแหล่งของยีนต้านทานโรคไหม้ที่สำคัญ สามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้ได้

**คำสำคัญ** ข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย พันธุ์ต้านทานโรคไหม้ การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล *Pyricularia grisea* ความต้านทานโรคแบบกว้าง

## ABSTRACT

*Pyricularia grisea* is a fungal pathogen of rice blast disease, a major disease that currently outbreak and causes yield losses in several rice growing areas of Thailand. Utilization of the resistant varieties is considered to be the most effective and economical method to control the rice blast. However, resistant varieties are usually have less durable resistance because the fungus is high genetic diversity, and able to break the resistance within a few seasons. Therefore, the screening and mapping for blast resistant genes that confer resistant to several blast isolates is important in breeding for the resistant varieties. In this research, genetic diversity of 19 isolates of rice blast pathogen collected from paddy fields in Thailand were analyzed using 14 *Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) markers. Thirteen markers resulted to polymorphism and their polymorphism information content (PIC) values were 0.1 to 0.8. Cluster analysis grouped the 19 isolates of fungal pathogen into 4 groups, group 1 comprised 73% of the total included isolates from the North, Northeast and Central regions. Group 2 was 15% composed of isolates from the Northeast and South, and 2 isolates from the Northeast were separated from others and set in group 3 and 4. Relationship of rice blast fungi in each group did not depend on the outbreak area. The disease outbreak area in the same province appeared to be infected by more than one isolates. The nineteen isolates of rice blast pathogen were pathogenicity tested on 250 F<sub>2</sub>- plants derived from a cross between Huai variety (GS19769), one out of four Thai indigenous rices that show highly resistant to blast, and KDML105, the susceptible cultivar. Reaction of blast resistant genes in F<sub>2</sub> population was evaluated 7 days after inoculation with a mix of 19 isolates at concentration of 10<sup>5</sup> conidia/ml. The result showed the distribution of blast resistance: susceptible in a good fit ratio of 15:1 ( $X^2 = 0.90$ ,  $df = 1.0$ ), indicating that Huai variety carried 2 non-linkage of major dominant resistant alleles. The location of blast resistant genes was identified by using microsatellite marker. Out of 230 markers, 66 markers were able to distinguish the parents. Only 3 markers, namely RM125, RM144 and RM224 were selected after screening by BSA method. Distribution of 3 microsatellite markers in 250 F<sub>2</sub>- plants for the proportion of the susceptible parent allele; A: both parent allele; H: resistant parent allele; B, showed a good fit to the ratio of 1:2:1 with the Chi-square value of 0.05, 0.1 and 0.5 ( $df=2.0$ ) for the RM125, RM144 and RM224, respectively. The result indicated that each marker linked to each single blast resistant allele. Analysis of marker RM11 and RM1132 on chromosome 7, marker RM287, RM5926 and RM6094 on chromosome 11 and marker RM247, RM235 and RM1261 on chromosome 12 were conducted to confirm the gene location using 15 F<sub>2</sub>- plants that showed the susceptible phenotype to blast disease. Recombination frequency of each marker was analyzed and the results

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

showed that the marker RM144, RM224, RM5926 and RM6094 on chromosome 11 were linked to the blast resistant gene at the distance of 20, 20, 26.67 and 26.67 cM, respectively. The location of the resistant gene was analyzed using MAPMAKER software. The resistant gene located at the bottom end of chromosome 11 and linked to markers RM144, RM224, RM5926 and RM6094, at a distance of 13.7, 13.7, 7.1 and 20.5 cM, respectively. The results of the genetic diversity of rice blast pathogen and identification of blast resistant gene indicated that Huai variety was broad spectrum resistant to multiple fungal isolates of blast pathogen. It carried 2 non-linkage major resistant genes and one gene located on chromosome 11. Therefore, Huai variety can be used as genetic resource in breeding program for resistance to rice blast disease.

**Keywords** Thai indigenous rice, Blast resistance variety, Marker assisted selection, *Pyricularia grisea*, Broad spectrum resistance



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อราโรคไหม้ที่ใช้ในการทดสอบ

ในเบื้องต้นของโครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และในเวลาต่อมาจากกองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) สำหรับการสนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือทางอณูชีววิทยา ในการดำเนินโครงการวิจัยและการสนับสนุนทุนการศึกษาบางส่วนแก่นักศึกษาผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย

นงลักษณ์ เกรินทวงศ์  
ผู้วิจัย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	V
สารบัญ	VI
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญภาพ	IX
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
<b>บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	<b>3</b>
2.1 แนวคิด ทฤษฎีหลัก	3
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.2.1 ข้าวและความสำคัญ	4
2.2.2 ข้าวขาวดอกมะลิ 105	5
2.2.3 โรคไหม้ข้าว	6
2.2.4 ยีนต้านทานโรคไหม้ของข้าว	10
2.2.5 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสาเหตุโรคไหม้กับพันธุ์ข้าวต้านทาน	13
2.2.6 การปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ในประเทศไทย	14
2.2.7 ข้าวพื้นเมืองไทยและการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมือง	16
2.2.8 เครื่องหมายดีเอ็นเอ	18
<b>บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย</b>	<b>21</b>
3.1 การสำรวจและเก็บเชื้อราสาเหตุโรคไหม้	21
3.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้	22
3.3 การคัดเลือกข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีลักษณะต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง	25
3.4 การวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนและการสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว	25
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัย</b>	<b>36</b>
4.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้	36
4.2 ข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีลักษณะต้านทานโรคไหม้	40
4.3 การกระจายตัวของยีนและการสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
<b>บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง</b>	<b>59</b>
5.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้	59
5.2 การคัดเลือกข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีลักษณะต้านทานโรคไหม้	60
5.3 การกระจายตัวของยีน และแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว	60
<b>บทที่ 6 สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย</b>	<b>65</b>
6.1 ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่	65
6.2 การร่วมประชุมวิชาการ	65
6.3 การผลิตบัณฑิต	66
<b>บรรณานุกรม</b>	<b>67</b>
<b>ภาคผนวก</b>	<b>74</b>
เอกสารหลักฐานอ้างอิงของผลผลิต	
สรุปการใช้จ่ายเงิน	
ประวัติผู้วิจัย	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ที่เชื่อมโยงกับเครื่องหมายดีเอ็นเอบนโครโมโซมข้าว	12
3.1	เชื้อสาเหตุโรคไหม้ 19 ไอโซเลทที่ใช้ในการทดสอบความต้านทานโรคและแหล่งที่มา	23
4.1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primer ของเครื่องหมายโมเลกุล MGM และค่า polymorphic information content (PIC)	37
4.2	ผลประเมินการเกิดโรคด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 19 ไอโซเลท บนประชากรข้าวข้าวที่ 2 (F <sub>2</sub> ) จำนวน 250 ต้น	42
4.3	อัตราการกระจายตัวของลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 19 ไอโซเลท ในประชากรข้าวข้าวที่ 2 (F <sub>2</sub> ) จำนวน 250 ต้น	43
4.4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้ จำนวน 66 เครื่องหมาย และผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA)	45
4.5	อัตราการกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าวที่ 2 (F <sub>2</sub> ) จำนวน 250 ต้น	50
4.6	การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าว 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ และเปอร์เซ็นต์การเกิด recombination ของยีนต้านทานโรคไหม้	57

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	วงจรชีวิต (Life cycle) และวงจรการเกิดโรค (Pathogenesis cycle) ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้	7
3.1	การตรวจหา conidia ด้วยกล้อง Stereo microscope และการเลือกเกี่ยว conidia ด้วยหลอดแก้วปลายแหลม	23
3.2	การผสมพันธุ์ข้าว	26
3.3	เกณฑ์ให้คะแนนการเกิดโรคตามระดับคะแนนของ Roumen et al. (1997)	28
3.4	ตำแหน่งของเครื่องหมาย microsatellite จำนวน 230 เครื่องหมาย บนโครโมโซมของข้าว	30
3.5	ตัวอย่างรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของประชากร F <sub>2</sub> ที่ปรากฏและการกำหนดเครื่องหมาย	33
4.1	รูปแบบดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 19 ไอโซเลท จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ของเครื่องหมาย MGM209 และ MGM57	38
4.2	แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ (Dendrogram) ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 19 ไอโซเลท วิเคราะห์โดยวิธี SAHN จากเครื่องหมาย MGM จำนวน 13 เครื่องหมาย	39
4.3	ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ ข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย และข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (KDML105 x GS19769)	41
4.4	รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมายที่วิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA)	48
4.5	รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM144 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F <sub>2</sub> ) จำนวน 250 ต้น	53
4.6	รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM224 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F <sub>2</sub> ) จำนวน 250 ต้น	53
4.7	รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM125 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F <sub>2</sub> ) จำนวน 250 ต้น	54
4.8	รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM11 และ RM1132 (โครโมโซม 7) ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F <sub>2</sub> ) ที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ 15 ต้น	54
4.9	รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM247, RM1261 และ RM235 (โครโมโซม 12) ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F <sub>2</sub> ) ที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ 15 ต้น	55
4.10	รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM5926, RM6094 และ RM287 (โครโมโซม 11) ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F <sub>2</sub> ) ที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ 15 ต้น	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

4.11

แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ และระยะห่างระหว่างเครื่องหมายบนโครโมโซม 11 ของข้าว วิเคราะห์ในประชากรข้าว ข้าวที่ 2 (F<sub>2</sub>) ที่แสดงความอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 19 ไอโซเลท จำนวน 15 ต้น

หน้า

58



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 1 บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวเป็นทั้งพืชอาหารและพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติตั้งแต่ฉบับแรก (ฉบับที่ 1: พ.ศ. 2505 - 2509) จนถึงฉบับปัจจุบัน (ฉบับที่ 12: 2560-2564) ได้กำหนดให้ข้าวเป็นพืชที่ต้องปลูกเพื่อความมั่นคงของประเทศ และเป็นพืชที่มีเป้าหมายในการผลิต ทั้งนี้การผลิต การบริโภค และการค้าข้าวส่วนใหญ่อยู่ในภูมิภาคทวีปเอเชีย ซึ่งประเทศที่มีบทบาทมากที่สุดในการผลิตและส่งออกข้าวคือประเทศไทย รองลงมาคืออินเดีย เวียดนาม จีน และพม่า ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การผลิตข้าวในประเทศไทยโดยเฉพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวที่เป็นที่นิยมในการบริโภคทั้งของคนไทยและชาวต่างประเทศ ยังประสบปัญหาการสูญเสียผลผลิตที่เกิดขึ้นจากการเข้าทำลายของโรคไหม้โดยเฉลี่ยพบว่ามีถึง 10 เปอร์เซ็นต์จากผลผลิตข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ควรผลิตได้ในประเทศ

โรคไหม้เป็นโรคที่มีการระบาดทุกพื้นที่ของการเพาะปลูกข้าวในประเทศไทย มีเชื้อรา *Pyricularia grisea* เป็นเชื้อก่อโรคที่สร้างความเสียหายแก่ต้นข้าวในทั้ง 3 ระยะ คือ ระยะต้นกล้า ระยะแตกกอ และระยะออกรวง ส่งผลให้ผลผลิตข้าวลดลงอย่างมากในแต่ละปี จากปัญหาดังกล่าว ได้มีหน่วยงานที่ดำเนินการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีลักษณะต้านทานโรคไหม้โดยใช้แหล่งความต้านทานจากข้าวสายพันธุ์ต่างๆ อย่างไรก็ตาม เชื้อราสาเหตุโรคไหม้เป็นเชื้อราที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (Sirithunya *et al*, 2008) มีการพัฒนาปรับตัวได้อย่างรวดเร็วในการเข้าทำลายข้าว จากเชื้อที่ไม่รุนแรงสามารถพัฒนาเป็นเชื้อที่รุนแรง และมีผลทำให้ข้าวพันธุ์ต้านทานพันธุ์ใหม่ที่มีการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเกิดการสูญเสียความต้านทานภายในระยะเวลาไม่กี่ฤดูกาลหลังจากที่มีการส่งเสริม (Hammond-Kosack and Jones, 2000) ข้อมูลด้านการปรับตัวของเชื้อสาเหตุโรคไหม้จึงเป็นปัจจัยสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้

ข้าวพันธุ์พื้นเมืองของไทยที่มีอยู่กว่า 20,000 สายพันธุ์ เป็นพันธุ์ข้าวที่ผ่านกระบวนการปรับตัวให้เข้ากับระบบนิเวศท้องถิ่นมาเป็นเวลานาน เช่น มีความเหมาะสมกับสภาพพื้นที่ ทนทานต่อสภาพภูมิอากาศ และอาจรวมถึงคุณสมบัติในการทนต่อโรคไหม้ที่มีการระบาดอยู่ในบริเวณพื้นที่เหล่านั้น ข้าวพันธุ์พื้นเมืองนี้จึงเป็นแหล่งพันธุกรรมสำคัญที่สามารถนำไปค้นหาลักษณะความต้านทานโรคไหม้ โดยเฉพาะลักษณะความต้านทานโรคไหม้ที่ครอบคลุมชนิดของเชื้อโรคอย่างกว้างขวาง (broad spectrum resistance) ทั้งเชื้อราสาเหตุโรคไหม้สายพันธุ์รุนแรง และสายพันธุ์ไม่รุนแรงที่อาจมีการพัฒนาเป็นสายพันธุ์รุนแรงได้ในอนาคต ซึ่งเมื่อประกอบกับข้อมูลด้านการปรับตัวของเชื้อสาเหตุโรคแล้ว จะเป็นข้อมูลสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานโรคไหม้ เพื่อลดความรุนแรงของการระบาดของโรคไหม้ที่จะทำให้ผลผลิตข้าวลดลง นอกจากนี้แหล่งความต้านทานใหม่ที่ค้นพบนี้ยังสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ต่อไปได้ในอนาคต

### 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาปฏิกิริยาสัมพันธ์ของการเกิดโรคไหม้ระหว่างสายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองในประเทศไทยที่ตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้

1.2.2 เพื่อค้นหาแหล่งพันธุกรรมของความต้านทานโรคไหม้ใหม่จากข้าวพันธุ์พื้นเมืองในประเทศไทย

1.2.3 เพื่อระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมของข้าว

1.2.4 เพื่อพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อใช้ในการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้

### 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

คัดเลือกข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีความต้านทานโรคไหม้แบบกว้างจากทั้งหมด 300 สายพันธุ์ ด้วยเชื้อราที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคไหม้ในประเทศไทย นำข้าวสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกไปผสมกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคไหม้ เพื่อสร้างประชากร F1 และ F2 ศึกษาการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรค รวมทั้งยีนควบคุมลักษณะความต้านทาน จากนั้นระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมและเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคไหม้

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้ประชากรเชื้อสาเหตุโรคไหม้ข้าวจากพื้นที่ปลูกข้าวบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออก

1.4.2 ได้ข้อมูลด้านความต้านทานโรคไหม้ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองของไทยจำนวน 200 สายพันธุ์

1.4.3 ได้สายพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้อย่างน้อย 1 สายพันธุ์

1.4.4 ค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้จากประชากรข้าวพันธุ์พื้นเมืองของไทย

1.4.5 สามารถระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ยีนใหม่ ซึ่งจะเป็ประโยชน์สำหรับการทำ fine mapping การทำ position cloning และการศึกษา ยีนต้านทานโรคไหม้

## บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 แนวคิด ทฤษฎีหลัก

การผลิตข้าวในประเทศไทยประสบปัญหาสำคัญหลายประการโดยเฉพาะการระบาดของโรคและแมลง เช่น โรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง โรคเมล็ดต่าง โรคใบแห้งที่เกิดจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและเพลี้ยกระโดดหลังขาว โรคที่เกิดจากไวรัส รวมทั้งอุปสรรคทางด้านสภาพแวดล้อม เช่น น้ำท่วม ดินเค็ม ภัยแล้ง เป็นต้น สำหรับปัญหาของการผลิตข้าวในนาชลประทานและน่าน้ำฝนนั้น พบว่าโรคไหม้มีความสำคัญมากที่สุด และมีการระบาดบ่อยที่สุด โดยพบมีการระบาดในแหล่งปลูกข้าวทั่วประเทศ โดยเฉพาะภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งการระบาดสามารถเกิดขึ้นได้ในทุกช่วงอายุของข้าวตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงระยะเก็บเกี่ยว ระดับความรุนแรงของโรคจะแตกต่างกันตามพื้นที่และสภาพแวดล้อมของแต่ละพื้นที่ ซึ่งรายงานในปี 2535 พบว่ามีการระบาดของโรคไหม้ที่รุนแรงในพื้นที่กว่า 70% ของพื้นที่ปลูกข้าวในภาคเหนือของประเทศ โดยมีการระบาดมากในข้าวหอมมะลิ 105 กข 6 กข 8 กข 10 เหมยนอง เหนียวอุบล และเหนียวสันป่าตอง (Disthaporn, 1994)

โรคไหม้มีสาเหตุจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* (asexual stage) หรือ *Magnaporthe grisea* (sexual stage) สามารถทำลายข้าวได้ทุกระยะตั้งแต่เริ่มปลูกจนถึงเก็บเกี่ยว ความรุนแรงของโรคจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีสภาพแวดล้อมเหมาะสม คือ สภาพความชื้นสูงตั้งแต่ 80% ขึ้นไป อุณหภูมิที่อยู่ระหว่าง 22-28 องศาเซลเซียส และที่สำคัญคือการใช้พันธุ์อ่อนแอต่อโรค เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม ส่วนขยายพันธุ์คือ conidia ที่แพร่กระจายมาตามกระแสลมและตกลงบนต้นข้าวจะงอก และสร้าง appressorium และ infection peg เพื่อแทงผ่านชั้นของ cuticle และ epidermis ของต้นข้าว หรืออาจเจริญผ่านทางปากใบ (stomata) เนื้อเยื่อบริเวณที่เชื้อราเข้าทำลายจะเกิดลักษณะอาการเป็นแผลไหม้ที่แบ่งเป็น 3 บริเวณ คือ บริเวณรอบนอกมีสีเหลือง เรียกว่า venetrate zone เป็นบริเวณที่เกิดจากการที่เชื้อราปล่อยสารพิษ (toxin) ออกมา บริเวณถัดจากขอบนอกเข้าไปด้านในมีสีน้ำตาล เรียกว่า necrotic zone และบริเวณด้านในมีขนาดใหญ่ที่สุดเรียกว่า disintegrated zone ซึ่งจะมีสีเทา หรือบางครั้งจะมีลักษณะใน และแผลซ้ำ (Ou, 1985)

เชื้อรา *P. grisea* เป็นเชื้อราที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม และมีการพัฒนาพันธุกรรมใหม่ๆ ขึ้นเสมอ ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคไหม้ในธรรมชาติมีสาเหตุจากกระบวนการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเป็นปัจจัยหลัก (Genovesi and Magill, 1976; Crawford et al., 1986) เช่น การกลายพันธุ์ (mutation) การเกิดลักษณะ heterokaryosis หรือ การเกิด parasexual cycle โดย Soubabere et al. (2001) ได้รายงานการเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้จากพื้นที่ต่างๆ ทั่วโลก พบว่าเชื้อสาเหตุโรคไหม้จากทวีปเอเชียมีความหลากหลายมากที่สุด และเชื้อจากทวีปยุโรปมีความหลากหลายต่ำที่สุด สำหรับการศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อในประเทศไทยโดย Mekwatanakarn et al. (1999) ด้วยเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphis (AFLP) และใช้เครื่องหมายโมเลกุล MGR536 พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยมีความหลากหลายสูงมากเมื่อเทียบกับประเทศอื่น และยังพบว่าเชื้อราสาเหตุโรคสามารถขยายพันธุ์แบบใช้เพศไทย ซึ่งอาจเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ประเทศไทยมีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลากหลายและมีความแปรปรวนของเชื้อสาเหตุโรคสูง นอกจากนี้การทดสอบปฏิกิริยาของพันธุ์ข้าวต่อโรคไหม้ในประเทศไทยที่ดำเนินการโดยศูนย์วิจัยข้าวและสถานีทดลองข้าวที่กระจายอยู่ทุกภูมิภาคของประเทศ ชี้ให้เห็นว่าสายพันธุ์ของเชื้อโรคไหม้มีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ปลูกข้าว (วัชร, 2534)

จากการที่เชื้อสาเหตุโรคไหม้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมและมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้เร็ว การปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้จึงมีการดำเนินการอย่างต่อเนื่อง โดยมีเป้าหมายเพื่อให้ได้พันธุ์ที่มียืนต้านทานแบบยั่งยืน (durable resistance) นั่นคือการพัฒนาให้ข้าวมียืนต้านทานแบบจำเพาะ (major gene) หลายตำแหน่ง ร่วมกับยืนต้านทานแบบให้ผลน้อย หรือ minor gene (Bonman and Mackill, 1988) จะทำให้ข้าวมีความต้านทานต่อโรคไหม้ได้อย่างยาวนาน หรือการพัฒนาให้มียืนควบคุมความต้านทานโรคไหม้ที่มีผลครอบคลุมชนิดของเชื้ออย่างกว้างขวาง (broad-spectrum resistance) ที่จะทำให้เชื้อโรคไม่สามารถพัฒนาตัวเองเข้าทำลายพันธุ์ข้าวเหล่านั้นได้ ยืนต้านทานโรคไหม้ที่มีการศึกษาแล้วส่วนใหญ่อยู่บนบริเวณโครโมโซมที่ 6 และ 12 (Nagato and Yoshimura, 1998) สำหรับยืนควบคุมความต้านทานโรคไหม้ได้อย่างกว้างขวางมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 7 และ 9 ในขณะที่ยืนควบคุมความต้านทานโรคไหม้คอรองอยู่ที่โครโมโซมที่ 4 5 6 และ 11 และยังพบว่าการทำงานของยืนแต่ละตำแหน่งมีความสัมพันธ์กัน (Sirithunya *et al.*, 2002)

ประเทศไทยมีพันธุ์ข้าวปลูกประมาณ 24,000 ตัวอย่าง รวบรวมโดยศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติ กรมวิชาการเกษตร และ ฉวีวรรณ (2543) ได้รายงานจำนวนพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของไทยที่รวบรวมไว้ในธนาคารพันธุ์ข้าวว่ามีมากกว่า 5,900 สายพันธุ์ นอกเหนือไปจากข้าวพันธุ์ดีเป็นที่ต้องการของตลาด ข้าวพันธุ์ป่า ข้าวพันธุ์ปรับปรุง จึงนับได้ว่าประเทศไทยมีทรัพยากรพันธุ์ข้าวมากแห่งหนึ่งของโลก พันธุ์ข้าวพื้นเมืองเป็นพันธุ์ข้าวที่ได้รับการคัดเลือกโดยเกษตรกร เนื่องจากเป็นพันธุ์พื้นเมืองมีคุณสมบัติที่ดีเป็นที่ต้องการของคนในแต่ละท้องถิ่น สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง ทนต่อโรค และแมลง ซึ่งเป็นศักยภาพของแหล่งพันธุกรรมข้าวของไทยที่มีการปรับตัวได้ดี และอาจเป็นแหล่งพันธุกรรมข้าวไทยที่สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต้านทานโรคไหม้ได้

## 2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.2.1 ข้าวและความสำคัญ

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

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตศูนย์กลางความผันแปรของข้าว ประกอบกับสภาพแวดล้อมและภูมิอากาศมีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ทำให้เกิดความหลากหลายของพันธุ์ข้าวทั้งในกลุ่มของพันธุ์ข้าวที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิยมปลูกอยู่ในปัจจุบัน พันธุ์ข้าวพื้นเมือง และพันธุ์ข้าวป่า (สมทรง, 2550) ในประเทศไทยพบพันธุ์ข้าวปลูกประมาณอย่างน้อย 3,500 ชื่อที่มีลักษณะต่างกัน โดยสถาบันวิจัยข้าวได้รวบรวมพันธุ์ข้าวปลูกและข้าวป่าของไทยไว้ได้มากกว่า 17,000 ตัวอย่าง (สงกรานต์ และ บริบูรณ์, 2544)

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

## 2.2.2 ข้าวขาวดอกมะลิ 105

พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ได้มาจากการคัดเลือกแบบคัดพันธุ์บริสุทธิ์ (pure line selection) ปลูกเปรียบเทียบกับพันธุ์ที่สถานีทดลองข้าวโคกสำโรง และปลูกเปรียบเทียบกับพันธุ์ในท้องถิ่นภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จนได้สายพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 4-2-105 ซึ่งเลข 4 หมายถึง สถานีที่เก็บรวงข้าว คืออำเภอบางคล้า เลข 2 หมายถึงพันธุ์ทดสอบที่ 2 คือ ข้าวดอกมะลิ และเลข 105 หมายถึง แถวหรือรวงที่ 105 จากจำนวน 199 รวง พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวเจ้าไวต่อช่วงแสงอย่างอ่อน (weakly photoperiod sensitive) ปลูกให้ผลดีในฤดูนาปี ความสูงถึงคอรวงเฉลี่ย 140 เซนติเมตร กอตั้ง ปล้องสีเหลืองอ่อน กาบใบและใบสีเขียว มีขนใบ ปลายใบตกร ลิ่นใบสีขาวรูปร่างแหลมมี 2 ยอด หูใบและข้อต่อใบสีเขียวอ่อน ปลายยอดดอกสีขาว กลีบรองดอกสีขาว ยอดเกสรตัวเมียสีขาว ต้นข้าวแข็งปานกลาง (มีลุ่มบ้าง) รวงแน่นปานกลาง คอรวงยาว ระแงะถี่ ใบธงเอนปานกลางเปลือกและยอดเมล็ดสีฟาง มีขนสั้นบนเปลือกเมล็ด กลีบรองดอกสั้นสีฟาง น้ำหนักข้าวเปลือก 1,000 เมล็ด ประมาณ 27.9 กรัม เมล็ดข้าวเปลือกยาว 10.4 มิลลิเมตร กว้าง 2.6 มิลลิเมตร เมล็ดข้าวกล้องรูปร่างเรียวยาว ระยะพักตัวของเมล็ด 8 สัปดาห์ ผลผลิตเฉลี่ย 515 กิโลกรัมต่อไร่ ข้าวหอมของไทยเป็นที่นิยมทั้งชาวไทยและชาวต่างประเทศ เป็นข้าวที่มีคุณภาพเมล็ดดี ข้าวสารใส แกร่ง คุณภาพขัดสีดี ท้องไข่น้อย มีปริมาณ amylose ต่ำ ประมาณ 15-16 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหุงสุกมีลักษณะเหนียว นุ่ม และที่สำคัญมีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์ เป็นพันธุ์ข้าวที่ทนปานกลางต่อสภาพแล้ง ดินเปรี้ยว และดินเค็ม ปลูกได้ในพื้นที่ดอนและสภาพข้าวไร่ แต่มีข้อจำกัด คือ ผลผลิตค่อนข้างต่ำ ลำต้นอ่อนลุ่มง่าย ไม่ต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูข้าวทุกชนิด โดยเฉพาะโรคไหม้ พบว่าทำความเสียหายต่อผลผลิตของข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นอย่างมาก (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2553)

ข้าวหอมของไทยเป็นที่ต้องการทั้งภายในประเทศและนอกประเทศ ตลาดข้าวหอมโลกมีมูลค่าไม่ต่ำกว่า 2 แสนล้านบาท ครั้งหนึ่งเป็นข้าวหอมมะลิ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมมะลิของไทยให้มีคุณภาพที่ดีขึ้น ต้านทานต่อโรคและแมลง จะส่งผลให้ประเทศไทยส่งออกข้าวหอมได้มากขึ้น และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของข้าวหอมไทยในตลาดโลก ต้นทุนการผลิตข้าวหอมจะถูกลง ซึ่งเป็นผลดีต่อเกษตรกรและการแข่งขันในตลาดโลก (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2553)

ในปี พ.ศ. 2541 สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (International Rice Research Institute, IRRI) ร่วมมือกับศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ดำเนินการปรับปรุงพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานต่อโรคไหม้ โดยรักษาคุณภาพเมล็ดและการหุงต้มที่ดีเช่นเดียวกับพันธุ์เดิมไว้ และมีการปรับตัวได้ดีในสภาพนาข้าว ในภาคเหนือตอนบนและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ดำเนินการผสมพันธุ์ข้าวที่ IRRI ประเทศฟิลิปปินส์ พันธุ์ IR70179-45-1-1-1 เป็นพันธุ์พ่อที่มีลักษณะความต้านทานโรคไหม้ และมีการปรับตัวได้ดีในนาข้าว โดยผ่านการคัดเลือกจากการปลูกทดสอบในศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี คือ และพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์แม่ ปลูกประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 ( $F_1$ - hybrid) และชั่วที่ 2 ( $F_2$ ) โดยคัดเลือกต้นที่ต้านทานโรคไหม้และมีความหอม ผสมกลับไปยังพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 1 ( $BC_1F_2$ ) ทำการทดสอบความต้านทานและความหอม คัดเลือกและนำไปปลูกในนาข้าว ผสมกลับอีกครั้งจนได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 2 ( $BC_2F_2$ ) และรุ่นต่อๆ ไป ในปี พ.ศ. 2545 คัดเลือกพันธุ์ที่สามารถต้านทานโรคไหม้ได้ดี และนำมาทดสอบคุณภาพการหุงต้ม ได้ข้าวอายุเบาที่มีคุณสมบัติเหมือนข้าวดอกมะลิ 105 จำนวน 19 สายพันธุ์ นำมาทดสอบการให้ผลผลิตเบื้องต้นในฤดูแล้งและฤดูฝน ของปี พ.ศ. 2546-2547 ทั้งภายในสถานีและในแปลงนาเกษตรกร จนได้พันธุ์ข้าว IR77924-62-71-1-2 ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์เป็นที่ยอมรับของเกษตรกร มีลักษณะเด่น คือ เป็นข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง อายุตกกล้าถึงออกดอกประมาณ 100-110 วัน มีความต้านทานโรคไหม้ที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือของประเทศไทย คุณภาพเมล็ด การหุงต้ม เหมือนพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (บุญรัตน์ และคณะ, 2548) เมื่อวันที่ 6 มีนาคม 2550 คณะกรรมการพิจารณาพันธุ์ กรมการข้าว มีมติให้ข้าวพันธุ์ IR77924-62-71-1-2 เป็นพันธุ์รับรอง ชื่อ กข33 (หอมอบล 80) เพื่อแนะนำให้เกษตรกรปลูก (สำนักงานวิจัยและพัฒนาข้าว, 2557)

### 2.2.3 โรคไหม้ของข้าว

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

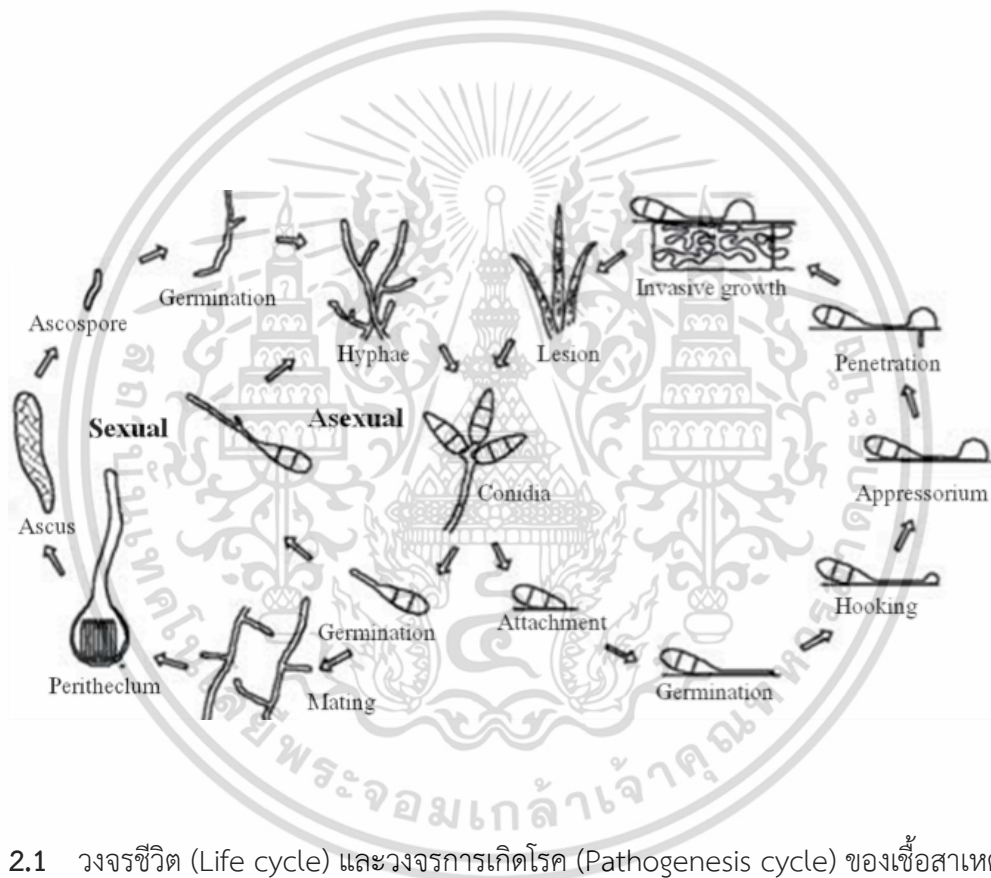
#### 2.2.3.1 วงจรชีวิตของเชื้อรา

##### 2.2.3.1.1 ระบบสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproductive)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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



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

#### 2.2.3.1.2 ระบบสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproductive)

เชื้อราสามารถสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้างส่วนขยายพันธุ์จากปลายของเส้นใยที่เรียกว่า conidiophore ส่วนขยายพันธุ์ที่ได้ เรียกว่า conidia ลักษณะของ conidia มีรูปร่างแตกต่างกันคืออาจมีรูปร่างแบบ pyriform จนถึง obclavate ส่วนมากด้านปลายแคบกว่าด้านโคน และมี 2 เส้นกั้น (septate) มีขนาดที่หลากหลายแตกต่างกันตามพืชอาศัยและสภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แวกด์ล้อม โดยปกติมีขนาด 19-23 x 7-9 ไมโครเมตร ไม่มีสีหรือมีสีเขียวมรกตอ่อน ส่วนมาก conidia จะเจริญจากเซลล์ปลาย (apical cell) หรือเซลล์ฐาน (basal cell) มากกว่าที่จะเจริญจากเซลล์กลาง (middle cell) conidiophore มีรูปร่างยาวเป็นส่วนก้านที่ช่วยพยุง conidia ไว้ ส่วนมากที่ฐานมีขนาดใหญ่กว่าส่วนปลาย เกิดเป็นกลุ่มโผล่มาจากปากใบหรือจากผนังเซลล์พืช มี 2-4 เส้นกั้น ในหนึ่ง conidiophore มักพบ conidia ประมาณ 1-20 conidia ซึ่ง conidia เป็นส่วนของเชื้อราที่สามารถปลิวไปตามลม และสามารถเข้าทำลายส่วนต่างๆ ของข้าวได้ (Ou, 1985) (ภาพที่ 2.1)

### 2.2.3.2 วงจรการเกิดโรค

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

### 2.2.3.3 ลักษณะอาการของโรคใหม่

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

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

ระยะแตกกอ (collar blast, node blast) อาการพบได้ที่ใบ กาบใบ ข้อต่อของใบ และข้อของลำต้น อาการส่วนใหญ่จะพบจุดสีน้ำตาลรูปดาตรงกลางแผลเป็นสีเทา ขนาดแผลจะใหญ่กว่าที่พบในระยะกล้า แผลลุกลามติดต่อกันได้ ที่บริเวณข้อต่อใบจะมีลักษณะแผลซ้ำสีน้ำตาลดำ ใบข้าวจะหลุดหรือหักพับง่าย (พูนศักดิ์, 2548)

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

### 2.2.3.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคใหม่ในข้าว

เชื้อสาเหตุโรคใหม่มีความแปรปรวนมากกว่าเชื้อราชนิดอื่นๆ เนื่องจากเชื้อราชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลงได้อย่างรวดเร็วภายในไม่กี่ชั่วอายุ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา เกิดได้ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

พูนศักดิ์ และคณะ (2550) ตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทย โดยนำพันธุ์ข้าวมาตรฐานที่มีถิ่นกำเนิดมาจากอินเดียมาจำแนกและวิเคราะห์ความรุนแรงของสายพันธุ์เชื้อรา ปลูกพันธุ์ข้าวที่มีถิ่นกำเนิดโรคไหม้ที่แตกต่างกันแปลงทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี และศูนย์วิจัยข้าวขอนแก่น ภาคเหนือที่ศูนย์วิจัยข้าวแพร่ ภาคเหนือตอนล่างที่ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก และภาคใต้ที่ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง เก็บตัวอย่างเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่เข้าทำลายใบข้าวและคอรวงข้าวในพันธุ์ข้าวทดสอบมาตรฐานที่มีถิ่นกำเนิดโรคไหม้ยีนเดียว โดยวิธีการแยกเชื้อให้ได้ conidia เพียงจนได้เชื้อบริสุทธิ์ นำไปทดสอบความรุนแรงในการเข้าทำลายของเชื้อบนพันธุ์ข้าวมาตรฐานที่มีถิ่นกำเนิดยีนเดียว 18 สายพันธุ์ จากเชื้อจำนวน 2,476 ไอโซเลท สามารถจำแนกเชื้อได้จำนวน 623 รูปแบบการเกิดโรค (pathotype) บนพันธุ์ข้าว แบ่งออกเป็น 186 pathotype ที่พบมีการระบาดของโรคไหม้ และ 437 pathotype เป็น pathotype ที่หายาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประชากรเชื้อสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทยมีความหลากหลายสูง pathotype ของเชื้อราที่พบประจำมีความรุนแรงน้อยกว่า pathotype ที่หายาก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยมีจำนวน pathotype ของเชื้อราที่เข้าทำลายข้าวมากที่สุด

Sirithunya *et al.* (2008) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *P. grisea* ในประเทศไทย โดยเก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุโรคไหม้จากข้าว หล้า ข้าวบาร์เลย์ และข้าวปารวมทั้งหมดจำนวน 174 ไอโซเลท ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา โดยใช้เทคนิค Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD) แล้วจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อราได้เป็น 9 กลุ่ม ได้แก่กลุ่ม A ถึงกลุ่ม I พบว่ากลุ่ม B, C และ H มีความโดดเด่นที่สุดพบมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราทั้งหมดในการศึกษานี้ และมีการกระจายตัวของประชากรสูง โดยมีกระจายตัวของประชากรเชื้อราอย่างกว้างขวางทั่วประเทศไทย แต่ในสายพันธุ์อื่นๆ จะมีการกระจายตัวของประชากรเชื้อราอย่างจำกัดแคบในพื้นที่นั้นๆ เช่น สายพันธุ์กลุ่ม A ถูกจำกัดอยู่เพียงในบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย จากผลการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา พบว่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือภาคเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้สูง ในขณะที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ

อัจฉราพร และ พูนศักดิ์ (2552) ทำการเก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่ทำให้เกิดอาการบนข้าวต่างสายพันธุ์ ที่ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลกและแปลงนาเกษตรกรบริเวณภาคเหนือตอนล่างในระหว่างฤดูปลูก พ.ศ. 2550-2551 โดยเก็บจากนิเวศนาชลประทานและนาข้าว ในข้าวพื้นเมืองและข้าวไร่ รวบรวมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้ทั้งหมด 80 ไอโซเลท แยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำมาทดสอบกับชุดข้าว Near Isogenic Lines (NILs) ของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) ที่มีฐานพันธุกรรมคล้ายกันแต่มียีนต้านทานโรคไหม้ที่แตกต่างกันสายพันธุ์ละ 1 ยีน รวมทั้งหมดจำนวน 18 สายพันธุ์ เพื่อจำแนก pathotype ของเชื้อรา พบว่าที่ความเหมือน 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถจำแนกเชื้อราได้จำนวน 13 pathotypes โดยมีสัดส่วนไอโซเลท: pathotype เท่ากับ 6.2:1 แสดงว่ามีความหลากหลายของเชื้อราในจังหวัดพิษณุโลกและพื้นที่ใกล้เคียงไม่มากนัก แต่พบว่าเชื้อราที่มีความรุนแรงมาก เพราะพันธุ์ข้าวทดสอบที่มียีนต้านทานโรคไหม้ สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้เพียง 20 ไอโซเลทจาก 80 ไอโซเลท

