รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

พันธุกรรมควบคุมลักษณะและระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมอง

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

ประเภททุน ทุนงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

นางสาวนงลักษณ์ เภรินทวงค์ หัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวศิริพร เปรมฤทธิ์

ได้รับการสนับสนุนเงินวิจัยจากภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

พันธุกรรมควบคุมลักษณะและระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมอง

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

ประเภททุน ทุนงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

นางสาวนงลักษณ์ เภรินทวงค์ หัวหน้าโครงการวิจัย
นางสาวศิริพร เปรมฤทธิ์

RCH
ฬ148พ
2558

เลขหมู่ 147847
เลขทะเบียน
วัน.เดือน.ปี 15 ก.ค. 2560

b. 12854153
i.

ได้รับการสนับสนุนเงินวิจัยจากภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ พันธุกรรมควบคุมลักษณะและระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมอง
Genetic inheritance and molecular mapping of blast resistant gene in Yang mawng variety of Thai indigenous rice

แหล่งเงิน งบประมาณเงินรายได้ คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ประจำปีงบประมาณ 2558 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 100,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ วันที่ 1 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2557 ถึง 30 เดือนกันยายน พ.ศ. 2558

หัวหน้าโครงการ นางสาวนงลักษณ์ เภรินทวงค์
ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

โรคไหม้ข้าวเกิดจากเชื้อรา *Pyricularia oryza* เป็นโรคที่มีความสำคัญและสร้างความเสียหายให้กับผลผลิตเป็นอย่างมาก การใช้พันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานถือเป็นวิธีการป้องกันที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด อย่างไรก็ตามพันธุ์ต้านทานมักจะสูญเสียความต้านทานในระยะเวลาไม่นานเนื่องจากเชื้อราสาเหตุโรคไหม้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถปรับตัวเข้าทำลายพันธุ์ข้าวต้านทานภายในเวลาไม่กี่ฤดูปลูก ดังนั้นการค้นหาและระบุยีนต้านทานโรคไหม้ที่สามารถต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้หลากหลายสายพันธุ์จึงมีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2 – population) ระหว่างข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมอง)GS20874) ซึ่งมีลักษณะต้านทานโรคไหม้ในระดับดี และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 228 ต้น ด้วยเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 19 ไอโซเลทศึกษาปฏิกิริยาของยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 โดยประเมินการเกิดโรค 7 วัน ภายหลังการปลูกเชื้อราที่มีความเข้มข้น 10^5 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร พบการกระจายตัวของลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อโรคไหม้ในอัตราส่วน ต้นต้านทาน : ต้นอ่อนแอ คือ 15:1 (P =0.011, df=1.0) แสดงว่าข้าวพันธุ์ยั้งมองมียีนหลักในการควบคุมลักษณะความต้านทานมากกว่า 1 ยีน ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมาย microsatellite โดยคัดเลือกเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ได้ 111 เครื่องหมาย จากทั้งหมด 230 เครื่องหมาย จากนั้นคัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความต้านทานและความอ่อนแอด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) พบ 3 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM543, RM443 และ RM431 การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ทั้ง 3 เครื่องหมาย ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 จำนวน 228 ต้น มีอัตราส่วนระหว่างผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (A) : ผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ (H) : ผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (B) เป็น 1:2:1 ด้วยค่า P เท่ากับ 0.51, 0.005 และ 0.32 ตามลำดับ เมื่อสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้โปรแกรม MAPMAKER พบว่ายีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคมีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมายที่บริเวณปลายด้านล่างโครโมโซมที่ 1 คือ RM443, RM431 และ RM543 เป็นระยะทาง 45.8, 73.6 และ 85.1 cM ตามลำดับ

คำสำคัญ ข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย พันธุ์ต้านทานโรคไหม้ การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล *Pyricularia grisea* ความต้านทานโรคแบบกว้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

Rice blast, caused by *Pyricularia oryzae* are major disease, which cause severe losses to yield and quality of rice. Utilization of the rice blast resistant varieties is considered to be the most effective and economical method to control the disease. However, resistant varieties are usually 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 study, two hundred and twenty eight F_2 population was developed from a cross between Yang Mawng)GS20874) which showed high resistance against several blast isolates and KDML105. Plants were inoculated with mixed of 19 isolates at concentration of 10^5 conidia/ml. 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 (P =0.011, df=1.0), indicating that Yang mawng variety carried more than one of major dominant resistant allele. Two hundred and thirty simple sequence repeat (SSR) markers were screened for polymorphism. One hundred and eleven markers showed polymorphism between the parents KDML105 and Yang mawng. Bulk segregant analysis (BSA) was conducted and 3 markers included RM4543, RM431 and RM443 were obtained. This suggested that, the gene that control blast disease resistance in Yang mawng variety might locate on chromosome 1 of rice genome. Distribution of 3 microsatellite markers in 228 F_2- plants for the proportion of the susceptible parent allele; A: both parent allele; H: resistant parent allele; B, showed a good fit to the ratio of 1:2:1 with the P value of 0.51, 0.005 and 0.32, respectively. The linkage analysis with these markers showed that the blast resistant gene was linked to the markers RM543, RM431 and RM443 at the distance 85.1, 73.6 and 45.8 centimorgans (cM), respectively.

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 และภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อราโรคไหม้ที่ใช้ในการทดสอบ

ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) สำหรับการสนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือทางอณูชีววิทยา ในการดำเนินโครงการวิจัยและการสนับสนุนทุนสำหรับฝึกอบรมแก่นักศึกษาผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย

นงลักษณ์ เภรินทวงค์
หัวหน้าโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	V
สารบัญ	VI
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญภาพ	IX
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 แนวคิด ทฤษฎีหลัก	3
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.2.1 โรคไหม้ของข้าว	3
2.2.2 แหล่งของความต้านทานโรคไหม้	4
2.2.3 เครื่องหมายดีเอ็นเอ	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	7
3.1 การสร้างประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1-hybrid)	7
3.2 การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้โดยใช้วิธีทดสอบการเกิดโรคในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2)	7
บทที่ 4 ผลการวิจัย	12
4.1 ประชากรข้าวชั่วที่ 2	12
4.2 การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้โดยวิธีทดสอบการเกิดโรคไหม้ในประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2)	12
4.3 เครื่องหมาย microsatellite ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ยั้งมอง	13
4.4 เครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอต่อโรคไหม้	13
4.5 การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2)	14
4.6 การสร้างแผนที่เพื่อระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MAPMAKER	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	19
5.1 การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2)	19
5.2 แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้	19
บทที่ 6 สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย	21
6.1 ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่	
6.2 การร่วมประชุมวิชาการ	
บรรณานุกรม	22
ภาคผนวก	25
เอกสารหลักฐานอ้างอิงของผลผลิต	26
สรุปการใช้จ่ายเงิน	
ประวัติผู้วิจัย	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	อัตราการกระจายตัวของลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 19 ไอโซเลทในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2) จำนวน 228 ต้น	13
4.2	การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน ต้น 228	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
3.1	เกณฑ์ให้คะแนนการเกิดโรคตามระดับคะแนน	9
4.1	ผลวิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) ของเครื่องหมาย RM431, RM443, RM495 และ RM543 ระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์ยั้งมอง ประชากรข้าวกลุ่มต้านทานโรคไหม้ และประชากรข้าวกลุ่มอ่อนแอต่อโรคไหม้	14
4.2	รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM543 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2) เปรียบเทียบกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ยั้งมอง	17
4.3	รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM443 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2) เปรียบเทียบกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ยั้งมอง	17
4.4	รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM431 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2) เปรียบเทียบกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ยั้งมอง	17
4.5	แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ และระยะห่างระหว่างเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 1 ของข้าว วิเคราะห์ในประชากรข้าว 5 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 19 ไอโซเลท	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวเป็นพืชอาหารที่สำคัญของโลก ประชากรโลกมากกว่าครึ่งโลกโดยเฉพาะประชากรในทวีปเอเชียบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก แหล่งปลูกข้าวที่สำคัญจึงอยู่ในทวีปเอเชีย ในปี พ.ศ. 2556 ประเทศไทยส่งออกข้าวมากเป็นอันดับ 3 ของโลก (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2556) ปริมาณส่งออกรวม 6.61 ล้านตันข้าวสาร มูลค่า 133,839 ล้านบาท ทั้งนี้ปริมาณข้าวที่ส่งออกแยกเป็นข้าวหอมมะลิ 29 เปอร์เซ็นต์ หรือ 1.91 ล้านตันข้าวสาร (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2556) ข้าวหอมมะลิของไทยเป็นที่นิยมทั้งชาวไทยและชาวต่างประเทศ เนื่องจากมีคุณลักษณะเด่น คือเป็นข้าวที่มีอะมิโลสต่ำ คือประมาณ 13.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหุงเป็นข้าวสุกจึงมีลักษณะนุ่มเหนียว และที่สำคัญมีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์ กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ประกาศรับรองว่าข้าวหอมมะลิของไทยคือพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ปริมาณการผลิตข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในประเทศไทยยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภคทั่วโลก และยังประสบปัญหาการสูญเสียผลผลิตที่เกิดจากการเข้าทำลายของโรคไหม้ เนื่องจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ (กรมการข้าว. 2556; สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว. 2553)

โรคไหม้ของข้าวเกิดจากเชื้อราสาเหตุ *Pyricularia grisea* Sacc. มีชื่อเรียกในระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศว่า *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr. เชื้อราสามารถปรับตัวได้ดีในทุกสภาพแวดล้อม มีพืชอาศัยกว้าง สามารถเข้าทำลายข้าวได้เกือบทุกระยะการเจริญเติบโต ทำให้เกิดการระบาดอย่างรุนแรงในทุกพื้นที่ที่มีการปลูกข้าว ทำให้ผลผลิตเสียหายเป็นจำนวนมาก (พูนศักดิ์, 2548)

การควบคุมโรคพืช เช่น โรคไหม้ในข้าวโดยใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีการที่เหมาะสมมากวิธีหนึ่ง เนื่องจากการใช้พันธุ์ต้านทาน ให้ผลคุ้มค่าในระยะยาว ช่วยลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรค ส่งผลให้ต้นทุนในการปลูกข้าวลดลง และลดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมได้ (พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ และคณะ. 2550) ปัจจุบันได้มีการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวประมาณ 96 ยีน และมียีนต้านทานโรคไหม้ 9 ยีนที่ได้ทำการโคลนยีนและมีข้อมูลลำดับเบสแล้ว ได้แก่ ยีน *Pi-b*, *Pi-ta*, *Pi-kh*, *Pi37*, *Piz-5*, *Piz-t*, *Pi9*, *Pid2* และ *Pi36* (Miah *et al*. 2012) ถึงแม้ว่าการใช้พันธุ์ต้านทานจะเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมาก แต่การใช้ยีนต้านทานโรคไหม้แบบแคบที่จำเพาะกับเชื้อสาเหตุของโรคเพียงไม่กี่สายพันธุ์มักจะส่งผลให้ข้าวพันธุ์ต้านทานสูญเสียความต้านทานต่อโรคได้ภายในระยะเวลาไม่กี่ปี เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคไหม้มีการปรับตัวและมีวิวัฒนาการให้สามารถเข้าทำลายข้าวได้ (Sreewongchai *et al*. 2010) ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาและค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ใหม่ๆ ในข้าวอยู่เสมอ และแหล่งพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้ส่วนใหญ่ได้มาจากข้าวพันธุ์พื้นเมือง (ชัชวาล และ สุรีพร. 2552) แนวทางการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ในประเทศไทยจึงควรเลือกใช้ยีนต้านทานโรคไหม้ที่ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้หลากหลายสายพันธุ์ และควรมีการรวมยีนต้านทานโรคไหม้หลายๆ ยีนไว้ด้วยกัน เพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานโรคไหม้ได้อย่างยั่งยืน (ศรีสวัสดิ์ ขันทอง และคณะ. 2553)

