ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)

ปริญญา

พืชไร่ พืชไร่นา

สาขา **ภาควิชา**

เรื่อง การวิเคราะห์ตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวโดยใช้ประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 ของคู่ผสมขาวดอกมะลิ 105 x IR64

Mapping of Blast Diseases Resistance Genes in Rice using BC_2F_6 Populations of a Cross KDML105 x IR64

นามผู้วิจัย นางสาวอุษณีย์ ไวยเลิศ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธานี ศรีวงศ์ชัย, วท.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ประภา ศรีพิจิตต์, D.Agr.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ **เดือน** **พ.ศ.**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การวิเคราะห์ตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวโดยใช้ประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 ของคู่ผสมขาวดอกมะลิ 105 x IR64

Mapping of Blast Diseases Resistance Genes in Rice using BC_2F_6 Population of a Cross KDML105 x IR64

โดย

นางสาวอุษณีย์ ไวยเลิศ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)
พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุษณีย์ ไวยเลิศ 2557: การวิเคราะห์ตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวโดยใช้ประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 ของคู่ผสมขาวดอกมะลิ 105 x IR64 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่) สาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่นา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธานี ศรีวงศ์ชัย, วท.ด. 118 หน้า

ข้าวเป็นธัญพืชที่สำคัญชนิดหนึ่ง เนื่องจากประชากรมากกว่าครึ่งหนึ่งของโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก พันธุ์ข้าวไทยที่มีชื่อเสียงและได้รับความนิยมจากชาวไทยและชาวต่างประเทศ คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (Khao Dawk Mali 105) ซึ่งเป็นข้าวที่มีคุณภาพหุงต้มดีและมีกลิ่นหอม แต่ข้าวพันธุ์นี้มีลักษณะไวต่อช่วงแสง หักล้มง่าย อ่อนแอต่อโรคแมลงหลายชนิดโดยเฉพาะโรคไหม้ ในการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ IR64 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานแบบกว้างต่อเชื้อโรคไหม้ของไทย และเป็นลักษณะการต้านทานที่ควบคุมโดยยีนหลายตำแหน่ง โดยการหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธ์ IR64 นี้ใช้ประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 ของคู่ผสม KDML105 x IR64 จำนวน 192 สายพันธุ์ และประเมินศักยภาพความต้านทานโรคไหม้ของสายพันธุ์ด้วยเชื้อโรคไหม้ 6 สายพันธุ์ จากการทดสอบในสายพันธุ์ที่ต้านทานโรคไหม้พบว่ามีตำแหน่งยีนต้านทานอยู่บนโครโมโซมที่ 2, 3, 8 และ 12 โดยยีนที่วางตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 3 และ 8 เป็นตำแหน่งใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน ซึ่งตำแหน่งยีนดังกล่าวนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาพันธุ์ข้าวให้สามารถต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ได้แบบกว้างโดยใช้ข้าวพันธุ์ IR64 เป็นเชื้อพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้

_____ _____ ___/___/___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Aussanee Waiyalert 2014: Mapping of Blast Diseases Resistance Genes in Rice using BC_2F_6 Populations of a cross KDML105 x IR64. Master of Science (Agronomy), Major Field: Agronomy, Department of Agronomy. Thesis Advisor: Assistant Professor Tanee Sreewongchai, Ph.D. 118 pages.

Rice (*Oryza sativa* L.) is the most important cereal crops and more than one half of the world's populations consume rice as staple food. The Thai jasmine rice or Khao Dawk Mali 105 (KDML 105) is the most famous and popular rice variety in Thailand and many other countries. The advantage of this variety is good cooking quality with aroma. However, it is photoperiod sensitive, prone to severe lodging and susceptible to many diseases and insects. Especially, it is susceptible to blast disease. IR64 rice variety has a broad spectrum resistance to blast pathogen in Thailand. Polygenic resistance genes were identified in this variety. To confirm the location of these genes, backcross inbred line (BIL) population was developed from the cross between KDML105 and IR64. A total of 192 BC_2F_6 BIL were examined to locate the resistance gene using 6 virulent blast isolates. The study confirms the presence of broad spectrum resistance loci in IR64 variety on chromosomes 2, 3, 8 and 12. Two of the loci located on chromosome 3 and 8 are new and not reported before. These loci could be exploited for the development of broad spectrum blast diseases resistant rice varieties after being validated. Also, IR64 could be utilized as a donor of blast resistance loci to develop durable blast resistant varieties.

_____ _____ ___/___/___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ธานี ศรีวงศ์ชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร.ประภา ศรีพิจิตต์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์เฉลิมพล ภูมิไชย์ ประธานในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และ ดร.กาญจนา กล้าแข็ง ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการศึกษาการทดลอง ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นาทุกท่าน ที่ถ่ายทอดความรู้ในด้านต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งที่ผู้วิจัยจะนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์กับการดำเนินการวิจัยและจัดทำวิทยานิพนธ์ และขอขอบคุณเจ้าของผลงานวิจัยทุกท่านที่นำผลงานวิจัยของท่านมาใช้เป็นเอกสารอ้างอิงในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่สนับสนุนค่าใช้จ่ายในการเรียนระดับบัณฑิตศึกษาและการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสัมฤทธิ์ และคุณแม่ละไม้ ไวยเลิศ ญาติพี่น้องทุกท่านที่ให้กำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆและน้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือจนงานวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดี

อุษณีย์ ไวยเลิศ

พฤษภาคม 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	17
อุปกรณ์	17
วิธีการ	19
ผลและวิจารณ์	32
สรุปและข้อเสนอแนะ	61
สรุป	61
ข้อเสนอแนะ	62
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	63
ภาคผนวก	73
ภาคผนวก ก ภาพผลการทดลอง และตารางแสดงผล	74
ภาคผนวก ข ปริมาณสารเคมีที่ใช้และการเตรียมสารเคมีที่จำเป็นใน ขั้นตอนการทำ PAGE	111
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	114

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ค่าความต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ 24 สายพันธุ์ของข้าว 24 พันธุ์	36
2	จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวพันธุ์ IR64 ในการทำ PAGE	49
3	ผลการประเมินประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 ทั้งหมดด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ 4 เครื่องหมาย เปรียบเทียบกับข้อมูลความต้านทานโรคไหม้	52

ตารางผนวกที่

ก1	รายชื่อเชื้อโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่บริเวณภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือในปีเพาะปลูก 2554/2555 แยกตามพื้นที่เก็บ พันธุ์ข้าวและส่วนที่เก็บ	75
ก2	การพัฒนาประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 ของคู่ผสมระหว่าง KDML 105 x IR64	76
ก3	เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ใช้ในการทดสอบ ทั้งหมด 230 เครื่องหมาย	87
ก4	ค่าปรากฏของแถบดีเอ็นเอของประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 ที่ประเมินโดยอาศัยเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 93 เครื่องหมาย เปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อแม่	96

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนภาพแสดงการศึกษาหาตำแหน่งของยีนด้วยประชากรแบบ Chromosome Segment Substitution Line (CSSLs)	16
2	ขั้นตอนการแยกเชื้อราแบบสปอร์เดี่ยว	21
3	แผนผังแสดงขั้นตอนการดำเนินงานเป็นขั้นตอนการดำเนินการในขั้นตอนการสร้างประชากรข้าวในหัวข้อรองที่ 3. การสร้างประชากรผสมกลับเพื่อหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้	22
4	ขั้นตอนการปลูกเชื้อโรคไหม้โดยวิธีการฉีดพ่น	24
5	ลักษณะความต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ทดสอบด้วยเชื้อโรคไหม้	24
6	บริเวณพื้นที่ที่มีการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคไหม้	32
7	การเก็บรวบรวมตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคไหม้	33
8	การทดสอบความต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ทดสอบ	35
9	แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ในความต้านทานโรคไหม้ของข้าว 24 พันธุ์ และค่าดัชนีความต้านทานแบบกว้างของข้าวพันธุ์ทดสอบ	38
10	แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ในความรุนแรงของเชื้อโรคไหม้ 23 สายพันธุ์ และค่าดัชนีความรุนแรงของเชื้อโรคไหม้	40
11	แผนภาพรวมแสดงความสัมพันธ์ในความต้านทานโรคไหม้ของข้าว 192 สายพันธุ์	43
12	แผนภาพแสดงรายละเอียดความสัมพันธ์ในความต้านทานโรคไหม้ของข้าว 192 สายพันธุ์	45
13	แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ในความรุนแรงของเชื้อโรคไหม้ 6 สายพันธุ์ และค่าดัชนีความรุนแรงของเชื้อโรคไหม้	47
14	รายชื่อและตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR	49
15	แสดงตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ 4 ตำแหน่งที่พบบนโครโมโซม ที่ 2, 3, 8 และ 12	60

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
ก1	ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ใช้เป็นพันธุ์รับ (ก) และข้าวพันธุ์ IR64 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ (ข)	100
ก2	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 1	101
ก3	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 2	101
ก4	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 2	102
ก5	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 2	102
ก6	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 3	103
ก7	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 3	103
ก8	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 4	104

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่ **หน้า**

ก9 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 4 104

ก10 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 4 105

ก11 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 5 105

ก12 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 6 106

ก13 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 7 106

ก14 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 7 107

ก15 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 8 107

ก16 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 8 108

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
ก17	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 9	108
ก18	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 10	109
ก19	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 10	109
ก20	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกใช้ในการทดลองบนโครโมโซมที่ 11	110
ก21	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 11	110
ก22	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกใช้ในการทดลองบนโครโมโซมที่ 12	111
ก23	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 12	111
ก24	แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 12	112

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่ **หน้า**

ก25 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM208 ที่ให้ผลการประเมินจีโนไทป์สอดคล้องกับฟีโนไทป์มาทดสอบในประชากรทั้งหมด 111

ก26 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM85 ที่ให้ผลการประเมินจีโนไทป์สอดคล้องกับฟีโนไทป์มาทดสอบในประชากรทั้งหมด 111

ก27 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM38 ที่ให้ผลการประเมินจีโนไทป์สอดคล้องกับฟีโนไทป์มาทดสอบในประชากรทั้งหมด 111

ก28 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM179 ที่ให้ผลการประเมินจีโนไทป์สอดคล้องกับฟีโนไทป์มาทดสอบในประชากรทั้งหมด 111

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวิเคราะห์ตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวโดยใช้ประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 ของคู่ผสมขาวดอกมะลิ 105 x IR64

Mapping of Blast Diseases Resistance Genes in Rice using BC_2F_6 Population of a Cross KDML105 x IR64

คำนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก ประชากรกว่าครึ่งโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก เนื่องจากข้าวเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญ พื้นที่ทางการเกษตรของประเทศไทยส่วนใหญ่ใช้ในการปลูกข้าวไว้เพื่อบริโภคและ/หรือเพื่อการค้า ผลผลิตที่ได้มีการใช้บริโภคในประเทศและที่เหลือมีการส่งออก ทำให้ในแต่ละปีประเทศไทยมีรายได้จากการส่งออกข้าวและผลิตภัณฑ์จากข้าวกว่าแสนล้านบาท ทำให้ปริมาณข้าวที่ส่งออกของประเทศไทยเป็นอันดับต้นๆ ของโลกอย่างต่อเนื่องมากว่า 20 ปี (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) พันธุ์ข้าวไทยที่มีชื่อเสียงและได้รับความนิยมจากชาวไทยและชาวต่างประเทศ คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (Khao Dawk Mali 105) ซึ่งเป็นข้าวที่มีคุณภาพหุงต้มดี คือเมื่อหุงสุกแล้วข้าวจะนิ่มและมีกลิ่นหอม แต่ข้าวพันธุ์นี้มีลักษณะไวต่อช่วงแสง ทำให้ปลูกได้เพียงปีละหนึ่งครั้ง โดยนิยมปลูกกันมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือของประเทศ ถึงแม้ว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีคุณภาพการหุงต้มดี แต่ก็มีลักษณะด้อยหลายประการ เช่น อ่อนแอต่อโรคและแมลงหลายชนิดโดยเฉพาะโรคไหม้ (blast disease) (ลัดดาวัลย์, 2550) ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* โดยเชื้อนี้สามารถเข้าทำลายข้าวได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง เนื่องจากเชื้อราสามารถแพร่กระจายได้ง่ายโดย ลม น้ำ ดิน และส่วนของพืชหรือเมล็ด ทำให้พบการระบาดของโรคไหม้ในพันธุ์ข้าวที่อ่อนแออยู่เสมอ (วัชระ, 2534) อาการของโรคไหม้เกิดขึ้นที่ใบ แผลจะมีลักษณะคล้ายรูปกระสวย (spindle shape) โดยอาการจะเริ่มจากจุดสีน้ำตาลเล็กๆและขยายใหญ่ขึ้น ซึ่งทำให้ต้นข้าวแห้งตายในที่สุด (Tebeest *et al*., 2007) Sriboonjit and Viboonpong (2000) ได้ประเมินผลผลิตที่เสียหายของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จากโรคไหม้ในแต่ละปีพบว่ามีค่าเฉลี่ยร้อยละ 5 ของผลผลิตที่ควรจะได้รับ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ความต้านทานแบบกว้าง (broad spectrum resistance) และความต้านทานแบบยั่งยืน (durable resistance) เพื่อให้ข้าวสายพันธุ์ใหม่สามารถต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ได้เป็นระยะเวลาที่ยาวนาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้าวพันธุ์ IR64 เป็นข้าวที่มีความต้านทานแบบกว้างต่อเชื้อโรคไหม้ในประเทศต่างๆกว่า 20 ประเทศจากทวีปลาตินอเมริกา แอฟริกา และเอเชีย ในประเทศไทยพบว่าข้าวพันธุ์ IR64 มีความสามารถในการต้านทานของเชื้อโรคไหม้ของไทยได้ดี ทำให้มีการนำข้าวพันธุ์ IR64 มาใช้เป็นเชื้อพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ให้ต้านทานโรคไหม้กันอย่างแพร่หลาย (Sreewongchai *et al*., 2010) การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีมาตรฐาน (conventional breeding)โดยการผสมกลับสามารถถ่ายทอดยีนต้านทานจากข้าวพันธุ์ IR64 มายังพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์รับที่ดีได้ แต่ข้าวสายพันธุ์ใหม่ที่ได้รับการปรับปรุงสามารถต้านทานโรคไหม้ได้เพียงไม่กี่ปีหลังการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก สาเหตุมาจากความหลากหลายของเชื้อโรคไหม้ที่มีอยู่มากในประเทศไทย (Sirithunya *et al.,* 2008) จากการวิเคราะห์ Quantitative trait loci (QTL) เพื่อหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ IR64 พบว่ามีตำแหน่งเฉพาะอยู่บนโครโมโซมที่ 2 และ 12 ซึ่งมีการใช้ยีนตำแหน่งดังกล่าวสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในปัจจุบัน (Sirithunya *et al.,* 2004) ปัญหาที่พบอย่างหนึ่งของการหาตำแหน่งยีนด้วยวิธี QTL คือ พื้นฐานพันธุกรรม (genetic background) ที่ไม่สม่ำเสมอในแต่ละต้นของประชากรที่มีผลต่อการวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนที่เกี่ยวข้อง ประกอบกับมีจำนวนประชากรน้อยเกินไปที่จะตรวจหาตำแหน่งยีนให้ครบ ปัจจุบันการหาตำแหน่งยีนที่มีความแม่นยำจะนิยมใช้ประชากรแบบ backcross inbred lines (BIL) โดยเฉพาะประชากรมีลักษณะเป็น chromosome segment substitution lines (CSSL) ซึ่งนอกจากจะสามารถระบุตำแหน่งยีนได้อย่างมีประสิทธิภาพแล้วยังสามารถตรวจสอบปฏิกิริยาของยีนระหว่างตำแหน่ง และตรวจหาอิทธิพลของยีนที่แสดงออกน้อย (minor gene)ได้ในประชากรที่มี genetic background ที่เหมือนกัน (Fakuoka *et al.,* 2010) การวิเคราะห์ตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ IR64 ด้วยประชากร BIL นี้จะสามารถนำข้อมูลตำแหน่งยีนและเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับยีนดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้อย่างกว้างได้มากกว่าตำแหน่งที่เคยใช้อยู่ในปัจจุบัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ IR64 โดยใช้ประชากรที่เป็น backcross inbred lines (BIL)

2. เพื่อหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง (broad spectrum resistance)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

ข้าว

ลักษณะทั่วไปของข้าว

ข้าว (rice) เป็นพืชผสมตัวเองจัดอยู่ในวงศ์ (family) Gramineae สกุล (genus) *Oryza* ซึ่งประกอบด้วยข้าวป่า 24 ชนิด (species) ชนิดที่สำคัญได้แก่ *O. spontanea O. perennis O. officinalis* และ *O. nivara* และข้าวปลูก 2 ชนิดได้แก่ *O. sativa* และ *O. glaberrima* (ประพาส, 2531; Chang, 1976)

O. sativa ปลูกกันทั่วไปทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่นของโลกมีอยู่ 3 กลุ่ม คือ 1) ข้าว japonica ซึ่งเป็นข้าวที่มีลำต้นเตี้ยใบตั้งและสั้น เมล็ดป้อม นิยมปลูกในประเทศจีน เกาหลี และญี่ปุ่น 2) ข้าว indica เป็นข้าวต้นสูง เมล็ดยาว มีใบมากและโค้งงอ นิยมปลูกในประเทศไทย จีน ลาว เวียดนาม กัมพูชา และฟิลิปปินส์ และ 3) ข้าว tropical japonica มีลักษณะต้นสูง รวงยาว เมล็ดป้อมใหญ่ ให้ผลผลิตต่ำ ปลูกเฉพาะในประเทศฟิลิปปินส์และอินโดนิเซียเท่านั้น ส่วน *O. glaberrima* มีปลูกเฉพาะในทวีปแอฟริกาเท่านั้น (Chang, 1976)

ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวปลูกชนิด *O. sativa* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม indica มีชื่อเดิมว่า ขาวดอกมะลิ 4-2-105 (กรมวิชาการเกษตร, 2539) เป็นข้าวเจ้าพันธุ์พื้นเมือง ที่นายสุนทร สีหะเนิน พนักงานเกษตรรวบรวมจากอำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา เมื่อ พ.ศ. 2493-2494 จำนวน 199 รวง แล้วนำไปคัดเลือกแบบคัดพันธุ์บริสุทธิ์ (pure line selection) จากนั้นจึงมีการพิจารณารับรองพันธุ์และปลูกขยายในปี พ.ศ. 2502 (กรมการข้าว, 2538)

ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีความสูงของต้นเฉลี่ยประมาณ 140 เซนติเมตร มีสีเขียวจาง ใบเรียวยาวค่อนข้างแคบ ฟางอ่อน ใบธงทำมุมกว้างกับคอรวง เมล็ดรูปร่างเรียวยาว ข้าวเปลือกสีฟาง อายุเก็บเกี่ยวประมาณวันที่ 25 พฤศจิกายน มีระยะพักตัวของเมล็ดประมาณ 8 สัปดาห์ มีขนาดเมล็ดข้าวกล้อง 2.1 x 7.5 x 1.8 มิลลิเมตร ปริมาณแป้งอะมิโลส 12-17 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิตเฉลี่ย 499 กิโลกรัมต่อไร่ (กรมการข้าว, 2551) มีคุณภาพหุงต้มดี เมล็ดข้าวสุกเหนียวนุ่มและมีกลิ่นหอม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มีวิตามินบี 1 และ บี 2 เท่ากับ 21.2 และ 6.4 ไมโครกรัม มีกรดอะมิโนไลซีน 1.3 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 9.5 เปอร์เซ็นต์ ข้อด้อยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 คือ ผลผลิตค่อนข้างต่ำ ไม่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง โรคไหม้ โรคจู๋ และโรคใบหงิก ไม่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยจักจั่นสีเขียว และหนอนกอ และเป็นข้าวไวต่อช่วงแสงทำให้สามารถเพาะปลูกได้เพียงปีละ 1 ครั้งในช่วงฤดูนาปี (วาสนา, 2538)

ข้าวพันธุ์ IR64

ข้าวพันธุ์ IR64 เป็นข้าวพันธุ์ปรับปรุง มีลักษณะทางการเกษตรที่ดี เช่น ผลผลิตสูง ลักษณะทรงต้นเตี้ยและแข็งแรง ทนทานต่อโรคแมลง เมื่อนำมาปลูกในประเทศไทยมีข้อจำกัดคือ คุณภาพเมล็ดทางกายภาพที่ยังไม่ดีพอ เมล็ดข้าวมีท้องไข่มาก ขนาดเมล็ดสั้นกว่ามาตรฐานข้าวไทย ด้วยเหตุนี้จึงนิยมนำข้าวพันธุ์ IR64 ใช้เป็นเชื้อพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ (กรมวิชาการเกษตร, 2546) Sreewongchai *et al*. (2010) พบว่า ข้าวพันธุ์ IR64 เป็นพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะความต้านทานโรคแบบกว้าง ต่อเชื้อโรคไหม้ โดยยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ IR64 นั้นวางตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 2 และ 12 โดยอยู่ใกล้กับโมเลกุลเครื่องหมาย RM208 และ RM179 ตามลำดับ โดยยีนที่อยู่บนโครโมโซมที่ 12 เป็นยีนหลัก (major gene) ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะที่ต้องการ (maker assisted selection, MAS) ได้

โรคไหม้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

โรคไหม้มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* เป็นโรคสำคัญที่เข้าทำลายข้าวในพื้นที่ปลูกทั่วโลก พบว่าความสูญเสียของผลผลิตจะเกิดขึ้นได้อย่างรุนแรงในเขตสภาพพื้นที่ที่มีอากาศหนาวเย็นและเป็นเขตพื้นที่สูง เนื่องจากเป็นสภาพที่เหมาะสมกับการเข้าทำลายของโรคนี้ ซึ่งอุณหภูมิต่ำและความชื้นเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการเข้าทำลายของเชื้อโรคได้มากขึ้น (Sun *et al*., 1999) โดยในสภาพดังกล่าวมีการสำรวจพบการเกิดโรคได้มาก วิธีการในการควบคุมโรคไหม้จะใช้สารเคมี (blast-specific fungicides) ในการควบคุมและใช้พันธุ์ข้าวที่มีความต้านทาน (Ziegler *et al*., 1998)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เชื้อรา *Pyricularia oryzae* จัดเป็นราชั้นสูง ซึ่งอยู่ใน deuteromycotina เป็น anamorph phase (imperfect stage) ซึ่งมีการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ (asexual reproduction) เมื่อเชื้อนี้เป็น teleomorph phase (perfect stage) จะเรียกว่า *Magnaporthe oryzae* ซึ่งจัดอยู่ใน ascomycotina ซึ่งเป็นระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ (sexual reproduction) โดยในประเทศไทยจะไม่พบเชื้อราในกลุ่ม ascomycotina เนื่องจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะเกิดขึ้นได้ในสภาพธรรมชาติที่มีความเหมาะสมหรือได้รับการกระตุ้นภายในห้องปฏิบัติการ คือ สภาพอุณหภูมิต่ำเป็นระยะเวลานานต่อเนื่องกัน

ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อรา *P. oryzae* มีโครงสร้างที่เรียกว่า conidiophores เป็นเส้นใยตรงและเรียบ สีน้ำตาลอ่อน มีการสร้างสปอร์ที่เรียกว่า conidia โดยที่บริเวณด้านล่างมีส่วนที่เรียกว่า basal hilum ยื่นออกมาเพื่อใช้ยึดติดกับ sterigma ซึ่งเป็นบริเวณที่ใช้สร้าง conidia โครงสร้างของconidia จะมี 3 เซลล์ มีผนังที่เรียกว่า septate กั้นอยู่ 2 ผนัง รูปร่างค่อนข้างยาวรี หัวแหลม ท้ายแหลม เซลล์ตรงกลางจะมีลักษณะกว้างสีน้ำตาลซีดกว่าเซลล์ทั้งสองที่บริเวณหัวท้าย โดย conidia มีขนาดประมาณ 8^{-10} x 19^{-27} นาโนเมตร (Sharma, 2005)

ลักษณะอาการ การเข้าทำลาย และการแพร่ระบาดของโรคไหม้

เชื้อราเป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคข้าวหลายชนิด เชื้อราสามารถแพร่กระจายโดยลม น้ำ ดิน ชิ้นส่วนของพืชหรือเมล็ด และสภาพแวดล้อมรวมทั้งความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญแพร่พันธุ์เกือบตลอดปี (Agrios, 1988) โรคข้าวที่เกิดจากเชื้อราและมีความสำคัญต่อการปลูกข้าวของไทย ได้แก่ โรคไหม้ โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคใบขีดสีน้ำตาล โรคกาบใบเน่า โรคกาบใบแห้งและโรคเมล็ดด่าง ซึ่งโรคไหม้เป็นโรคที่สำคัญและระบาดมากในการปลูกข้าวของไทย (ทัศนีย์, 2540) และเป็นโรคที่สำคัญในการเพาะปลูกข้าวทั่วโลก พบการระบาดได้ทั่วโลก (Noriguni, 2006) โดยจะมีความรุนแรงในแหล่งปลูกข้าวที่มีความชื้นสูง ความอุดมสมบูรณ์ดี เช่น ในเขตพื้นที่ชลประทาน ที่มีการทำนาหว่านน้ำตม โดยใช้อัตราเมล็ดพันธุ์ที่มีจำนวนสูงกว่าปกติ การใช้ปุ๋ยที่มากเกินไป หรือการปลูกข้าวไร่

เชื้อราจะเข้าทำลายข้าวได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงออกรวง เชื้อสามารถเข้าทำลายทุกส่วนของต้นข้าวที่อยู่เหนือดิน ในระยะกล้าและแตกกอเชื้อจะเข้าทำลายใบข้าวทำให้เกิดเป็นจุดสีน้ำตาลเล็กๆในระยะแรก ต่อมาจะขยายใหญ่ขึ้นตรงกลางแผลมีสีเทา ในพันธุ์ข้าวที่ไม่ต้านทาน แผลจะมีรูปร่างเรียวยาวคล้ายรูปกระสวย ตรงกลางแผลมีสีเทา ขอบแผลมีสีน้ำตาลขนาดของแผลยาว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประมาณ 10-15 มิลลิเมตร กว้างประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ลักษณะของแผลอาจเปลี่ยนแปลงไปได้ตามสภาพแวดล้อมและอายุของแผล ถ้าความรุนแรงมีมากแผลจะขยายใหญ่ขึ้นติดต่อกันทำให้ใบข้าวไหม้และแห้งตายได้ ถ้าเชื้อเข้าทำลายข้าวในระยะออกรวงแล้ว เชื้อจะเข้าทำลายบริเวณคอรวงจะทำให้รวงข้าวขาวและแห้งตายในที่สุด (วัชระ, 2534)

วงจรการเข้าทำลายและการระบาดของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

การเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ ในระยะแรกจะเกิดขึ้นหลังจากโคนิเดีย สัมผัสกับผิวพืชโดยใช้ส่วนที่เรียกว่า “spore tip mucilage” ซึ่งอยู่บริเวณปลายสุดของโคนิเดีย โดยมีน้ำที่ให้ความชื้นอย่างเพียงพอกระตุ้นให้เกิดการงอก และพบว่าการงอกของโคนิเดียจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยจะเกิดขึ้นภายในชั่วโมงแรกของการที่เชื้อเข้าสัมผัสกับพืช (Kang *et al*., 2000) และจะสร้าง appressorium และ infection peg เพื่อแทงทะลุผ่าน cuticle และ epidermis หรืออาจจะเข้าไปทางปากใบ (stomata) ก็ได้ หลังจากนั้นเส้นใยจะเจริญอยู่ในเซลล์พืชมากมาย และสร้างโคนิเดียต่อไป ซึ่งโคนิเดียจะเริ่มสร้างหลังจากเชื้อเข้าไปแล้วประมาน 6 วัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ลักษณะอาการจะเริ่มจากเป็นจุดสีน้ำตาลเล็กๆและขยายใหญ่ขึ้น ต่อมาแผลจะลุกลามเชื่อมต่อกันเป็นแผลไหม้ ทำให้เนื้อเยื่อตาย (necrosis) ในที่สุด (ชวาลา, 2531)

เซลล์ของข้าวพันธุ์ต้านทานโรคที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะมีการตอบสนองอย่างรวดเร็วต่อเชื้อ โดยจะสร้างถุง (granules) สีน้ำตาลหรือสารที่มีลักษณะคล้ายเรซินขึ้นมา ทำให้เส้นใยของเชื้อราไม่สามารถเจริญต่อไปได้ (Kawamura and Ono, 1948) ในขณะที่พันธุ์ข้าวอ่อนแอจะมีการตอบสนองของเซลล์ช้ากว่าทำให้เส้นใยของเชื้อราเจริญได้อย่างอิสระ Ou (1972) รายงานว่า เมื่อโคนิเดียตกลงบนส่วนของพืชในสภาพที่เหมาะสมภายใน 4 ชั่วโมง โคนิเดียจะงอกและเข้าสู่พืชในเวลา 8-10 ชั่วโมง และแผลจะเริ่มปรากฏภายใน 4-5 วัน โคนิเดียจะถูกสร้างขึ้นใหม่ภายใน 6-7 วัน ถ้าแผลขนาดใหญ่จะผลิตโคนิเดีย จำนวน 2,000-6,000 โคนิเดียต่อคืนและสามารถผลิตต่อเนื่องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในขณะที่แผลขนาดเล็กจะผลิตได้เพียง 50-300 โคนิเดียต่อคืนเป็นเวลา 5-7 วัน ในขณะที่มีน้ำค้างหรือมีฝนตกโคนิเดียจะถูกปลดปล่อยในช่วงเวลากลางคืนเป็นจำนวนมาก

เชื้อราจะเข้าทำลายต้นข้าวในระยะแรกเรียกว่า primary inoculum นอกจากนี้เชื้อรายังสามารถอยู่ข้ามฤดูหนึ่งไปยังฤดูถัดไปได้บนพืชที่เป็นโรค และวัชพืชบางอย่างสามารถเป็น alternate host ได้ดี รวมทั้งเมล็ดข้าวที่ตกหล่นในลักษณะเส้นใยติดไปกับเมล็ด (seed borne) หรืออาจจะตกค้างอยู่กับเศษซากพืช (debris borne) ได้แก่ ฟางข้าวและตอซัง อีกทั้งยังพบว่าเชื้อรานี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สามารถเข้าทำลายพืชตระกูลหญ้าชนิดต่าง ๆ ได้อย่างน้อย 50 ชนิดและพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ ได้แก่ ข้าว ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลีและข้าวฟ่าง (Zeigler, 1998) เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อเชื้อที่ฟักตัวอยู่จะเจริญเติบโตเป็น secondary inoculum เข้าทำลายพืชอาศัยต่อไป ด้วยเหตุนี้เองจึงทำให้การแพร่ระบาดของโรคไหม้ในข้าวรุนแรงและต่อเนื่องตลอดทั้งปี

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคไหม้ในข้าวมีความชื้นอยู่ในช่วงระยะเวลาที่ยาวนาน ความชื้นสัมพัทธ์สูง มีลมไม่มาก ในเวลากลางคืนอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 22-28 องศาเซลเซียส ใบที่เปียกน้ำค้างมีส่วนช่วยให้เกิดการเข้าทำลายได้ดีขึ้น การสร้างโคนิเดีย และปลดปล่อยโคนิเดีย เกิดขึ้นภายใต้ความชื้นสัมพัทธ์สูง และจะไม่สร้างโคนิเดียหากความชื้นสัมพัทธ์ต่ำกว่า 89 เปอร์เซ็นต์ และมีการสร้างโคนิเดียเพิ่มขึ้นเมื่อความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 93 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกของโคนิเดียและการเกิดแผล คือ 28 องศาเซลเซียส นอกจากนี้อาหารสังเคราะห์ยังเป็นปัจจัยที่สำคัญที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *P. oryzae* ได้ดี เนื่องจากเชื้อสาเหตุนี้สามารถเจริญได้บนฟางข้าวหรือเมล็ดข้าวได้และสารอาหารที่มีอยู่ในแป้งข้าวมีส่วนสำคัญในการเจริญเติบโตของเชื้อนี้ด้วย (Ou, 1985)

เครื่องหมายดีเอ็นเอกับการปรับปรุงพันธุ์พืช

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) คือลำดับเบสช่วงหนึ่งบนโครโมโซมซึ่งบ่งบอกตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งบนโครโมโซมที่ตรวจสอบได้และสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกหลานได้ จึงมีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชในหลาย ๆ ด้าน (McCouch and Tankslay, 1991) เช่น ใช้ในการแยกสายพันธุ์พืช (varietals identification) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ การทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) และการบ่งชี้ตำแหน่งของยีน (gene tagging) การศึกษาลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait loci: QTL) เพื่อทำการวิเคราะห์ QTL mapping ที่ทำให้ทราบตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของลักษณะทางปริมาณว่าวางตัวอยู่บนโครโมโซมใดและมีผลต่อการแสดงออกของลักษณะนั้นมากน้อยเพียงใด เมื่อทราบตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้ยีนนั้นสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือก (marker-assisted selection; MAS) เพื่อลดขั้นตอนการในการคัดเลือกพันธุ์พืชโดยไม่ต้องรอคัดเลือกจากการแสดงออกของลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์ตลอดจนสามารถร่นระยะเวลาและลดค่าใช้จ่าย (อภิชาต และ คณะ, 2544) และมีการเสนอวิธีการคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอให้เป็นไปอย่างรวดเร็วเพื่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประโยชน์ต่อการใช้งาน เช่น การวิเคราะห์จากสายพันธุ์คู่แฝด (NIL) เพื่อหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ได้รับการถ่ายทอดจากสายพันธุ์ให้ (recurrent parent) (Kaeppler *et al*., 1993)

Microsatellite หรือ Simple Sequence Repeats (SSR) หรือ Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้หลักการของการกระจายตัวของเบสซ้ำที่มีในสิ่งมีชีวิตที่เกิดจากความแตกต่างของจำนวนชุดของลำดับเบสสั้น ๆ ที่มีนิวคลีโอไทด์ซ้ำ ๆ กัน (simple sequence repeat) เพียง 1-4 คู่เบสหรือไม่เกิน 10 คู่เบส โดย polymorphism ที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลเนื่องมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeat) โดยทั่วไปเบสซ้ำเหล่านี้มักมีลำดับเบสที่จำเพาะ (unique sequences) อยู่บริเวณรอบ ๆ เบสซ้ำต่อเนื่อง จากลักษณะเฉพาะนี้สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้โดยการออกแบบ primer ที่สามารถเข้าคู่กับเบสจำเพาะ จากนั้นใช้หลักการของ PCR เพื่อเพิ่มขยายชิ้นส่วนของ DNA ในตำแหน่งนั้น ๆ ปัจจุบันนิยมใช้ microsatellite marker ในการศึกษาแผนที่ของจีโนมและใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต (สุรินทร์, 2545) ทั้งนี้เพราะ microsatellite มีอยู่จำนวนมหาศาลและมีขนาดความแปรรวนมาก คือ จำนวนซ้ำของหน่วย microsatellite มีความแตกต่างกันในพืชหรือสัตว์ต่างสายพันธุ์ในสปีชีส์เดียวกันจึงสามารถใช้ประโยชน์เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้อย่างดี (อรรัตน์, 2548) ข้อดีของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้คือ ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากและ polymorphic สูง บางชนิดจัดเป็น codominant marker สามารถจำแนกสิ่งมีชีวิตที่เป็น homozygous และ heterozygous ออกจากกันได้ จำนวน primer ที่ใช้มีมาก และเนื่องจากอาศัย PCR จึงใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นในปริมาณน้อย นอกจากนี้การแลกเปลี่ยนข้อมูลลำดับเบสของ primer ระหว่างนักวิจัยทำได้ง่าย จึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการศึกษาเกี่ยวกับแผนที่โครโมโซมและพันธุศาสตร์ประชากรได้ (สุรีพร, 2546)

การวิเคราะห์ตำแหน่งยีน

การสร้างแผนที่จีโนม (genome mapping) ในการหาตำแหน่งของยีน หรือการหาตำแหน่งของ QTL นั้นสามารถหาได้โดยการเปรียบเทียบข้อมูลจีโนไทป์ (genotypic data) ของแต่ละเครื่องหมายโมเลกุลกับข้อมูลฟีโนไทป์ (phenotypic data) ของลักษณะที่สนใจ วิธีการหาสามารถทำได้ 2 วิธี โดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ คือ วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of various) และวิธีการวิเคราะห์สมการถดถอย (regression analysis) ในปัจจุบันมีการพัฒนาโปรแกรมสำเร็จรูปเพื่อใช้ในการวิเคราะห์มากมาย เช่น โปรแกรม MAPMAKER , WinQTLcart 2.5 และ NQTL เป็นต้น ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนนั้นจะเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความใกล้ชิดกับ QTLs หรือยีนที่เราทำการศึกษา เมื่อหาตำแหน่งของยีนได้แล้วหลังจากนั้นอาจมีการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แยกสกัดตัวยีนออกมาในภายหลังโดยที่เครื่องหมายโมเลกุลที่นำมาใช้หาตำแหน่งยีน หรือ QTLs นี้มีหลายชนิด ซึ่งสามารถเลือกใช้ให้เหมาะสมกับงานได้ (อรรัตน์, 2548)

การเลือกประชากรสำหรับการสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมเกี่ยวข้องกับการเลือกพ่อ และแม่ของประชากร วิธีการผสม และชนิดของเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ ซึ่งขึ้นกับวัตถุประสงค์ของงานเช่นในการหาตำแหน่งของยีน หรือ QTLs ที่มีค่าการถ่ายทอดทางพันธุกรรมต่ำและมีความซับซ้อนจะนิยมใช้ประชากรที่เป็นสายพันธุ์แท้ ได้แก่ doubled haploid และ recombinant inbred lines เนื่องจากมีข้อจำกัดของชนิดเครื่องหมายโมเลกุลน้อย นอกจากนี้ในการเลือกพ่อแม่เพื่อใช้ในการสร้างประชากรจะต้องเลือกให้มีความแตกต่างกันในลักษณะที่เราสนใจทั้งในทางลำดับเบส และลักษณะที่แสดงออก ประชากรที่ใช้สร้างแผนที่นี้ต้องเป็นประชากรที่มีกระจายตัวของลักษณะที่สนใจ โดยแบ่งประชากรออกเป็น 4 ประเภท ดังนี้

1. ประชากร doubled haploid ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์แท้สองสายพันธุ์ เมื่อได้ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) จากนั้นก็นำละอองเกสรหรือ embryo ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมแบบ haploid มาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แล้วใส่สาร cholchicine เพื่อชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมขึ้นเป็นสองเท่า ซึ่งเราเรียกต้นพืชแบบนี้ว่า doubled haploid โดยต้นพืชที่ได้จะมียีนในทุกตำแหน่งเป็นแบบ homozygous ดังนั้นอัตราส่วนการกระจายตัวของยีนจึงเป็นแบบ 1: 1 (AA : aa)

2. ประชากรของลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์แท้สองสายพันธุ์ เมื่อได้ลูกผสมชั่วที่ 1 จากนั้นปล่อยให้เกิดการผสมตัวเองได้ลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) ซึ่งประชากรที่ได้จะมีการกระจายตัวของยีนสูงสุด และมีเปอร์เซ็นต์ของ heterozygosity สูงถึงร้อยละ 50 อัตราส่วนการกระจายตัวของยีนเป็นแบบ 1: 2: 1 (AA : Aa : aa)

3. ประชากรของลูกผสมกลับ (backcross) ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์แท้สองสายพันธุ์ เมื่อได้ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) นำมาผสมกลับไปยังต้นพ่อหรือแม่อีกครั้ง ลูกที่ได้เรียกว่า ลูกผสมกลับชั่วที่ 1ซึ่งประชากรของลูกผสมกลับนี้จะมีอัตราส่วนการกระจายตัวของยีนเป็น 1: 1 (Aa : aa)

4. ประชากรของ recombinant inbred lines (RILs) ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์แท้สองสายพันธุ์ เมื่อได้ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) จากนั้นปล่อยให้เกิดการผสมตัวเองในแต่ละชั่วจนกระทั่งยีนทั้งหมดไม่มีการกระจายตัวอีกต่อไป โดยปกติจะใช้ตั้งแต่ประชากรชั่วที่ 7 ซึ่งมีการกระจายตัว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของยีนในอัตราส่วน 1: 1 (AA : aa) แต่ในบางครั้งอาจพบว่ายีนบางตัวจะยังมีการกระจายตัวอยู่ (Collard *et al*., 2005)

ยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าว

ปัจจุบันนี้พบว่ายีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวมีมากกว่า 70 ยีน และมี quantitative trait loci (QTL) ที่ต้านทานโรคไหม้มากกว่า 347 QTL (Ballini *et a*l., 2008; Koide *et al*., 2009) โดยยีนต้านทานต่อโรคไหม้ในข้าวจะแสดงออก 2 แบบ คือ complete resistance (qualitative) และ partial resistance (quantitative)

qualitative หรือ complete dominant resistance มีปฏิกิริยาของยีนแบบ hypersensitive reaction (HR) มีสาเหตุมาจากการรวมตัวกันของยีนต้านทานโรคพืชและยีนก่อโรคของเชื้อที่เป็นแบบ incompatibility ซึ่งความต้านทานโรคส่วนใหญ่จะถูกควบคุมโดยยีนหลัก (major gene) (Kiyosawa, 1981; McCouch *et al*., 1994; Nguyen *et al*., 2006) ซึ่งให้ความต้านทานที่เป็นแบบ complete resistance ซึ่งมีการนำไปใช้เป็นแหล่งความต้านทานในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามพันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานแบบ complete resistance นี้มักใช้เป็นแหล่งความต้านทานได้เพียงไม่กี่ปีหลังจากที่ใช้เป็นพันธุ์ปลูก เนื่องจากเชื้อราสาเหตุอาจเกิดการกลายพันธุ์ทำให้สามารถทำลายความต้านทานโรคของพืชได้ทำให้พันธุ์ต้านทานกลายเป็นพันธุ์อ่อนแอได้ (Bonman *et al*., 1992; Fukuoka and Okuno, 2001)

quantitative resistance (QR) หรือ partial หรือ field resistance โดยปกติความต้านทานนี้จะเป็นแบบ non-race specific และถูกควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง (polygene) สามารถต้านทานเชื้อสาเหตุได้หลายสายพันธุ์ แต่จะนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้ยากกว่าความต้านทานแบบ complete resistance เนื่องจากถูกควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง ดังนั้นความต้านทานที่แสดงออกจึงเป็นผลมาจากยีนหลายตัวรวมกัน (Bonman *et al*., 1992) นอกจากนี้สภาพแวดล้อมยังส่งผลต่อลักษณะความต้านทานได้ เช่น อุณหภูมิ ปริมาณการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ชนิดของดินและ ความชื้นของใบ ยีนควบคุมความต้านทานแบบ quantitative ได้มีรายงานว่าอยู่บนโครโมโซมต่างๆของข้าว โดยมีแหล่งของความต้านทานมาจากพันธุ์ข้าวต่าง ๆ และพบว่ามีทั้งยีนที่ต้านทานต่อโรคไหม้ที่ใบและที่คอรวงหรือช่อดอกของข้าว (Wang *et al*., 1994; Prashanth *et al*., 2000; Fukuoka and Okuno, 2001; Miyamoto *et al*., 2001; Tabien *et al*., 2002; Ballini *et al*., 2008; Koide *et al*., 2009)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การศึกษายีนควบคุมความต้านทานโรคไหม้ในประเทศไทย

จากการศึกษาของอภิชาติ (2540) พบว่ามี QTL อย่างน้อย 2 ตำแหน่ง เป็นตัวกำหนดความต้านทานโรคไหม้ซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 7 และ 9 โดยมีตำแหน่งอยู่ใกล้กับยีน *Pi-i* และ *Pi-ta* นอกจากนั้นยังพบ QTL จำนวนอย่างน้อย 4 ตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 4, 5, 6 และ 11 ซึ่งมีผลต่อความต้านทานจำเพาะต่อเชื้อบางสายพันธุ์เท่านั้น จากการสืบหาตำแหน่ง QTL ของความต้านทานโรคไหม้คอรวง (neck blast) ในประชากรเดียวกัน พบว่าตำแหน่งของ QTL แตกต่างไปจาก QTL ของความต้านทานโรคใบไหม้ และอยู่บนโครโมโซมที่ 5 และ 6 ดังนั้นจึงชี้ให้เห็นว่าพื้นฐานของความต้านทานโรคทั้งสองนั้นแตกต่างกัน และมีผลต่อความยุ่งยากในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอเช่นพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานต่อโรคทั้งสอง ผลจากความรู้เรื่องตำแหน่งของยีนดังกล่าว สามารถนำไปพัฒนาระบบการคัดเลือกพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลได้

Sreewongchai *et al*. (2010) พบว่า ข้าวพันธุ์ IR64 เป็นพันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้แบบกว้าง ยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ IR64 นั้นวางตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 2 และ 12 โดยอยู่ใกล้กับเครื่องหมายโมเลกุล RM208 และ RM179 ตามลำดับ ทั้งนี้ยีนที่อยู่บนโครโมโซมที่ 12 เป็นยีนหลัก (major gene) ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะที่ต้องการ (maker assisted selection, MAS) ได้

อภิชาติ และคณะ (2553) ได้วิเคราะห์หาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้โดยวิธี quantitative trait loci (QTL) และพบว่ามียีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล ซึ่งวางตัวอยู่บนโครโมโซม 1 และ 11 โดยอยู่ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล RM212 - RM319 และ RM139 – RM144 ตามลำดับ โดยยีนที่อยู่บนโครโมโซมที่ 11 เป็นยีนหลัก และมีการใช้ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิลเป็นเชื้อพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ต้านทานโรคไหม้อยู่ในปัจจุบัน (Sreewongchai *et al*., 2010)

Li *et al*. (2008) ได้หาตำแหน่งยีน *Pi20 (t)* ที่ให้ความต้านทานต่อโรคไหม้ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR ในการหาตำแหน่งยีน ซึ่งการศึกษานี้ใช้ประชากรที่เป็น RILs จำนวน 71 สายพันธุ์ ที่ได้จากคู่ผสม Asominori (susceptible) x IR24 (resistance) และประเมินความต้านทานกับเชื้อ *M. grisae* จำนวน 160 สายพันธุ์ของจีน พบว่ายีนดังกล่าวสามารถให้ความต้านทานแบบ board spectrumโดยที่ Imbe *et al*. (1997) ได้เคยรายงานตำแหน่งของยีน *Pi20 (t)* นี้ที่โครโมโซม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

12 โดยมีเครื่องหมาย RFLP ที่เป็น flanking marker คือ XNpb402 และ XNpb88 ในการศึกษาของ Li *et al*.(2008) เพื่อหา SSR marker ที่เกิด polymorphic ในบริเวณ region นี้พบว่ามี 9 SSR markers เมื่อนำมาสร้าง linkage mapping พบว่ามี 5 markers ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีน *Pi20 (t)* ซึ่งอยู่ใกล้กับบริเวณcentromere โดยมีเครื่องหมาย ORS32 (0.2 cM) และ RM28050 (0.4 cM) เป็น flanking marker และเครื่องหมาย RM1337, RM5364 และ RM7102 ที่เป็นเครื่องหมายที่ co-segregated กับยีน

Noenplab *et al*. (2006) ได้สร้าง QTL mapping ของลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้และไหม้คอรวงในประชากร RILs จำนวน 587 สายพันธุ์ ที่ได้จากคู่ผสมระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่อ่อนแอต่อโรคกับพันธุ์เจ้าหอมนิลที่มีความต้านทานต่อโรค ประเมินความต้านทานโรคด้วยเชื้อ THL191, THL318และ THL899 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมในประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล 127 เครื่องหมายได้แก่ SSLPs 99 เครื่องหมาย, SSCPs 2 เครื่องหมาย, STSs 3 เครื่องหมาย, RGAPs 7 เครื่องหมาย และ SSR 16 เครื่องหมาย ใช้โปรแกรม MapMaker/QTL software ในการหาทำแผนที่พันธุกรรมและใช้โปรแกรม NQTL ในการหาตำแหน่ง QTL พบว่ามีจำนวน QTL 14กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อโรคใบไหม้ในข้าว

Prasad *et al*. (2009) ได้หาตำแหน่งยีน *Pi-1(t)* ที่ควบคุมความต้านทานต่อโรคไหม้ ซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 11 โดยใช้ประชากรลูกชั่วที่ 2 จำนวน 184 สายพันธุ์ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์Samba mahsuri (BPT5204) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีคุณภาพดี แต่อ่อนแอต่อโรค ผสมกับพันธุ์ C101LAC ซึ่งมียีน *Pi-1(t)* เมื่อทำการสร้างแผนที่พันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม Win QTLCartographer พบว่าเครื่องหมาย RM224 วางตัวอยู่ชิดกับยีน (linked marker) *Pi-1(t)* และจากการศึกษาของ Fuentes *et al*. (2008) ที่หาตำแหน่งของยีน *Pi-1(t)* ของข้าวพันธุ์ C101LAC โดยใช้วิธีการ BSA ซึ่งพบว่ามีเครื่องหมาย SSR จำนวน 5 เครื่องหมายซึ่งวางตัวอยู่ชิดกับยีน *Pi-1(t)* โดยเครื่องหมาย RM1233*I และ RM224 วางตัวอยู่ห่างจากยีน *Pi-1(t)* 0.0 cM

ตำแหน่งยีนต้านทานโรคสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานโรคได้ ซึ่งในการใช้พันธุกรรมต้านทานโรคหรือการใช้ยีนต้านทานโรคในพืชเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการควบคุมโรคพืช ดังนั้นจึงมีผู้พยายามศึกษาเกี่ยวกับตำแหน่งของยีนว่ามีเครื่องหมายโมเลกุลใดอยู่ใกล้ชิดกับยีน (marker linked) เพื่อที่จะนำเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนนั้นๆ มาใช้ในการคัดเลือกต้นที่มีความต้านทานโรคในแผนการปรับปรุงพันธุ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวิเคราะห์ตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะเชิงปริมาณ (Quantitative trait loci)

ลักษณะที่พืชแสดงออก (phenotype) เกิดจากพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะนั้นๆซึ่งสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ และอิทธิพลของสภาพแวดล้อมซึ่งมีความสำคัญต่อการแสดงออกของพืชเช่นกัน แต่ไม่สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ (กฤษฎา, 2546) ลักษณะที่มีความสำคัญทางพืชไร่หลายประการเช่น ผลผลิต องค์ประกอบของผลผลิต (จำนวนเมล็ด น้ำหนักเมล็ด) ความสูงของต้น และวันออกดอก จะถูกควบคุมด้วยยีนหลายตัว (polygene) และมีปฏิกิริยาสัมพันธ์กับสภาพแวดล้อมเรียกลักษณะเหล่านี้ว่า ลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait) จำนวนยีนและผลร่วมระหว่างการทำงานของยีนจะควบคุมการแสดงออกลักษณะทางปริมาณหลาย ๆ ลักษณะซึ่งถูกจำแนกโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) การทำแผนที่พันธุกรรม (genetic map) โดยใช้การกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุลบนส่วนต่าง ๆ ของโครโมโซมในประชากรกับลักษณะฟีโนไทป์ที่สนใจในประชากรทำให้สามารถหา linkage ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะที่สนใจได้

ลักษณะที่ปรากฏส่วนใหญ่จะเป็นลักษณะทางปริมาณที่มียีนหลายตัว (polygene) การควบคุมการแสดงออกของลักษณะและสภาพแวดล้อมมีผลต่อการแสดงออกของลักษณะสูง การทำ QTL mapping จะทำให้ทราบตำแหน่งของยีนแต่ละตัวว่าวางตัวอยู่บนโครโมโซมใด และมีผลต่อการแสดงออกของลักษณะนั้นอย่างไร เมื่อทราบตำแหน่งของยีนแต่ละยีนแล้วจะทำให้สามารถนำเครื่องหมายดีเอ็นเอนั้นมาใช้ช่วยในการคัดเลือกต่อไป

การวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนด้วยวิธี Quantitative Traits Loci (QTL) analysis

พื้นฐานของการวิเคราะห์ QTL เป็นการประยุกต์ใช้ประโยชน์เพื่อพิสูจน์หาเอกลักษณ์ระหว่างพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะที่แสดงออกและเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic markers) หลักการที่ได้รับการยอมรับเพื่อการวิเคราะห์ด้วย QTL (McCouch and Doerge, 1995) หรือ QTL detection คือ การวิเคราะห์หาจำนวน ตำแหน่ง และบทบาทของยีนที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณนั้น ๆ ด้วยการหาความสัมพันธ์ระหว่างการกระจายตัวของประชากร (segregating population) ที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยวิธีชั่ง ตวง วัด หรือวิธีการใดวิธีการหนึ่งกับเครื่องหมายทางพันธุกรรมหรือเครื่องหมายโมเลกุล และการวิเคราะห์ความหาสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถทำได้โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of various) และวิธีการวิเคราะห์สมการถดถอย (regression analysis) (McCouch *et al*., 1997) การแสดงออกลักษณะทางปริมาณนั้นเป็นผลเนื่องมาจากยีน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จำนวนมากที่ควบคุมลักษณะนั้นๆ (quantitative trait loci, or QTL) ร่วมกับสภาพแวดล้อม (environment) ที่เป็นตัวสนับสนุนซึ่งยีนแต่ละตัว (Individual loci) มีส่วนร่วมกันในการควบคุมการแสดงออกของลักษณะทางปริมาณและวิธีการวิเคราะห์ QTL ดังกล่าว เรียกว่า Biometrical Genetics ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นในช่วงตอนปลายทศวรรษที่ 19 ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแตกต่างของลักษณะปริมาณ (Hackett, 2002)