#### 2.2.4 ยีนต้านทานโรคไหม้ของข้าว

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

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

Koide *et al.* (2011) เก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ใหม่ในประเทศฟิลิปปินส์จำนวน 23 ไอโซเลท จำแนกเชื้อสาเหตุออกเป็น 16 pathotypes ซึ่งมีเชื้อ 11 pathotypes แสดงการเกิดรูปแบบปฏิกิริยาที่แตกต่างกันในอัลลีลของยีน *Pik* (*Pik*, *Pik-m*, *Pik-h* และ *Pik-p*) และ *Pi1* ในการศึกษาพบยีน *Pi19(t)* มีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้หลายไอโซเลท พบว่ามีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM27937 และ RM1337 และมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 12

Zeng *et al.* (2011) พบยีน *Pia* บนโครโมโซม 11 ในข้าวพันธุ์ Aichi Asahi แสดงความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้จากทุกมณฑลในประเทศจีนยกเว้นมณฑลเจียงซู ตรวจสอบความรุนแรงของการเกิดโรคโดยใช้เชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมในประเทศจีน 612 ไอโซเลท และวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้และการกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุล ในประชากรข้าวช่วงที่ 2 (F<sub>2</sub>) จำนวน 800 ต้น ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ Aichi Asahi และพันธุ์ Kasalath พบยีนต้านทาน

*Pia-1, Pia-2, Pia-3* และ *Pia-4* มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย A17, A25, A26 และ A27 และยังพบว่า ยีน *Pia-3* เป็นยีนที่สำคัญที่สุดสำหรับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pia* บนโครโมโซม 11



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.1** ตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ที่เชื่อมโยงกับเครื่องหมายดีเอ็นเอบนโครโมโซมข้าว

Chr.	Gene	Marker name	Map position (cM)	Reference
1	Pi24(t)	K5	64.4	Salad et al., 2003
	Pitp(t)	RM246	114.1	Barman et al., 2004
	Pi35(t)	RM1216, RM1003	132.0 - 136.6	Nguyen et al., 2006
2	Pid(t)1	G1314A, G45	87.5-89.9	Chen et al., 2004
	Pi25(t)	RG520	157.9	Sallaud et al., 2003
	Pib	RM138, RM166, RM208, RM266	154.1	Fjellstrom et al., 2004
	Pitq5	RG522, RG446	150.5 - 157.9	Tabien et al., 2000
	Pi-g(t)	RM166, RM208		Zhou et al., 2004
4	Pi39(t)	RM3843, RM5473	107.4 - 108.2	Terashima et al. 2008
	Pi46(t)	RM6748, RM5473		Matsushita et al., 2003
5	Pi26(t)	RG313	22.5 - 24.7	Sallaud et al., 2003
6	Pid(t)2	RM527, RM3	65.8	Chen et al., 2004
	Pitq(t)2	C236, RZ508	103.0 - 124.4	Tabien et al., 2000
	Pi8	Amp-3		Pan et al., 1996
	Pigm(t)	C26348	65.8	Deng et al., 2006
	Piz	RM527		RoyChowdhury et al., 2012
	Pi40(t)	RM3330, RM527	54.1 - 61.6	Jung et al., 2007
	Pi27(t)	Est-2	51.9	Sallaud et al., 2003
8	Pi29(t)	RZ617, RGA-IR86	69	Sallaud et al., 2003
	Pi33	RM72, RM44	45.4	Berruyer et el., 2003
	Pi36	RM5647	21.6 - 25.2	Liu et a., 2005
9	Pi15	CRG5, CRG2	31.3 - 34.9	Lin et al., 2007
	Pi5(t)	S04G03	31.3 -33.0	Jean et al., 2003
10	Pi28(t)	RZ500	114.7	Sallaud et al., 2003
11	Pia	yca72	36	Kwon et al., 2008; Zeng et al., 2011
	PiCO39(t)	RGA8, RZ141, RGACO39	49.1	Chauhan et al., 2002
	Pilm2	RZ536	56.2 - 117.9	Tabien et al., 2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chr.	Gene	Marker name	Map position (cM)	Reference
11	Pi30(t)	OpZ11-f, RGA-IG14	59.4 - 60.4	Sallaud et al., 2003
	Pi34	C1172-RG702	79.1 - 91.4	Zenbayashi et al., 2002
	Pi38	RM206, RM21	79.1 - 88.7	Gowda et al., 2006
	Pi44(t)	AF <sub>349</sub> - AF <sub>348</sub>	91.4 - 117.9	Chen et al., 1999
	Pik-h	RM224, RM1233, RM144	101.9	Shama et al., 2005; Fjellstrom et al., 2004
	Pi1	RM224, RM6094	112.1 - 117.9	Hittalmani et al., 2000
	Pi1(t)	RM224, RM6094	-	Fuentes et al., 2008
	Pi18(t)	RZ536	117.9	Ahn et al., 2000
	Pik-s	RM144, RM224, RM1233	115.1 - 117.3	Fjellstrom et al., 2004
	Pi47	RM206, RM224	-	Huang et al., 2011
	Pike	RM224, RM144	-	Jia et al., 2009
12	Pitq6	RG869, L102	29.2 - 47.5	Tabien et al., 2000
	Pi31(t)	O10-800	44.3	Sallaud et al., 2003
	Pi32(t)	AF6	47.5	Sallaud et al., 2003
	Pi-ta	YL153/YL154	50.4	Jia et al., 2009
	Pita-2	RM155, RM7102	50.4	Fjellstrom et al., 2004
	Pi19(t)	RM27973, RM1337	-	Koide et al., 2011
	Pi20(t)	RM1337, RM5364, RM7102	51.5 - 51.8	Li et al., 2008
	Pi48	RM5364, RM7102	-	Huang et al., 2011

## 2.2.5 ปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสาเหตุโรคใหม่กับพันธุ์ข้าวต้านทาน

การเกิดโรคในพืชเป็นผลมาจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชและเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งพืชอาจต้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรค และเช่นเดียวกันเชื้อสาเหตุโรคอาจเข้าทำลายพืชหรือไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้ การเกิดโรคคือปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนที่อยู่ในพืชและยีนที่อยู่ในเชื้อสาเหตุโรค เรียกทฤษฎีนี้ว่า gene for gene hypothesis ถูกค้นพบและเสนอโดย Flor (1971) สรุปได้ว่าหากมียีนหนึ่งที่ควบคุมปฏิริยาความต้านทาน (resistance gene, R gene) ในพืชย่อมมีอีกยีนหนึ่งที่คู่กันทำหน้าที่ควบคุมปฏิริยาก่อโรค (avirulence, AVR gene) ในเชื้อสาเหตุโรค และการแสดงออกของความต้านทาน (resistant) จะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อยีนที่เข้าคู่กันทั้งในพืชและในเชื้อสาเหตุโรคเป็นยีนเด่น (dominant gene) เท่านั้น หากยีนใดยีนหนึ่งเป็นยีนด้อย (recessive gene) จะแสดงความไม่ต้านทานโรคหรืออ่อนแอต่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(susceptible) ดังนั้นแม้ว่าต้นพืชจะมียีนต้านทานโรคใหม่อยู่ 1 ยีนหรือมีมากกว่าก็ตาม พืชจะถูกเชื้อเข้าทำลายได้ก็ต่อเมื่อถูกเชื้อโรคที่มียีนแบบ recessive gene เข้าทำลาย ตัวอย่างเช่น ในเชื้อสาเหตุโรคใหม่มี AVR-Pi-ta ซึ่งเป็น dominant gene เข้าทำลายข้าว ในพันธุ์ข้าวต้องมียีนต้านทานโรคใหม่ Pi-ta ที่เป็น dominant gene เช่นกัน จึงจะเกิดปฏิกิริยาแบบ compatible ทำให้พืชมีความต้านทานโรคเกิดขึ้น (Jia et al., 2009) ซึ่งเชื้อสาเหตุโรคใหม่นั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถปรับตัวให้เข้าทำลายพืชได้ในระยะเพียงไม่กี่ชั่วอายุ สามารถปรับเปลี่ยนจากยีนที่เป็น dominant gene ให้เป็น recessive gene เพื่อเข้าทำลายพืชได้ (Valent and Chumley, 1994; คำเนิน, 2541)

## 2.2.6 การปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคใหม่ในประเทศไทย

การใช้พันธุ์ข้าวต้านทานโรคใหม่เป็นวิธีการป้องกันกำจัดโรคที่มีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อสาเหตุโรคใหม่เป็นเชื้อราที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง ทำให้เชื้อรามีโอกาสกลายพันธุ์เกิดสายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีความรุนแรง และสามารถเข้าทำลายพันธุ์ข้าวต้านทานโรคใหม่พันธุ์เดิมได้ ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคใหม่ โดยใช้ยีนต้านทานที่สามารถต้านทานต่อเชื้อราได้หลายสายพันธุ์ หรือ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคใหม่โดยการรวมยีนต้านทานโรคใหม่หลายๆ ยีนไว้รวมกัน จึงเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคใหม่ได้อย่างยั่งยืน โดยทั่วไปการปรับปรุงพันธุ์ข้าวด้วยวิธีแบบดั้งเดิมจะใช้ระยะเวลาสั้น ที่สำคัญในขั้นตอนการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคใหม่เป็นขั้นตอนที่ต้องใช้แรงงานและค่าใช้จ่ายสูง ต้องอาศัยสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม และจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ประมาณ 8 ปี จึงทำให้ไม่สามารถปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้ทันตามความต้องการของเกษตรกร ปัจจุบันมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ โดยนำมาช่วยคัดเลือกลักษณะความต้านทาน แทนการคัดเลือกจาก phenotype ซึ่งผลที่ได้มีความแม่นยำเนื่องจากเป็นการคัดเลือกที่ genotype หรือยีนที่ควบคุมลักษณะดังกล่าวโดยตรง (ศรีสวัสดิ์ และคณะ, 2553)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พูนศักดิ์ และคณะ (2554) พัฒนาข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานต่อโรคไหม้ด้วยวิธีการผสมกลับ (backcross) โดยใช้ข้าวจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ IR77955-14-17, IR77955-22-53, IR77955-24-75, IR77955-24-88 และ IR77955-30-13 ซึ่งเป็นข้าวลูกผสมระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์เจ้าหอมนิล (JHN) หรือ DHL279 ซึ่งเป็นพันธุ์ถ่ายยีนต้านทานโรคไหม้ และทำการผสมกลับไปยังพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จึงมีลักษณะต่างๆ เหมือนพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ทำการผสมกลับไปยังพันธุ์รับทั้ง 5 สายพันธุ์ จำนวน 3 ครั้ง ในแต่ละชั่วทดสอบความต้านทานของสายพันธุ์ข้าวด้วยการทดสอบโรคไหม้ในระยะกล้าด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 20 สายพันธุ์ และตรวจหาต้นที่มียีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมาย RM246, RM319 และ RM212 สำหรับคัดเลือกต้นที่มียีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซม 1 และใช้เครื่องหมาย AP10, RM224 และ RM144 สำหรับคัดเลือกต้นที่มียีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซม 11 จนได้ประชากรข้าว BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> จำนวน 20 สายพันธุ์ นำไปปลูกเร่งชั่วอายุ และคัดเลือกข้าวสายพันธุ์ผสมกลับจนได้ชั่วที่ 5-6 (BC<sub>3</sub>F<sub>5-6</sub>) ที่ต้านทานโรคไหม้ ศึกษาพันธุ์เบื้องต้นจำนวน 105 สายพันธุ์ ส่งเปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสถานี และในแปลงนาเกษตรกร ทั้งชุดต้านทานโรคไหม้อายุเบา 30 สายพันธุ์ และอายุปานกลาง 43 สายพันธุ์ ในปี 2551-2553 จากการเปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสถานี พบชุดต้านทานโรคไหม้อายุเบาจำนวน 6 สายพันธุ์ให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐาน (กข15) ตั้งแต่ 2-10 เปอร์เซ็นต์ และชุดต้านทานโรคไหม้อายุปานกลางจำนวน 9 สายพันธุ์ พบว่าให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ตั้งแต่ 0.1 – 11 เปอร์เซ็นต์ ในฤดูนาปี 2553 พบข้าวชุดต้านทานโรคไหม้อายุเบาจำนวน 6 สายพันธุ์ให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐาน (กข15) ตั้งแต่ 11-34 เปอร์เซ็นต์ และข้าวชุดต้านทานโรคไหม้อายุปานกลางจำนวน 9 สายพันธุ์ พบว่าให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ขาว-ดอกมะลิ 105 ตั้งแต่ 1.6-9 เปอร์เซ็นต์

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

อนุชาติ และคณะ (2556) พัฒนาสายพันธุ์ข้าวเจ้าอายุเบาไวต่อช่วงแสงให้ต้านทานต่อโรคไหม้ โดยผสมระหว่างพันธุ์ IR77955-24-75-284 เป็นพันธุ์แม่ กับพันธุ์ DHL-279 ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ เป็นพันธุ์พ่อ ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานีในฤดูนาปี พ.ศ. 2546 ทำการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบปกติ (conventional breeding) ร่วมกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection, MAS) จนได้สายพันธุ์ UBN03007-47-7-7-26-35-19 ซึ่งเป็นข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจ้าไวต่อช่วงแสง ความสูงเฉลี่ย 157 เซนติเมตร จำนวน 9 รวงต่อกอ ให้ผลผลิตเฉลี่ยในสภาพแปลงทดลองของศูนย์วิจัยข้าว 517 กิโลกรัมต่อไร่ และให้ผลผลิตเฉลี่ยในสภาพแปลงนาเกษตรกร 431 กิโลกรัมต่อไร่ ข้าวเปลือกสีฟาง เมล็ดข้าวกล้องยาว 7.80 มิลลิเมตร รูปร่างเรียวย ปริมาณ amylose ต่ำ อุณหภูมิแป้งสุกต่ำ คุณภาพข้าวสุก เหนียว นุ่ม มีกลิ่นหอม ลักษณะเด่น คือ ต้านทานต่อโรคไหม้ทั้งใบไหม้และไหม้คอรวง อายุเบา ให้ผลผลิตเฉลี่ยในสภาพแปลงนาเกษตรกร สูงกว่าพันธุ์ กข15 คิดเป็น 24 เปอร์เซ็นต์

## 2.2.7 ข้าวพื้นเมืองไทยและการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ในพันธุ์ข้าวพื้นเมือง

พันธุ์ข้าวพื้นเมืองเป็นพันธุ์ข้าวที่ได้รับการคัดเลือกโดยเกษตรกร และสืบทอดกันมาหลายชั่วอายุ เนื่องจากเป็นพันธุ์พื้นเมืองมีคุณสมบัติที่ดีเป็นที่ต้องการของคนในแต่ละท้องถิ่น สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง ทนต่อโรค และแมลง (วิชา, 2544) พันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทยทั้งหมดที่เก็บรวบรวมจาก 76 จังหวัด โดยจำแนกชื่อเบื้องต้นมีชื่อไม่ซ้ำกันพบทั้งหมด 5,928 ชื่อพันธุ์ จากความหลากหลายของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของประเทศไทยทำให้คาดเดาได้ว่าน่าจะมีพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทยมากกว่านี้ เพราะว่าพันธุ์ข้าวยังมีอีกหลายตัวอย่างที่ยังไม่ทราบชื่อ และที่เก็บรวบรวมไว้ยังไม่ได้ทำการประเมินลักษณะประจำพันธุ์หรือจำแนกชื่อพันธุ์ พันธุ์ข้าวพื้นเมืองของไทยเหล่านี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างมาก และมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าว (ฉวีวรรณ, 2543) เนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ได้ข้าวพันธุ์ดีไม่ว่าจะเป็นเพิ่มผลผลิต เพิ่มคุณภาพ เพิ่มความต้านทานโรค และความต้านทานแมลง นอกจากจะต้องอาศัยเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์ การผสมพันธุ์ และการคัดเลือกพันธุ์ รวมไปถึงการทดสอบพันธุ์ที่เหมาะสม สิ่งที่สำคัญที่ขาดไม่ได้ คือ เชื่อพันธุ์ข้าว ยิ่งเชื่อพันธุ์ข้าวมีฐานทางพันธุกรรมกว้างมีความหลากหลายมากเท่าใด โอกาสและความสำเร็จที่จะได้พันธุ์ข้าวตามต้องการก็จะมีมากขึ้น (วิชา, 2544)

สมทรง และคณะ (2554) จำแนกและประเมินลักษณะต้านทานโรคไหม้ของเชื้อพันธุกรรมข้าวประมาณ 5,000 ตัวอย่าง ที่ศูนย์วิจัยข้าวทั่วประเทศ ในระหว่างปี พ.ศ. 2551-2553 พบพันธุ์ข้าวส่วนใหญ่ค่อนข้างอ่อนแอ จนถึงอ่อนแอมาก มีพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานโรคไหม้ในระดับสูงจำนวน 50 ตัวอย่าง เช่น บักม่วย (3257), เหลืองทอง (12518), เจ้าดำ (21648), อีอี (22769), กข4 (22197), ดำหอม (23509), สังข์หยด (15101) และดอกเหมย (13773) เป็นต้น และมีพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานโรคไหม้ในระดับกลางจำนวน 19 ตัวอย่าง เช่น ขาวแดง (23271), ขาวเกษตร (5467), หมากผาง (13905), จะหล่อยนะ (23152) และเปลี่ละ (23728) เป็นต้น

Zhu *et al.* (2004) พบข้าวพื้นเมืองของประเทศจีนพันธุ์ Q14 แสดงความต้านทานโรคไหม้มียีน *Pi27(t)* ซึ่งต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ ที่เก็บรวบรวมจากประเทศญี่ปุ่น ไทย และจีน ค้นหาและระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้โดยทดสอบการเกิดโรคในประชากรข้าวข้าวที่ 2 ( $F_2$ ) ที่ผสมพันธุ์ระหว่างข้าวพันธุ์ Q14 และข้าวพันธุ์ Q16 ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ พบการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในอัตราส่วน 3:1 (ต้านทาน:อ่อนแอ) คัดเลือกเครื่องหมายเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนด้วยเทคนิค bulk segregant analysis (BSA) จากเครื่องหมาย microsatellite จำนวน 189 เครื่องหมาย พบจำนวน 2 เครื่องหมายสามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ คือ เครื่องหมาย RM151 และ RM259 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 1 เลือกใช้ประชากรข้าว  $F_2$  จำนวน 155 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ เมื่อตรวจสอบการกระจายตัวของเครื่องหมาย พบยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อผู้ใช้เห็นประโยชน์อันใดอันหนึ่ง  
ไม่ว่าการณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้านทานโรคไหม้ถูกควบคุมด้วยยีนเพียงยีนเดียว ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM151 และ RM259 เป็นระยะทาง 11.9 และ 9.7 centiMorgans (cM) ตามลำดับ

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

อิงออน และคณะ (2553) ค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* ในข้าวพื้นเมืองไทยจำนวน 69 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนต้านทาน *Pid2* ผลจากการตรวจสอบพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* ในข้าวพื้นเมืองจำนวน 39 พันธุ์ ที่มีอัลลีลของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* ยืนยันผลการตรวจสอบโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีอัลลีลของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* เปรียบเทียบกับพันธุ์ที่มีอัลลีลที่ไม่ต้านทานของยีน *Pid2* พบว่ามี single nucleotide polymorphism (SNP) A/G ในส่วน recognition site ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mlu* I โดยพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีอัลลีลที่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5-A\*CGCGT-3 ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 700 และ 400 คู่เบส หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *Mlu* I ส่วนในข้าวพันธุ์ที่มีอัลลีลที่ไม่ต้านทานของยีน *Pid2* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5-G\*CGCGT-3 ซึ่งเอนไซม์ *Mlu* I ไม่สามารถตัดนิวคลีโอไทด์ในส่วนนี้ได้ จึงยังคงได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส

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

กฤตกิตติศักดิ์ และคณะ (2554) ค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* และ *Pigm(t)* บนโครโมโซม 6 และยีน *Pi36* บนโครโมโซม 8 ในข้าวพื้นเมืองไทยจำนวน 203 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนต้านทานโรคไหม้ดังกล่าว จากการตรวจสอบพบว่าข้าวพื้นเมืองของไทยทั้งหมดจำนวน 203 พันธุ์มียีนต้านทานโรคไหม้อย่างน้อยหนึ่งยีน และมีข้าวพื้นเมืองจำนวน 42 พันธุ์มียีนต้านทานโรคไหม้ทั้ง 3 ยีน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใหม่ในพันธุ์ข้าว XZ3150 โดยวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวช่วงที่ 9 ซึ่งเป็นประชากร recombinant inbred line (RILs) จำนวน 286 ต้น ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ XZ3150 เป็นพันธุ์พ่อ และ CO39 เป็นพันธุ์แม่ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ ค้นหาและสร้างแผนที่ของยีนต้านทานโดยใช้เครื่องหมาย simple sequence repeat (SSR) พบว่ายีนต้านทานโรคไหม้ยีนใหม่ *Pi47* มีตำแหน่งตั้งอยู่บนโครโมโซม 11 อยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM206 และ RM224 และยีนต้านทานโรคไหม้ยีนใหม่ *Pi48* มีตำแหน่งตั้งอยู่บนโครโมโซม 12 อยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM5364 และ RM7102 และยังสามารถใช้ประโยชน์ในการสร้างแผนที่ยีนต้านทานโรคไหม้ในอนาคต และยังสามารถใช้ประโยชน์ในการโคลนยีน และการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือก

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

## 2.2.8 เครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ชิ้นส่วนหรือบริเวณของดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมหรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ ใช้เป็นเครื่องหมายติดตามหน่วยพันธุกรรม หรือยีนของสิ่งมีชีวิตและสามารถถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่งได้ ใช้บ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิต เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะได้เนื่องจาก พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ หรือ ลำดับเบสโมเลกุลดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์และมีความแตกต่างกัน (polymorphism) (สุรินทร์, 2552) เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพมาก ผลที่ได้ถูกต้องและแม่นยำมากกว่าการใช้ลักษณะรูปร่างหรือสัณฐานของพืช (morphological marker) ที่มักผันแปรไปตามสภาพแวดล้อม (ปิยะดา, 2554)

ปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในงานด้านพันธุศาสตร์ และการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมาก เช่น ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ใช้เพื่อติดตามหายีนที่ควบคุมลักษณะที่ต่างๆ ใช้เป็นข้อมูลสำหรับวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนและสร้างแผนที่ยีน เป็นต้น ซึ่งแผนที่ของยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต่างๆ เป็นข้อมูลสำคัญช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์ทราบถึงจำนวน ตำแหน่ง และอิทธิพลของยีนที่มีความสำคัญ เพื่อเป็นแนวทางในการผนวกรวมยีนเหล่านั้นเพื่อสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ได้อย่างรวดเร็ว เครื่องหมายดีเอ็นเอที่นำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านพืชมีหลายประเภท ได้แก่ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP), Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) และ Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ microsatellite โดยการเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ และคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละประเภท (จุฑาพร, 2555)

### 2.2.8.1 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) สามารถตรวจสอบโดยอาศัยหลักการเข้าคู่ (hybridization) ของดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับชิ้นดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ศึกษา ข้อดีของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ คือ การตรวจสอบแบบเจาะจงตำแหน่งที่แน่นอนบนโครโมโซม สามารถทำซ้ำได้ผลเหมือนเดิม สามารถแยกแยะแถบดีเอ็นเอแบบข่มร่วมกัน (co-dominance) ทำให้สามารถตรวจสอบ heterozygous ได้ แต่มีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ ขั้นตอนยุ่งยาก ซับซ้อน ใช้เวลานาน และค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานสูง (สุริพร, 2546)

Yu *et al.* (1996) สร้างแผนที่ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-1(t)* ซึ่งได้รับจากข้าวพันธุ์ LAC23 ทดสอบการเกิดโรคและวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานในประชากรผสมกลับชั่วที่ 6 (BC<sub>6</sub>F<sub>3</sub>) และวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) ในประชากร nearly isogenic line (NILs) หรือ BC<sub>6</sub>F<sub>4</sub> พบยีน *Pi-1(t)* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 11 มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RZ536 โดยมีระยะห่าง 14±4.5 cM สร้างแผนที่ยีนต้านทานโรคไหม้ยีนที่สอง โดยใช้ประชากรข้าว Double haploid (DH) ที่ผสมระหว่างพันธุ์ Apure ซึ่งต้านทานโรคไหม้ และพันธุ์ IRAT177 ซึ่งอ่อนแอต่อโรคไหม้ พบยีนต้านทานโรคไหม้มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 12 โดยอยู่ระหว่างเครื่องหมาย RG457 และ RG869 มีระยะห่าง 13.5±4.3 และ 17.7±4.5 cM ตามลำดับ ยีนที่พบบนโครโมโซม 12 อาจเป็น allelic กันกับยีน *Pi-ta* (หรือ *Pi-4(t)*) ในข้าวพันธุ์ Tetep ซึ่งมีรายงานว่ามีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RG869 โดยมีระยะห่าง 15.4±4.7 cM

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

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

### 2.2.8.3 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

เป็นเครื่องหมายที่รวมหลักการของ RFLP และ RAPD เข้าด้วยกัน โดยการตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) จากนั้นนำ adapter ของเอนไซม์มาเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ แล้วนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นโดยใช้หลักการ PCR ข้อดีของเครื่องหมายชนิดนี้ คือ พบ polymorphism สูงต่อการทำแต่ละครั้ง แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้เป็นแบบ dominant marker และที่สำคัญมีความยุ่งยากในการเก็บข้อมูล และจำนวนขั้นตอนการทำที่ซับซ้อน (สุรินทร์, 2552)

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

เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบจำเพาะ ตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละ 1 ตำแหน่ง (single-locus marker) ลำดับเบสซ้ำๆ ท่อนสั้นๆ หรือแบบ microsatellite พบได้มากมายและกระจายตัวอยู่ทั่วจีโนม โดยลำดับเบสของ microsatellite มักเป็นลำดับเบสจำเพาะ มีเพียงจุดเดียวในจีโนม (unique sequence) ดังนั้นถ้าสามารถหาลำดับเบสที่อยู่สองข้างของส่วน microsatellite นำมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกแบบสังเคราะห์ primer สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR จะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่จำเพาะเพียงบริเวณเดียว และเนื่องจาก microsatellite เป็นส่วนที่มีการกลายพันธุ์โดยการลดลงหรือเพิ่มขึ้นของจำนวนชุดซ้ำได้ง่าย การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่รวมเอาส่วนของ microsatellite ไว้ภายใน จะทำให้มีโอกาสได้ขนาดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่ไม่เท่ากัน การตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย microsatellite จึงพบ polymorphism ค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังสามารถแสดงแถบดีเอ็นเอแบบ co-dominance ทำให้สามารถตรวจสอบ heterozygous ได้ (สุรินทร์, 2552)

ศิริภา และคณะ (2552) ค้นหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด microsatellite ค้นหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อโอโซเลท B1-2 จากประชากรข้าว recombinant inbred lines (RILs) จำนวน 252 สายพันธุ์ ซึ่งได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 กับพันธุ์เจ้าหอมนิล จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดโรคและรูปแบบอัลลีลของเครื่องหมาย microsatellite พบว่ายีนต้านทานโรคไหม้แบบจำเพาะในพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 8 ใกล้กับโมเลกุลเครื่องหมาย RM72 แม้ว่าบริเวณดังกล่าวเคยมีการพบยีนต้านทาน แต่ข้อมูลในปัจจุบันยังไม่สามารถยืนยันได้ว่า ยีนที่ค้นพบครั้งนี้เป็นยีนเดียวกันกับยีนที่รายงานไว้แล้วหรือไม่ การศึกษานี้จึงนับได้ว่าเป็นการค้นพบยีนใหม่ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในข้าวหอมมะลิของไทย

He *et al.* (2012) รายงานว่าข้าวพันธุ์ Yuejingsimiao 2 (YJ2) เป็นข้าวที่มีลักษณะดีหลายประการ คือ มีคุณภาพดี ให้ผลผลิตสูง และมีความต้านทานต่อ *M. grisea* พันธุ์ YJ2 แสดงความต้านทาน 100 เปอร์เซ็นต์ ในประชากรเชื้อราที่เก็บจากมณฑลกว่างตุง เสฉวน เหลียวหนิง และเฮยหลงเจียงในประเทศจีน ซึ่งเป็นความต้านทานที่สูงกว่าในพันธุ์ Sanhuangzhan 2 และ 28zhan ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานโรคไหม้ วิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ( $F_2$ ) และชั่วที่ 4 ( $F_4$ ) พบว่าความต้านทานในพันธุ์ YJ2 ถูกควบคุมโดยยีนต้านทานหลายตัวทั้งที่เป็นแบบ dominant และ recessive วิเคราะห์ตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมาย microsatellite ที่ตั้งอยู่บนโครโมโซม 2, 6, 8, และ 12 ด้วยวิธี bulk segregant analysis ในประชากรข้าว  $F_4$  พบมีการกระจายตัวแบบ recessive ในอัตราส่วน 1:3 (ต้านทาน:อ่อนแอ) พบยีนต้านทานแบบ recessive บนโครโมโซมที่ 8 อยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM3452 และ RM1345 โดยมีระยะห่าง 3.2 และ 2.7 cM ตามลำดับ พบว่าไม่เคยมีรายงานพบยีนต้านทานโรคไหม้ในช่วงตำแหน่งนี้ยีนที่พบจึงน่าจะเป็น ยีนใหม่ โดยถูกกำหนดให้เป็นยีน *pi55(t)*

RoyChowdhury *et al.* (2012) ศึกษาและค้นหา ยีน *Pi-z* ในพันธุ์ข้าวจำนวน 111 เชื้อพันธุ์กรรมโดยใช้เครื่องหมาย simple sequence repeat (SSR) ได้แก่ RM527, AP4791, AP5659-1 และ AP5659-5 ที่มีความเชื่อมโยงกับยีน *Pi-z* และทดสอบการเกิดโรคโดยใช้เชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่ก่อโรคไม่รุนแรง (avirulent) 1 สายพันธุ์ คือ IE1k และก่อโรครุนแรง (virulent) 2 สายพันธุ์ คือ IB33 และ IB49 พบว่าในพันธุ์ข้าวจำนวน 111 เชื้อพันธุ์ข้าว มี 73 เชื้อพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-z*

## บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

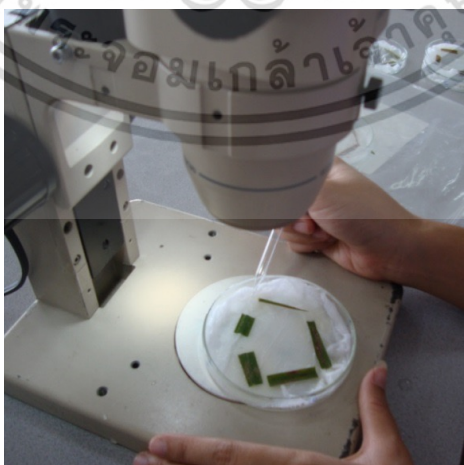
### 3.1 การสำรวจและเก็บเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

#### 3.1.1 การเก็บรวบรวมเชื้อราจากพื้นที่ปลูกข้าวในประเทศไทย

ออกสำรวจพื้นที่ปลูกข้าวในทุกๆ ระยะเวลา ได้แก่ ระยะต้นกล้า ระยะแตกกอ และระยะออกรวง ในช่วงเริ่มฤดูฝน บริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือตอนล่าง และในภาคตะวันออกพบบางพื้นที่จะเริ่มมีการระบาดของเชื้อซึ่งจะพบในระยะกล้าและระยะแตกกอ ส่วนในระยะออกรวงจะสามารถเก็บได้ในช่วงปลายฤดูฝนต้นฤดูหนาว หรือประมาณเดือนตุลาคม – ธันวาคม ซึ่งจะเป็นช่วงการเก็บเกี่ยวข้าวในฤดูนาปี โดยการระบาดของเชื้อจะเกิดมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีการปลูกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค

#### 3.1.2 การแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์โดยวิธี Tissue transplanting method

การดำเนินงานทุกขั้นตอนจะต้องปลอดเชื้อ (aseptic technique) เริ่มจากการทำ moist chamber โดยตัดกระดาษทิชชูให้ได้ขนาดเท่าจานเลี้ยงเชื้อแล้ววางลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เทน้ำกลั่นลงบนกระดาษทิชชูปริมาณ 5 มิลลิลิตร นำชิ้นส่วนของข้าวที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ จากส่วนของข้าวที่แสดงอาการของโรคไหม้ และส่วนที่ไม่ได้แสดงอาการให้ติดมาด้วยเล็กน้อย นำตัวอย่างวางบนกระดาษทิชชูที่ในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้แล้วปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อสร้าง conidia ตรวจสอบ conidia ด้วยกล้อง stereo microscope ใช้แท่งแก้วปลายแหลมเกี่ยวที่ conidia นำมาวางบนอาหาร Water agar (WA) ทำการแยกแต่ละ conidia ให้อยู่ห่างกัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาส่องด้วยกล้อง stereo microscope เพื่อตรวจสอบ conidia ที่งอกแล้ว จากนั้นใช้เข็มเย็บเย็บตัดตรงส่วนปลายของเส้นใยที่งอกจาก conidia ย้ายลงอาหาร Rice Flour Agar (RFA) ซึ่งประกอบด้วยข้าวบดละเอียด 20 กรัม รุ้น 20 กรัม และยีสต์ 2 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร ปล่อยให้เชื้อราเจริญเป็นเส้นใยแล้วนำมาตรวจสอบใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 3.1)



**ภาพที่ 3.1** การตรวจหา conidia ด้วยกล้อง Stereo microscope และการเลือกเกี่ยว conidia ด้วยหลอดแก้วปลายแหลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.1.3 การเก็บรักษาเชื้อรา

ทำการเก็บเชื้อราแบบแห้ง ด้วยการนำกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว วางลงบนอาหาร RFA จากนั้นวางเชื้อ *P. grisea* ลงบนกระดาษกรองบ่มทิ้งไว้เมื่อครบ 10 วัน จะพบเส้นใยสีขาวเจริญอยู่บนกระดาษกรอง นำกระดาษกรองออกจากจานเลี้ยงเชื้อ นำไปทำให้แห้งในภาชนะแก้วดูดความชื้น เมื่อแห้งแล้วนำกระดาษกรองที่มีเชื้อรามาคัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ถุงซิปล็อคที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

## 3.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้

### 3.2.1 การเตรียมดีเอ็นเอเชื้อรา

สกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 19 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.1) โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร RFA นาน 4 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตรเจาะที่ปลายเส้นใย นำชิ้นส่วนเชื้อราที่เจาะย้ายลงในอาหารเหลว Yeast Extract Glucose (YEG) เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน กรองเอาแต่เส้นใยเชื้อราด้วยกระดาษกรองเพื่อสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Matsumoto *et al.* (1999) บดเส้นใยเชื้อราด้วยไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง นำผงแป้งปริมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิเมตร เติม lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM EDTA, 3 % SDS, 1 %  $\beta$ -mercaptoethanol) ปริมาณ 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน (vortex) จากนั้นนำหลอดบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนปริมาณ 600 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microtube ใหม่ เติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาณ 600 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดูดส่วนใสด้านบนปริมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดใหม่ เติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดูดส่วนใสด้านบนปริมาณ 300 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microtube ใหม่ เติม 3 M sodium acetate ปริมาณ 30 ไมโครลิตร และ absolute ethyl alcohol ปริมาณ 600 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบาๆ บ่มทิ้งไว้ข้ามคืน ที่ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งให้เหลือตะกอนดีเอ็นเอที่ก้นหลอดด้านล่าง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 400 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งให้เหลือตะกอนดีเอ็นเอ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 1X TE buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

### 3.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

โดยใช้ชุด KAPA3G Plant PCR Kits (Kapa Biosystems, USA) ซึ่งเป็นชุด Kit ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอก่อน ใช้ primer ของเครื่องหมาย *Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) จำนวน 14 เครื่องหมาย (ตารางที่ 4.2) ในปฏิกิริยา PCR เตรียมส่วนประกอบ (master mix) ปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย dH<sub>2</sub>O 3.32 ไมโครลิตร, KAPA Plant PCR Buffer (2X) ที่มี MgCl<sub>2</sub> และ dNTPs 5 ไมโครลิตร, ส่วนผสมระหว่าง Forward Primer (5  $\mu$ M) และ Reverse Primer (5  $\mu$ M) 0.6 ไมโครลิตร, KAPA เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Plant DNA Polymerase (2.5 U/ $\mu$ L) 0.08 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอของเชื้อราความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรปริมาณ 1 ไมโครลิตร โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 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 40 รอบ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที จำนวน 1 รอบ เมื่อครบจำนวนรอบนำไปตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

### ตารางที่ 3.1 เชื้อสาเหตุโรคใหม่ 19 ไอโซเลทที่ใช้ในการทดสอบความต้านทานโรคและแหล่งที่มา

จังหวัด	ไอโซเลท
กรุงเทพฯ	BKK55003, BKK55004
ฉะเชิงเทรา	CCO55002
ราชบุรี	RBR55001, RBR55004
ชัยภูมิ	CPM55002, CPM55003
ขอนแก่น	KKN2010 61119, KKN2008 7357
หนองคาย	NKI2010 13502
อุบลราชธานี	UBN2010 11351, UBN2010 195167
สุรินทร์	SRN54002
พิษณุโลก	THL191, THL84, PLK 1.1, PLK 40.4
เชียงราย	CRI 43.1
พัทลุง	PL3

### 3.2.3 การวิเคราะห์ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR

วิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบผลด้วยการย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) ตามวิธีการของ Benbouza *et al.* (2006) โดยมีขั้นตอนดังนี้

#### 3.2.3.1 การเตรียม chamber และกระจก

ทำความสะอาด chamber ด้วย ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้ง เคลือบ chamber ด้วย Gel Save เพื่อป้องกัน acrylamide gel เกาะติดกับ chamber โดยใช้กระดาษ kimwipes สูดท้ายเช็ด ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง ด้วยกระดาษ kimwipes แผ่นเดิม เพื่อเกลี่ยสารให้ทั่ว chamber สำหรับกระจกเช็ดด้วย ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคลือบด้วย Glass Bond ปริมาณ 1,000 ไมโครลิตร โดยใช้กระดาษ kimwipes และเช็ด ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้งโดยใช้กระดาษ kimwipes แผ่นเดิม เพื่อเกลี่ยสารให้ทั่วกระจก นำ chamber และกระจกมาประกอบเข้าชุดโดยวางกระจกทับลงบน chamber ที่มี spacer วางไว้ตรงขอบทั้งสองข้างของ chamber เพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่าง chamber กับกระจก ใช้ clampหนีบกระจกเข้ากับ chamber

### 3.2.3.2 การเตรียม acrylamide gel

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

### 3.2.3.3 Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

ประกอบชุด PAGE (Bio-Active, UK) และต่อเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (electrophoresis power supply) ใช้ 1X TBE buffer ปริมาณ 1,500 มิลลิลิตร เป็นตัวกลาง ดึงหัวออก ใช้ปิเปตใส่ฟองอากาศบริเวณขอบเจลออก ทำการ pre-run โดยใช้กำลังไฟที่ 70 วัตต์ นาน 30 นาที ระหว่างนี้เตรียมตัวอย่าง โดยเติม sequencing dye (Formamide 49 มิลลิลิตร, 0.1 % bromphenol blue 12.5 มิลลิลิตร, Xylene cyanol 0.0125 กรัม, EDTA 1 มิลลิลิตร) ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ลงในผลผลิต PCR ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหมุนเหวี่ยงให้รวมอยู่กันตลอด เสียบหัวให้ด้านแหลมปักลงบนผิวหน้าของเจล หยอดตัวอย่าง ปริมาณ 2 ไมโครลิตรต่อช่อง ปลั๊กกระแสไฟฟ้า (run gel) โดยใช้กำลังไฟที่ 45 วัตต์ นาน 5 นาที ดึงหัวออก run gel ต่อ นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที

### 3.2.3.4 การย้อมสีแถบดีเอ็นเอ

ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate ตามวิธีการของ Benbouza *et al.* (2006) โดยมีขั้นตอนดังนี้ 1) fixation ด้วยสารละลายปริมาณ 2 ลิตร ที่ประกอบด้วย absolute alcohol 10 เปอร์เซ็นต์ และ acetic acid 0.5 เปอร์เซ็นต์ แช่นาน 5 นาที 2) impregnation ด้วยสารละลายปริมาณ 2 ลิตร ที่ประกอบด้วย silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) 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 แช่นาน 3-5 นาที หรือ จนแถบดีเอ็นเอปรากฏ 5) หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายปริมาณ 2 ลิตร ที่ประกอบด้วย absolute alcohol 10 เปอร์เซ็นต์ และ acetic acid 0.5 เปอร์เซ็นต์ แช่นาน 2 นาที