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาและระบุตำแหน่งของยีนต้านทานต่อโรคไหม้จากข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ยั้งมอง ยีนที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นพื้นฐานข้อมูลที่สำคัญและอาจเป็นประโยชน์อย่างมากในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมคุณภาพดีของไทยให้ต้านทานต่อโรคไหม้อย่างยั่งยืนในอนาคต ซึ่งส่งผลให้ประเทศไทยส่งออกข้าวหอมมะลิได้มากขึ้น เป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของข้าวหอมไทยในตลาดโลก

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาปฏิกิริยาของยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ยั้งมอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.2 เพื่อระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

เลือกพันธุ์ข้าวพื้นเมือง ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ที่จะนำมาสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) โดยนำมาผสมกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อโรคไหม้แต่มีลักษณะที่ดี ทำการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวพันธุ์ข้าวพื้นเมืองกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 เมื่อได้ประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) นำไปปลูกและปล่อยให้มีการผสมตัวเองตามธรรมชาติจนได้ประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) นำไปทดสอบความต้านทานโรคไหม้และเก็บตัวอย่างใบข้าวทุกต้นเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอและใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ที่ครอบคลุมทั้ง 12 โครโมโซมของข้าว ทำการคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ได้ จากนั้นนำเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่มาแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) และทำการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้ว และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติร่วมกับข้อมูลฟีโนไทป์เพื่อสร้างแผนที่ยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบปฏิกิริยาของยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ยั้งมอง

1.4.2 ทราบตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ที่พบบนแผนที่พันธุกรรมของข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิด ทฤษฎีหลัก

ข้าว (Oryza sativa) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อประเทศไทย เนื่องจากข้าวเป็นอาหารหลักของคนไทย ผลผลิตข้าวกว่าร้อยละ 55 ใช้บริโภคในประเทศ ส่วนที่เหลืออีกประมาณร้อยละ 45 ส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศ ประเทศไทยส่งออกข้าวมากเป็นอันดับ 1 ของโลก (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2558) ปริมาณส่งออกรวม 857 ล้านตันข้าวสาร มูลค่า 13,680 ล้านบาท ทั้งนี้ปริมาณข้าวที่ส่งออกแยกเป็นข้าวหอมมะลิ 1.73 ล้านตันข้าวสาร (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558) ข้าวหอมมะลิของไทยเป็นที่นิยมทั้งชาวไทยและชาวต่างประเทศเนื่องจากมีคุณลักษณะเด่นคือ เป็นข้าวที่มีอะมิโลสต่ำ เมื่อหุงเป็นข้าวสุกจึงมีลักษณะนุ่มเหนียว และที่สำคัญมีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์ กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ประกาศรับรองว่าข้าวหอมมะลิของไทย คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ปริมาณการผลิตข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในประเทศไทยยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภคทั่วโลกและยังประสบปัญหาการสูญเสียผลผลิตเนื่องจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ (กรมการข้าว, 2556 และสำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2553)

โรคไหม้มีสาเหตุจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* (asexual stage) หรือ *Magnaporthe grisea* (sexual stage) สามารถระบาดได้ในทุกพื้นที่ปลูกข้าวทั่วโลก สร้างความเสียหายรุนแรงต่อคุณภาพและปริมาณของผลผลิตข้าว โดยสามารถทำให้ผลผลิตข้าวลดลงได้ตั้งแต่ร้อยละ 11-90 (Zeigler *et al.*, 1994) การป้องกันโรคไหม้ที่มีประสิทธิภาพสูง คือ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานต่อโรคไหม้ อย่างไรก็ตาม เมื่อปลูกข้าวพันธุ์ต้านทานที่มียีนต้านทานเพียงตัวเดียว พบว่าพันธุ์ต้านทานดังกล่าวจะสูญเสียความต้านทานไปภายในเวลาเพียงไม่กี่ปี ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานต่อโรคอยู่เสมอ โดยใช้แหล่งของความต้านทานใหม่ๆ ที่สามารถต้านทานต่อโรคไหม้ได้แบบกว้าง)broad spectrum resistance) (อภิชาติ และคณะ, 2544)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.2.1 โรคไหม้ของข้าว (Rice Blast Disease)

ประเทศไทยมีรายงานว่าพบโรคนี้ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2496 โดยแผนกโรควิทยา กองพืชพันธุ์ กรม กสิกรรม โดยเกิดกับข้าวพันธุ์หอมเศรษฐี ที่สถานีทดลองเกษตรกลางบางเขน และบริเวณใกล้สถานีรถไฟมักกะสัน สันนิษฐานว่าโรคนี้อาจติดมากับข้าวที่มาจากประเทศญี่ปุ่นสมัยสงครามโรคครั้งที่ 2 (ชวาลา, 2531)

เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ของข้าวสามารถเข้าทำลายได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง เชื้อราสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของต้นข้าว ตั้งแต่ใบ ลำต้น ข้อ และคอรวง โดยพูนศักดิ์ (2548) แบ่งอาการของโรคตามอายุของต้นข้าวออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะกล้า พบอาการของโรคเป็นจุดสีน้ำตาลขนาดเล็ก 1 - 2 มิลลิเมตร ในระยะที่เชื้อเข้าทำลายในวันที่ 1 - 2 วันแรก จากนั้นแผลจะเริ่มขยายใหญ่ขึ้นและเปลี่ยนเป็นจุดสีเทาลักษณะช้ำน้ำขนาดของแผลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร จะพบลักษณะของแผลนี้เมื่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้เข้าทำลายได้ 3 - 5 วัน ต่อมาแผลจุดช้ำน้ำจะเปลี่ยนเป็นรูปตาสีเทาขอบแผลสีน้ำตาล ขนาดของแผลกว้างประมาณ 3 - 5 มิลลิเมตร และยาว 5 – 15 มิลลิเมตร อาการเช่นนี้จะพบมากเมื่อเข้าทำลายได้ 7 – 10 วัน ในกรณีที่มีการระบาดรุนแรงจะพบจุดช้ำน้ำในปริมาณมากทั่วทั้งใบทำให้ใบแห้งตายคล้ายถูกน้ำร้อนลวก และในที่สุดทำให้ต้นกล้าฟุบตายได้ ระยะแตกกอ พบเชื้อสาเหตุโรคไหม้เข้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำลายได้ที่ ใบ กาบใบ ข้อต่อใบ และข้อต่อลำต้น อาการส่วนใหญ่จะพบจุดสีน้ำตาลรูปตาตรงกลางแผลเป็นสีเทาขนาดแผลมักจะใหญ่กว่าระยะต้นกล้า เชื้อที่เข้าทำลายที่ข้อต่อใบและข้อต่อลำต้นจะพบแผลมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ใบข้าวจะหลุดหรือพับง่าย และระยะออกรวง เชื้อสามารถเข้าทำลายข้าวที่รวงข้าวได้จนถึงคอรวง ในระยะนี้เรียกว่า โรคไหม้คอรวง (panicle blast) โดยสปอร์ของเชื้อจะงอกเส้นใยเข้าทำลายรวงข้าวทำให้รวงข้าวมีเมล็ดลีบ เปลือกเมล็ดข้าวมีสีเทาดำของสปอร์ของเชื้อ ในกรณีที่รวงข้าวสามารถยืดขึ้นมาก่อนที่เชื้อโรคไหม้เข้าทำลาย เชื้อก็ยังสามารถเข้าทำลายที่คอรวง บริเวณที่เชื้อเข้าทำลายจะมีสีเทาดำ รวงข้าวมีลักษณะเมล็ดไม่สะอาดและลีบเป็นจำนวนมาก ถ้าเกิดการระบาดอย่างรุนแรงจะพบรวงข้าวลีบทั้งรวงและรวงข้าวหักง่ายในบริเวณที่เชื้อเข้าทำลาย

เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวคือ *Pyricularia grisea* Sacc. หรือ *P. oryzae* Cav. มีชื่อเรียกในระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศว่า *Magnaporthe grisea* Barr. จัดอยู่ใน Class Ascomycete เดิมทีเชื้อราถูกแบ่งออกเป็น 2 species ถ้าพบเชื้อเข้าทำลายข้าวก็จะเรียก *P. oryzae* และถ้าพบเข้าทำลายพืชตระกูลหญ้าอื่นๆ จะเรียก *P. grisea* โดยที่เชื้อราทั้งสองนี้พบว่าไม่มีความแตกต่างกันไม่ว่าลักษณะของเส้นใย จำนวนนิวเคลียส ลักษณะและสีของสปอร์ ไม่มีความแตกต่างกันเลย ในสภาพการเจริญและสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ ดังนั้นในปี 1992 ได้สรุปเหตุผลการเหมือนกันของเชื้อทั้งสองนี้ว่าควรที่จะใช้ชื่อเดียวคือ *P. oryzae* (พูนศักดิ์, 2548)

เชื้อราอยู่ข้ามฤดูในรูปของเส้นใยและโคนิเดียในเศษซากพืชที่เป็นโรค ในเมล็ดข้าว ต้นข้าว และนอกจากนี้ยังอยู่ตามพืชอาศัยอื่นๆ พืชอาศัยโดยมากอยู่ในตระกูลหญ้า นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถพบได้ในพืชตระกูลอื่นอีก เช่น Musaceae, Cannaceae, Zingiberaceae, Cyperaceae และมีรายงานว่า เชื้อรานี้ติดกับเมล็ดข้าวได้นานที่สุด 2 ถึง 4 ปี (Neergaard, 1979)