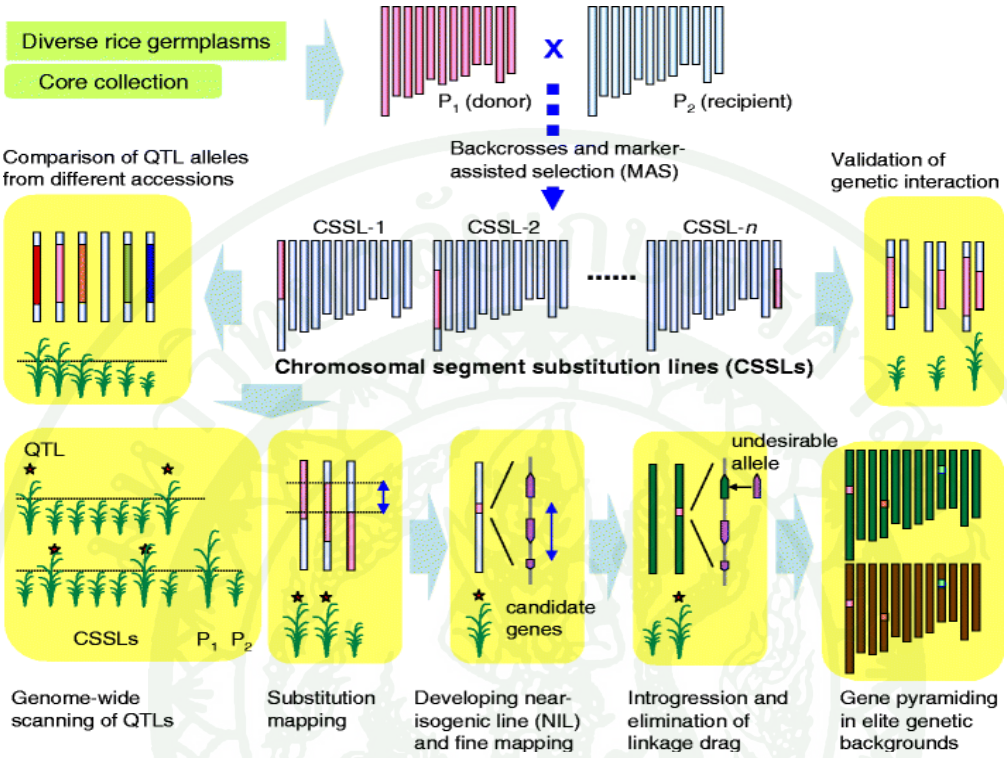
ซึ่งตำแหน่ง QTL ที่ได้จะต้องมีการตรวจสอบอีกครั้งเพื่อยืนยันการปรากฏของ QTL ซึ่งอาจจะประเมินได้จากประชากรที่มีการจำแนกไว้แล้วโดยการประเมินฟีโนไทป์ซ้ำหรือทำการทดลองให้มากขึ้น หรืออาจจะดำเนินการโดยการสร้างประชากรขึ้นมาใหม่ที่เป็น near isogenic lines (NILs) จากการผสมระหว่างต้นพ่อหรือต้นแม่ที่สนใจหรือเลือกจากต้นในประชากรที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ (donor parent) เพื่อผสมกลับไปยังพันธุ์รับ (recurrent parent) แล้วใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับตำแหน่ง QTL คัดเลือกและพัฒนาให้เป็นประชากรลูกผสมกลับ (backcross) ที่มีลักษณะพื้นฐานทางพันธุกรรม (genetic background) เหมือนพันธุ์รับแต่มีเฉพาะชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบริเวณ QTL ของพันธุ์ให้เพิ่มขึ้นมาเท่านั้น วิธีการนี้จะทำให้ทราบผลการแสดงออกของ QTL ได้อย่างแม่นยำเนื่องจากพื้นฐานทางพันธุกรรมในตำแหน่งอื่นเป็นเช่นเดียวกับพันธุ์รับทั้งหมด และจากข้อดีของวิธีการนี้ได้มีผู้เสนอวิธีการวิเคราะห์ตำแหน่ง QTL ที่มีประสิทธิภาพโดยใช้ประชากร NILs ในการศึกษาซึ่งเรียกประชากรแบบนี้ว่า Chromosome Segment Substitution Line (CSSL)

การวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนด้วยวิธี Chromosome Segment Substitution Line (CSSL)

การวิเคราะห์หาตำแหน่งของกลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณ (QTL analysis) นิยมนำมาใช้ในการหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคกันอย่างแพร่หลาย แต่ปัญหาที่พบบ่อยอย่างหนึ่งของการหาตำแหน่งยีนด้วยวิธีนี้คือพื้นฐานทางพันธุกรรมที่ไม่เท่ากันในแต่ละต้นของประชากร ซึ่งจะมีผลต่อการวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนที่เกี่ยวข้อง ประกอบกับมีจำนวนประชากรที่ใช้น้อยเกินไปที่จะตรวจหาตำแหน่งยีนให้ครบ วิธีการแก้ไขปัญหาของความไม่เท่ากันของพื้นฐานทางพันธุกรรมในประชากร คือ การวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนแบบ Chromosome Segment Substitution Line (CSSL) (ภาพที่ 1) เนื่องจากวิธีนี้จะใช้ประชากรสายพันธุ์แท้ที่ได้จากการผสมกลับ (Backcross inbred line หรือ BIL) ในการทดสอบซึ่งการใช้ประชากรดังกล่าวแต่ละสายพันธุ์จะมีพื้นฐานทางพันธุกรรมที่เหมือนกันทุกต้น ทำให้การวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนมีความแม่นยำมากขึ้น ซึ่งวิธี CSSL นอกจากจะสามารถระบุตำแหน่งของยีนได้อย่างมีประสิทธิภาพแล้ว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยังสามารถตรวจสอบปฏิกิริยาของยีนระหว่างตำแหน่ง และสามารถตรวจหาอิทธิพลของยีนที่แสดงออกน้อยได้ (Fukuoka *et al.*, 2010) ซึ่งถือว่าเป็นแนวคิดใหม่สำหรับการหาตำแหน่งยีน



ภาพที่ 1 แผนภาพแสดงการศึกษาหาตำแหน่งของยีนด้วยประชากรแบบ Chromosome Segment Substitution Line (CSSLs)

ที่มา: Fukuoka *et al.* (2010)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พันธุ์ข้าวและประชากรข้าวที่ใช้ในการทดลอง
   1.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้ทดสอบความต้านทานโรคไหม้ มีทั้งหมด 24 พันธุ์
      1.1.1 ขาวดอกมะลิ 105 (KDML 105)
      1.1.2 IR64
      1.1.3 เจ้าหอมนิล (JHN)
      1.1.4 กข6 (RD6)
      1.1.5 กข31 (RD31)
      1.1.6 กข6 (RD6)
      1.1.7 กวก.1 (DOA1)
      1.1.8 กวก.2 (DOA2)
      1.1.9 Qiqnizhan (CH1)
      1.1.10 Yuexiang zhan (CH4)
      1.1.11 สุพรรณบุรี1 (SPR1)
      1.1.12 สุพรรณบุรี3 (SPR3)
      1.1.13 สุพรรณบุรี60 (SPR60)
      1.1.14 สุพรรณบุรี80 (SPR80)
      1.1.15 ปทุมธานี1 (PTT1)
      1.1.16 ชัยนาท1 (CNT1)
      1.1.17 พิษณุโลก2 (PSL2)
      1.1.18 สกลนคร1 (SKN1)
      1.1.19 NERICA3
      1.1.20 NERICA4
      1.1.21 Basmati 370
      1.1.22 Azucina
      1.1.23 IR80151A
      1.1.24 IR8015

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 ประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_2 ของคู่ผสม KDML105 × IR64 ที่เป็นข้าวไวต่อช่วงแสงซึ่งได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานต่อโรคไหม้ด้วยยีน *Pi-1*

2. วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

2.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการแยกเชื้อโรคไหม้

2.1.1 แป้งข้าว (rice flour)

2.1.2 ผงวุ้น (agar)

2.1.3 yeast extract

2.1.4 เจลาติน

2.1.5 แอลกอฮอลล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์

2.1.6 จานเลี้ยงเชื้อ

2.1.7 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

2.1.8 ตะเกียงแอลกอฮอลล์

2.1.9 หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ (autoclave)

2.1.10 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

2.1.11 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)

2.1.12 แท่งแก้วปลายแหลม

2.1.13 โถดูดความชื้น (desicator)

2.1.14 กระดาษกรอง

2.1.15 ถุงกระดาษไข

2.1.16 ถุงพลาสติกแบบหนา

2.1.17 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

2.2 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล

2.2.1 เครื่องอิเล็คโตรโฟเรซิส (gel electrophoresis)

2.2.2 ชุด Phire® Plant Direct PCR Kit เป็นชุดสำเร็จรูปเพื่อทำปฏิกิริยา PCR

2.2.3 สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ได้แก่

2.2.3.1 2x plant PCR buffer

2.2.3.2 5 µmol forward primer

2.2.3.3 5 µmol reverse primer

2.2.3.4 Phire® Hot Start DNA polymeras

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2.3.5 Sterile distilled

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในเรือนปลูกพืชทดลอง
   3.1 กระบะพลาสติกแบบไม่มีรูขนาด 52 x 34 เซนติเมตร
   3.2 ถุงตาข่ายสีฟ้า
   3.3 ไม้ไผ่
   3.4 กรรไกร
   3.5 ปั๊มลม (air brush pressure)
   3.6 ถาดหลุมเพาะเมล็ด
   3.7 ห้องควบคุมอุณหภูมิ

วิธีการ

1. **การสำรวจและเก็บตัวอย่างใบข้าวที่เป็นโรคไหม้**

สำรวจและเก็บตัวอย่างใบข้าวที่เป็นโรคไหม้ ในพื้นที่ปลูกข้าวบริเวณภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยได้แก่ พิษณุโลก ชัยภูมิ ปทุมธานี ลพบุรี เพชรบูรณ์ ในปีเพาะปลูก 2554

2. การแยกเก็บเชื้อโรคไหม้แบบสปอร์เดี่ยว

นำตัวอย่างใบข้าวที่เป็นโรคไหม้มาแยกเก็บเชื้อแบบสปอร์เดี่ยวตามวิธีการของ Sirithunya *et al*. (2007) (ภาพที่ 2) ดังนี้

2.1 นำตัวอย่างใบข้าวที่เก็บรวบรวม มาตัดเฉพาะบริเวณที่เกิดแผลโรคไหม้ เป็นชิ้นขนาดประมาณ 5 เซนติเมตร จากนั้นวางลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่รองพื้นด้วยกระดาษเพาะเมล็ดที่ชุ่มน้ำ ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมงเพื่อให้เชื้อราสร้างโคนิเดีย

2.2 นำชิ้นส่วนใบข้าวในจานเลี้ยงเชื้อมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นใช้แท่งแก้วปลายแหลมแตะโคนิเดียจากบริเวณที่เกิดโรคไหม้มาวางลงบนอาหารวุ้น (วุ้น 2 เปอร์เซ็นต์) ที่เตรียมไว้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 นำจานเลี้ยงเชื้อที่มีชิ้นส่วนใบข้าวมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นใช้แท่งแก้วปลายแหลมแยกเชื้อให้ได้เป็นโคนิเดียเดี่ยวๆ ประมาณ 20-30 โคนิเดีย แล้วปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส โคนิเดียจะงอกและสร้างเส้นใย

2.4 นำจานเลี้ยงเชื้อที่มีชิ้นส่วนใบข้าวจากข้อ 2.3 มาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นใช้ลวดปลายแหลมตัดวุ้นตรงที่โคนิเดียงอก วางลงบนอาหารแป้งข้าว (rice flour agar, RFA; แป้งข้าว 2 เปอร์เซ็นต์ ผงวุ้น 2 เปอร์เซ็นต์ yeast extract 0.2 เปอร์เซ็นต์) ในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วเพาะบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน เชื้อราจะสร้างเส้นใยสีขาวขึ้นมา

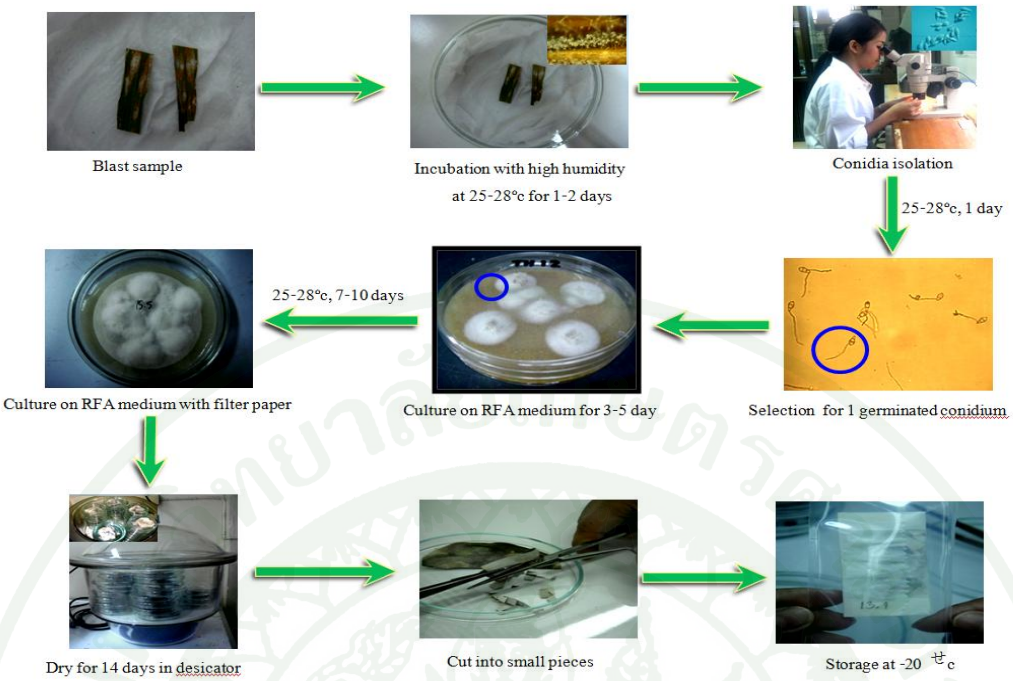
2.5 ใช้มีดผ่าตัด ตัดวุ้นตรงบริเวณที่โคนิเดียสร้างเส้นใยในบริเวณที่อยู่ห่างจากโคนิเดียอื่นๆ

2.6 นำชิ้นวุ้นที่โคนิเดียสร้างเส้นใยที่ได้จากข้อ 2.5 วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่วางทับด้วยกระดาษกรองเป็นเวลา 7-14 วัน เชื้อจะสร้างเส้นใยจนเต็มแผ่นกระดาษกรอง

2.7 ลอกกระดาษกรองที่มีเส้นใยเชื้อราวางในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ 14 วันเพื่อให้กระดาษกรองแห้งสนิท

2.8 ตัดกระดาษกรองที่มีเส้นใยเชื้อราแห้งที่ได้จากข้อ 2.7 ให้เป็นชิ้นเล็กๆบรรจุใส่ซองกระดาษไข แยกเก็บตัวอย่างละ 2 ซองเพื่อใช้งาน 1 ซอง อีกซองเก็บสำรองไว้ นำซองกระดาษไขดังกล่าวใส่ไว้ในถุงพลาสติกอีกหนึ่งชั้นเพื่อป้องกันความชื้น จากนั้นปิดผนึกถุงพลาสติกให้เรียบร้อย เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการแยกเชื้อราแบบสปอร์เดี่ยว

3. การสร้างประชากรลูกผสมกลับเพื่อหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้

3.1. นำประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_2 ของคู่ผสม KDML 105 × IR64 ที่เป็นข้าวไวต่อช่วงแสงซึ่งได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานโรคไหม้ด้วยการถ่ายทอดยีน *Pi-1* มาปลูกปลูกในถาดหลุมเพาะเมล็ดขนาด 12 x 9 หลุม จำนวนอย่างน้อย 100 สายพันธุ์ โดยปล่อยให้มีการผสมตัวเองเพื่อสร้างประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_3

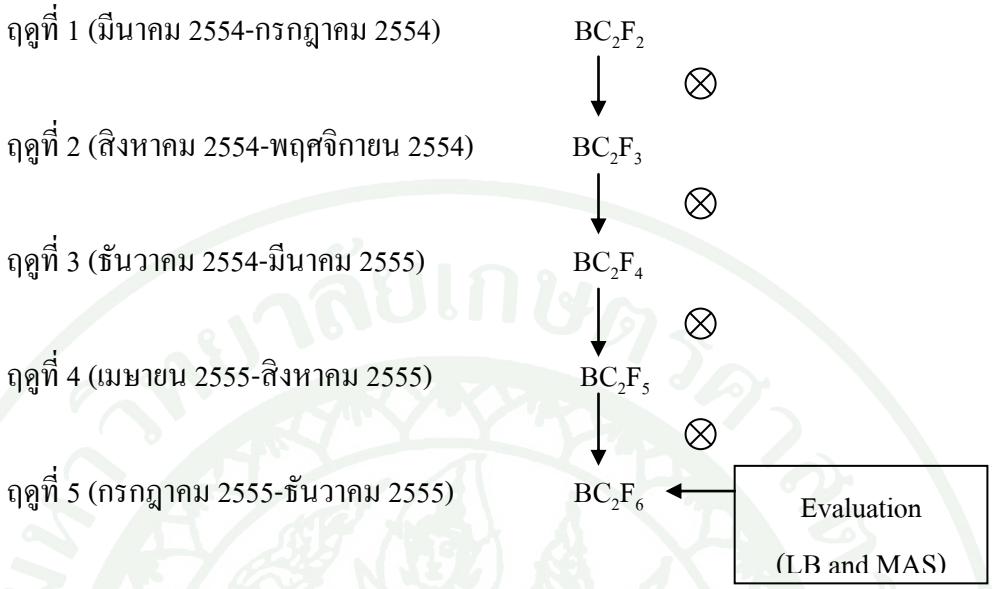
3.2 ผสมตัวเองในประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_3 เพื่อสร้างประชากร BC_2F_4 โดยปลูกแบบขยายสายพันธุ์ให้ได้อย่างน้อย 100 สายพันธุ์

3.3 ผสมตัวเองในประชากร BC_2F_4 เพื่อสร้างประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_5ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.2

3.4 ผสมตัวเองในประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_5 เพื่อสร้างประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.5 ปลูกขยายประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 เพื่อเพิ่มปริมาณเมล็ดพันธุ์ในแปลงปลูก



ภาพที่ 3 แผนผังแสดงขั้นตอนการดำเนินงานเป็นขั้นตอนการดำเนินการในขั้นตอนการสร้างประชากรข้าวในหัวข้อรองที่ **3**. การสร้างประชากรผสมกลับเพื่อหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้

หมายเหตุ LB คือ การประเมินโรคไหม้ MAS คือ การประเมินด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

4. การประเมินศักยภาพความต้านทานโรคไหม้ของข้าว

ทดสอบการเกิดโรคไหม้ในประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 โดยเลือกเชื้อที่เป็นตัวแทนของเชื้อโรคไหม้ที่ครอบคลุมทั้งพื้นที่ปลูกทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยรวม 6 สายพันธุ์เพื่อนำมาทดสอบความต้านทานโรคไหม้ในระยะต้นกล้าของประชากรข้าวที่ได้ โดยทำการทดสอบความต้านทานโรคไหม้ 3 ซ้ำ

4.1 การเตรียมเชื้อรา

เลี้ยงเชื้อรา *P. oryzae* ที่เก็บอยู่ในรูปเส้นใยแห้งบนกระดาษกรองบนอาหาร RFA ในจานเลี้ยงเชื้อโดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25°องศาเซลเซียส ให้แสงฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 7-9 วัน จากนั้นกระตุ้นให้เกิดการสร้างโคนิเดียโดยการลูบทำลายเส้นใยบนผิวหน้าอาหาร (scraping) ด้วยแท่งแก้วเบาๆ เพื่อให้เส้นใยของเชื้อราขาด แล้วย้ายไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 คืน ใช้น้ำกลั่นที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นึ่งฆ่าเชื้อแล้วชะเอาโคนิเดียของเชื้อราออกมาจากเส้นใย นับจำนวนโคนิเดียโดยใช้ haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วปรับความเข้มข้นของโคนิเดียให้ได้ 5×10^4 โคนิเดีย / มิลลิลิตรในเจลาติน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำมาทดสอบการก่อให้เกิดโรค