## 3.2.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อรา

วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.10 โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความต่าง (dissimilarity) ของ Canberra และจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยวิธี SAHN เพื่อสร้างเป็นแผนภาพแสดง

ความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ วิเคราะห์หาค่า polymorphic information content (PIC) เพื่อประเมินคุณสมบัติของเครื่องหมาย MGM โดยใช้สูตร (Zheng *et al.*, 2008)

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

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

### 3.3 การคัดเลือกข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีลักษณะต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง

#### 3.3.1 สายพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดสอบ

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดสอบ ได้รับความอนุเคราะห์จากกองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร โดยแบ่งเป็น ข้าวพันธุ์พื้นเมือง 263 สายพันธุ์ (จากภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคใต้ จำนวน 69, 88, 67 และ 39 สายพันธุ์ ตามลำดับ) ข้าวพันธุ์แนะนำ 43 สายพันธุ์ และข้าวป่า 5 สายพันธุ์

#### 3.3.2 การคัดเลือกข้าวสายพันธุ์ต้านทานโรค

ขั้นตอนนี้ดำเนินการและเผยแพร่โดย Salih *et al.* (2013) นำเมล็ดข้าวทั้ง 263 สายพันธุ์ รวมทั้งพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ IR64 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ่อนแอและต้านทานโรคไหม้ เพื่อใช้ในการทดลองควบคุม เพาะข้าวแต่ละสายพันธุ์บนกระดาษทิชชูที่ชุ่มน้ำ เมื่อข้าวเริ่มงอก ย้ายลงเพาะในถาดหลุมขนาดกว้าง 7 หลุม ยาว 12 หลุม เพื่อให้ต้นกล้าแข็งแรง เมื่อข้าวอายุ 2 สัปดาห์ (มีใบประมาณ 3-4 ใบ) ย้ายลงกระถางขนาด 10 นิ้ว โดยใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 46-0-0 ( $N-P_2O_5-K_2O$ ) 1 ครั้ง ประมาณ 125 กรัมต่อกระบะ ใส่ปุ๋ยที่ 7 และ 14 วันหลังปลูกลงกระบะแล้ว

ปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้ตามวิธีของ Roumen *et al.* (1997) ด้วยสารแขวนลอยโคโคนิดีของเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 29 ไอโซเลท ที่ความเข้มข้น  $5 \times 10^5$  โคโคนิดีต่อมิลลิลิตร เตรียมปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อกระบะปลูก ปลูกเชื้อด้วยวิธีพ่นหมอกบนใบข้าวที่มีอายุ 2 สัปดาห์ หลังจากปลูกเชื้อแล้ว นำต้นกล้าข้าวไปบ่มในห้องที่มีอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส และมีความชื้นสูงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นย้ายไปเก็บในโรงเรือนที่มีความชื้นสูง ฉีดพ่นด้วยน้ำเปล่าในช่วงเวลากลางวันในทุกๆ 4 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มความชื้น

#### 3.3.3 การประเมินโรค

ตรวจสอบความต้านทานโรคของข้าวหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 7 วัน คัดเลือกสายพันธุ์ที่ไม่แสดงอาการโรคไหม้เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

### 3.4 การวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนและการสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว

#### 3.4.1 การสร้างประชากรข้าว

##### 3.4.1.1 การสร้างประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ( $F_1$ - hybrid)

ผสมพันธุ์ระหว่างข้าวขาวดอกมะลิ 105 ใช้เป็นพันธุ์แม่ (female parent) และข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) ใช้เป็นพันธุ์พ่อ (male parent) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว (Salih *et al.*, 2013) จากงานวิจัยในโครงการค้นหา ยีนต้านทานโรคไหม้ที่เกิดจากเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อรา *P. grisea* จากแหล่งพันธุกรรมข้าวพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย เริ่มจากในช่วงเวลาเย็นก่อนผสมพันธุ์ 1 วัน เตรียมช่อดอกฝ้ายแม่ (KDML105) โดยการทำให้หมั้นเพศผู้ (emasculation) โดยเลือกช่อดอกในระยะโผล่ช่อดอก (heading) ใช้กรรไกรตัดดอกที่ผสมตัวเองไปแล้วบริเวณปลายช่อดอกและดอกอ่อนเกินไปบริเวณโคนช่อดอกทิ้ง เหลือไว้เฉพาะดอกที่จะพร้อมผสมในวันถัดไปประมาณ 20 ดอกต่อช่อสังเกตได้จากอับละอองเกสรอยู่ในตำแหน่งประมาณครึ่งของความยาวกาบหุ้มดอก จากนั้นใช้กรรไกรตัดปลายกาบหุ้มดอกประมาณ 1 ใน 3 เฉียงทำมุมประมาณ 45 องศาใช้ปลายเข็มหมุดเขี่ยอับเกสรเพศผู้ (anther) ออกจากกาบหุ้มดอกด้วยความระมัดระวัง พันดอกเพศเมียด้วยน้ำเปล่าเพื่อให้ความชุ่มชื้นแก่ดอก คลุมด้วยขวดพลาสติกเจาะรู ช่วงเช้าของวันถัดไปตรวจสอบดอกฝ้ายแม่ที่เตรียมไว้อีกครั้งว่าไม่มีอับเกสรเพศผู้หลงเหลืออยู่ นำเกสรเพศผู้จากดอกข้าวพันธุ์พ่อ (GS19769) มาถ่ายลงบนยอดเกสรเพศเมีย (stigma) โดยอาจนำทั้งช่อดอกมาเคาะไถ่ๆ ยอดเกสรเพศเมียเพื่อให้ละอองเกสร (pollen grain) ตกลงบนยอดเกสรเพศเมีย หรือคีบอับละอองเกสร (anther) ใส่ไว้ในกาบดอกเพศเมียที่เตรียมไว้ ผูกป้ายชื่อไว้กับช่อดอก ระบุชื่อพันธุ์พ่อและแม่พร้อมระบุวันที่ทำการผสมพันธุ์ (fertilization) ปลอ่ยให้มีการผสมพันธุ์ และเก็บเกี่ยวเมล็ดหลังจากวันที่ผสมพันธุ์แล้ว 30 วัน ปลอ่ยให้เมล็ดข้าวพักตัวประมาณ 8 สัปดาห์ (ภาพที่ 3.2)



ภาพที่ 3.2 การผสมพันธุ์ข้าว (ก) คือ ใช้กรรไกรตัดปลายกาบหุ้มดอก (ข) คือ ใช้ปลายเข็มหมุดเขี่ยอับเกสรเพศผู้ (anther) ออก (ค) คือ พันดอกเพศเมียด้วยน้ำเปล่า (ง) คือ คลุมด้วยขวดพลาสติกเจาะรู (จ) คือ คีบอับละอองเกสร (anther) ใส่ไว้ในกาบดอกเพศเมีย (ฉ) คือ นำทั้งช่อดอกเพศผู้มาเคาะไถ่ๆ ยอดเกสรเพศเมีย (ช) คือ เมล็ดที่ได้รับการผสมพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.1.2 การสร้างประชากรข้าวข้าวที่ 2 (F<sub>2</sub>)

เพาะเมล็ดข้าวลูกผสม F<sub>1</sub> ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์แม่และข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) ซึ่งเป็นพันธุ์พ่อ ในกระดาดหิมชุกที่ชุ่มน้ำ เมื่อข้าวเริ่มงอก ย้ายลงเพาะในถาดหลุมเพื่อให้ต้นกล้าแข็งแรง เมื่อข้าวอายุ 2 สัปดาห์ (มีใบประมาณ 3-4 ใบ) ย้ายลงกระถางขนาด 10 นิ้ว โดยใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O) รองกันหลุม และใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O) ผสม 15-15-15 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O) เมื่อข้าวอายุ 1, 2 และ 3 เดือน ในปริมาณที่พอเหมาะ เร่งให้ข้าวออกดอกโดยนำข้าวอายุประมาณ 2.5-3 เดือนเข้าห้องมืดเพื่อควบคุมช่วงแสง ในช่วงเวลา 17.00 - 8.00 นาฬิกา จนข้าวเริ่มตั้งท้อง ปล่อยให้มีการผสมตัวเองตามธรรมชาติ (selfed) บันทึกลักษณะประจำพันธุ์ในแต่ละช่วงอายุของข้าว ทั้งในข้าวลูกผสม F<sub>1</sub> และข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อและแม่ เก็บเมล็ดพันธุ์ (F<sub>2</sub>-seeds) ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เพื่อทำลายระยะพักตัวของเมล็ด ปลูกประชากรข้าว F<sub>2</sub> เพาะเมล็ดพันธุ์ข้าว F<sub>2</sub> (F<sub>2</sub>-seeds) จำนวน 250 เมล็ดในกระดาดหิมชุกที่ชุ่มน้ำ เมื่อข้าวเริ่มงอก ย้ายลงเพาะในกระบะปลูกขนาด กว้าง 7 หลุม ยาว 12 หลุม ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O) 1 ครั้ง ประมาณ 125 กรัม ต่อกระบะ ใส่ปุ๋ยที่ 7 และ 14 วันหลังปลูกลงกระบะแล้ว

### 3.4.2 การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะด้านทานโรคใหม่โดยวิธีทดสอบการเกิดโรคในประชากรข้าวข้าวที่ 2 (F<sub>2</sub>)

#### 3.4.2.1 การเตรียมสารแขวนลอย conidia ของเชื้อราสาเหตุโรคใหม่

นำเชื้อรา *P. grisea* จำนวน 19 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.1) เลี้ยงบนอาหาร RFA เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปล่อยให้เชื้อราเจริญเป็นเวลา 10 วัน เมื่อเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำเชื้อราไปกระตุ้นให้เกิดการสร้าง conidia โดยการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 2 มิลลิลิตร ลงบนหน้าอาหารที่มีเชื้อราเจริญ จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลชุดที่บริเวณเส้นใยบนผิวหน้าอาหารให้ทั่ว เปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ให้แห้ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยให้เชื้อราสร้าง conidia เป็นเวลา 2 วัน จะได้ conidia เป็นจำนวนมาก เตรียมสารแขวนลอย conidia ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำสารแขวนลอย conidia ที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นด้วย haemocytometer ปรับความเข้มข้นของ conidia ให้ได้ 10<sup>5</sup> conidia ต่อมิลลิลิตร เติมเจลาติน 0.5 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเจลาตินมีความหนืดสูงเมื่อพ่นหมอกสารแขวนลอย conidia ที่ผสมเจลาตินลงบนใบข้าว เจลาตินจะจับตัวเป็นฟิล์มปกคลุมแผ่นใบข้าว ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยึดเกาะของ conidia เชื้อรา

#### 3.4.2.2 การปลูกเชื้อสาเหตุโรคใหม่บนกล้าข้าว

ปลูกเชื้อสาเหตุโรคใหม่ตามวิธีของ Roumen *et al.* (1997) ด้วยสารแขวนลอย conidia ของเชื้อสาเหตุโรคใหม่ 19 ไอโซเลท ที่ความเข้มข้น 10<sup>5</sup> conidia ต่อมิลลิลิตร เตรียมปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อกระบะปลูก พ่นหมอกบนใบข้าวที่มีอายุ 2 สัปดาห์ หลังจากปลูกเชื้อแล้วนำต้นกล้าข้าวไปบ่มในห้องที่มีอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส และมีความชื้นสูงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นย้ายไปเก็บในโรงเรือนที่มีความชื้นสูง ฉีดพ่นด้วยน้ำเปล่าในช่วงเวลากลางวันในทุกๆ 4 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มความชื้น การทดลองนี้จะทำการปลูกเชื้อ 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 2 ปลูกเชื้อในวันที่ 3 หลังจากปลูกเชื้อครั้งแรก

### 3.4.2.3 วิธีประเมินการเกิดโรคในประชากรข้าวช่วงที่ 2 (F<sub>2</sub>)

ตรวจสอบความต้านทานโรคของข้าวหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 7 วัน บันทึกผลตามเกณฑ์ให้คะแนนการเกิดโรคตามระดับคะแนนของ Roumen *et al.* (1997) โดยมีระดับคะแนนดังนี้ (ภาพที่ 3.3)

ระดับ 0 ไม่มีแผลปรากฏ

ระดับ 1 แผลจุดกลมสีน้ำตาลเล็กๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตรไม่มีจุดเทาตรงกลางแผล

ระดับ 2 แผลกลม หรือ รียาวเล็กน้อย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตรไม่มีจุดเทาตรงกลางแผล

ระดับ 3 แผลจุดเล็กๆ ขนาดประมาณ 1-3 มิลลิเมตร และมีจุดเทาตรงกลางแผล

ระดับ 4 แผลจุดเล็กๆ ขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตรหรือยาวกว่า แผลเป็นสีเทา และมีขอบสีน้ำตาล

ระดับ 5 แผลสีเทาเกาะกันเป็นกลุ่ม มีขอบแผลสีน้ำตาล เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค

ระดับ 6 แผลลุกลามติดต่อกันมีสีเทาไม่มีขอบแผลที่แน่นอน เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค



ภาพที่ 3.3 เกณฑ์ให้คะแนนการเกิดโรคตามระดับคะแนนของ Roumen *et al.* (1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบ่งความต้านทานออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ระดับ 0, 1 และ 2 เป็นกลุ่มที่แสดงความต้านทานโรครุไหมในระดับสูง ในระดับ 3 และ 4 เป็นกลุ่มที่แสดงความต้านทานโรครุไหมในระดับปานกลาง และในระดับ 5 และ 6 เป็นกลุ่มที่แสดงความอ่อนแอต่อโรครุไหม (Sallaud *et al.*, 2003)

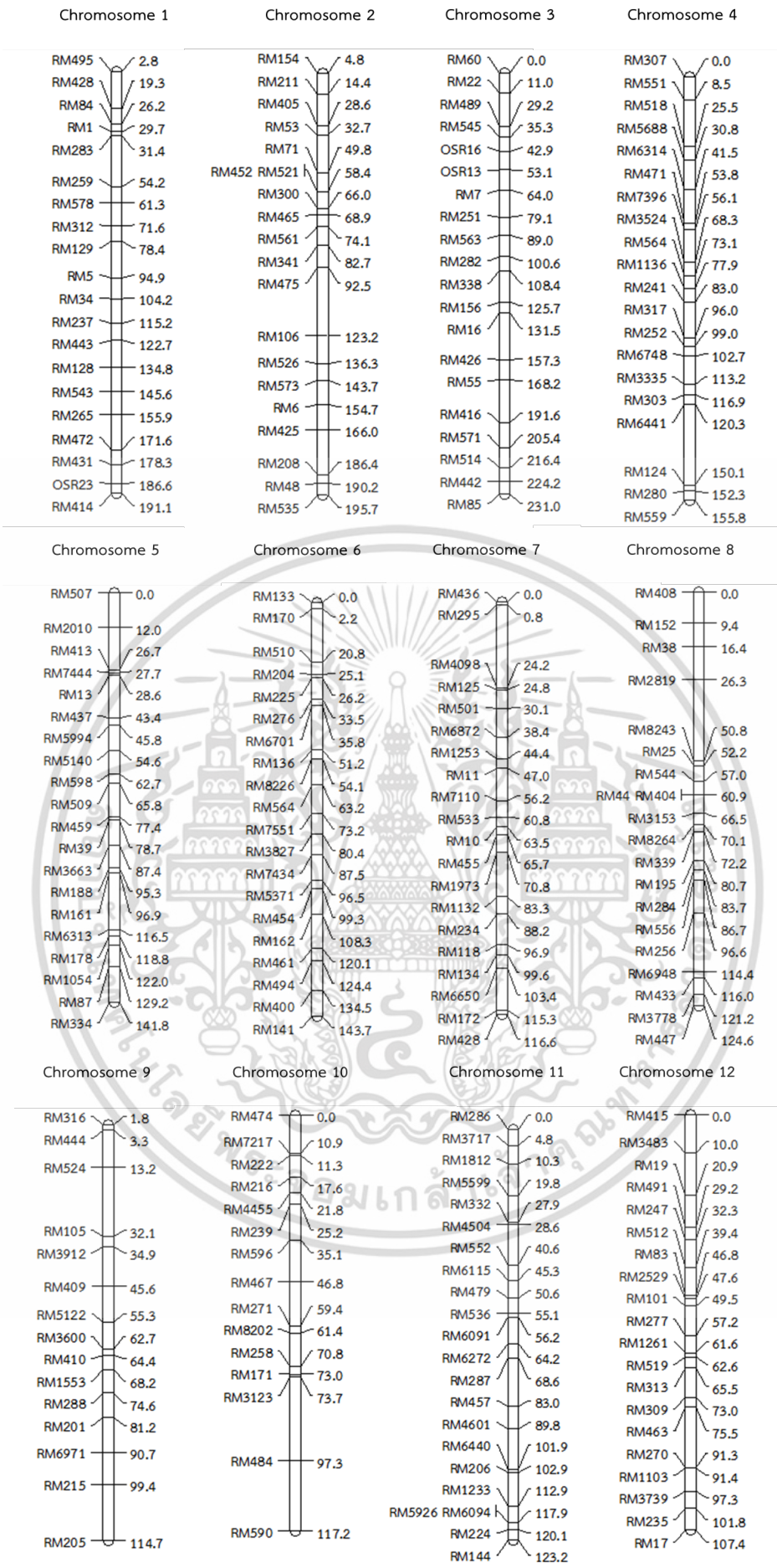
#### 3.3.2.4 การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรครุไหมในข้าว

วิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรครุไหมในประชากรข้าว F<sub>2</sub> จากข้อมูลที่ได้ ซึ่งเป็นข้อมูล phenotype ด้วยการทดสอบ Chi square โดยวิเคราะห์การกระจายตัวของประชากรว่าเป็นไปตามที่คาดหวังหรือไม่ (goodness of fit) ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2007 (ฟังก์ชัน CHISQ.TEST)

### 3.4.3 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าวข้าวที่ 2 (F<sub>2</sub>)

3.4.3.1 การคัดเลือกเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้ จากจำนวนเครื่องหมาย microsatellite ทั้งหมด 230 เครื่องหมายที่ครอบคลุมทั้ง 12 โครโมโซมข้าว (ภาพที่ 3.4)





ภาพที่ 3.4 ตำแหน่งของเครื่องหมาย microsatellite 230 เครื่องหมาย บนโครโมโซมของข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 3.4.3.1.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

โดยใช้ชุด KAPA3G Plant PCR Kits (Kapa Biosystems, USA) เครื่องหมาย microsatellite ทั้งหมด 230 เครื่องหมายใช้เป็น primer ในปฏิกิริยา PCR นำไปข้าวพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์แม่ และไปข้าวพันธุ์ห้วย (GS19769) ซึ่งเป็นพันธุ์พ่อ มาเจาะด้วย Harris UNI-CORETM ได้เนื้อเยื่อรูปร่างกลมเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 มิลลิเมตร ใช้เนื้อเยื่อจำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงใน PCR plate เตรียมส่วนผสม (master mix) ปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 10 ไมโครลิตรประกอบด้วย dH<sub>2</sub>O 4.32 ไมโครลิตร, KAPA Plant PCR Buffer (2X) ที่มี MgCl<sub>2</sub> และ dNTPs 5 ไมโครลิตร, ส่วนผสมระหว่าง Forward Primer (5 µM) และ Reverse Primer (5 µM) 0.6 ไมโครลิตร และ KAPA Plant DNA Polymerase (2.5 U/µL) 0.08 ไมโครลิตร โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 40 รอบ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 1 รอบ เมื่อครบจำนวนรอบนำไปตรวจสอบผลด้วยเทคนิค PAGE

#### 3.4.3.1.2 การวิเคราะห์ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR

วิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบผลโดยการย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate ตามวิธีการของ Benbouza *et al.* (2006) ตามวิธีการข้อ 3.2.3

3.4.3.2 การคัดเลือกเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้

นำเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ได้มาคัดเลือกด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) เพื่อค้นหาเครื่องหมาย microsatellite สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ โดยใช้ดีเอ็นเอรวมของประชากร 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือดีเอ็นเอของพันธุ์แม่ กลุ่ม 2 ดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อ กลุ่มที่ 3 ดีเอ็นเอของประชากร F<sub>2</sub>T<sub>1</sub> ที่แสดงความต้านทาน (resistant) ระดับ 0 กลุ่มที่ 4 ดีเอ็นเอของประชากร F<sub>2</sub>T<sub>1</sub> ที่แสดงความอ่อนแอ (susceptible) ระดับ 5 และ 6 กลุ่มที่ 5 ดีเอ็นเอของประชากร F<sub>2</sub>T<sub>2</sub> ที่แสดงความต้านทาน (resistant) ระดับ 0 และกลุ่มที่ 6 ดีเอ็นเอของประชากร F<sub>2</sub>T<sub>2</sub> ที่แสดงความอ่อนแอ (susceptible) ระดับ 5 และ 6

#### 3.4.3.2.1 การเตรียมดีเอ็นเอข้าว

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB method ตามขั้นตอนดังนี้ ตัดตัวอย่างใบข้าวใส่ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาณครึ่งหลอด เติม CTAB extraction buffer [CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) 2 กรัม, 1 M Tris-HCl (pH=8) 10 มิลลิลิตร, 0.5 M EDTA pH 8.0 4 มิลลิลิตร, 5 M NaCl 28 มิลลิลิตร, PVP 40 (polyvinylpyrrolidone) 1 กรัม, 0.2 % β-mercaptoethanol] หลอดละ 700 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นด้วยเม็ด bead (2 เม็ด) นาน 2 นาที นำหลอดป่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติม chloroform : isoamyl (24:1) 700 ไมโครลิตร แล้วพลิกหลอดไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนปริมาณ 400 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microtube ใหม่ เติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

#### 3.4.3.2.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

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

#### 3.4.3.2.3 การวิเคราะห์ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR

วิเคราะห์ผลด้วยวิธีเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบผลด้วยการย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate ตามวิธีการของ Benbouza *et al.* (2006) ตามวิธีการข้อ 3.2.3 ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR กำหนดเครื่องหมายดังนี้

A คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (parent 1, P1)

B คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (parent 2, P2)

H คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่

เมื่อกำหนดเครื่องหมาย A, B และ H แล้วคัดเลือกเครื่องหมายที่แสดงรูปแบบดีเอ็นเอในกลุ่ม 4 และ 6 เป็น A หรือกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งระหว่าง 4 และ 6 เป็น A มาใช้ในการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายในประชากร 250 ต้นต่อไป

3.4.3.3 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F<sub>2</sub>)

ใช้เครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) เป็น primer ในปฏิกิริยา PCR เพื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าว F<sub>2</sub> ทั้งหมด 250 ต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.3.3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ใช้ชุด KAPA3G Plant PCR Kits (Kapa Biosystems, USA) นำใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์แม่ และใบข้าวพันธุ์ห้วย (GS19769) ซึ่งเป็นพันธุ์พ่อ และประชากรข้าว F<sub>2</sub> ทั้งหมด 250 ต้น มาเจาะด้วย Harris UNI-CORETM ได้น้ำเยื่อเยื่อรูปวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 มิลลิเมตร ใช้เนื้อเยื่อจำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงใน PCR plate เตรียมส่วนผสม (master mix) ปฏิกริยา PCR ในปริมาตร 10 ไมโครลิตรประกอบด้วย dH<sub>2</sub>O 4.32 ไมโครลิตร, KAPA Plant PCR Buffer (2X) ที่มี MgCl<sub>2</sub> และ dNTPs 5 ไมโครลิตร, ส่วนผสมของ Forward Primer (5 µM) และ Reverse Primer (5 µM) 0.6 ไมโครลิตร และ KAPA Plant DNA Polymerase (2.5 U/µL) 0.08 ไมโครลิตร โดยตั้งอุณหภูมิและกำหนดจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 40 รอบ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 1 รอบ เมื่อครบจำนวนรอบนำไปตรวจสอบผลด้วยเทคนิค PAGE

### 3.4.3.3.2 การวิเคราะห์ผลจากการทำปฏิกริยา PCR

วิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบผลโดยการย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate ตามวิธีการของ Benbouza *et al.* (2006) ตามวิธีการข้อ 3.2.3 ผลจากการทำปฏิกริยา PCR กำหนดเครื่องหมายดังนี้ (ภาพที่ 3.5)

A คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (parent 1, P1)

B คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (parent 2, P2)

H คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่

ประชากร F <sub>2</sub>														
P1	P2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	B	B	A	H	B	B	A	A	A	H	B	B	H	A
_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____	_____

**ภาพที่ 3.5** ตัวอย่างรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของประชากร F<sub>2</sub> ที่ปรากฏและการกำหนดเครื่องหมาย A สำหรับประชากรที่มีผลผลิตดีเอ็นเอเหมือนแม่ (P1), B สำหรับประชากรที่มีผลผลิตดีเอ็นเอเหมือนพ่อ (P2), และ H สำหรับประชากรที่มีผลผลิตดีเอ็นเอเหมือนทั้งแม่และพ่อ

### 3.4.3.3 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายในประชากรข้าวข้าวที่ 2 (F<sub>2</sub>) ทั้งหมด 250 ต้น

วิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายจากข้อมูลที่ได้ ซึ่งเป็นข้อมูลทาง genotype ด้วยการทดสอบ Chi square โดยวิเคราะห์การกระจายตัวในประชากรข้าว F<sub>2</sub> ทั้งหมด 250 ต้น ของแต่ละเครื่องหมายว่าเป็นตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2007 (ฟังก์ชัน CHISQ.TEST)

### 3.4.4 สร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว จากเปอร์เซ็นต์รีคอมบิเนชัน (recombination)

สร้างแผนที่ยีนต้านทานโรคไหม้ โดยการคำนวณหาค่าความถี่ของการเกิด recombination หรือความถี่ของการเกิดครอสซิงโอเวอร์ (crossing over) ซึ่งโอกาสเกิด recombination มีความสัมพันธ์โดยตรงกับระยะทางระหว่างยีนในโครโมโซมเดียวกัน ค่าความถี่ของการเกิด recombination 1 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1 centiMorgans (cM) ซึ่งเป็นหน่วยของระยะห่างระหว่างยีนบนแผนที่ยีน (mapping function) ในการทดลองนี้ใช้ข้อมูล phenotype และ genotype ของประชากรเพียง 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจนพบการเกิดโรคที่ระดับ 5 และ 6 เนื่องจากเป็นประชากรที่มี phenotype ถูกต้องแน่นอน จึงเป็นประชากรที่เหมาะสมสำหรับนำมาวิเคราะห์เพื่อระบุตำแหน่งที่ตั้งของยีนต้านทานโรคไหม้ในการศึกษานี้ นำข้อมูล phenotype จากการทดสอบการเกิดโรคในประชากรข้าวและ genotype ของแต่ละเครื่องหมายจากการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายมาวิเคราะห์ร่วมกัน คำนวณหาค่าความถี่ของการเกิด recombination ของยีนต้านทานโรคไหม้ และค่าความถี่การเกิด recombination ของแต่ละคู่ของเครื่องหมายเพื่อวาดแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ โดยใช้สูตรดังนี้ (Morgan, 2008)

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

### 3.4.5 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite เพื่อยืนยันจำนวนและระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้

จากเครื่องหมาย microsatellite จำนวน 66 เครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ได้ นำมาคัดเลือกเครื่องหมายที่มีตำแหน่งตั้งอยู่บนโครโมโซมเดียวกันกับเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ โดยทำการคัดเลือกเครื่องหมาย microsatellite อื่น ที่มีตำแหน่งตั้งอยู่ใกล้และไกลกับเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ นำเครื่องหมายที่คัดเลือกมาวิเคราะห์เพื่อช่วยยืนยันความแม่นยำในการจัดกลุ่มของเครื่องหมายดีเอ็นเอ และระบุตำแหน่งที่แน่นอนของยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว วิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าว F<sub>2</sub> จำนวน 15 ต้นที่แสดงลักษณะอ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจน เป็นประชากรที่มี phenotype ที่ถูกต้องแน่นอน วิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite โดยดำเนินการตามข้อ 3.4.3.3.1 ถึงข้อ

3.4.3.3.3 และสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนด้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว จากเปอร์เซ็นต์รีคอมบิเนชัน (recombination) ตามข้อ 3.3.4

### 3.4.6 การสร้างแผนที่เพื่อระบุตำแหน่งของยีนด้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MAPMAKER

ใช้ข้อมูล phrnotype และ gonotype ของแต่ละเครื่องหมายเพื่อสร้างแผนที่พันธุกรรมระบุตำแหน่งของยีนด้านทานโรคไหม้ และเครื่องหมาย microsatellite ด้วยโปรแกรม MAPMAKER/EXP version 3.0b (Lincoln *et al.*, 1993) ตามหลักการดังนี้

3.4.6.1 จัดกลุ่มความเชื่อมโยงของแต่ละเครื่องหมายและยีนด้านทานโรคไหม้ โดยกำหนดระดับมาตรฐานให้สอดคล้องกับระดับความน่าเชื่อถือและลักษณะของข้อมูลที่คำนวณ ค่ามาตรฐานของโปรแกรมจะอยู่ที่ logarithm of odds (LOD) = 3.0

3.4.6.2 จัดลำดับการวางตัวของแต่ละเครื่องหมาย และตำแหน่งของยีนในแต่ละกลุ่มที่ถูกแบ่งจากข้อ 3.2.2.6.1 โดยเลือกลำดับการวางตัวของเครื่องหมายที่มีค่า likelihood สูงที่สุด คือ มีค่า likelihood = 0.00

3.4.6.3 คำนวณหาระยะห่างของแต่ละเครื่องหมายและยีนด้านทานโรคไหม้ โดยเลือก Kosambi function ระยะห่างที่ได้มีหน่วยเป็น centiMorgans (cM)

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

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้

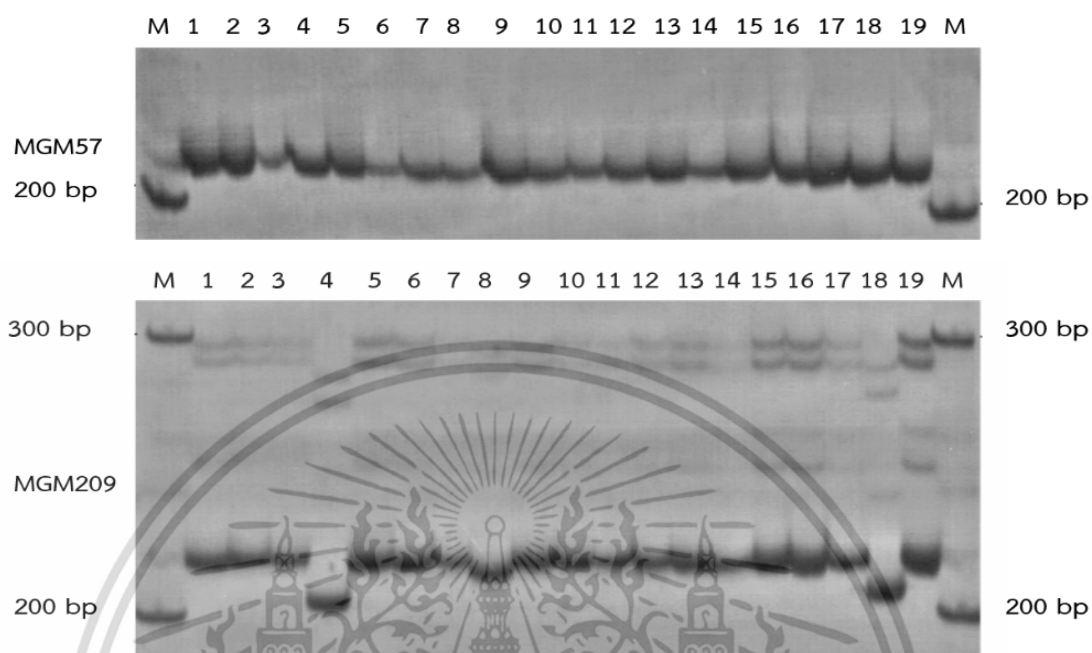
วิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ จำนวน 19 ไอโซเลท ซึ่งเก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าวที่พบว่ามีการระบาดของโรคไหม้ในประเทศไทย โดยสุ่มเลือกเครื่องหมาย MGM จำนวน 14 เครื่องหมาย ที่ครอบคลุมทั้ง 7 โครโมโซมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ โดยแบ่งเป็นโครโมโซมละ 2 เครื่องหมายใช้เป็น primer ในปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบผลจากปฏิกิริยา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

วิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.10 โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความต่าง (dissimilarity) ของ Canberra และจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยวิธี SAHN เพื่อสร้างเป็นแผนภาพแสดงความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ จากค่าสัมประสิทธิ์ความต่างที่ 90 เปอร์เซ็นต์ สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้จาก 19 ไอโซเลทได้จำนวน 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่ม 1 คิดเป็น 73 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่ศึกษา ประกอบด้วยเชื้อรา 14 ไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อราที่ระบาดบริเวณภาคเหนือ ได้แก่ PLK1.1, PLK40.0, THL84, THL191 และ CRI34.1 เชื้อราที่ระบาดบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ CPM55003, KKN2010 61119, KKN2008 7357 และ SRN54002 และเชื้อราที่ระบาดบริเวณภาคกลาง ได้แก่ BKK55003, BKK55004, CC055002, RBR55002 และ RBR55004 กลุ่ม 2 คิดเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อราที่ศึกษา ประกอบด้วยเชื้อรา 3 ไอโซเลท เป็นเชื้อราที่ระบาดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ NKI2010 13502 และ UBN2010 11351 และเชื้อราที่ระบาดบริเวณภาคใต้ ได้แก่ PL3 นอกจากนี้พบเชื้อราที่ระบาดบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือถูกจัดกลุ่มแยกออกเป็นเชื้อเดี่ยว ในกลุ่ม 3 และ 4 ได้แก่ UBN2010 195167 และ CPM55002 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.2)

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

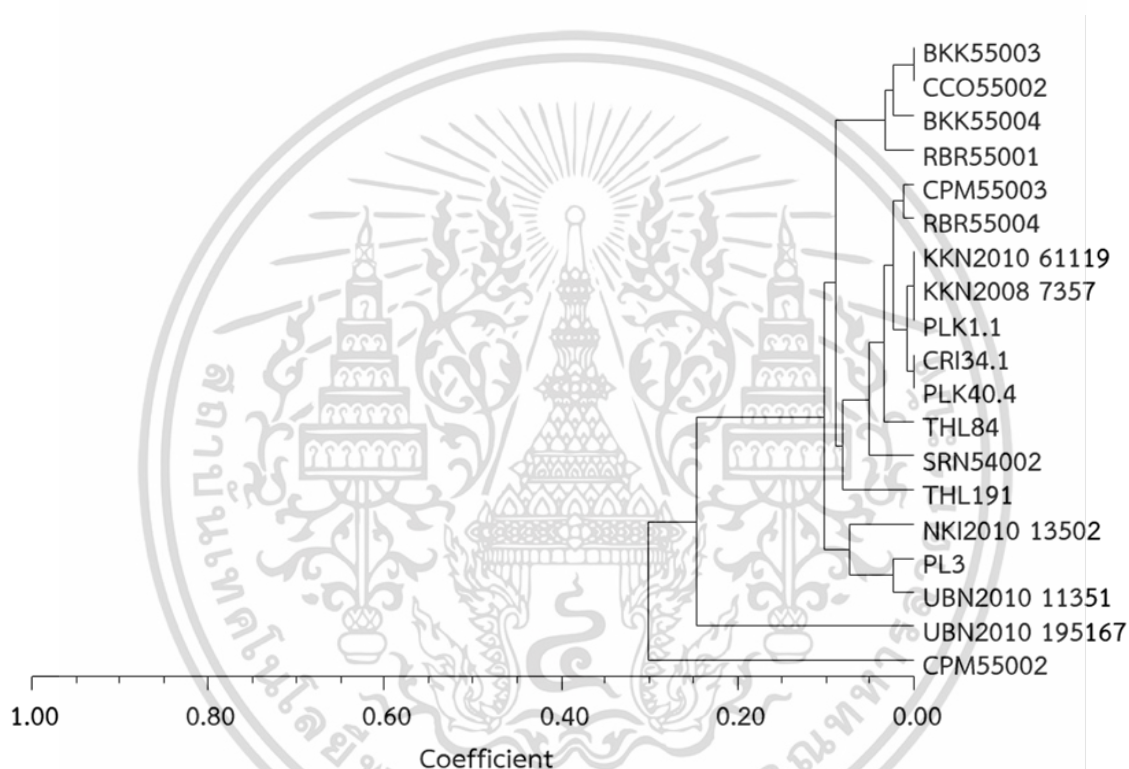
Chr.	เครื่องหมาย	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' - 3')		PIC
		Forward	Reverse	
1	MGM446	TTGGGATCTTCGGTAAGACG	GCCGACAAGACACTGAATGA	0.101
1	MGM35	GTTGAATTACCTTTCGGACTGG	AAGGACTTTTGCTCAGACCGTAG	0.803
2	MGM185	AATGCTTCGAGGTCCCAGT	GCTTATCGACGGCGTATTTG	0.189
2	MGM57	GATACGGATGCGGTAGAGGA	GCCTATTCTGAGCTTCGTG	0.000
3	MGM436	GACCTTTATCGGATGCGTGT	CACACAGTGCCCATCTAACG	0.196
3	MGM209	TCACCTCAACTGCAGTCAT	GTTGCCGCTGTTGTTGAATA	0.285
4	MGM246	CCGGATGTCACCTACCAACT	CCTTGTTTTCCCCCTGTGTA	0.484
4	MGM87	GTCCACCGCTTAAACACTGC	CTCCACTCGCTATGCACGTA	0.285
5	MGM119	GGGTCGCGTCAGTGAACATA	ACGGCTTGAACCAATACAG	0.706
5	MGM177	TGACTCGACCTGACATCTGC	TTCCTGGGACTGTTTCATGG	0.196
6	MGM400	GGCATTACCCAAGAAGCAAA	CTCGTTGCAGATGGTGATGA	0.101
6	MGM269	GATGGCCAGGTCAGCTTTT	ACTCTTGCAGCCATGGAAC	0.640
7	MGM282	TTGGCTGGCAAGACAGTTAAT	GGGCTTGTCTATTCCAGCA	0.562
7	MGM286	CGGCTGTGGTTTAACGATTT	CCATCAGGATCCATGAACAC	0.488

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 ข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีลักษณะต้านทานโรคไหม้

ผลการคัดเลือกข้าวสายพันธุ์ต้านทานโรคไหม้ด้วยการปลูกเชื้อราที่ผสมกัน 29 ไอโซเลท ลงบนต้นกล้าข้าวพันธุ์พื้นเมือง ข้าวพันธุ์แนะนำ และข้าวป่า ทั้งหมด 311 สายพันธุ์ พบข้าวที่สามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อราทั้ง 29 ไอโซเลท ในระดับสูง หรือไม่แสดงอาการของโรค จำนวน 9 สายพันธุ์ ประกอบด้วย

1. GS23107
2. GS19769
3. GS20874
4. GS23774
5. ชัยนาท 1
6. สุพรรณบุรี 1
7. สุพรรณบุรี 60
8. สุพรรณบุรี 90
9. เจ้าหอมนิล

จากผลการคัดเลือก พบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ต้านทานโรคไหม้ในระดับสูงมีจำนวน 4 สายพันธุ์ (ลำดับที่ 1-4) ในจำนวนนี้ ข้าวพื้นเมืองสายพันธุ์ GS19769 ซึ่งมีชื่อเรียกในท้องถิ่นคือ พันธุ์ห้วย ถูกเลือกเพื่อใช้ในการศึกษาการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในงานวิจัยครั้งนี้

