# การถ่ายทอดพันธุกรรมและการระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ยั้งมอง

# Genetic Inheritance and Mapping of Blast Resistant Gene in Yang Mawng, a Thai Indigenous Rice Variety

ศิริพร เปรมฤทธิ์

Siriporn Pramrit

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2560

KMITL-2017-AG-M-101-243

# การถ่ายทอดพันธุกรรมและการระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ยั้งมอง

# Genetic Inheritance and Mapping of Blast Resistant Gene in Yang Mawng, a Thai Indigenous Rice Variety

**ศิริพร เปรมฤทธิ์**

**Siriporn Pramrit**

**วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต**

**สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร**

**คณะเทคโนโลยีการเกษตร**

**สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง**

**พ.ศ.2560**

**KMITL-2017-AG-M-101-243**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# Genetic Inheritance and Mapping of Blast Resistant Gene in Yang Mawng, a Thai Indigenous Rice Variety

**SIRIPORN PRAMRIT**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF**

**THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF**

**MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY**

**FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

**2017**

**KMITL-2017-AG-M-101-243**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**COPYRIGHT 2017**

**FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**คณะเทคโนโลยีการเกษตร**

**สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง**

**ใบรับรองวิทยานิพนธ์**

---

**หัวข้อวิทยานิพนธ์** การถ่ายทอดพันธุกรรม และการระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทย พันธุ์ยั้งมอง

Genetic Inheritace and Mapping of Blast Resistant Gene in Yang Mawng Yariety, a Thai Indigenous Rice Variety

**นักศึกษา** นางสาวศิริพร เปรมฤทธิ์

**รหัสประจำตัว** 56604041

**ปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

**สาขาวิชา** เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์** ผศ.ดร.นงลักษณ์ เภรินทวงค์

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม** -

| คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ | | ลายมือชื่อ |
|---|---|---|
| ผศ.ดร.ธีรวัฒน์ | ศรุตโยภาส | |
| รศ.ดร.ธานี | ศรีวงศ์ชัย | |
| รศ.ดร.พรหมมาศ | คูหากาญจน์ | |
| ผศ.ดร.มณทินี | ธีรารักษ์ | |
| ผศ.ดร.นงลักษณ์ | เภรินทวงค์ | |

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

**วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ** 12 กรกฎาคม 2560

**สถานที่สอบ** ห้องประชุม 2 (ชั้น 1 ตึกบุนนาค)

**คณบดีรับรองแล้ว**

**(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณฑล แก่นมณี)**

**คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร**

**วันที่ 25 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2560**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **หัวข้อวิทยานิพนธ์** | การถ่ายทอดพันธุกรรมและการระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ยั้งมอง |
| **นักศึกษา** | ศิริพร เปรมฤทธิ์ |
| **รหัสนักศึกษา** | 56604041 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต |
| **สาขาวิชา** | เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร |
| **พ.ศ.** | 2560 |
| **อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์** | ผศ.ดร. นงลักษณ์ เภรินทวงค์ |

# บทคัดย่อ


โรคไหม้เป็นโรคที่มีความสำคัญและสร้างความเสียหายให้กับผลผลิตเป็นอย่างมาก มีสาเหตุจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* การใช้พันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานถือเป็นวิธีการป้องกันที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด อย่างไรก็ตามพันธุ์ต้านทานมักจะสูญเสียความต้านทานในระยะต่อมา เนื่องจากเชื้อราสาเหตุโรคไหม้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถปรับตัวเข้าทำลายพันธุ์ข้าวต้านทานภายในเวลาไม่กี่ฤดูปลูก ดังนั้นการค้นหาและระบุยีนต้านทานโรคไหม้ที่สามารถต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้หลากหลายสายพันธุ์จึงมีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความต้านทานโรคไหม้ของข้าวพันธุ์ยั้งมอง (GS20874) โดยปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 13 ไอ-โซเลทลงบนข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมอง ขาวดอกมะลิ 105 (ข้าวสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคไหม้) เจ้าหอมนิล และ IR64 (ข้าวสายพันธุ์ต้านทานต่อโรคไหม้) และประเมินความต้านทานโรคไหม้หลังปลูกเชื้อ 7 วันพบว่าข้าวพันธุ์ยั้งมองแสดงความต้านทานในระดับสูงต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลท RBR55002 PL1 และ PL2 แสดงความต้านทานปานกลางต่อ BKK55001 BKK55003 CRI34.1 CCO55002 SRN54002 SRN54005 THL191 และ UBN11351 และแสดงความอ่อนแอต่อไอโซเลท PLK40.4 และ UBN195167 ข้าวพันธุ์ยั้งมองจึงมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลท จากนั้นทำการระบุตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ยั้งมอง โดยปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้ทั้ง 13 ไอโซเลท ลงบนประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$-population) จำนวน 228 ต้น ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ และพันธุ์ยั้งมอง ศึกษาปฏิกิริยาของยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 และประเมินความต้านทานโรคไหม้หลังปลูกเชื้อ 7 วัน พบ




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การกระจายตัวของลักษณะต้านทานต่อลักษณะอ่อนแอต่อโรคไหม้ ในอัตราส่วน 15:1 ($p$=0.011, df=1.0) แสดงว่าข้าวพันธุ์ยั้งมองมียีนหลักในการควบคุมลักษณะความต้านทาน 2 ยีน คัดเลือกเครื่องหมาย SSR เพื่อระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ จาก 230 เครื่องหมายพบ 3 เครื่องหมายที่สามารถแยกลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อโรคไหม้ ได้แก่ เครื่องหมาย RM543 RM443 และ RM431 สร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้โปรแกรม MAPMAKER พบเครื่องหมาย RM543 RM431 และ RM443 มีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานบนโครโมโซมที่ 1 เป็นระยะทาง 21.2 10.5 และ 3.2 cM ตามลำดับ เพื่อยืนยันระยะทางระหว่างยีนต้านทานโรคไหม้และเครื่องหมาย RM443 จึงทำการคัดเลือกประชากรข้าวชั่วที่ 2 ที่มีลักษณะต้านทานโรคไหม้ แสดงผลวิเคราะห์เครื่องหมาย RM443 เป็นโฮโมไซกัสได้แก่ต้น $F_2T_{185}$ $F_2T_{218}$ และ $F_2T_{222}$ ใช้ประชากรรุ่น $F_3$ ของแต่ละต้นในการทดสอบความต้านทานโรคไหม้ พบต้นที่แสดงความอ่อนแอ 3 ต้น จาก 100 ต้น จึงยืนยันได้ว่าระยะห่างระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้เท่ากับ 3.2 cM เมื่อโอกาสเกิดรีคอมบิเนชั่น 1 เปอร์เซ็นต์หมายถึงระยะทางเท่ากับ 1 cM จากนั้นศึกษาการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้ โดยคัดเลือกยีนที่มีรายงานการเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM543 คือยีน *Pi37* ในต้นกล้าข้าวพันธุ์ยั้งมอง ขาวดอกมะลิ 105 และ IR64 ภายหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 13 ไอโซเลท และเก็บตัวอย่างใบข้าวหลังจากทำการปลูกเชื้อที่ 0 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง พบการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ในข้าวพันธุ์ IR64 ในขณะที่ไม่พบการแสดงออกของยีนในข้าวพันธุ์ยั้งมองและขาวดอกมะลิ 105 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมอง (GS20874) จึงเป็นยีนอื่นที่อยู่บริเวณปลายด้านล่างของโครโมโซม 1 ระยะห่างจากเครื่องหมาย RM443 เท่ากับ 3.2 cM นอกจากนี้การตรวจหายีนในกลุ่มยีน *Pi37* *Pish* และ *Pi64* บนโครโมโซมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ร่วมกับไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีนยืนยันว่าโครโมโซมข้าวพันธุ์ยั้งมองไม่มียีนต้านทานโรคไหม้ในกลุ่ม *Pi37*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| **Thesis Title** | Genetic Inheritance and Mapping of Blast Resistant Gene in Yang Mawng, a Thai Indigenous Rice Variety |
| **Student** | Siriporn Pramrit |
| **Student ID** | 56604041 |
| **Degree** | Master of Science |
| **Program** | Agricultural Biotechnology |
| **Year** | 2017 |
| **Advisor** | Asst. Prof. Dr. Nonglak Parinthawong |

# ABSTRACT

Rice blast, caused by *Pyricularia oryzae*, is a major disease of rice almost worldwide. However, resistant varieties are usually have less durable resistance because the fungus is high genetic diversity, and able to break the resistance within a few seasons. Therefore, 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, disease assessment was conducted using 13 rice blast fungal isolates from different blast disease regions of Thailand. Each fungal isolate was inoculated on 4 rice varieties included KDML105 (KDML105), Yang Mawng (YM), Jao Hom Nin (JHN) and IR64 and disease severity was scored. The result showed that Yang Mawng variety, was high resistant to blast isolate RBR55002, PL1 and PL2, moderate resistant to isolate BKK55001, BKK55003, CRI34.1, CCO55002, SRN54002, SRN54005, THL191 and UBN11351, and susceptible to isolate, PLK40.4 and UBN195167. The results indicated that Yang Mawng variety was broad spectrum resistance to multiple fungal isolates of blast pathogen. In order to map the resistance gene on chromosome, $F_1$ 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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

with conidia suspension mix of 13 isolates of *P. oryzae* and the disease was evaluated 7 days later. The segregation of resistance and susceptible phenotypes showed a goodness of fit to the ratio 15:1. The result suggested that 2 major resistance genes controlled resistant phenotype. Two hundred and thirty simple sequence repeat (SSR) markers were screened for polymorphism. Of 230 SSR markers, 3 markers showed polymorphism between resistance and susceptible included RM431, RM443 and RM543 of chromosome 1. The linkage analysis with these markers showed that the markers RM543, RM431 and RM443 were linked to the blast resistance gene at the distance 21.2, 10.5 and 3.2 cM, respectively. To confirm the distance between resistance gene and RM443 marker, the $F_2$ that showed resistance phenotype and homozygous of RM443 were selected included $F_2T_{185}$, $F_2T_{218}$ and $F_2T_{222}$. The $F_2$ generation of each $F_2$ plant were used for blast assessment. The finding of 3 susceptible in every 100 $F_3$ plants confirmed the distance 3.2 cM when 1 percent recombination is 1 cM. Expression analysis of candidate resistance gene linked to RM543, *Pi37*, was done in Yang Mawng, KDML105 and IR64 at 0, 6, 12, 24 and 48 hours after inoculation with 13 blast isolates. The result showed that *Pi37* expressed only in IR64 while no expression was found in Yang Mawng and KDML105. Suggesting that blast resistance gene in Yang Mawng was linked to RM443 with the distance of 3.2 cM and possibly not *Pi37*. Moreover, using of PCR technique with primers specific to genes in *Pi37* cluster confirmed non existence of *Pi37*, *Pish* and *Pi64* on the Yang Mawng chromosome.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจาก ผศ.ดร. นงลักษณ์ เภรินทวงค์ ซึ่งเป็นที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้ความรู้และคำแนะนำตลอดจนแนวทางแก้ไขปัญหาที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ธานี ศรีวงศ์ชัย ที่กรุณาให้ความรู้ตลอดจนคำแนะนำระหว่างการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จได้เป็นอย่างดี

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชั้นสูง (Advanced Institute of Science and Technology : THAIST) ให้ทุนสนันสนุนในการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง Molecular Plant Breeding : Plant Disease Resistance ภายใต้โครงการพัฒนาเครือข่ายเชี่ยวชาญด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชและการผลิตพืชและเมล็ดพันธุ์และได้รับการสนับสนุนจากโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 หน่วยงานสาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกๆ ท่านที่ได้ให้ความรู้ต่างๆ ให้กับข้าพเจ้า

ขอกราบขอบพระคุณครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุกๆ เรื่อง ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร และสาขาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกคนที่ให้คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดมา

ศิริพร เปรมฤทธิ์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

หน้า


บทคัดย่อภาษาไทย……I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……III

กิตติกรรมประกาศ……V

สารบัญ……VI

สารบัญตาราง……XI

สารบัญภาพ……XII

รายการคำย่อและสัญลักษณ์……XIII

บทที่ 1 บทนำ……1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย……2

1.3 สถานที่ดำเนินงาน……2

1.4 วิธีการดำเนินการศึกษา……3

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……4

2.1 ข้าว……4

2.1.1 ข้าวขาวดอกมะลิ 105……5

2.1.2 ข้าวพื้นเมืองไทย……6

2.2 โรคไหม้ของข้าว……7

2.2.1 ลักษณะอาการของโรค……8

2.3 แหล่งของความต้านทานและการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้……9

2.3.1 แหล่งของความต้านทานโรคไหม้และยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้……9

2.3.2 การแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้……11

2.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในข้าว……13

2.5 การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการปรับปรุงพันธุ์……14

2.6 การป้องกันโรคไหม้ของข้าวโดยการใช้พันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้15

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย……17

3.1 อุปกรณ์และวัสดุวิจัย……17



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า


3.1.1 ข้าวพันธุ์ทดสอบ……..……..17

3.1.2 ปุ๋ยเคมี……....17

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อรา……...17

3.1.4 สารเคมี……...17

3.1.5 ดีเอ็นเอมาตรฐาน……...18

3.1.6 เครื่องหมายดีเอ็นเอ……....19

3.1.7 อุปกรณ์……..19

3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย……20

3.2.1 การผสมพันธุ์เพื่อผลิตข้าวลูกผสม……20

3.2.1.1 การผสมพันธุ์ข้าวเพื่อผลิตลูกผสมชั่วที่ 1 ($F_1$- hybrid)……20

3.2.1.2 การสร้างประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 ($F_2$ population)……20

3.2.1.3 การสร้างประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 3 ($F_3$ population)……21

3.2.2 ความต้านทานของข้าวพันธุ์ยิ้งมองต่อประชากรเชื้อรา……21

3.2.3 การประเมินความต้านทานโรคไหม้……21

3.2.3.1 การเตรียมสารแขวนลอย conidia ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้……...21

3.2.3.2 การปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้บนต้นกล้าข้าว……22

3.2.3.3 วิธีประเมินการเกิดโรค……22

3.2.4 การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าว……23

3.2.5 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population)……24

3.2.5.1 การคัดเลือกเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้……24

3.2.5.2 การคัดเลือกเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้……26

3.2.5.3 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอในประชากรข้าวชั่วที่ 2……..…26


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า


3.2.5.4 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population) ทั้งหมด 228 ต้น……27

3.2.6 สร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้จากเปอร์เซ็นต์รีคอมบิเนชั่น (recombination).....28

3.2.7 การสร้างแผนที่เพื่อระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MAPMAKER……28

3.2.8 การแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้……29

3.2.8.1 ออกแบบไพร์เมอร์ของยีนต้านทานโรคไหม้……29

3.2.8.2 การเตรียมพันธุ์ข้าวเพื่อดูการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37*……29

3.2.8.3 การแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้……30

3.2.9 ยืนยันยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37*……31

บทที่ 4 ผลการทดลอง……33

4.1 ความต้านทานของข้าวพันธุ์ยั้งมองต่อประชากรเชื้อราจำนวน 13 ไอโซเลท……33

4.2 การผสมพันธุ์เพื่อผลิตข้าวลูกผสม……33

4.2.1 ประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ($F_1$ - hybrid)……33

4.2.2 ประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population)……34

4.3 การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้โดยวิธีทดสอบการเกิดโรคในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ generation) ……34

4.4 คัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพ่อและแม่ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population)……36

4.5 คัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความต้านทานและความอ่อนแอด้วยวิธี bulk segregant analysis……36

4.6 การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population)… ……37

4.7 สร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้จากเปอร์เซ็นต์รีคอมบิเนชั่น (recombination)……48


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า


4.8 การสร้างแผนที่เพื่อระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MAPMAKER……..49

4.9 การทดสอบความต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวชั่วที่ 3 ($F_3$ population) ……..……..…...51

4.10 การศึกษาการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้……...52

4.10.1 การออกแบบไพร์เมอร์ของยีนต้านทานโรคไหม้…….…...52

4.10.2 การแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ในข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 และการเปรียบเทียบปริมาณการแสดงออก ด้วยเทคนิค RT-PCR……....54

4.11 ยืนยันการมีอยู่ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* บนโครโมโซมของข้าวพันธุ์ยั้งมอง……..……..54

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง...……...56

5.1 ความต้านทานของข้าวพันธุ์ยั้งมองต่อประชากรเชื้อ 13 ไอโซเลท…….….56

5.2 การกระจายตัวของยีน และแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว.....56

5.2.1 การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population)……..……..56

5.2.2 การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$population).....57

5.2.3 แผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้จากเปอร์เซ็นต์รีคอมบิเนชั่น (recombination)……...……...…….58

5.2.4 แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้……....…..…….59

5.2.5 การทดสอบความต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวชั่วที่ 3 ($F_3$ generation)……...60

5.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้……...……60

5.4 ยืนยันการมีอยู่ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* บนโครโมโซมของข้าวพันธุ์ยั้งมอง……..……..61

บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง……...……..62


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บรรณานุกรม……...65

ภาคผนวก…….……...71

ภาคผนวก ก การเตรียมสารละลายและอาหารเลี้ยงเชื้อ……..…….72

ภาคผนวก ข ผลวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากร ข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$) จำนวน 228 ต้น ด้วยเครื่องหมาย SSR……...……76

ประวัติผู้วิจัย……..……..81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง


ตารางที่ หน้า

3.1 เชื้อสาเหตุโรคไหม้ 13 ไอโซเลทที่ใช้ในการทดสอบความต้านทานโรคและแหล่งที่มา……..……..…..……..…23

3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้……..……..32

4.1 ปฏิกิริยาก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมอง ขาวดอกมะลิ 105 ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล และพันธุ์ IR64 หลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ทีละไอโซเลท จำนวน 13 ไอโซเลท……...35

4.2 อัตราการกระจายตัวของลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 13 ไอโซเลทในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population) จำนวน 228 ต้น……..…..36

4.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่รวมทั้งผลรูปแบบแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค BSA จำนวน 111 เครื่องหมาย……..……...….38

4.4 การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 228 ต้น……48

4.5 ผลประเมินการเกิดโรคด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 13 ไอโซเลท บนประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population) ……..……52

4.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37*……...53



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ


ภาพที่ หน้า

3.1 เกณฑ์ให้คะแนนการเกิดโรคตามระดับคะแนนของ Roumen *et al.* (1997)……...23

4.1 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมายที่วิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA)……...43

4.2 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM543 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population) จำนวน 228 ต้น……..44

4.3 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM443 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population) จำนวน 228 ต้น……..45

4.4 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM431 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population) จำนวน 228 ต้น……...46

4.5 รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM495 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population) จำนวน 228 ต้น……...47

4.6 แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ และระยะห่างระหว่างเครื่องหมายบนโครโมโซม 1 ของข้าว วิเคราะห์ในประชากรข้าว 5 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 13 ไอโซเลท……50

4.7 แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ และระยะห่างระหว่างเครื่องหมายบนโครโมโซม 1 ของข้าว วิเคราะห์ในประชากรข้าว 48 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 13 ไอโซเลท……51

4.8 ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* และตำแหน่งของไพร์เมอร์บนยีน……53

4.9 การแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* (A) ในข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมอง ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์ IR64 ด้วยเทคนิค RT-PCR เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder (M) โดยใช้การแสดงออกของยีน *Actin1* (B) เป็นยีนอ้างอิง……...55

4.10 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของโลคัสยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์ยั้งมอง พันธุ์ IR64 ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล และข้าวพันธุ์ CO39 โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อโลคัสยีนต้านทานโรคไหม้ *Pish Pi37* และ *Pi64* เปรียบเทียบกับ 1 Kb DNA ladder (M) ……55



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# รายการคำย่อและสัญลักษณ์

| | | |
|---|---|---|
| bp | = | base pairs |
| cDNA | = | complementary deoxyribonucleotide acid |
| PCR | = | polymerase chain reaction |
| β | = | beta |
| RT-PCR | = | reverse transcription polymerase chain reaction |
| M | = | molar |
| mM | = | millimolar |
| df | = | degree of freedom |
| *p* | = | probability |
| cM | = | centiMorgans |
| PAGE | = | Polyacrylamide Gel Electrophoresis |
| BSA | = | Bulk Segregant Analysis |
| dNTPs | = | deoxynucleotide triphosphates |
| $X^2$ | = | Chi-Square |
| UV | = | ultraviolet |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวเป็นพืชอาหารที่สำคัญของโลก ประชากรมากกว่าครึ่งของโลกโดยเฉพาะประชากรในทวีปเอเชียบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก แหล่งปลูกข้าวที่สำคัญจึงอยู่ในทวีปเอเชีย ในปี พ.ศ. 2557 ประเทศไทยส่งออกข้าวมากเป็นอันดับ 1 ของโลก (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2558) ปริมาณส่งออกรวม 10.9 ล้านตันข้าวสาร มูลค่า 174,853 ล้านบาท ทั้งนี้ปริมาณข้าวที่ส่งออกแยกเป็นข้าวหอมมะลิ 1.73 ล้านตันข้าวสาร (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558) ข้าวหอมมะลิของไทยเป็นที่นิยมทั้งชาวไทยและชาวต่างประเทศ เนื่องจากมีคุณลักษณะเด่น คือเป็นข้าวที่มีอะมิโลสต่ำ คือประมาณ 13.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหุงเป็นข้าวสุกจึงมีลักษณะนุ่มเหนียว และที่สำคัญมีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์ กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ประกาศรับรองว่าข้าวหอมมะลิของไทยคือพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ปริมาณการผลิตข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในประเทศไทยยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภคทั่วโลก ให้ผลผลิตประมาณ 363 กิโลกรัมต่อไร่ และยังประสบปัญหาการสูญเสียผลผลิตที่เกิดจากการเข้าทำลายของโรคไหม้ เนื่องจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ (กรมการข้าว, 2556 ; สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2553)

โรคไหม้ของข้าวเกิดจากเชื้อราสาเหตุ *Pyricularia oryzae* Sacc. มีชื่อเรียกในระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศว่า *Magnaporthe oryzae* (Hebert) Barr. เชื้อราสามารถปรับตัวได้ดีในทุกสภาพแวดล้อม มีพืชอาศัยหลายชนิด สามารถเข้าทำลายข้าวได้เกือบทุกระยะการเจริญเติบโต จึงเกิดการระบาดอย่างรุนแรงได้ในทุกพื้นที่ที่มีการปลูกข้าว ทำให้ผลผลิตเสียหายเป็นจำนวนมาก (พูนศักดิ์, 2548)

การควบคุมโรคไหม้ในข้าวโดยใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีการที่เหมาะสมมากวิธีหนึ่ง เนื่องจากให้ผลคุ้มค่าในระยะยาว ช่วยลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรค ส่งผลให้ต้นทุนในการปลูกข้าวลดลงและลดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมได้ (พูนศักดิ์ และคณะ, 2550) รวมถึงปลอดภัยทั้งต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค ปัจจุบันได้มีการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าว 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 แต่การใช้ยีนต้านทานโรคไหม้แบบแคบที่จำเพาะกับเชื้อสาเหตุของโรคเพียงไม่กี่สายพันธุ์มักจะส่งผลให้ข้าวพันธุ์ต้านทานสูญเสียความต้านทานต่อโรคได้ภายในระยะเวลาไม่กี่ ปีเนื่องจากเชื้อราสาเหตุโรคไหม้มีการปรับตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และมีวิวัฒนาการให้ให้สามารถเข้าทำลายข้าวได้ (Sreewongchai *et al.* 2010) ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาและค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ใหม่ๆ อยู่เสมอ และแหล่งพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้ส่วนใหญ่ได้มาจากข้าวพันธุ์พื้นเมือง (ชัชวาล และ สุรีพร, 2552) แนวทางการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ในประเทศไทยจึงควรเลือกใช้ยีนต้านทานโรคไหม้ที่ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์ ควรมีการรวมยีนต้านทานโรคไหม้หลายๆ ยีนไว้ด้วยกัน เพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานโรคไหม้ได้อย่างยั่งยืน (ศรีสวัสดิ์ และคณะ, 2553)

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาของยีนต้านทานโรคไหม้ต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้และระบุตำแหน่งของยีนต้านทานต่อโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ยั้งมอง ซึ่งยีนที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลที่สำคัญและเป็นประโยชน์อย่างมากในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมคุณภาพดีของไทยให้ต้านทานต่อโรคไหม้อย่างยั่งยืนในอนาคต และอาจส่งผลให้ประเทศไทยสามารถส่งออกข้าวหอมมะลิได้มากขึ้น เป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของข้าวหอมไทยในตลาดโลก

**1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย**

**1.2.1** เพื่อศึกษาปฏิกิริยาของยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ยั้งมองต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย

**1.2.2** เพื่อศึกษาการถ่ายทอดพันธุกรรมควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ยั้งมองไปสู่รุ่นลูก

**1.2.3** เพื่อค้นหาและระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าวพันธุ์ยั้งมอง

**1.2.4** เพื่อตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ยั้งมองว่าเป็นยีนที่เคยมีการรายงานไว้แล้วหรือไม่

**1.3 สถานที่ดำเนินงาน**

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

ห้องปฏิบัติการโรคพืช ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

โรงเรือนปลูกและทดลองข้าว ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**1.4 วิธีการดำเนินการศึกษา**

ศึกษาปฏิกิริยาการก่อโรคของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 13 ไอโซเลทบนข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมอง เพื่อทดสอบความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ของข้าวพันธุ์ยั้งมอง ใช้ข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมองที่ต้านทานโรคไหม้ นำมาผสมกับพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่มีลักษณะดีแต่ไม่ต้านทานโรคไหม้ เพื่อสร้างประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 2 และ 3 นำประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 3 ไปทดสอบความต้านทานโรคไหม้ ทำการคัดเลือกเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ได้ และนำเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่มาแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) และทำการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้ว และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติร่วมกับข้อมูลฟีโนไทป์เพื่อสร้างแผนที่ยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว ทำการศึกษาข้อมูลของยีนต้านทานโรคไหม้ที่เชื่อมโยงกับเครื่องหมายดีเอ็นเอในบริเวณที่ระบุได้จากการสร้างแผนที่ยีน เพื่อออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีน สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีนต้านทานดังกล่าวด้วยเทคนิค RT-PCR และตรวจสอบการมีอยู่ของยีนต้านทานโรคไหม้บางยีนในข้าวพันธุ์ยั้งมองด้วยเทคนิค PCR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2
# งานวิจัยเกี่ยวข้อง