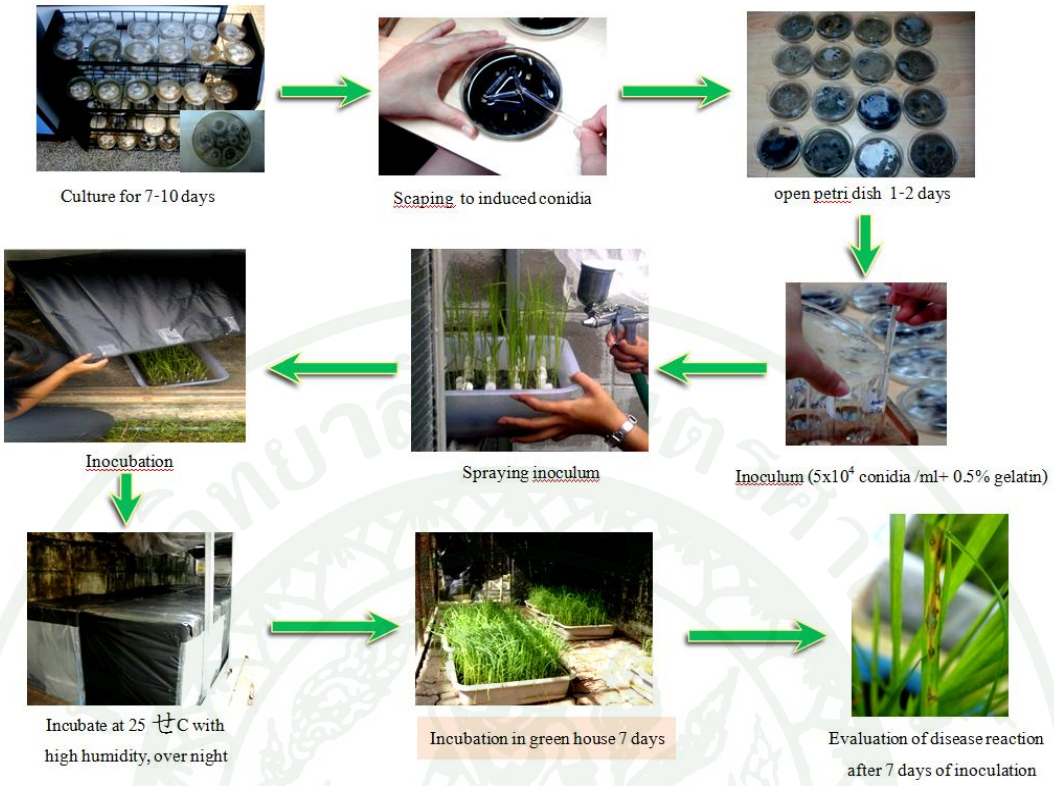
4.2 การเตรียมพืชทดสอบ

นำเมล็ดข้าวที่ต้องการทดสอบมาปลูกในถาดหลุมสีดำขนาด 2 × 2.5 เซ็นติเมตร โดยโรยเมล็ดข้าวที่ต้องการทดสอบพันธุ์ละ 4-5 เมล็ดต่อหลุม เก็บไว้ในโรงเรือนเพาะชำ ใส่ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) เมื่อต้นข้าวอายุ 13 วันหรือก่อนการปลูกเชื้อ 1 วัน เมื่อต้นข้าวอายุ 14 วัน จึงนำมาทดสอบความต้านทานโรคไหม้

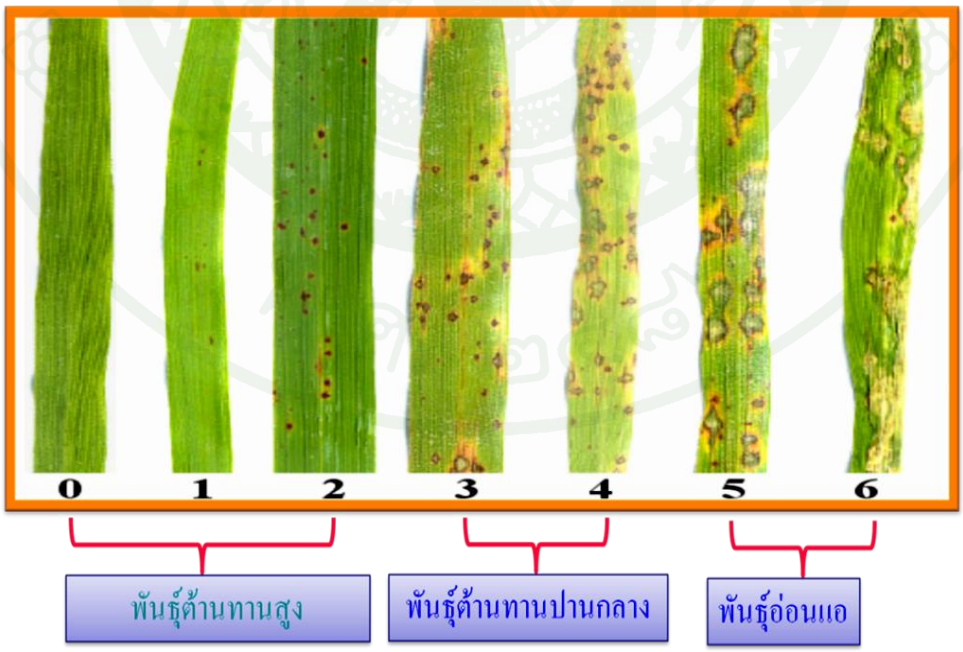
4.3 การทดสอบโรคโดยวิธีการปลูกเชื้อแบบฉีดพ่น

นำต้นข้าวที่มีอายุ 14 วันมาทดสอบกับเชื้อโรคไหม้ในห้องสำหรับปลูกเชื้อโดยใช้เครื่องปั๊มลม (air brush pressure) ฉีดพ่น (spraying) เชื้อโรคไหม้ให้ทั่วทั้งต้น แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในสภาพที่มีความชื้นสูง (moist chamber) เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมงหรือข้ามคืน (over night) (Veillet *et al*., 1996) จากนั้นย้ายมาเก็บรักษาในโรงเรือนที่มีการพรางแสงและสามารถควบคุมความชื้นได้ เพื่อให้เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค รดน้ำด้วยระบบน้ำพ่นฝอยทุกวัน และประเมินระดับความรุนแรงของโรคหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน (ภาพที่ 3) บันทึกผลโดยการประเมินความรุนแรงของโรคเป็น 7 ระดับตั้งแต่ 0-6 (Roumen and Nottegham, 1997) โดยระดับ 0-2 เป็นปฏิกิริยาที่ข้าวต้านทานต่อเชื้อสูง (resistance) ระดับ 3-4 ต้านทานต่อเชื้อปานกลาง (intermediate) และระดับ 5-6 อ่อนแอ (susceptible) จากนั้นเก็บตัวอย่างใบข้าวที่แสดงอาการเกิดโรคอย่างชัดเจนแบบสุ่มนำมาเก็บในรูป herbarium

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการปลูกเชื้อโรคไหม้โดยวิธีการฉีดพ่น



ภาพที่ 5 ลักษณะความต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ทดสอบด้วยเชื้อโรคไหม้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.4 การทดสอบและประเมินระดับความรุนแรงของการเกิดโรคไหม้ของข้าวในระยะกล้า

ทดสอบความต้านทานโรคไหม้ในระยะต้นกล้าอายุ 14 วัน ที่ปลูกในถาดหลุม ๆ ละ 2 ต้น ตามวิธีการของ Sirithunya *et al*. (2007) ในข้าวทั้งหมด 3 พันธุ์และประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC2F6 โดยใช้เชื้อโรคไหม้ที่แยกเก็บใหม่จำนวน 6 สายพันธุ์ (isolate) ทดสอบ 3 ซ้ำ บันทึกผลการประเมินโดยการประเมินความรุนแรงของโรคเป็นคะแนน7 ระดับตั้งแต่ 0-6 ตามวิธีการของ Roumen and Nottegham (1997) และเลือกข้าวสายพันธุ์ที่ต้านทานโรคไหม้เพื่อจะนำไปวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนต่อไป โดยระดับคะแนนจะประเมินจากขนาดของแผลที่ปรากฏ ดังนี้

ระดับ 0 ไม่มีแผลปรากฏ

ระดับ 1 แผลจุดกลมสีน้ำตาลเล็ก ๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร ไม่มีการสร้างโคนิเดีย

ระดับ 2 แผลกลมหรือเรียวยาวเล็กน้อยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5-1 มิลลิเมตร แผลไม่มีการสร้างโคนิเดีย

ระดับ 3 แผลจุดเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1-3 มิลลิเมตร และมีจุดสีเทาตรงกลางแผล

ระดับ 4 แผลจุดเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตรหรือยาวกว่า แผลเป็นสีเทาและมีขอบแผลสีน้ำตาล

ระดับ 5 แผลสีเทาเกาะกันเป็นกลุ่ม มีขอบแผลสีน้ำตาล เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค

ระดับ 6 แผลลุกลามยาวติดต่อกันเป็นสีเทา ไม่มีขอบแผลที่แน่นอน เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค

5. การคำนวณหาค่าดัชนีความต้านทานแบบกว้างของข้าว

การคำนวณค่าดัชนีความต้านทานแบบกว้างของข้าวต่อเชื้อโรคไหม้ (broad spectrum resistance index, BSR) ของข้าวแต่ละพันธุ์ สามารถทำได้โดยนำจำนวนสายพันธุ์เชื้อที่ไม่สามารถเข้าทำลายข้าวพันธุ์นั้นได้ (avirulence isolate) หารด้วยจำนวนเชื้อทั้งหมดที่ทดสอบตามสูตร (ดัดแปลงจาก Sirithunya *et al*., 2007)

$$\text{ค่าดัชนีความต้านทานแบบกว้างต่อเชื้อโรคไหม้} = \frac{\text{จำนวนสายพันธุ์เชื้อโรคไหม้ที่ไม่สามารถเข้าทำลายข้าวพันธุ์นั้น}}{\text{จำนวนสายพันธุ์เชื้อโรคไหม้ทั้งหมดที่ใช้ทดสอบข้าวพันธุ์นั้น}}$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. **การคำนวณหาค่าดัชนีความรุนแรงของเชื้อโรคไหม้**

การคำนวณหาค่าดัชนีความรุนแรงของเชื้อโรคไหม้ (virulence index, VI) ในข้าวแต่ละพันธุ์ สามารถทำได้โดยนำจำนวนพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อเชื้อโรคไหม้สายพันธุ์นั้น (susceptible variety) หารด้วยจำนวนพันธุ์ข้าวทั้งหมดที่ทดสอบด้วยเชื้อโรคไหม้สายพันธุ์นั้น (ดัดแปลงจาก Sirithunya *et al*., 2007)

$$\text{ค่าดัชนีความรุนแรงของเชื้อโรคไหม้} = \frac{\text{จำนวนพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อเชื้อโรคไหม้สายพันธุ์นั้น}}{\text{จำนวนพันธุ์ข้าวทั้งหมดที่ทดสอบเชื้อโรคไหม้สายพันธุ์นั้น}}$$

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของระดับการเกิดโรคไหม้ด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.2 e โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความต่าง (dissimilarity) ของ Canberra และจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยวิธี SAHN เพื่อสร้างเป็นแผนภาพแสดงความต้านทานโรคไหม้ (Sirithunya *et al*., 2001)

8. การวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 **โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ**

8.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ และการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

8.1.1 เจาะใบข้าวด้วย *Harris* UNI-CORETM จะได้เนื้อเยื่อรูปวงกลมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร (จำนวน 5 ชิ้น) ใส่ลงในหลอด PCR

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8.1.2 เตรียม PCR reaction ดังนี้

Stock	PCR concentration	Final PCR volume (µl)
2x plant PCR buffer	1x	5
5 µmol forward primer	0.5 µmol	0.5
5 µmol reverse primer	0.5 µmol	0.5
Phire® Hot Start DNA polymerase	-	0.2
Sterile distilled H2O	-	3.8
Total	-	10

8.1.3 เมื่อผสม PCR reaction ในหลอด PCR เรียบร้อยแล้วให้หยด mineral oil 1 หยด

8.1.4 นำหลอด PCR ใส่ลงในเครื่อง PCR ตั้งโปรแกรมเครื่อง PCR ตามเงื่อนไขดังนี้

First denature	98 º C	5 นาที	
Denature	98 º C	5 วินาที	40 รอบ
Annealing	57 º C	5 วินาที	
Extension	72 º C	30 วินาที	
Final extension	72 º C	1 นาที	
Hold	16 º C	∞	

8.2 วิธีการทำอิเล็คโตรโฟเรซีสและการย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์สเตน (silver stain)

8.2.1 การเตรียมกระจก (glass)

8.2.1.1 ใช้กระดาษทิชชูเช็ดกระจกด้วยแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 3 รอบ

8.2.1.2 ใช้กระดาษคิมไวพ์ (kimwipes paper) เช็ดกระจกด้วย bind silane 2 ไมโครลิตร (2 µl of γ-methacryloxy-propyltrimethoxysilane)

8.2.1.3 ใช้กระดาษคิมไวพ์เช็ดกระจกด้วยแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 2 รอบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8.2.2 การเตรียมแชมเบอร์ (chamber)

8.2.2.1 ใช้กระดาษทิชชูเช็ดแชมเบอร์ด้วยแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 3 รอบ

8.2.2.2 ใช้กระดาษคิมไวพ์เช็ดแชมเบอร์ด้วยเคลียร์วิว (clear view)

8.2.2.3 ใช้กระดาษคิมไวพ์เช็ดแชมเบอร์ด้วยแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 2 รอบ

8.2.3 การเตรียมชุดโพลิอะคริลามายด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส

8.2.3.1 ทำความสะอาดหวี (comb) และ สเปเซอร์ (spacer) ด้วยแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์

8.2.3.2 วางสเปเซอร์ตามยาวที่ขอบของแชมเบอร์ จากนั้นวางกระจกด้านที่เช็ดทำความสะอาดแล้วทับลงไปบนแชมเบอร์

8.2.3.3 ใช้แคลมป์ (clamps) ครอบตรงขอบของแชมเบอร์ทั้ง 2 ข้าง

8.2.4 การเตรียมโพลิอะคริลามายด์เจล (polyacrylamide gel)

8.2.4.1 เตรียมโพลิอะคริลามายด์เจลปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่าง โพลิอะคริลามายด์ 6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ (10% ammonium persulfate) และเติม TEMED ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

8.2.4.2 เทโพลิอะคริลามายด์เจลที่เตรียมไว้ในช่องว่างระหว่างกระจกกับแชมเบอร์

8.2.4 3 ใช้สันหวีเสียบในช่องว่างระหว่างกระจกกับแชมเบอร์ให้ลึกประมาณ 1 เซ็นติเมตร

8.2.4.4 ทิ้งโพลิอะคริลามายด์เจลไว้ประมาณ 90 นาที เจลจะเกิดการแข็งตัว

8.2.5 การตรวจสอบดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส

8.2.5.1 ตั้งชุดเจลอิเล็คโตรโฟเรซิสพร้อมกับติดแถบวัดอุณหภูมิตรงบริเวณกลางกระจก

8.2.5.2 เติมรันนิ่งบัฟเฟอร์ (running buffer, 1xTBE) ลงในแชมเบอร์และ spout

8.2.5.3 ดึงหวีออก จากนั้นใช้ดร็อปเปอร์ (dropper) ไล่เศษเจลออกจากขอบเจล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8.2.5.4 พรีรันนิ่ง โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 วัตต์ เป็นเวลา 30 นาที

8.2.5.6 ปิดเครื่องพาวเวอร์ซับพลาย (power supply) แล้วถอดชุดครอบออก

8.2.5.7 ใช้วาสลีนทาซี่หวีให้ทั่ว จากนั้นเสียบหวีเข้าไปในช่องว่างระหว่างกระจกกับแชมเบอร์ให้ปักลงไปในเนื้อเจลเล็กน้อย

8.2.5.8 หยอดดีเอ็นเอตัวอย่างละ 2 ไมโครลิตรลงในช่อง (wells) จากด้านบนเจล เมื่อครบตามจำนวนดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการทดสอบแล้ว ติดตั้งชุดเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสให้เรียบร้อย

8.2.5.9 ตั้งค่าที่เครื่องพาวเวอร์ซับพลายโดยให้กระแสไฟฟ้า 45 วัตต์

8.2.5.10 หยุดการให้กระแสไฟฟ้าชุดเจลอิเล็คโตรโฟเรซิสเมื่อไซลีนไซยานอลดาย (xylene cyanol dye) เคลื่อนตัวต่ำลงมาเป็นระยะทาง 15 เซนติเมตร

8.2.6 การย้อมสีแถบดีเอ็นเอ

8.2.6.1 ล้างเจลใน fixing solution ในปริมาตร 1,000 มิลลิลิตรที่มีอุณหภูมิ 10-12 องศาเซลเซียส

8.2.6.2 ล้างเจลใน silver strain solution ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร พร้อมกับการเขย่านาน 7 นาที

8.2.6.3 จุ่มเจลลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตรอย่างเร็ว นาน 10-15 วินาที 1 ครั้ง

8.2.6.4 จุ่มเจลลงใน developed ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตรพร้อมกับการเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ทำนานจนกว่าแถบดีเอ็นเอจะปรากฏ

8.2.6.5 เมื่อแถบดีเอ็นเอปรากฏชัดเจนแล้ว จุ่มเจลลงใน fixing solution ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

8.2.6.6 จุ่มเจลลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นาน 1 นาที ผึ่งเจลไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเจลแห้งแถบดีเอ็นเอจะปรากฏเด่นชัดขึ้น

8.3 การทดสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับความต้านทานโรคไหม้ของข้าวพันธุ์IR64

นำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับลักษณะความต้านทานโรคไหม้ของข้าวจำนวน 2 เครื่องหมายคือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM 208 และ RM 179 ซึ่งวางตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 2 และ 12 ตามลำดับ นำมาทดสอบในประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8.4 การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่

นำเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR จำนวน 230 ไพรเมอร์ โครโมโซมละ15-20 ไพรเมอร์มาทดสอบในพันธุ์พ่อแม่เพื่อหาความแตกต่างพันธุกรรม (polymorphism) ระหว่างข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ IR64 โดยใช้เทคนิค SSR ตามวิธีการของ Benbouza *et al*. (2006) เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เลือกใช้นี้มีทั้งสำหรับการตรวจสอบพื้นฐานทางพันธุกรรมข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ IR64

คัดเลือกต้นประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 ที่มีลักษณะต้านทานโรคไหม้ มาทดสอบด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 93 ไพรเมอร์ที่เลือกได้จากข้อ 8.4 โดยการใช้เทคนิค SSR แล้วอ่านผลแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ นำมาวิเคราะห์หาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรคไหม้ เพื่อใช้ในการทดสอบหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 ทั้งหมดต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สถานที่และระยะเวลาการทำวิจัย

1. สถานที่การทำวิจัย

1.1 โรงเรือนปลูกพืชทดลองภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร

1.2 ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีข้าว ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร

2. ระยะเวลาการทำวิจัย

ตั้งแต่เดือนมีนาคม 2554 ถึงเดือนธันวาคม 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

การสำรวจ เก็บตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคไหม้ และการแยกเก็บเชื้อราแบบสปอร์เดี่ยว

การสำรวจและเก็บตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคไหม้ ทำโดยการสำรวจพื้นที่ปลูกข้าวและศูนย์วิจัยข้าวในบริเวณเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของประเทศไทย รวมทั้งสิ้น 4 จังหวัด ได้แก่ พิษณุโลก ชัยภูมิ ลพบุรี และปทุมธานี (ภาพที่ 5 และ 6)โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างข้าวพันธุ์และสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 รวมทั้งสิ้น 6 ตัวอย่าง และแยกเก็บเชื้อราแบบสปอร์เดี่ยวรวมทั้งสิ้น 17สายพันธุ์ โดยเก็บรักษาเชื้อราไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ตารางผนวกที่ ก1) โดยพื้นที่ที่มีการเก็บรวบรวมเชื้อโรคไหม้พบว่าส่วนใหญ่นิยมปลูกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105



ภาพที่ 6 บริเวณพื้นที่ที่มีการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคไหม้

- คือ จังหวัดที่สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างใบข้าวที่เป็นโรคไหม้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 7 การเก็บรวบรวมตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคไหม้

การทดสอบความต้านทานโรคไหม้

จากการทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ของข้าว (ภาพที่ 7) ทั้ง 24 พันธุ์ด้วยเชื้อรา 23 สายพันธุ์ที่เป็นเชื้อที่เก็บใหม่และเชื้อจากศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ข้าวนั้น พบว่าข้าวแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ได้แตกต่างกัน เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาจัดกลุ่มของพันธุ์ข้าวสามารถแบ่งข้าวออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 8)

1. กลุ่มพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อเชื้อทดสอบทั้งหมด ได้แก่ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กข6 สกลนคร1 และ สุพรรณบุรี1 โดยมีค่าความต้านทานโรคไหม้แบบกว้างเท่ากับ 0 ทั้งหมด

2. กลุ่มพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อเชื้อทดสอบทั้งหมด ได้แก่ พันธุ์ CH1 กวก.2 NERICA3 พิษณุโลก2 สุพรรณบุรี80 กข31 กวก.1 IR64 และ เจ้าหอมนิล โดยมีค่าความต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง เท่ากับ 1 ทั้งหมด

3. กลุ่มพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อเชื้อทดสอบบางสายพันธุ์ ได้แก่พันธุ์BASMATI NERICA4 สุพรรณบุรี60 CH4 สุพรรณบุรี3 IR80151A NPT20-4 IR80151B ปทุมธานี1 ชัยนาท1 และ AZUCENA โดยมีค่าความต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง อยู่ในช่วง 0.48 – 0.91

พันธุ์ข้าวแต่ละพันธุ์มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ที่แตกต่างกัน โดยพันธุ์ปรับปรุงใหม่มีทั้งข้าวที่ต้านทานโรคไหม้ได้ดีและต้านทานโรคไหม้บางสายพันธุ์ เมื่อเกษตรกรนำไปเพาะปลูกจะต้องมีการป้องกันการทำลายของโรคไหม้ โดยเฉพาะการเพาะปลูกข้าว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ กข6 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sirithunya *et al*. (2007) ที่ทดสอบความต้านทานโรคไหม้ด้วยเชื้อที่เก็บในช่วงปี 2542 – 2545 และการแบ่งกลุ่มความต้านทานของข้าวสายพันธุ์ต่างได้สอดคล้องกับงานวิจัยของเสาวลักษณ์ และคณะ (2552) ซึ่งได้มีการจัดกลุ่มความต้านทานของข้าว 24 สายพันธุ์ด้วยเชื้อโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมใหม่ในปีเพาะปลูก 2551 – 2552 และพบว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อโรคไหม้โดยมีค่าความต้านทานโรคไหม้แบบกว้างเท่ากับ 0 ส่วนข้าวพันธุ์ IR64 และพันธุ์เจ้าหอมนิล จัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้โดยมีค่าความต้านทานโรคไหม้แบบกว้างเท่ากับ 1 เช่นเดียวกัน

ข้าวที่จัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ต้านทาน ได้แก่ ข้าวพันธุ์ IR64 และ เจ้าหอมนิล ที่แสดงความต้านทานสูงต่อเชื้อโรคไหม้ที่เก็บใหม่และเชื้อจากศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ข้าวนั้น ซึ่งข้าวทั้ง 2 พันธุ์นี้ได้มีการใช้เป็นเชื้อพันธุกรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ต้านทานโรคไหม้อยู่ในปัจจุบัน (Sreewongchai *et al*., 2010) การค้นหาแหล่งพันธุกรรมของความต้านทานเชื้อโรคไหม้ใหม่ๆนั้นมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อการวางแผนการพัฒนาพันธุ์พืชให้สอดคล้องกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อโรคไหม้ที่มีอยู่ (พูนศักดิ์ และคณะ, 2550) และจากการรายงานของอภิชาติ และคณะ (2553) พบว่าข้าวพันธุ์ IR64 และเจ้าหอมนิลมีการทำแผนที่ยีนไว้แล้ว ในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้ข้าวพันธุ์ IR64 เป็นพันธุ์ให้ และใช้ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์รับ เนื่องจากข้าวพันธุ์ IR64 มีการค้นพบตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ไว้แล้วซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 2 และ 12 โดยยีนบนโครโมโซมที่ 12 เป็นยีนหลัก และข้าวพันธุ์ IR64 เป็นพันธุ์ที่มียีนต้านทานอยู่หลายตำแหน่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(ก)



(ข)

ภาพที่ 8 การทดสอบความต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ทดสอบ

(ก) การเก็บรักษาต้นกล้าข้าวหลังจากการปลูกเชื้อแล้วในสภาพการพรางแสง

(ข) ลักษณะอาการโรคไหม้บนใบข้าว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 ค่าความต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ 24 สายพันธุ์ของข้าว 24 พันธุ์

สายพันธุ์เชื้อ	จังหวัด	ประเทศ	KDML105	CH1	PTT1	NERICA4	DOA2	SPR1	NERICA3	IR80151A	PSL2	NPT20-4	RD31	IR64	JHN	CNT1	SPR60	IR80151AB	CH4	DOA1	AZUCENA	SKN1	SPR 80	SPR 3	BASMATI2	RD6	VI
BAG1.1	พิษณุโลก	ไทย	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	0.21
BAG 1.2	พิษณุโลก	ไทย	S	R	R	R	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	R	S	0.17
BAG 2.4	อุบลราชธานี	ไทย	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	S	0.13
BAG 6.4	ชัยภูมิ	ไทย	S	R	R	R	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	0.13
BAG 7.3	หนองคาย	ไทย	S	R	I	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	I	S	R	R	R	S	0.13
BAG 8.1	อุบลราชธานี	ไทย	S	R	R	I	R	I	R	I	R	I	R	R	R	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	S	0.13
BAG 8.4	อุบลราชธานี	ไทย	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	S	0.08
THL 19.6	ขอนแก่น	ไทย	S	R	R	R	R	S	R	S	R	I	R	R	R	R	S	I	S	R	R	I	R	S	R	S	0.29
BAG 40.1	ลพบุรี	ไทย	S	R	I	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	I	I	R	R	R	S	0.08
BAG 41.1	ลพบุรี	ไทย	S	R	I	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	I	I	R	R	R	S	0.08
BAG 42.1	พิษณุโลก	ไทย	S	R	I	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	I	I	R	R	R	S	0.08
BAG 42.2	พิษณุโลก	ไทย	S	R	I	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	I	S	R	R	R	S	0.13
BAG 43.1	ชัยภูมิ	ไทย	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	S	0.13
BAG 43.2	ชัยภูมิ	ไทย	S	R	R	R	R	S	R	S	R	I	R	R	R	R	S	I	S	R	R	S	R	S	R	S	0.33

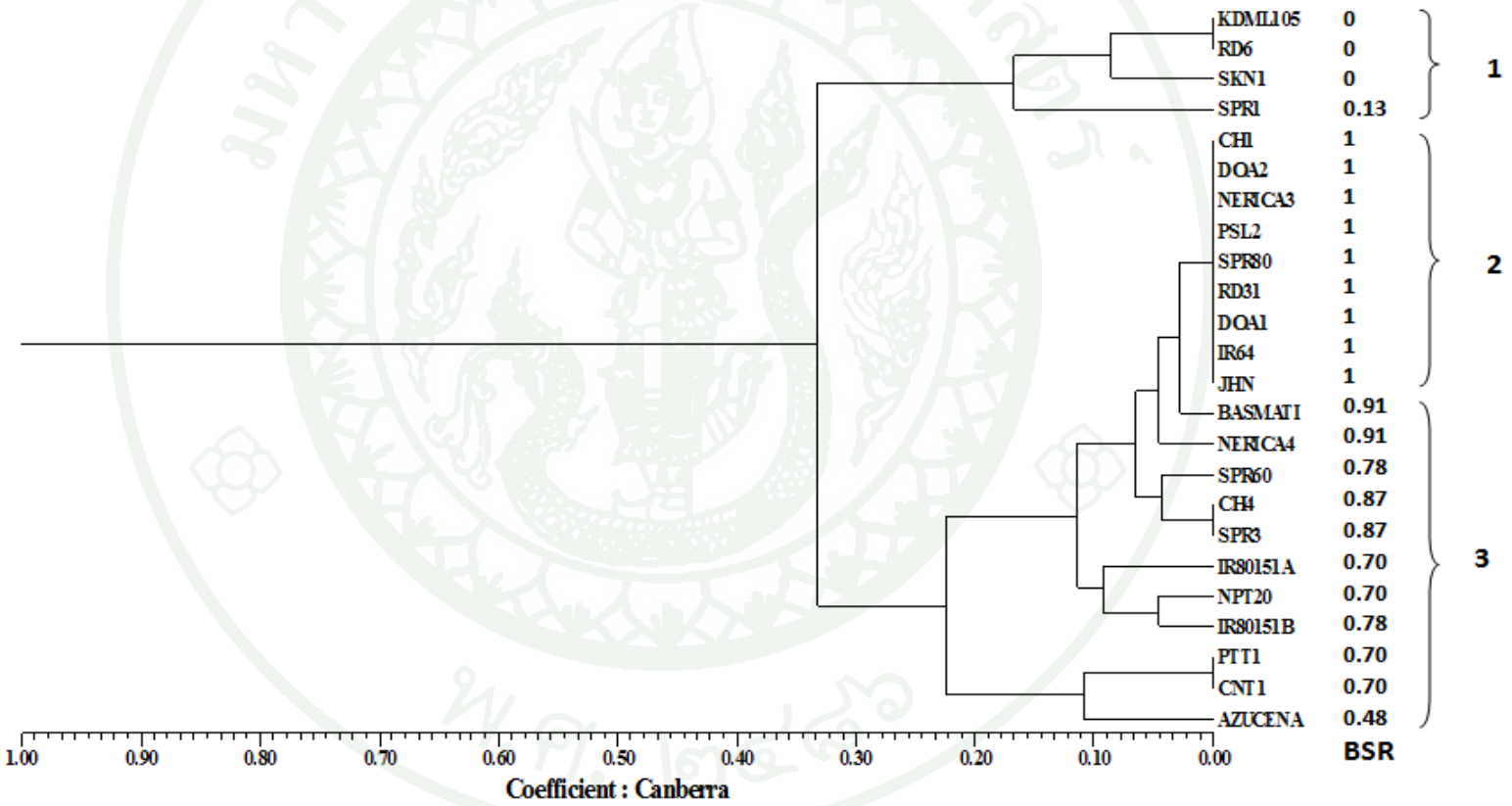
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สายพันธุ์เชื้อ	จังหวัด	ประเทศ	KDML105	CH1	PTT1	NERICA4	DOA2	SPR1	NERICA3	IR80151A	PSL2	NPT20-4	RD31	IR64	JHN	CNT1	SPR60	IR80151AB	CH4	DOA1	AZUCENA	SKN1	SPR80	SPR3	BASMATI2	RD6	VI
BAG43.3	ชัยภูมิ	ไทย	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	S	0.08
BAG43.4	ชัยภูมิ	ไทย	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	0.21
BAG43.5	ชัยภูมิ	ไทย	S	R	R	R	R	I	R	R	R	S	R	R	R	R	I	R	R	R	S	R	R	R	S	0.17
BAG44.1	ลพบุรี	ไทย	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	S	0.13
BAG44.2	ลพบุรี	ไทย	S	R	R	R	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	0.13
BAG44.3	ลพบุรี	ไทย	S	R	I	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	I	S	R	R	R	S	0.13
BAG45.1	ปทุมธานี	ไทย	S	R	R	I	R	I	R	I	R	I	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	S	0.13
BAG45.2	ปทุมธานี	ไทย	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	S	0.08
BAG45.3	ปทุมธานี	ไทย	S	R	R	R	R	S	R	S	R	I	R	R	R	R	S	I	S	R	I	R	S	R	S	0.29
BSR			0	1	0.70	0.91	1	0.13	1	0.70	1	0.70	1	1	1	0.70	0.78	0.78	0.87	1	0.48	0	1	0.87	0.91	0	

หมายเหตุ: R = ต้านทานโรคไหม้สูง, I = ต้านทานโรคไหม้ปานกลาง, S = อ่อนแอต่อโรคไหม้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 9 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ในความต้านทานโรคไหม้ของข้าว 24 พันธุ์ และค่าดัชนีความต้านทานแบบกว้างของข้าวพันธุ์ทดสอบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

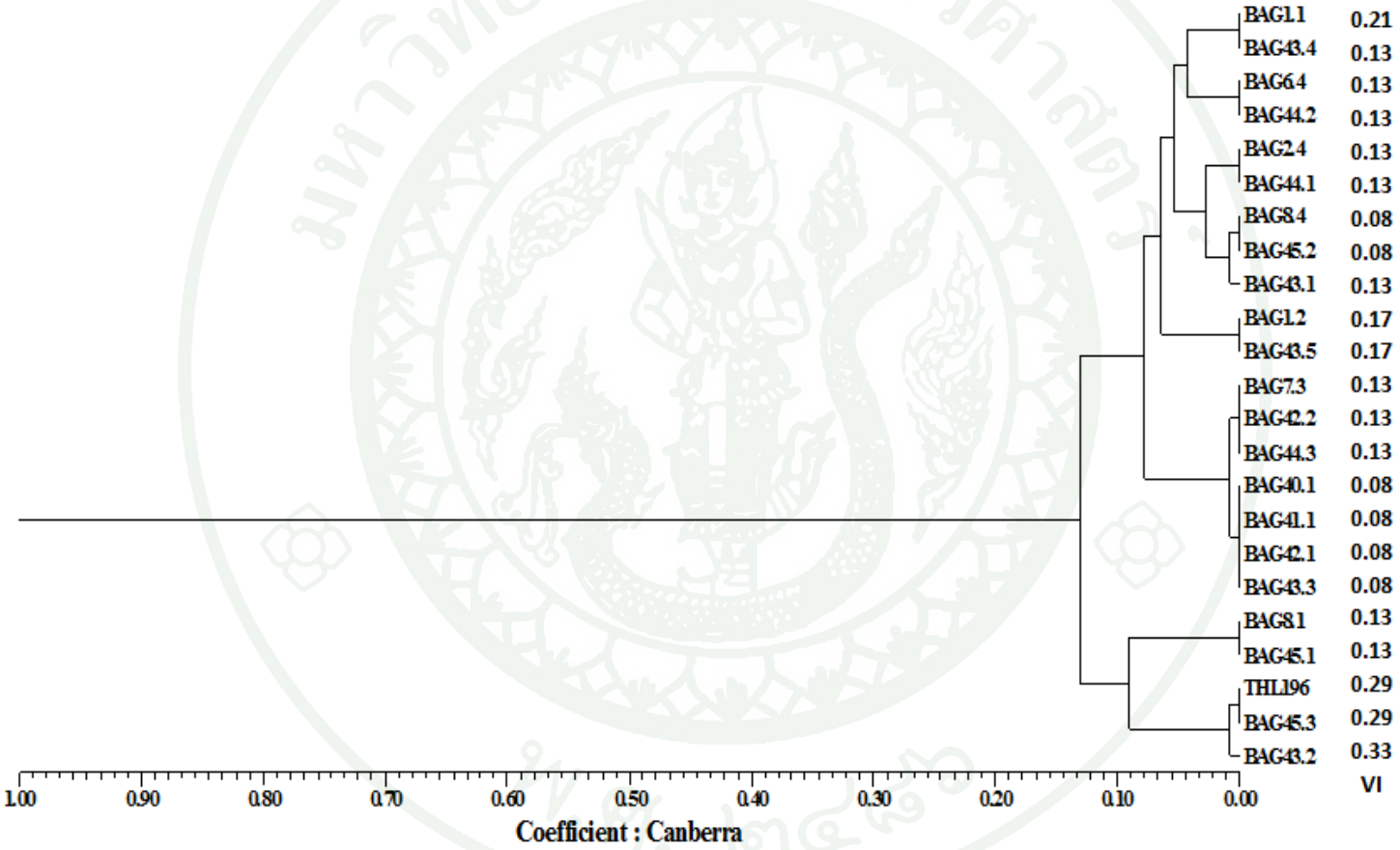
ความหลากหลายของความรุนแรงของเชื้อโรคไหม้

เชื้อโรคไหม้จำนวน 23 สายพันธุ์ทั้งจากที่เก็บรวบรวมใหม่และเชื้อจากศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว เมื่อนำมาทดสอบความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ทดสอบนั้น พบว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคต่อพันธุ์ข้าวต่างกัน โดยเชื้อทั้ง 23 สายพันธุ์นั้นไม่สามารถจัดกลุ่มเชื้อตามสถานที่เก็บเชื้อมาได้ (ตารางผนวกที่ ก1และภาพที่ 9) เมื่อพิจารณาถึงความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ พบว่า

1. เชื้อที่ทดสอบจำนวน 23 สายพันธุ์ที่มีแหล่งมาจากพื้นที่ปลูกข้าวแตกต่างกันนั้นมีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคในข้าวได้แตกต่างกัน โดยกลุ่มเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคในข้าวมากที่สุดจะมีค่า VI สูงสุด ซึ่งกลุ่มเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคสูงสุด คือ THL196 มีค่า VI = 0.29 ซึ่งเป็นเชื้อที่เก็บรวบรวมจาก จ.ขอนแก่น ส่วนเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคในข้าวได้น้อยที่สุดคือ BAG8.4, BAG40.1, BAG41.1, BAG42.1, BAG43.3 และ BAG45.2 มีค่า VI = 0.08 เท่ากันทั้งหมดซึ่งเชื้อเหล่านี้เก็บรวบรวมจาก จ.อุบลราชธานี ลพบุรี ชัยภูมิ และ จ.ปทุมธานี ตามลำดับ