## 4.3 การกระจายตัวของยีนและการสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว

### 4.3.1 ประชากรข้าว

#### 4.3.1.1 ประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ( $F_1$ - hybrid)

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

ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) เป็นข้าวเจ้าแบบนาสวนในอำเภอปาย จังหวัดแม่ฮ่องสอน ไม่มีขนบนแผ่นใบ แผ่นใบมีสีเขียวม่วงที่ปลายใบ กาบใบสีเขียวเส้นม่วง ลิ่นใบมีสีขาวมีลักษณะ 2 ยอด และมีความยาว 25 มิลลิเมตร หูใบและสีข้อต่อใบสีม่วง ปล้องสีเขียว ทรงกอแผ่ ยอดเกสรเพศเมียสีขาว ยอดกาบดอกและกลีบรองดอกสีม่วง ความแข็งลำต้นปานกลาง ความยาวลำต้น 150 เซนติเมตร คอรวงยาว มีขนบนเปลือกเมล็ด เปลือกเมล็ดสีฟาง จากการสังเกตลักษณะที่พบเห็นได้ชัดเจน และพบว่ามีแตกต่างจาก KDML105 คือ การมีสีของแผ่นใบเป็นสีเขียวปลายม่วง สีกาบใบเขียวเส้นม่วง มีสีของหูใบและข้อต่อใบเป็นสีม่วง รวมถึงสียอดกาบดอกและสีกลีบรองดอกก็ยังเป็นสีม่วง (ภาพที่ 4.3)

ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ( $F_1$ - hybrid) ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769) มีขนบนแผ่นใบ แผ่นใบมีสีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



#### 4.3.1.2 ประชากรข้าวข้าวที่ 2 ( $F_2$ )

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

#### 4.3.2 การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้โดยวิธีทดสอบการเกิดโรคในประชากรข้าวข้าวที่ 2 ( $F_2$ )

ทดสอบการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 19 ไอโซเลท บนกล้าข้าวจำนวน 250 ต้น พบการแสดงออกของลักษณะความต้านทานโรคไหม้ระดับสูง (ระดับ 0, 1 และ 2) จำนวน 193 ต้น โดยแยกเป็นประชากรข้าว  $F_2$  ที่ได้จากข้าวลูกผสม  $F_1T_1$  ( $F_2T_1$ ) จำนวน 124 ต้น และประชากรข้าว  $F_2$  ที่ได้จากข้าวลูกผสม  $F_1T_2$  ( $F_2T_2$ ) จำนวน 69 ต้น แสดงความต้านทานโรคไหม้ในระดับปานกลาง (ระดับ 3 และ 4) จำนวน 42 ต้น โดยแยกเป็นประชากรข้าว  $F_2T_1$  จำนวน 33 ต้น และประชากรข้าว  $F_2T_2$  จำนวน 9 ต้น พบลักษณะที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ (ระดับ 5 และ 6) จำนวน 15 ต้น โดยแยกเป็นประชากรข้าว  $F_2T_1$  จำนวน 8 ต้น และประชากรข้าว  $F_2T_2$  จำนวน 7 ต้น (ตารางที่ 4.2) ผลประเมินการเกิดโรคของประชากรข้าว  $F_2$  ทั้งหมด 250 ต้น แบ่งเป็นต้นที่แสดงลักษณะต้านทาน 235 ต้น และต้นที่แสดงลักษณะอ่อนแอ 15 ต้น นำข้อมูลที่ได้อามาวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ว่าเป็นตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) โดยทดสอบหาค่า Chi square เนื่องจากประชากรที่ศึกษาเป็นประชากรข้าว  $F_2$  หากความต้านทานโรคไหม้ที่ศึกษาถูกควบคุมด้วยยีนเพียงยีนเดียว การกระจายตัวของยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้จะเท่ากับ 3:1 นั่นคือ ต้านทาน (resistance, R): อ่อนแอ (susceptible, S)

ตารางที่ 4.2 ผลประเมินการเกิดโรคด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 19 ไอโซเลท บนประชากรข้าวข้าวที่ 2 ( $F_2$ ) จำนวน 250 ต้น

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

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

\*\* 0-2 จัดอยู่ในกลุ่มต้านทาน 3-4 จัดอยู่ในกลุ่มต้านทานปานกลาง และ 5-6 จัดอยู่ในกลุ่มอ่อนแอต่อ โรคไหม้ (Sallaud *et al.*, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการกระจายตัวของยีนควบคุมลักษณะต้านทานในอัตราส่วน 3:1 (R:S) พบค่าสถิติ Chi square เท่ากับ 48.133 เมื่อเปรียบเทียบกับตาราง Chi square ที่ degree of freedom (df) เท่ากับ 1 พบว่ามีค่าความน่าจะเป็น (Probability, P) เท่ากับ 0.000 แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 3:1 (R:S) ดังนั้นจึงวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนควบคุมลักษณะต้านทานในอัตราส่วน 15:1 (R:S) พบมีค่าสถิติ Chi square เท่ากับ 0.027 เมื่อเปรียบเทียบกับตาราง Chi square ที่ df เท่ากับ 1 พบว่ามีค่า P เท่ากับ 0.870 หรือ  $0 < P < 0.95$  แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้เป็นไปตามอัตราส่วน 15:1 (R:S) เป็นไปได้ว่าลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ห้วย (GS19769) ถูกควบคุมด้วยยีนหลักที่เป็นยีนเด่นจำนวน 2 ยีน (2 major dominantly resistant genes) โดยยีนหลัก 2 ตำแหน่งนี้มีปฏิกริยาข้ามข้ามตำแหน่งระหว่างกัน (interallelic interaction) และเมื่อพิจารณาข้อมูลในตารางที่ 4.2 จะเห็นว่าในกลุ่มที่ต้านทานมีบางส่วนแสดงความต้านทานปานกลาง แสดงว่าปฏิกริยาระหว่างยีนต้านทานโรคไหม้ 2 ตำแหน่งนี้ในข้าวพันธุ์ห้วยเป็นแบบ (additive-addition interaction) (ตารางที่ 4.3)

**ตารางที่ 4.3** อัตราการกระจายตัวของลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 19 ไอโซเลท ในประชากรข้าวข้าวที่ 2 ( $F_2$ ) จำนวน 250 ต้น

ประชากร (จำนวนต้น)	Expected ratio	Expected		Observed		$X^2$	P
		Expected No.		No.			
		R	S	R	S		
$F_2$ (250)	3:1	187.5	62.5	235	15	48.133*	0
$F_2$ (250)	15:1	234.4	15.6	235	15	0.027**	0.87

\* ค่าสถิติ Chi square ( $X^2$ ) = 0.05, df = 1.0 (3.84, 1), \*\* $X^2$  = 0.90, df = 1.0 (0.02, 1) R คือ Resistant (ต้านทาน), S คือ Susceptible (อ่อนแอ), P คือ Probability

#### 4.3.3 การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าวข้าวที่ 2 ( $F_2$ )

##### 4.3.3.1 เครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้

คัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพ่อและแม่ได้โดยใช้เครื่องหมาย microsatellite จำนวน 230 เครื่องหมายที่กระจายอยู่บนทุกโครโมโซมของข้าวเป็น primer ในปฏิกริยา PCR ตรวจสอบผลจากการทำปฏิกริยา PCR ด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate พบเครื่องหมาย microsatellite จำนวน 66 เครื่องหมายสามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพ่อและแม่ได้ คิดเป็น 28.44 เปอร์เซ็นต์ของเครื่องหมายทั้งหมด กระจายอยู่ที่จีโนมของข้าว โดยแบ่งตามโครโมโซมได้ดังนี้ โครโมโซม 1 จำนวน 5 เครื่องหมาย โครโมโซม 2 จำนวน 7 เครื่องหมาย โครโมโซม 3 จำนวน 4 เครื่องหมาย โครโมโซม 4 จำนวน 9 เครื่องหมาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครโมโซม 5 จำนวน 7 เครื่องหมาย โครโมโซม 6 จำนวน 4 เครื่องหมาย โครโมโซม 7 จำนวน 6 เครื่องหมาย โครโมโซม 8 จำนวน 4 เครื่องหมาย โครโมโซม 9 จำนวน 4 เครื่องหมาย โครโมโซม 10 จำนวน 4 เครื่องหมาย โครโมโซม 11 จำนวน 7 เครื่องหมาย และโครโมโซม 12 จำนวน 5 เครื่องหมาย (ตารางที่ 4.4)

4.3.3.2 เครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้

นำเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้จำนวน 66 เครื่องหมายมาคัดเลือกเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) โดยใช้ดีเอ็นเอรวมของประชากร 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือดีเอ็นเอของพันธุ์แม่ กลุ่ม 2 ดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อ กลุ่มที่ 3 ดีเอ็นเอของประชากร  $F_2T_1$  ที่แสดงความต้านทาน (resistant) ระดับ 0 กลุ่มที่ 4 ดีเอ็นเอของประชากร  $F_2T_1$  ที่แสดงความอ่อนแอ (susceptible) ระดับ 5 และ 6 กลุ่มที่ 5 ดีเอ็นเอของประชากร  $F_2T_2$  ที่แสดงความต้านทาน (resistant) ระดับ 0 และกลุ่มที่ 6 ดีเอ็นเอของประชากร  $F_2T_2$  ที่แสดงความอ่อนแอ (susceptible) ระดับ 5 และ 6 นำดีเอ็นเอของแต่ละกลุ่มมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบผลจากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค PAGE ด้วย polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลด้วยสารละลาย silver nitrate วิเคราะห์แปลงรูปแบบดีเอ็นเอเป็นข้อมูล A, B และ H โดยกำหนดให้ A คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ B คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ H คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่ พบเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้จำนวน 3 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM125 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 7 มีการแสดงของเครื่องหมายเรียงตามกลุ่ม 1 ถึง 6 คือ ABHABA เครื่องหมาย RM144 อยู่บนโครโมโซมที่ 11 มีการแสดงของเครื่องหมายเรียงตามกลุ่ม 1 ถึง 6 คือ ABHAHA และเครื่องหมาย RM224 อยู่บนโครโมโซมที่ 11 มีการแสดงของเครื่องหมายเรียงตามกลุ่ม 1 ถึง 6 คือ ABBABA นอกจากนี้ยังพบเครื่องหมาย microsatellite ที่มีความเป็นไปได้ว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ คือ เครื่องหมาย RM247 อยู่บนโครโมโซมที่ 12 มีการแสดงของเครื่องหมายเรียงตามกลุ่ม 1 ถึง 6 คือ ABHABH แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมาย RM247 สามารถแยกความแตกต่างของกลุ่มที่แสดงความต้านทานและความอ่อนแอได้ในประชากรข้าว  $F_2T_1$  เท่านั้น ดังนั้นจึงเลือกใช้เครื่องหมาย RM125, RM144 และ RM224 เพื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าว  $F_2$  จำนวน 250 ต้นต่อไป (ภาพที่ 4.4 และตารางที่ 4.4)

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

Chr.	Marker	Primer sequences (5'-3')		BSA score band
		Forward primer	Reverse primer	
1	RM495	AATCCAAGGTGCAGAGATGG	CAACGATGACGAACACAACC	ABHHHH*
	RM312	GTATGCATATTTGATAAGAG	AAGTCACCGAGTTTACCTTC	ABHAHH
	RM428	AACAGATGGCATCGTCTTCC	CGTGCATCCACTACTGTTG	ABABBB
1	RM433	GATGGTTTTTCATCGGCTACG	AGTCCCAGAATGTCGTTTTCG	ABBBBB*
	RM472	CCATGGCCTGAGAGAGAGAG	AGCTAAATGGCCATACGGTG	ABHHHH
2	RM106	CGTCTTCATCATCGTCGCCCG	GGCCCATCCCGTCGTGGATCTC	ABHHHH
	RM6	GTCCCTCCACCCAATTC	TCGTCTACTGTTGGCTGCAC	ABHHHH
	RM208	TCTGCAAGCCTTGTCTGATG	TAAGTCGATCATTGTGTGGACC	ABABAA
	RM71	CTAGAGGCGAAAACGAGATG	GGGTGGGCGAGGTAATAATG	ABHHHH
	RM341	CAAGAACTCAATCCGAGC	CTCCTCCCGATCCCAATC	ABHHHH
	RM475	CCTCACGATTTCTCCAAC	ACGGTGGGATTAGACTGTGC	ABHHHH
	RM526	CCAAGCAATACGTCCCTAG	ACCTGGTCATGACAAGGAGG	ABHHHH
3	RM55	CCGTCGCCGTAGTAGAGAAG	TCCCGTTATTTAAGGCG	ABHHHH
	OSR16	AAAAGTAGCTTGCAAAGGGGA	TGCCGGCTGATCTTGTCTC	ABAAAH
	RM7	TTCGCCATGAAGTCTCTCG	CCTCCCATCTTCGTTGTT	ABHHHB
	RM85	CCAAGATGAAACCTGGATTG	GCACAAGGTGAGCAGTCC	ABBAAH
4	RM551	AGCCAGACTAGCATGATTG	GAAGGCGAGAAGGATCACAG	ABHHHH
	RM471	ACGCACAAGCAGATGATGAG	GGGAGAAGACGAATGTTTGC	ABHHHH
	RM252	TTCGCTGACGTGATAGGTTG	ATGACTTGATCCCGAGAACG	ABHHHH
	RM280	ACACGATCCACTTTGCGC	TGTGTCTTGAGCAGCCAGG	ABHHHH
	RM559	ACGTACACTTGGCCCTATGC	ATGGGTGTCAGTTTGCTTCC	ABHHHH
	RM3524	CGGAGCTGGTCTAGCCATC	GTCTCCGTCTTCTCACTCG	ABHHHH
	RM1136	ATGTCATCCAGAGTCGCCTC	AGGACGTATTCACACACGAC	ABHHHH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

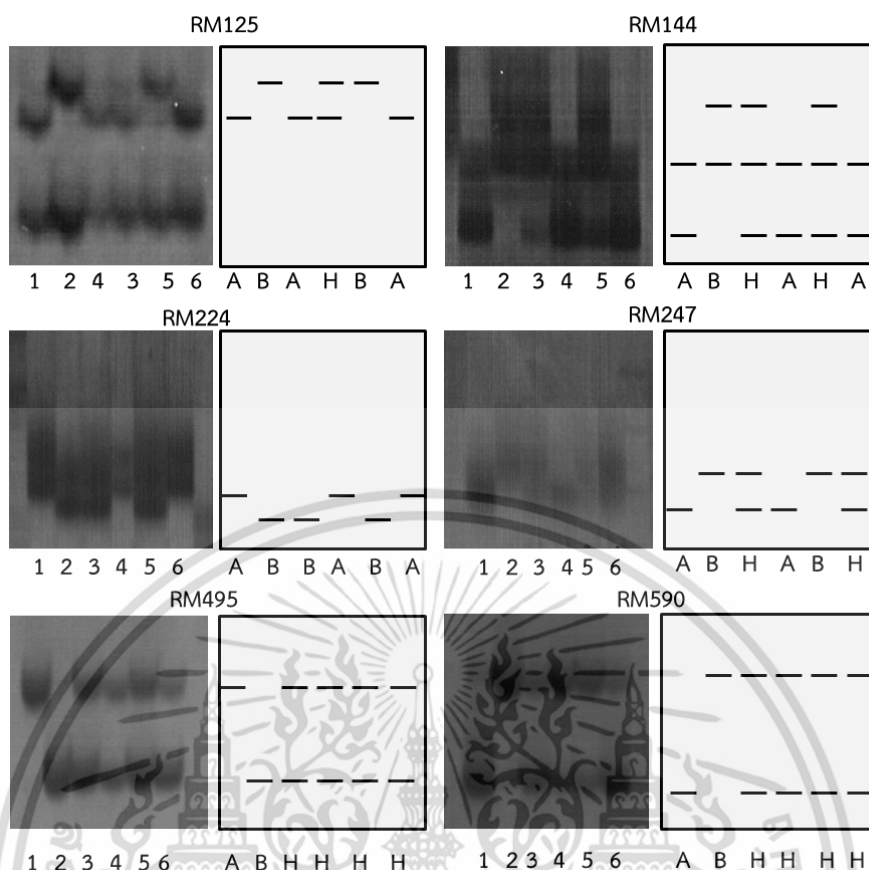
Chr.	Marker	Primer sequences (5'-3')		BSA score band
		Forward primer	Reverse primer	
4	RM241	GAGCCAAATAAGATCGCTGA	TGCAAGCAGCAGATTTAGTG	ABHHHH
	RM6748	ATTGGGTTTCTCATATTATG	CCAACACTCCTAACTAGTTC	ABHHHH
5	RM413	GGCGATTCTTGATGAAGAG	TCCCCACCAATCTTGTCTTC	ABHHHH
	RM509	TAGTGAGGGAGTGGAACGG	ATCGTCCCCACAATCTCATC	ABHHHH
	RM178	TCGCGTGAAAGATAAGCGGCGC	GATCACCGTTCCCTCCGCTGC	ABBBBH
	RM2010	ATCTTCTAGGAAATCGAGGA	GTTGGCAACTGTAGTCTTG	ABHHHH
	RM5140	GACGAGGTTGTTTATTAGTG	CTTATTTTACGTGTACGTT	ABBBBA
	RM598	GAATCGCACACGTGATGAAC	ATGCGACTGATCGGTACTCC	ABHHHH
	RM3663	CATCAACCTCCACGAACATG	CTCGGTGGTGATCCTCCTC	ABHHHH
	6	RM204	GTGACTGACTTGGTCATAGGG	GCTAGCCATGCTCTCGTACC
RM225	TGCCCATATGGTCTGGATG	GAAAGTGATCAGGAAGGC	ABHHHH	
RM136	GAGAGCTCAGCTGCTGCCTTAGC	GAGGAGCGCCACGGTGTACGCC	ABBHBH	
RM7434	GGAGGAAAGGTTGGAGAAGG	TTTCCCGTATCCATGAGCC	ABHHHH	
7	RM125	ATCAGCAGCCATGGCAGCGACC	AGGGGATCATGTGCCGAAGGCC	ABHABA
	RM11	TCTCCTCTCCCCGATC	ATAGCGGGCGAGGCTTAG	ABHHHH
	RM4098	CGTTTGGATGAAGAAGAAGA	AGTGTTTCGTTTCGGATTAGA	ABHHHH
	RM1253	CTGAACCTTGCTGAGAACTC	GACGACCTCTCCATGCTCG	ABHHHH
	RM1973	GAGTTGCAAGGATATTTTAA	TGGAGCCTAGAGAATACATA	ABHHHH
	RM1132	ATCACCTGAGAAACATCCGG	CTCCTCCCACGTCAAGGTC	ABHHHH
8	RM152	GAAACCACCACACCTCACCG	CCGTAGACCTTCTTGAAGTAG	ABHHHH
	RM44	ACGGGCAATCCGAACAACC	TCGGGAAAACCTACCCTACC	ABHHHH
	RM38	ACGAGCTCTCGATCAGCCTA	TCGGTCTCCATGTCCCAC	ABABBH
	RM8264	ACGCTCCTCGCTTTCTAC	GCACCTCACACCAGTAATTC	ABHHHH
9	RM201	CTCGTTTATTACCTACAGTACC	CTACCTCCTTTCTAGACCGATA	ABHHHH
	RM205	CTGGTTCTGTATGGGAGCAG	CTGGCCCTTACGTTTCAGTG	ABHHHH
	RM5122	CTCGCAATTTATACGTAATC	CTCACGAAATAAATGAGTG	ABHHHH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chr.	Marker	Primer sequences (5'-3')		BSA score band
		Forward primer	Reverse primer	
9	RM1553	AATTAGAGGGTCCACATGTC	ATTACCCTCATTTTCTACGC	ABHHHH
10	RM474	AAGATGTACGGGTGGCATTTC	TATGAGCTGGTGAGCAATGG	ABHHHH
	RM590	CATCTCCGCTCTCCATGC	GGAGTTGGGGTCTTGTTCG	ABHHHH
	RM7217	TTTGTAGGATGACACGTGGC	CGGGATTTAGTACCTCACG	ABAAAA
	RM3123	ATTTCCACACATCTCGCTG	GTGTGCGCCGGTCAAGAAC	ABHHHH
	RM287	TCCCTGTAAAGAGAGAAATC	GTGTATTTGGTGAAAGCAAC	ABHHHH
11	RM457	CTCCAGCATGGCCTTTCTAC	ACCTGATGGTCAAAGATGGG	ABHHHH
	RM206	CCCATGCGTTTAACTATTCT	CGTTCATCGATCCGTATGG	ABHHHH
	RM224	ATCGATCGATCTTCACGAGG	TGCTATAAAAGGCATTCTGGG	ABBABA
	RM144	TGCCCTGGCGCAAATTTGATCC	GCTAGAGGAGATCAGATGGTAGTGCATG	ABHAHA
	RM3717	AGCTCTACCTTTGCTGTCCG	AACTCCCTAGACCCACCTGC	ABHHHH
	RM4601	CATACATGTGAACCTGACTG	CTAGCTTAGCATCTCCTCAA	ABHHHH*
12	RM415	CTTCGATCCATCATCCATGG	ATTGCTGTACGCAGTTTCGG	ABHHHH
	RM247	TAGTGCCGATCGATGTAACG	CATATGGTTTTGACAAAGCG	ABHABH
	RM235	AGAAGCTAGGGCTAACGAAC	TCACCTGGTCAGCCTCTTTC	ABBBBB
	RM1261	GTCCATGCCAAGACACAAC	GTTACATCATGGGTGACCCC	ABHHHH
	RM1103	CAGCTGCTGCTACTACACCG	CTACTCCACGTCCATGCATG	ABBBBB

\*เรียงตามกลุ่ม 1 ถึง 6 โดย A คือ มีผลผลิตชั้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่, B คือ มีผลผลิตชั้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ, H คือ มีผลผลิตชั้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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

#### 4.3.3.3 การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ( $F_2$ )

ใช้เครื่องหมาย microsatellite RM125, RM144 และ RM224 เป็น primer ในปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบผลจากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate วิเคราะห์แปลงรูปแบบดีเอ็นเอเป็นข้อมูล A, B และ H โดยกำหนดให้ A คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ B คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ H คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่ ผลการวิเคราะห์ของเครื่องหมาย RM144 ในประชากรข้าว  $F_2$  จำนวน 250 ต้น พบผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ กำหนดให้เป็น A จำนวน 71 ต้น พบผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อกำหนดให้เป็น B จำนวน 46 ต้น และพบผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่กำหนดให้เป็น H จำนวน 133 ต้น ผลการวิเคราะห์ของเครื่องหมาย RM224 ในประชากรข้าว  $F_2$  จำนวน 250 ต้น พบผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์แม่กำหนดให้เป็น A จำนวน 66 ต้น พบผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อกำหนดให้เป็น B จำนวน 49 ต้น และพบผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่กำหนดให้เป็น H จำนวน 135 ต้น และผลการวิเคราะห์ของเครื่องหมาย RM125 ในประชากรข้าว F<sub>2</sub> จำนวน 250 ต้น พบผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่กำหนดให้เป็น A จำนวน 65 ต้น พบผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อกำหนดให้เป็น B จำนวน 55 ต้น และพบผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่กำหนดให้เป็น H จำนวน 130 ต้น (ตารางที่ 4.5)

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

#### 4.3.4 สร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนด้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว จากเปอร์เซ็นต์รีคอมบิเนชัน (recombination)

โอกาสเกิด recombination มีความสัมพันธ์โดยตรงกับระยะทางระหว่างยีนในโครโมโซมเดียวกัน ค่าความถี่ของการเกิด recombination 1 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1 centiMorgans (cM) ซึ่งเป็นหน่วยของระยะห่างระหว่างยีนบนแผนที่ยีน (mapping function) ในการทดลองนี้ใช้ข้อมูล phenotype และ genotype ของประชากรเพียง 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจน พบการเกิดโรคที่ระดับ 5 และ 6 เป็นประชากรที่มี phenotype ถูกต้องแน่นอน จึงเป็นประชากรที่เหมาะสมสำหรับนำมาวิเคราะห์เพื่อระบุตำแหน่งที่ตั้งของยีนด้านทานโรคไหม้ พบว่าเครื่องหมาย RM144 และ RM224 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 11 มีการเกิด recombination เท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่ายีนด้านทานโรคไหม้มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM144 และ RM224 โดยมีระยะห่างจากทั้ง 2 เครื่องหมายเป็นระยะทาง 20 cM และมีตำแหน่งที่ตั้งอยู่บนโครโมโซม 11 ผลของเครื่องหมาย RM125 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 7 มีการเกิด recombination เท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเครื่องหมายเป็นอิสระจากยีนด้านทานโรคไหม้อาจอยู่ห่างจากยีนด้านทานโรคไหม้มากเป็นระยะทาง 60 cM หรือไม่ได้มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมเดียวกันกับยีนด้านทานโรคไหม้ (ตารางที่ 4.6, ภาพที่ 4.8) เพื่อเป็นการช่วยยืนยันถึงการมีอยู่ของจำนวนยีนและระบุตำแหน่งที่ตั้งของยีนด้านทานโรคไหม้ที่ชัดเจนขึ้น จึงทำการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

#### 4.3.5 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite เพื่อยืนยันจำนวนและระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้

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

เพื่อค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ที่ควบคุมความต้านทานในข้าวพันธุ์ห้วย (GS19769) ซึ่งอาจมีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM125 ที่มีตำแหน่งบนโครโมโซม 7 และ RM247 มีตำแหน่งบนโครโมโซม 12 ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่มีความเป็นไปได้ว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ (ภาพที่ 4.4) เนื่องจากสามารถแยกความแตกต่างของกลุ่มที่แสดงความต้านทานและความอ่อนแอได้ในประชากรข้าว  $F_2T_1$  จึงคัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้ และมีตำแหน่งของเครื่องหมายบนโครโมโซม 7 จำนวน 2 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM11 และ RM1132 (ภาพที่ 4.8) และคัดเลือกเครื่องหมายบนโครโมโซม 12 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้จำนวน 2 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM1261 และ RM235 (ภาพที่ 4.9) นำมาวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายในประชากร 15 ต้นที่แสดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

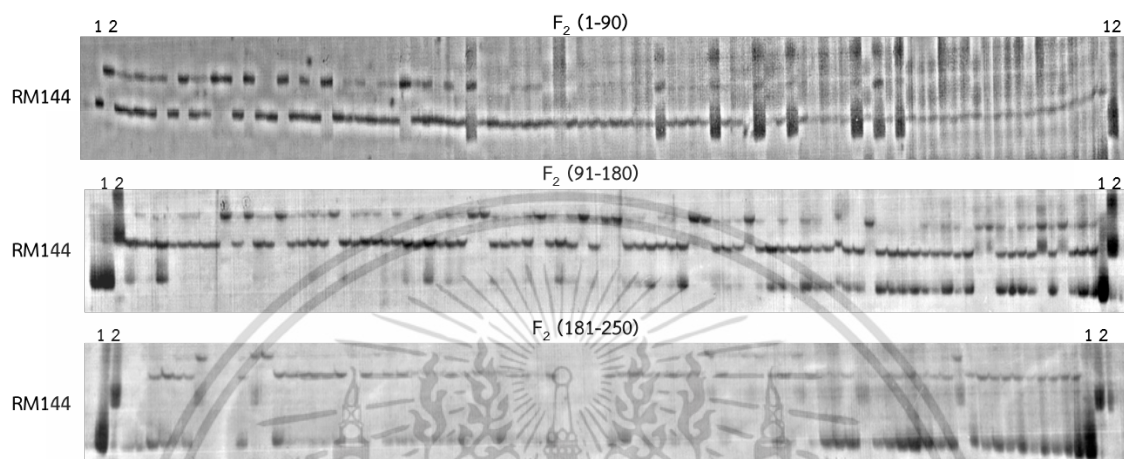
ความอ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจนเป็นประชากรที่มี phenotype ที่ถูกต้องแน่นอน วิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย โดยใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบผลจากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate วิเคราะห์แปลงรูปแบบดีเอ็นเอเป็นข้อมูล A, B และ H โดยกำหนดให้ A คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ B คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ H คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิด recombination เพื่อหาระยะทางระหว่างเครื่องหมายและยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย RM11 และ RM1132 พบว่าไม่มีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ โดยมีเปอร์เซ็นต์ recombination เท่ากับ 73.33 และ 80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนเครื่องหมายที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 12 ได้แก่ RM247, RM1261 และ RM235 มีเปอร์เซ็นต์ recombination เท่ากับ 73.33, 53.33 และ 66.66 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เนื่องจากทั้ง 3 เครื่องหมายมีเปอร์เซ็นต์ recombination มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเครื่องหมายเป็นอิสระจากยีนต้านทานโรคไหม้อาจอยู่ห่างจากยีนต้านทานโรคไหม้มาก หรือ ไม่ได้มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมเดียวกันกับยีนต้านทานโรคไหม้ (ตารางที่ 4.6)

เพื่อระบุตำแหน่งที่แน่นอนของยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซม 11 ในข้าวพื้นเมืองไทย พันธุ์ห้วย (GS19769) จึงคัดเลือกเครื่องหมาย microsatellite บนโครโมโซม 11 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้ และมีตำแหน่งของเครื่องหมายอยู่ใกล้และอยู่ไกลจากเครื่องหมาย RM144 และ RM224 จำนวน 3 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM5926, RM6094 และ RM287 (ภาพที่ 4.10) นำมาวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายในประชากร 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจนเป็นประชากรที่มี phenotype ที่ถูกต้องแน่นอน วิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย โดยใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบผลจากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วย silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) วิเคราะห์แปลงรูปแบบดีเอ็นเอเป็นข้อมูล A, B และ H โดยกำหนดให้ A คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ B คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ H คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิด recombination เพื่อหาระยะทางระหว่างเครื่องหมายและยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว ผลจากการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย RM5926, RM6094 และ RM287 พบว่ามีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ โดยพบว่ามีเปอร์เซ็นต์ recombination เท่ากับ 26.67, 26.67 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) นำข้อมูล genotype ของเครื่องหมายบนโครโมโซม 11 ที่ทำการวิเคราะห์ทั้งหมดมาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูล phenotype ของประชากร 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจนเป็นประชากรที่มี phenotype ที่ถูกต้องแน่นอน โดยคำนวณเปอร์เซ็นต์ recombination ระหว่างแต่ละคู่ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ เพื่อวาดภาพระบุตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอตามเปอร์เซ็นต์การเกิด recombination ระยะห่างบนโครโมโซมมีหน่วยเป็น centiMorgans (cM) แสดงให้เห็นว่ายีนต้านทานโรคไหม้มีตำแหน่งที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 11 มีระยะห่างจากเครื่องหมาย RM144 และ RM224 เป็นระยะทาง 20 cM มีระยะห่างจากเครื่องหมาย RM5926 เป็นระยะทาง 26.67 cM มี

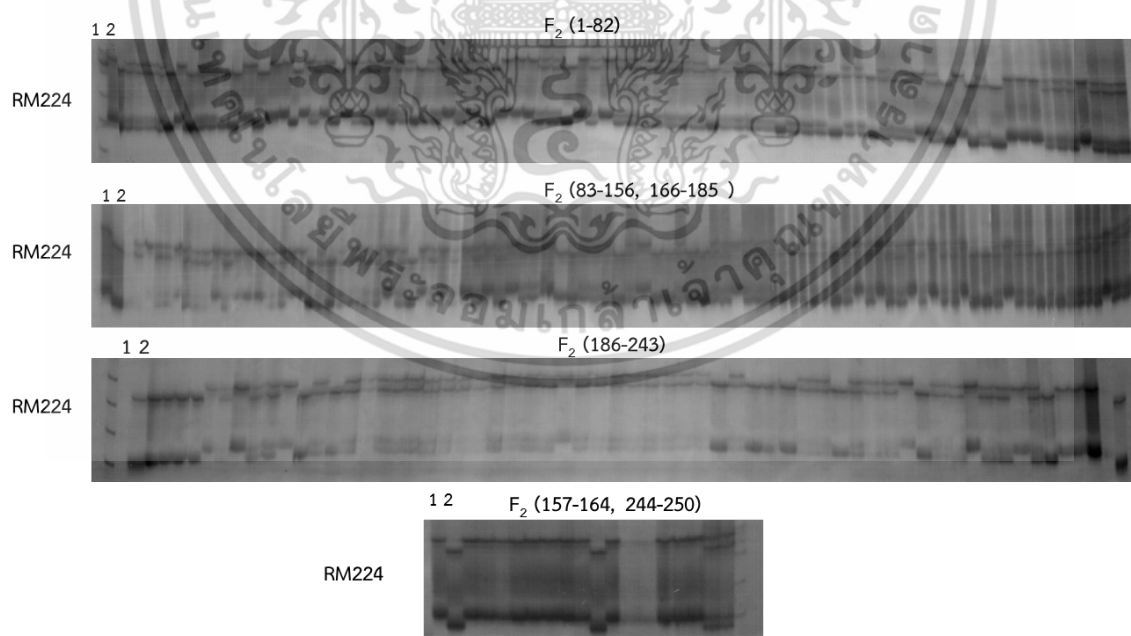
ระยะห่างจากเครื่องหมาย RM6094 เป็นระยะทาง 33.34 cM และมีระยะห่างจากเครื่องหมาย RM287 เป็นระยะทาง 86.67 cM (ภาพที่ 4.11 ก)

#### 4.3.6 การสร้างแผนที่เพื่อระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MAPMAKER

สร้างแผนที่ยีนต้านทานโรคไหม้ โดยนำข้อมูลการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ที่ได้จากการทดสอบการเกิดโรคไหม้ในประชากรข้าว F<sub>2</sub> ซึ่งเป็นข้อมูล phenotype และข้อมูลการกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากร 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจน ซึ่งเป็นข้อมูล genotype มาวิเคราะห์ร่วมกัน ทำการจัดกลุ่มและคำนวณหาค่าระยะห่างของแต่ละเครื่องหมาย และระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้ ด้วยโปรแกรม MAPMAKER/EXP version 3.0b และวาดแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapChart version 2.2 จัดกลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอและยีนต้านทานโรคไหม้ที่มีความใกล้เคียงกัน ที่ค่า logarithm of odds (LOD) =3.0 พบเครื่องหมายที่มีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ห้วย (GS19769) คือ เครื่องหมาย RM144, RM224, RM5926 และ RM6094 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 11 จากการคำนวณหาระยะห่างของแต่ละเครื่องหมาย และระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้ด้วย Kosambi function พบว่ายีนต้านทานโรคไหม้มีระยะห่างจากเครื่องหมาย RM144 และ RM224 เป็นระยะทางเท่ากันคือ 13.7 cM ห่างจากเครื่องหมาย RM5926 เป็นระยะทาง 17.1 cM และห่างจากเครื่องหมาย RM6094 เป็นระยะทาง 20.5 cM (ภาพที่ 4.11 ข)

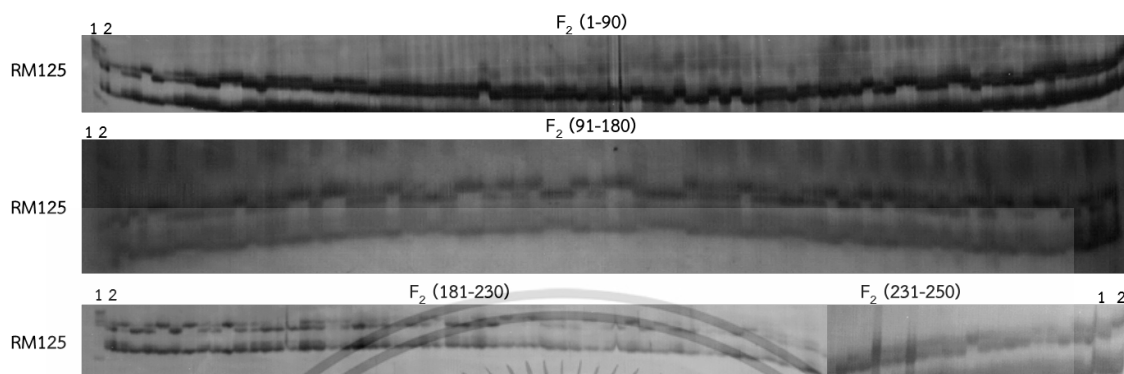


ภาพที่ 4.5 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM144 ในประชากรข้าวข้าวที่ 2 ( $F_2$ ) จำนวน 250 ต้น ด้วยเลข 1 คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, 2 คือ พันธุ์ห้วย (GS19769)

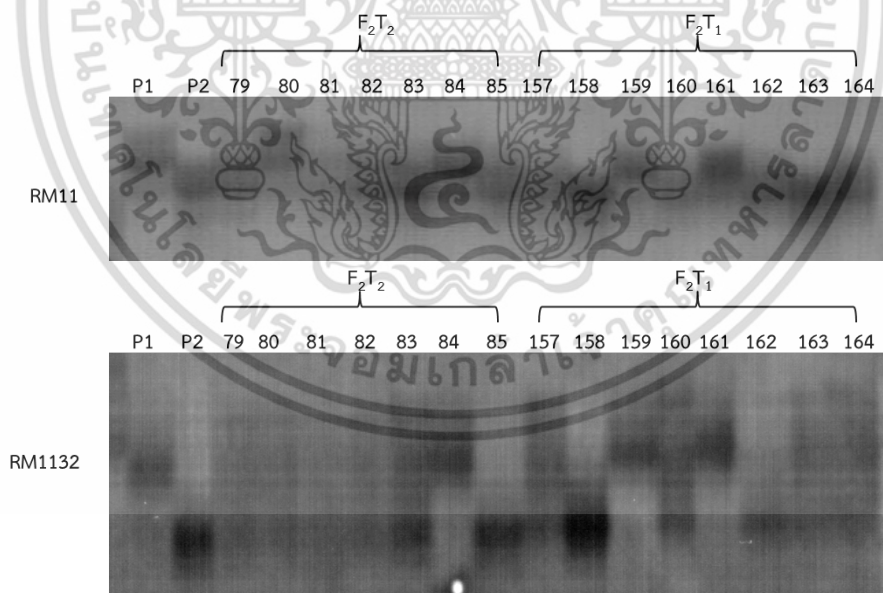


ภาพที่ 4.6 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM224 ในประชากรข้าวข้าวที่ 2 ( $F_2$ ) จำนวน 250 ต้น ด้วยเลข 1 คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, 2 คือ พันธุ์ห้วย (GS19769)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

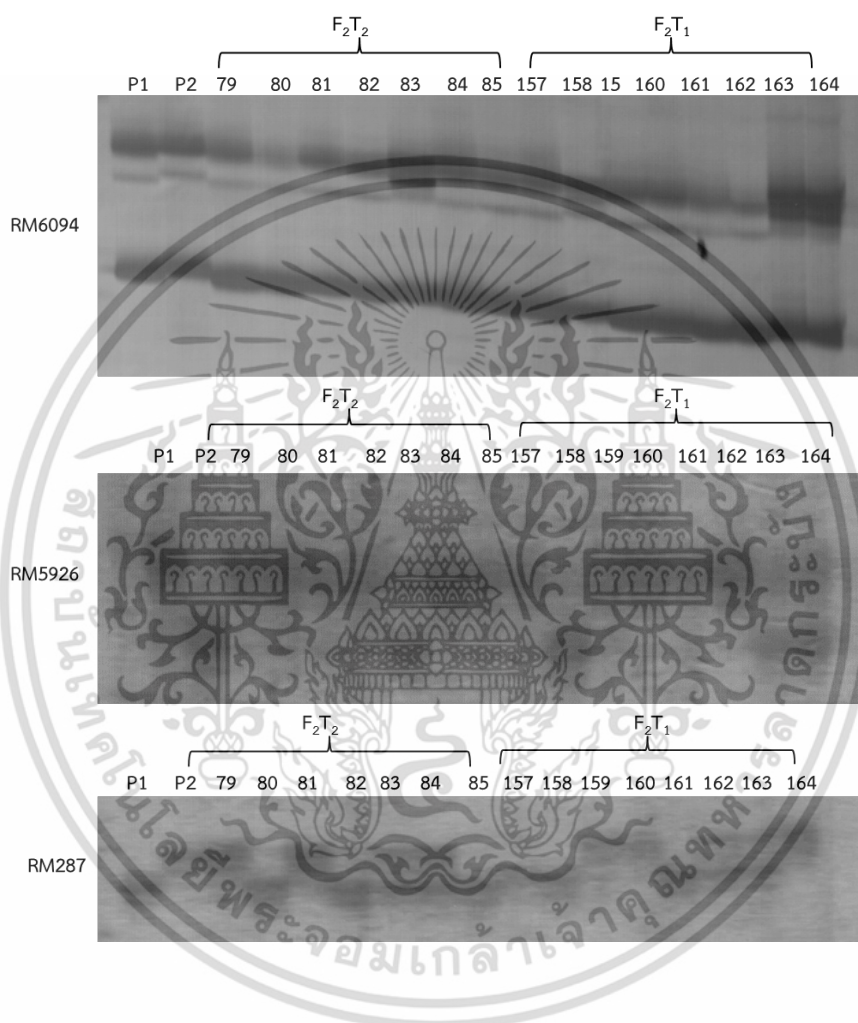


ภาพที่ 4.7 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM125 ในประชากรข้าวชี้ที่ 2 ( $F_2$ ) จำนวน 250 ต้น ด้วยเลข 1 คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, 2 คือ พันธุ์ห้วย (GS19769)