พบการแพร่ระบาดของโรคในแปลงที่ต้นข้าวหนาแน่นทำให้อับลม ถ้าใส่ปุ๋ยอัตราสูงและมีสภาพแห้งในตอนกลางวันและชื้นจัดในตอนกลางคืน น้ำค้างยาวนานถึงตอนสายราว 9 โมงเช้า ถ้าอากาศค่อนข้างเย็น อุณหภูมิประมาณ 22-25 องศาเซลเซียส ลมแรง จะช่วยให้โรคแพร่กระจายได้ดี (สำนักวิจัยและพัฒนาการข้าว, 2552) เมื่อสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรคนี้ตกลงบนใบข้าวในสภาพที่ใบข้าวเปียกชื้นนานกว่า 10 ชั่วโมงขึ้นไปจะพบว่าเกิดการระบาดของโรคไหม้ โดยที่สปอร์จะเริ่มงอกเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมเพียง 30–90 นาที โดยอาศัยน้ำที่เกาะอยู่ที่ผิวใบข้าวในการงอกเส้นใยและใช้เวลาประมาณ 2–4 ชั่วโมง สร้าง appressorium เพื่อทำหน้าที่ยึดเกาะเพื่อที่จะใช้อวัยวะปลายแหลมที่เรียก penetration peg แทรกตัวเข้าไปในใบและเจริญใช้อาหารในใบข้าว (พูนศักดิ์, 2548)

เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในข้าวมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมซึ่งอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ แต่สาเหตุหลัก คือ การกลายพันธุ์ของเชื้อ การกลายพันธุ์ของโคนิเดียเชื้อรามีส่วนทำให้เกิดความหลากหลายของเชื้อเพิ่มขึ้นในประชากรของเชื้อในแหล่งปลูกข้าวต่างๆ (Shi and Leung. 1995) การรวมตัวของยีนแบบ parasexual recombination ก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้อมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง (Zeigler *et al*. 1997 อ้างโดยพูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2548) รวมไปถึงการเคลื่อนย้ายประชากรของเชื้อราจากแหล่งปลูกข้าวหนึ่งไปสู่อีกแหล่งหนึ่ง ทำให้ตรวจพบสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่แตกต่างจากที่มีอยู่เดิมในพื้นที่ (พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2548)

2.2.2 แหล่งของความต้านทานโรคไหม้

ปัจจุบันข้าวที่ปลูกบริโภคมีอยู่ 2 ชนิด คือ ข้าวเอเชีย (*Oryza sativa* L.) และข้าวแอฟริกา (*O. glaberrima* Steud.) ข้าวที่ปลูกในประเทศไทยเป็นข้าวปลูกเอเชียซึ่งมีวิวัฒนาการมาจากข้าวป่า *O. rufipogon* และ *O. nivara* ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตศูนย์กลางความผันแปรของข้าว ประกอบกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาพแวดล้อมและภูมิอากาศมีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ทำให้เกิดความหลากหลายของพันธุ์ข้าวทั้งในกลุ่มของพันธุ์ข้าวที่นิยมปลูกอยู่ในปัจจุบัน พันธุ์ข้าวพื้นเมือง และพันธุ์ข้าวป่า (สมทรง โชติชื่น. 2550)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ได้ข้าวพันธุ์ดีไม่ว่าจะเป็นการเพิ่มผลผลิต เพิ่มคุณภาพ หรือเพิ่มความต้านทานโรคหรือแมลง นอกจากจะต้องอาศัยวิธีการปรับปรุงพันธุ์ การผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ รวมไปถึงการทดสอบพันธุ์ที่เหมาะสม วัตถุดิบที่สำคัญที่ขาดไม่ได้ คือ เชื้อพันธุ์ข้าว ยิ่งเชื้อพันธุ์ข้าวมีฐานทางพันธุกรรมกว้างและแปรปรวนมากเท่าใด โอกาสและความสำเร็จที่จะได้พันธุ์ตามต้องการก็จะมีมากขึ้น (สถาบันวิจัยข้าว. 2544)

2.2.3 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึง ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอใช้เป็นเครื่องหมายติดตามหน่วยพันธุกรรมหรือยีนของสิ่งมีชีวิตและสามารถถ่ายทอดจากรุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่งได้ใช้บ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิต เป็นดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมหรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจาก พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์และมีความแตกต่างกัน (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนั่นเอง (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552) ปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นเป็นจำนวนมากและได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ใช้เพื่อติดตามหายีนที่ควบคุมลักษณะที่ดีต่างๆ และเครื่องหมาย ดีเอ็นเอยังใช้เป็นข้อมูลสำหรับวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนและสร้างแผนที่ยีน ซึ่งเป็นข้อมูลที่สำคัญที่ช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์ทราบถึงจำนวน ตำแหน่ง และอิทธิพลของยีนที่มีความสำคัญ เพื่อเป็นแนวทางในการผนวกยีนเหล่านั้นเพื่อสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ได้อย่างรวดเร็ว (จุฑาพร แสงประจักษ์. 2555) เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพมาก ผลที่ได้ถูกต้องและแม่นยำกว่าการใช้ลักษณะรูปร่างหรือสัณฐานของพืช (morphological marker) ที่มักผันแปรไปตามสภาพแวดล้อม (ปิยะดา ตันตสวัสดิ์. 2554)

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite marker) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบจำเพาะ ตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละ 1 ตำแหน่ง (single-locus marker) ลำดับเบสแบบไมโครแซท-เทลไลท์พบได้มากมายและกระจายตัวอยู่ทั่วจีโนม โดยลำดับเบสของไมโครแซทเทลไลท์มักเป็นลำดับเบสจำเพาะ มีเพียงจุดเดียวในจีโนม (unique sequence) ดังนั้นถ้าสามารถหาลำดับเบสที่อยู่สองข้างของส่วนไมโครแซทเทลไลท์ นำมาออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์ (primer) สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ จะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่จำเพาะเพียงบริเวณเดียว และเนื่องจากไมโครแซทเทลไลท์เป็นส่วนที่มีการกลายพันธุ์โดยการลดลงหรือเพิ่มขึ้นของจำนวนชุดซ้ำได้ง่าย การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณที่รวมเอาส่วนของไมโครแซทเทลไลท์ไว้ภายในจึงทำให้มีโอกาสได้ขนาดดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่ไม่เท่ากันการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จึงพบความแตกต่าง (polymorphism) ค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังสามารถแสดงแถบดีเอ็นเอแบบข่มร่วมกัน (co-dominance) ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง homozygous และ heterozygous ได้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552)

อิงออน สีแก้วและคณะ (2553) ค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยจำนวน 69 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนต้านทาน *Pid2* ผลจากการตรวจสอบพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองทุกพันธุ์ ซึ่งในจำนวนนี้ 39 พันธุ์มีอัลลีลที่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* ยืนยันผลการตรวจสอบโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีอัลลีลที่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* เปรียบเทียบกับพันธุ์ที่มีอัลลีลที่ไม่ต้านทานของยีน *Pid2* พบว่ามี single nucleotide polymorphism (SNP) A/G ในส่วน recognition

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

Prasad et al. (2009) วิเคราะห์ near isogenic lines (NILs) ซึ่งได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวพันธุ์ C101LAC ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ *M. grisea* สูง และข้าว indica พันธุ์ Samba Mahsuri (BPT 5204) เป็นพันธุ์ข้าวที่ปลูกทั่วประเทศอินเดีย มีเมล็ดเรียวยาวปานกลาง ให้อัตราผลตอบแทนสูงและมีคุณภาพดี แต่อ่อนแอต่อโรคไหม้ ทดสอบการเกิดโรคและสร้างแผนที่ประชากรพบอัตราส่วนการกระจายตัวของประชากร เท่ากับ 3 (ต้านทาน) :1 (อ่อนแอ) แยกกลุ่มความต้านทานของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) วิเคราะห์ bulk segregation พบยีนต้านทานโรคไหม้ที่สำคัญ *Pi1(t)* ที่มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM224

Koide et al. (2011) เก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ใหม่ในประเทศฟิลิปปินส์จำนวน 23 ไอโซเลต จำแนกเชื้อสาเหตุออกเป็น 16 pathotypes ซึ่งมีเชื้อ 11 pathotypes แสดงการเกิดรูปแบบปฏิกิริยาที่แตกต่างกันในอัลลีลของยีน *Pik* (*Pik*, *Pik-m*, *Pik-h* และ *Pik-p*) และ *Pi1* ในการศึกษานี้พบยีน *Pi19(t)* มีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้หลายไอโซเลต พบว่ามีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM27937 และ RM1337 และมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 12 RoyChowdhury *et al.* (2012) ศึกษาและค้นหายีน *Pi-z* ในข้าว 111 เชื้อพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย simple sequence repeat (SSR) ได้แก่ RM527, AP4791, AP5659-1, และ AP5659-5 ที่มีความเชื่อมโยงกับยีน *Pi-z* และตรวจสอบความรุนแรงของการเกิดโรคโดยใช้เชื้อสาเหตุ avirulent 1 สายพันธุ์ คือ IE1k และ virulent 2 สายพันธุ์ คือ IB33 และ IB49 พบว่าในจำนวน 111 เชื้อพันธุ์ข้าว มี 73 เชื้อพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-z*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การสร้างประชากรข้าว

3.1.1 การสร้างประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 - hybrid)

ผสมระหว่างข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ยั้งมอง (GS20874) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว (Salih *et al.*, 2013) จากงานวิจัยในโครงการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *P. oryzea* จากแหล่งพันธุกรรมข้าวพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย ใช้เป็นพันธุ์พ่อ (male parent) กับพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์แม่ (female parent) กระบวนการผสมเริ่มจากในช่วงเวลาเย็นก่อนผสมพันธุ์ 1 วันเตรียมช่อดอกฝ่ายแม่ (KDML105) โดยการทำหมันเพศผู้ (emasculation) โดยเลือกช่อดอกในระยะโผล่ช่อดอก (heading) ใช้กรรไกรตัดดอกที่ผสมตัวเองไปแล้วบริเวณปลายช่อดอกและดอกอ่อนเกินไปบริเวณโคนช่อดอกทิ้ง เหลือไว้เฉพาะดอกที่จะพร้อมผสมในวันถัดไปประมาณ 20 ดอกต่อช่อ สังเกตได้จากอับละอองเกสรอยู่ในตำแหน่งประมาณครึ่งของความยาวกาบหุ้มดอก จากนั้นใช้กรรไกรตัดปลายกาบหุ้มดอกประมาณ 1 ใน 3 เฉียงทำมุมประมาณ 45 องศาใช้ปลายเข็มหมุดเขี่ยอับเกสรเพศผู้ (anther) ออกจากกาบหุ้มดอกด้วยความระมัดระวัง พ่นดอกเพศเมียด้วยน้ำเปล่าเพื่อให้ความชุ่มชื้นแก่ดอก คลุมด้วยขวดพลาสติกเจาะรู ช่วงเช้าของวันถัดไปตรวจสอบดอกฝ่ายแม่ที่เตรียมไว้อีกครั้งว่าไม่มีอับเกสรเพศผู้หลงเหลืออยู่ นำเกสรเพศผู้จากดอกข้าวพันธุ์พ่อ (GS20874) มาถ่ายลงบนยอดเกสรเพศเมีย (stigma) โดยอาจนำทั้งช่อดอกมาเคาะใกล้ๆ ยอดเกสรเพศเมียเพื่อให้ละอองเกสร (pollen grain) ตกลงบนยอดเกสรเพศเมีย หรือคีบอับละอองเกสร (anther) ใส่ไว้ในกาบดอกเพศเมียที่เตรียมไว้ ผูกป้ายชื่อไว้กับช่อดอก ระบุชื่อพันธุ์พ่อและแม่พร้อมระบุวันที่ทำการผสมพันธุ์ (fertilization) ปล่อยให้มีการผสมพันธุ์และเก็บเกี่ยวเมล็ดหลังจากวันที่ผสมพันธุ์แล้ว 30 วัน ระยะพักตัวของข้าวประมาณ 8 สัปดาห์