2. ความหลากหลายของเชื้อโรคไหม้ในตัวอย่างเดียวกันที่นำมาแยกออกเป็นสายพันธุ์เมื่อนำมาทดสอบการเกิดโรคไหม้ พบว่ามีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคไหม้บนใบข้าวพันธุ์ทดสอบมากกว่า 1 แบบ โดยเชื้อที่แยกออกมาจะมีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคไหม้เหมือนกันแต่มีเชื้อ 1 สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคไหม้แตกต่างกันออกไป ทำให้ทราบว่าเชื้อโรคไหม้ในตัวอย่างเดียวกันประกอบด้วยเชื้อที่เป็นเชื้อหลักและมีเชื้อในสัดส่วนรองลงมา ทำให้จำเป็นต้องแยกเก็บเชื้อโรคไหม้จาก 1 ตัวอย่าง เป็นหลายๆสายพันธุ์เชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของเสาวลักษณ์ (2553) ที่ได้มีการทดสอบความหลากหลายของความรุนแรงของเชื้อโรคไหม้ 24 สายพันธุ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 10 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ในความรุนแรงของเชื้อโรคไหม้ 23 สายพันธุ์ และค่าดัชนีความรุนแรงของเชื้อโรคไหม้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การพัฒนาประชากรลูกผสมกลับ

จากการผสมข้ามระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งอ่อนแอต่อโรคไหม้และทำหน้าที่เป็นพันธุ์รับกับข้าวพันธุ์ IR64 ซึ่งต้านทานโรคไหม้และทำหน้าที่เป็นพันธุ์ให้ (ภาพผนวกที่ ก1)ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 และผสมกลับไปยังพันธุ์รับ 2 ครั้ง ได้ลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_2 โดยการวิจัยครั้งนี้ได้นำประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_1 มาพัฒนาต่อดังนี้

การสร้างประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_2

ปลูกประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_1 ที่ได้ทั้งหมด 24 สายพันธุ์ โดยปลูกแบบขยายสายพันธุ์ จาก 1 สายพันธุ์ เป็น 2 สายพันธุ์ จดบันทึกประวัติและปล่อยให้เกิดการผสมตัวเองเพื่อสร้างประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_2 ได้ทั้งหมด 48 สายพันธุ์

การสร้างประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_3

ปลูกประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_2 ที่ได้ทั้งหมด 48 สายพันธุ์ โดยปลูกแบบขยายสายพันธุ์ จาก 1 สายพันธุ์ เป็น 4 สายพันธุ์ จดบันทึกประวัติและปล่อยให้เกิดการผสมตัวเองเพื่อสร้างประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_3 ได้ทั้งหมด 192 สายพันธุ์

การสร้างประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_4

ปลูกประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_3 ที่ได้ทั้งหมด 192 สายพันธุ์ โดยปลูกแบบขยายสายพันธุ์ จาก 1 สายพันธุ์ เป็น 4 สายพันธุ์ จดบันทึกประวัติและปล่อยให้เกิดการผสมตัวเองเพื่อสร้างประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_4 ได้ทั้งหมด 192 สายพันธุ์

การสร้างประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_5

ปลูกประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_4 ที่ได้ทั้งหมด 192 สายพันธุ์ จดบันทึกประวัติและปล่อยให้เกิดการผสมตัวเองเพื่อสร้างประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_5 ซึ่งได้ทั้งหมด 192 สายพันธุ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การสร้างประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6

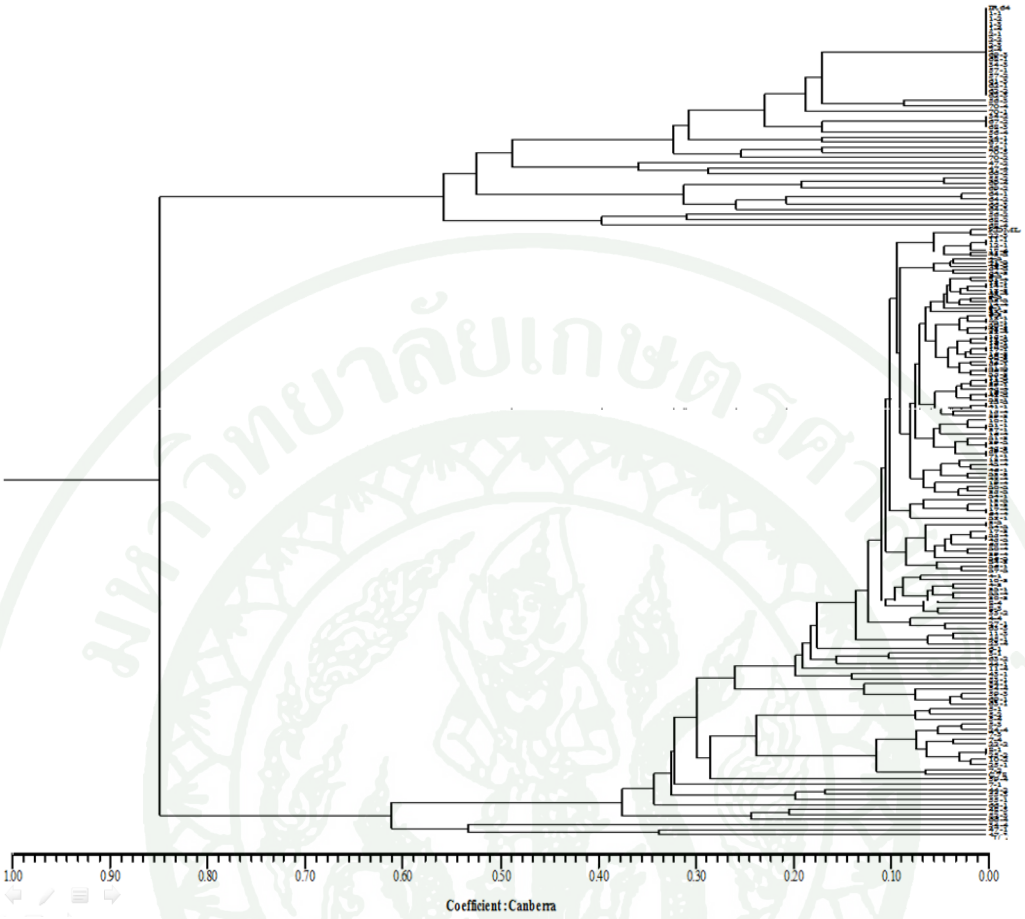
ปลูกประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_5 ที่ได้ทั้งหมด 192 สายพันธุ์ แล้วทดสอบความต้านทานโรคไหม้ด้วยเชื้อทดสอบ 6 สายพันธุ์ พบว่ามี 14 แฟมิลี่ที่สามารถต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ดังกล่าวได้ และได้นำไปปลูกในกระถางปล่อยให้เกิดการผสมตัวเองเพื่อขยายจำนวนเมล็ด (ตารางผนวกที่ ก2)

การทดสอบการกระจายตัวของความต้านทานโรคในประชากร

จากการประเมินศักยภาพความต้านทานโรคไหม้ของประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_5 จำนวน 192 สายพันธุ์ด้วยเชื้อโรคไหม้ 6 สายพันธุ์ที่มาจากต่างพื้นที่กัน พบว่ามีการกระจายตัวของความต้านทานในประชากรดังกล่าว เมื่อนำประชากรทั้งหมดมาจัดกลุ่มความต้านทานพบว่าสามารถแบ่งประชากรออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ เหมือนพันธุ์พ่อมีจำนวน 34 สายพันธุ์ โดยมีค่าความต้านทานโรคที่ 0.50 - 0.60 ส่วนกลุ่มที่สอง คือ กลุ่มสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้เช่นเดียวกับพันธุ์แม่ ซึ่งมีค่าความต้านทานโรคอยู่ในช่วง 0 – 1.0 และ กลุ่มที่สามคือกลุ่มที่สามารถต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ได้บางสายพันธุ์ โดยมีค่าความต้านทานอยู่ในช่วง 0.20 – 0.40 (ตารางที่ 3 ภาพที่ 10 ภาพที่ 11)

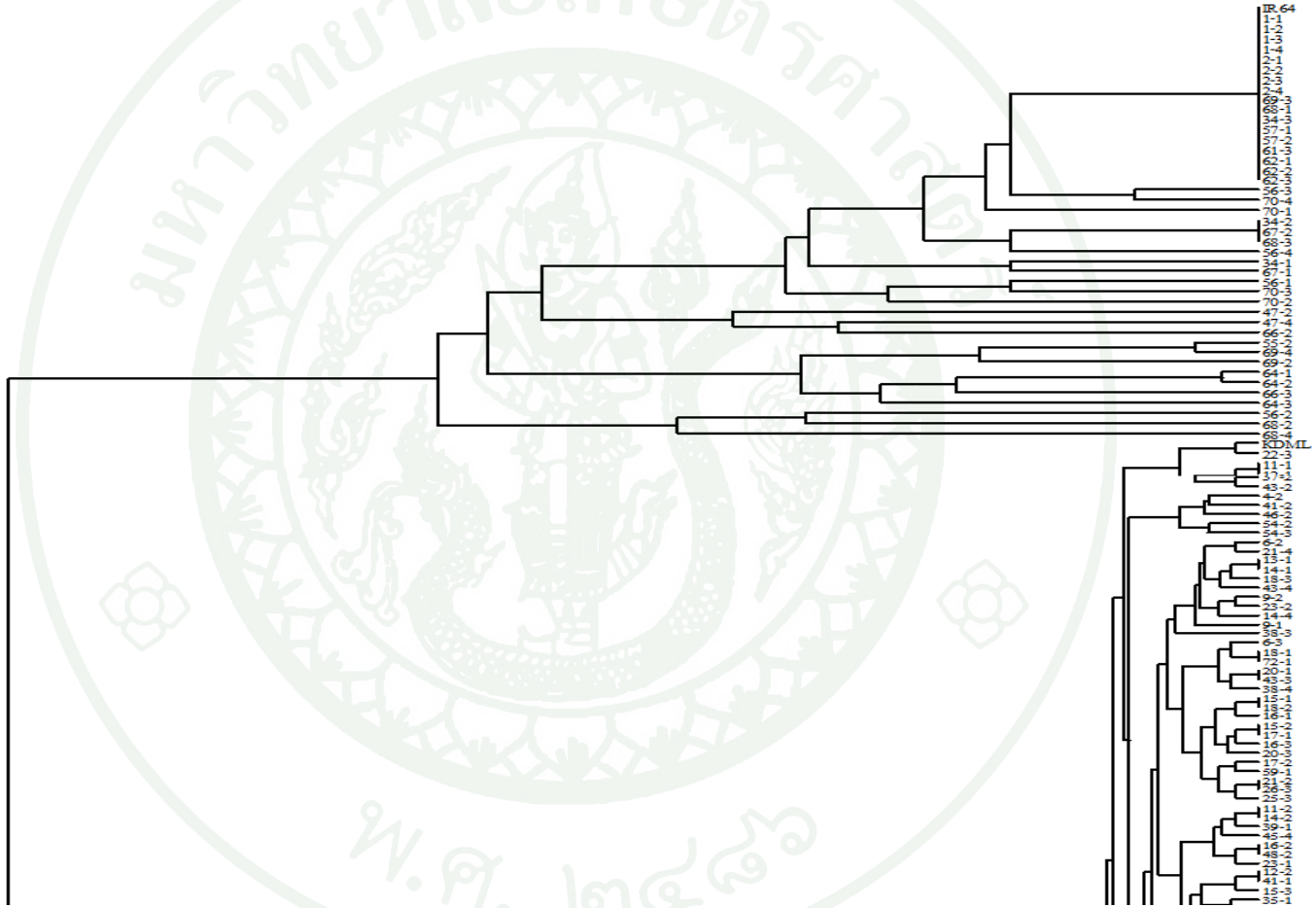
เมื่อนำเชื้อโรคไหม้ที่ใช้ทดสอบจำนวน 6 สายพันธุ์มาจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยอาศัยค่าความรุนแรงของเชื้อพบว่าดัชนีความรุนแรงของการเกิดโรคไหม้ของเชื้อดังกล่าวไม่แตกต่างกัน โดยมีค่า ดัชนีความรุนแรงในการเกิดโรค อยู่ในช่วง 0.62 – 0.70 (ภาพที่ 12)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



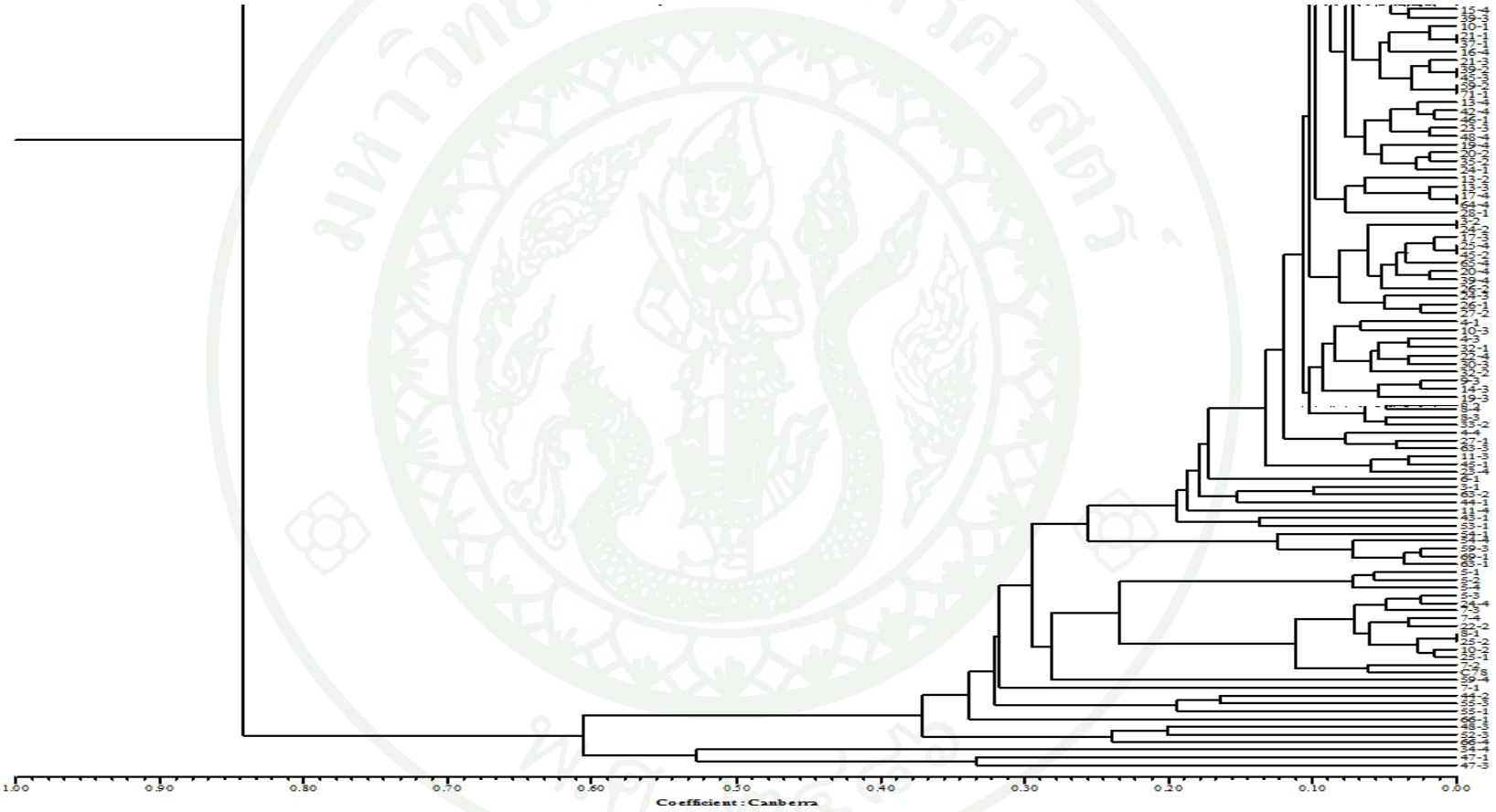
ภาพที่ 11 แผนภาพรวมแสดงความสัมพันธ์ในความต้านทานโรคไหม้ของข้าว 192 สายพันธุ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



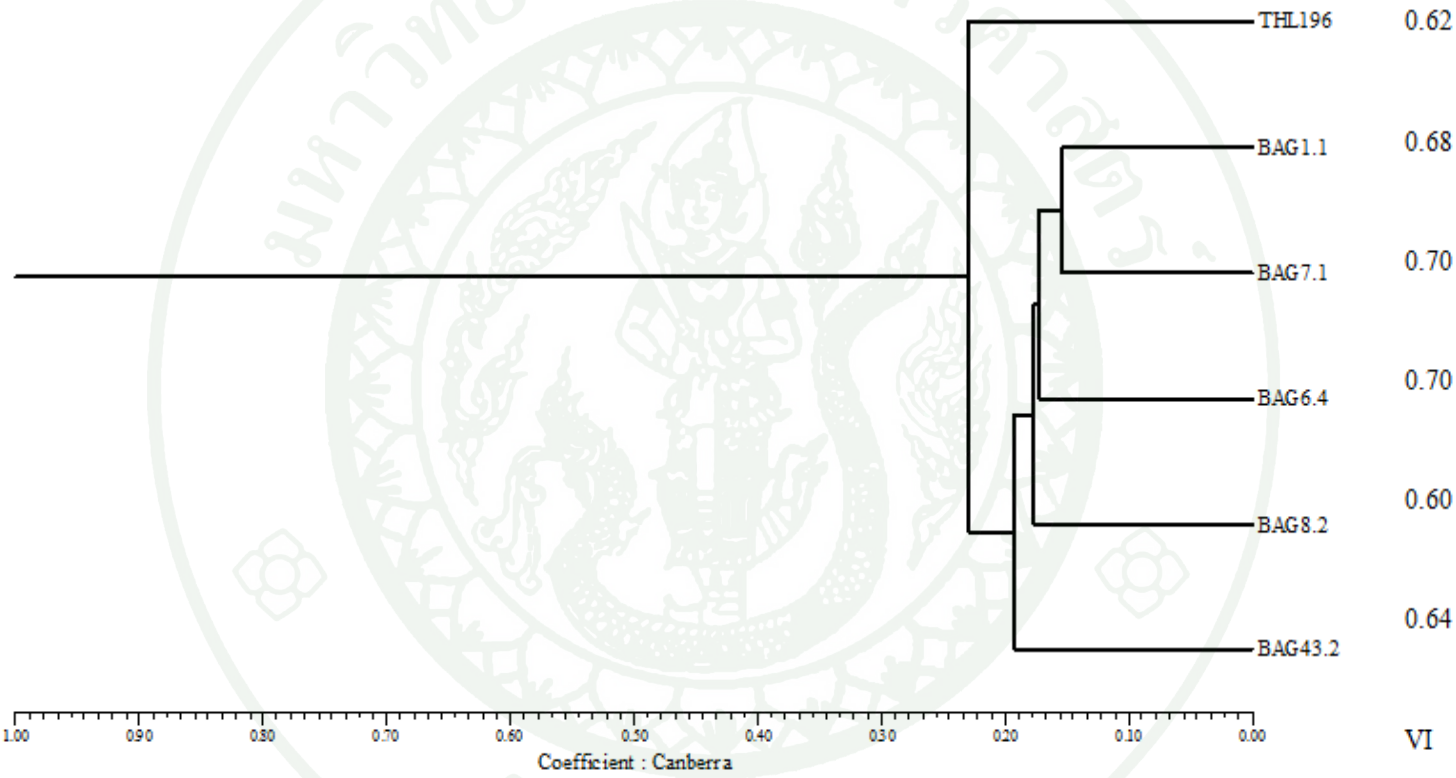
ภาพที่ 12 แผนภาพแสดงรายละเอียดความสัมพันธ์ในความต้านทานโรคไหม้ของข้าว 192 สายพันธุ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 12 (ต่อ) แผนภาพแสดงรายละเอียดความสัมพันธ์ในความต้านทานโรคไหม้ของข้าว 192 สายพันธุ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