## 2.1 ข้าว

เป็นพืชอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก ประชากรมากกว่าครึ่งของโลกโดยเฉพาะประชากรในทวีปเอเชียบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก โดยเฉพาะประเทศในภูมิภาคเอเชีย นิยมรับประทานข้าวเป็นอาหารหลักมากกว่าในภูมิภาคอื่นๆ ของโลก ข้าวที่นิยมปลูก เพื่อบริโภคมีอยู่ 2 ชนิด คือ ข้าวแอฟริกา *(Oryza glaberrima* Steud.*)* และข้าวเอเชีย (*O. sativa* L.) ปลูกทั่วไปๆ ทุกประเทศ โดยข้าวที่ทำการค้าขายกันในตลาดโลกส่วนใหญ่เป็นข้าวเอเชีย ซึ่งสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามลักษณะทรงกอ เมล็ด และแหล่งปลูกเป็น 3 กลุ่ม คือ ข้าวอินดิกา มีลักษณะเมล็ดยาวรี เป็นข้าวที่ปลูกในเอเชียเขตร้อนรวมทั้งประเทศไทย ข้าวจาโปนิกา มีลักษณะเมล็ดป้อมกลมรี รวงแน่น ปลูกในเขตอบอุ่น เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี และข้าวจาวานิกา เป็นข้าวที่มีลักษณะเมล็ดป้อมใหญ่ รวงยาว ปลูกในประเทศอินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์แต่ไม่ได้รับความนิยม เพราะให้ผลผลิตต่ำ (ปิยะนันท์, 2543) ข้าวที่ปลูกในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นข้าวอินดิกา ซึ่งแบ่งตามปริมาณแป้งอะมิโลสและอะไมเลสแพคตินในเมล็ดออกเป็น ข้าวเจ้าและข้าวเหนียว ประกอบด้วยหลายพันธุ์ โดยมีการพัฒนาสายพันธุ์ขึ้นมาใหม่รวมกับข้าวพันธุ์พื้นเมืองเดิม พันธุ์ข้าวเหล่านี้มีทั้งชนิดข้าวเจ้าและข้าวเหนียว ทั้งพันธุ์ที่ปลูกเฉพาะนาปีและปลูกได้ตลอดปี บางสายพันธุ์เป็นข้าวหอม พันธุ์ข้าวส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง มีความต้านทานต่อโรคและแมลงที่สำคัญ มีคุณภาพการหุงต้มตามความต้องการของผู้บริโภค ตลอดจนทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นปัญหาสำคัญ อย่างไรก็ตามงานปรับปรุงดูแลพันธุ์ข้าวยังคงต้องดำเนินการต่อไปอย่างต่อเนื่อง (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2555)

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตศูนย์กลางความผันแปรของข้าว ประกอบกับสภาพแวดล้อมและภูมิอากาศมีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ทำให้เกิดความหลากหลายของพันธุ์ข้าวทั้งในกลุ่มของพันธุ์ข้าวที่นิยมปลูกอยู่ในปัจจุบัน พันธุ์ข้าวพื้นเมือง และพันธุ์ข้าวป่า (สมทรง, 2550) ในประเทศไทยพบพันธุ์ข้าวปลูกประมาณอย่างน้อย 3,500 ชื่อที่มีลักษณะต่างกัน โดยสถาบันวิจัยข้าวได้รวบรวมพันธุ์ข้าวปลูกและข้าวป่าของไทยไว้ได้มากกว่า 17,000 ตัวอย่าง (สงกรานต์ และ บริบูรณ์, 2545)

ในปี พ.ศ. 2557 ประเทศไทยส่งออกข้าวมากเป็นอันดับ 1 ของโลก (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2558) ปริมาณส่งออกรวม 10.969 ล้านตันข้าวสาร มูลค่า 174,853 ล้านบาท ทั้งนี้ปริมาณข้าวที่ส่งออกเป็นข้าวหอมมะลิ 1.73 ล้านตันข้าวสาร (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2558) ข้าวหอมของไทยเป็นที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องการทั้งภายในประเทศและนอกประเทศ ตลาดข้าวหอมโลกมีมูลค่าไม่ต่ำกว่า 2 แสนล้านบาท ครึ่งหนึ่งเป็นข้าวหอมมะลิ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมมะลิของไทยให้มีคุณภาพที่ดีขึ้น ต้านทานต่อโรค และแมลงศัตรู จะส่งผลให้ประเทศไทยส่งออกข้าวหอมได้มากขึ้น และเป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของข้าวหอมไทยในตลาดโลก ต้นทุนการผลิตข้าวหอมจะถูกลง ซึ่งเป็นผลดีต่อเกษตรกรและการแข่งขันในตลาดโลก (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2553)

**2.1.1 ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML105)**

ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) ได้มาจากการคัดเลือกแบบคัดพันธุ์บริสุทธิ์ (pure line selection) จากนั้นถูกนำไปปลูกเปรียบเทียบพันธุ์ที่สถานีทดลองข้าวโคกสำโรง และปลูกเปรียบเทียบพันธุ์ในท้องถิ่นภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จนได้สายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 4-2-105 ซึ่งเลข 4 หมายถึง สถานที่เก็บรวงข้าว คืออำเภอบางคล้า เลข 2 หมายถึงพันธุ์ทดสอบที่ 2 คือ ขาวดอกมะลิ และเลข 105 หมายถึง แถวหรือรวงที่ 105 จากจำนวน 199 รวง พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวเจ้าไวต่อช่วงแสงอย่างอ่อน (weakly photoperiod sensitive) ปลูกให้ผลดีในฤดูนาปี ความสูงถึงคอรวงเฉลี่ย 140 เซนติเมตร กอตั้ง ปล้องสีเหลืองอ่อน กาบใบและใบสีเขียว มีขนใบ ปลายใบตก ลิ้นใบสีขาวรูปร่างแหลมมี 2 ยอด หูใบและข้อต่อใบสีเขียวอ่อน ปลายยอดดอกสีขาว กลีบรองดอกสีขาว ยอดเกสรตัวเมียสีขาว ต้นข้าวแข็งปานกลาง (มีล้มบ้าง) รวงแน่นปานกลาง คอรวงยาว ระแง้ถี่ ใบธงเอนปานกลาง เปลือกและยอดเมล็ดสีฟาง มีขนสั้นบนเปลือกเมล็ด กลีบรองดอกสั้นสีฟาง น้ำหนักข้าวเปลือก 1,000 เมล็ด ประมาณ 27.9 กรัม เมล็ดข้าวเปลือกยาว 10.4 มิลลิเมตร กว้าง 2.6 มิลลิเมตร เมล็ดข้าวกล้องรูปร่างเรียวยาว ระยะพักตัวของเมล็ด 8 สัปดาห์ ผลผลิตเฉลี่ย 515 กิโลกรัมต่อไร่ ข้าวหอมของไทยเป็นที่นิยมทั้งชาวไทยและชาวต่างประเทศ เป็นข้าวที่มีคุณภาพเมล็ดดี ข้าวสารใส แกร่ง คุณภาพขัดสีดี ท้องไข่น้อย มีปริมาณ amylose ต่ำ ประมาณ 15–16 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหุงสุกมีลักษณะเหนียว นุ่ม และที่สำคัญมีกลิ่นหอมที่เป็นเอกลักษณ์ เป็นพันธุ์ข้าวที่ทนปานกลางต่อสภาพแล้ง ดินเปรี้ยว และดินเค็ม ปลูกได้ในพื้นที่ดอนและสภาพข้าวไร่ แต่มีข้อจำกัด คือ ผลผลิตค่อนข้างต่ำ ลำต้นอ่อนล้มง่าย ไม่ต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูข้าวทุกชนิด โดยเฉพาะโรคไหม้ พบว่าทำความเสียหายต่อผลผลิตของข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นอย่างมาก (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2553)

ในปี พ.ศ. 2541 สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (International Rice Research Institute, IRRI) ร่วมมือกับศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ดำเนินการปรับปรุงพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานต่อโรคไหม้ โดยรักษาคุณภาพเมล็ดและการหุงต้มที่ดีเช่นเดียวกับพันธุ์เดิมไว้ และมีการปรับตัวได้ดีในสภาพนาน้ำฝน ในภาคเหนือตอนบนและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ดำเนินการผสมพันธุ์ข้าวที่ IRRI ประเทศฟิลิปปินส์ พันธุ์ IR70179-45-1-1-1 เป็นพันธุ์พ่อที่มีลักษณะความต้านทานโรคไหม้ และมีการปรับตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ดีในนาน้ำฝน โดยผ่านการคัดเลือกจากการปลูกทดสอบในศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์แม่ ปลูกลูกผสมชั่วที่ 1 ($F_1$- hybrid) และปลูกคัดเลือกประชากรชั่วที่ 2 ($F_2$ population) โดยคัดเลือกต้นที่ต้านทานโรคไหม้และมีความหอม ผสมกลับ (backcross) ไปยังพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ได้ลูกผสมกลับชั่วที่ 2 ($BC_1F_2$) ทำการทดสอบความต้านทานโรคไหม้และความหอม คัดเลือกและนำไปปลูกในนาข้าว ผสมกลับอีกครั้งจนได้ลูกผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 2 ($BC_2F_2$) จากนั้นปลูกคัดเลือกรุ่นต่อๆ ไป ในปี พ.ศ. 2545 คัดเลือกพันธุ์ที่สามารถต้านทานโรคไหม้ได้ดี และนำมาทดสอบคุณภาพการหุงต้ม ได้ข้าวอายุเบาที่มีคุณสมบัติเหมือนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 19 สายพันธุ์ นำมาทดสอบการให้ผลผลิตเบื้องต้นในฤดูแล้งและฤดูฝน ของปี พ.ศ. 2546–2547 ทั้งภายในสถานีและในแปลงนาเกษตรกร จนได้สายพันธุ์ข้าว IR77924-62-71-1-2 ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์เป็นที่ยอมรับของเกษตรกร มีลักษณะเด่น คือ เป็นข้าวไม่ไวต่อช่วงแสง อายุตกกล้าถึงเก็บเกี่ยวประมาณ 100-110 วัน มีความต้านทานโรคไหม้ที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือของประเทศไทย คุณภาพเมล็ด การหุงต้ม เหมือนพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (บุญรัตน์ และคณะ, 2548) เมื่อวันที่ 6 มีนาคม 2550 คณะกรรมการพิจารณาพันธุ์ กรมการข้าว มีมติให้ข้าวพันธุ์ IR77924-62-71-1-2 เป็นพันธุ์รับรองชื่อ กข33 (หอมอุบล 80) เพื่อแนะนำให้เกษตรกรปลูก (สำนักงานวิจัยและพัฒนาข้าว, 2557)

**2.1.2 ข้าวพื้นเมืองไทย**

พันธุ์ข้าวพื้นเมืองเป็นพันธุ์ข้าวที่ได้รับการคัดเลือกโดยเกษตรกร และสืบทอดกันมาหลายชั่วอายุ เนื่องจากเป็นพันธุ์พื้นเมืองมีคุณสมบัติที่ดีเป็นที่ต้องการของคนในแต่ละท้องถิ่น สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง ทนต่อโรคและแมลง (วิชา, 2544) พันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทยทั้งหมดที่เก็บรวบรวมจาก 76 จังหวัด โดยจำแนกชื่อเบื้องต้นมีชื่อไม่ซ้ำกันพบทั้งหมด 5,928 ชื่อพันธุ์ จากความหลากหลายของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของประเทศไทยทำให้คาดเดาได้ว่าน่าจะมีพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทยมากกว่านี้ เพราะว่ายังมีอีกหลายตัวอย่างที่ยังไม่ทราบชื่อ และที่เก็บรวบรวมไว้ยังไม่ได้ทำการประเมินลักษณะประจำพันธุ์หรือจำแนกชื่อพันธุ์ พันธุ์ข้าวพื้นเมืองของไทยเหล่านี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างมากและมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าว (ฉวีวรรณ, 2543) เนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ได้ข้าวพันธุ์ดีไม่ว่าจะเป็นการเพิ่มผลผลิต เพิ่มคุณภาพ เพิ่มความต้านทานโรค และเพิ่มความต้านทานแมลง นอกจากจะต้องอาศัยเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์ การผสมพันธุ์ และการคัดเลือกพันธุ์ รวมไปถึงการทดสอบพันธุ์ที่เหมาะสม สิ่งที่สำคัญที่ขาดไม่ได้ คือ เชื้อพันธุ์ข้าว ยิ่งเชื้อพันธุ์ข้าวมีฐานทางพันธุกรรมกว้างมีความหลากหลายมากเท่าใด โอกาสและความสำเร็จที่จะได้พันธุ์ข้าวตามต้องการก็จะมีมากขึ้น (วิชา, 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

สมทรง และคณะ (2554) จำแนกและประเมินลักษณะต้านทานโรคไหม้ของเชื้อพันธุกรรมข้าว ประมาณ 5,000 ตัวอย่าง ที่ศูนย์วิจัยข้าวทั่วประเทศ ในระหว่างปี พ.ศ. 2551–2553 พบพันธุ์ข้าวส่วนใหญ่ค่อนข้างอ่อนแอจนถึงอ่อนแอมาก มีพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานโรคไหม้ในระดับสูงจำนวน 50 ตัวอย่าง เช่น บักม่วย (3257) เหลืองทอง (12518) เจ้าดำ (21648) อียี่ (22769) กข4 (22197) ดำหอม (23509) สังข์หยด (15101) และดอเหมย (13773) เป็นต้น และมีพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานโรคไหม้ในระดับกลางจำนวน 19 ตัวอย่าง เช่น ขาวแดง (23271) ขาวเกษตร (5467) หมากผาง (13905) จะหล่อยนะ (23152) และเบล้ละ (23728) เป็นต้น

Salih *et al*. (2013) จำแนกพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ จากพันธุ์ข้าวของไทยทั้งหมด 311 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น ข้าวพื้นเมืองจำนวน 263 ตัวอย่าง ข้าวที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์แล้วจำนวน 43 ตัวอย่าง และข้าวป่าจำนวน 5 ตัวอย่าง ตรวจสอบความต้านทานโดยปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 29 ไอโซเลทซึ่งเป็นเชื้อที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดพิษณุโลก อุบลราชธานี ขอนแก่น เชียงราย หนองคาย ชัยภูมิ และอุดรธานี จากการตรวจสอบพบพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 35 ตัวอย่าง แบ่งเป็น ข้าวพื้นเมืองจำนวน 25 ตัวอย่าง ข้าวที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์แล้วจำนวน 9 ตัวอย่าง และข้าวป่าจำนวน 1 ตัวอย่าง ในจำนวนพันธุ์พื้นเมือง 25 ตัวอย่างพบว่ามีพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานโรคไหม้ได้ในระดับสูงมากกว่าพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ หมายเลข GS23107 (ก่ำเฟื้อย) GS19769 (ห้วย) GS20874 (ยั้งมอง) และ GS23774(ดอกพยอมไร่) โดยไม่พบอาการของโรคบนพันธุ์ข้าวทั้ง 4 ตัวอย่างเลย

**2.2 โรคไหม้ของข้าว (Rice Blast Disease)**

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.2.1 ลักษณะอาการและการแพร่ระบาดของโรค**

เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ของข้าวสามารถเข้าทำลายได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง เชื้อราสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของต้นข้าว ตั้งแต่ใบ ลำต้น ข้อ และคอรวง โดยพูนศักดิ์ (2548) แบ่งอาการของโรคตามอายุของต้นข้าวออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะกล้า พบอาการของโรคเป็นจุดสีน้ำตาลขนาดเล็ก 1-2 มิลลิเมตร ในระยะที่เชื้อเข้าทำลายในวันที่ 1-2 วันแรก จากนั้นแผลจะเริ่มขยายใหญ่ขึ้นและเปลี่ยนเป็นจุดสีเทาลักษณะช้ำน้ำ ขนาดของแผลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร จะพบลักษณะของแผลนี้เมื่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้เข้าทำลายได้ 3-5 วัน ต่อมาแผลจุดช้ำน้ำจะเปลี่ยนเป็นรูปตาสีเทาขอบแผลสีน้ำตาล ขนาดของแผลกว้างประมาณ 3-5 มิลลิเมตร และยาว 5-15 มิลลิเมตร อาการเช่นนี้จะพบมากเมื่อเข้าทำลายได้ 7-10 วัน ในกรณีที่มีการระบาดรุนแรงจะพบจุดช้ำน้ำในปริมาณมากทั่วทั้งใบทำให้ใบแห้งตายคล้ายถูกน้ำร้อนลวก และในที่สุดทำให้ต้นกล้าฟุบตายได้ ระยะแตกกอ พบเชื้อสาเหตุโรคไหม้เข้าทำลายได้ที่ ใบ กาบใบ ข้อต่อใบ และข้อต่อลำต้น อาการส่วนใหญ่จะพบจุดสีน้ำตาลรูปตาตรงกลางแผลเป็นสีเทา ขนาดแผลมักจะใหญ่กว่าระยะต้นกล้า เมื่อเชื้อเข้าทำลายที่ข้อต่อใบและข้อต่อลำต้นจะพบแผลมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ใบข้าวจะหลุดหรือพับง่าย ในระยะออกรวง เชื้อสามารถเข้าทำลายข้าวที่รวงข้าวได้จนถึงคอรวง ในระยะนี้เรียกว่า โรคไหม้คอรวง (panicle blast) โดยสปอร์ของเชื้อจะงอกเส้นใยเข้าทำลายรวงข้าวทำให้รวงข้าวมีเมล็ดลีบ เปลือกเมล็ดข้าวมีสีเทาดำของสปอร์ของเชื้อ ในกรณีที่รวงข้าวสามารถยืดขึ้นมาก่อนที่เชื้อโรคไหม้เข้าทำลาย เชื้อก็ยังสามารถเข้าทำลายที่คอรวง บริเวณที่เชื้อเข้าทำลายจะมีสีเทาดำ รวงข้าวมีลักษณะเมล็ดไม่สะอาดและลีบเป็นจำนวนมาก ถ้าเกิดการระบาดอย่างรุนแรงจะพบรวงข้าวลีบทั้งรวงและรวงข้าวหักง่ายในบริเวณที่เชื้อเข้าทำลาย

โรคไหม้ของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* Sacc. หรือ *P. oryzae* Cav. มีชื่อเรียกในระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศว่า *Magnaporthe grisea* Barr. จัดอยู่ใน Class Ascomycete เดิมทีเชื้อราถูกแบ่งออกเป็น 2 สปีชีส์ ถ้าพบเชื้อเข้าทำลายข้าวเรียก *P. oryzae* และถ้าพบเข้าทำลายพืชตระกูลหญ้าอื่นๆ เรียก *P. grisea* โดยที่เชื้อราทั้งสองนี้พบว่าไม่มีความแตกต่างกันไม่ว่าลักษณะของเส้นใย จำนวนนิวเคลียส ลักษณะและสีของสปอร์ ในสภาพการเจริญและสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ ดังนั้นในปี พ.ศ. 2535 ได้สรุปเหตุผลการเหมือนกันของเชื้อทั้งสองนี้ว่าควรที่จะใช้ชื่อเดียวคือ *P. oryzae* (พูนศักดิ์, 2548)

เชื้อราอยู่ข้ามฤดูในรูปของเส้นใยและโคนิเดียในเศษซากพืชที่เป็นโรค ในเมล็ดข้าว ต้นข้าวและนอกจากนี้ยังอยู่ตามพืชอาศัยอื่นๆ พืชอาศัยโดยมากอยู่ในตระกูลหญ้า นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถพบได้ในพืชตระกูลอื่นอีก เช่น Musaceae Cannaceae Zingiberaceae Cyperaceae และมีรายงานว่า เชื้อรานี้ติดกับเมล็ดข้าวได้นานที่สุด 4 ปี (Neergaard *et al.,* 1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อราสาเหตุโรคไหม้นี้สามารถเข้าทำลายข้าวได้ทุกระยะตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง โดยเชื้อจะสร้างโคนิเดียปลิวไปในอากาศ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมได้แก่ ความชื้นในอากาศสูง อุณหภูมิอยู่ในช่วง 25–30 องศาเซลเซียส เมื่อสปอร์ตกลงบนใบข้าวในสภาพที่ใบข้าวเปียกชื้นนานกว่า 10 ชั่วโมงขึ้นไปจะพบว่าเกิดการระบาดของโรคไหม้ โดยที่สปอร์จะเริ่มงอกเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมเพียง 30–90 นาที โดยอาศัยน้ำที่เกาะอยู่ที่ผิวใบข้าวในการงอกเส้นใยและใช้เวลาประมาณ 2–4 ชั่วโมง สร้าง appressorium เพื่อทำหน้าที่ยึดเกาะเพื่อที่จะใช้อวัยวะปลายแหลมที่เรียกว่า penetration peg แทรกตัวเข้าไปในเนื้อเยื่อใบและเจริญใช้อาหารในใบข้าว (พูนศักดิ์, 2548)

การแพร่ระบาด พบโรคในแปลงที่ต้นข้าวหนาแน่นทำให้อับลม ถ้าใส่ปุ๋ยอัตราสูงและมีสภาพแห้งในตอนกลางวันและชื้นจัดในตอนกลางคืน น้ำค้างยาวนานถึงตอนสายราว 9 โมงเช้า ถ้าอากาศค่อนข้างเย็น อุณหภูมิประมาณ 22–25 องศาเซลเซียส ลมแรง จะช่วยให้โรคแพร่กระจายได้ดี (สำนักวิจัยและพัฒนาการข้าว, 2552)

**2.3 แหล่งของความต้านทานและการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้**

โรคไหม้เป็นโรคที่มีความสำคัญมากอันดับหนึ่งของข้าว เชื้อราสามารถเข้าทำลายต้นข้าวได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง ซึ่งถ้าระบาดในระยะออกรวงจะทำให้ผลผลิตเสียหายอย่างมาก การลดความเสียหายของโรคไหม้มีด้วยกันหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีการก็มีความเหมาะสมตามเหตุการณ์ที่เกิดและสถานการณ์ตามช่วงเวลานั้น รวมทั้งผลกระทบกับสภาพแวดล้อมที่จะเกิดตามมา การใช้พันธุ์ข้าวที่ต้านทานนับเป็นวิธีการที่ดีวิธีหนึ่งในการควบคุมโรค ซึ่งนอกจากจะช่วยลดการใช้สารเคมีแล้ว เกษตรกรยังสามารถนำไปใช้ได้ง่าย และประหยัด (อังคณา และคณะ, 2557)

**2.3.1 แหล่งของความต้านทานโรคไหม้และยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้**

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ได้ข้าวพันธุ์ดีไม่ว่าจะเป็นการเพิ่มผลผลิต เพิ่มคุณภาพ หรือเพิ่มความต้านทานโรคหรือแมลง นอกจากจะต้องอาศัยวิธีการปรับปรุงพันธุ์ การผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ รวมไปถึงการทดสอบพันธุ์ที่เหมาะสม วัตถุดิบที่สำคัญที่ขาดไม่ได้ คือ เชื้อพันธุ์ข้าว ยิ่งเชื้อพันธุ์ข้าวมีฐานทางพันธุกรรมกว้างและแปรปรวนมากเท่าใด โอกาสและความสำเร็จที่จะได้พันธุ์ตามต้องการก็จะมีมากขึ้น (วิชา, 2544)

มีรายงานการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้มากกว่า 100 ยีน แต่มียีนต้านทานเพียง 22 ยีนเท่านั้นที่ได้รับการโคลน (clone) และศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมแล้ว (Wang *et al*., 2014) โดยยีนต้านทานที่ถูกค้นพบจะเรียกชื่อนำหน้าว่า *Pi* ตามหลักเกณฑ์ที่กำหนดโดยคณะกรรมการว่าด้วยการกำหนดยีนสัญลักษณ์ระหว่างประเทศในปี ค.ศ.1995 เพื่อให้ การเรียกชื่อยีนต้านทานเป็นไปในทิศทางเดียวกัน และหากพบยีนมากกว่าหนึ่งยีนที่สันนิษฐานว่าเป็นยีนที่เหมือนกัน การพิจารณาจะขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาของยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นั้นที่มีต่อกลุ่มเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ และผลการวิเคราะห์กลุ่มลิงเกจของยีน นอกจากนี้ยังมียีนอีกหลายยีนที่มีการสันนิษฐานว่ามีตำแหน่งที่เชื่อมโยงใกล้ชิดกันมาก เช่น ยีน *Pi2/Piz Piz-t* กับยีน *Piz-5* บนโครโมโซม 6 ยีน *Pik Pik-s Pik-p Pik-m Pik-h* กับยีน *Pik-g* บนโครโมโซม 11 และยีน *Pita* กับยีน *Pita-2* บนโครโมโซม 12 (Koide *et al.,* 2009) จากข้อมูลการรายงานของ Wang *et al.* (2014) สามารถสรุปได้ว่ายีนต้านทานโรคไหม้กว่าครึ่งหนึ่งที่พบมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 6 11 และ 12 และยังพบยีนต้านทานโรคไหม้กระจายอยู่เกือบทุกโครโมโซมของข้าว ยกเว้นโครโมโซมที่ 3

การตอบสนองของยีนต้านทานต่อเชื้อชนิดต่างๆ มีการตอบสนองที่หลากหลายสามารถจำแนกยีนต้านทานได้เป็น 7 ประเภท กลุ่มที่ใหญ่ที่สุดและสำคัญที่สุดคือ nucleotide binding site plus leucine-rich repeat (NBS-LRR) (Martin *et al*., 2003; Howles *et al*., 2005) ในปัจจุบัน ยีนต้านทานโรคไหม้จำนวน 22 ยีนที่ได้รับการโคลนแล้ว ได้แก่ *Pit Pi37 Pish Pib Pi21 Pid2 Pi9 Pi2 Piz-t Pid3 Pi25 Pi36 Pi5 Pi1 Pik Pikm Pikp Pikh Pi54rh Pia Pb1* และ *Pita* (Wang *et al.,* 2014) ส่วนใหญ่มีโดเมนโครงสร้างเป็น NBS-LRR ซึ่งเป็นโครงสร้างที่พบบ่อยที่สุดของยีนต้านทานในพืช มีเพียงยีน *Pid2* เท่านั้นที่มีโครงสร้างโดเมนเป็น B-lectin (Bent, 1996; Hammond-Kosack and Jones, 1997; Hulbert *et al.,* 2001) โดยสันนิษฐานว่าโดเมนโครงสร้างของ NBS-LRR เป็นส่วนที่เกิดปฏิกิริยาต่อยีนก่อโรคของเชื้อสาเหตุโรคซึ่งเป็นไปตามกฎ gene-for-gene (Flor, 1971)

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

Huang *et al.* (2011) ค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ยีนใหม่ *Pi47* และ *Pi48* ในพันธุ์ข้าวพื้นเมือง Xiangzi 3150 (XZ3150) ที่มีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ *M. grisea* ที่เก็บรวบรวมจากมณฑลยูนานในประเทศจีน การจำแนกยีนต้านทานโรคไหม้ในพันธุ์ข้าว XZ3150 ในประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 9 ซึ่งเป็น recombinant inbred line (RILs) จำนวน 286 ต้น ที่ได้จากการผสมระหว่าง XZ3150 และ CO39 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ ค้นหาและสร้างแผนที่ของยีนต้านทานโดยใช้เครื่องหมาย simple sequence repeat (SSR) จากแผนที่ยีนพบว่ายีนต้านทานโรคไหม้ยีนใหม่ *Pi47* มีตำแหน่งที่ตั้งอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บนโครโมโซมที่ 11 ระหว่างเครื่องหมาย RM206 และ RM224 และยีนต้านทานโรคไหม้ยีนใหม่ *Pi48* มีตำแหน่งที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 12 ระหว่างเครื่องหมาย RM5364 และ RM7102

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

Li *et al*. (2012) จำแนกยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองในมณฑลยูนาน จำนวน 173 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมาย simple sequence repeat (SSR) คือเครื่องหมาย MRG4766 พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง 64 พันธุ์ คิดเป็น 36.99 เปอร์เซ็นต์ ของพันธุ์ข้าวทั้งหมด พบว่าพันธุ์ข้าวที่มียีน *Pi1* กระจายอยู่ทั่วไปในมณฑลยูนาน และยังพบว่ายีน *Pi1* มีความถี่ของการกระจายตัวสูงมากคิดเป็น 41.03 เปอร์เซ็นต์ ในบริเวณพื้นที่ปลูกข้าวทางตอนใต้ของมณฑลยูนาน ประเทศจีน

สำหรับประเทศไทยมีตำแหน่งที่ตั้งอยู่ในเขตศูนย์กลางความผันแปรของข้าวประกอบกับสภาพแวดล้อมและภูมิอากาศมีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ทำให้เกิดความหลากหลายของพันธุ์ข้าวทั้งในกลุ่มของพันธุ์ข้าวที่นิยมปลูกอยู่ในปัจจุบัน พันธุ์ข้าวพื้นเมือง และพันธุ์ข้าวป่า (สมทรง, 2550)