3.1.2 การสร้างประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2)

เพาะเมล็ดข้าวลูกผสม F_1 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์แม่และข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ยั้งมอง (GS20874) ซึ่งเป็นพันธุ์พ่อ ในกระดาษทิชชูที่ชุ่มน้ำ เมื่อข้าวเริ่มงอก ย้ายลงเพาะในถาดหลุมเพื่อให้ต้นกล้าแข็งแรง เมื่อข้าวอายุ 2 สัปดาห์ (มีใบประมาณ 3-4 ใบ) ย้ายลงกระถางขนาด 10 นิ้ว โดยใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 (N-P_2O_5-K_2O) รองก้นหลุม และใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 (N-P_2O_5-K_2O) ผสม 15-15-15 (N-P_2O_5-K_2O) ปล่อยให้ดอกข้าวผสมตัวเองตามธรรมชาติ (selfed-fertilization) เก็บเมล็ดพันธุ์ (F_2-seed) ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เพื่อทำลายระยะพักตัวของเมล็ด ปลูกประชากรข้าว F_2 เพาะเมล็ดพันธุ์ข้าว F_2 (F_2-seeds) ในกระดาษทิชชูที่ชุ่มน้ำ เมื่อข้าวเริ่มงอก ย้ายลงเพาะในกระบะปลูกขนาด กว้าง 7 หลุม ยาว 12 หลุม ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 (N-P_2O_5-K_2O) 1 ครั้ง ประมาณ 125 กรัม ต่อกระบะ ใส่ปุ๋ยที่ 7 และ 14 วันหลังปลูกลงกระบะแล้ว

3.2 การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้โดยวิธีทดสอบการเกิดโรคในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2)

3.2.1 การเตรียมสารแขวนลอย conidia ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร Rice Flour Agar (RFA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสปล่อยให้เชื้อราเจริญเป็นเวลา 10 วัน นำเชื้อรามากระตุ้นให้เกิดการสร้าง conidia โดยการขูดเส้นใยบนผิวหน้าอาหารให้ขาดด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล บ่มที่อุณหภูมิห้อง เปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ ปล่อยให้เชื้อราสร้าง conidia เป็นเวลา 2 วัน จะได้ conidia เป็นจำนวนมาก เตรียมสารแขวนลอย conidia ด้วยน้ำกลั่นผ่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้น conidia ให้ได้ 5×10^5 conidia ต่อมิลลิลิตร เติมเจลาติน 0.5 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเจลาตินมีความหนืดสูงเมื่อพ่นหมอกสารแขวนลอย conidia ที่ผสมเจลาตินลงบนใบข้าว เจลาตินจะจับตัวเป็นฟิล์มปกคลุมแผ่นใบข้าว ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยึดเกาะของ conidia เชื้อราบนใบข้าว

3.2.2 การปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้บนกล้าข้าว

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

3.2.3 การประเมินการเกิดโรคในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2)

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

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

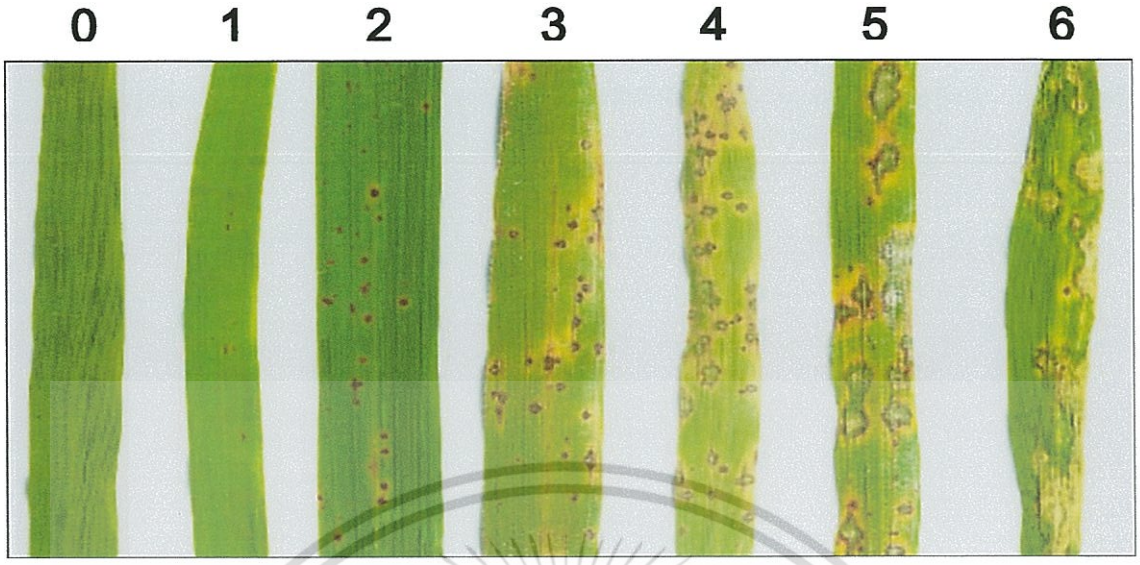
ระดับ 4 แผลจุดเล็กๆ ขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตรหรือยาวกว่า แผลเป็นสีเทาและมีขอบสีน้ำตาล

ระดับ 5 แผลสีเทาเกาะกันเป็นกลุ่ม มีขอบแผลสีน้ำาตาล เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค

ระดับ 6 แผลลุกลามติดต่อกันมีสีเทาไม่มีขอบแผลที่แน่นอน เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 เกณฑ์ให้คะแนนการเกิดโรคตามระดับคะแนน
ที่มา : Roumen *et al.* (1997)

3.2.4 การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าว

วิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าว F_2 จากข้อมูลที่ได้ ซึ่งเป็นข้อมูล phenotype ด้วยการทดสอบ Chi square โดยวิเคราะห์การกระจายตัวของประชากรว่าเป็นไปตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2007

3.2.5 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2)

3.2.5.1 การคัดเลือกเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้

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

3.2.5.1.1 การเตรียมดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB method ตามขั้นตอนดังนี้ ตัดตัวอย่างใบข้าวใส่ในหลอด microtube ขนาด 2 มิลลิลิตร ประมาณครึ่งหลอด เติม CTAB extraction buffer หลอดละ 600 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เม็ด bead (2 เม็ด) นำไปเขย่าด้วยเครื่อง shaker milk นาน 2 นาที บ่มหลอดในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติม chloroform : isoamyl (24:1) 600 ไมโครลิตร แล้วพลิกหลอดไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนปริมาณ 400 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microtube ใหม่ เติม isopropanol ปริมาณ 400 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งให้เหลือตะกอนดีเอ็นเอที่ก้นหลอดด้านล่าง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 400 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งให้เหลือตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอซ้ำอีก 2 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 1X TE buffer ปริมาณ 50 ไมโครลิตร วิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เตรียมดีเอ็นให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำไปเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา PCR

3.2.5.1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

เครื่องหมาย microsatellite ทั้งหมด 230 เครื่องหมายใช้เป็น primer ในปฏิกิริยา PCR นำดีเอ็นเอที่ปรับความเข้มข้นเป็น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรมาเพิ่มปริมาณดีเอ็น-เอ โดยเตรียมส่วนผสมต่อไมโครลิตร ปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 10 ไมโครลิตรประกอบด้วย ดีเอ็นเอความเข้มข้น 10 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, dH_2O 5.9 ไมโครลิตร, 10X Taq polymerase buffer 1 ไมโครลิตร, 2.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, 1.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร,ส่วนผสมระหว่าง Forward Primer (5 μM) และ Reverse Primer (5 μM) 0.5 ไมโครลิตร และ Taq polymerase (1 U/μL) 0.01 ไมโครลิตร โดยกำหนดอุณหภูมิและจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1นาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที จำนวน 1 รอบ เมื่อครบจำนวนรอบนำไปตรวจสอบผลด้วยเทคนิค PAGE

3.2.5.1.3 การวิเคราะห์ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR

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

3.2.5.2 การคัดเลือกเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้

นำเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ได้มาคัดเลือกด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) เพื่อค้นหาเครื่องหมาย microsatellite สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างลักษณะต้านทานและลักษณะอ่อนแอได้ โดยใช้ดีเอ็นเอรวมของประชากร 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือดีเอ็นเอของพันธุ์แม่ กลุ่ม 2 ดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อ กลุ่มที่ 3 ดีเอ็นเอของประชากรที่แสดงความต้านทาน (resistant) ระดับ 0 กลุ่มที่ 4 ดีเอ็นเอของประชากรที่แสดงความอ่อนแอ (susceptible) ระดับ 5 และ 6

3.2.5.2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ใช้ primer ของเครื่องหมาย microsatellite ในปฏิกิริยา PCR โดยเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 10 ไมโครลิตรประกอบด้วย ดีเอ็นเอความเข้มข้น 10 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, dH2O 5.9 ไมโครลิตร, 10X Taq polymerase buffer 1 ไมโครลิตร, 2.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, 1.5 มิลลิโมลาร์ MgCl2 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร,ส่วนผสมระหว่าง Forward Primer (5 μM) และ Reverse Primer (5 μM) 0.5 ไมโครลิตร และ Taq polymerase (1 U/μL) 0.01 ไมโครลิตร โดยกำหนดอุณหภูมิและจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1นาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที จำนวน 1 รอบ เมื่อครบจำนวนรอบนำไปตรวจสอบผลด้วยเทคนิค PAGE

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5.2.2 การวิเคราะห์ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR

วิเคราะห์ผลด้วยวิธีเทคนิค PAGE โดยใช้ poly-acrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบผลด้วยการย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate ตามวิธีการของ Benbouza et al. (2006) ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR กำหนดเครื่องหมายดังนี้

A คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (parent 1, P1)

B คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (parent 2, P2)

H คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่

3.2.5.3 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2)

ใช้เครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) เป็น primer ในปฏิกิริยา PCR เพื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าว F_2