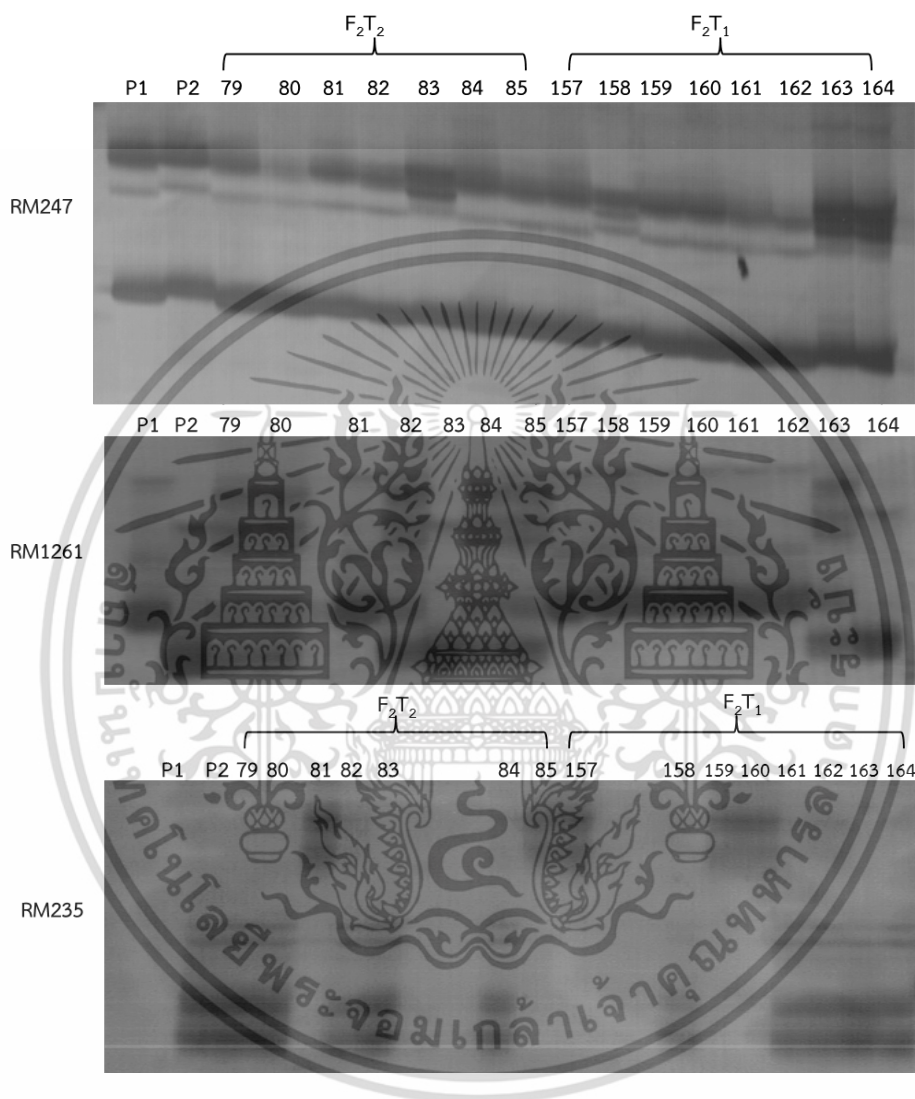
ภาพที่ 4.8 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM11 และ RM1132 โคโรโมโซม 7 ในประชากรข้าว 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ P1 คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, P2 คือ พันธุ์ห้วย (GS19769)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM5926, RM6094 และ RM287 โครโมโซม 11 ในประชากรข้าว 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ P1 คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ105, P2 คือ พันธุ์ห้วย (GS19769)

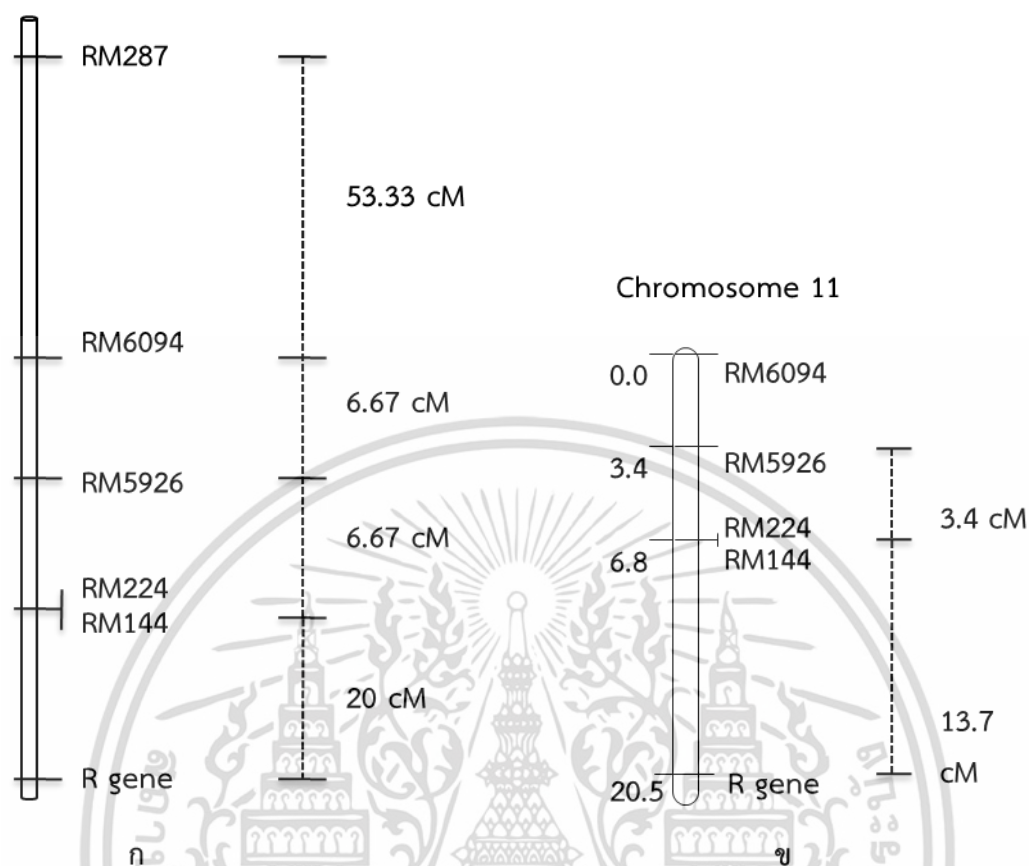
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าว 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ และเปอร์เซ็นต์การเกิด recombination ของยีนต้านทานโรคไหม้

		ประชากรข้าว F <sub>2</sub> จำนวน 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้																	% recombination	
โครโมโซม	เครื่องหมาย	P1	P2	157	158	159	160	161	162	163	164	79	80	81	82	83	84	85		
Geno- type	7	RM125	A	B	H	H	A	H	A	H	A	H	H	A	A	H	H	A	H	60
	7	RM11	A	B	H	B	A	B	A	H	B	H	H	A	H	H	H	A	H	73.33
	7	RM1132	A	B	H	B	A	H	A	B	H	H	H	H	H	H	H	A	B	80
	11	RM287	A	B	A	A	B	B	A	H	H	B	B	A	B	A	H	H	A	60
	11	RM224	A	B	A	B	A	A	A	A	H	H	A	A	A	A	A	A	A	20
	11	RM144	A	B	A	B	A	A	A	A	H	H	A	A	A	A	A	A	A	20
	11	RM6094	A	B	A	H	A	A	A	A	H	H	A	A	A	A	H	A	A	26.67
	11	RM5926	A	B	A	B	A	A	A	A	H	H	A	A	A	A	H	A	A	26.67
	12	RM247	A	B	A	H	A	H	H	H	H	B	H	B	H	A	B	H	A	73.33
	12	RM1261	A	B	A	A	A	A	A	A	H	B	H	H	A	H	B	H	H	53.33
	12	RM235	A	B	A	B	A	A	B	B	B	B	B	B	A	B	B	B	A	66.66
Pheno- type			5	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	5	5	5	6	

A คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่, B คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ, H คือ มีผลผลิตขึ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่

## Chromosome 11



ภาพที่ 4.11 แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ และระยะห่างระหว่างเครื่องหมายบนโครโมโซม 11 ของข้าว วิเคราะห์ในประชากรข้าว 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 19 ไอโซเลท ก) จำนวนเปอร์เซ็นต์ recombination ของยีนต้านทานโรคไหม้และระหว่างแต่ละคู่ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ ข) จำนวนหาระยะห่างของแต่ละเครื่องหมายและยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MAPMAKER และวาดแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapChart

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 5.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

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

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

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

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

นอกจากนี้ พบว่าเชื้อราที่เก็บจากจังหวัดเดียวกันในพื้นที่ใกล้เคียงกัน เช่น เชื้อสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลท UBN2010 195167 และ UNB2010 11357 เป็นเชื้อราที่เก็บจากจังหวัดอุบลราชธานี เช่นเดียว

กับกรณีของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลท CPM55002 และ CPM55003 เป็นเชื้อราที่เก็บจากจังหวัดชัยภูมิ เชื้อสาเหตุโรคไหม้ทั้ง 4 ไอโซเลทถูกจัดแยกกลุ่มกัน โดยพบว่าเชื้อสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลท UBN2010 195167 และ CPM55002 ถูกจัดกลุ่มแยกออกเป็นเชื้อเดี่ยวในกลุ่มที่ 3 และ 4 ตามลำดับ เชื้อสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลท UBN2010 11357 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 และเชื้อสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลท CPM55003 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 แสดงให้เห็นว่าเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บจากจังหวัดเดียวกันพื้นที่ใกล้เคียงกันมีพันธุกรรมของเชื้อที่ต่างกัน และบริเวณที่มีการระบาดของโรคไหม้ในจังหวัดเดียวกันพื้นที่ใกล้เคียงกันมีจำนวนเชื้อราเข้าทำลายข้าวปลูกได้มากกว่า 1 ไอโซเลท สอดคล้องกับงานวิจัยของ เสาวลักษณ์ และคณะ (2554) ที่รายงานว่าเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บจากจังหวัดเดียวกัน มีความหลากหลายของระดับความรุนแรงในการก่อโรคไหม้แตกต่างกันไม่สามารถจัดกลุ่มรวมกันได้ และเชื้อราที่เข้าทำลายข้าวจากบริเวณแผ่นดินเดียวกันมีมากกว่า 1 เชื้อพันธุ์ (race) ในงานวิจัยนี้ยังพบว่าเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่พบระบาดในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีความหลากหลายมากกว่าบริเวณพื้นที่ปลูกข้าวแหล่งอื่น เนื่องจากสามารถจัดกลุ่มแยกกันในกลุ่มที่ 1 ถึง 4 ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ พูนศักดิ์ และคณะ (2550) ที่รายงานว่าเชื้อสาเหตุโรคไหม้ข้าวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ (pathotype) มากที่สุด

## 5.2 การคัดเลือกข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีลักษณะต้านทานโรคไหม้

ผลการคัดเลือกข้าวสายพันธุ์ต้านทานโรค จากข้าวพันธุ์พื้นเมือง ข้าวพันธุ์แนะนำ และข้าวป่า รวมทั้งสิ้น 311 สายพันธุ์ พบข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ไม่แสดงอาการของโรค 4 สายพันธุ์ คือ GS23107, GS19769, GS20874 และ GS23774 ข้าวพันธุ์แนะนำที่ไม่แสดงอาการของโรค 4 สายพันธุ์ คือ ชัยนาท 1 สุพรรณบุรี 1 สุพรรณบุรี 60 และสุพรรณบุรี 90 และพันธุ์เจ้าหอมนิล ในจำนวนนี้ สายพันธุ์ GS19769 ถูกเลือกเพื่อใช้ในการศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้

## 5.3 การกระจายตัวของยีน และแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว

### 5.3.1 ลักษณะประจำพันธุ์

ลักษณะประจำพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (KDML105) ที่ปลูกและใช้ในการทดลองพบว่ามีความคล้ายคลึงกับลักษณะที่มีรายงานไว้โดย สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว (2553) โดยเฉพาะลักษณะดังนี้ กาบใบและใบสีเขียว มีขนใบ ลิ่นใบสีเขียวรูปร่างแหลมมี 2 ยอด หูใบและข้อต่อใบสีเขียวอ่อน ปลายยอดดอกสีขาว ยอดเกสรเพศเมียสีขาว ต้นข้าวแข็งปานกลาง (มีล้มบ้าง) คอรวงยาว มีขนบนเปลือกเมล็ด เปลือกเมล็ดสีฟาง

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะประจำพันธุ์ข้าวลูกผสม  $F_1$  เนื่องจากเป็นข้าวลูกผสม  $F_1$  ดังนั้นลักษณะที่พบเห็นจึงมีความเหมือนทั้งในพันธุ์พ่อและแม่ โดยลักษณะที่พบว่ามีความเหมือนกับพันธุ์แม่ คือ มีขนบนแผ่นใบ ลักษณะที่พบว่ามีความเหมือนกับพันธุ์พ่อ คือ ยอดดอกและกลีบรองดอกสีม่วง และพบลักษณะที่ต่างจากพ่อและแม่ คือ แผ่นใบมีสีเขียวเข้ม กาบใบสีม่วง หูใบและสีข้อต่อใบสีม่วงอ่อน และยอดเกสรตัวเพศสีม่วงดำ (ภาพที่ 4.3) ซึ่งลักษณะทาง phenotype ที่พบเป็นลักษณะที่บ่งบอกได้ว่าข้าว  $F_1$  ที่ได้เป็นข้าวลูกผสม  $F_1$  ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 กับข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (GS19769)

### 5.3.2 การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ( $F_2$ )

ทดสอบการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 19 ไอโซเลท บนกล้าข้าว พบการแสดงออกของลักษณะความต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าว  $F_2$  จำนวน 250 ต้น แบ่งเป็นต้นที่แสดงลักษณะต้านทานจำนวน 235 ต้น และต้นที่แสดงลักษณะอ่อนแอจำนวน 15 ต้น วิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ว่าเป็นตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) เนื่องจากประชากรที่ศึกษาเป็นประชากรข้าว  $F_2$  หากความต้านทานโรคไหม้ที่ศึกษาถูกควบคุมด้วยยีนเพียงยีนเดียว จะพบการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในอัตราส่วน 3:1 (R:S) ตัวอย่างงานวิจัยของ Prasad *et al.* (2009) วิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากร  $F_2$  จำนวน 184 ต้น ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวพันธุ์ Samba Mahsuri (BPT5204) และ C101LAC ทดสอบการเกิดโรคด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลท DRR 001 วิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ พบมีการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้เป็นไปตามอัตราส่วน 3:1 (R:S) แสดงว่ามียีนต้านทานโรคไหม้ที่ควบคุมความต้านทานเพียงยีนเดียว วิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมาย microsatellite จัดกลุ่มของเครื่องหมายและหาระยะทางระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้ พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-1(t)* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 11 แต่จากผลการทดลองนี้พบว่า การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 3:1 (R:S) แสดงให้เห็นว่าลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ห้วยไม่ได้ถูกควบคุมด้วยยีนเพียงยีนเดียว

เมื่อการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าว  $F_2$  จำนวน 250 ต้น ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 3:1 (R:S) จึงวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานในอัตราส่วน 15:1 (R:S) ซึ่งบ่งชี้ว่ามียีนที่ควบคุมความต้านทานโรคไหม้มากกว่า 1 ยีน จากผลการทดลองพบว่าการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้เป็นไปตามอัตราส่วน 15:1 (R:S) โดยมีค่า P เท่ากับ 0.87 หรือ  $0.90 < P < 0.95$  เป็นไปได้ว่าลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ห้วย (GS19769) ถูกควบคุมด้วยยีนหลักที่เป็นยีนเด่นจำนวน 2 ยีน (2 major dominantly resistant genes) ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Huang *et al.* (2011) วิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากร  $F_2$  จำนวน 378 ต้น ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวพันธุ์ Xiangzi3150 และ CO39 ทดสอบการเกิดโรคด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ สายพันธุ์ (race) ZC11 ไอโซเลท 193-1-1 ในประเทศจีน วิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ พบมีการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้เป็นไปตามอัตราส่วน 15:1 (R:S) แสดงว่ามียีนต้านทานโรคไหม้ที่ควบคุมความต้านทานมากกว่า 1 ยีน และวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมาย microsatellite จัดกลุ่มของเครื่องหมายและหาระยะทางระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้ พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-47* และ *Pi-48* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 11 และ 12 ตามลำดับ

### 5.3.3 การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ( $F_2$ ) และแผนที่ตั้งตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้จากเปอร์เซ็นต์ recombination

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการคัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้ จำนวน 66 เครื่องหมาย ซึ่งคิดเป็น 28.44 เปอร์เซ็นต์ของเครื่องหมายทั้งหมด นำมาคัดเลือกเครื่องหมาย microsatellite สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) ซึ่งเป็นการคัดเลือกเครื่องหมายที่มีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ที่สนใจ ด้วยการผสมรวมดีเอ็นเอ (bulk) ของประชากรข้าวในกลุ่มที่แสดงความต้านทานและกลุ่มที่แสดงความอ่อนแอ การคัดเลือกเครื่องหมายด้วยวิธี BSA เป็นวิธีที่นำมาใช้เพื่อลดระยะเวลาและประหยัดค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานวิจัย ผลการคัดเลือกด้วยวิธี BSA พบเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ชัดเจนจำนวน 3 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM125, RM144 และ RM224 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 7, 11 และ 11 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบเครื่องหมาย RM247 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 12 แต่พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้เฉพาะในประชากร  $F_2T_1$  เท่านั้น

จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าว  $F_2$  ทั้งหมด 250 ต้น ด้วยเครื่องหมาย RM144, RM224 และ RM125 พบว่าการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้เป็นไปตามอัตราส่วน 1:2:1 (B:H:A) เมื่อคำนวณการเกิด recombination เพื่อสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ พบยีนต้านทาน 1 ตำแหน่งบนโครโมโซม 11 มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM144 และ RM224 จากผลของการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ด้วยการทดสอบการเกิดโรคในประชากรข้าว  $F_2$  ทั้งหมด 250 ต้น ที่พบว่าการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้เป็นไปตามอัตราส่วน 15:1 (R:S) เป็นไปได้ว่าลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ห้วย (GS19769) ถูกควบคุมด้วยยีนหลักที่เป็นยีนเด่นจำนวน 2 ยีน (2 major dominantly resistant genes) ดังนั้นเพื่อค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ที่ควบคุมความต้านทานในข้าวพันธุ์ห้วย (GS19769) จึงคัดเลือกเครื่องหมายที่มีตำแหน่งของเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 7 จำนวน 2 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM11 และ RM1132 เครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 12 จำนวน 2 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM1261 และ RM235 และเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 11 จำนวน 3 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM287, RM5926 และ RM6094 นำมาวิเคราะห์การกระจายตัวในประชากร 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจน พบการเกิดโรคที่ระดับ 5 และ 6 เนื่องจากเป็นประชากรที่มี phenotype ที่ถูกต้องแน่นอน จึงเป็นประชากรที่เหมาะสมสำหรับนำมาวิเคราะห์เพื่อระบุตำแหน่งที่ตั้งของยีนต้านทานโรคไหม้ในการศึกษานี้ เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิด recombination พบว่าเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 7 ได้แก่ เครื่องหมาย RM125, RM11 และ RM1132 เครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 11 ได้แก่ เครื่องหมาย RM287 เครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 12 ได้แก่ เครื่องหมาย RM247, RM1261 และ RM235 ทั้ง 7 เครื่องหมายไม่มีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ ในขณะที่ เครื่องหมาย RM144, RM224, RM6094 และ RM5926 พบว่ามีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ ซึ่งตำแหน่งที่ตั้งของเครื่องหมายอยู่บนโครโมโซมที่ 11 จากผลการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ทั้งหมด ช่วยระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ที่ควบคุมความต้านทานโรคไหม้ในการศึกษานี้ โดยพบว่ายีนต้านทานโรคไหม้ 1 ตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 11 และมีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM144, RM224, RM5926 และ RM6094

#### 5.3.4 แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้

จากการวาดแผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเปอร์เซ็นต์ recombination ของยีนต้านทานโรคไหม้ และเปอร์เซ็นต์ recombination ระหว่างแต่ละคู่ของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องหมาย สามารถระบุถึงตำแหน่งที่ตั้งของยีนต้านทานโรคไหม้และระยะห่างระหว่างเครื่องหมายได้ ซึ่งผลที่ได้มีความแตกต่างกันเล็กน้อย เนื่องจากการสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MAPMAKER มีการจัดกลุ่มของเครื่องหมายด้วยค่า logarithm of odds (LOD) =3.0 ซึ่งหมายถึงโอกาสที่เครื่องหมายที่ถูกจัดกลุ่มอยู่ด้วยกันจะไม่มี ความเชื่อมโยงกัน เท่ากับ 0.01 หรือ 1 ใน 1000 แสดงให้เห็นว่าการจัดกลุ่มของเครื่องหมายมีความละเอียดมากวิเคราะห์ความเชื่อมโยง 1000 ครั้ง มีเพียง 1 ครั้งที่อาจพบว่าเครื่องหมายไม่มีความเชื่อมโยงกัน เครื่องหมายที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือ เครื่องหมายที่มีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้และมีระยะห่างจากยีนน้อยกว่า 50 cM ซึ่งได้แก่ เครื่องหมาย RM144, RM224, RM5926 และ RM6094 การจัดเรียงตัวของแต่ละเครื่องหมายบน โครโมโซม เลือกผลการคำนวณที่แสดงค่า likelihood ที่สูงที่สุด คือ เท่ากับ 0.00 และการคำนวณระยะห่างของเครื่องหมายด้วย Kosambi function โปรแกรมมีคำสั่ง ripple เพื่อใช้ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับการเรียงตัวของเครื่องหมาย และมีคำสั่ง error detection on เพื่อใช้ตรวจสอบความผิดพลาดที่อาจเกิดจากค่า genotype ของประชากร ดังนั้นการสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ โดยใช้โปรแกรม MAPMAKER จึงมีความละเอียดและแม่นยำกว่าการคำนวณเปอร์เซ็นต์ recombination

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องหมาย RM144 (Nguyen *et al.*, 2005) และยีน *Xa35(t)* มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM144 โดยมีระยะห่าง 1.8 cM (Guo *et al.*, 2010) เครื่องหมาย RM144 ยังมีความเชื่อมโยงกับยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown plant hopper, BPH) (Sana *et al.*, 2004) และนอกจากนี้เครื่องหมาย RM144 ยังมีความเชื่อมโยงกับยีนที่ควบคุมลักษณะอื่นๆ เช่น ยีน *qCTP11* ซึ่งเป็นยีน QTL ที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณของความทนต่ออากาศหนาวเย็น (Baruah *et al.*, 2009) ยีน *tgw11* ซึ่งเป็นยีน QTL ที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณของน้ำหนักเมล็ด (Oh *et al.*, 2011) ยีน *qGT-11* ซึ่งเป็นยีน QTL ที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณของคุณภาพเมล็ดข้าวมีตำแหน่งของยีนอยู่ระหว่างเครื่องหมาย RM144 และ RM1341 (Sabouri, 2009) แม้ว่าบริเวณใกล้เคียงเคยมีการพบยีนต้านทานโรคไหม้ แต่ข้อมูลในปัจจุบันยังไม่สามารถยืนยันได้ว่ายีนที่ค้นพบในงานวิจัยนี้เป็นยีนเดียวกับที่เคยรายงานไว้หรือไม่ งานวิจัยนี้จึงนับว่าเป็นการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ยีนใหม่ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 6

### สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

#### 6.1 ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

##### 6.1.1 ระดับชาติ จำนวน 1 เรื่อง

- (1) เพ็ญนภา ตันเชียน ธานี ศรีวงศ์ชัย และ นางลักษณ์ เกรินทวงศ์. ๒๕๕๗. วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์. หน้า ๔๐๐-๔๐๖ ใน เรื่องตีพิมพ์การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ ๕๒ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เล่มที่ ๑ สาขาพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ, ๔-๗ กุมภาพันธ์ ๒๕๕๗.

##### 6.1.2 ระดับนานาชาติ จำนวน 3 เรื่อง

- (2) 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.
- (3) Pramrit, S. and Parinthawong, N. 2015. Identification of blast resistance gene in Yang Mawng variety of Thai indigenous rice. page 309-312 *In Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Agricultural Technology*. July 1-3, 2015, A-One The Royal Cruise Hotel, Pattaya, Thailand. (Proceeding-Poster)
- (4) 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(02): 278-287.

#### 6.2 การร่วมประชุมวิชาการ

##### 6.2.1 ระดับชาติ จำนวน 1 เรื่อง

- (5) เพ็ญนภา ตันเชียน ธานี ศรีวงศ์ชัย และ นางลักษณ์ เกรินทวงศ์. ๒๕๕๗. วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ ๕๒ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ, ๔-๗ กุมภาพันธ์ ๒๕๕๗.

##### 6.2.2 ระดับนานาชาติ จำนวน 3 เรื่อง

- (6) Parinthawong, N., Tansian, P. and Sreewongchai, T. 2014. Genetic Mapping of *Oryza sativa* Resistant Gene Corresponding to Leaf Blast Disease in Landrace Rice Cultivars 'GS19769'. *International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*. July 6-10, 2014, Rhodes, Greece. (Abstract-Poster)
- (7) Parinthawong, N., Pramrit, S. and Sreewongchai, T. 2014. Marker assisted selection of gene resistance to leaf blast disease in Thai landrace rice. *The 5<sup>th</sup> Asian Conference on Plant Pathology*. November 3-6, 2014, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand. (Abstract-Poster)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- (8) Pramrit, S. and Parinthawong, N. 2015. Identification of blast resistance gene in Yang Mawng variety of Thai indigenous rice. The 2<sup>nd</sup> International Symposium on Agricultural Technology. July 1-3, 2015, A-One The Royal Cruise Hotel, Pattaya, Thailand. (Proceeding-Poster)

### 6.3 การผลิตบัณฑิต

#### 6.3.1 ระดับปริญญาโท จำนวน 2 คน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวเพ็ญภา ตันเชียน
หลักสูตร	ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
ปีที่จบ	พ.ศ. 2557
หัวข้อวิทยานิพนธ์	พันธุกรรมควบคุมลักษณะและการระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย (KMITL-2014-AG-M-101-168)
ชื่อ-นามสกุล	นางสาวศิริพร เปรมฤทธิ์
หลักสูตร	ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
ปีที่จบ	กำลังศึกษา
หัวข้อวิทยานิพนธ์	.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บรรณานุกรม

- กฤตกิตติศักดิ์ ไพโรจน์จิตต์ อิงออน สีแก้ว ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ ธาณี ศรีวงศ์ชัย และ สุรีพร เกตุงาม. 2554. การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9, Pi36, Pigm(t)* ในข้าวพื้นเมืองไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ. *Thai Journal of Genetics* 4(1): 52-62.
- จุฑาทพร แสงประจักษ์. 2555. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ข้าว. *แก่นเกษตร* 40: 299-308.
- ฉวีวรรณ วุฒิญาโณ. 2543. เอกสารวิชาการพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทย. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร. 215 หน้า.
- ดำเนิน กะละดี. 2541. เทคโนโลยีการปรับปรุงพันธุ์พืช. เชียงใหม่ : มิ่งเมือง. 256 หน้า.
- บุญรัตน์ จงดี สุรพงษ์ สาครรงค์ พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ ดวงใจ สุริยาอรุณโรจน์ และ จิระพงศ์ ใจรินทร์. 2548. ข้าวหอมสายพันธุ์ใหม่ต้านทานโรคไหม้ IR77924-62-71-1-2. หน้า 13-36. ใน การประชุมทางวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว. นครนายก.
- บุญหงส์ จงคิด. 2549. ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 184 หน้า.
- ปิยะดา ต้นตสวัสดิ์. 2554. การปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ต้านทานศัตรูพืช. นครราชสีมา : โคราชมาร์เก็ตติ้ง แอนด์โปรดักส์ซัน. 197 หน้า.
- พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ วราพงษ์ ชมาฤกษ์ จิระพงศ์ ใจรินทร์ อุไรวรรณ คชสถิต อนุชาติ คชสถิต บุญรัตน์ จงดี สมใจ สาลีโท วีระศักดิ์ หอมสมบัติ อัธราพร ณ ลำปาง เนินพลับ และ พันนิภา ยาใจ. 2554. ความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้กับการพัฒนาข้าวต้านทานโรคไหม้. หน้า 249-266. ใน การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวประจำปี 2554. กรุงเทพฯ: โรงแรมอมารี แอร์พอร์ต.
- พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ พะยอม โคเบลลี อัธราพร ณ ลำปาง เนินพลับ อนุอมจิตร ฤทธิมนตรี กุลชานา เกตุสุพรรณ ชนสิริน กลิ่นมณี และ สงวน เทียงดีฤทธิ. 2550. การตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทย. *วารสารวิชาการข้าว* 1(1): 52-64.
- พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2548. โรคไหม้ข้าว : ความหลากหลายและแนวทางการพัฒนาข้าวต้านทานโรคไหม้. อุบลราชธานี: กรมวิชาการเกษตร. 61 หน้า.
- เมทินี กลัดมูข นิตยศรี แสงเดือน และ วิภา หงษ์ตระกูล. 2552. การตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทย. *Thai Journal of Genetics* 2(1): 36-43.
- วิชา ธิติประเสริฐ และ คณะสถาบันวิจัยข้าว สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ กรมวิชาการเกษตร. 2544. ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์: ข้าว. กรุงเทพฯ : ชุมชุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด. 682 หน้า.
- ศิริภา กออินทร์ศักดิ์ ธีรยุทธ ตูจินดา และ ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์. 2552. การค้นหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบไมโครแซทเทล-ไลท์. หน้า 1-6. ใน การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 35. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ศรีสวัสดิ์ ชันทอง ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ และ สุรีพร เกตุงาม. 2553. โรคไหม้และการปรับปรุงข้าวต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก. *Thai Journal of Genetics* 3(2): 106-119.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สงกรานต์ จิตรกร. 2544. ข้าวกับวิถีชีวิตคนไทย. หน้า 13-28. ใน วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับข้าวไทย. กรุงเทพฯ:สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- สงกรานต์ จิตรกร และ บริบูรณ์ สมฤทธิ์. 2544. พัฒนาการพันธุ์ข้าวไทย. หน้า 29-76. ใน วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับข้าวไทย. กรุงเทพฯ:สำนักพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- สมใจ สาลีโท และ คณะทำงานโครงการวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวนาข้าวฝนภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือตอนบน. 2554. KKN97057-7-1-1-6-4-NKI-1-1: ข้าวเหนียวหอมอายุเบาต้านทานต่อโรคไหม้สำหรับนาข้าวฝนภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. หน้า 26-24. ใน การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวครั้งที่ 2 ปี 2554. กรุงเทพฯ: ณ โรงแรมอมารีแอร์พอร์ต ดอนเมือง.
- สมใจ สาลีโท และ คณะทำงานโครงการวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวนาข้าวฝนภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือตอนบน. 2553. RGD334-3-11-1-1-147-1KPS-3 : ข้าวเหนียวต้านทานโรคไหม้สายพันธุ์ดีเด่นสำหรับนาข้าวฝนภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. หน้า 185-198. ใน เอกสารประกอบการประชุมวิชาการข้าว เนื่องในโอกาสวันข้าวและชาวนาแห่งชาติ ปี 2553. กรุงเทพฯ.
- สมทรง โชติชื่น. 2550. “การอนุรักษ์และใช้ประโยชน์เชื้อพันธุกรรมข้าว : อดีต ปัจจุบัน และอนาคต.” หน้า 262-274. ใน การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวประจำปี 2550. ปทุมธานี : พิพิธภัณฑการเกษตรเฉลิมพระเกียรติฯ.
- สมทรง โชติชื่น เกษม สุนทรอาจารย์ อภิชาติ ลาวัญย์ประเสริฐ วาสนา พันธุ์เพ็ง กัญญา เชื้อพันธุ์ สุนันทาวงศ์ปิยชน วัชรวิวัฒน์ อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ นลินี เจียงวรรณระ พิชะพันธ์ ศรีคุ้ม รณชัย ช่างศรี เปรมฤดี ปินทยา ปรีดา เสียงใหญ่ พันนิภา ยาใจ วันชัย โรจนหัสตินทร์ สุวัฒน์ เจียรระคมั่น และ ดวงใจ สุริยาอรุณโรจน์. 2554. แหล่งพันธุกรรมข้าวเพื่อการใช้ประโยชน์. หน้า 88-100. ใน การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวประจำปี 2554. กรุงเทพฯ: โรงแรมอมารี แอร์พอร์ต.
- สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2556. สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้ม ปี 2557. ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร [Online]. Available: [http://www.oae.go.th/download/journal/trends\\_FEB2557.pdf](http://www.oae.go.th/download/journal/trends_FEB2557.pdf)
- สำนักงานวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. 2557. พันธุ์ข้าว. องค์ความรู้เรื่องข้าว. [Online]. Available : <http://www.brrd.in.th/rkb/varieties/index.php.htm>.
- สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. 2553. ข้าวขาวดอกมะลิ 105. กรุงเทพฯ: กรมการข้าว. 45 หน้า
- สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว. 2552. องค์ความรู้ด้านศัตรูข้าว. กรุงเทพฯ : กรมการข้าว.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 269 หน้า.
- สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 5(2): 37-50.
- เสาวลักษณ์ อัคราช ประภา ศรีพิจิตต์ และ ธานี ศรีวงศ์ชัย. 2554. การวิเคราะห์จัดกลุ่มความต้านทานเชื้อโรคไหม้ของข้าวพันธุ์ปรับปรุงด้วยเชื้อที่เก็บรวบรวมใหม่. หน้า 581-588. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.
- อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ และ พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2552. ความหลากหลายของ pathotype ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว ในปี 2550/51 และยืนต้านทานกว้างขวางที่เป็น
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ประโยชน์ในภาคเหนือตอนล่าง. หน้า 208-219. ใน การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวประจำปี 2552. ชลบุรี: ณ โรงแรมซีบีซี จอมเทียนรีสอร์ท พัทยา.
- อิงออน สีแก้ว ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ และ สุรีพร เกตุงาม. 2553. การค้นหายีนต้านทานต่อโรคไหม้ในข้าว (*Pi-d2*) ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยด้วยเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น 15(2): 123-131.
- อภิชาติ เนินพลับ อภิชาติ วรรณวิจิตร อธิยุทธ ตูจันดา ปัทมา ศิณิธัญญา สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง แสงชัย ศรีประโคน และ ชนาภานต์ งามพรหม. 2549. การทำแผนที่ลักษณะทางปริมาณของความต้านทานต่อโรคใบไหม้และคอรวงไหม้ในประชากรกลุ่มผสมจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวเจ้าหอมนิล. หน้า 79-84. ใน การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวประจำปี 2549. เพชรบุรี: ณ โรงแรมลองบีช ชะอำ.
- อนุชาติ คชสถิต และ คณะทำงานโครงการวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวนาสวนน่าน้ำฝนภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระยะที่ 2. 2556. UBN03007-47-7-26-35-19: ข้าวเจ้าสายพันธุ์ดีเด่นอายุเบาต้านทานโรคไหม้. หน้า 56-71. ใน การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองครั้งที่ 30 ปี 2556. กรุงเทพฯ: โรงแรมมารวยการ์เด้น.
- Ahn, S.N., Y.K. Kim, H.C. Hong, S.S. Han, S.J. Kwon, H.C. Choi, H.P. Moon and S.R. McCouch. 2000. Molecular mapping of a new gene for resistance to rice blast (*Pyricularia grisea* Sacc.). *Euphytica* 116: 17-22.
- Baruah, A.R., N.I. Oka, M. Adachi, Y. Oguma, Y. Tokizono, K. Onishi and Y. Sano. 2009. Cold tolerance at the early growth stage in wild and cultivated rice. *Euphytica* 165: 459-470.
- Benbouza, H., J.M. Jacquemin, J.P. Baudoin and G. Mergeai. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 10(2): 77-81.
- Bonman, J.M. and D.J. Mackill. 1988. Durable resistance to rice blast disease. *Oryza* 25(2): 103-110.
- Bryan, G.T., K.S. Wu, L. Farrall, H.P. Hershey, S.A. McAdams, K.N. Faulk, G.K. Donaldson, R. Tarchini and B. Valent. 2000. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell* 12(11): 2033-2046.
- Chen, J., R. Henny, P. Devanand and C. Chao. 2006. AFLP analysis of nephthytis (*Syngonium podophyllum* Schott) selected from somaclonal variants. *Plant Cell Report* 24(12): 743-749.
- Crawford, M.S., F.G. Chumley, C.G. Weaver and B. Valent. 1986. Characterization of the heterokaryotic and vegetative diploid phases of *Magnaporthe grisea*. *Genetics* 114: 1111-1129.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Dean, R.A., N.J. Talbot, D.J. Ebbole, M.L. Farman, T.K. Mitchell, M.J. Orbach, M. Thon, R. Kulkarni, J.R. Xu, H. Pan, N.D. Read, Y.H. Lee, I. Carbone, D. Brown, Y.Y. Oh, N. Donofrio, J.S. Jeong, D.M. Soanes, S. Djonovic, E. Kolomiets, C. Rehmeyer, W. Li, M. Harding, S. Kim, M.H. Lebrun, H. Bohnert, S. Coughlan, J. Butler, S. Calvo, L.J. Ma, R. Nicol, S. Purcell, C. Nusbaum, J.E. Galagan and B.W. Blrren. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* 434: 980-986.
- Disthaporn, S. 1994. Current rice blast epidemics and their management in Thailand. pp. 333-442. *In* Zeigler, R.S., S.A. Leong and P.S. Teng (eds.). *Rice Blast Disease*. U.K.: CAB International.
- Fjellstrom, R., C.A.C. Bormans, A.M. McClung, M.A. Marchetti, A.R. Shank and W.D. Park. 2004. Development of DNA markers suitable for marker assisted selection of three *Pi* genes conferring resistance to multiple *Pyricularia grisea* pathotypes. *Crop Science Society of America* 44: 1790-1798.
- Fuentes, J.L., F.J. Correa-Victoria, F. Escobar, G. Prado, G. Aricapa, M.C. Duque and J. Tohme. 2008. Identification of microsatellite markers linked to the blast resistance gene *Pi-1(t)* in rice. *Euphytica* 160: 295-304.
- Genovesi, A.D. and C.W. Magill. 1976. Heterokaryosis and parasexuality in *Pyricularia oryzae* Cavara. *Canadian Journal of Microbiology* 22(4): 531-536.
- Guo, S.B., D.P. Zhang and X.H. Lin. 2010. Identification and mapping of a novel bacterial blight resistance gene *Xa35(t)* originated from *Oryza minuta*. *Scientia Agricultura Sinica* 43(13): 2611-2618.
- Hammond-Kosack, K.E. and J.D.G. Jonas. 1997. Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 575-607.
- He, X.Y., X.Q. Liu, L. Wang, F. Lin, Y.S. Ckeng, Z.M. Chen, Y.P. Liao and Q.H. Pan. 2012. Identification of the novel recessive gene *Pi55(t)* conferring resistance to *Magnaporthe oryzae*. *Science China Life Sciences* 55: 141-149.
- Howard, R.J. and M.A. Ferrari. 1989. Role of melanin in appressorium function. *Experimental Mycology* 13: 403-418.
- Huang, H., L. Huang, G. Feng, S. Wang, Y. Wang, J. Liu, N. Jiang, W. Yan, L. Xu, P. Sun, Z. Li, S. Pan, X. Liu, Y. Xiao, E. Liu, L. Dai and G.L. Wang. 2011. Molecular mapping of the new blast resistance genes *Pi47* and *Pi48* in the durably resistant local rice cultivar Xiangzi3150. *Phytopathology* 101: 620-626.
- Jia, Y., F.N. Lee and A. McClung. 2009. Determination of resistance spectra of the *Pi-ta* and *Pi-k* genes to U.S. races of *Magnaporthe oryzae* causing rice blast in a recombinant inbred line population. *Plant Disease* 93:639-644.
- Koide, Y., M.J. Telebanco-Yanoria, F.D. Pen, Y. Fukuta and N. Kobayashi. 2011. Characterization of rice blast isolates by the differential system and their
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- application for mapping a resistance gene, *Pi19(t)*. *Journal of Phytopathology* 159: 85–93.
- Li, J., D. Li, Y. Sun, and M. Xu. 2012. Rice blast resistance gene *Pi1* identified by marker in 173 Yunnan rice landraces. *Rice Genomics and Genetics* 3(3): 13-18.
- Lin, F., Y. Liu, L. Wang, X. Liu and Q. Pan. 2007. A high-resolution map of the rice blast resistance gene *Pi15* constructed by sequence ready markers. *Plant Breeding* 126(3): 287–290.
- Lincoln, S.E., M.J. Daly and E.S.Lander. 1993. Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP version 3.0: A tutorial and reference manual. Cambridge: Whitehead Institute for Biomedical Research.
- Liu, X., F. Lin, L. Wang and Q. Pan. 2007. The *in silico* map-based cloning of *Pi36*, a rice coiled-coil–nucleotide binding site–leucine-rich repeat gene that confers race specific resistance to the blast fungus. *Genetics* 176: 2541–2549.
- Liu, S.P., X. Li, C.Y. Wang, X.H. Li and Y.Q. He. 2003. Improvement of resistance to rice blast in Zhenshan 97 by molecular marker-aided selection. *Acta Botanica Sinica* 45(11): 1346-1350.
- Matsumoto, C., K. Kageyama, H. Suga and M. Hyakumachi. 1999. Phylogenetic relationships of *Pythium* species based on ITS and 5.8S sequences of the ribosomal DNA. *Mycoscience* 40(4): 321-331.
- Mekwatanakarn, P., W. Kositratana, T. Phromraksa and R.S. Zeigler. 1999. Sexually fertile *Magnaporthe grisea* rice pathogens in Thailand. *Plant Disease* 83: 939-943.
- Morgan, T.H. 2008. Genetic recombination and gene mapping. *Nature Education* 1(1): 205.
- Nagato, Y. and A. Yoshimura. 1998. Report of the committee on gene symbolization, nomenclature and linkage group. *Rice Genetics Newsletter* 15: 13-74.
- Nguyen, V.P., T.L. Nguyen and C.B. Bui. 2005. STS and microsatellite marker-assisted selection for bacterial blight resistance in rice, *Oryza sativa* L. *Omonrice* 13: 18-25.
- Nottingham, J.L. and D. Silué. 1992. Distribution of the mating type alleles in *Magnaporthe grisea* population pathogenic on rice. *Phytopathology* 82: 421-424.
- Oh, J.M., S. Balkunde, P. Yang, D.B. Yoon and S.N. Ahn. 2011. Fine mapping of grain weight QTL, *tgw11* using near isogenic lines from a cross between *Oryza sativa* and *O. grandiglumis*. *Genes and Genomics* 33: 259-265.
- Ou, S.H. 1985. *Rice Diseases*. Great Britain: The Cambrian New Ltd. 380 p.
- Qu, S., G. Liu, B. Zhou, M. Bellizzi, L.R. Zeng, L.Y. Dai, B. Han and G.L. Wang. 2006. The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes an NBS-LRR protein and is a member of a multigene family in rice. *Genetics* 172(3): 1901–1914.