อิงออน และคณะ (2553) ค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยจำนวน 69 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนต้านทาน *Pid2* ผลจากการตรวจสอบพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองทุกพันธุ์ ซึ่งในจำนวนนี้มี 39 พันธุ์ที่มีอัลลีลที่ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* ยืนยันผลการตรวจสอบโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีอัลลีลที่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* เปรียบเทียบกับพันธุ์ที่มีอัลลีลที่ไม่ต้านทานของยีน *Pid2*

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

**2.3.2 การแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้**

ความต้านทานโรคที่เกิดขึ้นในพืช สามารถจำแนกตามการเหนี่ยวนำและกลไกของความต้านทานได้ 2 ประเภท คือ ความต้านทานที่มีอยู่แล้วในพืช เช่น ความหนาและความแข็งแรงของผนัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ ชั้นของแวกซ์ (wax) และคิวติเคิล (cuticle) ที่ปกคลุมบริเวณลำต้นและผิวใบช่วยขัดขวางเชื้อรา บางชนิดในการแทงเข้าสู่เซลล์พืช พืชบางชนิดสังเคราะห์สารไฟโตแอนทิซิปิน (phytoanticipin) ที่มีผลในทางยับยั้งการเจริญของเชื้อราหรือแบคทีเรียสาเหตุโรค ซึ่งโครงสร้างเหล่านี้เป็นเหมือนการป้องกันชั้นแรกของพืช (Buchanan *et al*., 2000) และความต้านทานที่พืชถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้น เป็นลักษณะความต้านทานที่พืชถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวเองภายหลังเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลาย โดยโมเลกุลของพืชที่ทำหน้าที่เป็นตัวตอบสนองการกระตุ้น (pattern recognition receptor; PRR) สามารถตรวจจับโมเลกุลจากเชื้อสาเหตุโรค (pathogen-associated molecular pattern; PAMP) ที่สัมผัสผิวของเซลล์พืช ความต้านทานลักษณะนี้มีชื่อเรียกเฉพาะว่า PAMP-triggered immunity หรือ PTI การรับรู้ของพืชส่งผลให้เกิดการตอบสนองในแบบต่างๆ ทั้งในลักษณะเพื่อป้องกันพืชและเพื่อกำจัดเชื้อสาเหตุที่เข้าทำลายพืช (Thomma *et al.,* 2011)

ยีนต้านทานโรค (R gene) เป็นองค์ประกอบหลักของยีนต้านทานโรคซึ่งสามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนประกอบด้วย nucleotide-binding site (NBS) ร่วมกับ leucine-rich repeats (LRRs) โปรตีน NBS-LRR มีความสำคัญในเรื่องการจดจำและความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคที่หลากหลาย เช่น ไวรัสแบคทีเรีย เชื้อรา ไส้เดือนฝอย และแมลง (McHale *et al*., 2006) โปรตีน NBS-LRR มีหลากหลายกลไก กลไกหนึ่งคือทำปฏิกิริยาโดยตรงกับ effector หรือผลผลิตยีน *Avr* ของเชื้อก่อโรค ทำให้ไม่สามารถก่อโรคได้ (Flor, 1971)

Navadagi *et al.* (2014) โคลนยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* จากข้าวอินดิกาสายพันธุ์ Tetep ซึ่งสามารถต้านทานแบบกว้างต่อเชื้อรา *M. oryzae* จากการศึกษาลักษณะโปรตีนของยีน *Pi54* สามารถพิสูจน์ได้ว่า โปรตีนของยีน *Pi54* มีปฏิกิริยาต่อ *Avr-Pi54* ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ถอดรหัสได้โปรตีนขนาดประมาณ 43 kDa มีการแสดงออกต่อเชื้อรา *M. oryzae* ตรวจสอบด้วยวิธี phylogenetic และ western blot analysis และทำการยืนยันผลของโปรตีนด้วย MALDI-TOF analysis โปรตีนของยีน *Pi54* มีปฏิกิริยาต่อ *Avr-Pi54* ผ่านโดเมน LRR domain ได้แก่ โดเมน STI1 และ RhoGEF

Parisa *et al.* (2015) ศึกษาข้าวสายพันธุ์มาเลเซียจำนวน 10 พันธุ์ โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และการตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ด้วยเทคนิค quantitative PCR (qPCR) ประเมินการเจริญเติบโตของประชากรเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ต้านทานและข้าวพันธุ์อ่อนแอ ตรวจดูการสังเคราะห์แสงและวัดคลอโรฟิลล์เพื่อศึกษาผลกระทบเมื่อเชื้อ *M. oryzae* เข้าสู่ต้นข้าวเหล่านี้ และใช้เทคนิค real-time PCR ศึกษาการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้จำนวน 8 ยีน ที่ได้มาจากข้าวสายพันธุ์มาเลเซียจำนวน 10 พันธุ์ พบว่ายีนต้านทาน *Pikh Pi9 Pi21* และ *Osw45* เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *M. oryzae* ในข้าวสายพันธุ์มาเลเซียจำนวน 10 สายพันธุ์ หลังจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลูกเชื้อเป็นเวลา 31 ชั่วโมง ทั้งคลอโรฟิลล์และการสังเคราะห์แสงลดลง แต่ยีน *Pikh* แสดงออกอย่างต่อเนื่องในข้าวสายพันธุ์อ่อนแอ ในขณะที่ยีนต้านทาน *Pi9 Pi21* และ *Osw45* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น

**2.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในข้าว**

เชื้อสาเหตุโรคไหม้มีความแปรปรวนมากกว่าเชื้อราชนิดอื่นๆ เนื่องจากเชื้อชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลงได้อย่างรวดเร็วภายในไม่กี่ชั่วอายุ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราเกิดได้จากหลายสาเหตุ ได้แก่ ก) การกลายพันธุ์ของเชื้อรา พบว่าการกลายของลักษณะการสร้างเม็ดสี (melanin pigment) บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์มีผลต่อความรุนแรงของเชื้อรา โดยเม็ดสีของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ประกอบด้วยสาร polymerized dihydroxynaphthalene สารนี้เกี่ยวข้องกับขบวนการงอกเส้นใยและการแทงเข้าสู่ใบข้าว (Wheerler and Bell, 1988; Howard and Ferrari, 1989 อ้างโดย พูนศักดิ์, 2548) การกลายพันธุ์ของโคนิเดียเชื้อราทำให้มีความผิดปกติของรูปร่างลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีน *SMO1* การกลายพันธุ์นี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการเกิดโรคของเชื้อรา (Shi and Leung, 1995 อ้างโดยพูนศักดิ์, 2548) ข) การแลกเปลี่ยนหน่วยพันธุกรรมของเชื้อในระยะของ การแบ่งเซลล์เกิดขึ้นในระยะที่เชื้อรามีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิด parasexual recombination ได้ด้วยความถี่สูง (Genovesi and Magill, 1976 อ้างโดย พูนศักดิ์, 2548) ค) การเกิด transposable element ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดสั้นๆ ที่สามารถเคลื่อนย้ายเข้าออกในจีโนมของพืชได้ อาจทำให้เชื้อสาเหตุโรคไหม้เกิดการกลายพันธุ์ได้ รวมไปถึง ง) การเคลื่อนย้ายประชากรของเชื้อราจากแหล่งปลูกข้าวหนึ่งไปสู่อีกแหล่งหนึ่ง ทำให้ตรวจพบสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่แตกต่างจากที่มีอยู่เดิมในพื้นที่ ด้วยสาเหตุเหล่านี้ทำให้เกิดการระบาดของโรคไหม้อยู่เป็นประจำ เมื่อนักปรับปรุงพันธุ์ได้พัฒนาพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้พันธุ์ใหม่ออกมา เชื้อราก็สามารถปรับตัวเพื่อเข้าทำลายข้าวพันธุ์ใหม่ได้ในระยะเวลาไม่นาน (พูนศักดิ์, 2548)

พูนศักดิ์ และคณะ (2550) ตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทย โดยปลูกพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ที่แตกต่างกันจากแหล่งต่างๆ ในแปลงทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี และศูนย์วิจัยข้าวขอนแก่น ในภาคเหนือที่ศูนย์วิจัยข้าวแพร่ ภาคเหนือตอนล่างที่ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก และภาคใต้ที่ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง เก็บตัวอย่างเชื้อโรคไหม้ที่เข้าทำลายใบข้าวและคอรวงในพันธุ์ทดสอบมาตรฐาน โดยวิธีการแยกเชื้อให้ได้โคนิเดียเดี่ยวจนได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำไปทดสอบความรุนแรงในการเข้าทำลายของเชื้อบนพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว 18 สายพันธุ์ จากเชื้อจำนวน 2,476 ไอโซเลต สามารถจำแนกเชื้อได้ 623 สายพันธุ์ แบ่งออกเป็นสายพันธุ์ที่พบประจำจำนวน 186 สายพันธุ์ สายพันธุ์ที่หายากจำนวน 437 สายพันธุ์ พบว่าประชากรเชื้อสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทยมีความหลากหลายสูง ยีนต้านทานในข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บางพันธุ์แสดงความต้านทานได้เฉพาะพื้นที่และฤดูปลูกข้าว สายพันธุ์ที่พบประจำมีความรุนแรงน้อยกว่าสายพันธุ์ที่หายาก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยพบเชื้อเข้าทำลายมากที่สุด

Sirithunya *et al.* (2007) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *P. grisea* ในประเทศไทย โดยเก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุโรคไหม้จาก ข้าว หญ้า ข้าวบาร์เลย์ และข้าวป่ารวมทั้งหมด 174 ไอโซเลท ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราโดยใช้เทคนิค Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD) แล้วจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อราแต่ละไอโซเลตได้เป็น 9 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม A ถึงกลุ่ม I พบว่ากลุ่ม B C และ H มีความโดดเด่นที่สุดพบมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อสาเหตุทั้งหมดในการศึกษานี้ จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของเชื้อราจะเห็นว่ากลุ่มเชื้อราสายพันธุ์ที่มีความโดดเด่นจะมีการกระจายตัวของประชากรสูงโดยจะกระจายตัวอยู่ทั่วประเทศไทย แต่ในสายพันธุ์อื่นๆ จะมีการกระจายตัวอย่างจำกัดเฉพาะพื้นที่ เช่น สายพันธุ์กลุ่ม A ถูกจำกัดอยู่เพียงในบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย ในขณะที่สายพันธุ์กลุ่ม B และ C มีการกระจายตัวอย่างกว้างขวาง แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของชีววิทยาและสิ่งแวดล้อมที่มีผลกระทบต่อความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ จากผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา พบว่าในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคไหม้สูง ในขณะที่ภาคตะวันออกและภาคใต้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ

**2.5 การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการปรับปรุงพันธุ์**

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional breeding) เพื่อปรับปรุงให้พืชมีลักษณะตามที่ต้องการภายในต้นเดียว ถ้าเป็นลักษณะที่คัดเลือกยาก ถูกควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่งหรือมีอัตราการถ่ายทอดทางพันธุกรรมต่ำ จำเป็นต้องใช้ความเชี่ยวชาญอย่างมากในการคัดเลือก หรือใช้ระยะเวลานานในการคัดเลือก ทำให้การปรับปรุงพันธุ์พืชมีความล่าช้า ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการนำเทคโนโลยีทางชีวภาพมาใช้เพื่อช่วยในการคัดเลือกลักษณะที่ต้องการ เรียกว่า Marker-assisted selection (MAS) สามารถคัดเลือกได้ครั้งละหลายลักษณะพร้อมกัน และใช้เวลาน้อยในการคัดเลือก ซึ่งต่างจากวิธีการปกติที่ต้องใช้จำนวนรอบในการคัดเลือกมาก

วราพงษ์ และคณะ (2550) ปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข6 ให้ทนต่อสภาพน้ำท่วมฉับพลันโดยการถ่ายทอดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มียีนทนน้ำท่วม *sub1* จากพันธุ์พ่อสายพันธุ์ KD571-77 ไปสู่พันธุ์แม่คือ กข6 ด้วยวิธีการผสมกลับ และใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSRs ตำแหน่ง RM0873 RM219 และ RM285 ซึ่งอยู่บนโครโมโซม 9 ของข้าวช่วยในการคัดเลือก พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 3 ตำแหน่งสามารถใช้คัดเลือกประชากรผสมกลับครั้งที่ 1 ชั่วที่ 1 ($BC_1F_1$) ที่มียีน *sub1* จำนวน 16 ต้น จากประชากรทั้งหมด 53 ต้น คิดเป็นร้อยละ 30 และเมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล PB7F และ PB8R ตรวจหาต้นข้าวที่มียีนต้านทาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคขอบใบแห้ง *Xa21* พบว่ามี 3 ต้นที่มียีนนี้อยู่ด้วย และในประชากรข้าวผสมกลับครั้งที่ 2 ชั่วที่ 1 ($BC_2F_1$) พบว่าจากจำนวนที่ปลูกคัดเลือก 50 ต้น มี 26 ต้นที่มียีน *sub1* การผสมกลับครั้งที่ 3 ชั่วที่ 1 ถูกปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อให้ได้ประชากรผสมกลับครั้งที่ 3 ชั่วที่ 2 ($BC_3F_2$) ต้นที่ถูกคัดเลือกไว้จะถูกนำไปผสมกลับกับ กข6 จนได้สายพันธุ์ near-isogenic lines (NILs) ที่มีลักษณะเหมือนกับพันธุ์ กข6 แต่มีลักษณะทนน้ำท่วมฉับพลัน เพื่อนำไปทดสอบในแปลงและแนะนำให้เกษตรกรในพื้นที่เสี่ยงต่อภาวะน้ำท่วมใช้ปลูกในที่สุด

นัททรียา และ ภิญญารัตน์ (2559) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีนต้านทานโรคไหม้ทั้งสิ้น 5 ยีนได้แก่ *Pi27(t) Pib Pi36 Pik-h* และ *Pi20(t)* ที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 1 2 8 11 และ 12 ของข้าวตามลำดับ ช่วยในการคัดเลือกลักษณะต้านทานต่อโรคไหม้ในประชากรผสมกลับครั้งที่ 1 ชั่วที่ 1 จำนวน 300 ต้นจากคู่ผสมระหว่างพันธุ์สกลนคร (SKN) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นข้าวเหนียว มีกลิ่นหอมและคุณภาพข้าวสุกเหนียวนุ่ม กับพันธุ์ กข33 (RD33) ที่มีศักยภาพต้านทานต่อโรคไหม้ โดยคัดเลือกต้นที่มีพันธุกรรมแบบคงตัวในลักษณะต้านทานต่อโรคไหม้ได้จำนวนทั้งสิ้น 160 ต้น ซึ่งจะได้นำไปใช้ในขั้นตอนต่อไปของการปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้มีการใช้ข้อมูลทางฟีโนไทป์ของประชากรผสมกลับครั้งที่ 1 ชั่วที่ 1 มาประกอบการคัดเลือกเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกต้นที่ต้องการ

**2.6 การป้องกันโรคไหม้ของข้าวโดยการใช้พันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้**

โคนิเดียสาเหตุโรคไหม้ของข้าวจะแพร่ระบาดไปกับน้ำโดยเฉพาะเมื่อความชื้นสูงสภาพจะช่วยให้โรคแพร่ระบาดอย่างรวดเร็ว (วิชิต และคณะ, 2553) ซึ่งปัจจัยที่เอื้ออำนวยต่อการระบาดของโรคไหม้ได้แก่ พันธุ์ข้าวที่อ่อนแอ โดยเฉพาะพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 รวมถึงการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนในปริมาณมาก และมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค การลดความเสียหายจากการเข้าทำลายของโรคไหม้สามารถทำได้หลายวิธีซึ่งแต่ละวิธีการที่ใช้ก็ขึ้นอยู่กับสถานการณ์และความเหมาะสมในช่วงเวลานั้นรวมทั้งผลกระทบที่จะเกิดขึ้นกับสภาพแวดล้อมที่จะเกิดตามมา ซึ่งการใช้พันธุ์ข้าวต้านทานนับเป็นวิธีที่เหมาะสมวิธีหนึ่งในการป้องกันโรคไหม้ (อังคณา และคณะ, 2557)

อัจฉราพร (2554) ศึกษาการลดความรุนแรงของโรคไหม้ข้าวโดยใช้หลักการปลูกข้าว 2 สายพันธุ์ร่วมกันเพื่อขยายฐานความต้านทานของพันธุ์ข้าว ในปี 2551 ได้ทดสอบพันธุ์ข้าวจำนวน 2 ชุดที่พัฒนามาจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ด้วยการผสมกลับโดยมีพันธุ์พ่อที่ให้ความต้านทานต่อโรคไหม้ต่างกัน ทำการทดสอบโดยการปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่มาจากต่างกลุ่มกันในภาคเหนือตอนล่างลงบนข้าวอายุ 21 วัน ครั้งละ 1 ไอโซเลท รวม 10 ไอโซเลท ตรวจสอบผลหลังปลูกเชื้อสาเหตุ 7 วัน พบว่าไม่สามารถเลือกคู่พันธุ์ที่เหมาะสมจากข้าวทั้งสองชุดได้ ในปี 2552 ทำการทดสอบข้าวชุดที่ 3 ซึ่งเป็นข้าวที่พัฒนาจากลูกผสมกลับข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยมีข้าวเจ้าหอมนิล และ DHL-279 เป็นพันธุ์พ่อที่ให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความต้านทานต่อโรคไหม้จำนวน 15 สายพันธุ์ ใช้วิธีการและขั้นตอนเช่นเดียวกับปี 2551 ผลการทดสอบจากห้องควบคุมคัดเลือกได้ 3 สายพันธุ์คือ UBN03005-6-3-26-10-49-10 UBN03004-3-16-20-20-40-14 และ UBN03004-3-16-20-11-100-4 เมื่อนำมาทดสอบในเรือนทดลองโดยการปลูกเป็นคู่ได้ 2 คู่เปรียบเทียบกัน เมื่อปลูกแบบสายพันธุ์เดียว มีข้าวขาวดอกมะลิ 105 และ กข15 เป็นพันธุ์มาตรฐานไม่ต้านทานโรคเปรียบเทียบ ปลูกเชื้อโรคไหม้ในระยะแตกกอและออกรวง การทดลองนี้พบโรคไหม้บนใบเล็กน้อย ส่วนอาการโรคไหม้คอรวงอยู่ระหว่าง 0–6 เปอร์เซ็นต์ การปลูกข้าวสายพันธุ์ UBN03005-6-3-26-10-49-10 ร่วมกับ UBN03004-3-16-20-11-100-4 ไม่พบอาการโรคไหม้คอรวง ในขณะที่พบอาการ 6 เปอร์เซ็นต์ ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 และ 1.7 เปอร์เซ็นต์ ใน กข15 เมื่อทดสอบในโรงเรือนในปี 2553 พบว่าผลเป็นไปในแนวทางเดียวกัน

อังคณา และคณะ (2557) ทดสอบปฏิกิริยาโรคไหม้ของพันธุ์ข้าวต่อโรคไหม้ภายใต้โครงการวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวนาสวนนาน้ำฝนและนาสวนนาชลประทานในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานต่อโรคไหม้ในระยะกล้า และระยะออกรวง โดยใช้สายพันธุ์ข้าวนาสวนนาน้ำฝนจำนวน 99 สายพันธุ์และข้าวนาสวนนาชลประทานจำนวน 35 สายพันธุ์ ทดสอบปฏิกิริยาต่อโรคไหม้ในระยะกล้าแบบสภาพธรรมชาติบนพื้นที่ดอน (upland short row) ในระยะออกรวงทดสอบโดยฉีดสปอร์แขวนลอยของเชื้อราโรคไหม้บริเวณกาบใบธง พบว่าสายพันธุ์ข้าวนาสวนนาน้ำฝนสามารถต้านทานถึงค่อนข้างต้านทานโรคไหม้ระยะกล้า จำนวน 52 สายพันธุ์ ค่อนข้างต้านทานโรคไหม้ระยะออกรวง จำนวน 2 สายพันธุ์ และสายพันธุ์นาสวนนาชลประทานสามารถต้านทานถึงค่อนข้างต้านทานโรคไหม้ระยะกล้า จำนวน 23 สายพันธุ์ ค่อนข้างต้านทานโรคไหม้ระยะออกรวง จำนวน 1 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3
# อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 อุปกรณ์และวัสดุการวิจัย

### 3.1.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1.1 ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวคุณภาพดีแต่อ่อนแอต่อโรคไหม้

3.1.1.2 ข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ยั้งมอง (GS20874)

3.1.1.3 ข้าวพันธุ์ IR64 เป็นพันธุ์ต้านทานโรคไหม้สำหรับทดสอบเปรียบเทียบ

3.1.1.4 ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิลเป็นพันธุ์ต้านทานโรคไหม้สำหรับทดสอบเปรียบเทียบ

### 3.1.2 ปุ๋ยเคมี

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

3.1.2.2 ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ($N$-$P_2O_5$-$K_2O$)

### 3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อรา

3.1.3.1 Rice Flour Agar (RFA)

3.1.3.2 Rice flour

3.1.3.3 Yeast extract (Svichem, India)

3.1.3.3 Agar powder (Biomark, India)

### 3.1.4 สารเคมี

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

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

3.1.4.3 agarose gel (Vivantis, Malaysia)

3.1.4.4 ammonium persulphate (APS, Ajax Finechem, Australia)

3.1.4.5 bromophenol blue (Ajax Finechem, Australia)

3.1.5.6 boric acid (VWR international, UK)

3.1.4.7 β-mercaptoethanol (Merck, Germany)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4.9 ethyl alcohol (Merck, Germany 3.1.4.10 ethidium bromide (Vivantis, Malaysia)

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

3.1.4.11 formaldehyde (Ajax Finechem, Australia)

3.1.4.12 gelatin (Gelita AG, Germany)

3.1.4.13 Glass Bond (National diagnostics, USA)

3.1.4.14 isoamyl alcohol (Merck, Germany)

3.1.4.15 isopropanol (Merck, Germany)

3.1.4.16 phenol (Merck, Germany)

3.1.4.17 polyvinylpyrrolidone (PVP, Sigma-Aldrich, USA)

3.1.4.18 N, N, N′, N′– tetramethylethylenediamine (TEMED, EMD chemicals, Germany)

3.1.4.19 RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo scientific, USA)

3.1.4.20 Ribolock™ RNase Inhibitor (Thermo scientific, USA)

3.1.4.21 Terra PCR Direct (Clontech Laboratories, USA)

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

3.1.4.23 Trizol reagent (Ambion, USA)

3.1.4.24 silver nitrate (Merck, Germany)

3.1.4.25 sodium acetate (Ajax Finechem, Australia)

3.1.4.26 sodium chloride (Ajax Finechem, Australia)

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

3.1.4.28 sodium hydroxide (Merck, Germany)

3.1.4.29 urea (Ajax Finechem, Australia)

3.1.4.30 xylene cyanol (Asia Pacific Specialty chemicals, Australia)

**3.1.5 ดีเอ็นเอมาตรฐาน**

3.1.5.1 10 bp DNA Ladder (Invitrogen, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.5.2 1 kb DNA Ladder (Thermo scientific, USA)

**3.1.6 เครื่องหมายดีเอ็นเอ**

เครื่องหมายโมเลกุลชนิด simple sequence repeat (SSR) ที่ครอบคลุมทั้ง 12 โครโมโซมของข้าว จำนวนทั้งหมด 230 เครื่องหมาย (http://www.gramene.org)

**3.1.7 อุปกรณ์**

3.1.8.1 กล้อง stereo microscope

3.1.8.2 กระบะปลูก ขนาด กว้าง 7 หลุม ยาว 12 หลุม

3.1.8.3 กระถางปลูกขนาด 10 นิ้ว

3.1.8.4 เครื่องแก้วและบีกเกอร์ขนาดต่างๆ

3.1.8.5 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, BP221S, Germany)

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

3.1.8.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Eppendrof, Model 5418, USA)

3.1.8.8 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Biometra, Germany)

3.1.8.9 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Eppendrof, Model 6132, Germany)

3.1.8.10 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Schott, cG 842, Germany)

3.1.8.11 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Consort, Germany)

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

3.1.8.13 ชุดอุปกรณ์สำหรับเลี้ยงเชื้อ

3.1.8.14 ชุดอุปกรณ์สำหรับผสมพันธุ์ข้าว

3.1.8.15 ไมโครปิเปต (Gilson, France)

3.1.8.16 เม็ด bead

3.1.8.17 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, SV-1422, Germany)

3.1.8.18 อุปกรณ์สำหรับปลูกเชื้อ

3.1.8.19 PCR plate (Thermoscientific, UK)

3.1.8.20 Tip ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

3.1.8.21 microtube ขนาด 1.5 และ 2 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.2 วิธีดำเนินการวิจัย**

**3.2.1 การผสมพันธุ์เพื่อผลิตข้าวลูกผสม**

**3.2.1.1 การผสมพันธุ์ข้าวเพื่อผลิตลูกผสมชั่วที่ 1 ($F_1$ - hybrid)**

ผสมข้ามพันธุ์โดยใช้พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) เป็นพันธุ์แม่ (female parent) และข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ยั้งมอง (GS20874) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ที่ผ่านการตรวจสอบแล้วจากงานวิจัยในโครงการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *P. oryzea* จากแหล่งพันธุกรรมข้าวพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย (Salih *et al*., 2013) เป็นพันธุ์พ่อ (male parent) เริ่มจากการเตรียมช่อดอกฝ่ายแม่ (KDML105) ในช่วงเวลาเย็นก่อนผสมพันธุ์ 1 วัน โดยการทำหมันเพศผู้ (emasculation) โดยเลือกช่อดอกในระยะโผล่ช่อดอก (heading) ใช้กรรไกรตัดดอกที่ผสมตัวเองไปแล้วบริเวณปลายช่อดอกและดอกอ่อนเกินไปบริเวณโคนช่อดอกทิ้ง เหลือไว้เฉพาะดอกที่จะพร้อมผสมในวันถัดไปประมาณ 20 ดอกต่อช่อ สังเกตได้จากอับละอองเกสรอยู่ในตำแหน่งประมาณครึ่งของความยาวกาบหุ้มดอก จากนั้นใช้กรรไกรตัดปลายกาบหุ้มดอกประมาณ 1 ใน 2 เฉียงทำมุมประมาณ 45 องศาใช้ปลายเข็มหมุดเขี่ยอับเกสรเพศผู้ (anther) ทั้งหมดจำนวน 6 อับเกสรออกจากกาบหุ้มดอกด้วยความระมัดระวัง พ่นดอกเพศเมียด้วยน้ำเปล่าเพื่อให้ความชุ่มชื้นแก่ดอก คลุมด้วยขวดพลาสติกเจาะรู ตรวจสอบดอกฝ่ายแม่ที่เตรียมไว้อีกครั้งในช่วงเช้าของวันถัดไปว่าไม่มีอับเกสรเพศผู้หลงเหลืออยู่ นำเกสรเพศผู้จากดอกข้าวพันธุ์พ่อ (GS20874) มาถ่ายลงบนยอดเกสรเพศเมีย (stigma) โดยอาจนำทั้งช่อดอกมาเคาะใกล้ๆ ยอดเกสรเพศเมียเพื่อให้ละอองเกสร (pollen grain) ตกลงบนยอดเกสรเพศเมีย หรือคีบอับละอองเกสร (anther) ใส่ไว้ในกาบดอกเพศเมียที่เตรียมไว้ ผูกป้ายชื่อไว้กับช่อดอก ระบุชื่อพันธุ์พ่อและแม่พร้อมระบุวันที่ทำการผสมพันธุ์ (hybridization) ปล่อยให้มีการผสมพันธุ์ และเก็บเกี่ยวเมล็ดหลังจากวันที่ผสมพันธุ์แล้วประมาณ 30 วัน ระยะพักตัวของข้าวประมาณ 8 สัปดาห์นำเมล็ด ($F_1$-seed) ไปปลูกเพื่อขยายให้ได้ประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ต่อไป