3.2.5.3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ใช้ชุด Terra PCR Direct (Clontech Laboratories, USA) นำใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์แม่ และใบข้าวพันธุ์ยั้งมอง (GS20874) ซึ่งเป็นพันธุ์พ่อ และประชากรข้าว F_2 ทั้งหมด 228 ต้น นำมาตัดให้ได้เนื้อเยื่อรูปวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 มิลลิเมตร ใช้เนื้อเยื่อจำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงใน PCR plate เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 10 ไมโครลิตรประกอบด้วย dH_2O 2.2 ไมโครลิตร, Terra PCR Direct Buffer (2X) ที่มี $MgCl_2$ และ dNTPs 5 ไมโครลิตร, ส่วนผสมของ Forward Primer (5 μM) และ Reverse Primer (5 μM) 0.6 ไมโครลิตร และ Terra PCR Direct Polymerase Mix (1.25 U/μL) 0.2 ไมโครลิตร โดยกำหนดอุณหภูมิและจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 40 รอบ 5) ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 1 รอบ เมื่อครบจำนวนรอบนำไปตรวจสอบผลด้วยเทคนิค PAGE

3.2.5.3.2 การวิเคราะห์ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR

วิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ poly-acrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบผลโดยการย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate ตามวิธีการของ Benbouza *et al.* (2006) ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR กำหนดเครื่องหมายดังนี้

A คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (parent 1, P1)

B คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (parent 2, P2)

H คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่

3.2.5.3.3 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2) ทั้งหมด 228 ต้น

วิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายจากข้อมูลที่ได้ ซึ่งเป็นข้อมูลทาง genotype ด้วยการทดสอบ Chi square โดยวิเคราะห์การกระจายตัวในประชากรข้าว F_2 ของแต่ละเครื่องหมายว่าเป็นตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2)

ผสมระหว่างพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ใช้เป็นพันธุ์แม่ (female parent) และข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ยั้งมอง (GS20874) ใช้เป็นพันธุ์พ่อ (male parent) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ ได้ข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1- hybrid) จำนวน 1 เมล็ด ปลูกและปล่อยให้มีการผสมตัวเองตามธรรมชาติ ลูกผสมชั่วที่ 1 ต้นที่ 1 (F_1T_1) ได้เมล็ดจำนวน 228 เมล็ด เมื่อนำไปปลูกจะได้ประชากรข้าว F_2 (F_2- plant)

4.2 การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้โดยวิธีทดสอบการเกิดโรคในประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2)

ทดสอบการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 19 ไอโซเลท บนกล้าข้าวจำนวน 228 ต้น พบการแสดงออกของลักษณะความต้านทานโรคไหม้ระดับสูง (ระดับ 0, 1 และ 2) จำนวน 210 ต้น แสดงความต้านทานโรคไหม้ในระดับปานกลาง (ระดับ 3 และ 4) จำนวน 14 ต้น พบลักษณะที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ (ระดับ 5 และ 6) จำนวน 5 ต้น ผลประเมินการเกิดโรคของประชากรข้าว F_2 ทั้งหมด 228 ต้น แบ่งเป็นต้นที่แสดงลักษณะต้านทาน 223 ต้น และต้นที่แสดงลักษณะอ่อนแอ 5 ต้น นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ว่าเป็นตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) โดยทดสอบหาค่า Chi square เนื่องจากประชากรที่ศึกษาเป็นประชากรข้าว F_2 หากความต้านทานโรคไหม้ที่ศึกษาถูกควบคุมด้วยยีนเพียงยีนเดียว การกระจายตัวของยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้จะเท่ากับ 3:1 นั่นคือ ต้านทาน (resistance, R): อ่อนแอ (susceptible, S)

ผลการกระจายตัวของยีนควบคุมลักษณะต้านทานในอัตราส่วน 3:1 (R:S) พบค่าสถิติ Chi square เท่ากับ 63.24 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 6.13 เมื่อเปรียบเทียบกับตาราง Chi square ที่ df เท่ากับ 1 พบว่ามีค่า P เท่ากับ 0.011 แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้เป็นไปตามอัตราส่วน 15:1 (R:S) เป็นไปได้ว่าลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ยั้งมอง(GS20874) ถูกควบคุมด้วยยีนหลักที่เป็นยีนเด่นจำนวน 2 ยีน (2 major dominantly resistant genes) โดยยีนหลัก 2 ตำแหน่งนี้มีปฏิกิริยาข่มข้ามตำแหน่งระหว่างกัน (interallelic interaction) (ตารางที่ 4.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 อัตราการกระจายตัวของลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 19 ไอโซเลท ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2) จำนวน 228 ต้น

ประชากร (จำนวนต้น)	Expected ratio	Expected No.		Observed No.		χ^2	p
		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

4.3 เครื่องหมาย microsatellite ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ยั้งมอง

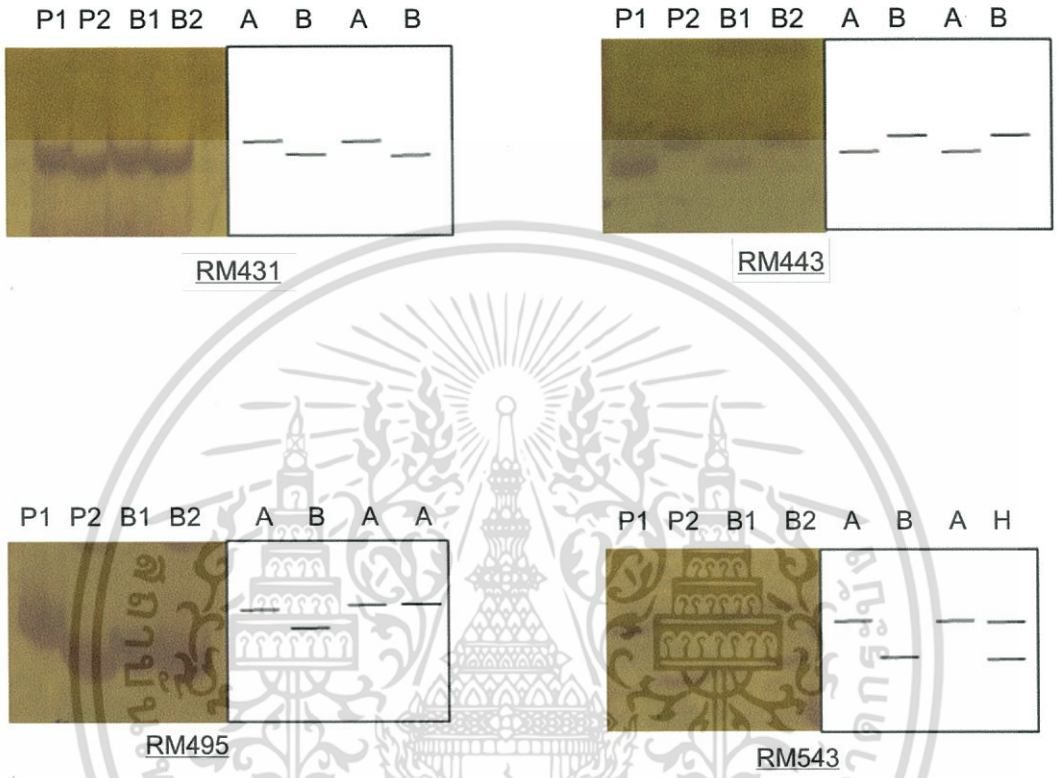
คัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (พันธุ์แม่) และพันธุ์ยั้งมอง (พันธุ์พ่อ) ได้ โดยใช้เครื่องหมาย microsatellite จำนวน 230 เครื่องหมาย ที่กระจายอยู่บนทุกโครโมโซมของข้าวเป็น primer ในปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบผลจากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate พบเครื่องหมาย microsatellite จำนวน 111 เครื่องหมายสามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพ่อและแม่ได้ โดยแบ่งตามโครโมโซมได้ดังนี้ โครโมโซม 1 จำนวน 13 เครื่องหมาย โครโมโซม 2 จำนวน 7 เครื่องหมาย โครโมโซม 3 จำนวน 13 เครื่องหมาย โครโมโซม 4 จำนวน 14 เครื่องหมาย โครโมโซม 5 จำนวน 7 เครื่องหมาย โครโมโซม 6 จำนวน 11 เครื่องหมาย โครโมโซม 7 จำนวน 8 เครื่องหมาย โครโมโซม 8 จำนวน 6 เครื่องหมาย โครโมโซม 9 จำนวน 6 เครื่องหมาย โครโมโซม 10 จำนวน 6 เครื่องหมาย โครโมโซม 11 จำนวน 9 เครื่องหมาย และโครโมโซม 12 จำนวน 11 เครื่องหมาย

4.4 เครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอต่อโรคไหม้

นำเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้จำนวน 111 เครื่องหมายนำมาคัดเลือกเครื่องหมาย microsatellite ที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) โดยใช้ดีเอ็นเอรวมของประชากร 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือดีเอ็นเอของพันธุ์แม่ กลุ่ม 2 ดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อ กลุ่มที่ 3 ดีเอ็นเอของประชากร F_2T_1 ที่แสดงความต้านทาน (resistant) ระดับ 0 และกลุ่มที่ 4 ดีเอ็นเอของ ประชากร F_2T_1 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 4 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM495 RM543 RM443 และ RM431 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 ในเครื่องหมาย RM443 และ RM431 มีการแสดงของเครื่องหมายเรียงตามกลุ่ม 1 ถึง 4 คือ ABAB แต่เครื่องหมาย RM543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการแสดงของเครื่องหมายเรียงตามกลุ่ม 1 ถึง 4 คือ ABHH และในเครื่องหมาย RM495 มีการแสดงของเครื่องหมายเรียงตามกลุ่มคือ ABAA (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 ผลวิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) ของเครื่องหมาย RM431, RM443, RM495 และ RM543 ระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (P1) พันธุ์ยั้งมอง (P2) ประชากรข้าวกลุ่มต้านทานโรคไหม้ (B1) และประชากรข้าวกลุ่มอ่อนแอต่อโรคไหม้ (B2) กำหนดให้ A หมายถึงมีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 B หมายถึงมีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์ยั้งมอง และ H หมายถึงมีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ยั้งมอง

4.5 การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2)

ใช้ pirmer ของเครื่องหมาย microsatellite จำนวน 4 เครื่องหมาย ประกอบด้วย RM495 RM543 RM443 และ RM431 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 ในปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบผลจากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate วิเคราะห์แปลงรูปแบบดีเอ็นเอเป็นข้อมูล A, B และ H โดยกำหนดให้ A คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ B คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ H คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่ ผลการวิเคราะห์ของเครื่องหมาย RM543 ในประชากรข้าว F_2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวน 228 ต้น พบผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่กำหนดให้เป็น A จำนวน 46 ต้น พบผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อกำหนดให้เป็น B จำนวน 62 ต้น และพบผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่กำหนดให้เป็น H จำนวน 117 ต้น (ภาพที่ 4.2) ผลการวิเคราะห์ของเครื่องหมาย RM443 ในประชากรข้าว F_2 จำนวน 228 ต้น พบผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่กำหนดให้เป็น A จำนวน ต้น พบผลผลิตชิ้นดี 77 เอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อกำหนดให้เป็นB จำนวน 72 ต้น และพบผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่กำหนดให้เป็น H จำนวน 79 ต้น (ภาพที่ 4.3) ผลการวิเคราะห์ของเครื่องหมาย RM431 ในประชากรข้าว F_2 จำนวน 228 ต้น พบผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่กำหนดให้เป็น A จำนวน 65 ต้น พบผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อกำหนดให้เป็น B จำนวน 62 ต้น และพบผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่กำหนดให้เป็น H จำนวน 101 ต้น (ภาพที่ 4.4) และผลการวิเคราะห์ของเครื่องหมาย RM495 ในประชากรข้าว F_2 จำนวน ต้น พบผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่กำหนดให้เป็น 228A ทั้งหมดจำนวน 228 ต้น