- Prasad, M.S., B.A. Kanthi, S.M. Balachandran, M. Seshumadhav, K.M. Mohan and B.C. Viraktamath. 2009. Molecular mapping of rice blast resistance gene *Pi-1(t)* in the elite indica variety *Samba mahsuri*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 1765–1769.
- Roumen, E., M. Levy and J.L. Notteghem. 1997. Characterization of the European pathogen population of *Magnaporthe grisea* by DNA finger printing and pathotype analysis. *European Journal of Plant Pathology* 103: 365-371.
- RoyChowdhury, M., Y. Jia, A.K. Jackson, M.H. Jia, R.G. Fjellstrom and R. Cartwright. 2012. Analysis of rice blast resistance gene *Pi-z* in rice germplasm using pathogenicity assays and DNA markers. *Euphytica* 184: 35-46.
- Sabouri, H. 2009. QTL detection of rice grain quality traits by microsatellite markers using an indica rice (*Oryza sativa* L.) combination. *Journal of Genetics* 88(1): 81-85.
- Sabouri, H., A. Sabouri, M.R. Jafarzadeh and M. Mollashah. 2011. Detection of QTLs controlling field blast resistance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Omics Journal* 4(1): 1-5.
- Salih, A., T. Sreewongchai, P. Sripichitt and N. Parinthawong. 2013. Identification of blast resistant varieties from landrace, improved and wild species of rice. *Kasetsart Journal (Natural Science)* 47: 1-7.
- Sallaud, C., M. Lorieux, E. Roumen, D. Tharreau, R. Berruyer, P. Svestasrani, O. Garsmeur, A. Ghesquiere and J.L. Notteghem. 2003. Identification of five new blast resistance genes in the highly blast-resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 794-803.
- Sana, E.A., J.E. Hernandez and D.S. Brar. 2004. Molecular tagging of genes for brown planthopper resistance introgressed from the tetraploid wild species *Oryza minuta* into rice (*O. sativa*). *Philippine Journal of Crop Science* 29:59.
- Sharma, T.R., M.S. Madhav and B.K. Singh. 2005. High-resolution mapping, cloning and molecular characterization of the *Pi-kh* gene of rice, which confers resistance to *Magnaporthe grisea*. *Molecular Genetics and Genomics* 274(6): 569-578.
- Shi, X., J. Wang, Y. Bao, P. Li, L. Xie, J. Huang and H. Zhang. 2010. Identification of the quantitative trait loci in japonica rice landrace Heikezijing responsible for broad-spectrum resistance to rice blast. *Phytopathology* 100: 822-829.
- Shi, Z. and H. Leung. 1995. Genetic analysis of sporulation in *Magnaporthe grisea* by chemical and insertional mutagenesis. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 8: 949-959.
- Sirithunya, P., T. Sreewongchai, S. Sriprakhon, T. Toojinda, S. Pimpisithavorn, C. Kosawang and P. Smitamana. 2008. Assessment of genetic diversity in Thai isolates of

- Pyricularia grisea* by random amplification of polymorphic DNA. *Phytopathology* 156: 196-204.
- Sirithunya, P., S. Tragoonrung, A. Vanavichit, N. Pa-in, C. Vongsaprom and T. Toojinda. 2002. Quantitative trait loci associated with leaf and neck blast resistance in recombinant inbred line population of rice (*Oryza sativa*). *DNA Research* 9: 79-88.
- Soubabere, O., V. Jorge, J.L. Notteghem and M.H. Tharreau. 2001. Sequence characterized amplified region markers for the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecular Ecology Notes* 1: 19-21.
- Valent, B. and F.G. Chumley. 1994. Avirulence genes and mechanisms of genetic instability in the rice blast fungus. pp. 111-134. In Zeigler, R.S., S.A. Leong and P.S. Teng (eds.). *Rice Blast Disease*. U.K.: CAB International.
- Voorrips, R.E. 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *The Journal of Heredity* 14:77-78.
- Wang, C., M. Tan, X. Xu, G. Wen, D. Zhang and X. Lin. 2003. Localizing the bacterial blight resistance gene, *Xa22(t)*, to a 100-kilobase bacterial artificial chromosome. *Phytopathology* 93(10): 1250-1262.
- Wheeler, M.H. and A.A. Bell. 1988. Melanins and their importance in pathogenic fungi. *Current Topics in Medical Mycology* 2: 338-387.
- Wu, J.L., P.K. Sinha, M. Varivar, K.L. Zheng, J.E. Leach, B. Courtois and H. Leung. 2004. Association between molecular markers and blast resistance in an advanced backcross population of rice. *Theoretical and Applied Genetics* 108(6): 1024-1032.
- Yu, Z., D.J. Mackill, J.M. Bonman and S.D. Tanksley. 1996. RFLP tagging of blast resistance genes in rice. pp. 451-458. *In Proceedings of the Second International Rice Genetics Symposium*. Philippines.
- Zeng, X.S., X.F. Yang, Z.H. Zhao, F. Lin, L. Wang and Q.H. Pan. 2011. Characterization and fine mapping of the rice blast resistance gene *Pia*. *Science China Life Sciences* 54: 372-378.
- Zheng, Y., G. Zhang, F. Lin, Z. Wan, G. Jin, L. Yang, Y. Wang, X. Chen, Z. Xu, X. Zhao, H. Wang, J. Lu, G. Lu and W. Wu. 2008. Development of microsatellite markers and construction of genetic map in rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology* 45: 1340-1347.
- Zhou, E., Y. Jia, F.N. Lee, M. Lin, M. Jia, J.C. Correll and R.D. Cartwright. 2005. Evidence of the instability of a telomeric *Magnaporthe grisea* virulence gene *AVR-Pita* in the US. *Phytopathology* 95(6): 118.

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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### เอกสารหลักฐานอ้างอิงของผลผลิต

- (1) เพ็ญญา ตันเชียน ธานี ศรีวงศ์ชัย และ นางลักษณ์ เกรินทวงศ์. ๒๕๕๗. วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์. หน้า ๔๐๐-๔๐๖ ใน เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ ๕๒ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เล่มที่ ๑ สาขาพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ, ๔-๗ กุมภาพันธ์ ๒๕๕๗.
- (2) 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.
- (3) Pramrit, S. and Parinthawong, N. 2015. Identification of blast resistance gene in Yang Mawng variety of Thai indigenous rice. page 309-312 *In Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Agricultural Technology*. July 1-3, 2015, A-One The Royal Cruise Hotel, Pattaya, Thailand. (Proceeding-Poster)
- (4) 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(02): 278-287.
- (5) เพ็ญญา ตันเชียน ธานี ศรีวงศ์ชัย และ นางลักษณ์ เกรินทวงศ์. ๒๕๕๗. วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ ๕๒ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ, ๔-๗ กุมภาพันธ์ ๒๕๕๗.
- (6) Parinthawong, N., Tansian, P. and Sreewongchai, T. 2014. Genetic Mapping of *Oryza sativa* Resistant Gene Corresponding to Leaf Blast Disease in Landrace Rice Cultivars ‘GS19769’. *International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*. July 6-10, 2014, Rhodes, Greece. (Abstract-Poster)
- (7) Parinthawong, N., Pramrit, S. and Sreewongchai, T. 2014. Marker assisted selection of gene resistance to leaf blast disease in Thai landrace rice. *The 5<sup>th</sup> Asian Conference on Plant Pathology*. November 3-6, 2014, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand. (Abstract-Poster)
- (8) Pramrit, S. and Parinthawong, N. 2015. Identification of blast resistance gene in Yang Mawng variety of Thai indigenous rice. *The 2<sup>nd</sup> International Symposium on Agricultural Technology*. July 1-3, 2015, A-One The Royal Cruise Hotel, Pattaya, Thailand. (Proceeding-Poster)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทย  
โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

Genetic diversity analysis of rice blast pathogen in Thailand  
using *Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) markers

เพ็ญภา ดันเชียน<sup>1,2</sup>, ธาณี ศรีวงศ์ชัย<sup>3</sup> และ นงลักษณ์ เภรินทวงศ์<sup>1</sup>

Pennapar Tansian<sup>1,2</sup>, Tanee Sreewongchai<sup>3</sup> and Nonglak Parinthawong<sup>1</sup>

บทคัดย่อ

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ (*Pyricularia grisea*) 19 ไอโซเลท ซึ่งเก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทย ด้วยเครื่องหมาย *Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) 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 และพบเชื้อจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือแยกออกเป็นเชื้อเดี่ยว ในกลุ่ม 3 และ 4 ความสัมพันธ์ของพันธุกรรมเชื้อไม่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มีการระบาดของโรคไหม้ และบริเวณที่มีการระบาดของโรคในจังหวัดเดียวกันมีจำนวนเชื้อเข้าทำลายข้าวมากกว่า 1 ไอโซเลท

ABSTRACT

Nineteen isolates of rice blast pathogen (*Pyricularia grisea*) were collected from important paddy field of Thailand. All isolates were genetic diversity analyzed using 14 *Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) markers. Polymorphism information content (PIC) value among 19 isolates varied from 0 to 0.8. Cluster analysis using SAHN method separated the population into 4 groups. Group 1 was 73% of the population and included rice blast fungi from North, Northeast and Central parts. Group 2 was 15% and included rice blast fungi from Northeast and South. The rice blast fungi from Northeast were separated as single isolate in group 3 and 4. Relationship of rice blast fungi in each group was not dependent on the area of disease outbreak. The disease outbreak area in the same province was appeared to be infected more than one isolates.

Key words: Rice blast, *Pyricularia grisea*, *Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) markers

e-mail address: tansian\_pp@hotmail.com

<sup>1</sup>สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

<sup>1</sup>Program in Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520

<sup>2</sup>ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

<sup>2</sup>Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

<sup>3</sup>ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ การใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้า ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

<sup>3</sup>Departments of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทนำ

โรคไหม้ของข้าวเป็นโรคที่มีความสำคัญและทำความเสียหายอย่างมากต่อผลผลิตของข้าว เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Pyricularia grisea* Sacc. เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยมีความแปรปรวน และหลากหลายมากกว่าแหล่งปลูกข้าวแหล่งอื่นๆ ของโลก มีความแตกต่างไปตามแหล่งปลูก ฤดูปลูก รวมถึงระยะการเจริญเติบโตของข้าว (Mekwatanakarn *et al.*, 2000) เชื้อรามีการปรับตัวและมีวิวัฒนาการให้สามารถเข้าทำลายพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ได้ (Sreewongchai *et al.*, 2010)

ปัจจุบันมีการศึกษาความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลอย่างกว้างขวาง เนื่องจากผลที่ได้มีความถูกต้องแม่นยำมากกว่าการประเมินจากความรุนแรงและโครงสร้างของเชื้อ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ดีที่สุดเครื่องหมายหนึ่ง เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดี ได้แก่ มีจำนวนและตำแหน่งครอบคลุมทั้งจีโนม มีหลายอัลลีลในโลกลักษณะหนึ่ง ทำให้สามารถตรวจสอบความแตกต่างได้มากกว่าเครื่องหมายชนิดอื่น และสามารถแยกความแตกต่างระหว่างไฮบริดไฮบริดและเฮเทอโรไฮบริดได้ (สุริพร, 2546) เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ของ *Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดย Brondani *et al.* (2000), Kaye *et al.* (2005) และ Zheng *et al.*, (2008) มีตำแหน่งของเครื่องหมายครอบคลุมทั้ง 7 โครโมโซมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ และ Mohan *et al.* (2012) ได้นำเอาเครื่องหมาย MGM นี้ไปใช้เพื่อศึกษาความหลากหลายของประชากรเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในประเทศอินเดีย

การทดลองนี้เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 19 ไอโซเลท ซึ่งเก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทย โดยเลือกใช้เครื่องหมาย MGM จำนวน 14 เครื่องหมาย ข้อมูลที่ได้จะยืนยันความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเชื้อราที่ใช้ในการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองของไทย

## อุปกรณ์และวิธีการ

### สกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเชื้อรา

รวบรวมเชื้อสาเหตุโรคไหม้จากพื้นที่ปลูกข้าวที่มีการระบาดของโรคจำนวน 19 ไอโซเลท (Table 1) ทำการแยกเชื้อให้ได้สปอร์เดี่ยวและเลี้ยงบนอาหาร Rice Flour Agar (RFA) เก็บเชื้อราในรูปเส้นใยแห้งบนกระดาษกรอง ตามวิธีการของ ตามวิธีของ Sirithunya *et al.* (2007) เมื่อต้องการเส้นใย นำกระดาษกรองที่มีเชื้อราแต่ละไอโซเลทวางบนอาหาร RFA ปล่อยให้เชื้อราเจริญนาน 4 วัน ย้ายเชื้อราด้วย cork borer ลงในอาหารเหลว Yeast Extract Glucose (YEG) 2 เปอร์เซ็นต์ เซย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน กรองเอาแต่เส้นใยเชื้อราเพื่อสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีการของ Matsumoto *et al.* (1999)

### เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction)

เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ตามคำแนะนำของ KAPA3G Plant PCR Kits (Kapa Biosystems, USA) ประกอบด้วย 1X KAPA Plant PCR Buffer ที่มีส่วนผสมของ  $MgCl_2$  และ dNTP ไพรเมอร์สำหรับเครื่องหมาย MGM ความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมล เอนไซม์ KAPA Plant DNA Polymerase 1 ยูนิต และดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 10 นาโนกรัม ขั้นตอนในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วย 1) Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที 1 รอบปฏิกิริยา 2) Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 3) Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 4) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 25 รอบปฏิกิริยา 5) Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบปฏิกิริยา 6) Hold ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบปฏิกิริยา

เซลเซียส นาน 20 วินาที 3) Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที 4) Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ทำซ้ำรอบที่ 2-4 จำนวน 40 รอบ และ 5) Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 1 รอบปฏิบัติการ วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ด้วยเทคนิค Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ และ ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วย silver nitrate ตามวิธีการของ Benbouza *et al.* (2006)

Table 1 Nineteen isolates of *P. grisea* and their locations.

Province	Code
Bangkok	BKK55003, BKK55004
Chachoengsao	CCO55002
Ratchaburi	RBR55001, RBR55004
Chaiyaphum	CPM55002, CPM55003
Khon Kaen	KKN61119, KKN7357
Nong Khai	NYK13502
Ubon Ratchathani	UBN11351, UBN195167
Surin	SRN54002
Phitsanulok	THL191, THL84, PLK 1.1, PLK 40.4
Chiang Rai	CRI 43.1
Phatthalung	PL3

การวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อรา

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคใหม่ด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.1 (Rohlf, 2004) โดยใช้สัมประสิทธิ์ความต่าง (dissimilarity) ของ Canberra และจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยวิธี SAHN เพื่อสร้างเป็นแผนภาพแสดงความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคใหม่ วิเคราะห์ค่า polymorphic information content (PIC) เพื่อประเมินคุณสมบัติของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ โดยใช้สูตร

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

โดย  $P_{ij}$  คือ ความถี่ของอัลลีล  $j$  ของ marker  $i$

### ผลการทดลองและวิจารณ์

วิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคใหม่ จำนวน 19 ไอโซเลท ซึ่งเก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทย โดยสุ่มเลือกเครื่องหมาย MGM จำนวน 14 เครื่องหมาย แบ่งเป็นโครโมโซมละ 2 เครื่องหมายจากทั้งหมด 7 โครโมโซม พบ 13 เครื่องหมายสามารถแยกความแตกต่างของพันธุกรรมเชื้อสาเหตุโรคใหม่ได้ และอีก 1 เครื่องหมายไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ (Figure 1) พบเครื่องหมาย MGM มีค่า PIC ไม่ต่างกันเท่า ๆ หงสน อีกทั้งห้ามให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อยู่ระหว่าง 0 ถึง 0.8 แสดงถึงความมีศักยภาพของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในการใช้เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของพันธุกรรมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ (Table 2) จากค่าสัมประสิทธิ์ความต่างที่ 90 เปอร์เซ็นต์ สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้ 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม 1 คิดเป็น 73 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 14 ไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อที่ระบาดบริเวณภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง ประกอบด้วย BKK55003, CC055002, BKK55004, RBR55002, CPM55003, RBR55004, KKN61119, KKN7357, PLK1.1, CRI34.1, PLK40.0, THL84, SRN54002 และ THL191 กลุ่ม 2 คิดเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 3 ไอโซเลท เป็นเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่ระบาดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ของประเทศไทย ประกอบด้วย NK113502, PL3 และ UBN11351 และมีเชื้อสาเหตุโรคไหม้จากบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือแยกออกเป็นเชื้อเดี่ยว ในกลุ่ม 3 และ 4 ได้แก่ UBN195167 และ CPM55002 ตามลำดับ (Figure 2) จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อพบว่าเชื้อสาเหตุโรคไหม้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง กลุ่มความสัมพันธ์ของพันธุกรรมเชื้อไม่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มีการระบาดของโรคไหม้ เชื้อที่มาจากต่างสถานที่กันมีพันธุกรรมคล้ายกัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการกระจายอย่างกว้างขวางในภาคต่างๆ ของประเทศไทย และเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่พบระบาดในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความหลากหลายมากกว่าบริเวณพื้นที่ปลูกข้าวแหล่งอื่น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ พูนศักดิ์ และคณะ (2550) ที่รายงานว่าการระบาดของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ข้าวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อมากที่สุด และในงานวิจัยนี้ยังพบว่าเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่มาจากแหล่งเดียวกันมีพันธุกรรมที่ต่างกัน แสดงว่าบริเวณที่มีการระบาดของโรคในจังหวัดเดียวกันมีจำนวนเชื้อเข้าทำลายข้าวมากกว่า 1 ไอโซเลท สอดคล้องกับงานวิจัยของ เสาวลักษณ์ และคณะ (2554) ที่รายงานว่าการระบาดของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บจากจังหวัดเดียวกัน มีความหลากหลายของระดับความรุนแรงในการก่อโรคไหม้แตกต่างกันไม่สามารรถจัดกลุ่มรวมกันได้ และเชื้อที่เข้าทำลายข้าวจากบริเวณแผลเดียวกันมีมากกว่า 1 เชื้อพันธุ์ (race)

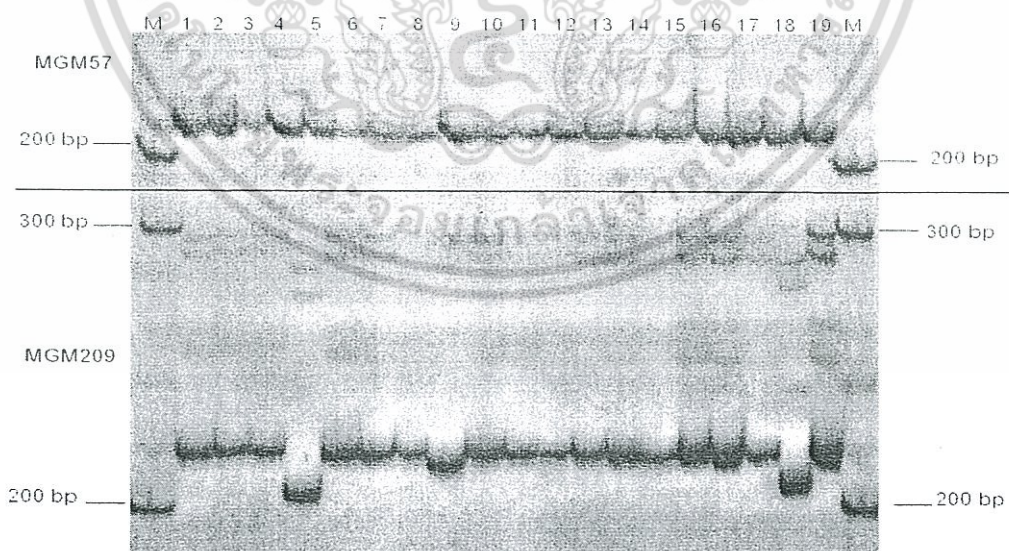


Figure 1 Generated DNA patterns of 19 isolates (1=BKK55003, 2=BKK55004, 3=CCO55002, 4=CPM55002, 5=CPM55003, 6=KKN61119, 7=KKN7357, 8=NK113502, 9=RBR55001, 10=RBR55004,

11= SRN54002, 12=THL191, 13=THL84, 14=CRI34.1, 15=PLK1.1, 16=PLK40.4, 17=PL3, 18=UBN195167 and 19=UBN11351) of *P. grisea* from two MGM markers, M is 20 bp DNA ladder.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 2 Sequence of the MGM marker used in this study and polymorphic information content (PIC) value.

No.	Chr.	Name	Sequence		PIC
			Forward	Reverse	
1	1	MGM446	TTGGGATCTTCGGTAAGACG	GCCGACAAGACTGAATGA	0.101
2	1	MGM35	GTTGAATTACCTTTCGGACTGG	AAGGACTTTGCTCAGACCGTAG	0.803
3	2	MGM185	AATGCTTCGAGGTCCCAGT	GCTTATCGACGGCGTATTTG	0.189
4	2	MGM57	GATACGGATGCGGTAGAGGA	GCCTATTCTGAGCTTCGTG	0.000
5	3	MGM436	GACCTTTATCGGATGCGTGT	CACACAGTGGCCATCTAACG	0.196
6	3	MGM209	TCACCCTCAACTGCAGTCAT	GTTGCCGCTGTTGTTGAATA	0.285
7	4	MGM246	CCGGATGTCACCTACCAACT	CCTTGTTTTCCCCCTGTGTA	0.484
8	4	MGM87	GTCCACCGCTTAAACACTGC	CTCCACTCGCTATGCACGTA	0.285
9	5	MGM119	GGGTCGCGTCAGTGAACATA	ACGGCTTGAACCCAATACAG	0.706
10	5	MGM177	TGACTCGACCTGACATCTGC	TTCCTGGGACTGTTTCATGG	0.196
11	6	MGM400	GGCATTACCCAAGAAGCAAA	CTCGTTGCAGATGGTGATGA	0.101
12	6	MGM269	GATGGCCAGGTCAGCTTTT	ACTCTTTCAGCCATGGAAC	0.640
13	7	MGM282	TTGGCTGGCAAGACAGTTAAT	GGGCTTTGTCTATTCCAGCA	0.562
14	7	MGM286	CGGCTGTGGTTAACGATTT	CCATCAGGATCCATGAACAC	0.488

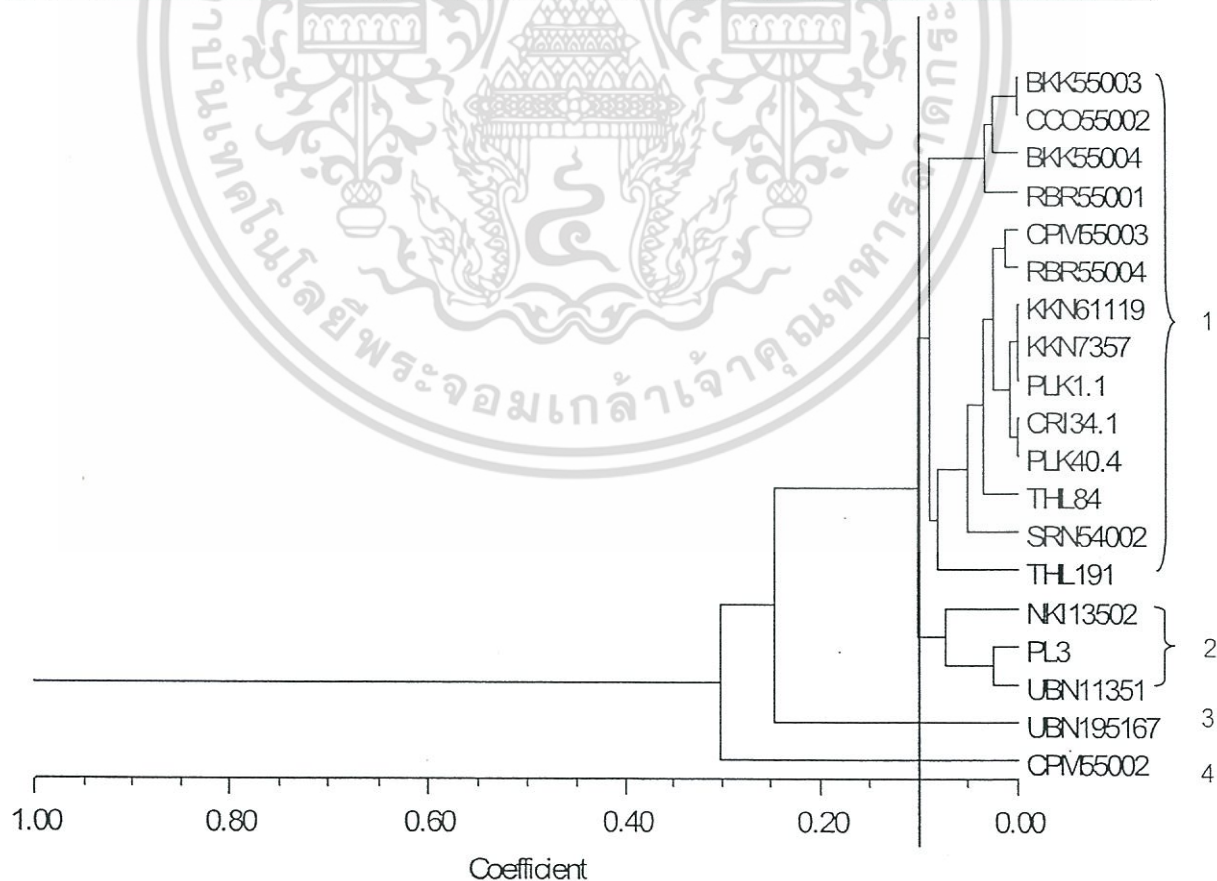


Figure 2 Dendrogram of 19 isolates of *P. grisea* generated by SAHN analysis method from 14 MGM) marker.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สรุป

เครื่องหมาย *Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) เป็นเครื่องหมายที่มีศักยภาพดีและเหมาะสมในการใช้เพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ เชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 19 ไอโซเลท ซึ่งเก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าวที่มีการระบาดของโรคไหม้ในประเทศไทย มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง กลุ่มความสัมพันธ์ของพันธุกรรมเชื้อไม่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มีการระบาดของโรคไหม้ เชื้อมีการกระจายอย่างกว้างขวางในภาคต่างๆ ของประเทศไทย และบริเวณที่มีการระบาดของโรคในจังหวัดเดียวกันมีจำนวนเชื้อเข้าทำลายข้าวมากกว่า 1 ไอโซเลท

## กิติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการค้นหาชนิดพันธุ์โรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* จากแหล่งพันธุกรรมข้าวพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย และได้รับทุนวิจัยจากกองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## เอกสารอ้างอิง

- พูนศักดิ์ เมวัฒนากาญจน์. 2548. โรคไหม้ข้าว: ความหลากหลายและแนวทางการพัฒนาข้าวต้านทานโรคไหม้. ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี กรมวิชาการเกษตร, อุบลราชธานี.
- พูนศักดิ์ เมวัฒนากาญจน์, พะยอม โคเบลี, อัจฉราพร ณ ลำปาง, เนินพลับ, ถนอมจิตรี ฤทธิมนตรี, กุลชญา เกศสุพรรณ, ชนสิริน กลิ่นมณี และสงวน เทียงดีฤทธิ์. 2550. การตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทย. วารสารวิชาการข้าว. 1(1): 52-64.
- สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการ ม.อบ. 5 (2): 37-39.
- เสาวลักษณ์ อัคราช, ประภา ศรีพิจิตต์ และธานี ศรีวงศ์ชัย. 2554. การวิเคราะห์จัดกลุ่มความต้านทานเชื้อโรคไหม้ของข้าวพันธุ์ปรับปรุงด้วยเชื้อที่เก็บรวบรวมใหม่, น. 581-588. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Benbouza, H., J.M. Jacquemin, J.P. Baudoin, and G. Mergeai. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 10(2): 77-81.
- Brondani, C., R.P.V. Brondani, L.R. Garrido and M.E. Ferreira. 2000. Development of microsatellite markers for the genetic analysis of *Magnaporthe grisea*. Genet. Mol. Biol. 23(4): 753-762.
- Kaye, C., J. Milazzo, S. Rozenfeld, M.H. Lebrun and D.Tharreau. 2003. The development of simple sequence repeat markers for *Magnaporthe grisea* and their integration into an established genetic linkage map. Fungal Genet. Biol. 40: 207-214.
- Mekwatanakarn, P., W. Kositratana, M. Levy and R.S. Zeigler. 2000. Pathotype and avirulence gene diversity of *Pyricularia grisea* in Thailand as determined by rice lines near-isogenic for major resistance genes. Plant Dis. 84: 60-70.
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Madhan Mohan, K.M., M.S. Madhav, M.S. Prasad, S.J.S.R. Devi, G.R. Kumar and B.C. Viraktamath. 2012. Analysis of population structure of *Magnaporthe grisea* using genome specific microsatellite markers. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*. 6(2): 173-182.
- Matsumoto, C., K. Kageyama, H. Suga and M. Hyakumachi. 1999. Phylogenetic relationships of *Pythium* species based on ITS and 5.8S sequences of the ribosomal DNA. *Mycoscience*. 40(4): 321-331.
- Rohlf, F.J. 2004. NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1 User Guide. Applied Biostatistics Inc., New York.
- Sirithunya, P., T. Sreewongchai, S. Sriprakhon, T. Toojinda, S. Pimpisithavorn, C. Kosawang, and P. Smitamana. 2007. Assessment of genetic diversity in Thai isolates of *Pyricularia grisea* by random amplification of polymorphic DNA. *Phytopathology*. 156: 196-204.
- Sreewongchai, T., T. Toojinda, N. Thanintorn, C. Kosawang, A. Vanavichit, D. Tharreau, and P. Sirithunya. 2010. Development of elite indica rice lines with wide spectrum of resistance to Thai blast isolates by pyramiding multiple resistance QTLs. *Plant Breed*. 129: 176-180.
- Zheng, Y., G. Zhang, F. Lin, Z. Wang, G. Jin, L. Yang, Y. Wang, X. Chen, Z. Xu, X. Zhao, H. Wang, J. Lu, G. Lu and W. Wu. 2008. Development of microsatellite markers and construction of genetic map in rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genet. Biol.* 45: 1340-1347.

## Identification of Blast-Resistant Varieties from Landrace, Improved and Wild Species of Rice

Abdu Salih<sup>1</sup>, Tanee Sreewongchai<sup>2,\*</sup>, Prapa Sripichitt<sup>2</sup>  
and Nonglak Parinthawong<sup>3</sup>

### ABSTRACT

An experiment was conducted to identify rice varieties resistant to blast disease. Samples of 311 genetically diversified varieties/accessions comprised of landrace (263), improved (43) and wild (5) rice varieties/accessions were provided by the National Rice Gene Bank of Thailand. The screening for blast at the seedling stage was done using 29 diversified blast isolates. The blast isolates were collected from seven provinces (Phitsanulok, Ubon Ratchathani, Khon Kean, Chiang Rai, Nong Khai, Chaiyaphum and Udon Thani) of Thailand. The results indicated a total of 35 varieties/accessions (25 landrace, 9 improved and 1 wild) were resistant to all tested blast isolates. The 25 resistant landrace varieties were collections from Northern (10), Northeastern (9) and Southern (6) Thailand. Moreover four of the resistant landrace varieties (GS23107, GS19769, GS20874 and GS23774) were highly resistant with no symptom of the disease. From this study, it can be suggested that the resistant landraces from the Southern, Northern and Northeastern regions could be used as sources of resistant varieties in designing future breeding programs aimed at developing disease-resistant genotypes.

**Keywords:** blast disease, identification, landrace, resistance, rice

### INTRODUCTION

Rice (*Oryza sativa*) is the world's second most important cereal and is the staple food for over one third of the world's people (John and Sleeper, 1995). It is recognized as an important strategic food security crop and as a crucial element in the staple food economies of sub Saharan Africa (Kaung and Allan, 1985). It is the leading cereal crop of Southeast Asia and is the only major food crop that can be grown in the vast areas of standing water in tropical and subtropical areas (Pennisi, 2010). In Thailand, it is also one of

the major staple foods and an income generating commodity contributing to the gross domestic product. The production and productivity of rice is constrained by factors that vary with different agro-ecology, zones and/or regions. Different diseases, insect pests and weeds impact the yield of rice worldwide. Sixteen diseases are economically important to rice (Baker *et al.*, 1997) of which rice blast disease is the most important disease in rice-growing countries worldwide. This disease has spread to more than 85 countries (Ou, 1985). It is caused by *Magnaporthe grisea* (anamorph: *Pyricularia grisea*) Sacc and is highly adaptable

<sup>1</sup> Afar Pastoral and Agro-Pastoral Research Institute, Afar, Ethiopia.

<sup>2</sup> Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

<sup>3</sup> Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.

\* Corresponding author, e-mail: taneesree@yahoo.com

Received date : 27/08/12

Accepted date : 30/11/12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

to different environmental conditions and can be found in irrigated lowlands, rain-fed uplands or deepwater rice fields (Ou, 1985; Latif *et al.*, 2011). Under favorable environmental conditions, this disease destroys seedlings in nurseries and crops in the tillering stage. Leaf blast stunts plant height and reduces the number of bearing panicles and the weight of individual grains (Thurston, 1998). It also increases plant respiration and reduces the maximum photosynthetic rate at light saturation and initial light use efficiency (Pinnschmidt *et al.*, 1994). The economic loss caused by rice blast is estimated to be USD 5 billion annually. Songsak and Aree (2001) reported that in Thailand, a rice blast disease outbreak in 1992 caused over 1.25 million rai (0.2 million ha) of damage that incurred a loss of over THB 1 billion (approximately THB 30 = USD 1). To curb the effects of this serious disease, a multifaceted response was designed.

The use of host resistance is one of the most economical and effective means of controlling blast disease. Resistance to blast disease is governed by a gene-for-gene relationship between a resistance gene in the host and a virulence gene in the blast pathogen (Kiyosawa, 1972; Silue *et al.*, 1992). In Thailand, serious attention has been given to blast disease since 1959 (Ou, 1985). Several crossings have been made to develop resistant cultivars in various regions. However, the resistant varieties obtained were unstable and became susceptible or intermediate

within a few years of release. Thus, susceptible old cultivars have gradually been eliminated and more resistant ones are in wider use. A clear picture of the genetic base to blast resistance, in presently cultivated rice varieties, will provide important indications to which approach and strategy could be adopted to strengthen the degree of blast resistance and to improve the durability of resistance in future varieties. The objective of this study was to identify blast-resistant rice varieties from the landrace and improved rice (*Oryza sativa* L.) in Thailand.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental site and plant materials

The study was conducted in the nursery of the Department of Agronomy, Kasetsart University, Bangkok, Thailand during 2011. A total of 311 rice varieties/accessions, including resistant and susceptible controls, were used to screen for blast disease. All rice materials were provided by the National Rice Genebank of Thailand. These varieties/accessions were grouped into three categories—landrace (263 genotypes), improved genotypes (43 varieties) and wild rice species (5 accessions). Out of the 263 landrace rice varieties, 69, 88, 67 and 39 varieties were collected from Central, Northeastern, Northern and Southern Thailand, respectively (Table 1).

**Table 1** Blast resistance or susceptible information of 311 rice varieties/accessions used in this study.

Type of rice	Susceptible	Intermediate	Resistant	Total
Landrace from Central Thailand	35	34	0	69
Landrace from Northeast Thailand	43	35	10	88
Landrace from Northern Thailand	27	31	9	67
Landrace from Southern Thailand	8	25	6	39
Improved varieties	19	15	9	43
Wild species	2	2	1	5
<b>Total</b>	<b>134</b>	<b>142</b>	<b>35</b>	<b>311</b>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### Blast pathogen

Twenty nine diversified blast isolates were collected from seven provinces (Phitsanulok, Ubon Ratchathani, Khon Kean, Chiang Rai, Nong Khai, Chaiyaphum and Udon Thani) of Thailand. These districts are known for the widespread occurrence of rice blast disease and hence the sampling was used to capture the available pathogenic diversity of these hotspot areas. Furthermore, the sampling represented the major rice growing areas of the seven provinces

(Uckarach *et al.*, 2011). Samples were collected randomly at 30–40 d after transplanting the rice following disease development at the tillering stage. For each sample, the plant part, locations, and the date of sample collection were recorded. The samples were then taken to the laboratory and stored in desiccators for further processing following the method described by Uckarach *et al.* (2011). The detailed descriptions of the samples are indicated in Table 2.