**3.2.1.2 การสร้างประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 ($F_2$ population)**

เพาะเมล็ดข้าวลูกผสม ($F_1$-hybrid seed) ที่ได้จากการผสมข้าม 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 ($N$-$P_2O_5$-$K_2O$) เมื่อข้าวอายุ 1, 2 และ 3 เดือน ในปริมาณที่เหมาะสม เมื่อข้าวเริ่มตั้งท้อง ปล่อยให้มีการผสมตัวเองตามธรรมชาติ (selfed) บันทึกลักษณะประจำพันธุ์ในแต่ละช่วงอายุของข้าว ทั้งในข้าวลูกผสม ($F_1$-hybrid) และข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อและแม่ เก็บเมล็ดพันธุ์ ($F_2$- seed) ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เพื่อทำลายระยะพักตัวของเมล็ด เพาะเมล็ดพันธุ์ข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$F_2$ ($F_2$- seed) จำนวน 228 เมล็ดในกระดาษทิชชูที่ชุ่มน้ำ เมื่อข้าวเริ่มงอก ย้ายลงเพาะในกระบะปลูกขนาดกว้าง 7 หลุม ยาว 12 หลุม ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 (N-$P_2O_5$-$K_2O$) 2 ครั้ง ครั้งแรกใส่ปุ๋ยประมาณ 5 กรัมต่อกระบะ ใส่หลังจากทำการย้ายเพาะแล้ว และใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 ประมาณ 1 กรัมต่อกระบะ หลังจากต้นกล้าข้าวมีอายุ 7 วัน ทำการทดสอบความต้านทานโรคไหม้ เมื่อข้าวมีอายุ 14 วัน

**3.2.1.3 การสร้างประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 3 ($F_3$ population)**

คัดเลือกประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$) ที่มีลักษณะต้านทานทั้งลักษณะทาง phenotype และลักษณะทาง genotype เพาะเมล็ดประชากรข้าวชั่วที่ 3 ($F_3$) จากต้น $F_2$ ที่คัดเลือกไว้ต้นละ 100 เมล็ด ในกระดาษทิชชูที่ชุ่มน้ำ เมื่อข้าวเริ่มงอก ย้ายลงเพาะในกระบะปลูกขนาด กว้าง 7 หลุม ยาว 12 หลุม ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 (N-$P_2O_5$-$K_2O$) 2 ครั้ง ครั้งแรกใส่ปุ๋ยประมาณ 5 กรัมต่อกระบะ ใส่หลังจากทำการย้ายเพาะแล้ว และใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 ประมาณ 1 กรัมต่อกระบะ หลังจากต้นกล้าข้าวมีอายุ 7 วัน ทำการทดสอบความต้านทานโรคไหม้ เมื่อข้าวมีอายุ 14 วัน

**3.2.2 ความต้านทานของข้าวพันธุ์ยั้งมองต่อประชากรเชื้อรา**

ศึกษาความต้านทานของข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมองต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 13 ไอโซเลท ปลูกข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมอง ขาวดอกมะลิ 105 เจ้าหอมนิล และ IR64 โดยเพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวในกระดาษทิชชูที่ชุ่มน้ำ เมื่อข้าวเริ่มงอก ย้ายลงเพาะในกระบะปลูกขนาด กว้าง 7 หลุม ยาว 12 หลุม ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 (N-$P_2O_5$-$K_2O$) 2 ครั้ง ครั้งแรกใส่ปุ๋ยประมาณ 5 กรัมต่อกระบะ ใส่หลังจากทำการย้ายเพาะแล้ว และใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 ประมาณ 1 กรัมต่ะกระบะ หลังจากต้นกล้าข้าวมีอายุ 7 วัน เมื่อข้าวมีอายุ 14 วัน ทำการประเมินความต้านทานโรคไหม้ต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 13 ไอโซเลท

**3.2.3 การประเมินความต้านทานโรคไหม้**

**3.2.3.1 การเตรียมสารแขวนลอย conidia ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้**

เตรียมสารแขวนลอยโคนิเดียจากเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่ผ่านการแยกเชื้อแบบสปอร์เดี่ยว และเก็บในรูปเส้นใยแห้งบนกระดาษกรอง ตามวิธีของ Sirithunya *et al*. (2007) นำเชื้อราจำนวน 13 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.1) มาเลี้ยงบนอาหาร RFA เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ปล่อยให้เชื้อราเจริญเป็นเวลา 10 วัน นำเชื้อรามากระตุ้นให้เกิดการสร้างโคนิเดียโดยลูบที่บริเวณเส้นใยบนผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอลเพื่อให้เส้นใยขาด แล้วบ่มทิ้งไว้ให้เชื้อราสร้างโคนิเดียเป็นเวลา 3 วัน จะได้โคนิเดียเป็นจำนวนมาก เตรียมสารแขวนลอยโคนิเดียด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นโคนิเดียให้ได้ $1\times10^5$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร เติมเจลาตินในสารแขวนลอยโคนิเดียให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 2 เปอร์เซ็นต์ สารละลายเจลาตินมีความหนืดสูงเมื่อพ่นหมอกสารแขวนลอยโคนิเดียที่ผสมเจลาตินลงบนใบข้าว เจลาตินจะจับตัวเป็นฟิล์มปกคลุมแผ่นใบข้าว ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยึดเกาะของโคนิเดียเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.2.3.2 การปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้บนต้นกล้าข้าว**

ปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้บนต้นกล้าข้าวตามวิธีของ Roumen *et al.* (1997) โดยปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 13 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.1) ที่ความเข้มข้น $1\times10^5$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร เตรียมปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อกระบะปลูก ใช้วิธีปลูกเชื้อโดยพ่นหมอกบนใบข้าวอายุ 2 สัปดาห์ที่ปลูกอยู่ในถาดหลุม หลังจากปลูกเชื้อแล้วนำต้นกล้าข้าวไปบ่มในห้องที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูงเป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง จากนั้นย้ายไปเก็บในโรงเรือนที่มีความชื้นสูง และทำการฉีดพ่นด้วยน้ำเปล่าในช่วงเวลากลางวันในทุกๆ 4 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการก่อโรคของเชื้อรา

**3.2.3.3 วิธีประเมินการเกิดโรค**

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

ระดับ 0 ไม่มีแผลปรากฏ

ระดับ 1 แผลจุดกลมสีน้ำตาลเล็กๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร ไม่มีจุดเทาตรงกลางแผล

ระดับ 2 แผลกลม หรือ รียาวเล็กน้อย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5–1 มิลลิเมตร ไม่มีจุดเทาตรงกลางแผล

ระดับ 3 แผลจุดเล็กๆ ขนาดประมาณ 1-3 มิลลิเมตร และมีจุดเทาตรงกลางแผล

ระดับ 4 แผลจุดเล็กๆ ขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตรหรือยาวกว่า แผลเป็นสีเทาและมีขอบสีน้ำตาล

ระดับ 5 แผลสีเทาเกาะกันเป็นกลุ่ม มีขอบแผลสีน้ำตาล เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค

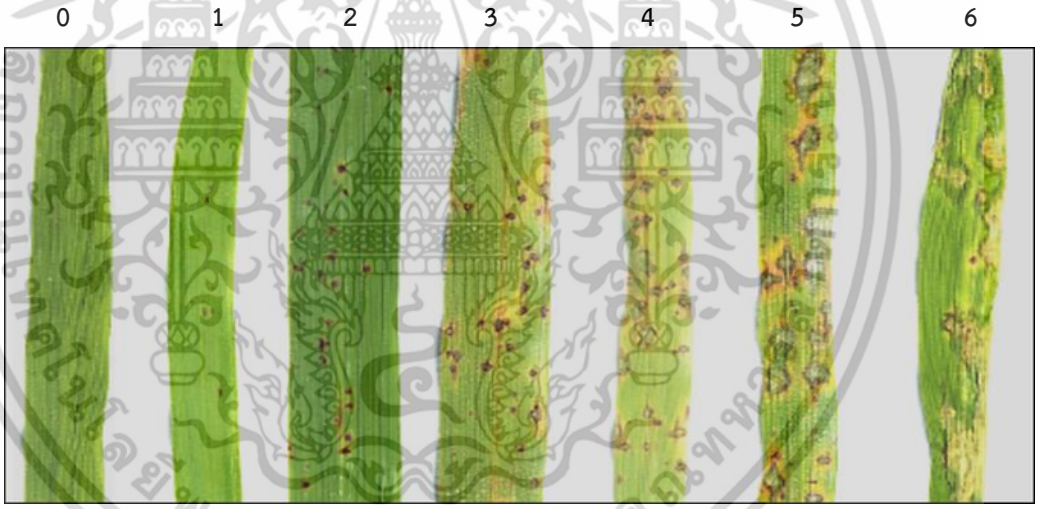
ระดับ 6 แผลลุกลามติดต่อกันมีสีเทาไม่มีขอบแผลที่แน่นอน เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค

แบ่งความต้านทานออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ระดับ 0 1 และ 2 เป็นกลุ่มที่แสดงความต้านทานโรคไหม้ในระดับสูง ในระดับ 3 และ 4 เป็นกลุ่มที่แสดงความต้านทานโรคไหม้ในระดับปานกลาง และในระดับ 5 และ 6 เป็นกลุ่มที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ (ภาพที่ 3.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 3.1** เชื้อสาเหตุโรคไหม้ 13 ไอโซเลทที่ใช้ในการทดสอบความต้านทานโรคและแหล่งที่มา

| จังหวัด | ไอโซเลท |
|---|---|
| กรุงเทพฯ | BKK55001 BKK55003 |
| ฉะเชิงเทรา | CCO55002 |
| ราชบุรี | RBR55001 |
| อุบลราชธานี | UBN11351 UBN195167 |
| สุรินทร์ | SRN54002 SRN54005 |
| พิษณุโลก | THL191 PLK 40.4 |
| เชียงราย | CRI 43.1 |
| พัทลุง | PL1PL2 |




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

### 3.2.4 การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าว

วิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population) จากข้อมูล phenotype ที่ได้ ด้วยการทดสอบ Chi square โดยวิเคราะห์การกระจายตัวของประชากรว่าเป็นไปตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2013 (ฟังก์ชัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CHISQ.TEST) โดยกำหนดให้ระดับคะแนนการเกิดโรค 0–4 หมายถึงลักษณะต้านทาน และ 5–6 หมายถึงลักษณะอ่อนแอ

**3.2.5 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population)**

**3.2.5.1 การคัดเลือกเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้**

**การสกัดดีเอ็นใบข้าว**

สกัดดีเอ็นเอข้าวพันธุ์พ่อ คือ ข้าวพื้นเมืองพันธ์ยั้งมอง และข้าวพันธุ์แม่ คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยวิธี CTAB method ตามขั้นตอนดังนี้ ตัดตัวอย่างใบข้าวใส่ในหลอด microtube ขนาด 2 มิลลิลิตร ประมาณครึ่งหลอด เติม CTAB extraction buffer หลอดละ 600 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เม็ด bead (2 เม็ด) นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่านาน 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 หลอดใหม่ 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 spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เตรียมดีเอ็นให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากัน ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำไปเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา PCR

**การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR**

ใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อเครื่องหมาย SSR ครอบคลุมทั้ง 12 โครโมโซมของข้าว จำนวน 230 คู่ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR นำดีเอ็นเอที่ปรับความเข้มข้นเป็น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 10 ไมโครลิตรประกอบด้วย ดีเอ็นเอความเข้มข้น 10 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 5.9 ไมโครลิตร 10X Taq polymerase buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 2.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 1.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ส่วนผสมระหว่าง Forward Primer (5 ไมโครโมลาร์) และ Reverse Primer (5 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ Taq polymerase (1 ยูนิต/ไมโครลิตร) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร โดยกำหนดอุณหภูมิและจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน10 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 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 Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)

**การวิเคราะห์ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR**

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

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

**การเตรียม acrylamide gel** เตรียม acrylamide gel โดยมีส่วนประกอบคือ acrylamide gel ที่ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย acrylamide solution ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 7.5 มิลลิลิตร ยูเรีย 21.03 กรัม และ 10X TBE ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติม APS (ammonium persulphate) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ TEMED (N,N,N′,N′– tetramethylethylenediamine) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบาๆ เท acrylamide gel ลงในช่องว่างระหว่างกระจกกับ chamber จนเต็ม ระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ เสียบหวีด้านที่ไม่มีซี่แหลมลงไปด้านบนให้ลึก 0.5 เซนติเมตร เพื่อให้เกิดช่องว่าง วางทิ้งไว้ในแนวราบ ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อเจลแข็งตัวแล้วทำความสะอาดกระจก และทำการเช็ดยูเรียส่วนเกินออก

**การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทโฟรีซิส** ประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเล็กโทโฟรีซิส เติม 1X TBE buffer ลงในช่องด้านบน และช่องด้านล่าง เสร็จแล้วทำการ pre-run โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 70 วัตต์ หรือประมาณ 1600 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการปิดเครื่อง ทำการไล่ยูเรียส่วนเกินออก โดยใช้ไมโครปิเปต และเสียบหวีให้ด้านแหลมปักลงบนผิวหน้าของเจล หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตรต่อช่อง พร้อมทั้ง DNA standard marker ขนาด 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คู่เบส ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ปล่อยกระแสไฟฟ้าโดยใช้กำลังไฟที่ 45 วัตต์ นาน 5 นาที ดึงหวีออก ปล่อยกระแสไฟฟ้าต่อ นาน 2 ชั่วโมง เมื่อเสร็จแล้วทำการแยกกระจกและ chamber ออกจากกัน

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

**3.2.5.2 การคัดเลือกเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้**

นำเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ได้มาคัดเลือกด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) เพื่อค้นหาเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ โดยใช้ดีเอ็นเอรวมของประชากร 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือดีเอ็นเอของพันธุ์แม่ กลุ่ม 2 ดีเอ็นเอของพันธุ์พ่อ กลุ่มที่ 3 ดีเอ็นเอของประชากรที่แสดงความต้านทาน (resistant) ระดับ 0 กลุ่มที่ 4 ดีเอ็นเอของประชากรที่แสดงความอ่อนแอ (susceptible) ระดับ 5 และ 6 และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลด้วยการย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate ($AgNO_3$) ตามที่อธิบายไว้ในข้อ 3.2.5.1 กำหนดเครื่องหมายให้กับผลของทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

A หมายถึง มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (parent 1, P1)

B หมายถึง มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (parent 2, P2)

H หมายถึง มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่

**3.2.5.3 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population)**

ใช้เครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PCR เพื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ที่ได้จากต้น $F_1T_1$ ทั้งหมด 228 ต้น

**การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR**

ใช้ชุด Terra PCR Direct (Clontech Laboratories, USA) นำใบข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์แม่ และใบข้าวพันธุ์ยั้งมอง (GS20874) ซึ่งเป็นพันธุ์พ่อ และประชากรข้าวชั่วที่ 2 ทั้งหมด 228 ต้น นำมาตัดให้ได้เนื้อเยื่อรูปวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 มิลลิเมตร ใช้เนื้อเยื่อจำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงใน PCR plate เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 10 ไมโครลิตรประกอบด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 2.2 ไมโครลิตร Terra PCR Direct Buffer (2X) ที่มี $MgCl_2$ และ dNTPs ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ส่วนผสมของ Forward Primer (5 ไมโครโมลาร์) และ Reverse Primer (5 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร และ Terra PCR Direct Polymerase Mix (1.25 ยูนิต/ไมโครลิตร) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร โดยกำหนดอุณหภูมิและจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที 4) ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 40 รอบ 5) ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 1 รอบ เมื่อครบจำนวนรอบนำไปตรวจสอบผลโดยการย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate ตามที่อธิบายไว้ในข้อ 3.2.5.1 และกำหนดเครื่องหมายให้กับผลของปฏิกิริยา PCR ดังนี้

A หมายถึง มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (parent 1, P1)

B หมายถึง มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (parent 2, P2)

H หมายถึง มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่

**3.2.5.4 การวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population) ทั้งหมด 228 ต้น**

วิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population) จากข้อมูลที่ได้ ซึ่งเป็นข้อมูล genotype ด้วยการทดสอบ Chi square โดยวิเคราะห์การกระจายตัวของประชากรว่าเป็นไปตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel 2013 (ฟังก์ชัน CHISQ.TEST) โดยกำหนดให้ A หมายถึงมีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ B หมายถึงมีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ และ H หมายถึงมีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.2.6 สร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้จากเปอร์เซ็นต์รีคอมบิเนชั่น (recombination)**

การหาระยะทางระหว่างตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคใช้หลักการคำนวณหาความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่น หรือความถี่ของการเกิดครอสซิงโอเวอร์ (crossing over) โดยคู่ของยีนที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้ชิดกันบนโครโมโซมจะมีความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่นต่ำ ส่วนคู่ของยีนที่มีตำแหน่งอยู่ห่างกันบนโครโมโซมจะมีความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่นสูง โดยมีค่าความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่นสูงสุดไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ ค่าความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่น 1 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1 centiMorgans (cM) ซึ่งเป็นหน่วยของระยะห่างระหว่างยีนบนแผนที่ยีน (mapping function) ในการทดลองนี้ใช้ข้อมูล phenotype และ genotype ของประชากรที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจน มีการเกิดโรคที่ระดับ 5 และ 6 เนื่องจากเป็นประชากรที่มี phenotype ถูกต้องแน่นอน จึงเป็นประชากรที่เหมาะสมสำหรับนำมาวิเคราะห์เพื่อระบุตำแหน่งที่ตั้งของยีนต้านทานโรคไหม้ในการศึกษานี้ นำข้อมูล phenotype และ genotype ของแต่ละเครื่องหมายจากการทดสอบการเกิดโรคมาวิเคราะห์ร่วมกัน คำนวณหาค่าความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่น ของยีนต้านทานโรคไหม้ และค่าความถี่การเกิด recombination ของแต่ละคู่ของเครื่องหมายเพื่อวาดแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ โดยใช้สูตรดังนี้ (Morgan, 2008)

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

**3.2.7 การสร้างแผนที่เพื่อระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วโปรแกรม MAPMAKER**

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

**3.2.7.1 จัดกลุ่มความเชื่อมโยงของแต่ละเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้**

โดยกำหนดระดับมาตรฐานให้สอดคล้องกับระดับความน่าเชื่อถือและลักษณะของข้อมูลที่คำนวณ ค่ามาตรฐานของโปรแกรมจะอยู่ที่ logarithm of odds (LOD) = 3.0

**3.2.7.2 จัดลำดับการวางตัวของแต่ละเครื่องหมายกับตำแหน่งของยีนในแต่ละกลุ่มที่ถูกแบ่ง**

โดยเลือกลำดับการวางตัวของเครื่องหมายที่มีค่า likelihood สูงที่สุด คือ มีค่า likelihood = 0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.2.7.3 คำนวณหาระยะห่างระหว่างแต่ละเครื่องหมายและยีนต้านทานโรคไหม้**

โดยเลือก Kosambi function ระยะห่างที่ได้มีหน่วยเป็น centiMorgans (cM)

**3.2.7.4 ตรวจสอบความถูกต้องของผลที่คำนวณได้**

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

**3.2.8 ศึกษาการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้**

**3.2.8.1 ออกแบบไพร์เมอร์ของยีนต้านทานโรคไหม้**

เมื่อสร้างแผนที่เพื่อระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้แล้วศึกษาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว เพื่อดูว่าเครื่องหมาย SSR ที่เชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ของข้าวพันธุ์ยั้งมองมีการเชื่อมโยงกับยีนใดในบริเวณที่ระบุตำแหน่งบนโครโมโซม หลังจากการศึกษาข้อมูลพบว่าเครื่องหมาย RM543 เชื่อมโยงกับยีน *Pi37* จึงทำการออกแบบไพร์เมอร์ให้จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37*

**3.2.8.2 การเตรียมพันธุ์ข้าวเพื่อดูการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37***

ปลูกข้าวพันธุ์ยั้งมอง ข้าวสายพันธุ์ที่คาดว่ามียีนต้านทานโรคไหม้ ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวสายพันธุ์อ่อนแอ และพันธุ์ IR64 ที่เป็นข้าวต้านทานโรคไหม้ โดยเพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวในกระดาษทิชชูที่ชุ่มน้ำ เมื่อข้าวเริ่มงอก ย้ายลงเพาะในกระบะปลูกขนาด กว้าง 7 หลุม ยาว 12 หลุม ใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 (N-$P_2O_5$-$K_2O$) 2 ครั้ง ครั้งแรกใส่ปุ๋ยประมาณ 5 กรัมต่อกระบะ ใส่หลังจากทำการย้ายกล้าแล้ว และใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 ประมาณ 1 กรัมต่อกระบะ หลังจากต้นกล้าข้าวมีอายุ 7 วัน เมื่อข้าวมีอายุ 14 วัน ทำการปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 13 ไอโซเลทบนอาหาร RFA ตามวิธีการข้อ 3.2.3.1 และปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้บนต้นกล้าข้าวตามวิธีการข้อ 3.2.3.2 และทำการเก็บตัวอย่างใบข้าวหลังจากทำการปลูกเชื้อราในชั่วโมงที่ 0 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างโดยการทำให้เย็นทันทีในไนโตรเจนเหลว โดยทำการทดลองนี้ทั้งหมด 2 ซ้ำ

**3.2.8.3 ตรวจสอบการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้**

**การสกัดอาร์เอ็นเอ** บดใบข้าวให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว นำเนื้อเยื่อแต่ละตัวอย่างใส่ microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Trizol reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2–3 นาที เขย่าให้เข้ากัน จากนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดสารละลายด้านบนปริมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microtube ใหม่ เติม isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้งเหลือตะกอนอาร์เอ็นเอที่ก้นหลอดด้านล่าง ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย ethyl alcohol 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้งคว่ำหลอดบนกระดาษทิชชู เพื่อให้ตะกอนอาร์เอ็นเอแห้ง เมื่อตะกอนอาร์เอ็นเอแห้งเติม diethyl pyrocarbonate water (DEPC water) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนอาร์เอ็นเอ จากนั้นเก็บอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

**การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง และวิธีอิเล็กโทรีซีส** วัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ($A_{260}$ และ $A_{280}$) โดยเจือจางอาร์เอ็นเอที่สัดส่วน 1:100 (DEPC water ปริมาตร 99 ไมโครลิตร และอาร์เอ็นเอ 1 ไมโครลิตร) อาร์เอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่า A260/A280 เข้าใกล้ 2.0 (Sambrook *et al.,* 1989) นำปริมาณอาร์เอ็นเอที่ได้มาคำนวณและเตรียมอาร์เอ็นเอ ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 ไมโครกรัม จากนั้นนำอาร์เอ็นเอปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 7 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดสารละลายทั้งหมดลงในหลุมของแผ่นอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้สารละลาย 0.5X TAE buffer เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า เมื่อแสร็จแล้วย้อมเจลในสารละลายเอทธีเดียมโบรมายด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น และตรวจดูแถบอาร์เอ็นด้วยเครื่อง UV transilluminator

**การกำจัดดีเอ็นเอออกจากอาร์เอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ *DNase* I** นำอาร์เอ็นเอที่ได้มากำจัดดีเอ็นเอปนเปื้อนโดยใช้เอนไซม์ *DNase* I เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X *DNase* I buffer ที่มี $MgCl_2$ 1 ไมโครลิตร 1 ยูนิต/ไมโครลิตร Ribolock™ RNase Inhibitor (Thermo Scientific, USA) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 1 ยูนิต/ไมโครลิตร *DNase* I ปริมาตร 1 ไมโครลิตร. อาร์เอ็นเอความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ DEPC water ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 50 mM ethylene diamine tetraacetic (EDTA) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)** สังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอ เตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 12.5 ไมโครลิตรประกอบด้วยอาร์เอ็นเอความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม ปริมาตร 3 ไมโครลิตร 10 mM Oligo$(dT)_{18}$ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ DEPC water ปริมาตร 8.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวางบนน้ำแข็งจากนั้นเติม 5X Reaction Buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร Ribolock™ RNase Inhibitor 0.5 ไมโครลิตร 2.5 mM dNTPs ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ 200 ยูนิตต่อไมโครลิตร RevertAid Reverse Transcriptase Inhibitor (Thermo Scientific, USA) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บ cDNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

**การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR** ใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *Actin1* และ *Pi37* ที่ออกแบบได้ในปฏิกิริยา PCR โดยเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA ที่เจือจางในสัดส่วน 1:10 (cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 9 ไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 5.9 ไมโครลิตร 10X Taq polymerase buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 2.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 1.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ส่วนผสมระหว่าง Forward Primer (5 ไมโครโมลาร์) และ Reverse Primer (5 ไมโครโมลาร์) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ Taq polymerase (1 ยูนิต/ไมโครลิตร) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร โดยกำหนดอุณหภูมิและจำนวนรอบดังนี้ 1) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ 2) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 3) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 4) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 ถึง 4 จำนวน 35 รอบ 5) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที จำนวน 1 รอบ เมื่อครบจำนวนรอบนำไปตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทโฟรีซีส

**การวิเคราะห์ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR** นำผลผลิต PCR ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 7 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดสารละลายทั้งหมดลงในหลุมของแผ่นอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที โดยใช้สารละลาย 0.5X TAE buffer เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า เมื่อแสร็จแล้วย้อมเจลในสารละลายเอทธีเดียมโบรมายด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น และตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV transilluminator

### 3.2.9 ตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* บนโครโมโซมข้าว

เพื่อยืนยันผลที่ได้จากการศึกษาเรื่องการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้ ใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีนต้านทานโรคไหม้ในกลุ่ม *Pi37* ซึ่งประกอบไปด้วยยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37 Pish* และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Pi64* จากตารางที่ 3.2 และดีเอ็นเอข้าว 5 ตัวอย่าง ประกอบด้วยดีเอ็นเอข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ยั้งมองเจ้าหอมนิลซึ่งเป็นข้าวสายพันธุ์ที่ผ่านการยืนยันว่ามียีนต้านทานโรคไหม้ในกลุ่ม *Pi37* (Chaivarakun *et al*., 2017) และพันธุ์ CO39 ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์อ่อนแอ มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแต่ละยีนด้วยเทคนิค PCR และวิเคราะห์ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิคอิเล็กโทโฟรีซีส

**ตารางที่ 3.2** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้

| | Primer sequences (5'-3') | |
|---|---|---|
| Gene | Forward primer | Reverse primer |
| *Pi37* | CCATCACCATCTGTTCTTAT | GGGTTCCACCATATATATACC |
| *Pish* | CACGAGGAGAG ATGAGATT | TAGTTGAGTGTTCAACAGAC |
| *Pi64* | GTCCGGCTAGAATATCTTAG | ATATGTGCCAATCTTGGGGT |