จากนั้นวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย RM543 RM443 และ RM431 ในประชากรข้าว F_2 ว่าเป็นตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) โดยทดสอบหาค่า Chi square วิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายในอัตราส่วน 1 : 2 : 1 นั่นคือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (B) มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่ (H) มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (A) ผลการวิเคราะห์พบว่าค่าสถิติ Chi square สำหรับการกระจายตัวของเครื่องหมายในอัตราส่วน 1 : 2 : 1 (B : H : A) ของเครื่องหมาย RM543 มีค่าเท่ากับ 1.56 เครื่องหมาย RM443 มีค่าสถิติ Chi square เท่ากับ 1.87 และเครื่องหมาย RM431 มีค่าสถิติ Chi square เท่ากับ 1.69 แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้เป็นไปตามสัดส่วน 1 : 2 : 1 (B : H : A) (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน ต้น 228

Marker	Expected ratio	Expected No.		Observed No.		χ^2	*P*
		R	S	R	S		
RM543	3:1	171	57	166	62	0.55	0.51
RM431	3:1	171	57	163	65	0.79	0.32
RM443	3:1	171	57	151	77	7.81	0.005

4.6 การสร้างแผนที่เพื่อระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MAPMAKER

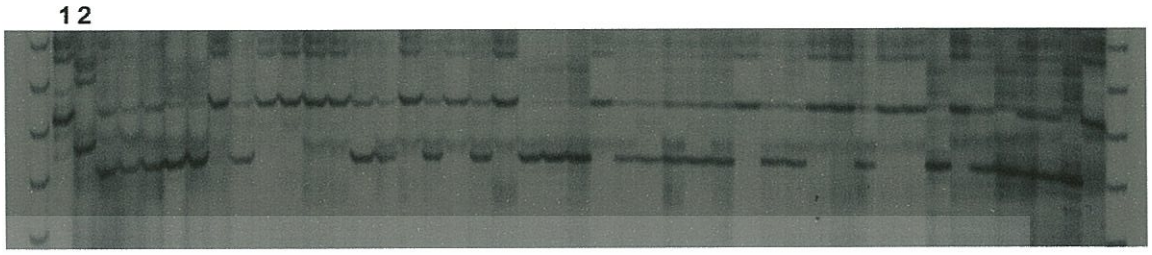
ในการทดลองนี้ใช้ข้อมูล phenotype และ genotype ของประชากรเพียง 5 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจนพบการเกิดโรคที่ระดับ 5 และ 6 เป็นประชากรที่มี phenotype ที่ถูกต้องแน่นอน จึงเป็นประชากรที่เหมาะสมสำหรับนำมาวิเคราะห์เพื่อระบุตำแหน่งที่ตั้งของยีนต้านทานโรคไหม้ นำมาสร้างแผนที่ยีนต้านทานโรคไหม้ ทำการจัดกลุ่มและคำนวณหาค่าระยะห่างของแต่ละเครื่องหมายและระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้ ด้วยโปรแกรม MAPMAKER/EXP version 3.0b และวาดแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapChart version 2.2 จัดกลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอและยีนต้านทานโรคไหม้ที่มีความใกล้ชิดกัน ที่ค่า logarithm of odds (LOD) =3.0 พบเครื่องหมายที่มีความเชื่อมโยงกับยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ยั้งมอง (GS20874) คือ เครื่องหมาย RM543 RM443 และ RM431 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 จากการคำนวณหาระยะห่างของแต่ละเครื่องหมาย และระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้ด้วย Kosambi function พบว่ายีนต้านทานโรคไหม้มีระยะห่างจากเครื่องหมาย RM543 เป็นระยะทาง 85.1 cM ห่างจากเครื่องหมาย RM431 เป็นระยะห่าง 73.6 cM และห่างจากเครื่องหมาย RM443 เป็นระยะทาง 45.8 cM (ภาพที่ 4.5)

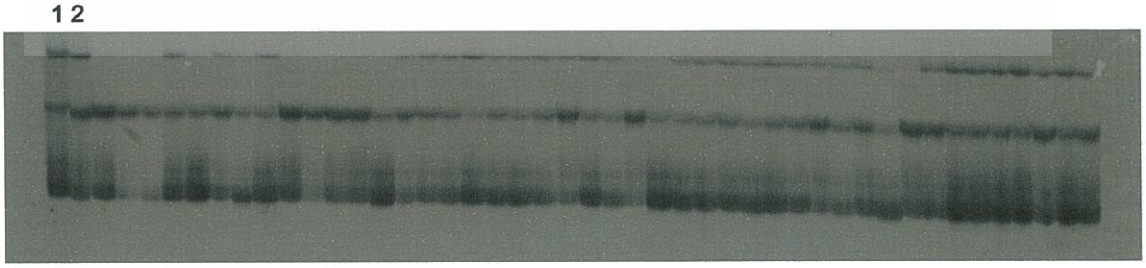
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



ภาพที่ 4.2 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM543 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2) เปรียบเทียบกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (1) และพันธุ์ยั้งมอง (2)

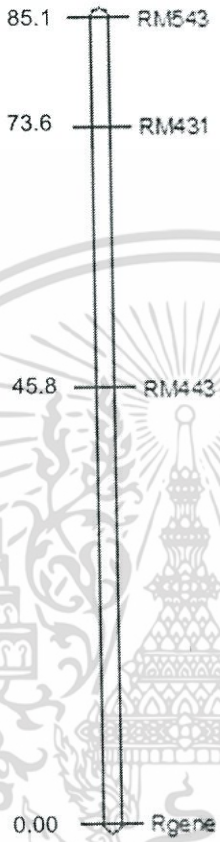
ภาพที่ 4.3 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM443 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2) เปรียบเทียบกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (1) และพันธุ์ยั้งมอง (2)



ภาพที่ 4.4 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM431 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 (F_2) เปรียบเทียบกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (1) และพันธุ์ยั้งมอง (2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

147847



ภาพที่ 4.5 แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ และระยะห่างระหว่างเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 1 ของข้าว วิเคราะห์ในประชากรข้าว 5 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 19 ไอโซเลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2)

ทดสอบการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้จานวน 19 ไอโซเลท บนกล้าข้าว พบการแสดงออกของลักษณะความต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าว F_2 จำนวน 228 ต้น แบ่งเป็นต้นที่แสดงลักษณะต้านทานจำนวน 223 ต้น และต้นที่แสดงลักษณะอ่อนแอจำนวน 5 ต้น วิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ว่าเป็นตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) เนื่องจากประชากรที่ศึกษาเป็นประชากรข้าว F_2 หากความต้านทานโรคไหม้ที่ศึกษาถูกควบคุมด้วยยีนเพียงยีนเดียว จะพบการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในอัตราส่วน 3:1 (R:S) ตัวอย่างงานวิจัยของ Ashkani *et al.* (2011) วิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากร F_2 จำนวน 320 ต้น ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวพันธุ์ Pongsu Seribu เป็นพันธุ์ต้านทาน และ Mahsuri เป็นพันธุ์อ่อนแอ ทดสอบการเกิดโรคด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ pathotype, P7.2 วิเคราะห์การกระจายตัวยีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ พบมีการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้เป็นไปตามอัตราส่วน 3:1 (R:S) แสดงว่ามียีนต้านทานโรคไหม้ที่ควบคุมความต้านทานเพียงยีนเดียว วิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมาย microsatellite จัดกลุ่มของเครื่องหมายและหาระยะทางระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้ แต่จากผลการทดลองนี้พบว่าการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 3:1 (R:S) แสดงให้เห็นว่าลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ห้วยไม่ได้ถูกควบคุมด้วยยีนเพียงยีนเดียว เมื่อการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าว F_2 จำนวน 228 ต้นไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 3:1 (R:S) จึงวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานในอัตราส่วน 15:1 (R:S) ซึ่งบ่งชี้ว่ามียีนที่ควบคุมความต้านทานโรคไหม้มากกว่า 1 ยีน จากผลการทดลองพบว่าการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้เป็นไปตามอัตราส่วน 15:1 (R:S) โดยมีค่า P เท่ากับ 2.62 เป็นไปได้ว่าลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ยั้งมอง (GS20874) 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 วิเคราะห์การกระจายตัวยีนต้านทานโรคไหม้ พบมีการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้เป็นไปตามอัตราส่วน 15:1 (R:S) แสดงว่ามียีนต้านทานโรคไหม้ที่ควบคุมความต้านทานมากกว่า 1 ยีน และวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมาย microsatellite จัดกลุ่มของเครื่องหมายและหาระยะทางระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้ พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-47* และ *Pi-48* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 11 และ 12 ตามลำดับ

5.2 แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้

เนื่องจากการทดลองนี้ใช้ข้อมูล phenotype และ genotype ของประชากรเพียง 5 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้นำมาวิเคราะห์ร่วมกัน เมื่อทำการจัดกลุ่มและคำนวณหาค่าระยะห่างของแต่ละเครื่องหมาย และระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้ ด้วยโปรแกรม MAPMAKER และวาดแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapChart จัดกลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอและยีนต้านทานโรคไหม้ที่มีความใกล้ชิดกัน ที่ค่า logarithm of odds (LOD) =3.0 ซึ่งหมายถึงโอกาสที่เครื่องหมายที่ถูกจัดกลุ่มอยู่ด้วยกันจะไม่มีความเชื่อมโยงกัน เท่ากับ แสดง 1000 ใน 1 หรือ 0.01ให้เห็นว่าการจัดกลุ่มของเครื่องหมายมีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละเอียดมากวิเคราะห์ความเชื่อมโยง ครั้งที่อาจพบว่าเครื่องหมายไม่มีความเชื่อมโยง 1 ครั้งมีเพียง 1000 อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้และมีกัน เครื่องหมายที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือ เครื่องหมายที่มีความเชื่ ระยะห่างจากยีนน้อยกว่า 50cM ซึ่งได้แก่ เครื่องหมาย RM543, RM443 และ RM431 การจัดเรียงตัวของ แต่ละเครื่องหมายบนโครโมโซม เลือกผลการคำนวณที่แสดงค่า likelihood ที่สูงที่สุด คือ เท่ากับ 0.00 และการคำนวณระยะห่างของเครื่องหมายด้วย Kosambi function

จากแผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้โปรแกรม MAPMAKER พบว่ายีน ต้านทานโรคไหม้มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM543 RM443 และ RM431 ยีนต้านทานโรคไหม้มี ระยะห่างจากเครื่องหมาย RM543 เป็นระยะทาง 85.1 cM ห่างจากเครื่องหมาย RM431 เป็นระยะห่าง 73.6 cM และห่างจากเครื่องหมาย RM443 เป็นระยะทาง 45.8 cM โดยยีนต้านทานโรคไหม้มีตำแหน่ง ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 โดยบริเวณที่พบว่าเป็นที่ตั้งของยีนต้านทานโรคไหม้นี้ เคยมีรายงานพบยีน ต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ห่างจากเครื่องหมาย RM543 และ RM302 เป็นระยะห่าง 0.7 cM และ 0.07 cM ตามลำดับ (Lin *et al.*, 2007) แม้ว่าบริเวณใกล้เคียงมีการพบยีนต้านทานโรคไหม้ แต่ข้อมูลในปัจจุบันยัง ไม่สามารถยืนยันได้ว่ายีนที่ค้นพบในงานวิจัยนี้เป็นยีนเดียวกับที่เคยรายงานไว้หรือไม่ งานวิจัยนี้จึงนับว่า เป็นการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ยีนใหม่ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ยั้งมอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

6.1 ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

6.1.1 ระดับชาติ จำนวน - เรื่อง

6.1.2 ระดับนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง

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 2nd International Symposium on Agricultural Technology. July 1-3, 2015, A-One The Royal Cruise Hotel, Pattaya, Thailand. (Proceeding-Poster)

6.2 การร่วมประชุมวิชาการ

6.2.1 ระดับชาติ จำนวน - เรื่อง

6.2.2 ระดับนานาชาติ จำนวน 3 เรื่อง

Parinthawong, N., Pramrit, S. and Sreewongchai, T. 2014. Marker assisted selection of gene resistance to leaf blast disease in Thai landrace rice. The 5th Asian Conference on Plant Pathology. November 3-6, 2014, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand. (Abstract-Poster)

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 2nd International Symposium on Agricultural Technology. July 1-3, 2015, A-One The Royal Cruise Hotel, Pattaya, Thailand. (Proceeding-Poster)

Pramrit, S. and Parinthawong, N. 2016. Molecular mapping of rice blast resistance gene in Yang Mawng variety of Thai indigenous rice. The 7th AG-BIO/PERDO Graduate Conference on Agricultural Biotechnology and KU-UT Joint Seminar IV. December 8-9, 2016, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom, Thailand. (Abstract-Oral presentation)

6.3 การผลิตบัณฑิต

6.3.1 ระดับปริญญาโท จำนวน 1 คน

ชื่อ-นามสกุล	**นางสาวศิริพร เปรมฤทธิ์**
หลักสูตร	ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
ปีที่จบ	กำลังศึกษา
หัวข้อวิทยานิพนธ์	การถ่ายทอดพันธุกรรมควบคุมลักษณะและการระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ยั้งมอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กรมการข้าว. 2556. **ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในองค์ความรู้เรื่องข้าว.** [Online]. Available : http://www.brrd.in.th/rkb/varieties/index.php-file=content.php&id=19.htm

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

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

ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ และ สุรีพร เกตุงาม. 2552. โรคไหม้ในข้าวและสถานการณ์ปัจจุบันของงานวิจัยด้านยีนต้านทานโรคไหม้. **แก่นเกษตร** 37 : 69-78.

ชวาลา บุรุณศิริ. 2531. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา. คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ. 199 หน้า.

ปิยะดา ตันตสวัสดิ์. 2554. **การปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ต้านทานศัตรูพืช**. นครราชสีมา : โคราชมาร์เก็ตติ้ง แอนด์ โปรดักส์ชั่น.

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2548. **โรคไหม้ข้าว : ความหลากหลายและแนวทางการพัฒนา ข้าวต้านทานโรคไหม้.** อุบลราชธานี. กรมวิชาการเกษตร.

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

ศรีสวัสดิ์ ขันทอง ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ และ สุรีพร เกตุงาม. 2553. โรคไหม้และการปรับปรุงข้าวต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก. **Thai Journal of Genetics** 3(2) : 106-119.

สถาบันวิจัยข้าว และสำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ กรมวิชาการเกษตร. 2544. **ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์ : ข้าว.** กรุงเทพฯ : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด.

สมทรง โชติชื่น. 2550. การอนุรักษ์และใช้ประโยชน์เชื้อพันธุกรรมข้าว : อดีต ปัจจุบัน และอนาคต. หน้า 262-274. *ใน* **การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวประจำปี 2550**, ปทุมธานี : พิพิธภัณฑ์การเกษตรเฉลิมพระเกียรติ ฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2558. **สถิติการนำเข้าส่งออก.** [Online]. Available :http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export.php.

สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว. 2552. องค์ความรู้ด้านศัตรูข้าว: คู่มือสำหรับชาวนาไทย. กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 60 หน้า.

สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว. 2553. **ข้าวขาวดอกมะลิ 105.** กรุงเทพฯ : กรมการข้าว. 45 หน้า

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. 2558. **สถานการณ์การส่งออกข้าวไทย.** [Online]. Available : http://www.thairiceexporters.or.th/Local%20news/News_2015/news_090215-1.html

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อภิชาติ วรรณวิจิตร สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง และ ธีระยุทธ ตู้จินดา. 2544. **วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับข้าวไทย: เทคโนโลยีชีวภาพกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าว.** ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, กรุงเทพฯ

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

Ashkani, S., M.Y. Rafii., M. Sariah., A. Siti Nor Akmar., I. Rusli., H. Abdul Rahim. and M.A. Latif. 2011. Analysis of simple sequence repeat markers linked with blast disease resistance genes in a segregating population of rice (*Oryza sativa*). **Genetics and Molecular Research** 10(3) : 1345-1355

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.

Haung, H., L. Huang, G. Feng, S. Wang, Y. Wang, J. Liu, N. Jiang, W. Yan, L. Xu, P. Sun, Z. Li, S. Pan, X. Liu, Y. Xiao, E. Liu, L. Dai and G.L. Wang. 2011. Molecular mapping of the new blast resistance genes *Pi47* and *Pi48* in the durably resistant local rice cultivar Xiangzi3150. **Phytopathology** 101 : 620-626.

Koide, Y., M. J. Telebanco-Yanoria, F. D. Pen, Y. Fukuta, and N. Kobayashi. 2011. Characterization of rice blast isolates by the differential system and their application for mapping a resistance gene, *Pi19(t)*. **Journal of Phytopathology** 159 : 85–93.

Lin, F., S. Chen., Z. Que., L. Wang., X. Liu., and Q. Pan. 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 Society of America** DOI: 10.1534 /genetics.107.080648.

Miah, G., M.Y. Rafii, M.R. Ismail, A.B. Puteh, H.A. Rahim, R. Asfaliza and M.A. Latif. 2012. Blast resistance in rice: a review of conventional breeding to molecular approaches. **Molecular Biology Reports**. DOI 10.1007/s11033-012-2318-0.

Neergaard, P. 1979. **Seed Pathology. Vol.1.** Macmillan and Press Ltd., London.

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. 1977. Characterization of the European pathogen population of *Magnaporthe grisea* by DNA finger printing and pathotype analysis. **European Journal of Plant Pathology** 103: 363-371.

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**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

and Applied Genetics 106: 794-803.

Shi Z., D. Christian and H. Leung. 1995. Enhanced transformation in *Magnaporthe grisea*by restriction enzyme mediated integration of plasmid DNA. **Phytopathology** 85: 329-333.

Sreewongchai, T., T. Toojinda, N. Thanintorn, C. Kosawang, A. Vanavichit, D. Tharreau and P. Sirithunya. 2010. Development of elite indica rice lines with wide spectrum of resistance to Thai blast isolates by pyramiding multiple resistance QTLs. **Plant Breeding** 129: 176-180.

Zeigler, R.S., S.A. Leong and P.S.Teng. 1994. **Rice blast disease.** Cab Int. Wallingford, U.K.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารหลักฐานอ้างอิงของผลผลิต

(1) Parinthawong, N., Pramrit, S. and Sreewongchai, T. 2014. Marker assisted selection of gene resistance to leaf blast disease in Thai landrace rice. The 5th Asian Conference on Plant Pathology. November 3-6, 2014, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand. (Abstract-Poster)

(2) 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 2nd International Symposium on Agricultural Technology. July 1-3, 2015, A-One The Royal Cruise Hotel, Pattaya, Thailand. (Proceeding-Poster)

(3) Pramrit, S. and Parinthawong, N. 2016. Molecular mapping of rice blast resistance gene in Yang Mawng variety of Thai indigenous rice. The 7th AG-BIO/PERDO Graduate Conference on Agricultural Biotechnology and KU-UT Joint Seminar IV. December 8-9, 2016, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom, Thailand. (Abstract-Oral presentation)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

P-1-5

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

Nonglak Parinthawong[1,*], Siriporn Pramrit[1,2] and Tanee Sreewongchai[3]
[1] Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Chalongkrung Rd. Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand
[2] Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand
[3] 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_2 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_2 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Siriporn PRAMRIT[1,2]*and Nonglak PARINTHAWONG[3]

[1]**Department of Agricultural Biotechnology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand**
[2]**Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand**
[3]**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_2 population was developed from a cross between KDML105 and Yang mawng. Two hundred and twenty eight F_2 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_2 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

markers associated with rice blast resistance genes in an F_2 population derived from Yang mawng resistant variety and KDML105, a susceptible rice cultivar.

Materials and Methods

Plant material and phenotypic evaluation

The F_1 plant, which obtained from the cross between KDML105 and Yang mawng varieties were self-fertilized. A total of 228 F_2 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 10^5 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_2 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 $MgCl_2$ 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_2 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_2 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_2 seedlings, 223 seedlings were characterised as resistant, while only 5 seedlings were found to be susceptible to fungal

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pathogen isolates. The numbers of resistant and susceptible lines at the ratio of 3:1 (χ^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 (χ^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.		χ^2	*p*
		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

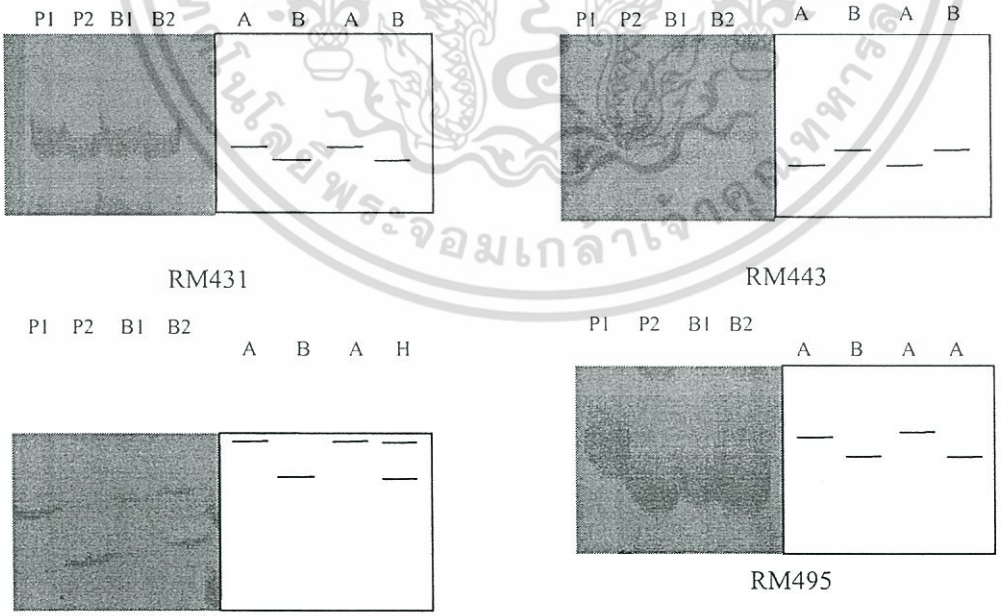


Figure 1 DNA patterns of markers analyzed by bulked segregant analysis (BSA). P1; KDML105, P2; Yang mawng, B1; resistance bulk and B2; susceptible bulk. A = susceptible parent allele; B = resistant parent allele and H = heterozygous.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Conclusion