**Table 2** Rice blast fungus isolates used in the study.

Isolate code	Rice variety isolated	Organ infected	Location collected
Bag 1.1	KDML105	Leaf	Wang Thong, Phitsanulok
Bag 1.3	KDML105	Leaf	Wang Thong, Phitsanulok
Bag 1.4	KDML105	Leaf	Wang Thong, Phitsanulok
Bag 2.3	KDML105	Leaf	Mueang, Ubon Ratchathani
Bag 2.4	KDML105	Leaf	Mueang, Ubon Ratchathani
Bag 3.3	KDML105	Leaf	Wang Thong, Phitsanulok
Bag 3.5	KDML105	Leaf	Wang Thong, Phitsanulok
Bag 4.4	KDML105	Neck	Mueang, Phitsanulok
Bag 5.3	1034N.110	Neck	Mueang, Khon Kaen
Bag 5.4	1034N.110	Neck	Mueang, Khon Kaen
Bag 6.1	1030N.8	Neck	Mueang, Khon Kaen
Bag 7.1	KDML105	Leaf Collar	Mueang, Phitsanulok
Bag 7.2	KDML105	Leaf Collar	Mueang, Phitsanulok
Bag 8.2	KDML105	Leaf	Mueang, Ubon Ratchathani
Bag 8.5	KDML105	Leaf	Mueang, Ubon Ratchathani
Bag 9.2	KDML105	Neck	Mueang, Chiang Rai
Bag 9.5	KDML105	Neck	Mueang, Chiang Rai
Bag 9.6	KDML105	Neck	Mueang, Chiang Rai
Bag 11.2	RD6	Leaf	Tha Bo, Nong Khai
Bag 12.4	RD6	Leaf	Phon Phisai, Nong Khai
Bag 14.3	KDML105	Leaf	Si Chiang Mai, Nong Khai
Bag 15.1	KDML105	Leaf	Mueang, Udon Thani
Bag 16.1	RD6	Leaf	Phen, Udon Thani
Bag 17.2	KDML105	Leaf	Chatturat, Chaiyaphum
Bag 19.2	KDML105	Leaf	Kut Chap, Udon Thani
Bag 24.1	KDML105	Leaf	Mueang, Chaiyaphum
Bag 24.2	KDML105	Leaf	Mueang, Chaiyaphum
Bag 28.2	RD6	Leaf	Bueng Kan, Nong Khai
Bag 31.1	RD6	Leaf	Ban Dung, Udon Thani

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### Rice planting

Seeds of all collected rice varieties/accessions were sown on moist tissue paper for about 5–7 d and then the seedlings were transferred to trays containing soil. Each variety/accession was prepared in three replications. Urea and NPK fertilizers were applied twice—that is, as recommended and one day before inoculation. The resistant (IR64) and susceptible (KDML105) varieties were used as standard check varieties in all experiments.

### Inoculation and evaluation of disease resistance

Each of the blast isolates was cultured on rice flour agar medium (2.0% rice flour, 0.2% yeast extract and 2.0% agar) and incubated at 25 °C under 12 hours per day of fluorescent light conditions for 8–10 d. Fungal colonies were scraped out of the surface for further sporulation and incubation under the same conditions of culture for 1–2 d. After conidia formation, the conidia were harvested using sterile distilled water. The inocula were adjusted to a concentration of  $5 \times 10^4$  conidia.mL<sup>-1</sup> using sterilized distilled water with 0.5% gelatin.

The prepared conidial suspensions of the fungus were sprayed or inoculated at the fourth leaf stage on each rice seedling in the plastic tray. Then, inoculated seedlings were incubated at 25–28 °C and relative humidity of 98–100% in a chamber for about 12–16 hr to create a conducive environment for the penetration of the conidia and for disease development. Seedlings were maintained in the nursery for an additional 7 d. Seven days after inoculation, data for leaf blast symptoms and disease severity were recorded as described by Sirithunya *et al.* (2001) and their disease severity reaction score ranging from 0 (resistant) to 6 (susceptible) was recorded.

### Data analysis

The data were classified into two groups based on the reaction of the rice varieties—resistant

(R = 0, 1, 2 and 3) and susceptible (S = 4, 5 and 6). A modified resistance index (RI) formula was used to assess the resistance index (Sirithunya *et al.*, 2001). The RI was expressed as  $RI = S/T$ , where S is the number of isolates showing a resistance reaction and T is the total number of isolates used for screening. Thus, the RI value can range from 0 (susceptible) to 1 (resistant).

## RESULTS

### Blast disease resistance of rice varieties/accessions

The analysis was based on the Resistance Index (RI) methodology (Sirithunya *et al.*, 2001) of disease data analysis to determine the available genetic variation in disease resistance. Accordingly, out of the 311 varieties/accessions compared a total of 35, 142, and 134 cultivars were found resistant, intermediate and susceptible respectively. Among the 35 resistant varieties (25 from landraces, 9 from improved and 1 wild rice) only 9 were highly resistant to blast disease with no symptom of blast disease (0 score) when tested against the 29 individual blast isolates.

The nine highly resistant rice varieties plus IR64 (resistant check) and KDML105 (susceptible check) were tested again against the 29 isolates. The results showed that from the landraces, GS23107, GS19769, GS20874 and GS23774 and from the improved varieties, Nat 1, Suphanburi 1, Suphanburi 60, Suphanburi 90, JHN and IR64, were resistant to all isolates with an RI value of one, while KDML105 (susceptible control) was susceptible to all isolates with an RI value of 0 (detailed descriptions are provided in Table 3). Comparisons among the regions indicated that landrace varieties which were collected from the central region showed no resistance while the highest percentage of those landraces from the southern region showed resistance against all blast isolates. The detailed descriptions of the landrace rice varieties are indicated in Table 4.

**Table 3** Name, Resistance level, type of cultivar and origin of nine highly resistant cultivars and one resistant and one susceptible control.

Code/Name	Resistance level	Type of cultivar	Origin	Score	RI value
GS 23107	Resistant	Landrace	Thailand	0	1
GS 19769	Resistant	Landrace	Thailand	0	1
GS 20874	Resistant	Landrace	Thailand	0	1
GS 23774	Resistant	Landrace	Thailand	0	1
Nat 1	Resistant	Improved	Thailand	0	1
Suphan Buri 1	Resistant	Improved	Thailand	0	1
Suphan Buri 60	Resistant	Improved	Thailand	0	1
Suphan Buri 90	Resistant	Improved	Thailand	0	1
JHN	Resistant	Improved	Thailand	0	1
IR64	Resistant	Resistant control	IRRI	0	1
KDML 105	Susceptible	Susceptible control	Thailand	6	0

IRRI = International Rice Research Institute, Los Baños, Laguna, the Philippines.

RI = Resistance index.

**Table 4** Local/landrace varieties collected from some regions of Thailand and their response to rice blast fungus.

Region	Susceptible	Intermediate	Resistance	Total
Central	35 (50.72%)	34 (49.28%)	0	69
Northeast	43 (48.85%)	35 (39.8%)	10 (11.35%)	88
Northern	27 (40.3%)	31 (46.27%)	9 (13.43%)	67
Southern	8 (20.52%)	25 (64.10%)	6 (15.38%)	39

The numbers in parentheses show the percentage of the level of disease incidence against blast isolates.

## DISCUSSION

The results from this study indicated the genetic diversity of the rice varieties collected from the different regions of Thailand against blast pathogens and their interaction. It was clear that the blast disease caused by *M. oryzae* is one of the destructive diseases of rice and can cause severe damage and yield reduction with favorable environmental conditions and susceptible varieties. This experiment showed differences in the resistance to blast among cultivars collected from different regions in Thailand. These differences are in agreement with the report of Ou (1985) which recorded variability in resistance from region to region or from country to country. The differences could probably be

related to the availability of predisposing factors that favor disease development (Babujee and Gnanamanickam, 2000). Artificial inoculation conducted in the greenhouse showed that 80% of the local cultivars tested against blast showed either susceptible or intermediate resistance to the 29 isolates of *P. grisea*. Four (GS23107, GS19769, GS20874 and GS23774) out of the 263 local cultivars were highly resistant to all 29 isolates of *P. grisea*. Similar research was carried out in other rice growing countries; in screening trials in Bangladesh, Mohanta *et al.* (2003) reported that among 28 restored lines and 3 standard checks, 3 were highly resistant, 12 were resistant and 16 were moderately susceptible. Similarly Dissanayake (1995), in Sri Lanka revealed that out of 22 cultivated rice varieties used in his

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

study, only 6 varieties were resistant to blast at two sites, with this difference attributed to parental sources.

A comparison of the regions in the current study showed that all resistant varieties were obtained from the Southern, Northern and Northeastern provinces of Thailand. However, the results from this inoculation study need to be verified with field-based observations. The susceptibility of most of the varieties clearly suggests the need for the development and promotion of blast-resistant varieties.

#### CONCLUSION AND RECOMENDATION

This study showed that there is variability in resistance among the different rice genotypes evaluated. All resistant genotypes were obtained from Southern, Northern and Northeastern Thailand. These regions/areas could be used as a potential source of genotypes resistant to blast disease. The inclusion of blast disease resistance as one of the criteria in rice breeding programs and the use of these resistant genotypes will help to develop rice genotypes that are agronomically important and blast-disease resistant.

#### ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to acknowledge the Ethiopian Ministry of Agriculture for financing this study through the Rural Capacity Building Project and also to thank the National Rice Gene Bank of Thailand for providing the rice materials. Finally, thanks are recorded to the graduate students at the Department of Agronomy, Kasetsart University, Bangkok, Thailand for their excellent technical support.

#### LITERATURE CITED

- Babujee, L. and S.S. Gnanamanickam. 2000. Review article: Molecular tools for characterization of rice blast pathogen (*Magnaporthe grisea*) population and molecular marker assisted breeding for disease resistance. *Curr. Sci.* 78(3): 248–257.
- Baker, B., P. Zambryski, B. Staskawicz and S.P. Dinesh-Kumar 1997. Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 726–733.
- Dissanayake, D.M.N. 1995. **Genetic Base of Blast Resistance in Cultivated Rice Varieties in Sri Lanka and Breeding Strategies for Durable Resistance to Blast.** [Available from: [http://www.goviia.lk/agri\\_learning/paddy/paddy\\_research/paddy\\_pdf/V18.pdf](http://www.goviia.lk/agri_learning/paddy/paddy_research/paddy_pdf/V18.pdf)]. [Sourced: 26 August 2012].
- John, M.P. and D.A. Sleeper. 1995. **Breeding Field Crops.** 4th ed. Iowa State University Press. Ames, IA, USA. 627 pp.
- Kaung, Z.T. and M.S. Alam. 1985. Rice Production in Africa: Rice Improvement in Eastern, Central and Southern Africa, p. 159. *In Proceedings of the International Rice Research Workshop.* 9–19 April 1984. Lusaka, Zambia.
- Kiyosawa, S. 1972. Genetics of blast resistance, pp. 203–225. *In Rice Breeding, International Rice Research Institute.* Manila, the Philippines.
- Latif, M.A., M.A. Badsha, M.I. Tajul, M.S. Kabir, M.Y. Rafii and M. MAT. 2011. Identification of genotypes resistant to blast, bacterial leaf blight, sheath blight and tungro and efficacy of seed treating fungicides against blast disease of rice. *Scientific Research and Essays* 6: 2804–2811.
- Mohanta, B.K., M.R. Aslam, M.E. Kabir, M.K. Anam, K. Alarm and M.A. Habib. 2003. Performance of different genotypes/cultivars to blast disease of rice in Boro and T. Aman crop in Bangladesh. *Asian. J. Plant Sci.* 7: 575–577.
- Ou, S.H. 1985. **Rice Diseases.** 2nd ed. Commonwealth Agricultural Bureaux. UK. pp.109–201.
- Pennisi, E. 2010. Armed and dangerous. *Science* 327: 804–805.

- Pinnschmidt, H.O., P.S. Teng and L. Yong. 1994. Methodology for quantifying rice yield effects of blast, pp. 381–408. *In* R.S. Zeigler, S.A. Leong and P.S. Teng, (eds.). **Rice Blast Disease**. CAB International, Wallingford, UK in association with IRRI, Manila, the Philippines.
- Silue, D., J.L. Notteghm and D. Tharreau 1992. Evidence of a gene-for-gene relationship in the *Oryza sativa-Magnaporthe grisea* pathosystem. *Phytopathol.* 82: 577–580.
- Sirithunya, P., T. Sreewongchai, S. Sriprakhon, C. Wongsaprom, S. Pimpisitithavorn and E. Roumen. 2001. Genetic analysis of plant pathogen interaction between rice (*Oryza sativa*) and the rice plant pathogen (*Magnaporthe grisea*): **Project Report**. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. Bangkok, Thailand.
- Songsak, S. and W. Aree 2001. On estimation of stochastic production frontiers with self-selectivity: **Jasmine and Non-Jasmine Rice in Thailand**. Multiple Cropping Center. Chiang Mai University, Thailand.
- Thurston, H.D. 1998. **Tropical Plant Disease**. 2nd ed. Amer. Phytopathological Society. 208 pp.
- Uckarach, S., P. Sripichitt and T. Sreewongchai. 2011. Cluster analysis of blast disease resistance of improved rice varieties using newly blast pathogen isolates, pp. 581–588. *In* **The Proceedings of 49th Kasetsart University Annual Conference**. 1–4 February, 2011. Kasetsart University. Bangkok, Thailand.

## Identification of Blast Resistance Gene in Yang Mawng Variety of Thai Indigenous Rice

Siriporn PRAMRIT<sup>1,2\*</sup> and Nonglak PARINTHAWONG<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Agricultural Biotechnology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

<sup>2</sup>Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

<sup>3</sup>Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

\*Corresponding email: siripornpramrit@gmail.com

### ABSTRACT

Rice blast, caused by *Pyricularia oryzae*, is a major disease of rice almost worldwide. KDML105 is a good quality cultivar, however, this cultivar is susceptible to rice blast disease. Therefore, finding of new rice blast resistance gene is a major approach for rice breeding program. A Thai indigenous rice variety, Yang mawng, is highly resistant to the infection of *P. oryzae*. In this study, an F<sub>2</sub> population was developed from a cross between KDML105 and Yang mawng. Two hundred and twenty eight F<sub>2</sub> plants were inoculated with conidia suspension of *P. oryzae* and the disease was scored 7 days later. The segregation of resistance and susceptible phenotype showed a goodness of fit to the ratio 15:1. Two hundred and thirty simple sequence repeat (SSR) markers were screened for polymorphism. The result showed that 111 markers showed polymorphism between the parents KDML105 and Yang mawng. Bulk segregant analysis (BSA) was conducted using 111 SSR markers and four markers included RM495, RM431, RM443 and RM543 were obtained. This suggested that, the gene that control blast disease resistance in Yang mawng variety might locate on chromosome 1 of rice genome. The four markers will be used in further analysis of an individual F<sub>2</sub> population in order identify the SSR markers linked to blast resistance gene.

**Keywords:** Rice blast, Blast resistance gene, *Pyricularia oryzae*

### Introduction

Blast disease caused by a fungal pathogen, *Pyricularia oryzae*, is one of the important rice diseases because of its devastating effects on yield under favorable conditions. Effective and durable use of blast resistance lines has been limited and lost within a few years of initial cultivation due to the emergence of more virulent forms of the rice blast fungus (Zhou *et al.*, 2007). However, development of blast resistant varieties of rice is yet the most effective and economical method of controlling this disease. Thai indigenous rice variety provides potentially valuable resources for the improvement of cultivated rice. In addition, Thai indigenous rice variety is a donor of several other resistance genes. To develop an effective resistance, it is essential to determine spectrum of resistance mediated by resistance (*R*) genes. To date, more than 70 *R* genes and some quantitative trait loci (QTL) have been identified and mapped on rice chromosomes (Liu *et al.*, 2010; Koide *et al.*, 2009; Ballini *et al.*, 2008). The use of molecular markers in many aspects of rice studies has been increasing considerably. Microsatellites or simple sequence repeats (SSRs) are widely used in rice genetic studies. SSRs are highly polymorphic genetic markers and because of their widespread distribution in the genome. The objective of this study was to analyze SSR

markers associated with rice blast resistance genes in an F<sub>2</sub> population derived from Yang mawng resistant variety and KDML105, a susceptible rice cultivar.

### Materials and Methods

#### Plant material and phenotypic evaluation

The F<sub>1</sub> plant, which obtained from the cross between KDML105 and Yang mawng varieties were self-fertilized. A total of 228 F<sub>2</sub> plants from a cross were harvested and used for developing the mapping population. Seeds were pre-germinated by soaking in water at 30 °C for 2 days and were, sown in plastic trays (30×60×4 cm) filled with soil. The parental cultivars KDML105 and Yang mawng were also included as controls. Seedlings were grown in a greenhouse for 3 weeks before inoculation. Nineteen isolates of *P. oryzae*, were cultured on Rice Flour Agar (RFA) for 10 days. Conidia were induced by adding sterilized water on to mycelium and scraping with L-shape glass rod. Plates were incubated on room temperature for another 2 days. The conidia were harvested and the conidial suspension was adjusted to 10<sup>5</sup> conidia/mL using hemacytometer and mixed together. Seedlings in each tray were sprayed with a 100 ml conidia suspension and incubated at 25 °C under high humidity for 18 hours, and sprayed three or four times a day with distilled water to maintain high humidity for 3 days. Disease incidence was observed 7 days after inoculation using the visual rating scale 0 to 6 rating system as described by Roumen *et al.* (1997). The plants showing scores 0-2 were considered resistant, 3-4 were considered moderate resistant and 5-6 as susceptible. KDML105 and Yang mawng were used as a susceptible and resistant control, respectively. In the inheritance study, the frequencies of the classes obtained were tested for significance by Chi-square.

#### DNA extraction and PCR conditions

Total genomic DNA was extracted from frozen leaves of the seedlings using CTAB method described by Doyle and Doyle (1990). Two hundred and thirty simple sequence repeat (SSR) markers distributed evenly across the twelve chromosome of rice were screened for polymorphisms between KDML105 and Yang mawng. Those markers that showed polymorphism between parents were used for bulk segregant analysis (BSA). DNA pools of susceptible (B1) and resistant (B2) bulks were generated by mixing equimolar amounts of DNA from either 5 resistant or 5 susceptible F<sub>2</sub> individuals, respectively. The BSA was carried out to identify molecular markers putatively associated with the resistant and susceptible phenotype using polymerase chain reaction (PCR). The PCR mix consisted of 10 µL of reaction mixture containing 20 ng of total DNA, 5 µmol each of primers, 2.5 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 10X Taq polymerase buffer and 1 unit Taq polymerase. The PCR was conducted with thermocycler (Biometra, Germany), with the following temperature profiles, the initial denaturation was at 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturing at 95 °C for 30 seconds, annealing at 55 °C for 30 seconds, extension at 72°C for 30 seconds, and 5 min at 72°C for final extension. The PCR products were separated on 6% polyacrylamide gels and visualized using the silver staining method described by Benbouza *et al.* (2006). The target bands were scored and analyzed.

### Results and Discussion

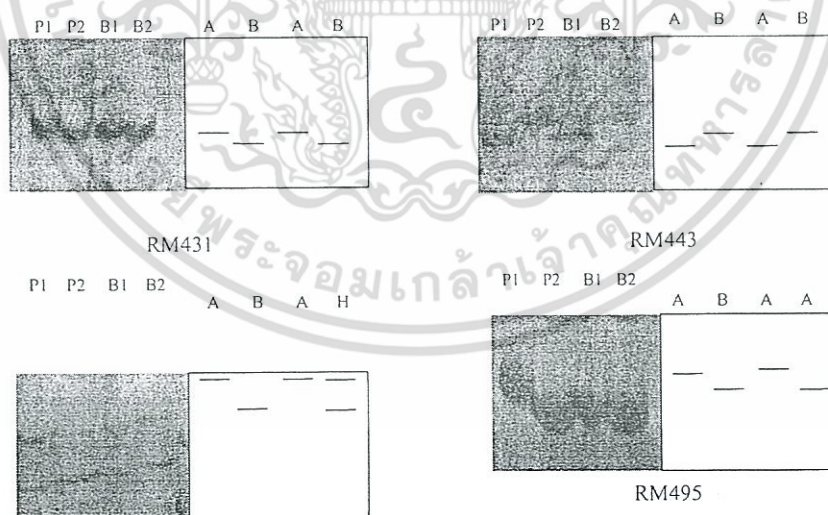
#### Phenotypic evaluation in F<sub>2</sub> populations

Nineteen isolates of *P. oryzae* were collected from northern, eastern, northeast and southern region in Thailand. The conidia suspensions were pooled together and used to evaluate susceptible and resistance frequencies in F<sub>2</sub> population. The resistant trait obtained will indicate broad-spectrum resistance to phenotype *P. oryzae*., as reported previously by Chen *et al.* (2005) and Zhou *et al.* (2004). Among the 228 tested F<sub>2</sub> seedlings, 223 seedlings were characterised as resistant, while only 5 seedlings were found to be susceptible to fungal

pathogen isolates. The numbers of resistant and susceptible lines at the ratio of 3:1 ( $\chi^2 = 63.24$ ;  $P = 0.00$ ) were unreliable. While, the segregation of resistance and susceptible phenotype showed a goodness of fit to the ratio 15:1 ( $\chi^2 = 6.13$ ;  $P = 0.011$ ) (Table 1). Chi-square data on the segregation analysis suggested that the resistant phenotype of the Yang mawng variety on blast disease was controlled by more than one gene. Two hundred and thirty SSR markers were screened for polymorphisms between parents KDML105 and Yang mawng varieties, and 111 markers were obtained as they showed polymorphism between the two parents. BSA was conducted using 111 SSR markers and four markers included RM495, RM431, RM443 and RM543 on chromosome 1 were found polymorphism between susceptible and resistant parents (Figure 1) and corresponding bulks indicating their possible association with blast resistance in the mapping population. Similarly, Lin *et al.* (2007) reported that RM543 linked to the resistance gene *Pi37* and Chen *et al.* (2005) reported that RM543 linked to the resistance gene *Pi37(t)*. The  $F_2$  mapping population will be genotyped with these four markers to study their possible association with blast resistance.

**Table 1** Segregation in the  $F_2$  population obtained from a cross between KDML105 and Yang mawng varieties at 7 days after inoculation with 19 isolates of *P. oryzae*.

Total no. of seedlings	Expected ratio	Expected No.		Observed No.		$\chi^2$	<i>p</i>
		R	S	R	S		
$F_2$ (228)	3:1	214	14	223	5	63.24	0.00
$F_2$ (228)	15:1	214	214	223	5	6.13	0.011



**Figure 1** DNA patterns of markers analyzed by bulked segregant analysis (BSA). P1; KDML105, P2; Yang mawng, B1; resistance bulk and B2; susceptible bulk. A = susceptible parent allele; B = resistant parent allele and H = heterozygous.

### Conclusion

In summary, an F<sub>2</sub> population was developed from a cross between KDML105 and Yang mawng. Two hundred and twenty eight F<sub>2</sub> plants were inoculated with the mix of conidia suspension of *P. oryzae* and the disease was scored 7 days later. The segregation of resistance and susceptible phenotype showed a goodness of fit to the ratio 15:1 ( $\chi^2 = 6.13$ ;  $P = 0.011$ ). Chi-square data on the segregation analysis suggested that the resistant phenotype of the Yang mawng variety on blast disease was controlled by more than one gene. Two hundred and thirty simple sequence repeat (SSR) markers were screened for polymorphism. The result showed that 111 markers showed polymorphism between the parents KDML105 and Yang mawng. Bulk segregant analysis (BSA) was conducted using 111 SSR markers and four markers included RM495, RM431, RM443 and RM543 which located on chromosome 1 were obtained.

### Acknowledgments

This research is partially supported by the Center of Excellence on agricultural Biotechnology Science and Technology Postgraduate Education and Research Development Office, Office of Higher Education Commission, Ministry of Education (AG-BIO/PERDO-CHE), Thailand Advanced Institute of Science and Technology. Thanks also to King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang for financial support for presenting this research at the symposium.

### References

- Ballini, E., Morel J.B., Droc G., Price A., Courtois B., Notteghem J.L. and Tharreau D. 2008. A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. *Molecular Plant-Microbe Interact* 21(7): 859–868.
- Benbouza, H., Jacquemin J.M., Baudoin J.P. and Mergeai G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 10(2): 77-81.
- Chen, F., Wang L., Que Z., Pan R. and Pan Q. 2005. Genetic and physical mapping of *Pi37(t)*, a new gene conferring resistance to rice blast in the famous cultivar St. No. 1. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 1563-1570.
- Doyle, J.J. and Doyle J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Koide, Y., Kobayashi N., Xu D. and Fukuta Y. 2009. Blast resistance genes and their selection markers in rice (*Oryza sativa* L.), JIRCAS Working Report 63: 95-122.
- Lin, F., Chen S., Que Z., Wang L., Liu X. and Pan Q. 2007. The blast resistance gene *Pi37* encodes a nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a resistance gene cluster on rice chromosome 1. *Genetics* 177: 1871-1880.
- Liu, J., Wang X., Mitchell T., Hu Y., Liu X., Dai L. and Wang G. 2010. Recent progress and understanding of the molecular mechanisms of the rice-*Magnaporthe oryzae* interaction. *Molecular Plant Pathology* 11: 419-427.
- Zhou, E., Jia Y., Correll J. and Lee F.N. 2007. Instability of the *Magnaporthe oryzae* avirulence gene AVR-*Pita* alters virulence. *Fungal Genetics and Biology* 44: 1024-1034.
- Zhou, J.H., Wang J.L., Xu J.C., Lei L.C. and Ling Z.Z. 2004. Identification and mapping of a rice blast resistance gene *Pi-g(t)* in the cultivar Guangchangzhan. *Plant Pathology* 53: 191-196.

Full Paper

## Genetic mapping of leaf blast resistance gene in landrace rice cultivar 'GS19769'

Nonglak Parinthawong<sup>1,\*</sup>, Pennapar Tansian<sup>1,2</sup> and Tanee Sreewongchai<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

<sup>2</sup>Centre of Excellence on Agricultural Biotechnology, Bangkok 10900, Thailand

<sup>3</sup>Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

\* Corresponding author, e-mail: [kpnongla@kmitl.ac.th](mailto:kpnongla@kmitl.ac.th); tel.: +66 2 3298513; fax: +66 2 3298513

Received: 19 March 2014 / Accepted: 23 July 2015 / Published: 31 August 2015

**ABSTRACT:** The rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, is highly varied and therefore overcomes resistance in a few years. Rice cultivars with the ability to resist different blast races are therefore required. In this study, a resistance gene of landrace rice cultivar 'GS19769' is identified using a mix of 19 blast isolates collected from several epidemic areas in Thailand. The selected cultivar was fertilised with the blast susceptible variety, Khao Dok Mali 105 (KDML105), to generate the mapping population. Segregation analysis in the F<sub>2</sub> population shows that 'GS19769' contains more than 1 resistance gene, as the Chi-square test for segregation of resistance and susceptibility does not fit the ratio of 3:1. The bulk segregant analysis by simple sequence repeat (SSR) markers shows that the identified resistance gene is linked to the SSR markers RM224 and RM144 on chromosome 11. Analysis of 15 F<sub>2</sub> plants susceptible to the blast was conducted. The gene was mapped to RM224 and RM144 at the same distance of 20 cM.

**Key words:** genetic mapping, rice blast, landrace rice, *Magnaporthe oryzae*, SSR markers

### INTRODUCTION

Rice blast is one of the most devastating diseases for rice-growing countries worldwide. The causal fungal pathogen, *Magnaporthe oryzae*, has the ability to infect several parts of the plant at all 3 growth stages, i.e. seedling, tillering and panicle stages. The fungus can survive over seasons on many gramineous hosts other than rice. Moreover, the diversity of the fungus occurs as it easily adapts to different environmental conditions across seasons [1]. In Thailand, a high diversity has been confirmed by the determination of 623 pathotypes collected during 2002-2005 on 18 near

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Maejo Int. J. Sci. Technol.* **2015**, 9(02), 278-287

isogenic lines [2]. The disease dispersal in 1992 damaged over 650,000 tons or 60% of the total yield of rice in Thailand [3].

Developing blast-resistant rice cultivars is an effective approach to controlling the blast disease. The blast resistance in rice is controlled by a resistance (R) gene corresponding to an avirulence gene in blast fungal isolates and its reaction follows the gene-for-gene hypothesis [4]. Many blast-resistant cultivars have been generated by molecular-assisted breeding programmes, where an identified resistance gene was introduced to the cultivars. However, the new cultivars developed often lost their resistance after a few years. Blast isolates could break resistant cultivars, especially when a single resistance gene is present. The goal of the rice breeder is to develop a rice cultivar with a broad-spectrum-resistance phenotype against the infection of several blast isolates [5]. This type of resistant cultivar consists of a resistance (R) gene obtained from disease-resistant varieties. A number of broad-spectrum R genes have been identified from resistance genes in non-cultivated varieties. As summarised by Yang et al. [6], over 80 resistance genes have been identified and are distributed on 11 rice chromosomes, with the exception of chromosome 3. Among these, *Pi2*, *Pi9*, *Piz-t*, *Pigm* and *Pi50(t)* from the *Pi2/9* locus on chromosome 6 confer broad-spectrum resistance to blast isolates [5, 7-11].

Generally, R genes are identified in landraces, cultivars or wild rice collections [12]. Recent work on the identification of blast-resistant varieties from landrace rice using 29 blast isolates revealed that 4 out of 263 landrace rice varieties showed broad-spectrum resistance with no symptoms of disease after inoculation with a mix of blast isolates collected from disease outbreak areas in Thailand [13]. The objectives of this study are to locate the resistance gene and identify simple sequence repeats (SSR) markers closely linked to a broad-spectrum blast resistance gene of a landrace rice cultivar 'GS19769'. The marker obtained, linked to the resistant phenotype, would be useful for the marker-assisted selection of a blast-resistance trait in a rice breeding programme.

## MATERIALS AND METHODS

### Rice Variety

The landrace rice cultivar 'GS19769' used in this study was derived from screening of the landrace rice cultivars for a blast-resistant phenotype using 29 blast isolates collected from the disease epidemic areas in Thailand, as described in Salih et al. [13]. The F<sub>1</sub> obtained from the crossing between GS19769 and Khao Dok Mali 105 (KDML105, obtained from Rice Department, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand), a well-known aromatic rice variety which is susceptible to leaf and neck blast diseases, were grown for F<sub>2</sub> seed production. The resistant Jao Hom Nin (JHN) and susceptible KDML105 were used as standard check varieties in all experiments.

### Pathogen Isolates

The 19 blast isolates were collected from disease epidemic areas across the rice planting region of Thailand (Table 1). The fungi (a single spore each) isolated from leaf or neck with blast symptoms were cultured on rice-flour agar medium (20 g/L rice flour, 20 g/L agar, 2 g/L yeast extract and 40 mg/L streptomycin) at 25°C and stored as dried mycelium on filter paper at -20°C, as described by Sirithunya et al. [14]. These were used for further experiments.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Table 1.** Nineteen isolates of *M. oryzae* used in this phenotypic analysis and their collection locations

Area	Province	Number of fungal isolates
North	Chiang Rai, Phitsanulok	5
North-east	Chaiyaphum, Khon Kaen, Nong Khai, Ubon Ratchathani, Surin	8
Middle	Bangkok, Chachoengsao, Ratchaburi	5
South	Phatthalung	1

### Inoculation and Disease Assessment

F<sub>2</sub> seeds obtained from F<sub>1</sub> plants were sown individually in plastic trays (33 x 11 x 11 cm) half-filled with soil and fertilised with ammonium sulphate (5 g). JHN and KDML105 were planted at both sides of the end rows as resistant and susceptible check varieties respectively. Ammonium sulphate (1 g) was added to each tray 3 days prior to inoculation. Inoculation of the blast isolates was performed following the method described by Sreewongchai et al. [15]. All 29 isolates were grown on rice-flour agar medium and incubated at 25°C. Sporulation was induced by scraping 8- to 10-day-old mycelium from each plate and allowing growth for another 2 days. Spores were harvested and the concentration of spores was adjusted to 10<sup>5</sup> spores/mL in 0.5% gelatine. Inocula were sprayed onto 14-day-old seedlings using an air-brush pressure pump. The inoculated seedlings were placed in a high-humidity chamber for 18 hr at 25°C and were then transferred to a greenhouse. The degree of infection of each seedling was evaluated 7 days after inoculation by a standard reference scale for rice blast, scoring 0 (resistant) to 6 (susceptible) [16].

### DNA Preparation, Amplification and Bulk Segregant Analysis

Genomic DNA of ten F<sub>2</sub> plants from each resistant group, susceptible group and two parental lines was extracted from leaves of seedlings by the cetyltrimethylammonium bromide method described by Doyle and Doyle [17]. The DNA quality was compared with known concentrations of DNA by electrophoresis on 0.8% agarose gel and staining with ethidium bromide.

The parents were used to screen the 270 SSR markers with known position and wide distribution on 12 rice chromosomes for polymorphism and possible association with blast resistance. These markers are reported online [18]. The polymerase chain reaction (PCR) mixture (10 µL) contained 5.9 µL of sterile distilled water, 1 µL of 10xPCR buffer, 1 µL of MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.5 µL of dNTPs solution mix (2.5 mM), 0.1 µL of *Taq* DNA polymerase (5 units/µL) (Fermentas, USA), 0.5 µL of SSR primer pair (0.25 µM each) and 1 µL of rice genomic DNA (10 ng). The PCR was conducted in a thermal cycler as follows: initial denaturation step at 95°C for 10 min., followed by 40 cycles of 95°C for 20 sec., 57°C for 15 sec., 72°C for 30 sec., and a final extension at 72°C for 5 min. PCR products were observed by 6% polyacrylamide gel electrophoresis and made visible by silver staining [19].

The bulk segregant analysis (BSA) was arranged into 2 bulk sets according to the two F<sub>1</sub> plants obtained. The analysis resulted in a number of SSR markers that sufficiently distinguished the genotype of the two bulks. Two resistant bulk sets (B1) were comprised of 8 resistant F<sub>2</sub> plants from F<sub>1</sub> plant no. 1 (B1-1) and 7 resistant F<sub>2</sub> plants from F<sub>1</sub> plant no. 2 (B1-2), while 2 susceptible

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bulk sets (B2) were comprised of 8 susceptible F<sub>2</sub> plants from F<sub>1</sub> plant no. 1 (B2-1) and 7 susceptible F<sub>2</sub> plants from F<sub>1</sub> plant no. 2 (B2-2). The DNA from each plant was extracted and the DNA pool was prepared for each bulk by mixing DNA of the respective F<sub>2</sub> DNA samples in equal quantity. The bulks were used to analyse the SSR markers obtained from parental screening (Table 4). The PCR profile was conducted and the PCR products were analysed as mentioned above.

The SSR markers found to be polymorphic among the bulks were used for the co-segregation study of F<sub>2</sub> progenies. Leaves of each F<sub>2</sub> plant and its parents were excised to give pieces 0.5 mm in diameter and 5 pieces were added into the PCR plate containing 10 µL of KAPA plant PCR mix (KAPA Biosystems, USA) for genetic analysis. The PCR products were analysed by electrophoresis as described previously.

### Data Analysis

The clearly detected amplicons of SSR were scored manually as A for the susceptible parent allele, B for the resistant parent allele and H for alleles from both parents. The data sheet was generated and scored. A Chi-square ( $\chi^2$ ) test for goodness of fit of the F<sub>2</sub> population for the phenotype and marker data was performed by CropStat 7.2 computer software [20]. The SSR markers surrounding the resistance gene on the specific region of the chromosome were identified. The phenotype and SSR data were combined for linkage analysis by using MAPMAKER/EXP3.0 program [21]. In addition, the frequency of recombination was calculated using the genotype of markers and the resistant phenotype of F<sub>2</sub> plants that showed susceptible phenotype to fungal infection.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Phenotype Distributions and Correlation

A population of 250 F<sub>2</sub> seedlings plus two check varieties were inoculated with a mix of 19 blast isolates. The blast fungi were isolated from naturally infected rice leaf and leaf sheath from different regions of a paddy field in Thailand. They were found to be highly genetically diverse when analysed using *M. grisea* microsatellite markers, as described in Tansian et al. [22]. The score of each seedling was evaluated after inoculation and used for further analysis. Among the 250 seedlings tested, 235 were characterised as resistant while only 15 were found to be susceptible to fungal isolates (Table 2). Chi-square tests of the data obtained from the segregation of resistance are shown in Tables 2 and 3. Analysis of a two-independent-gene model or two loci interactions shows that the expected number of resistant and susceptible plants in the segregation ratio for the model of more than one dominant gene is in accordance with the 9:3:3:1 segregation ratio at the  $0.90 < p < 0.95$  level of significance. The one-dominant-gene model (3:1) is also considered. However, the Chi-square data obtained is 48.13, with a *p* value of less than 0.0005 ( $p < 0.0005$ ) (Table 2). The Chi-square data on the segregation analysis suggest that the resistant phenotype of the GS19769 cultivar against blast disease is controlled by more than one gene.

**Table 2.** Segregation of F<sub>2</sub> population obtained from the cross between KDML105 and GS19769 rice cultivars and inoculated with 19 isolates of *M. oryzae*

Total no. of seedlings	Resistant (R)	Susceptible (S)	Expected ratio	$\chi^2$	<i>p</i> value
250	235	15	3:1	48.133	0.000

Note:  $\chi^2(0.05, 1) = 3.84, df = 1.0$  การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Table 3.** Chi-square tests of two independent genes (9:3:3:1) and epistatic effect (15:1) for blast resistance in F<sub>2</sub> population derived from the cross between KDML105 and GS19769 rice cultivars inoculated with 19 isolates of *M. oryzae*

Gene model	Total no. of F <sub>2</sub> seedlings	Observed ratio				Expected ratio	$\chi^2$	p value
		R	MR	MS	S			
Independent genes <sup>a</sup>	250	134	59	42	15	9:3:3:1	3.980	0.264
Epistatic effect <sup>b</sup>	250	235	-	-	15	15:1	0.027	0.870

<sup>a</sup>  $\chi^2$  0.5, 3 = 2.38, df=3;  $\chi^2$  0.25, 3 = 4.11, df=3

<sup>b</sup>  $\chi^2$  0.75, 1 = 0.10, df=1;  $\chi^2$  0.90, 1 = 0.02, df=1

R = resistant; MR = moderately resistant; MS = moderately susceptible; S = susceptible

### Molecular Marker Analysis

Two hundred and seventy SSR markers were screened for polymorphism between the parents KDML105 and GS19769. The 66 markers which showed polymorphism between the parents and were widely distributed along 12 rice chromosomes were then used in the BSA. Markers with polymorphic bands that showed distinct alleles between resistant and susceptible plants, either A:B:B:A or A:B:H:A for KDML105: GS19769: B1: B2, were selected (Table 4). In this experiment, SSR markers that scored H (heterozygous) for the resistant phenotype were also considered as this indicated that the resistant phenotype in this BSA might be controlled by a dominant allele. Out of the 66 SSR markers, 4 markers that fit the genotype patterns were selected and used in the analysis of the individual F<sub>2</sub> population. These markers were: RM125 (Chr.7), RM201 (Chr.9), RM144 (Chr.11) and RM247 (Chr.12). Their genotype patterns (KDML105: GS19769: B1-1: B2-1: B1-2: B2-2, where B1-1 and B2-1 were progenies from F<sub>1</sub> plant number 1, and B1-2 and B2-2 were from F<sub>1</sub> plant number 2) were ABAABA, ABAAHA, ABHABA and ABAAHA respectively (Figure 1). The segregation analysis of F<sub>2</sub> plants revealed that the resistant allele(s) associated with markers RM125 and RM144 had the Chi-square results of 1.20 (1:2:1 at  $p = 0.549$ , where  $df = 2$ ) and 6.02 ( $p = 0.049$ , where  $df = 2$ ) respectively (Table 5). These Chi-square data confirmed that the analysis of the F<sub>2</sub> population according to marker RM125 and RM144 fitted Mendel's segregation theory of 1:2:1. Moreover, the data indicated that the population segregation was normal. The results suggest that the resistant allele(s) might link either to RM125 on chromosome 7 or to RM144 on chromosome 11. Interestingly, marker RM144 is the only one that provides a distinguishable genotype between resistance and susceptibility in the BSA. However, the segregation analysis of RM125 in individual F<sub>2</sub> plants results in over 50 per cent recombination (Table 6), suggesting that the position of RM125 is not linked to the resistant allele.

In order to define the location of the blast resistant allele, additional markers from chromosomes 7, 9, 11 and 12 were selected to define which chromosome harbours the resistant allele (Table 4). Among these, RM224 and RM287, located 3.1 and 54.6 cM respectively above RM144 on chromosome 11, were found in the same F<sub>2</sub> population. RM224 has a Chi-square of 3.91 with  $p = 0.14$ , while the value for RM287 is 1.60 with  $p = 0.44$ , which fits the 1:2:1 segregation and represent the normal segregation of this population. Thus, the results confirm the location of the resistant allele on chromosome 11 and link its location to those 3 markers.