**ที่มา**: Chaivarakun *et al*. (2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4

# ผลการทดลอง

## 4.1 ความต้านทานของข้าวพันธุ์ยั้งมองต่อประชากรเชื้อราจำนวน 13 ไอโซเลท

ศึกษาความต้านทานของข้าวพันธุ์ยั้งมองต่อประชากรเชื้อราจำนวน 13 ไอโซเลท เพื่อตรวจสอบความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ โดยการปลูกข้าวพันธุ์ยั้งมอง ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวสายพันธุ์อ่อนแอ เจ้าหอมนิลและ IR64 ซึ่งเป็นข้าวต้านทานโรคไหม้ และปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 13 ไอโซเลทบนกล้าข้าวทดสอบทีละไอโซเลท และประเมินความต้านทานโรคของข้าวหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 7 วัน บันทึกผลตามเกณฑ์ให้คะแนนการเกิดโรคของ Roumen *et al.* (1997) ทำการทดลองทั้งหมด 2 ครั้ง ในแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำ พบว่าข้าวพันธุ์ยั้งมองแสดงความต้านทานสูงต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลท RBR55002 PL1 และ PL2 แสดงความต้านทานปานกลางต่อเชื้อราไอโซเลท BKK5500, BKK55003 CRI34.1 CCO55002 SRN54002 SRN54005 THL191 และ UBN11351 และแสดงความอ่อนแอต่อเชื้อราไอโซเลท PLK40.4 และ UBN195167 (ตาราง 4.1) จากผลการทดลองพบว่าข้าวพันธุ์ยั้งมองมีลักษณะความต้านทานแบบกว้างต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ เนื่องจากสามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลท

## 4.2 การผสมพันธุ์เพื่อผลิตข้าวลูกผสม

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

ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวเจ้าไวต่อช่วงแสงอย่างอ่อน มีขนบนแผ่นใบ แผ่นใบและกาบใบเป็นสีเขียว ลิ้นใบมีสีขาวมีลักษณะ 2 ยอด หูใบและสีข้อต่อใบสีเขียวอ่อน ปล้องสีเขียว ทรงกอแผ่ ยอดเกสรเพศเมียและยอดกาบดอกสีขาว กลีบรองดอกสีเขียว ความแข็งลำต้นปานกลาง คอรวงยาว มีขนเปลือกเมล็ด เปลือกเมล็ดสีฟาง

ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวพันธุ์ยั้งมอง (GS20874) เป็นข้าวเจ้าไม่ไวต่อช่วงแสง ไม่มีขนแผ่นใบ แผ่นใบและกาบใบเป็นสีเขียว ลิ้นใบมีสีขาวมีลักษณะ 2 ยอด หูใบมีสีเขียว สีข้อต่อใบสีเขียวอ่อน ปล้องสีเขียว ทรงตั้ง ยอดเกสรเพศเมียและยอดกาบดอกสีขาว กลีบรองดอกขาว ความแข็งลำต้นปานกลาง คอรวงยาว ไม่มีขนเปลือกเมล็ด เปลือกเมล็ดสีฟาง ไม่มีหางข้าว

ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ($F_1$- hybrid) ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ยั้งมอง (GS20874) ไม่มีขนบนแผ่นใบ แผ่นใบมีสีเขียว กาบใบสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เขียว ลิ้นใบมีสีขาวมีลักษณะ 2 ยอด และมีความยาว 25 มิลลิเมตร หูใบและสีข้อต่อใบสีเขียว ปล้องสีเหลืองอ่อน ทรงกอตั้ง ยอดเกสรเพศเมียสีขาว ยอดกาบดอกและกลีบรองดอกสีขาว ความแข็งลำต้นปานกลาง คอรวงยาว ไม่มีขนบนเปลือกเมล็ด เปลือกเมล็ดสีฟาง ไม่มีหางข้าว ลักษณะที่พบว่ามีความเหมือนกับพันธุ์แม่ คือ มียอดเกสรเพศเมียและยอดกาบดอกสีขาว ลักษณะที่พบว่ามีความเหมือนกับพันธุ์พ่อ คือ ทรงกอตั้ง ไม่มีขนแผ่นใบ ไม่มีขนเปลือกเมล็ด พบลักษณะที่ต่างจากพ่อและแม่ คือ มีปล้องสีเหลืองอ่อน

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

ผลการผสมข้ามระหว่างข้าวขาวดอกมะลิ 105 ใช้เป็นพันธุ์แม่ และข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ยั้งมอง (GS20874) ใช้เป็นพันธุ์พ่อ ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ ได้ข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ($F_1$- hybrid) จำนวน 1 เมล็ด ปลูกและปล่อยให้มีการผสมตัวเองตามธรรมชาติได้เมล็ด ($F_2$-seed) จำนวน 228 เมล็ด เมื่อนำเมล็ดไปปลูกจึงได้ประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$- plant) จำนวน 228 ต้น

**4.3 การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้โดยวิธีทดสอบการเกิดโรคในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population)**

ผลการทดสอบการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 13 ไอโซเลท บนกล้าข้าวจำนวน 228 ต้น พบต้นต้านทานโรคไหม้ระดับสูง (ระดับคะแนน 0 1 และ 2) จำนวน 209 ต้น แสดงความต้านทานโรคไหม้ในระดับปานกลาง (ระดับคะแนน 3 และ 4) จำนวน 14 ต้น อ่อนแอต่อโรคไหม้ (ระดับคะแนน 5 และ 6) จำนวน 5 ต้น ผลประเมินการเกิดโรคของประชากรข้าว $F_2$ ทั้งหมด 228 ต้น จึงแบ่งเป็นต้นที่แสดงลักษณะต้านทาน 223 ต้น และต้นที่แสดงลักษณะอ่อนแอ 5 ต้น นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ว่าเป็นตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) โดยทดสอบหาค่า Chi square เนื่องจากประชากรที่ศึกษาเป็นประชากรข้าวชั่วที่ 2 หากความต้านทานโรคไหม้ที่ศึกษาถูกควบคุมด้วยยีนเพียงยีนเดียว การกระจายตัวของยีนควบคุมลักษณะต้านทาน-อ่อนแอต่อโรคไหม้จะมีสัดส่วนต้านทาน (resistance, R): อ่อนแอ (susceptible, S) เท่ากับ 3:1

ผลการคำนวณการกระจายตัวของยีนควบคุมลักษณะต้านทานในอัตราส่วน 3:1 (R:S) พบค่าสถิติ Chi square เท่ากับ 63.24 เมื่อเปรียบเทียบกับตาราง Chi square ที่ degree of freedom (df) เท่ากับ 1 พบว่ามีค่าความน่าจะเป็น (probability, *p*) เท่ากับ 1.81 แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 3:1 (R:S) ดังนั้นจึงวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ในอัตราส่วน 15:1 (R:S) พบมีค่าสถิติ Chi square เท่ากับ 6.13 เมื่อเปรียบเทียบกับตาราง Chi square ที่ df เท่ากับ 1 พบว่ามีค่า *p* เท่ากับ 0.011 แสดงให้เห็นว่าการกระจาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวของยีนควบคุม ลักษณะต้านทานโรคไหม้เป็นไปตามอัตราส่วน 15:1 (R:S) เป็นไปได้ว่าลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ยั้งมอง (GS20874) ถูกควบคุมด้วยยีนหลัก (major gene) จำนวน 2 ยีน โดยยีนต้านทานโรคไหม้เป็นยีนข่มทั้ง 2 ยีน (dominant allele) ข่มต่อยีนควบคุมลักษณะไม่ต้านทานโรคไหม้ (ตารางที่ 4.2)

**ตารางที่ 4.1** ปฏิกิริยาก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมอง ขาวดอกมะลิ 105 เจ้าหอมนิล และพันธุ์ IR64 หลังจากปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ทีละไอโซเลทจำนวน 13 ไอโซเลท

| ไอโซเลท | พันธุ์ข้าว | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ขาวดอกมะลิ105 | | เจ้าหอมนิล | | IR64 | | ยั้งมอง | |
| PL2 | 3* | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| PL1 | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| UBN195167 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 5 |
| UBN11351 | 5 | 6 | 1 | 0 | 3 | 2 | 3 | 3 |
| BKK55003 | 6 | 6 | 1 | 0 | 1 | 0 | 4 | 3 |
| SRN54002 | 6 | 6 | 1 | 0 | 0 | 1 | 3 | 4 |
| THL191 | 5 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 |
| PLK40.4 | 5 | 5 | 5 | 6 | 2 | 2 | 5 | 6 |
| RBR55002 | 5 | 6 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| BKK55001 | 3 | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| CRI34.1 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 5 |
| CCO55002 | 5 | 5 | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 | 3 |
| SRN54005 | 6 | 6 | 0 | 1 | 1 | 1 | 3 | 3 |

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.2** อัตราการกระจายตัวของลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 13 ไอโซเลทในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population) จำนวน 228 ต้น

| ประชากร (จำนวนต้น) | Expected ratio | Expected No. | | Observed No. | | $\chi^{2*}$ | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | R** | S | R | S | | |
| $F_2$ (228) | 3:1 | 171 | 57 | 223 | 5 | 63.24 | 1.81 |
| $F_2$ (228) | 15:1 | 214 | 14 | 223 | 5 | 6.13 | 0.011 |

*ค่าสถิติ Chi square ($\chi^2$) =0.05, df=1

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

### 4.4 คัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพ่อและแม่

คัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพ่อและแม่ได้โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อเครื่องหมาย SSR ครอบคลุมทั้ง 12 โครโมโซมข้าวจำนวน 230 คู่ที่กระจายอยู่บนทุกโครโมโซมของข้าวในปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบผลจากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate พบเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพ่อและแม่ได้ จำนวน 111 เครื่องหมาย ซึ่งคิดเป็น 48.26 เปอร์เซ็นต์ของเครื่องหมายทั้งหมด 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 (ตารางที่ 4.3)

### 4.5 คัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความต้านทานและความอ่อนแอด้วยวิธี bulk segregant analysis

นำเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้จำนวน 111 เครื่องหมายมาคัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างความต้านทานและความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อ่อนแอได้ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) โดยใช้ดีเอ็นเอของประชากร 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ ดีเอ็นเอของพันธุ์แม่ 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 วิเคราะห์โดยแทนรูปแบบดีเอ็นเอเป็นตัวอักษร A B และ H โดยกำหนดให้ A หมายถึงมีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ B หมายถึงมีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ H หมายถึงมีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่ จากการทดสอบทั้งหมด 111 เครื่องหมาย พบเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้จำนวน 4 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM495 RM543 RM443 และ RM431 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 ในเครื่องหมาย RM443 และ RM431 มีการแสดงผลของเครื่องหมายเรียงตามกลุ่ม 1 ถึง 4 คือ ABAB แต่เครื่องหมาย RM543 มีการแสดงของเครื่องหมายเรียงตามกลุ่ม 1 ถึง 4 คือ ABHH และในเครื่องหมาย RM495 มีการแสดงของเครื่องหมายเรียงตามกลุ่มคือ ABAA (ภาพที่ 4.1)

**4.6 การกระจายตัวของเครื่องหมาย microsatellite ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population)**

ใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อเครื่องหมาย RM495 RM543 RM443 และ RM431 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบผลจากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเทคนิค PAGE โดยใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลาย silver nitrate แทนผลของรูปแบบดีเอ็นเอด้วยตัวอักษร A B และ H ผลการวิเคราะห์ของเครื่องหมาย RM543 ในประชากรข้าว $F_2$ จำนวน 228 ต้น พบผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (A) จำนวน 52 ต้น ผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (B) จำนวน 66 ต้น และพบผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่ (H) จำนวน 110 ต้น (ภาพที่ 4.2) ผลการวิเคราะห์ของเครื่องหมาย RM431 พบผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (A) จำนวน 75 ต้น พบผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (B) จำนวน 51 ต้น และพบผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่ (H) จำนวน 102 ต้น (ภาพที่ 4.3) ผลการวิเคราะห์ของเครื่องหมาย RM443 พบผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (A) จำนวน 64 ต้น พบผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (B) จำนวน 63 ต้น และพบผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนทั้งพันธุ์พ่อและแม่ (H) จำนวน 101 ต้น (ภาพที่ 4.4) และผลการวิเคราะห์ของเครื่องหมาย RM495 พบผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอของประชากรทั้ง 228 ต้น เหมือนพันธุ์แม่ (A) ทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.3** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมาย SSR ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ รวมทั้งผลรูปแบบแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค BSA จำนวน 111 เครื่องหมาย

| | | Primer sequences (5'-3') | | BSA |
|---|---|---|---|---|
| Chromosome | Marker | Forward primer | Reverse primer | score band |
| 1 | RM5 | TGCAACTTCTAGCTGCTCGA | CAACGATGACGAACACAACC | ABHH |
| | RM495 | AATCCAAGGTGCAGAGATGG | CAACGATGACGAACACAACC | ABAA |
| | RM312 | GTATGCATATTTGATAAGAG | AAGTCACCGAGTTTACCTTC | ABHH |
| | RM428 | AACAGATGGCATCGTCTTCC | CGCTGCATCCACTACTGTTG | ABHH |
| | RM443 | GATGGTTTTCATCGGCTACG | AGTCCCAGAATGTCGTTTCG | ABAB |
| | RM283 | GTCTACATGTACCTTGTTGGG | CGGCATGAGAGTCTGTGATG | ABHH |
| | RM431 | TCCTGCGAACTGAAGAGTTG | AGAGCAAAACCCTGGTTCAC | ABAB |
| | RM84 | TAAGGGTCCATCCACAAGATG | TTGCAAATGCAGCTAGAGTAC | ABHH |
| | RM265 | CGAGTTCGTCCAAGTGAGC | CATCCACCATTCCACCAATC | ABHH |
| | RM128 | AGCTTGGGTGATTTCTTGGAAGCG | ACGACGAGGAGTCGCCGTGCAG | ABHH |
| | RM1 | GCGAAAACACAATGCAAAAA | GCGTTGGTTGGACCTGAC | ABHH |
| | RM543 | CTGCTGCAGACTCTACGCG | AAATATTACCCATCCCCCCC | ABAH |
| | RM472 | CCATGGCCTGAGAGAGAGAG | AGCTAAATGGCCATACGGTG | ABHH |
| 2 | RM300 | GCTTAAGGACTTCTGCGAACC | CAACAGCGATCCACATCATC | ABHH |
| | RM405 | TCACACACTGACAGTCTGAC | AATGTGGCACGTGAGGTAAG | ABHH |
| | RM526 | CCCAAGCAATACGTCCCTAG | ACCTGGTCATGACAAGGAGG | ABHH |
| | RM71 | CTAGAGGCGAAAACGAGATG | GGGTGGGCGAGGTAATAATG | ABHH |
| | RM341 | CAAGAAACCTCAATCCGAGC | CTCCTCCCGATCCCAATC | ABHH |
| | RM475 | CCTCACGATTTTCCTCCAAC | ACGGTGGGATTAGACTGTGC | ABHH |
| | RM53 | ACGTCTCGACGCATCAATGG | CACAAGAACTTCCTCGGTAC | ABHH |
| 3 | RM55 | CCGTCGCCGTAGTAGAGAAG | TCCCGGTTATTTTAAGGCG | ABHH |
| | RM22 | GGTTTGGGAGCCCATAATCT | CTGGGCTTCTTTCACTCGTC | ABHH |
| | RM442 | CTTAAGCCGATGCATGAAGG | ATCCTATCGACGAATGCACC | ABHH |
| | RM545 | CAATGGCAGAGACCCAAAAG | CTGGCATGTAACGACAGTGG | ABHH |
| | RM514 | AGATTGATCTCCCATTCCCC | CACGAGCATATTACTAGTGG | ABHH |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.3** (ต่อ)

| Chromosome | Marker | Primer sequences (5'-3') | | BSA score band |
|---|---|---|---|---|
| | | Forward primer | Reverse primer | |
| 3 | RM85 | CCAAAGATGAAACCTGGATTG | GCACAAGGTGAGCAGTCC | ABHH |
| | RM416 | GGGAGTTAGGGTTTTGGAGC | TCCAGTTTCACACTGCTTCG | ABHH |
| | RM7 | TTCGCCATGAAGTCTCTCG | CCTCCCATCATTTCGTTGTT | ABHH |
| | RM338 | CACAGGAGCAGGAGAAGAGC | GGCAAACCGATCACTCAGTC | ABHH |
| | RM571 | GGAGGTGAAAGCGAATCATG | CCTGCTGCTCTTCATCAGC | ABHH |
| | RM16 | CGCTAGGGCAGCATCTAAA | AACACAGAAGGTACGCGC | ABHH |
| 4 | RM6314 | GATTCGTGTCGGTTGTCAAG | GGTTCAGGGACGAATTTCAG | ABHH |
| | RM6748 | ATTGGGTTTCTCATATTATG | CCAACACTCCTAACTAGTTC | ABHH |
| | RM280 | ACACGATCCACTTTGCGC | TGTGTCTTGAGCAGCCAGG | ABHH |
| | RM559 | ACGTACACTTGGCCCTATGC | ATGGGTGTCAGTTTCCTTCC | ABHH |
| | RM1136 | ATGTCATCCAGAGTCGCCTC | AGGACGTATTCACACACGAC | ABHH |
| | RM518 | CTCTTCACTCACTCACCATGG | ATCCATCTGGAGCAAGCAAC | ABHH |
| | RM241 | GAGCCAAATAAGATCGCTGA | TGCAAGCAGCAGATTTAGTG | ABHH |
| | RM564 | CATGGCCTTGTGTATGCATC | ATGCAGAGGATTGGCTTGAG | ABHH |
| | RM252 | TTCGCTGACGTGATAGGTTG | ATGACTTGATCCCGAGAACG | ABHH |
| | RM303 | GCATGGCCAAATATTAAAGG | GGTTGGAAATAGAAGTTCGGT | ABHH |
| | RM317 | CATACTTACCAGTTCACCGCC | CTGGAGAGTGTCAGCTAGTTGA | ABHH |
| | RM307 | GTACTACCGACCTACCGTTCAC | CTGCTATGCATGAACTGCTC | ABHH |
| | RM471 | ACGCACAAGCAGATGATGAG | GGGAGAAGACGAATGTTTGC | ABHH |
| | RM3335 | TAATCCACTGTGTCATTTAA | ACCATCATCTTGTACCTAGT | ABHH |
| 5 | RM459 | CTGCAATGCTGCATGACC | CACTTTCTCTGCAGCACCAG | ABHH |
| | RM3663 | CATCAACCTCCACGAACATG | CTCGGTGGTGATCCTCCTC | ABHH |
| | RM178 | TCGCGTGAAAGATAAGCGGCGC | GATCACCGTTCCCTCCGCCTGC | ABHH |
| | RM87 | CCTCTCCGATACACCGTATG | GCGAAGGTACGAAAGGAAAG | ABHH |
| | RM413 | GGCGATTCTTGGATGAAGAG | TCCCCACCAATCTTGTCTTC | ABHH |
| | RM137 | ACACCAACCAGATCAGGGAG | TGCTCGTCAATGGTGAGTTC | ABHH |
| | RM1054 | TGCATATGTACCGCAACCTC | TTTCTGCATGATCCCCTCTG | ABHH |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.3** (ต่อ)

| Chromosome | Marker | Primer sequences (5'-3') | | BSA score band |
|---|---|---|---|---|
| | | Forward primer | Reverse primer | |
| 6 | RM170 | TCGCGCTTCTTCCTCGTCGACG | CCCGCTTGCAGAGGAAGCAGCC | ABHH |
| | RM162 | GCCAGCAAAACCAGGGATCCGG | TCAAGGTCTTGTGCGGCTTGAGG | ABHH |
| | RM494 | GGGAGGGGATCGAGATAGAC | TTTAACCTTCCTTCCGCTCC | ABHH |
| | RM510 | AACCGGATTAGTTTCTCGCC | TGAGGACGACGAGCAGATTC | ABHH |
| | RM204 | GTGACTGACTTGGTCATAGGG | GCTAGCCATGCTCTCGTACC | ABHH |
| | RM225 | TGCCCATATGGTCTGGATG | GAAAGTGGATCAGGAAGGC | ABHH |
| | RM136 | ATTGGGTTTCTCATATTATG | CCAACACTCCTAACTAGTTC | ABHH |
| | RM454 | CTCAAGCTTAGCTGCTGCTG | GTGATCAGTGCACCATAGCG | ABHH |
| | RM400 | ACACCAGGCTACCCAAACTC | CGGAGAGATCTGACATGTGG | ABHH |
| | RM276 | CTCAACGTTGACACCTCGTG | TCCTCCATCGAGCAGTATCA | ABHH |
| | RM8226 | TTAGGATACGGCTTCTAGGC | CGTAATTGTTGCATATGGTG | ABHH |
| 7 | RM428 | AACAGATGGCATCGTCTTCC | CGCTGCATCCACTACTGTTG | ABHH |
| | RM11 | TCTCCTCTTCCCCCGATC | ATAGCGGGCGAGGCTTAG | ABHH |
| | RM125 | ATCAGCAGCCATGGCAGCGACC | AGGGGATCATGTGCCGAAGGCC | ABHH |
| | RM455 | AACAACCCACCACCTGTCTC | AGAAGGAAAAGGGCTCGATC | ABHH |
| | RM118 | CCAATCGGAGCCACCGGAGAGC | CACATCCTCCAGCGACGCCGAG | ABHH |
| | RM501 | GCCCAATTAATGTACAGGCG | ATATCGTTTAGCCGTGCTGC | ABHH |
| | RM1132 | ATCACCTGAGAAACATCCGG | CTCCTCCCACGTCAAGGTC | ABHH |
| | RM234 | ACAGTATCCAAGGCCCTGG | CACGTGAGACAAAGACGGAG | ABHH |
| 8 | RM408 | CAACGAGCTAACTTCCGTCC | ACTGCTACTTGGGTAGCTGACC | ABHH |
| | RM25 | GGAAAGAATGATCTTTTCATGG | CTACCATCAAAACCAATGTTC | ABHH |
| | RM44 | ACGGGCAATCCGAACAACC | TCGGGAAAACCTACCCTACC | ABHH |
| | RM404 | CCAATCATTAACCCCTGAGC | GCCTTCATGCTTCAGAAGAC | ABHH |
| | RM339 | GTAATCGATGCTGTGGGAAG | GAGTCATGTGATAGCCGATATG | ABHH |
| | RM384 | ATCTCTGATACTCCATCCATCC | CCTGTACGTTGATCCGAAGC | ABHH |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.3** (ต่อ)

| Chromosome | Marker | Primer sequences (5'-3') | | BSA score band |
|---|---|---|---|---|
| | | Forward primer | Reverse primer | |
| 9 | RM409 | CCGTCTCTTGCTAGGGATTC | GGGGTGTTTTGCTTTCTCTG | ABHH |
| | RM410 | GCTCAACGTTTCGTTCCTG | GAAGATGCGTAAAGTGAACGG | ABHH |
| | RM5122 | CTCGCAATTTATACGTAATC | CTCACGAAATAAAATGAGTG | ABHH |
| | RM215 | CAAAATGGAGCAGCAAGAGC | TGAGCACCTCCTTCTCTGTAG | ABHH |
| | RM205 | CTGGTTCTGTATGGGAGCAG | CTGGCCCTTCACGTTTCAGTG | ABHH |
| | RM201 | CTCGTTTATTACCTACAGTACC | CTACCTCCTTTCTAGACCGATA | ABHH |
| 10 | RM271 | TCAGATCTACAATTCCATCC | TCGGTGAGACCTAGAGAGCC | ABHH |
| | RM258 | TGCTGTATGTAGCTCGCACC | TGGCCTTTAAAGCTGTCGC | ABHH |
| | RM590 | CATCTCCGCTCTCCATGC | GGAGTTGGGGTCTTGTTCG | ABHH |
| | RM7217 | TTTGTAGGATGACACGTGGC | CGGGATTTCAGTACCTCACG | ABHH |
| | RM3123 | ATTTCCCACACATCTCGCTG | GTGTCGCCGGTCAAGAAC | ABHH |
| | RM239 | TACAAAATGCTGGGTACCCC | ACATATGGGACCCACCTGTC | ABAH |
| 11 | RM5599 | CTCACAATATCACCATCCAC | AATTTTGTGCTGTTGTTGAA | ABHH |
| | RM4601 | CATACATGTGAACCTGACTG | CTAGCTTAGCATCTCCTCAA | ABHH |
| | RM479 | CCCCTTGCTAGCTTTTGGTC | CCATACCTCTTCTCCTCCCC | ABHH |
| | RM552 | CGCAGTTGTGGATTTCAGTG | TGCTCAACGTTTGACTGTCC | ABHH |
| | RM6272 | AACATCTACTCCGCCACCAC | CAGCAAGCAGATGGTGGC | ABHH |
| | RM287 | TTCCCTGTTAAGAGAGAAATC | GTGTATTTGGTGAAAGCAAC | ABHH |
| | RM224 | ATCGATCGATCTTCACGAGG | TGCTATAAAAGGCATTCGGG | ABHH |
| | RM144 | TGCCCTGGCGCAAATTTGATCC | GCTAGAGGAGATCAGATGGTAGTGCATG | ABHH |
| | RM6440 | ATTGCTGGTCTATCGGCAAC | TGTCTCAGTTGGGTCTGCTC | ABHH |
| 12 | RM247 | TAGTGCCGATCGATGTAACG | CATATGGTTTTGACAAAGCG | ABHH |
| | RM313 | TGCTACAAGTGTTCTTCAGGAC | GCTCACCTTTTGTGTTCCAC | ABHH |
| | RM19 | CAAAAACAGAGCAGATGAC | CTCAAGATGGACGCCAAGA | ABHH |
| | RM270 | GGCCGTTGGTTCTAAAATC | TGCGCAGTATCATCGGCGAG | ABHH |
| | RM83 | ACTCGATGACAAGTTGAGG | CACCTAGACACGATCGAG | ABHH |
| | RM1261 | GTCCATGCCCAAGACACAAC | GTTACATCATGGGTGACCCC | ABHH |

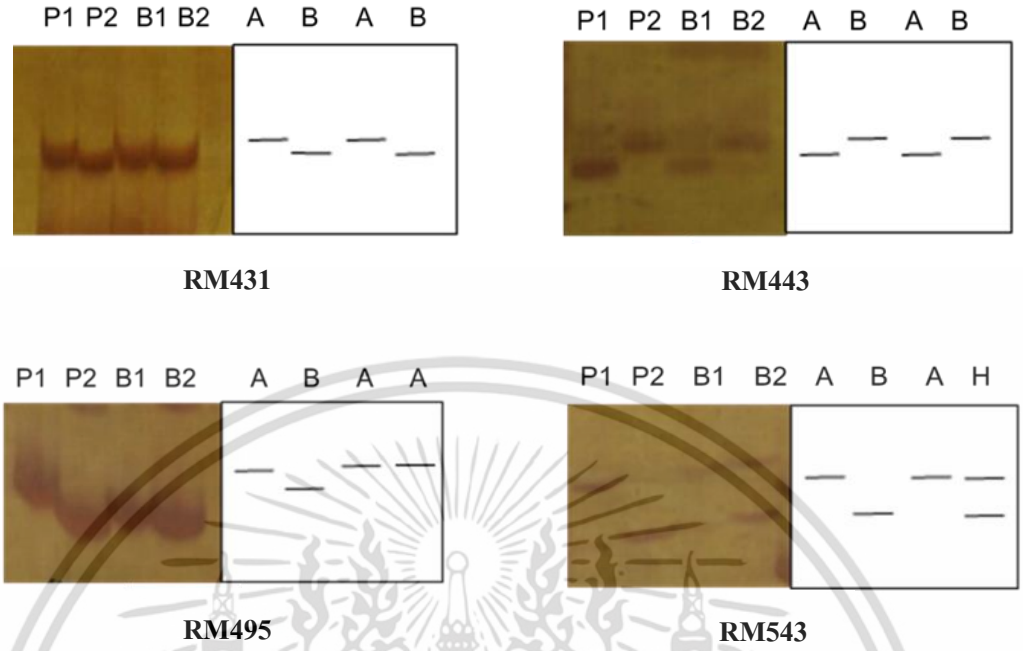
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.3** (ต่อ)

| Chromosome | Marker | Primer sequences (5'-3') | | BSA score band |
|---|---|---|---|---|
| | | Forward primer | Reverse primer | |
| 12 | RM519 | AGAGAGCCCCTAAATTTCCG | AGGTACGCTCACCTGTGGAC | ABHH |
| | RM277 | CGGTCAAATCATCACCTGAC | CAAGGCTTGCAAGGGAAG | ABHH |
| | RM3483 | CCTAGCTTTCAGGAGCAAG | CCCACAATGAGAAACAGTTG | ABHH |
| | RM463 | TTCCCCTCCTTTTATGGTGC | TGTTCTCCTCAGTCACTGCG | ABHH |
| | RM17 | TGCCCTGTTATTTTCTTCTCTC | GGTGATCCTTTCCCATTTCA | ABHH |