In summary, an F_2 population was developed from a cross between KDML105 and Yang mawng. Two hundred and twenty eight F_2 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 selectionmarkers 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Molecular Mapping of Rice Blast Resistance Gene in Yang Mawng Variety of Thai Indigenous Rice

Pramrit, S.[1,2,3] and N Parinthawong[1]

[1] Department of Plant Production Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand
[2] Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand
[3] Thailand Advanced Institute of Science and Technology: (THAIST), Bangkok 10330, Thailand

Abstract

Rice blast, caused by *Pyricularia oryzae*, is one of the most devastated diseases affects rice production worldwide. KDML105 is a good quality cultivar, however, this cultivar is susceptible to the disease. Therefore, finding of new blast resistance gene is a major approach for rice breeding program. A Thai indigenous rice variety, Yang mawng, is highly resistant to blast fungus. In this study, F_1 and F_2 populations from a cross between KDML105 and Yang mawng were generated. The inheritance pattern of blast resistance and the linked markers associated with blast resistance in F_2 population were identified. Two hundred and twenty eight F_2 plants were inoculated with the conidia suspension of *P. oryzae* (mix of 19 isolates) and the disease was scored week later. The segregation of resistance and susceptible phenotype showed a goodness of fit to the ratio 15:1. 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. These results indicated resistance gene involved which is located on chromosome 1. The linkage analysis with these markers showed that the markers RM543, RM431 and RM443 were linked to the blast resistant gene at the distance 85.1, 73.6 and 45.8 centimorgans (cM), respectively. However, more F_2 populations are being analysed to confirm the resistance gene position.

Keywords: rice blast, blast resistance gene, *Pyricularia oryzae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปการใช้จ่ายเงิน

สัญญาเลขที่

โครงการ ภาษาไทย พันธุกรรมควบคุมลักษณะและระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมอง

ภาษาอังกฤษ Genetic inheritance and molecular mapping of blast resistant gene in Yang mawng variety of Thai indigenous rice

---

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย ผู้รับทุน ผศ.ดร. นงลักษณ์ เภรินทวงค์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 เดือนตุลาคม พ.ศ. 2557 ถึง 30 เดือนกันยายน พ.ศ. 2558

สรุปงบประมาณค่าใช้จ่ายที่ใช้นับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยถึงปัจจุบัน

หมวดค่าใช้จ่าย	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	ค่าใช้จ่ายจากรายงานครั้งก่อน	ค่าใช้จ่ายงวดปัจจุบัน	รวมค่าใช้จ่ายสะสมถึงปัจจุบัน	คงเหลือ (หรือเกิน)
งบบุคลากร: ค่าจ้างชั่วคราว	60,000	-	-	60,000	0
งบดำเนินงาน:					
ค่าตอบแทน	-	-	-	-	-
ค่าใช้สอย	-	-	-	-	-
ค่าวัสดุ	40,000	-	-	40,000	0
ค่าสาธารณูปโภค					
งบลงทุน: ค่าครุภัณฑ์					
รวม	100,000	-	-	100,000	0

.....

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

.....

ลงนามเจ้าหน้าที่การเงินโครงการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้วิจัย

1. **ชื่อ-นามสกุล** **(ภาษาไทย)** นางสาว นงลักษณ์ เภรินทวงค์
   (ภาษาอังกฤษ) Miss Nonglak Parinthawong
2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** 3220100451961
3. **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

ชื่อย่อปริญญา	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 ภายหลังการชักนำด้วย salicylic acid, methyl jasmonate และ B-aminobutyric acid เพื่อการพัฒนาเป็น gene marker สำหรับการตรวจหาระดับความต้านทานโรค

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร. นงลักษณ์ เภรินทวงค์
ผู้ร่วมวิจัย ผศ.ดร. พรหมมาศ คูหากาญจน์
แหล่งทุน คณะเทคโนโลยีการเกษตร
ปีงบประมาณ 2551 ปีที่แล้วเสร็จ 2555

ชื่อโครงการวิจัย ผลของสารสกัดจากขมิ้นชัน ว่านน้ำ ตะบูนดำ และมะคำดีควาย ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคทางใบของพืช

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร. นงลักษณ์ เภรินทวงค์
ผู้ร่วมโครงการวิจัย นางสาวชัชฎา ยังนิตย์
แหล่งทุน คณะเทคโนโลยีการเกษตร
ปีงบประมาณ 2552 ปีที่แล้วเสร็จ 2555

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษายีนก่อโรคไหม้ของข้าวในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร. นงลักษณ์ เภรินทวงค์
แหล่งทุน ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ปีงบประมาณ 2556 อยู่ในระหว่างการตีพิมพ์ผลงานวิจัย

5.2 ในฐานะผู้ร่วมโครงการวิจัย

ชื่อโครงการวิจัย การปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงโดยวิธีตัดแต่งพันธุกรรม
หัวหน้าโครงการ รศ.ดร. สุเม อรัญนารถ
ผู้ร่วมโครงการ ผศ.ดร. กัญจนา แซ่เตียว
ดร. นงลักษณ์ เภรินทวงค์
แหล่งทุน กองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีงบประมาณ 2551 อยู่ในระหว่างการเตรียมรายงานฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการวิจัย การทดสอบระบบการผลิตมะละกออย่างยั่งยืนในพื้นที่จังหวัดสระแก้ว
หัวหน้าโครงการ ดร. ลำแพน ขวัญพูล
ผู้ร่วมโครงการ ดร. นงลักษณ์ เภรินทวงค์
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 2nd 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 2nd 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 2nd International Symposium on Agricultural Technology. July 1-3, 2015, A-One The Royal Cruise Hotel, Pattaya, Thailand. (Proceeding-Poster)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Parinthawong, N., Pramrit, S. and Sreewongchai, T. 2014. Marker assisted selection of

gene resistance to leaf blast disease in Thai landrace rice. The 5th Asian Conference on Plant Pathology. November 3-6, 2014, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand. (Abstract-Poster)

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 16th Asian Agricultural Symposium and 1st 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 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand. p710-713.

Talubnak, C., P Koohakakan, **N. Parinthawong** and T. Jaenaksorn. 2010. Effect of the indigenous non-pathogenic *Pythium* spp. on growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in hydrogonics. Proceedings of 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

Koohakan, P., J. Rangjaroen, **N. Parinthawong** and T. Jaenaksorn. 2010. Distribution of bacterial antagonist in hydroponics. Proceedings of 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับชาติ

นวรัตน์ ใจหอม และ **นงลักษณ์ เภรินทวงค์**. 2557. การประเมินความหลากหลายและการจัดกลุ่มความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวที่เก็บรวบรวมในประเทศไทย. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 52 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 4-7 กุมภาพันธ์ 2557. หน้า 71-78.

นวรัตน์ ใจหอม สุภาภรณ์ เอี่ยมเข่ง และ **นงลักษณ์ เภรินทวงค์.** 2557. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว (*Pyricularia grisea*) ที่เก็บรวบรวมในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 32(3): 52-60.

เพ็ญนภา ตันเซียน ธานี ศรีวงศ์ชัย และ **นงลักษณ์ เภรินทวงค์**. 2557. วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 52 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 4-7 กุมภาพันธ์ 2557. หน้า 400-406.

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

ชัยวรกุล ไชยปัญญา กัญจนา แซ่เตียว สุเม อรัญนาถ และ **นงลักษณ์ เภรินทวงค์.** 2555. การโคลนและศึกษาการแสดงออกของยีน Flavanone 3-Hydroxylase (*F3H*) ในอุบลชาติล้มลุกเช นต์หลุยส์. เรื่องเต็มการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 11. 1-3 กุมภาพันธ์ 2555.

วรวุฒิ เอื้อมงคลการ กัญจนา แซ่เตียว สุเม อรัญนาถ และ **นงลักษณ์ เภรินทวงค์**. 2555. การสร้าง DNA สายผสมของยีน chalcone 4'-O-glucosyltransferase (*4'CGT*) from snapdragon (*Antirrhinum majus*) เพื่อการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงปุณฑริก. เรื่องเต็มการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 11. 1-3 กุมภาพันธ์ 2555.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้วิจัย

1. **ชื่อ-นามสกุล** **(ภาษาไทย)** นางสาว ศิริพร เปรมฤทธิ์
   (ภาษาอังกฤษ) **Miss Siriporn Pramrit**
2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** 1100300080660
3. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก**

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520
โทรศัพท์ 080-457-5620 โทรสาร 02-3298513
e-mail siripornpramrit@gmail.com

4. **ประวัติการศึกษา**

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถานที่จบ	ปีที่จบ
วท.บ. (เกษตรศาสตร์)	เกษตรศาสตร์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	2555

5. **ประสบการณ์งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และ/หรือ ที่ผ่านมา ทั้งภายในและภายนอกประเทศ**

การอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง Molecular Plant Breeding : Plant Disease Resistance ภายใต้โครงการพัฒนาเครือข่ายเชี่ยวชาญด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช และการผลิตพืชและเมล็ดพันธุ์ ณ อาคารปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ทุนสนับสนุนจากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชั้นสูง (Advanced Institute of Science and Technology : THAIST)

6. **ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่**

Parinthawong, N., Pramrit, S. and Sreewongchai, T. 2014. Marker assisted selection of gene resistance to leaf blast disease in Thai landrace rice. The 5th Asian Conference on Plant Pathology. November 3-6, 2014, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand. (Abstract-Poster)

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 2nd International Symposium on Agricultural Technology. July 1-3, 2015, A-One The Royal Cruise Hotel, Pattaya, Thailand. (Proceeding-Poster)

Pramrit, S. and Parinthawong, N. 2016. Molecular mapping of rice blast resistance gene in Yang Mawng variety of Thai indigenous rice. The 7th AG-BIO/PERDO Graduate Conference on Agricultural Biotechnology and KU-UT Joint Seminar IV. December 8-9, 2016, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom, Thailand. (Abstract-Oral presentation)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้