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Table 4.** List of SSR markers used in BSA

Marker	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Chromosome no.	Product size (bp)
RM125	ATCAGCAGCCATGGCAGCGACC	AGGGGATCATGTGCCGAAGGCC	7	127
RM11	TCTCCTCTTCCCCGATC	ATAGCGGGCGAGGCTTAG	7	140
RM1132	ATCACCTGAGAAACATCCGG	CTCCTCCCACGTCAAGGTC	7	93
RM5122	CTCGCAATTTATACGTAATC	CTCACGAAATAAAATGAGTG	9	161
RM201	CTCGTTTATTACCTACAGTACC	CTACCTCCTTTCTAGACCGATA	9	158
RM205	CTGGTTCTGTATGGGAGCAG	CTGGCCCTTCACGTTTCAGTG	9	122
RM287	TCCCTGTTAAGAGAGAAATC	GTGTATTTGGTGAAAGCAAC	11	118
RM224	ATCGATCGATCTTCACGAGG	TGCTATAAAAGGCATTTCGGG	11	157
RM144	TGCCCTGGCGCAAATTTGATCC	GCTAGAGGAGATCAGATGGTAGTGCATG	11	237
RM247	TAGTGCCGATCGATGTAACG	CATATGGTTTTGACAAAGCG	12	131
RM1261	GTCCATGCCCAAGACACAAC	GTTACATCATGGGTGACCCC	12	168
RM235	AGAAGCTAGGGCTAACGAAC	TCACCTGGTCAGCCTCTTTC	12	124



**Figure 1.** Results BSA by using susceptible parent KDML105 (1) and resistant parent GS19769 (2) and their respective bulks: resistant bulks B1-1 (3) and B1-2 (5); susceptible bulks B2-1 (4) and B2-2 (6), with SSR markers RM125, RM201, RM144 and RM 247

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Table 5.** Markers analysed in F<sub>2</sub> population derived from the cross between KDML105 and GS19769 cultivars

Marker	Marker segregation analysis (no. of lines observed)			$\chi^2$ (1:2:1)	p value
	A	AB=SG	B		
RM144	46	133	71	6.024	0.049
RM224	49	135	66	3.912	0.141
RM287	54	129	67	1.608	0.448
RM125	55	130	65	1.200	0.549

Note: df=2,  $\chi^2$  0.025=7.38,  $\chi^2$  0.05= 5.99,  $\chi^2$  0.1=4.61,  $\chi^2$  0.25=2.77,  $\chi^2$  0.5=1.39

A = resistant; B = susceptible; AB or SG = segregant, according to model with single dominant gene

**Table 6.** Resistant genotype and phenotype of markers showing frequency of recombination occurring in F<sub>2</sub> plants that appear to be phenotypes susceptible to *M. oryzae* infection

Chr.	Marker	Genotype															% Recombination			
		Parents		F2 population																
		P1	P2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14	15	
7	RM125	A	B	H	H	A	H	A	H	A	H	H	A	A	H	H	A	H	60	
7	RM11	A	B	H	B	A	B	A	H	B	H	H	A	H	H	H	A	H	73.33	
7	RM1132	A	B	H	B	A	H	A	B	H	H	H	H	H	H	H	A	B	80	
9	RM5122	A	B	H	H	A	H	H	H	A	B	A	H	H	H	H	A	H	73.33	
9	RM201	A	B	H	A	A	H	B	H	A	B	H	H	B	A	H	A	H	66.66	
9	RM205	A	B	H	A	A	H	B	B	H	B	H	A	B	A	H	A	A	60	
11	RM287	A	B	A	A	B	B	A	H	H	B	B	A	B	A	H	H	A	60	
11	RM224	A	B	A	B	A	A	A	H	H	A	A	A	A	A	A	A	A	20	
11	RM144	A	B	A	B	A	A	A	A	H	H	A	A	A	A	A	A	A	20	
12	RM247	A	B	A	H	A	H	H	H	H	B	H	B	H	A	B	H	A	73.33	
12	RM1261	A	B	A	A	A	A	A	A	H	B	H	H	A	H	B	H	H	53.33	
12	RM235	A	B	A	B	A	A	B	B	B	B	B	B	A	B	B	B	A	66.66	
		Phenotype																		
		5	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	5	5	5	6	

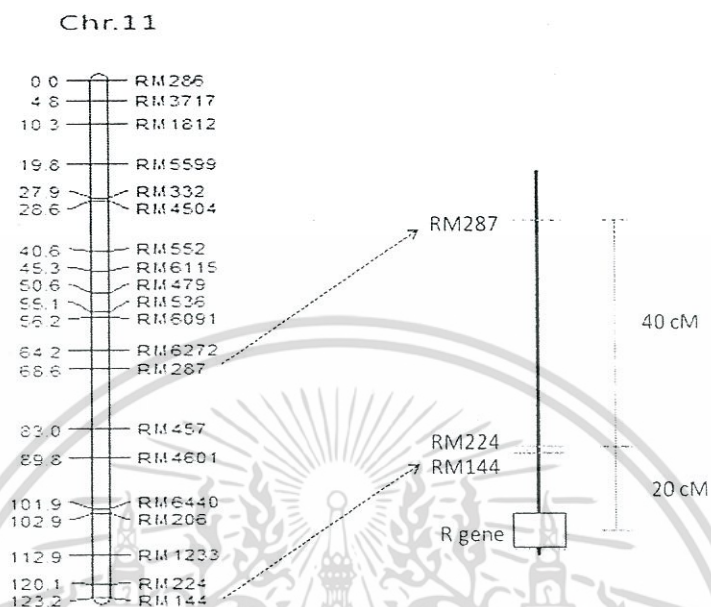
Note: A = susceptible parent allele, B = resistant parent allele, H = alleles from both parents

### Mapping of Resistant Allele

The localisation of the gene of interest is useful for further operations such as map-based cloning, identification of a resistance gene and breeding of a disease-resistant variety. The determination of the frequency of recombination on rice chromosomes would provide an estimated position of the resistant allele. Chromosome 11 was speculated for gene location and was analysed by SSR and additional markers. Fifteen F<sub>2</sub> plants that showed a susceptible phenotype (score 5 and 6) to blast fungi were analysed. As they were phenotypically confirmed, using 15 susceptible plants was sufficient and enabled the percentage of recombination on the chromosome of those plants to be analysed. As shown in Table 6, markers RM224 and RM144 have a similar recombination of 20%. This can be explained by a map of SSR markers [18] as shown on Figure 2, which shows a close proximity of both markers, with a distance of 3.1 cM. RM287 shows 60% recombination, thus indicating that the marker is not linked to the resistant allele. In addition, SSR markers on other

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

chromosomes such as 7, 9 and 12 were also analysed to clarify the gene location. The results show that the recombination percentage of each detected marker is higher than 50% (Table 5).



**Figure 2.** SSR map of resistance gene on rice chromosome 11. The linkage map was obtained from analysis using a KDML105 x GS19769 F<sub>2</sub> population. Location and distance in cM of known SSR markers are shown according to the comparative map available online [18]. The resistance gene is located close to RM224 and RM144.

A number of resistance genes have been identified by SSR markers on chromosome 11, including *Pi34<sup>b</sup>*, *Pi38*, *PiCO39*, *Pik-h*, *Pik-s* and *Pi-1* [5, 23-24]. Among these, the *Pik-h*, *Pik-s* and *Pi-1* genes were reported to link with RM224 at the distance of 0.0 cM. A previous study mapped *Pi-1* gene at a distance of 6.8 cM away from RM144 [23]. However, the resistance gene identified in this study is mapped downstream of RM224 and RM144 with a distance of 20 cM. Therefore, it is possible that it is a new blast-resistance gene candidate.

## CONCLUSIONS

Analysis of leaf blast resistance genes reveals a dominant inheritance pattern controlling the resistant phenotype in the landrace rice cultivar GS19769. The identified resistance gene is found to be a broad-spectrum blast resistance gene as it is resistant to a mixture of 19 blast isolates. From the segregation analysis, the GS19769 cultivar contains more than 1 resistance gene loci. From bulk segregant analysis, the gene is found to be on chromosome 11 and is tightly linked to the SSR markers RM144, being mapped downstream of the markers at a distance of 20 cM. Locating of the resistance gene and the linked SSR markers should help to narrow down the position of the resistance gene in this landrace cultivar.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Fisseha Worede Kirkos, Chatchawan Jantasuriyarat and Antony Buchala for their critical reading of the manuscript. We are grateful to the National Science and Technology Development Agency for the blast isolates used in this study. This research was supported by King

*Maejo Int. J. Sci. Technol.* **2015**, *9*(02), 278-287

Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Research Fund and the Centre of Excellence on Agricultural Biotechnology, Science and Technology Postgraduate Education and Research Development Office, Office of Higher Education Commission, Ministry of Education (AG-BIO/PERDO-CHE).

## REFERENCES

1. S. H. Ou, "Rice Disease I", 2<sup>nd</sup> Edn., Commonwealth Mycological Institute, Kew, **1985**, pp.109-201.
2. P. Mekwatanakarn, P. Cobelli, A. N. L. Noenplab, T. Rithmontree, K. Ketsuwan, C. Klinmanee and S. T. Deerith, "Determination of pathotype diversity of rice blast fungal population in Thailand", *Thai Rice Res. J.*, **2007**, *1*, 52-64.
3. S. Disthaporn, "Current rice blast epidemics and their management in Thailand", in "Rice Blast Disease" (Ed. R. S. Zeigler, S. A., Leong and P. S. Teng), CAB International, Wallingford, **1994**, pp.333-342.
4. H. H. Flor, "Current status of the gene-for-gene concept", *Ann. Rev. Phytopathol.*, **1971**, *9*, 275-296.
5. G. Liu, G. Lu, L. Zeng and G. L. Wang, "Two broad-spectrum blast resistance genes, *Pi9(t)* and *Pi2(t)*, are physically linked on rice chromosome 6", *Mol. Genet. Genom.*, **2002**, *267*, 472-480.
6. Q. Z. Yang, F. Lin, S. J. Feng, L. Wang and Q. H. Pan, "Recent progress on molecular mapping and cloning of blast resistance genes in rice (*Oryza sativa* L.)", *Sci. Agric. Sin.*, **2009**, *42*, 1601-1615.
7. D. H. Chen, M. dela Vina, T. Inukai, D. J. Mackill, P. C. Ronald and R. J. Nelson, "Molecular mapping of the blast resistance gene, *Pi44(t)*, in a line derived from a durably resistant rice cultivar", *Theor. Appl. Genet.*, **1999**, *98*, 1046-1053.
8. Y. Shen, H. Adreit, X. D. Zhu, J. Milazzo, H. Q. Chen and D. Tharreau. "Resistance evaluation of some hybrid rice, conventional early *indica* and late *japonica* rice to *Magnaporthe grisea* in China", *Sci. Agric. Sin.*, **2004**, *37*, 362-369.
9. N. Jiang, Z. Li, J. Wu, Y. Wang, L. Wu, S. Wang, D. Wang, T. Wen, Y. Liang, P. Sun, J. Liu, L. Dai, Z. Wang, C. Wang, M. Luo, X. Liu and G. L. Wang, "Molecular mapping of the *Pi2/9* allelic gene *Pi2-2* conferring broad-spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae* in the rice cultivar Jefferson", *Rice*, **2012**, *5*, 29.
10. X. Zhu, S. Chen, J. Yang, S. Zhou, L. Zeng, J. Han, J. Su, L. Wang and Q. Pan, "The identification of *Pi50(t)*, a new member of the rice blast resistance *Pi2/Pi9* multigene family", *Theor. Appl. Genet.*, **2012**, *124*, 1295-1304.
11. J. Imam, S. Alam, M. Variar and P. Shukla, "Identification of rice blast resistance gene *Pi9* from Indian rice land races with STS marker and its verification by virulence analysis", *Proc. Natl. Acad. Sci. India B: Biol. Sci.*, **2013**, *83*, 499-504.
12. S. D. Tanksley and S. R. McCouch, "Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild", *Science*, **1997**, *277*, 1063-1066.
13. A. Salih, T. Sreewongchai, P. Sripichitt and N. Parinthawong, "Identification of blast-resistant varieties from landrace, improved and wild species of rice", *Kasetsart J. Nat. Sci.*, **2013**, *47*, 1-7.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Maejo Int. J. Sci. Technol.* **2015**, 9(02), 278-287

14. P. Sirithunya, S. Tragoonrung, A. Vanavichit, N. Pa-In, C. Vongsaprom and T. Toojinda, "Quantitative trait loci associated with leaf and neck blast resistance in recombinant inbred line population of rice (*Oryza sativa*)", *DNA Res.*, **2002**, 9, 79-88.
15. T. Sreewongchai, S. Sriprakhon, C. Wongsaprom, A. Vanavichit, T. Toojinda, D. Tharreau and P. Sirithunya, "Genetic mapping of *Magnaporthe grisea* avirulence gene corresponding to leaf and panicle blast resistant QTLs in Jao Hom Nin rice cultivar", *J. Phytopathol.*, **2009**, 157, 338-343.
16. E. Roumen, M. Levy and J. L. Nottigham, "Characterisation of the European pathogen population of *Magnaporthe grisea* by DNA fingerprinting and pathotype analysis", *Eur. J. Plant Pathol.*, **1997**, 103, 363-371.
17. J. J. Doyle and J. L. Doyle, "A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue", *Focus*, **1990**, 12, 13-15.
18. M. K. Monaco, J. Stein, S. Naithani, S. Wei, P. Dharmawardhana, S. Kumari, V. Amarasinghe, K. Youens-Clark, J. Thomason, J. Preece, S. Pasternak, A. Olson, Y. Jiao, Z. Lu, D. Bolser, A. Kerhornou, D. Staines, B. Walts, G. Wu, P. D'Eustachio, R. Haw, D. Croft, P. J. Kersey, L. Stein, P. Jaiswal and D. Ware, "Gramene 2013: Comparative plant genomics resources", *Nucleic Acids Res.*, **2014**, 42 (Database issue), D1193-D1199.
19. H. Benbouza, J.-M. Jacquemin, J.-P. Baudoin and G. Mergeai, "Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels", *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2006**, 10, 77-81.
20. "CropStat for Windows 7.2", International Rice Research Institute, Dapo, Metro Manila, Philippines, **2007**.
21. E. S. Lander, P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M. J. Daly, S. E. Lincoln and L. A. Newburg, "Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations", *Genomics*, **1987**, 1, 174-181.
22. P. Tansian, T. Sreewongchai and N. Parinthawong, "Genetic diversity analysis of rice blast pathogen in Thailand using *Magnaporthe grisea* microsatellite (MGM) markers", Proceedings of 52<sup>nd</sup> Kasetsart University Annual Conference on "Agriculture Sciences: Leading Thailand to World Class Standards", **2014**, Bangkok, Thailand, pp.400-406.
23. S. P. Liu and Y. H. Xue, "Locating rice blast resistance gene by DNA microsatellite markers", *J. Chi. Three Gorges Univ. (Nat. Sci.)*, **2003**, 25, 574-576.
24. M. S. Prasad, B. A. Kanthi, S. M. Balachandran, M. Seshumadhav, K. M. Mohan and B. C. Viraktamath, "Molecular mapping of rice blast resistance gene *Pi-1(t)* in the elite *indica* variety Samba mahsuri", *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **2009**, 25, 1765-1769.

© 2015 by Maejo University, San Sai, Chiang Mai, 50290 Thailand. Reproduction is permitted for noncommercial purposes.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**XVI**

International  
Congress

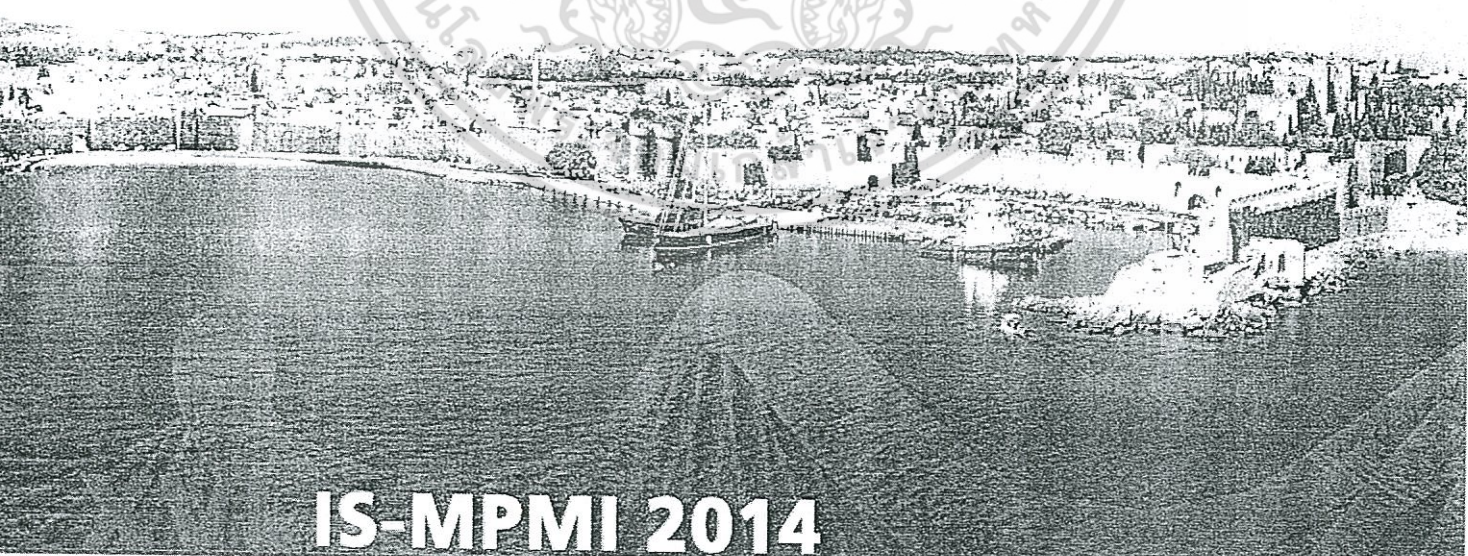


on Molecular  
Plant-Microbe  
Interactions

PROGRAM

**IS-MPMI 2014**

**6-10 JULY 2014 RHODES, GREECE**





P367

## GENETIC MAPPING OF *ORYZA SATIVA* RESISTANCE GENE CORRESPONDING TO LEAF BLAST DISEASE IN LANDRACE RICE CULTIVARS 'GS19769'

P. Tansian<sup>1,2</sup>, T. Sreewongchai<sup>3</sup>, N. Parinthawong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Chalokkrung Rd. Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

<sup>2</sup>Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

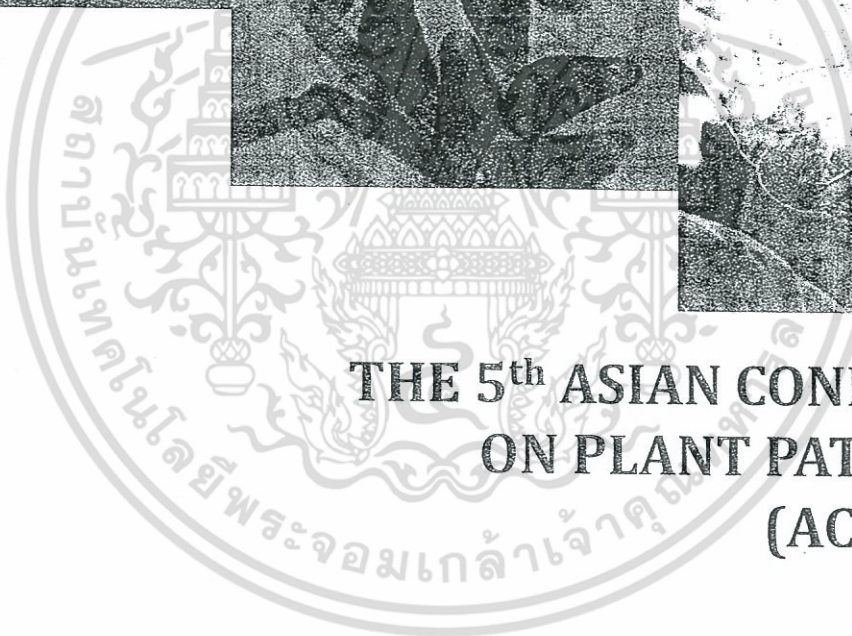
<sup>3</sup>Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

Rice blast caused by *Magnaporthe oryzae* is one of the destructive diseases worldwide including Thailand. Numbers of resistance cultivars were developed by breeding program as it is the most effective and economical way of disease controlling. However, the blast fungi are high in variability and therefore overcome resistance in few years. Therefore, rice cultivars with ability to resist against different blast races are required. In this study, a resistance gene was identified in a landrace rice cultivar 'GS19769' using a mix of 19 blast isolates collected from several disease epidemic areas of Thailand. An F<sub>2</sub> population was generated by crossing 'GS19769' with KDML105, a well known aromatic but blast disease susceptible cultivar. Segregation analysis in F<sub>2</sub> population has shown that 'GS19769' contained more than 1 resistance genes where Chi-square test for segregation of resistance and susceptibility fitted the ratio of 1:2:1. Bulk segregant analysis (BSA) using simple sequence repeat (SSR) markers was carried out and resulted that the identified resistance gene was linked to SSR markers RM144 on chromosome 11. Analysis on 15 F<sub>2</sub> plants appearing susceptible phenotype to blast inoculation was conducted. The gene was mapped to chromosome 11 with a distance of 20 cM from RM144. The location of the resistance gene and the linked SSR markers will help to narrow down the position of the resistance gene in this landrace cultivar.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



# Book of Abstracts



**THE 5<sup>th</sup> ASIAN CONFERENCE  
ON PLANT PATHOLOGY  
(ACPP2014)**

**November 3-6, 2014**

**The Empress Hotel  
Chiang Mai, THAILAND**

Organized by



ผู้จัดทำสารบัญที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้คัดลอกหรือเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

P-1-5

## Marker Assisted Selection of Gene Resistance to Leaf Blast Disease in Thai Landrace Rice

Nonglak Parinthawong<sup>1,\*</sup>, Siriporn Pramrit<sup>1,2</sup> and Tanee Sreewongchai<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Chalongkrung Rd. Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

<sup>2</sup> Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

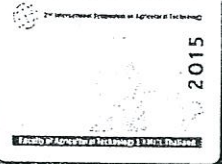
<sup>3</sup> Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

Email: kpnongla@kmitl.ac.th; tel.: +66 2 3298513; fax: +66 2 3298513

### Abstract

Rice blast disease caused by *Magnaporthe oryzae*, is one of the most devastating diseases of rice growing countries worldwide. Development of resistant cultivar is an effective approach for disease control, however, the new cultivars developed often lose their resistance after a few years because of high variability of the causal fungus. Therefore, generating a rice cultivar which is able to resist the infection of several blast isolates is another goal of rice breeder. In this study, the landrace cultivar 'GS20874' was selected as no symptom appeared at 7 days after inoculation with a mix of 29 blast isolates collected from several disease epidemic areas of Thailand. The selected cultivar was used to generate the mapping population. Segregation analysis in the F<sub>2</sub> population has shown that 'GS20874' contained more than one resistant gene with the Chi-square test for segregation of resistance and susceptible fitted the ratio of 9:3:3:1. Analysis using simple sequence repeat (SSR) markers was conducted. Two hundred and thirty SSR markers were screened for polymorphism between the parents KDML105 and 'GS20874'. The 111 SSR markers which were widely distributed along 12 rice chromosomes were obtained and were then used in bulk segregant analysis (BSA). Out of the 111 SSR markers, 3 markers including RM495, RM543 and RM251 from chromosomes 1, 1 and 3, respectively, were selected and are being used in the analysis of an individual F<sub>2</sub> population. Identification of the location of the resistant gene and the linked SSR markers will help to narrow down the resistant gene in this landrace cultivar.

Keywords: Rice blast resistance, *Magnaporthe oryzae*, Simple sequence repeat markers



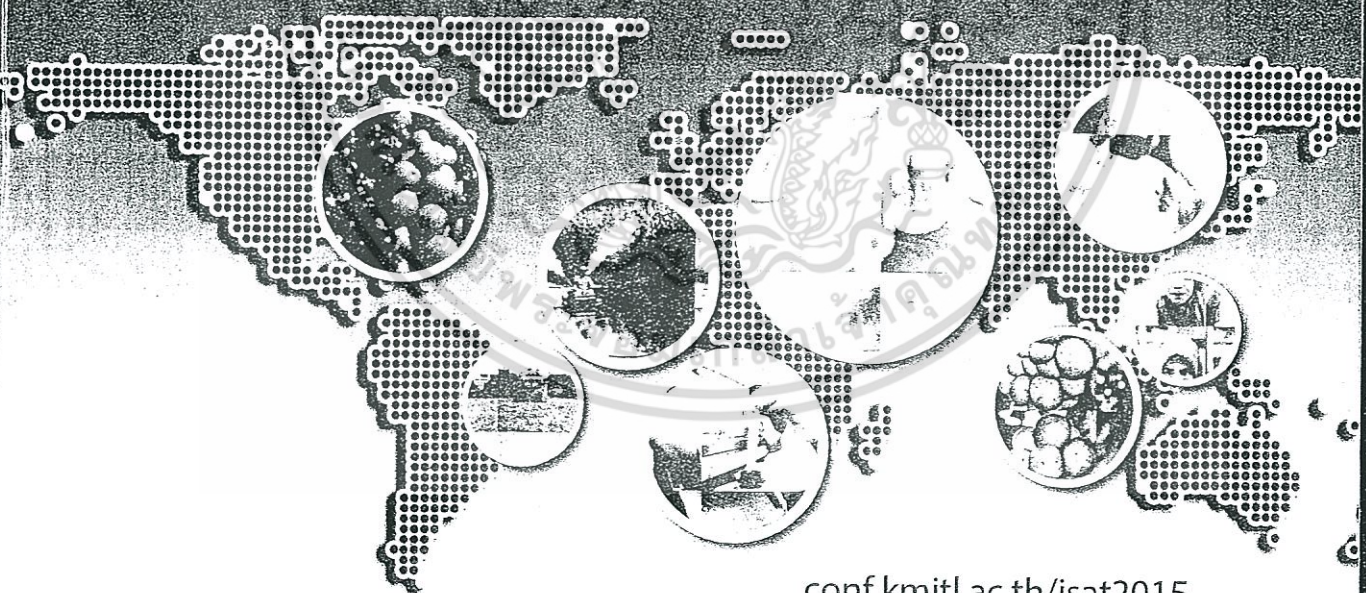
# 2<sup>nd</sup> International Symposium on Agricultural Technology

*Global Agriculture Trends for Sustainability*

July 1-3, 2015

A-One The Royal Cruise Hotel  
Pattaya, Thailand

## BOOK OF ABSTRACTS



[conf.kmitl.ac.th/isat2015](http://conf.kmitl.ac.th/isat2015)

Organized by  
Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang(KMITL)

Major Sponsors



บริษัท เอเชียน ฟีด จำกัด  
ASIAN FEED CO.,LTD.

## Identification of Blast Resistance Gene in Yang Mawng Variety of Thai Indigenous Rice

Siriporn PRAMRIT<sup>1,2\*</sup> and Nonglak PARINTHAWONG<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Agricultural Biotechnology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

<sup>2</sup>Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

<sup>3</sup>Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

\*Corresponding email: siripornpramrit@gmail.com

### ABSTRACT

Rice blast, caused by *Pyricularia oryzae*, is a major disease of rice almost worldwide. KDML105 is a good quality cultivar, however, this cultivar is susceptible to rice blast disease. Therefore, finding of new rice blast resistance gene is a major approach for rice breeding program. A Thai indigenous rice variety, Yang mawng, is highly resistant to the infection of *P. oryzae*. In this study, an F<sub>2</sub> population was developed from a cross between KDML105 and Yang mawng. Two hundred and twenty eight F<sub>2</sub> plants were inoculated with conidia suspension of *P. oryzae* (10<sup>5</sup> conidia/mL) and the disease was scored 7 days later. The segregation of resistance and susceptible phenotype showed a goodness of fit to the ratio 15:1. Two hundred and thirty simple sequence repeat (SSR) markers were screened for polymorphism. The result showed that 111 markers showed polymorphism between the parents KDML105 and Yang mawng. Bulk segregant analysis (BSA) was conducted using 111 SSR markers and four markers included RM495, RM431, RM443 and RM543 were obtained. This suggested that, the gene that control blast disease resistance in Yang mawng variety might locate on chromosome 1 of rice genome. The four markers will be used in further analysis of an individual F<sub>2</sub> population in order identify the SSR markers linked to blast resistance gene.

**Keywords:** Rice blast, Blast resistance gene, *Pyricularia oryzae*

## สรุปการใช้จ่ายเงิน

สัญญาเลขที่ KREF045401

โครงการ ภาษาไทย การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* จากแหล่งพันธุกรรมข้าวพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย

ภาษาอังกฤษ Screening and molecular mapping of rice blast resistance gene corresponding to rice blast fungus (*Pyricularia grisea*) from landrace rice of Thailand

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย ผู้รับทุน ผศ.ดร. นงลักษณ์ เภรินทวงศ์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 21 มิถุนายน 2556 ถึงวันที่ 9 กันยายน 2559

สรุปงบประมาณค่าใช้จ่ายที่ใช้ นับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยถึงปัจจุบัน

หมวดค่าใช้จ่าย	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	ค่าใช้จ่ายจากรายงานครั้งก่อน	ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน	รวมค่าใช้จ่ายสะสมถึงปัจจุบัน	คงเหลือ (หรือเกิน)
งบบุคลากร: ค่าจ้างชั่วคราว					
งบดำเนินงาน:					
ค่าตอบแทน	144,000.00	108,000.00	-	108,000.00	36,000.00
ค่าใช้สอย	102,000.00	50,649.00	52,201.14	102,850.14	-850.14
ค่าวัสดุ	234,000.00	76,712.61	158,500.00	235,212.61	-1,212.61
ค่าสาธารณูปโภค					
งบลงทุน: ค่าครุภัณฑ์					
<b>รวม</b>	<b>480,000</b>	<b>235,361.61</b>	<b>210,701.14</b>	<b>446,062.75</b>	<b>-2,062.75</b>

### จำนวนเงินที่ได้รับและจำนวนเงินที่ใช้จ่าย

งวดเงินที่ได้รับ	จำนวนเงินที่ได้รับ (บาท)	เมื่อ (ระบุนวัน เดือน ปี)
งวดที่ 1	237,000.00	11 กรกฎาคม 2554
งวดที่ 2	207,000.00	25 สิงหาคม 2557
<b>รวม</b>	<b>444,000.00</b>	

งวดที่	จำนวนเงินที่ใช้จ่าย (บาท)	เมื่อ (ระบุนวัน เดือน ปี)
งวดที่ 1	54,061.00	21 ธันวาคม 2554
งวดที่ 2	69,606.20	28 มิถุนายน 2555
งวดที่ 3	111,694.41	21 มิถุนายน 2556
งวดที่ 4	210,701.14	9 กันยายน 2559
<b>รวม</b>	<b>446,062.75</b>	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดอกเบี้ยที่ได้รับระหว่างดำเนินโครงการ

ครั้งที่	จำนวนเงิน	เมื่อ (ระบุ วัน เดือน ปี)
ดอกเบี้ย ครั้งที่ 1	823.91	25 ธันวาคม 2554
ดอกเบี้ย ครั้งที่ 2	461.76	25 มิถุนายน 2555
ดอกเบี้ย ครั้งที่ 3	195.93	25 ธันวาคม 2555
ดอกเบี้ย ครั้งที่ 4	7.41	25 มิถุนายน 2556
ดอกเบี้ย ครั้งที่ 5	1.79	25 ธันวาคม 2556
ดอกเบี้ย ครั้งที่ 6	1.05	25 มิถุนายน 2557
ดอกเบี้ย ครั้งที่ 7	260.40	25 ธันวาคม 2557
ดอกเบี้ย ครั้งที่ 8	265.17	25 มิถุนายน 2558
รวมดอกเบี้ย	2,017.42	

จำนวนเงินคงเหลือ 1-2 =  $444,000.00 - 446,062.75 = -2,062.75$  บาท

.....  
ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

.....  
ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติผู้วิจัย

- ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว นงลักษณ์ เกรินทวงศ์  
(ภาษาอังกฤษ) Miss Nonglak Parinthawong
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3220100451961
- หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520  
โทรศัพท์ 089-8216377 โทรสาร 02-3298513  
e-mail nonglak.pa@kmitl.ac.th , ae\_nonglak@hotmail.com

## 4. ประวัติการศึกษา

ชื่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
Ph.D.	Plant Biology	University of Fribourg, Switzerland	2548
วท.ม.	เกษตรศาสตร์	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2543
วท.บ.	เกษตรศาสตร์	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	2537

## 5. ประสบการณ์งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และ/หรือ ที่ผ่านมา ทั้งภายในและภายนอกประเทศ

## 5.1 ในฐานะหัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาการแสดงออกของยีนต้านทานต่อโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจในผักสลัดที่ปลูกในระบบปลูกแบบไม่ใช้ดิน ภายหลังจากชักนำด้วย salicylic acid, methyl jasmonate และ B-aminobutyric acid เพื่อการพัฒนาเป็น gene marker สำหรับการตรวจหาระดับความต้านทานโรค

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร. นงลักษณ์ เกรินทวงศ์

ผู้ร่วมวิจัย ผศ.ดร. พรหมมาศ คูหากาญจน์

แหล่งทุน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ปีงบประมาณ 2551 ปีที่แล้วเสร็จ 2555

ชื่อโครงการวิจัย ผลของสารสกัดจากขมิ้นชัน ว่านน้ำ ตะบูนดำ และมะคำดีควาย ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคทางใบของพืช

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร. นงลักษณ์ เกรินทวงศ์

ผู้ร่วมโครงการวิจัย นางสาวชัชฎา ยั่งยืนิตย์

แหล่งทุน คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ปีงบประมาณ 2552 ปีที่แล้วเสร็จ 2555

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาอินทอร์โมนของข้าวในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นเป็นประโยชน์ในการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวหน้าโครงการวิจัย	ดร. นงลักษณ์ เกรินทวงศ์
แหล่งทุน	ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ปีงบประมาณ	2556 อยู่ในระหว่างการตีพิมพ์ผลงานวิจัย

## 5.2 ในฐานะผู้ร่วมโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย	การปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงโดยวิธีตัดแต่งพันธุกรรม
หัวหน้าโครงการ	รศ.ดร. สุเม อรัญนารถ
ผู้ร่วมโครงการ	ผศ.ดร. กัญจนา แซ่เตียว ดร. นงลักษณ์ เกรินทวงศ์
แหล่งทุน	กองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
ปีงบประมาณ	2551 อยู่ในระหว่างการเตรียมรายงานฉบับสมบูรณ์
ชื่อโครงการวิจัย	การทดสอบระบบการผลิตมะละกออย่างยั่งยืนในพื้นที่จังหวัดสระแก้ว
หัวหน้าโครงการ	ดร. ลำแพน ขวัญพูล
ผู้ร่วมโครงการ	ดร. นงลักษณ์ เกรินทวงศ์ นางสาวนิภาพร ยลสวัสดิ์
แหล่งทุน	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
ปีงบประมาณ	2552 ปีที่แล้วเสร็จ 2556

## 5.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

### ระดับนานาชาติ

- 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(02): 278-287.
- Pramrit, S. and N. Parinthawong. 2015. Identification of blast resistance gene in Yang Mawng variety of Thai indigenous rice. page 309-312 In Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Agricultural Technology. July 1-3, 2015, A-One The Royal Cruise Hotel, Pattaya, Thailand. (Proceeding-Poster)
- Pradubyat, M., Parinthawong, N. and T. Jaenaksorn, 2015. Gene expression analysis in lettuce (*Lactuca sativa* L.) treated with *Trichoderma* spp. page 169-172 In Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Agricultural Technology. July 1-3, 2015, A-One The Royal Cruise Hotel, Pattaya, Thailand. (Proceeding-Poster)
- Talubnak, C., Parinthawong, N. and T. Jaenaksorn. 2015. *In vitro* production of cell wall degrading enzymes by *Pythium* species isolated from asymptomatic and symptomatic lettuce root. page 165-168 In Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Agricultural Technology. July 1-3, 2015, A-One The Royal Cruise Hotel, Pattaya, Thailand. (Proceeding-Poster)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Saetiew, K., Leethaweesup, W., **Parinthawong, N.** and S. Arunyanart. 2014. Transformation of antisense dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*) into sacred lotus 'Buntharik' using *Agrobacterium*-mediated gene transfer. *Acts Horticulturae (ISHS)*, 1025: 99-106.
- Salih, A., Sreewongchai, T., Sripichitt, P and **N. Parinthawong**. 2013. Identification of blast-resistant varieties from landrace, improved and wild species of rice. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 47: 1-7.
- Buathong, R., Saetiew, K., Phansiri, S., **Parinthawong, N.** and S. Arunyanart. 2013. Tissue culture and transformation of the antisense *DFR* gene into lotus (*Nelumbo nucifera* Gaerth.) through particle bombardment. *Scientia Horticulturae*, 161: 216-222.
- Tansian, P., Jaihom, N. and **N. Parinthawong**. 2012. Effect of some plant crude extracts on conidia germination and mycelia growth of rice blast fungus (*Pyricularia grisea*). Poster presented at The International Conference on Tropical and Sub-tropical Plant Diseases 2012. February 7-10, 2012.
- Parinthawong, N.** and R. Moonsarn. 2010. Effects of some plant crude extracts on mycelia growth of *Colletotrichum* sp. Proceedings of 16<sup>th</sup> Asian Agricultural Symposium and 1<sup>st</sup> International Symposium on Agricultural Technology. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.
- Parinthawong, N.**, P. Tansian and C. Youngnit. 2010. Effects of three plant crude extracts on fungal spore germination and hyphal growth of *Curvularia* sp. Proceedings of 16<sup>th</sup> Asian Agricultural Symposium and 1<sup>st</sup> International Symposium on Agricultural Technology. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand. p710-713.
- Talubnak, C., P. Koohakan, **N. Parinthawong** and T. Jaenaksorn. 2010. Effect of the indigenous non-pathogenic *Pythium* spp. on growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in hydroponics. Proceedings of 16<sup>th</sup> Asian Agricultural Symposium and 1<sup>st</sup> International Symposium on Agricultural Technology. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.
- Koohakan, P., J. Rangaroen, **N. Parinthawong** and T. Jaenaksorn. 2010. Distribution of bacterial antagonist in hydroponics. Proceedings of 16<sup>th</sup> Asian Agricultural Symposium and 1<sup>st</sup> International Symposium on Agricultural Technology. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

## ระดับชาติ

นวรรตน์ ไจหอม และ **นงลักษณ์ เกรินทวงศ์**. 2557. การประเมินความหลากหลายและการจัดกลุ่มความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวที่เก็บรวบรวมในประเทศไทย. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 52 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 4-7 กุมภาพันธ์ 2557. หน้า 71-78.

นวรรตน์ ไจหอม สุภาภรณ์ เอี่ยมข่ง และ **นงลักษณ์ เกรินทวงศ์**. 2557. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว (*Pyricularia grisea*) ที่เก็บรวบรวมในประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 32(3): 52-60.

เพ็ญญา ตันเขียน ธานี ศรีวงศ์ชัย และ **นงลักษณ์ เกรินทวงศ์**. 2557. วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 52 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 4-7 กุมภาพันธ์ 2557. หน้า 400-406.

**นงลักษณ์ เกรินทวงศ์**. 2556. กลไกการต้านทานโรคของพืช. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 31(3): 76-82.

ชัยวรกุล ไชยปัญญา กัญจนา แซ่เตียว สุเม อรัญญา และ **นงลักษณ์ เกรินทวงศ์**. 2555. การโคลนและศึกษาการแสดงออกของยีน Flavanone 3-Hydroxylase (*F3H*) ในอุบลชาติล้มลุกเซนต์หลุยส์. เรื่องเต็มการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 11. 1-3 กุมภาพันธ์ 2555.

วรวิติ เอื้อมงคลการ กัญจนา แซ่เตียว สุเม อรัญญา และ **นงลักษณ์ เกรินทวงศ์**. 2555. การสร้าง DNA สายผสมของยีน chalcone 4'-O-glucosyltransferase (*4'CGT*) from snapdragon (*Antirrhinum majus*) เพื่อการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงพันธุ์ไทย. เรื่องเต็มการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 11. 1-3 กุมภาพันธ์ 2555.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้