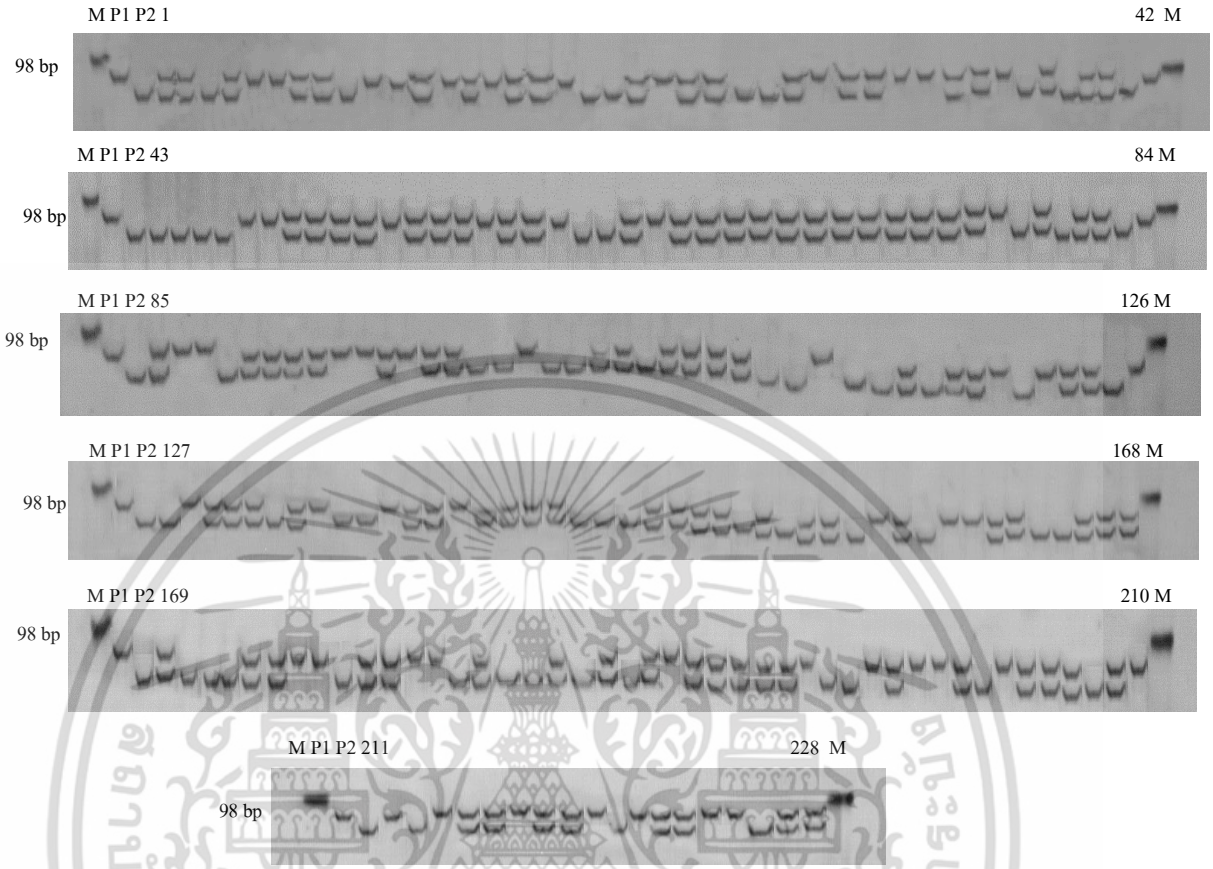
จากนั้นวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM495 RM543 RM443 และ RM431 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ว่าเป็นตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) โดยทดสอบหาค่า Chi square วิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายในอัตราส่วน 1:2:1 นั่นคือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (B) : มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่ (H) : มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (A) ผลการวิเคราะห์พบว่าค่าสถิติ Chi square สำหรับการกระจายตัวของเครื่องหมายในอัตราส่วน 1:2:1 (B:H:A) ของเครื่องหมาย RM543 มีค่าเท่ากับ 1.99 เครื่องหมาย RM431 มีค่าสถิติ Chi square เท่ากับ 7.57 และเครื่องหมาย RM443 มีค่าสถิติ Chi square เท่ากับ 1.69 แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นไปตามสัดส่วน 1:2:1 (B:H:A) ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM495 มีค่าสถิติ Chi square เท่ากับ 684 แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 1:2:1 ซึ่งอาจเป็นผลจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM495 ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้จากการทดสอบด้วยเทคนิค BSA โดยให้ผลผลิตชิ้นดีเอ็นเหมือนของแม่ทั้ง 2 กลุ่ม จึงทำให้มีการกระจายตัวที่ผิดปกติ (ตารางที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4.1** ผลการวิเคราะห์เครื่องหมายด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) เปรียบเทียบระหว่างขาวดอกมะลิ 105 (P1) พันธุ์ยั้งมอง (GS20874) (P2) ประชากรข้าวกลุ่มต้านทาน (B1) ประชากรข้าวกลุ่มอ่อนแอ (B2) โดย A คือ ผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ B คือ ผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ H คือ ผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

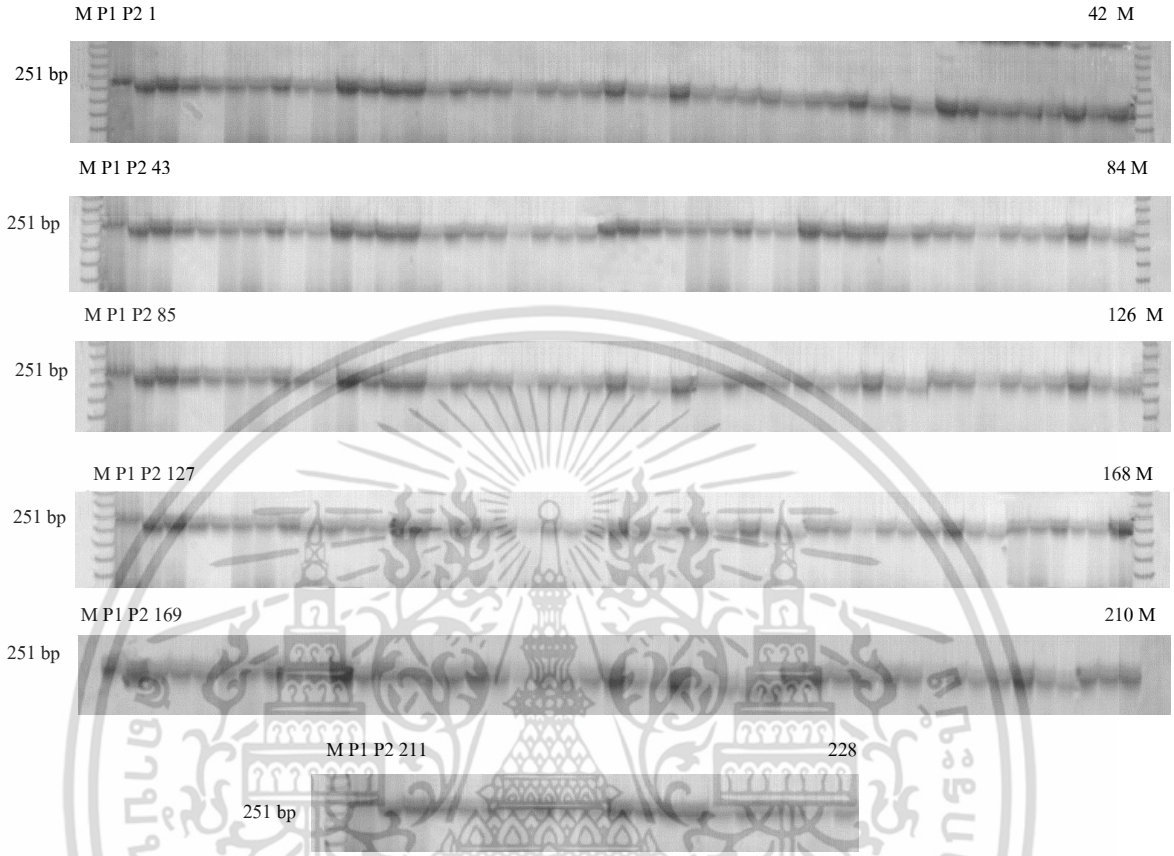



**ภาพที่ 4.2** รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM543 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population) จำนวน 228ต้น P1 คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ P2 คือ พันธุ์ยั้งมอง (GS20874) M คือ 10 bp DNA ladder

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

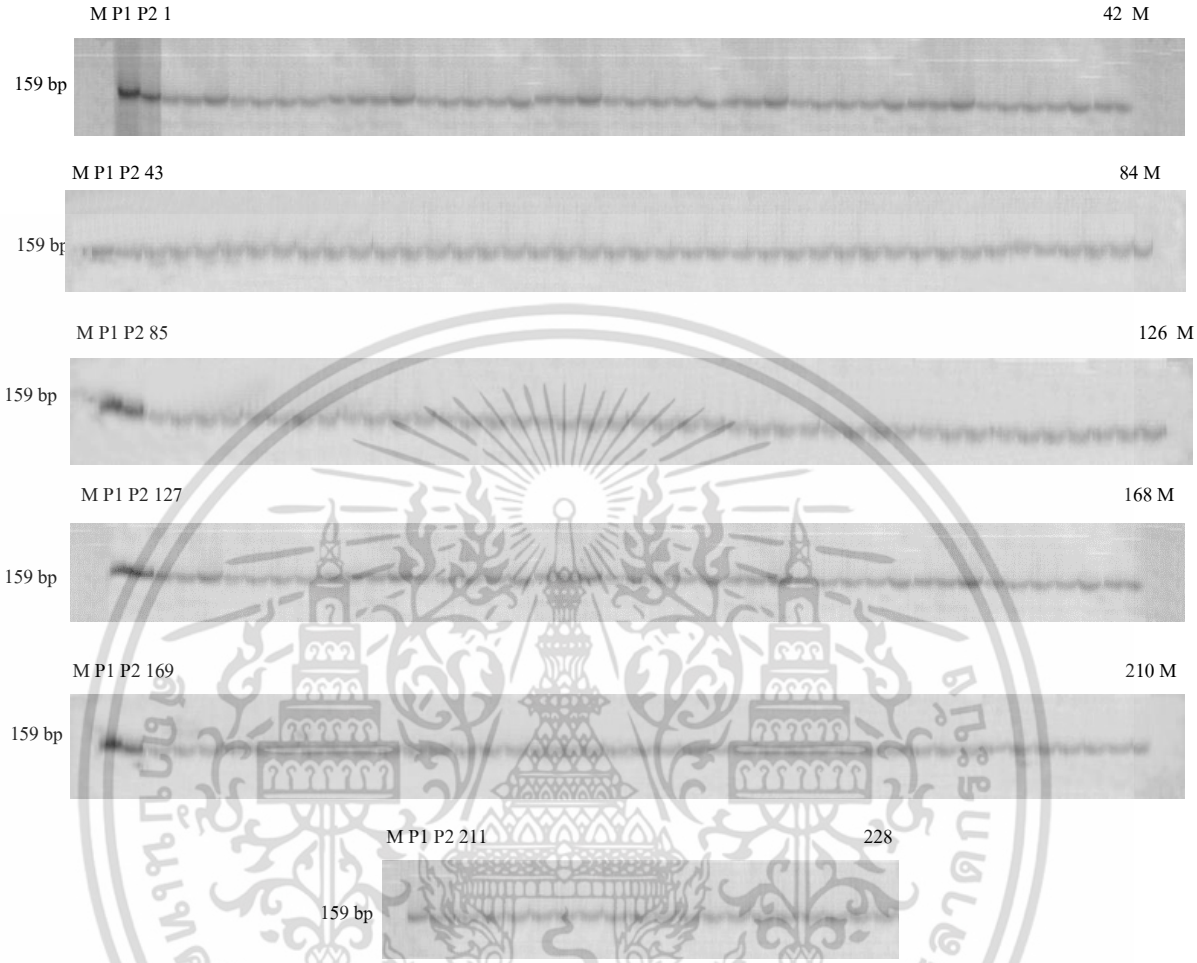
**ภาพที่ 4.3** รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM443 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population) จำนวน 228 ต้น P1 คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ P2 คือ พันธุ์ยั้งมอง (GS20874 ) M คือ 10 bp DNA ladder

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4.4** รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM431 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population) จำนวน 228 ต้น P1 คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ P2 คือ พันธุ์ยั้งมอง (GS20874 ) M คือ 10 bp DNA ladder

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4.5** รูปแบบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย RM495 ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population) จำนวน 228 ต้น P1 คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ P2 คือ พันธุ์ยั้งมอง (GS20874 ) M คือ 10 bp DNA ladder

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.4** การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 228 ต้น

| Marker | Expected ratio | Expected No. | | | Observed No. | | | $\chi^2$ | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | B | H | A | B | H | A | | |
| RM495 | 1:2:1 | 57 | 114 | 57 | 0 | 0 | 228 | 684 | 2.96 |
| RM543 | 1:2:1 | 57 | 114 | 57 | 66 | 110 | 52 | 1.99 | 0.36 |
| RM443 | 1:2:1 | 57 | 114 | 57 | 63 | 101 | 64 | 2.96 | 0.22 |
| RM431 | 1:2:1 | 57 | 114 | 57 | 51 | 102 | 75 | 7.57 | 0.022 |

*ค่าสถิติ Chi square ($\chi^2$) =0.05, df = 2

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

**4.7 สร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้จากเปอร์เซ็นต์ recombination**

การหาระยะทางระหว่างตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคใช้หลักการคำนวณหาความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่น หรือความถี่ของการเกิดครอสซิงโอเวอร์ (crossing over) โดยคู่ของยีนที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้ชิดกันบนโครโมโซมจะมีความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่นต่ำ ส่วนคู่ของยีนที่มีตำแหน่งอยู่ห่างกันบนโครโมโซมจะมีความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่นสูง โดยมีค่าความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่นสูงสุดไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ ค่าความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่น 1 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1 centiMorgans (cM) ซึ่งเป็นหน่วยของระยะห่างระหว่างยีนบนแผนที่ยีน (mapping function) ในการทดลองนี้ใช้ข้อมูลลักษณะต้านทานโรคที่ปรากฏ (phenotype) และลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ของประชากร 5 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจนพบการเกิดโรคที่ระดับ 5 และ 6 เนื่องจากเป็นประชากรที่มี phenotype ถูกต้องแน่นอน จึงเป็นประชากรที่เหมาะสมสำหรับนำมาวิเคราะห์เพื่อระบุตำแหน่งที่ตั้งของยีนต้านทานโรคไหม้ ในการศึกษานี้พบว่าเครื่องหมาย RM443 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 1 มีการเกิดรีคอมบิเนชั่นเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่ายีนต้านทานโรคไหม้มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM431 มีระยะห่างระหว่างยีนต้านทานโรคไหม้และเครื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมาย RM443 เป็นระยะทาง 40 cM และเครื่องหมาย RM543 และ RM431 เกิดรีคอมบิเนชั่นเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเครื่องหมายเป็นอิสระจากยีนต้านทานโรคไหม้และอาจอยู่ห่างจากยีนต้านทานโรคไหม้เป็นระยะทาง 60 cM ดังนั้นเพื่อเป็นการช่วยยืนยันถึงการมีอยู่ของจำนวนยีนและระบุตำแหน่งที่ตั้งของยีนต้านทานโรคไหม้ที่ชัดเจนขึ้น จึงต้องทำการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ต่อไป

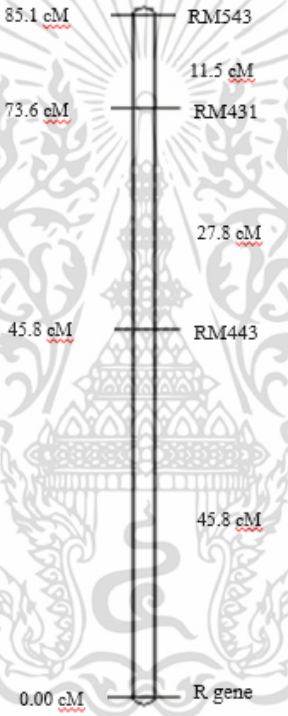
**4.8 การสร้างแผนที่เพื่อระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MAPMAKER**

โอกาสเกิดรีคอมบิเนชั่นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับระยะทางระหว่างยีนในโครโมโซมเดียวกัน ค่าความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่น 1 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1 cM ซึ่งเป็นหน่วยของระยะห่างระหว่างยีนบนแผนที่ยีน ในการทดลองนี้ใช้ข้อมูล phenotype และ genotype ของประชากร 5 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจนพบการเกิดโรคที่ระดับ 5 และ 6 ซึ่งเป็นประชากรที่มี phenotype ที่ถูกต้องแน่นอน จึงเป็นประชากรที่เหมาะสมสำหรับนำมาวิเคราะห์เพื่อระบุตำแหน่งที่ตั้งของยีนต้านทานโรคไหม้ นำมาสร้างแผนที่ยีนต้านทานโรคไหม้ ทำการจัดกลุ่มและคำนวณหาค่าระยะห่างของแต่ละเครื่องหมาย และระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้ ด้วยโปรแกรม MAPMAKER/EXP version 3.0b และวาดแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapChart version 2.2 จัดกลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอและยีนต้านทานโรคไหม้ที่มีความใกล้ชิดกัน ที่ค่า logarithm of odds (LOD) =3.0 พบเครื่องหมายที่มีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ยั้งมอง (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) ซึ่งมีระยะห่างระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานมากเกินไป

จึงทำการทดสอบเพิ่มโดยใช้ประชากรที่สร้างโดย บดีเอก (2558) ที่ทำการผสมระหว่างพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ใช้เป็นพันธุ์แม่ และข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ยั้งมอง (GS20874) ใช้เป็นพันธุ์พ่อ ได้ข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 ($F_1$- hybrid) จำนวน 2 เมล็ด คือ $F_1T_2$ และ $F_1T_5$ ปลูกและปล่อยให้มีการผสมตัวเองตามธรรมชาติ ได้เมล็ดจาก $F_1T_2$ จำนวน 78 เมล็ดและจาก $F_1T_5$ จำนวน 124 เมล็ด ทำการทดสอบการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้และวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้โดยวิธีทดสอบการเกิดโรคในประชากรข้าวชั่วที่ 2 พบต้นที่แสดงความอ่อนแอ (การเกิดโรคระดับ 5 และ 6) ทั้งหมด 43 ต้น เมื่อนำมารวมกับ $F_1T_1$ ที่พบต้นที่แสดงความอ่อนแอจำนวน 5 ต้น จึงมีข้าวลูกผสมชั่วที่ 2

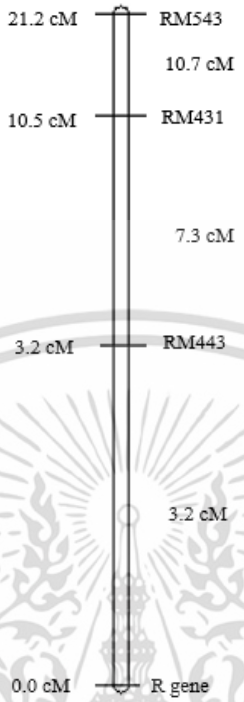
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่แสดงความอ่อนแอทั้งหมดจำนวน 48 เมื่อใช้ข้อมูล phenotype และ genotype ของประชากรทั้ง 48 ต้น มาสร้างแผนที่ยีนต้านทานโรคไหม้ ทำการจัดกลุ่มและคำนวณหาค่าระยะห่างของแต่ละเครื่องหมายและระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MAPMAKER/EXP version 3.0b วาดแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapChart version 2.2 จัดกลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอและยีนต้านทานโรคไหม้ที่มีความใกล้ชิดกัน ที่ค่า logarithm of odds (LOD) =3.0 พบว่ายีนต้านทานโรคไหม้ห่างจากเครื่องหมาย RM543 เป็นระยะทาง 21.2 cM ห่างจากเครื่องหมาย RM431 เป็นระยะห่าง 10.5 cM และห่างจากเครื่องหมาย RM443 เป็นระยะห่าง 3.2 cM (ภาพที่ 4.6 )




**ภาพที่ 4.6** แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ และระยะห่างระหว่างเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 1 ของข้าว เมื่อวิเคราะห์จากประชากรข้าว 5 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 13 ไอโซเลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4.7** แผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ และระยะห่างระหว่างเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 1 ของข้าว เมื่อวิเคราะห์จากประชากรข้าว 48 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 13 ไอโซเลท

**4.9 การทดสอบความต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวชั่วที่ 3 ($F_3$ population)**

ใช้ประชากรข้าวลูกผสมชั่วที่ 3 ที่ได้จากคัดเลือกประชากรข้าวชั่วที่ 2 ที่มีลักษณะต้านทานทั้งลักษณะทาง phenotype และ genotype เพื่อยืนยันระยะห่างระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้จากการสร้างแผนที่ยีนต้านทานโรคไหม้ ทำการจัดกลุ่มและคำนวณหาค่าระยะห่างของแต่ละเครื่องหมาย และระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม MAPMAKER/EXP version 3.0b ที่แสดงผลว่ายีนต้านทานโรคไหม้ห่างจากเครื่องหมาย RM443 เป็นระยะทาง 3.2 cM ซึ่งหมายความว่ามีค่าความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่นเท่ากับ 3.2 เปอร์เซ็นต์ หรือพบต้นที่ให้ผล genotype ต่างจาก phenotype จำนวน 3 ต้น นั่นหมายความว่าในจำนวน 100 ต้นถ้ามีการเกิดรีคอมบิเนชั่นเท่ากับ 3.2 เปอร์เซ็นต์จะมีข้าวจำนวน 3 ต้นที่แสดงความอ่อนแอ จึงทำการคัดเลือกประชากรข้าวชั่วที่ 2 ที่มีลักษณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้านทานทั้งลักษณะทาง phenotype และลักษณะทาง genotype ได้แก่ต้น $F_2T_{185}$ $F_2T_{218}$ และ $F_2T_{222}$ นำเมล็ดของต้นดังกล่าวจำนวนต้นละ 100 เมล็ด มาทดสอบโรคบนกล้าข้าวด้วยประชากรเชื้อ 13 ไอโซเลท พบว่าประชากร $F_3$ ของต้น $F_2T_{185}$ ภายหลังทำการทดสอบโรคมีลูกผสมชั่วที่ 3 ที่แสดงความต้านทานจำนวน 78 ต้น แสดงความต้านทานปานกลางจำนวน 9 ต้น และแสดงความอ่อนแอ 3 ต้น มีเมล็ดที่ไม่งอกจำนวน 10 เมล็ด ต้น $F_2T_{218}$ มีข้าวลูกผสมชั่วที่ 3 ที่แสดงความต้านทานจำนวน 78 ต้น แสดงความต้านทานปานกลางจำนวน 7 ต้น และแสดงความอ่อนแอ 4 ต้น มีเมล็ดที่ไม่งอกจำนวน 11 เมล็ด และต้น $F_2T_{222}$ มีข้าวลูกผสมชั่วที่ 3 ที่แสดงความต้านทานจำนวน 77 ต้น แสดงความต้านทานปานกลางจำนวน 9 ต้น และแสดงความอ่อนแอ 5 ต้น มีเมล็ดที่ไม่งอกจำนวน 9 เมล็ด (ตารางที่ 4.5)

**ตารางที่ 4.5** ผลประเมินการเกิดโรคด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 13 ไอโซเลท บนประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population)

| ประชากร | จำนวนต้นที่ประเมิน | ระดับความต้านทาน (ต้น) | | | เปอร์เซ็นต์ต้นอ่อนแอ |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ต้านทานสูง (0-2)* | ต้านทานปานกลาง (3-4) | อ่อนแอ (5-6) | |
| $F_2T_{185}$ | 90 | 78 | 9 | 3 | 3.33 |
| $F_2T_{218}$ | 89 | 78 | 7 | 4 | 4.49 |
| $F_2T_{222}$ | 91 | 77 | 9 | 5 | 5.49 |

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

### 4.10 การศึกษาการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้

#### 4.10.1 การออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีนต้านทานโรคไหม้

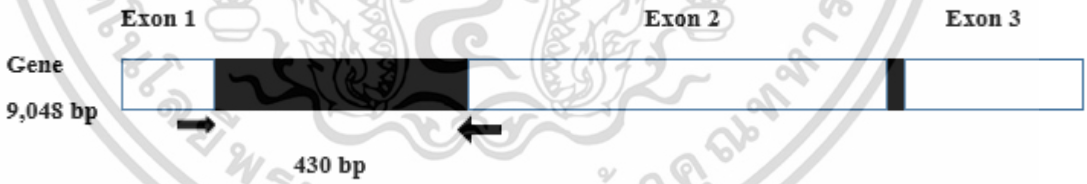
เมื่อทราบตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้แล้วจึงศึกษาข้อมูลบริเวณตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ ว่ามีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ยีนใด พบว่าเครื่องหมาย RM543 เชื่อมโยงกับยีน *Pi37* (Lin *et al.,* 2007) ในขณะที่เครื่องหมาย RM443 เชื่อมโยงกับยีน *Rf3* เกี่ยวข้องกับการแก้ความเป็นหมันในข้าว (fertility restorer) (Bazrkar *et al*., 2008) และ RM431 เชื่อมโยงกับยีน $qVTY_{11}$ ซึ่งคือยีนทนแล้ง (Vikram *et al*., 2015) ยังไม่พบข้อมูลที่รายงานว่าเครื่องหมาย RM431 และ RM443 เชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ จึงออกแบบไพร์เมอร์ให้จำเพาะกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล Genbank ในการออกแบบไพร์เมอร์ให้จำเพาะกับยีน ซึ่งยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* มี exon ทั้งหมด 3 ท่อน ออกแบบไพร์เมอร์จำนวน 2 เส้น เส้นแรก เป็น forward primer ออกแบบให้จำเพาะกับบริเวณส่วนท้ายของ exon 1 และ เส้นที่ 2 เป็น reverse primer ออกแบบให้จำเพาะกับบริเวณส่วนต้นของ exon 2 (ตารางที่ 4.6 และ ภาพที่ 4.7) ยีน *Pi37* เป็นยีนต้านทานโรคไหม้ที่คาดว่าเป็นยีนที่ควบคุมลักษณะการต้านทานโรคไหม้ในข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 ที่ผสมจากข้าวพันธุ์แม่พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์พ่อพันธุ์ยั้งมองที่ต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 13 ไอโซเลท

**ตารางที่ 4.6** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37*

| Primer sequences (5'-3') | | Position | PCR |
|---|---|---|---|
| Forward primer | Reverse primer | | product |
| ATGAGTAGAGGTACGATCTC | - | exon 1 | 430 bp |
| - | CCAGAAGGTCCTCAGCAT | exon 2 | |




**ภาพที่ 4.8** ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* และตำแหน่งของไพร์เมอร์บนยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

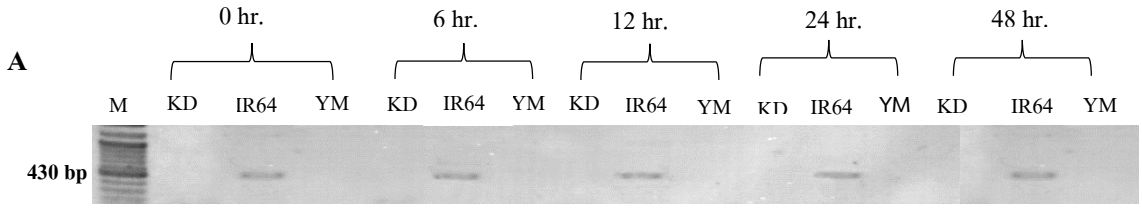
**4.10.2 ศึกษาการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ในข้าวลูกผสมชั่วที่ 2 ด้วยเทคนิค RT-PCR**

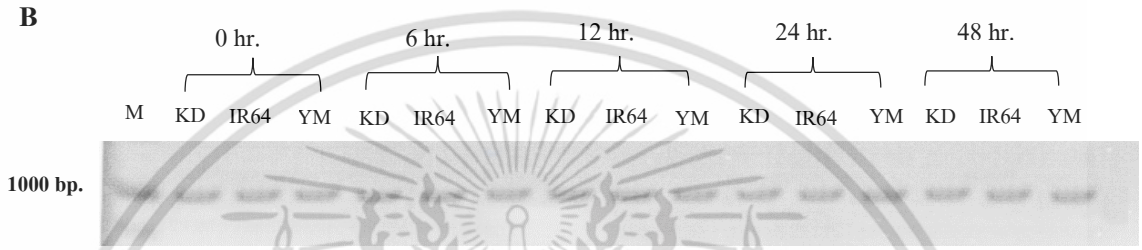
ศึกษาการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ในข้าวพันธุ์ยั้งมองซึ่งเป็นข้าวสายพันธุ์ที่คาดว่ามียีนต้านทานโรคไหม้ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคไหม้ และข้าวพันธุ์ IR64 ที่เป็นข้าวต้านทานโรคไหม้ ด้วยเทคนิค RT-PCR พบการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ในข้าวพันธุ์ IR64 ในขณะที่ไม่พบการแสดงออกของยีน *Pi37* ในข้าวพันธุ์ยั้งมองและขาวดอกมะลิ 105 ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอบนเจล ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ยีน *Actin1* เป็นยีนอ้างอิง เมื่อสามารถปรับปริมาณ cDNA ของแต่ตัวอย่างให้เท่ากันสำหรับทำ RT-PCR จึงทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ในข้าวพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบ พบว่ายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* มีการแสดงออกที่สม่ำเสมอตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 6 12 24 และ 48 ชั่วโมงในข้าวพันธุ์ IR64 (ภาพที่ 4.8)

**4.11 ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* บนโครโมโซมของข้าวพันธุ์ยั้งมอง**

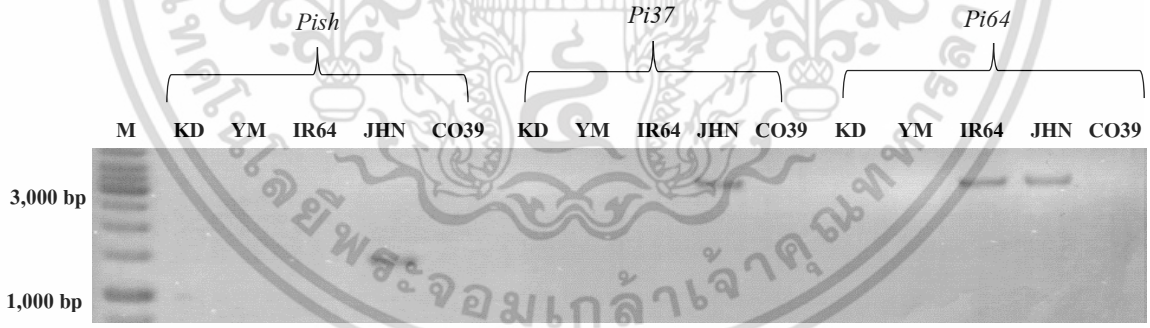
เนื่องจากไม่พบการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR จึงทำการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *Pi37* บนโครโมโซมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ดีเอ็นเอของข้าว 5 ตัวอย่าง ประกอบด้วยดีเอ็นเอข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์ยั้งมอง พันธุ์ IR64 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาเรื่องการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้ พันธุ์เจ้าหอมนิลที่เป็นข้าวสายพันธุ์ที่ได้รับการยืนยันว่ามียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* และข้าวพันธุ์ CO39 เป็นข้าวพันธุ์อ่อนแอโดยทำการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ที่อยู่ในกลุ่มหรือบริเวณใกล้เคียงกับยีน *Pi37* ซึ่งประกอบไปด้วยยีน *Pi37 Pish* และ *Pi64* (Chaivarakun *et al*., 2017) ใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และวิเคราะห์ผลจากการทำปฏิกิริยา PCR จากผลการตรวจสอบพบแถบดีเอ็นเอของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37 Pish* และ *Pi64* ในตัวอย่างดีเอ็นเอข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล และพบแถบดีเอ็นเอยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi64* ในตัวอย่างดีเอ็นเอข้าวพันธุ์ IR64 ในขณะที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีนใดๆ ในตัวอย่างดีเอ็นเอข้าวพันธุ์ยั้งมอง (ภาพที่ 4.9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่ 4.9** การแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* (A)ในข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมอง ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ IR64 เมื่อใช้เทคนิค RT-PCR เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder (M) โดยใช้การแสดงออกของยีน *Actin1* (B) เป็นยีนอ้างอิง




**ภาพที่ 4.10** ผลการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ในกลุ่ม *Pi37* ในดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KD) พันธุ์ยั้งมอง (YM) พันธุ์ IR64 (IR64) พันธุ์เจ้าหอมนิล (JHN) และพันธุ์ CO39 (CO39) โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีนต้านทานโรคไหม้ *Pish Pi37* และ *Pi64* เปรียบเทียบกับ 1 Kb DNA ladder (M)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5
# วิจารณ์ผลการทดลอง

## 5.1 ความต้านทานของข้าวพันธุ์ยั้งมองต่อประชากรเชื้อ 13 ไอโซเลท

ศึกษาปฏิกิริยาก่อโรคบนข้าวพันธุ์ยั้งมองโดยการปลูกข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมอง ขาวดอกมะลิ 105 ที่เป็นข้าวสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคไหม้ เจ้าหอมนิล และ IR64 ที่เป็นข้าวต้านทานโรคไหม้ ภายหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 13 ไอโซเลทบนกล้าข้าวทดสอบทีละไอโซเลทพบว่าข้าวพันธุ์ยั้งมองแสดงความต้านทานสูงต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลท RBR55002 PL1 และ PL2 แสดงความต้านทานปานกลางต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลท BKK55001 BKK55003 CRI43.1 CCO55002 SRN54002 SRN54005 THL191 และ UBN11351 และแสดงความอ่อนแอต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลท PLK40.4 และ UBN195167 จะเห็นได้ว่าข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมองแสดงความต้านทานโรคในระดับสูงกับเชื้อจำนวน 3 ไอโซเลท และต้านทานเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในระดับปานกลางจำนวน 8 ไอโซเลท มีเชื้อสาเหตุโรคไหม้เพียง 2 ไอโซเลทที่สามารถเข้าทำลายข้าวพันธุ์พื้นเมืองพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับรุนแรง จึงสามารถสรุปได้ว่าข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมองเป็นข้าวที่มีลักษณะความต้านทานแบบกว้างต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ เนื่องจากสามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลท ซึ่งเป็นการยืนยันงานวิจัยของ Salih *et al.* (2013) ที่จำแนกข้าวพันธุ์ต้านทานโรคไหม้จากพันธุ์ข้าวของไทย 311 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นข้าวพื้นเมืองจำนวน 263 ตัวอย่าง ข้าวที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์แล้วจำนวน 43 ตัวอย่าง และข้าวป่าจำนวน 5 ตัวอย่าง ตรวจสอบความต้านทานโรคไหม้โดยการปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 29 ไอโซเลท ผลการตรวจสอบพบพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 35 สายพันธุ์ แบ่งเป็น ข้าวพื้นเมือง 25 สายพันธุ์ ข้าวที่ได้รับการปรับปรุงจำนวน 9 สายพันธุ์ และข้าวป่าจำนวน 1 สายพันธุ์ และข้าวพันธุ์ยั้งมองคือหนึ่งในประชากรข้าวพื้นเมืองที่ผ่านการคัดเลือก

## 5.2 การกระจายตัวของยีน และแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมข้าว

### 5.2.1 การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population)

ทดสอบการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 13 ไอโซเลท บนกล้าข้าวพบการแสดงออกของลักษณะความต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 จำนวน 228 ต้น แบ่งเป็นต้นที่แสดงลักษณะต้านทานจำนวน 223 ต้น และต้นที่แสดงลักษณะอ่อนแอจำนวน 5 ต้น วิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ว่าเป็นตามที่คาดหมายหรือไม่ (goodness of fit) เนื่องจากประชากรที่ศึกษาเป็นประชากรข้าวชั่วที่ 2 หากความต้านทานโรคไหม้ที่ศึกษาถูกควบคุมด้วยยีนเพียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีนเดียว จะพบการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในอัตราส่วน 3:1 (R:S) แต่จากผลการทดลองเมื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้ในอัตราส่วน 3:1 (R:S) ได้ค่า chi-square เท่ากับ 63.24 และมีค่า *p* เท่ากับ 1.18 ซึ่งไม่เป็นไปตามสมมติฐาน แสดงว่าลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ยั้งมองไม่ได้ถูกควบคุมด้วยยีนเพียงยีนเดียว จึงทำการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะต้านทานในอัตราส่วน 15:1 (R:S) จากผลการวิเคราะห์ได้ค่า chi-square เท่ากับ 6.13 ค่า *p* เท่ากับ 0.011 การกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้จึงเป็นไปตามอัตราส่วน 15:1 (R:S) แสดงว่าลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ยั้งมอง (GS20874) ถูกควบคุมด้วยยีนหลัก จำนวน 2 ยีน โดยยีนต้านทานโรคไหม้เป็นยีนข่มทั้ง 2 ยีน (dominant allele) ข่มต่อยีนควบคุมลักษณะไม่ต้านทานโรคไหม้ ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Huang *et al*. (2011) วิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากรชั่วที่ 2 จำนวน 378 ต้น ที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวพันธุ์ Xiangzi3150 และ CO39 ทดสอบการเกิดโรคด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้สายพันธุ์ (race) ZC11 ไอโซเลท 193-1-1 ในประเทศจีน ผลการวิเคราะห์การกระจายตัวยีนต้านทานโรคไหม้ พบการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้เป็นไปตามอัตราส่วน 15:1 (R:S) แสดงว่ามียีนต้านทานโรคไหม้ที่ควบคุมความต้านทานมากกว่า 1 ยีน และเมื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมาย microsatellite จัดกลุ่มของเครื่องหมายและหาระยะทางระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้ สามารถระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-47* และ *Pi-48* บนโครโมโซมที่ 11 และ 12 ตามลำดับ

**5.2.2 การกระจายตัวของเครื่องหมาย SSR ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ generation)**

จากการคัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้ จำนวน 111 เครื่องหมาย ซึ่งคิดเป็น 48.26 เปอร์เซ็นต์ของเครื่องหมายทั้งหมด เมื่อนำมาคัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) ซึ่งเป็นการคัดเลือกเครื่องหมายที่มีความเชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคไหม้ที่สนใจ ด้วยการผสมรวมดีเอ็นเอ (bulk) ของประชากรข้าวในกลุ่มที่แสดงความต้านทานและกลุ่มที่แสดงความอ่อนแอ การคัดเลือกเครื่องหมายด้วยวิธี BSA เป็นวิธีที่นำมาใช้เพื่อลดระยะเวลาและประหยัดค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานวิจัย ผลการคัดเลือกด้วยวิธี BSA พบเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ชัดเจนจำนวน 3 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมาย RM543 RM431 และ RM443 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 1 ในขณะที่เครื่องหมาย RM495 ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความอ่อนแอและความต้านทานได้ จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ทั้งหมด 228 ต้น ด้วยเครื่องหมาย RM543 RM431 และ RM443 พบว่าการกระจายตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นไปตามอัตราส่วน 1:2:1 (B:H:A) ทั้งนี้งานวิจัยของ He *et al.* (2012) ประสบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสำเร็จในการใช้เทคนิค BSA ช่วยในการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคไหม้ในประชากรชั่วที่ 4 ได้แก่ เครื่องหมาย RM223 และ RM503 ซึ่งมีการกระจายตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นไปตามอัตราส่วน 1:2:1 และสามารถระบุยีนด้อยที่อยู่บนโครโมโซมข้าวคู่ที่ 8 คือ *Pi55(t)* มีระยะห่างระหว่างยีนต้านทานและเครื่องหมายดีเอ็นเอเท่ากับ 14 และ 4.1 cM ตามลำดับ

**5.2.3 การสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้จากเปอร์เซ็นต์รีคอมบิเนชั่นของประชากรจำนวน 5 ต้น**

การหาระยะทางระหว่างตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคใช้หลักการคำนวณหาความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่น หรือความถี่ของการเกิดครอสซิงโอเวอร์ (crossing over) โดยคู่ของยีนที่มีความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่นต่ำจะมีตำแหน่งอยู่ใกล้ชิดกันบนโครโมโซม ส่วนคู่ของยีนที่มีความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่นสูงจะมีตำแหน่งอยู่ห่างกันบนโครโมโซม โดยมีค่าสูงสุดไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ ค่าความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่น 1 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1 cM ซึ่งเป็นหน่วยของระยะห่างระหว่างยีนบนแผนที่ยีน ในการทดลองนี้ใช้ข้อมูล phenotype และ genotype ของประชากร 5 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจน (เกิดโรคที่ระดับคะแนน 5 และ 6) เนื่องจากเป็นประชากรที่มี phenotype ถูกต้องแน่นอน จึงเป็นประชากรที่เหมาะสมสำหรับนำมาวิเคราะห์เพื่อระบุตำแหน่งที่ตั้งของยีนต้านทานโรคไหม้ในการศึกษานี้ พบว่าเครื่องหมาย RM443 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 มีการเกิดรีคอมบิเนชั่น เท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ และเครื่องหมาย RM543 และ RM431 เกิดรีคอมบิเนชั่นเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเครื่องหมาย RM543 และ RM431 เป็นอิสระจากยีนต้านทานโรคไหม้และอาจมีตำแหน่งอยู่ห่างจากยีนต้านทานโรคไหม้มากเกินไป พบยีนต้านทาน 1 ตำแหน่งที่เชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM443 ซึ่งงานวิจัยของเพ็ญนภา (2557) ใช้วิธีเดียวกันโดยการสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเปอร์เซ็นต์รีคอมบิเนชั่น โดยใช้ประชากร 15 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ พบเครื่องหมาย RM144 และ RM224 ที่อยู่บนโครโมโซม 11 เกิดรีคอมบิเนชั่นเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ายีนต้านทานโรคไหม้มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM144 และ RM224 โดยมีระยะห่างจากทั้ง 2 เครื่องหมายเป็นระยะทาง 20 cM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**5.2.4 การสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยโปรแกรม** MAPMAKER

การทดลองนี้ใช้ข้อมูล phenotype และ genotype ของประชากร 5 ต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้นำมาวิเคราะห์ร่วมกัน จัดกลุ่ม และคำนวณหาค่าระยะห่างของแต่ละเครื่องหมาย และระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้ ด้วยโปรแกรม MAPMAKER และวาดแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapChart จัดกลุ่มเครื่องหมายดีเอ็นเอและยีนต้านทานโรคไหม้ที่มีความใกล้ชิดกัน ที่ค่า logarithm of odds (LOD) = 3.0 ซึ่งหมายถึงโอกาสที่เครื่องหมายที่ถูกจัดกลุ่มอยู่ด้วยกันจะไม่มีความเชื่อมโยงกัน เท่ากับ 0.01 หรือ 1 ใน 1000 แสดงให้เห็นว่าการจัดกลุ่มของเครื่องหมายมีความละเอียดมาก วิเคราะห์ความเชื่อมโยง 1000 ครั้งมีเพียง 1 ครั้งที่อาจพบว่าเครื่องหมายไม่มีความเชื่อมโยงกัน เครื่องหมายที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือ เครื่องหมายที่มีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้และมีระยะห่างจากยีนน้อยกว่า 50 cM การจัดเรียงตัวของแต่ละเครื่องหมายบนโครโมโซม เลือกผลการคำนวณที่แสดงค่า likelihood สูงที่สุด คือ เท่ากับ 0 และการคำนวณระยะห่างของเครื่องหมายด้วย Kosambi function ซึ่งเครื่องหมายที่มีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้และมีระยะห่างน้อยกว่า 50 cM ได้แก่ เครื่องหมาย RM431 เพียงเครื่องหมายเดียว ในส่วนของเครื่องหมาย RM543 และ RM443 มีระยะห่างระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้มากกว่า 50 cM จึงเพิ่มข้อมูล phenotype และ genotype ของประชากรต้นที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้จำนวน 43 ต้น ที่ได้รับมาจาก บดีเอก (2558) รวมเป็นทั้งหมด 48 ต้น นำมาวิเคราะห์ร่วมกันทำการจัดกลุ่มและคำนวณหาค่าระยะห่างของแต่ละเครื่องหมาย และระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้ พบว่าเครื่องหมายมีความเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้และมีระยะห่างจากยีนน้อยกว่า 50 cM ทั้ง 3 เครื่องหมาย ได้แก่เครื่องหมาย RM543 RM443 และ RM431

จากแผนที่ระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้โปรแกรม MAPMAKER พบว่ายีนต้านทานโรคไหม้มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM543 RM443 และ RM431 บนโครโมโซมที่ 1 โดยมีระยะห่างจากเครื่องหมาย RM543 RM431 และ RM443 เป็นระยะทาง 21.2 cM 10.5 cM และ 3.2 cM ตามลำดับ โดยบริเวณเครื่องหมายเหล่านี้เคยมีรายงานพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* มีตำแหน่งห่างจากเครื่องหมาย RM543 และ RM302 เป็นระยะห่าง 0.7 cM และ 0.07 cM ตามลำดับ (Lin *et al.,* 2007) และบริเวณใกล้เคียงยีน *Pi37* พบยีน *Pi35(t)* อยู่บริเวณด้านบนยีน *Pi37* มีระยะห่างระหว่างยีน 4.1 cM (Wang *et al*., 2014) ในขณะที่ยังไม่พบรายงานข้อมูลของเครื่องหมาย RM431 และ RM443 ว่าเชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ใดๆ จึงยังไม่สามารถยืนยันได้ว่ายีนต้านทานของข้าวพันธุ์ยั้งมองนี้เป็นยีนเดียวกับที่เคยมีผู้รายงานไว้หรือไม่ งานวิจัยนี้จึงนับว่าเป็นการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ยีนใหม่ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**5.2.5 การทดสอบความต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวชั่วที่ 3 ($F_3$ population) เพื่อยืนยันตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้**

ผลการจัดกลุ่มและคำนวณหาค่าระยะห่างของแต่ละเครื่องหมาย และระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ยั้งมอง พบว่ายีนต้านทานโรคไหม้ห่างจากเครื่องหมาย RM443 เป็นระยะทาง 3.2 cM ซึ่งหมายความว่าค่าความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่นเท่ากับ 3.2 เปอร์เซ็นต์ หรือพบต้นที่ให้ผล phenotype และ genotype ต่างกันมีจำนวน 3.2 เปอร์เซ็นต์ นั่นหมายความว่าในประชากรข้าวจำนวน 100 ต้นจะมีการเกิดรีคอมบิเนชั่น เท่ากับ 3.2 เปอร์เซ็นต์หรือมีข้าวจำนวน 3 ต้นที่แสดงความอ่อนแอ ดังนั้นเพื่อยืนยันระยะทางระหว่างเครื่องหมายและยีนต้านทานโรคไหม้ด้วยค่าความถี่ของการเกิดรีคอมบิเนชั่น จึงคัดเลือกประชากรข้าวชั่วที่ 2 ที่มีลักษณะต้านทานทั้งลักษณะทาง phenotype และลักษณะทาง genotype จำนวน 3 ต้น ได้แก่ $F_2T_{185}$ $F_2T_{218}$ และ $F_2T_{222}$ โดยทำการประเมินความต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวชั่วที่ 3 ของแต่ละต้นดังกล่าว พบว่าประชากรชั่วที่ 3 ของต้น $F_2T_{185}$ แสดงความต้านทานจำนวน 87 ต้น และแสดงความอ่อนแอ 3 ต้น ประชากรชั่วที่ 3 ของต้น $F_2T_{218}$ แสดงความต้านทานจำนวน 85 ต้น และแสดงความอ่อนแอ 4 ต้น และประชากรชั่วที่ 3 ของต้น $F_2T_{222}$ แสดงความต้านทานจำนวน 86 ต้น และแสดงความอ่อนแอ 5 ต้น ซึ่งแสดงว่ามีโอกาสเกิดรีคอมบเนชั่นอยู่ที่ 3–5 เปอร์เซ็นต์ หรือมีระยะห่างระหว่างยีนต้านทานโรคไหม้กับเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้เท่ากับ 3–5 cM จึงสามารถยืนยันได้ว่า ระยะห่างระหว่างยีนต้านทานโรคไหม้กับเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM443 มีระห่างอยู่ที่ 3.2 cM

**5.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน *Pi37***

เมื่อผลการระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ยั้งมองพบว่ามีระยะห่างจากเครื่องหมาย RM443 อยู่ที่ 3.2 cM โดย Lin *et al*. (2007) รายงานไว้ว่าพบว่าเครื่องหมาย RM543 เชื่อมโยงกับยีน *Pi37* จึงศึกษาการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ในข้าวพันธุ์ยั้งมอง ผลการทดลองพบการแสดงออกของยีน *Pi37* ในข้าวพันธุ์ IR64 ในขณะที่ไม่พบการแสดงออกในข้าวพันธุ์ยั้งมองและขาวดอกมะลิ 105 ในข้าวพันธุ์ IR64 พบการแสดงออกของยีน *Pi37* อย่างต่อเนื่องตั้งแต่ 0 ชั่วโมงจนถึง 48 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lin *et al*. (2007) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ในข้าวพันธุ์ St. No. 1 ตั้งแต่ 0 24 และ 48 ชั่วโมง พบมีการแสดงออกของยีนอย่างต่อเนื่อง เริ่มตั้งแต่ 0 ชั่วโมงจนถึง 48 ชั่วโมง จึงมีความเป็นไปได้ว่าในข้าวพันธุ์ IR64 มีการแสดงออกยีน *Pi37* ตลอดเวลา ดังนั้นยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานในข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมอง (GS20874) อาจเป็นยีนอื่นที่อยู่บริเวณด้านล่างของโครโมโซมที่ 1 ของข้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**5.4 ยืนยันการมีอยู่ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* บนโครโมโซมของข้าวพันธุ์ยั้งมอง**

เนื่องจากไม่พบการแสดงออกของยีน *Pi37* ในข้าวพันธุ์ยั้งมอง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการแสดงออกของยีนอาจมีระดับต่ำเกินไปที่จะสามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค RT-PCR ดังนั้นจึงตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *Pi37* บนโครโมโซมของข้าวพันธุ์ยั้งมองด้วยเทคนิค PCR โดยทำการตรวจสอบยีนต้านทานที่มีรายงานอยู่ในกลุ่มของยีนต้านทาน *Pi37* (gene cluster) ซึ่งประกอบไปด้วยยีน *Pi37 Pish* และ *Pi64* (Chaivarakun *et al*., 2017) ผลการตรวจสอบพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37 Pish* และ *Pi64* ในข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล และพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi64* ในข้าวพันธุ์ IR64 ในขณะที่ไม่พบยีน *Pi37 Pish* และ *Pi64* ในข้าวพันธุ์ยั้งมอง จึงสามารถสรุปได้ว่ายีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมองคือยีนอื่นที่ไม่ใช่ *Pi37 Pish* หรือ *Pi64* ทั้งนี้งานวิจัยของ Lin *et al*. (2007) รายงานว่าพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ในข้าวสายพันธุ์ St. No. 1 บนโครโมโซมคู่ที่ 1 และงานวิจัยของ Jian *et al.* (2015) รายงานว่าข้าวสายพันธุ์ Yangmaogu ที่มีลักษณะความต้านทานแบบกว้างต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ เมื่อวิเคราะห์ทาง genotype พบว่ามียีนเด่นที่ควบคุมลักษณะความต้านทานน้อยกว่า 3 ยีน และยีน *Pi64* คือหนึ่งยีนที่พบบนโครโมโซมคู่ที่ 1 ของข้าวสายพันธุ์ Yangmaogu

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 6

# สรุปผลการทดลอง

โรคไหม้ของข้าวเกิดจากเชื้อราสาเหตุ *Pyricularia oryzae* เป็นเชื้อราที่เป็นปัญหาต่อการปลูกข้าวของประเทศไทย ทำความเสียหายอย่างมากต่อผลผลิตข้าว โดยเฉพาะพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย แนวทางการป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพปลอดภัยต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค คือ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวอ่อนแอให้ต้านทานโรคไหม้ แต่เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคไหม้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถปรับตัวให้เข้าทำลายพันธุ์ข้าวต้านทานได้ ส่งผลให้พันธุ์ข้าวต้านทานเดิมสูญเสียความต้านทาน ด้วยเหตุนี้จึงมีการศึกษาและระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ที่สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลากหลายสายพันธุ์ ในงานวิจัยนี้ได้ความต้านทานของข้าวพันธุ์ยั้งมองต่อประชากรเชื้อ 13 ไอโซเลทที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าวในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ โดยทดสอบความต้านทานของเชื้อสาเหตุโรคไหม้บนข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมอง ขาวดอกมะลิ 105 ที่เป็นข้าวสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคไหม้ พันธุ์เจ้าหอมนิล และ IR64 ที่เป็นข้าวต้านทานโรคไหม้ เมื่อทำการปลูกเชื้อสาเหตุโรคทีละไอโซเลท ทำการทดลองจำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 2 ซ้ำ พบว่าข้าวพันธุ์ยั้งมองแสดงความต้านทานระดับสูงต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 3 ไอโซเลท และแสดงความต้านทานในระดับปานกลางต่อเชื้อจำนวน 8 ไอโซเลท มีเชื้อสาเหตุโรคไหม้เพียง 2 ไอโซเลทที่สามารถเข้าทำลายข้าวพันธุ์พื้นเมืองพันธุ์ยั้งมองได้ในระดับรุนแรง ดังนั้นข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมองเป็นข้าวที่มีลักษณะความต้านทานแบบกว้างต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ เนื่องจากสามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายไอโซเลท

ผลการศึกษาการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคไหม้โดยวิธีทดสอบการเกิดโรคในประชากรข้าวชั่วที่ 2 ($F_2$ population) ทดสอบการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้จำนวน 13 ไอโซเลทลงบนกล้าข้าวจำนวน 228 ต้น ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่อ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ กับข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ยั้งมอง (GS20874) ที่ใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้ พบการกระจายตัวของลักษณะต้านทาน : อ่อนแอโรคไหม้ในอัตราส่วน 15:1 และในกลุ่มที่แสดงความต้านทาน (15 ใน 16 ส่วน) มีระดับความต้านทานแตกต่างกัน แสดงว่าลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ยั้งมอง (GS20874) ถูกควบคุมด้วยยีนหลัก (major gene) จำนวน 2 ยีน โดยยีนต้านทานโรคไหม้เป็นยีนข่มทั้ง 2 ยีน (dominant allele) ข่มต่อยีนควบคุมลักษณะไม่ต้านทานโรคไหม้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการระบุตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้โดยคัดเลือกเครื่องหมาย SSR จาก 230 เครื่องหมายที่ครอบคลุมทุกโครโมโซมข้าว พบ 111 เครื่องหมายสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้ จากนั้นคัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างความต้านทานและความอ่อนแอได้ด้วยวิธี bulk segregant analysis (BSA) พบ 4 เครื่องหมาย ได้แก่ RM543 RM431 RM443 และ RM495 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 เมื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของแต่ละเครื่องหมายในประชากรข้าวชั่วที่ 2 จำนวน 228 ต้น พบการกระจายตัวของเครื่องหมาย RM543 RM431 และ RM443 เป็นไปตามอัตราส่วน 1:2:1 คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ (B): มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่ (H): มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ (A) มีค่า Chi square เท่ากับ 1.99 7.57 และ 2.96 ตามลำดับ โดยมีค่า probability (*p*) เท่ากับ 0.36 0.022 และ 0.22 ตามลำดับ สำหรับเครื่องหมาย RM495 มีค่าสถิติ Chi square เท่ากับ 684 โดยมีค่า *p* เท่ากับ 2.96 แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 1:2:1 จากนั้นสร้างแผนที่ระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้จากเปอร์เซ็นต์รีคอม-บิเนชั่น โดยเลือกใช้ประชากรข้าวที่แสดงความอ่อนแอต่อโรคไหม้อย่างชัดเจนจำนวน 5 ต้น พบว่าเครื่องหมาย RM443 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม 1 มีการเกิดรีคอมบิเนชั่นเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่ายีนต้านทานโรคไหม้มีความเชื่อมโยงกับเครื่องหมาย RM443 และมีระยะห่างจากเครื่องหมาย RM443 เป็นระยะทาง 40 cM ในขณะที่เครื่องหมาย RM543 และ RM431 เกิดรีคอมบิเนชั่นเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเครื่องหมายเป็นอิสระจากยีนต้านทานโรคไหม้ ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ที่ชัดเจนขึ้น จึงทำการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม MAPMAKER และวาดแผนที่พันธุกรรมด้วยโปรแกรม MapChart พบว่ายีนต้านทานโรคไหม้มีระยะห่างจากเครื่องหมาย RM543 RM431 และ RM443 เป็นระยะทาง 85.1 73.6 และ 45.8 cM ตามลำดับ ซึ่งมีระยะห่างระหว่างเครื่องหมายกับยีนต้านทานมากเกินไป จึงเพิ่มประชากรข้าวชั่วที่ 2 ที่แสดงความอ่อนแออีก 43 ต้น รวมเป็น 48 ต้น ผลการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MAPMAKER พบว่ายีนต้านทานโรคไหม้ห่างจากเครื่องหมาย RM543 RM431 และ RM443 เป็นระยะทาง 21.2 10.5 และ 3.2 cM ตามลำดับ ทำให้สามารถระบุได้ว่าตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ของข้าวพันธุ์ยั้งมองอยู่บริเวณด้านล่างของโครโมโซมที่ 1

จากการศึกษาข้อมูลของเครื่องหมายดีเอ็นเอ พบรายงานระบุว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM543 เชื่อมโยงกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* จึงทำการออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีน *Pi37* เพื่อตรวจสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแสดงออกของยีน *Pi37* ในข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมอง พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ IR64 ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR พบการแสดงออกของยีน *Pi37* ในข้าวพันธุ์ IR64 ในขณะที่ไม่พบการแสดงออกในข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมอง และขาวดอกมะลิ 105 นอกจากนี้ยีน *Pi37* มีการแสดงออกต่อเนื่องในข้าวพันธุ์ IR64 เมื่อไม่พบการแสดงออกของยีน *Pi37* จึงทำการยืนยันการมีอยู่ของยีน *Pi37* โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีนในกลุ่ม *Pi37* ซึ่งประกอบไปด้วยยีน *Pi37 Pish* และ *Pi64* ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ใช้ดีเอ็นเอข้าว 5 สายพันธุ์ ประกอบด้วย ข้าวพื้นเมืองพันธุ์ยั้งมอง ขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์ IR64 เจ้าหอมนิล และพันธุ์ CO39 ผลการทดลองพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37 Pish* และ *Pi64* ในข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล และพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi64* ในข้าวพันธุ์ IR64 ในขณะที่ไม่พบยีนใดในข้าวพันธุ์ยั้งมอง ดังนั้นยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ยั้งมองจึงเป็นยีนอื่นที่ไม่ใช่ยีน *Pi37 Pish* หรือ *Pi64*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บรรณานุกรม


กรมการข้าว. 2556. ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ในองค์ความรู้เรื่องข้าว. [Online].
Available : http://www.brrd.in.th/rkb/varieties/index, 12 มิถุนายน 2560.

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

ฉวีวรรณ วุฒิญาโณ. 2543. **เอกสารวิชาการพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทย**. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร. 215 หน้า.

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

ชวาลา บุรณศิริ. 2531. **โรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา**. คณะเทคโนโลยีทางการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 208 หน้า.

นัททรียา จิตบำรุง และ ภิญญารัตน์ กงประโคน. 2559. การพัฒนาพันธุ์ข้าวเหนียวต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก. **แก่นเกษตร** 44: 265–271.

บดีเอก พงศ์ธนากุล. 2558. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ต้านทานโรคไหม้โดยใช้ลักษณะความต้านทานจากพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ยั้งมอง. ปัญหาพิเศษ. สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 43 หน้า.

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

ปิยะนันท์ อึ้งทรงธรรม. 2543. **สายพันธุ์ข้าว.** [Online].
Available : nutrition.anamai.moph.go.th/temp/ files/K-center/morning54/4.pdf, 12 มิถุนายน 2560.

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2548. **โรคไหม้ข้าว: ความหลากหลายและแนวทางการพัฒนาข้าวต้านทานโรคไหม้.** อุบลราชธานี. กรมวิชาการเกษตร. 61 หน้า.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เพ็ญนภา ตันเซียน. 2557. พันธุกรรมควบคุมลักษณะและการระบุตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทยพันธุ์ห้วย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 89 หน้า.

วิชา ธิติประเสริฐ มนิตย์ ใจฉกรรจ์ ทองมากเหลือ พิทักษ์ ทองเจือเพ็ชร์ สุพัตรา รักษาศิลป์ อเนก ดีมั่น และ ฉวีวรรณ วุฒิญาโณ. 2544. **ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์: ข้าว**. กรุงเทพฯ: ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 682 หน้า.

วิชิต ศิริสันธนะ วิชชุดา รัตนากาญจน์ รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์ และ วันพร เข็มมุกด์. 2553. **โรคข้าวที่สำคัญในประเทศไทย : การวินิจฉัย การสุ่ม และการประเมินความรุนแรงของโรค** กลุ่มวิชาการ สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. 55 หน้า.

วราพงษ์ ชมาฤกษ์ อุไรวรรณ คชสถิตย์ พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ จิรพงศ์ ใจรินทร์ และ กฤษณา สัตยากุล. 2550. การปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข6 ให้มียีนทนทานน้ำท่วมขังโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย. หน้า 58–67. *ใน* **การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2550.** ปทุมธานี: สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว.

ศรีสวัสดิ์ ขันทอง. 2552. การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* และ *Pi-b* ในข้าวป่าและและข้าวพื้นเมืองไทย. ปัญหาพิเศษ. ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 71 หน้า.

ศรีสวัสดิ์ ขันทอง ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ และ สุรีพร เกตุงาม. 2553. โรคไหม้และการปรับปรุงข้าวต้านทานโรคไหม้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก. **Thai Journal of Genetics** 3: 106–119.

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

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

สมทรง โชติชื่น เกษม สุนทราจารย์ อภิชาต ลาวัณย์ประเสริฐ วาสนา พันธุ์เพ็ง กัญญา เชื้อพันธุ์ สุนันทา วงศ์ปิยชน วัชรี สุขวิวัฒน์ อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ นลินี เจียงวรรธนะ ปิยะพันธ์ ศรีคุ้ม รณชัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช่างศรี เปรมฤดี ปินทยา ปรีดา เสียงใหญ่ พันนิภา ยาใจ วันชัย โรจนหัสดินทร์ สุวัฒน์ เจียระคงมั่น และ ดวงใจ สุริยาอรุณโรจน์. 2554. แหล่งพันธุกรรมข้าวเพื่อการใช้ประโยชน์. หน้า 88–100. *ใน* **การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวประจำปี 2554.** กรุงเทพฯ: โรงแรมอมารีแอร์พอร์ต.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2558. สถิติการนำเข้าส่งออก. [Online]. Available : http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export.php, 12 มิถุนายน 2560.

สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว. 2552. องค์ความรู้ด้านศัตรูข้าว. กรุงเทพฯ: กรมการข้าว. 59 หน้า.

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

สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. 2555. **องค์ความรู้เรื่องข้าว.** [Online]. Available : http://www.brrd.in.th/rkb/, 12 มิถุนายน 2560.

สำนักงานวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว. 2557. พันธุ์ข้าว. **องค์ความรูเรื่องข้าว.** [Online]. Available : http://www.brrd.in.th/rkb/varieties/index.php.htm, 12 มิถุนายน 2560.

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. 2558. **สถานการณ์การส่งออกข้าวไทย.** [Online]. Available:http://www.thairiceexporters.or.th/Local%20news/News_2015/news_090215-1.html, 12 มิถุนายน 2560.

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

อังคณา กันทาจันทร์ สุวัฒน์ เจียระคงมั่น วีระศักดิ์ หอมสมบัติ และ กัลยา บุญสง่า. 2557. ปฏิกิริยาของพันธุ์ข้าวต่อโรคไหม้และโรคขอบใบแห้งที่จังหวัดสกลนคร. หน้า 228–242. *ใน* **การประชุมวิชาการข้าวภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปี 2557.** หนองคาย: ณ โรงแรมรอยัลแม่โขงหนองคาย.

อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ. 2554. การลดความรุนแรงของโรคไหม้ของข้าวโดยการปลูกแบบหลายสายพันธุ์ในภาคเหนือตอนล่าง. หน้า 247–255. *ใน* **สัมมนาวิชาการกลุ่มศูนย์วิจัยข้าวภาคเหนือตอนบนภาคเหนือตอนล่าง ประจำปี 2554**. แพร่: ณ โรงแรมนครแพร่ทาวเวอร์.

Ashkani, S., M.Y. Rafii, M. Sariah, A.S.N. Akma, I. Rusli, H. A. 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: 1,345–1,355.

Bazrkar, L., A.J. Ali, N.A. Babaeian, A.A. Ebadi, M. Allahgholipour, K. Kazemitabar amd G. Nematzadeh. 2008. Tagging of four fertility restorer loci for wild abortive-cytoplasmic male sterility system in rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite markers. **Euphytica** 164: 669–677.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 markersin polyacrylamide gels. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment** 10: 77–81.

Bent, A. F. 1996. Plant disease resistance genes, function meets structure. **Plant Cell** 8: 1,757–1,771.

Buchanan, B. B., W. Gruissem and R. L. Jones. 2000. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants.** ASPP press, Rockville. 1,280 p.

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

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

Hammond-Kosack K.E. and J.D.G. Jones. 1997. Plant disease resistance genes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 48: 575–607.

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.

He X.Y., L.X. Qiong, W. Li, W. Ling, L. Fei, C.Y. Sheng, C. Z. Ming, L.Y. Ping and P. Q. Hua. 2012. Identification of the novel recessive gene *pi55(t)* conferring resistance to *Magnaporthe oryzae.* **Science China Life Sciences** 55: 141–149.

Howles, P., G. Lawrence, J. Finnegan, H. McFadden, M. Ayliffe, P. Dodds and J. Ellis. 2005. Autoactive alleles of the flax L6 rust resistance gene induce non-race-specific rust resistance associated with the hypersensitive response. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 18: 570–582.

Hulbert, S.H., C.A. Webb, S.M. Smith and Q. Sun. 2001. Resistance gene complexes, evolution and utilization. **Annual Review of Phytopathology** 39:285–312.

Jian, M., C. Lei, X. Xu, K. Hao, J. Wang, Z. Cheng, X. Ma, J. Ma, K. Zhou, X. Zhang, X. Guo, F. Wu, Q. Lin, C. Wang, H. Zhai, H. Wang and J. Wan. 2015. *Pi64*, Encoding a novel CC-NBS-LRR protein, confers resistance to leaf and neck blast in rice. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 28: 558–568.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Koide, Y., N. Kobayashi, D. Xu and Y. Fukuta. 2009. Resistance gene and selection DNA marker for blast disease in rice (*Oryza sativa* L.). **Japan Agricultural Research Quarterly** 43: 255–280.

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.

Li, J., D. Li, Y. Sun and M. Xu. 2012. Rice blast resistance gene *Pi1* identified by marker in 173 Yunnan rice landraces. **Rice Genomics and Genetics** 3: 13–18.

Lincoln, S.E. M.J. Daly and E.S. Lander. 1993. **Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP version 3.0: A tutorial and reference manual.** Cambridge: Whitehead Institute for Biomedical Research. 47 p.

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** 177: 1,871–1,880.

Martin, B.G., A. J. Bogdanove and G. Sessa. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. **Annual Review of Plant Biology** 54: 23–61.

McHale, L, X. Tan, P. Koehl and R.W. Michelmore. 2006. Plant NBS-LRR proteins: Adaptable guards. **Genome Biology** 7: 212.

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** 40: 2,369–2,388.

Morgan, T.H. 2008. Genetic recombination and gene mapping. **Nature Education** 1: 205.

Navadagi, B. D., J. Vijayan and T. R. Sharma. 2014. The blast resistance gene *Pi54* of cloned from *Oryza officinali*s interacts with *Avr-Pi54* through its novel non-LRR domains. **PlosOne** 9: e104840.

Neergaard P. 1979. **Seed pathology**. 2nd ed . Newyork.: Macmillan press Ltd. 1,191 p.

Parisa, A., M.Y. Rafii, M. Mahmood, S.N.A. Abdullah, M.M. Hanafi, N. Nejat, M.A. Latif and M. Sahebi. 2015. Differential gene expression reflects morphological characteristics and physiological processes in rice immunity against blast pathogen *Magnaporthe oryzae*. **PlosOne** 10: e0126188.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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: 1,765–1,769.

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

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

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed. Newyork : Cold spring harbor laboratory. 2,028 p.

Sirithunya, P., T. Sreewongchai, S. Sriprakhon, T. Toojinda, S. Pimpisithavorn, C. Kosawangand and P. Smitamana. 2007. Assessment of genetic diversity in Thai isolates of *Pyricularia grisea* by random amplification of polymorphic DNA. **Phytopathology** 156: 196–204.

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.

Thomma, B.P.H.J., T. Nurnberger and M.H.A.J. Joosten. 2011. Of PAMPs and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy. **Plant Cell** 23: 4–15.

Vikram, P., B.P.M. Swamy, S. Dixit, R. Singh, B.P. Singh, B. Miro, A. Kohli, A. Henry, N.K. Singh and A. Kumar. 2015. Drought susceptibility of modern rice varieties: an effect of linkage of drought tolerance with undesirable traits. **Scientific Reports** 5:1–18.

Voorrips, R.E. 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **The Journal of Heredity** 14: 77–78.

Wang X., S. Lee, J. Wang, J. Ma, T. Bianco and Y. Jia. 2014. Current Advances on Genetic Resistance to Rice Blast Disease. **Rice-germplasm, genetics and improvement**. Croatia: Intech. 316 p.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก

# การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

**1.1 Rice Flour Agar (RFA)**

| | | |
|---|---|---|
| rice flour | 20 | กรัม |
| yeast extract | 2 | กรัม |
| agar powder | 20 | กรัม |

ผสมรวมกันปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**1.2 Water Agar**

| | | |
|---|---|---|
| agar powder | 17 | กรัม |
| water | 1,000 | มิลลิลิตร |

ผสมรวมกัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**2. การเตรียมสารละลาย**

**2.1 CTAB extraction buffer**

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

ผสมรวมกันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.2 Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (25: 24: 1)**

| | | |
|---|---|---|
| phenol | 25 | มิลลิลิตร |
| chloroform | 24 | มิลลิลิตร |
| isoamyl alcohol | 1 | มิลลิลิตร |

ผสมสารละลายให้เข้ากัน เทใส่ขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

**2.2 1X TE buffer**

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

ผสมสารละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**2.3 10X TBE**

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

ละลายสารที่ชั่งด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลซียส

**2.4 Acrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์**

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.5 Chloroform : Isoamyl alcohol (24: 1)**

| | | |
|---|---|---|
| chloroform | 48 | มิลลิลิตร |
| isoamyl alcohol | 2 | มิลลิลิตร |

ผสมสารละลายให้เข้ากัน เทใส่ขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

2.5 **Sequencing dye**

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

ผสมสารละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

**2.7 10% Ammonium persulfate (APS)**

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

ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 20 มิลลิลิตร ใส่ขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ข

## ผลวิเคราะห์การกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากรข้าวชั่วที่ 2 จำนวน 228 ต้น ด้วยเครื่องหมาย SSR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางผนวกที่ 1** ผลวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอในประชากรข้าว $F_2$ จำนวน 228 ต้น ด้วยเครื่องหมาย SSR

| phenotype | | genotype | | | phenotype | | genotype | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | RM543 | RM431 | RM443 | | | RM543 | RM431 | RM443 |
| KDML105 | 6 | A | A | A | 32 | 1 | B | A | H |
| Yang mawng | 0 | B | B | B | 33 | 1 | A | B | B |
| 1 | 0 | B | H | H | 34 | 0 | B | A | A |
| 2 | 3 | H | H | H | 35 | 1 | H | A | H |
| 3 | 1 | H | H | B | 36 | 2 | H | A | H |
| 4 | 1 | A | H | A | 37 | 1 | H | H | H |
| 5 | 1 | H | B | H | 38 | 0 | A | H | H |
| 6 | 1 | H | A | H | 39 | 0 | A | B | A |
| 7 | 1 | H | B | H | 40 | 2 | H | A | H |
| 8 | 2 | H | H | A | 41 | 1 | B | H | H |
| 9 | 0 | B | H | A | 42 | 0 | A | A | A |
| 10 | 2 | B | B | B | 43 | 0 | H | H | H |
| 11 | 1 | A | B | B | 44 | 2 | H | H | A |
| 12 | 2 | B | A | A | 45 | 1 | H | H | H |
| 13 | 1 | B | B | A | 46 | 4 | H | H | A |
| 14 | 2 | H | A | H | 47 | 0 | A | H | B |
| 15 | 1 | H | A | H | 48 | 1 | A | H | H |
| 16 | 2 | H | B | H | 49 | 1 | H | H | H |
| 17 | 1 | B | A | H | 50 | 3 | H | B | A |
| 18 | 2 | H | H | A | 51 | 1 | B | H | B |
| 19 | 2 | B | A | A | 52 | 2 | B | H | A |
| 20 | 2 | H | B | H | 53 | 3 | B | H | A |
| 21 | 0 | B | A | H | 54 | 2 | A | H | B |
| 22 | 1 | H | H | H | 55 | 4 | B | B | A |
| 23 | 3 | B | H | A | 56 | 0 | B | H | B |
| 24 | 1 | H | A | H | 57 | 0 | A | H | A |
| 25 | 2 | H | H | H | 58 | 1 | B | H | H |
| 26 | 2 | H | H | H | 59 | 1 | H | B | H |
| 27 | 2 | B | B | H | 60 | 0 | H | H | A |
| 28 | 0 | H | A | H | 61 | 0 | A | H | H |
| 29 | 1 | B | H | B | 62 | 1 | B | H | H |
| 30 | 0 | H | H | H | 63 | 1 | H | H | B |
| 31 | 0 | H | H | A | 64 | 0 | H | H | H |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางผนวกที่ 1** (ต่อ)

| phenotype | | genotype | | | phenotype | | genotype | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | RM543 | RM431 | RM443 | | | RM543 | RM431 | RM443 |
| KDML105 | 6 | A | A | A | 98 | 0 | H | A | H |
| Yang mawng | 0 | B | B | B | 99 | 0 | H | B | B |
| 65 | 1 | B | H | H | 100 | 2 | A | A | A |
| 66 | 0 | H | H | H | 101 | 2 | A | A | H |
| 67 | 0 | B | H | B | 102 | 0 | B | A | H |
| 68 | 1 | A | H | A | 103 | 2 | A | H | H |
| 69 | 1 | H | B | H | 104 | 0 | H | H | H |
| 70 | 2 | B | A | H | 105 | 1 | B | B | A |
| 71 | 0 | H | B | H | 106 | 2 | H | A | H |
| 72 | 2 | H | H | A | 107 | 0 | H | H | H |
| 73 | 2 | B | H | A | 108 | 1 | H | A | A |
| 74 | 6 | A | A | H | 109 | 0 | B | H | H |
| 75 | 1 | H | B | B | 110 | 1 | A | H | A |
| 76 | 1 | A | A | A | 111 | 1 | H | H | H |
| 77 | 1 | B | B | A | 112 | 0 | H | H | A |
| 78 | 0 | A | A | H | 113 | 1 | H | H | B |
| 79 | 1 | B | A | H | 114 | 0 | B | H | H |
| 80 | 0 | H | B | H | 115 | 0 | B | H | H |
| 81 | 1 | H | A | H | 116 | 1 | B | B | A |
| 82 | 3 | H | H | A | 117 | 0 | B | H | B |
| 83 | 0 | H | A | A | 118 | 1 | H | H | A |
| 84 | 0 | H | B | H | 119 | 0 | B | H | A |
| 85 | 2 | H | A | H | 120 | 1 | B | H | B |
| 86 | 0 | H | H | H | 121 | 1 | H | B | A |
| 87 | 0 | H | H | A | 122 | 0 | H | H | B |
| 88 | 0 | H | A | H | 123 | 2 | B | H | A |
| 89 | 1 | A | H | H | 124 | 0 | H | H | H |
| 90 | 0 | A | H | H | 125 | 0 | A | B | H |
| 91 | 0 | H | B | H | 126 | 3 | H | H | A |
| 92 | 0 | H | H | H | 127 | 2 | B | H | H |
| 93 | 0 | H | H | H | 128 | 0 | A | H | A |
| 94 | 0 | B | H | H | 129 | 0 | B | H | H |
| 95 | 1 | A | H | H | 130 | 0 | H | H | A |
| 96 | 2 | H | B | H | 131 | 1 | H | B | B |
| 97 | 0 | H | H | A | 132 | 2 | H | H | H |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางผนวกที่ 1** (ต่อ)

| phenotype | | genotype | | | phenotype | | genotype | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | RM543 | RM431 | RM443 | | | RM543 | RM431 | RM443 |
| KDML105 | 6 | A | A | A | 166 | 0 | B | A | H |
| Yang mawng | 0 | B | B | B | 167 | 0 | A | B | B |
| 133 | 2 | H | H | H | 168 | 0 | B | A | A |
| 134 | 0 | B | H | H | 169 | 0 | H | A | H |
| 135 | 1 | H | H | B | 170 | 0 | B | A | H |
| 136 | 1 | B | H | A | 171 | 6 | A | A | A |
| 137 | 0 | H | B | H | 172 | 0 | A | H | H |
| 138 | 0 | H | A | H | 173 | 0 | H | B | A |
| 139 | 1 | H | B | H | 174 | 1 | H | A | H |
| 140 | 0 | H | H | A | 175 | 0 | B | H | H |
| 141 | 2 | H | H | A | 176 | 0 | H | A | A |
| 142 | 0 | A | B | B | 177 | 2 | A | H | H |
| 143 | 1 | B | B | B | 178 | 0 | B | H | A |
| 144 | 2 | B | A | A | 179 | 0 | B | H | H |
| 145 | 2 | A | B | A | 180 | 0 | H | H | A |
| 146 | 1 | A | A | H | 188 | 0 | B | H | B |
| 147 | 5 | H | A | A | 189 | 0 | A | H | H |
| 148 | 0 | B | B | H | 190 | 1 | H | H | H |
| 149 | 0 | H | A | H | 191 | 0 | A | B | A |
| 150 | 0 | H | H | A | 192 | 6 | H | A | A |
| 151 | 0 | H | A | A | 193 | 0 | B | H | A |
| 1352 | 1 | B | B | H | 194 | 0 | H | H | A |
| 153 | 3 | H | A | H | 195 | 1 | B | H | B |
| 154 | 1 | H | H | H | 196 | 0 | B | B | A |
| 155 | 1 | H | H | A | 197 | 0 | H | H | B |
| 156 | 2 | A | A | H | 198 | 1 | H | H | A |
| 157 | 1 | A | H | H | 199 | 1 | H | H | H |
| 158 | 2 | H | H | H | 200 | 1 | A | B | H |
| 159 | 2 | H | B | H | 201 | 1 | B | H | A |
| 160 | 1 | H | H | H | 202 | 1 | H | B | A |
| 161 | 3 | H | B | H | 203 | 1 | H | H | H |
| 162 | 0 | H | H | H | 204 | 1 | B | A | H |
| 163 | 1 | H | H | A | 205 | 0 | H | H | B |
| 164 | 1 | H | H | HB | 206 | 2 | H | H | H |
| 165 | 1 | H | B | | 207 | 0 | H | A | H |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางผนวกที่ 1** (ต่อ)

| phenotype | | Genotype | | | phenotype | | genotype | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | RM543 | RM431 | RM443 | | | RM543 | RM431 | RM443 |
| KDML105 | 6 | A | A | A | 218 | 1 | H | A | H |
| Yang mawng | 0 | B | B | B | 219 | 2 | H | B | B |
| 209 | 1 | A | H | H | 220 | 1 | H | A | A |
| 210 | 1 | A | H | H | 221 | 0 | H | A | H |
| 211 | 1 | H | H | B | 222 | 0 | A | A | H |
| 212 | 3 | H | H | A | 223 | 0 | H | H | H |
| 213 | 0 | H | B | H | 224 | 0 | H | H | H |
| 214 | 0 | A | A | H | 225 | 0 | H | B | A |
| 215 | 0 | H | B | H | 226 | 0 | H | A | H |
| 216 | 0 | H | H | A | 227 | 0 | H | H | H |
| 217 | 1 | H | H | A | 228 | 3 | H | A | A |

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

** A คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่, B คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ, H คือ มีผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อและแม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ประวัติผู้วิจัย

**ชื่อ-นามสกุล** นางสาวศิริพร เปรมฤทธิ์

**วัน เดือน ปีเกิด** 11 ธันวาคม พ.ศ.2533

**ที่อยู่ปัจจุบัน** 43/1 ถนน สารีบุตร-ทับยาว แขวงทับยาว เขตลาดกระบัง จ.กรุงเทพฯ 10520

ประวัติการศึกษา พ.ศ.2555 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

**ทุนวิจัยที่ได้รับ** 1. การอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง Molecular Plant Breeding : Plant Disease Resistance ภายใต้โครงการพัฒนาเครือข่ายเชี่ยวชาญด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช และการผลิตพืชและเมล็ดพันธุ์ ทุนสนับสนุนจากสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชั้นสูง (Advanced Institute of Science and Technology : THAIST)

2. โครงการวิจัย (Research Project)ประกอบการเสนอของบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 หน่วยงาน สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาด-
กระบัง

**ผลงานทางวิชาการ** 1. Siriporn PRAMRIT and Nonglak PARINTHAWONG “Identification of blast resistance gene in Yang mawng variety of Thai indigenous rice” งานประชุมวิชาการ 2nd International symposium on Agricultural Technology 1-3 กรกฎาคม 2558

2. Siriporn PRAMRIT and Nonglak PARINTHAWONG “Molecular mapping of rice blast resistance gene in Yang mawng variety of Thai indigenous rice” งานประชุมวิชาการ the 7th AG-BIO/PERDO Graduate conference on Agricultural Biotechnology & KU-UT Joint Seminar IV 8-9 ธันวาคม 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้