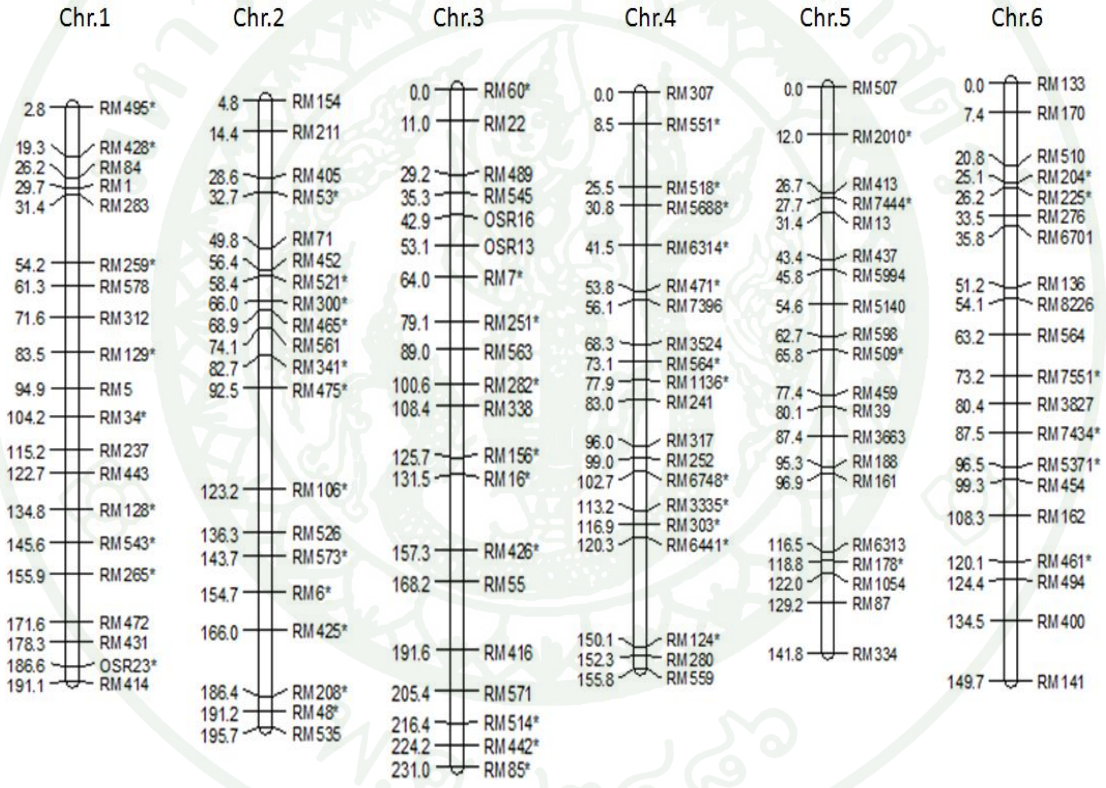


ภาพที่ 13 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ในความรุนแรงของเชื้อโรคไหม้ 6 สายพันธุ์และค่าดัชนีความรุนแรงของเชื้อโรคไหม้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การประเมินด้วยความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวพันธุ์ IR64 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

จากการประเมินเพื่อหาความแตกต่างพันธุกรรม (polymorphism) ระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ IR64 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR จำนวน 230 เครื่องหมาย ที่มีตำแหน่งกระจายตัวอยู่บนโครโมโซมต่างๆ โครโมโซมละ 15-20 เครื่องหมาย พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวพันธุ์ IR64 มีจำนวน 93 เครื่องหมาย (ตารางที่ 2 ตารางผนวกที่ ก3 ภาพที่ 13)



(ก)

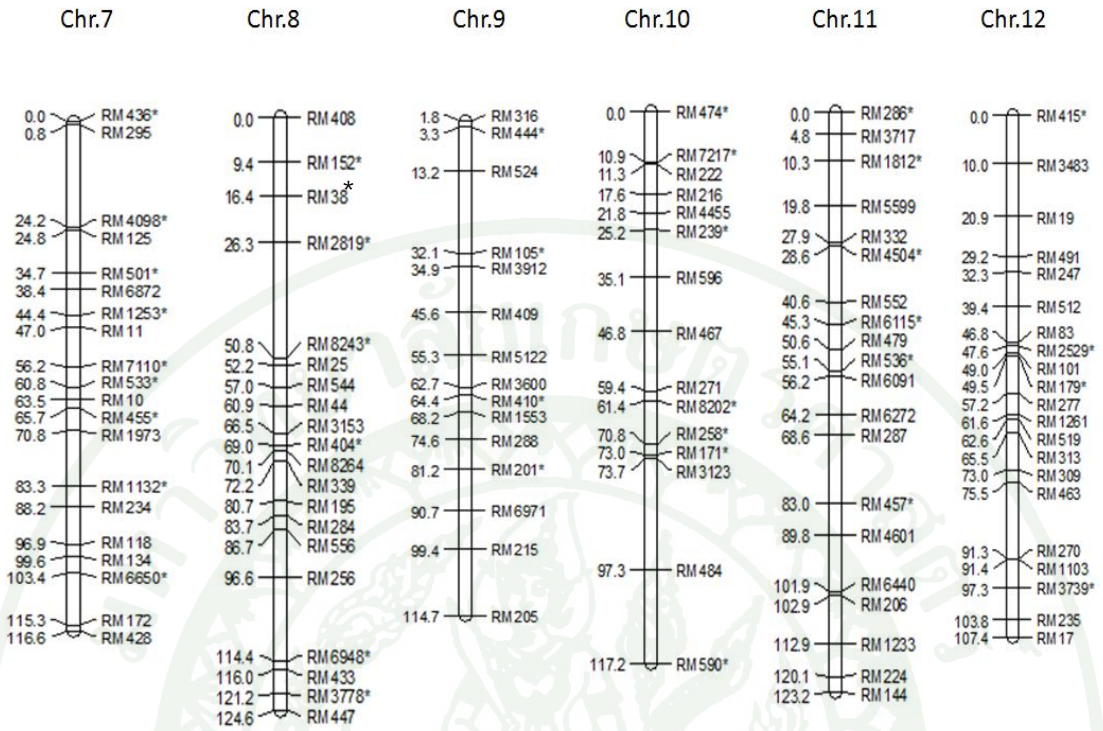
ภาพที่ 14 รายชื่อและตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR (McCouch *et al*., 1997)

(ก) รายชื่อและตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR บนโครโมโซมที่ 1- 6

(ข) รายชื่อและตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR บนโครโมโซมที่ 7 – 12

* เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ – แม่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(ข)

ภาพที่ 14 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวพันธุ์ IR64 ในการทำ PAGE

โครโมโซมที่	จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอ	จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105กับข้าวพันธุ์ IR64	เปอร์เซนต์ความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105กับข้าวพันธุ์ IR64
1	20	6	30
2	20	14	70
3	20	10	50
4	20	12	60
5	20	5	25
6	20	6	30
7	20	9	45
8	20	6	30
9	15	4	26.67
10	15	7	46.67
11	20	6	30
12	20	10	50
รวม	230	93	40.44

คัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่จำนวน 93 เครื่องหมาย เพื่อนำมาประเมินพันธุกรรมในลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 จำนวน 10 ต้นที่คัดเลือกไว้ โดยภาพหลังจากการทำ PAGE อ่านผลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ได้ แล้วบันทึกเป็นลักษณะพันธุกรรมที่เหมือนพันธุ์พ่อหรือแม่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การประเมินประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 ที่คัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวพันธุ์ IR64

จากการทดสอบความต้านทานโรคไหม้ในประชากรประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 ทั้งหมดจำนวน 192 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3 ตารางผนวกที่ ก4) สามารถคัดเลือกข้าวที่ต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ทุกสายพันธุ์ได้ 10 แฟมมิลี่ และคัดเลือกเพียง 1 สายพันธุ์ เพื่อเป็นตัวแทนของแต่ละแฟมมิลี่ ได้แก่สายพันธุ์ที่ 1-1, 2-1, 5-1, 34-1, 47-1, 61-1, 62-2, 67-1, 68-3 และ 70-1 แล้วนำสายพันธุ์เหล่านี้มาประเมินด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวพันธุ์ IR64 เมื่อนำสายพันธุ์ที่ต้านทานมาทดสอบโดยใช้เครื่องหมายดีอ็นเอแบบ SSR จำนวน 93 เครื่องหมายเพื่อจำแนกตำแหน่งบนโครโมโซมที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคไหม้ ซึ่งถ้ามีอัลลีลที่เหมือนกับพันธุ์ IR64 แสดงว่ามียีนต้านทานที่อยู่ใกล้กับเครื่องหมายดีเอ็นเอนั้นๆ จากการทดสอบในสายพันธุ์ที่ต้านทานพบว่ามีเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 4 เครื่องหมาย คือ RM208 RM85 RM38 และ RM179 ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวให้ผลการประเมินจีโนไทป์ที่สอดคล้องกับข้อมูลฟีโนไทป์ทั้งหมด (ตารางที่ 3)

การประเมิน การประเมินประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ผลการประเมินจีโนไทป์ที่สอดคล้องกับข้อมูลฟีโนไทป์

ยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ IR64 ได้มีการศึกษาไว้แล้วว่าวางตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 2 และ 12 โดยอยู่ใกล้กับเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM208 และ RM179 ตามลำดับ และยังพบอีกว่ายีนต้านทานที่อยู่บนโครโมโซมที่ 12 เป็นยีนหลัก (Sirithunya *et al.,* 2004) จากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM208 RM85 RM38 และ RM179 ในการตรวจสอบยีนบนโครโมโซมที่ 2, 3, 8 และ 12 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM85 ให้ค่าพันธุกรรมเหมือนกับข้าวพันธุ์ IR64 สูงที่สุดในประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM38 และ RM179 ให้ค่าพันธุกรรมเหมือนกับข้าวพันธุ์IR64 เป็นลำดับที่สองและเครื่องหมาย RM208 เป็นลำดับสุดท้าย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM85 มีตำแหน่งที่อยู่ใกล้กับยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์IR64 มากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM38 RM179 RM208 จึงทำให้พันธุกรรมของข้าวพันธุ์IR64 ปรากฏในประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC2F6 ที่ต้านทานทุกต้น (ตารางที่ 3)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้

จากการทดสอบความต้านทานโรคไหม้ของประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 สามารถคัดเลือกและแบ่งกลุ่มสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้ 4 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่มีอัลลีลเหมือนกับพันธุ์ IR64 ทั้ง 4 เครื่องหมายคือ RM208 RM85 RM38 และ RM179 ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ 1-1, 2-1, 34-1 โดยมีค่าความต้านทานโรคแบบกว้างเท่ากับ 1 ทั้งหมด

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่มีอัลลีลเหมือนกับพันธุ์ IR64 จำนวน 3 เครื่องหมาย (RM85 RM38 และ RM179) ประกอบด้วยสายพันธุ์ที่ 61-1, 62-1, 67-1 โดยมีค่าความต้านทานโรคแบบกว้างเท่ากับ 1 ทั้งหมด

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่มีอัลลีลเหมือนกับพันธุ์ IR64 จำนวน 2 เครื่องหมาย (RM85 และ RM179) ประกอบด้วยสายพันธุ์ 62-3, 64-3, 68-2, 70-3 โดยมีค่าความต้านทานโรคแบบกว้างเท่ากับ 1 ทั้งหมด

และกลุ่มที่ 4 มีอัลลีลเหมือนกับพันธุ์ IR64 จำนวน 2 เครื่องหมายคือ RM85 และ RM38 สายพันธุ์ที่ 68-3 เพียงสายพันธุ์เดียวโดยมีค่าความต้านทานโรคแบบกว้างเท่ากับ 1 ในขณะที่สายพันธุ์ที่ 56-2 และ 57-2 มีอัลลีลเหมือนพันธุ์ IR64 เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล RM208 และ RM85 และสายพันธุ์ที่ 70-1 มีอัลลีลเหมือนพันธุ์ IR64 เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุล RM208 และ RM38 จะสามารถต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ได้เพียง 3 สายพันธุ์เท่านั้น โดยมีค่าความต้านทานโรคแบบกว้างเท่ากับ 0.50

สำหรับสายพันธุ์ที่ 5-1 จากการทดสอยด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ 4 เครื่องหมายดังกล่าว พบว่าไม่มีอัลลีลที่เหมือนกับพันธุ์ IR64 ทั้ง 4 เครื่องหมาย แต่สามารถต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้สายพันธุ์ BAG43.2 ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ดังกล่าวมีตำแหน่งยีนต้านทานอยู่บนโครโมโซมอื่นที่ยังไม่สามารถตรวจพบ และประชากรที่นำมาวิเคราะห์อาจมีจำนวนที่น้อยเกินไป (ตารางที่ 3)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 ผลการประเมินประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 ทั้งหมดด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ 4 เครื่องหมาย เปรียบเทียบกับข้อมูลความต้านทานโรคไหม้

พันธุ์/สายพันธุ์	เครื่องหมายดีเอ็นเอ				สายพันธุ์เชื้อโรคไหม้						BSR
	RM208	RM85	RM38	RM179	THL196	BAG1.1	BAG7.1	BAG82	BAG432	BAG64	
KDML	1	1	1	1	6	5	6	6	6	6	0
IR64	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	1
1-1	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	1
2-1	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	1
5-1	1	1	1	1	0	5	5	4	0	4	0.33
34-1	2	2	2	2	0	0	0	1	0	0	1
47-1	1	2	1	1	2	2	1	1	2	1	1
61-1	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	1
62-2	1	2	1	2	0	0	0	0	0	0	1
67-1	1	2	1	2	1	0	0	1	0	0	1
68-3	1	2	1	2	0	0	0	0	0	1	1
70-1	2	2	1	1	0	0	1	0	0	0	1
1-2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	1
1-3	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	1
1-4	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	1
2-2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	1
2-3	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	1
2-4	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	1
3-1	1	1	1	1	4	5	4	1	4	3	0.17
3-2	1	1	1	1	4	4	4	2	4	4	0.17
4-1	1	1	1	1	3	4	4	4	3	4	0
4-2	1	1	1	1	4	3	4	4	5	5	0
4-3	1	1	1	1	3	6	4	5	5	4	0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 (ต่อ)

พันธุ์/สายพันธุ์	เครื่องหมายดีเอ็นเอ				สายพันธุ์เชื้อโรคไหม้						BSR
	RM208	RM85	RM38	RM179	THL196	BAG1.1	BAG7.1	BAG8.2	BAG43.2	BAG6.4	
4-4	1	1	1	1	2	4	4	5	4	4	0.17
5-2	1	1	1	1	0	4	6	4	0	4	0.33
5-3	1	1	1	1	0	5	5	4	4	4	0.33
5-4	1	1	1	1	0	4	5	3	0	5	0.17
6-1	2	1	1	1	4	1	6	5	5	4	0.17
6-2	1	1	1	2	4	5	4	4	6	5	0
6-3	1	1	1	1	4	5	5	5	3	5	0
7-1	1	1	1	1	3	1	4	1	3	5	0.33
7-2	1	1	1	1	0	4	3	4	5	4	0.17
7-3	1	1	1	1	0	5	5	5	5	4	0.17
7-4	1	1	1	1	0	4	5	5	4	5	0.17
8-1	1	1	1	1	0	6	6	5	5	5	0.17
8-2	1	1	1	1	3	5	5	5	5	6	0
8-3	1	1	1	1	3	5	6	5	4	5	0
8-4	1	1	1	1	2	5	5	5	5	5	0.17
9-1	1	1	1	1	4	6	5	4	6	5	0
9-2	1	1	1	1	4	5	6	4	6	5	0
9-3	1	1	1	1	5	6	5	4	4	5	0
10-1	1	1	1	1	4	4	4	5	5	5	0
10-2	1	1	1	1	4	5	6	4	5	5	0
10-3	1	1	1	1	3	3	4	4	4	5	0
11-1	1	1	1	1	5	5	6	5	5	4	0
11-2	1	1	1	1	4	4	5	4	5	4	0
11-3	1	1	1	1	4	4	5	4	2	4	0.17

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 (ต่อ)

พันธุ์/สายพันธุ์	เครื่องหมายดีเอ็นเอ				สายพันธุ์เชื้อโรคไหม้						BSR
	RM208	RM85	RM38	RM179	THL196	BAG1.1	BAG7.1	BAG8.2	BAG43.2	BAG6.4	
11-4	1	1	1	1	4	6	6	5	1	5	0.17
12-1	1	1	1	1	5	5	6	5	5	4	0
12-2	1	1	1	1	5	4	5	5	6	5	0
13-1	1	1	1	1	4	5	5	4	5	5	0
13-2	1	1	1	1	6	4	6	4	4	4	0
13-3	1	1	1	1	5	5	6	4	5	3	0
13-4	1	1	1	1	4	4	6	5	4	5	0
14-1	1	1	1	1	4	5	5	4	5	5	0
14-2	1	1	1	1	4	4	5	4	5	4	0
14-3	1	1	1	1	4	6	5	4	4	5	0
14-4	1	1	1	1	4	5	6	4	4	5	0
15-1	1	1	1	1	5	5	5	4	5	4	0
15-2	1	1	1	1	4	5	5	4	5	4	0
15-3	1	1	1	1	5	4	5	5	5	5	0
15-4	1	1	1	1	6	4	5	4	5	5	0
16-1	1	1	1	1	5	5	6	4	5	4	0
16-2	1	1	1	1	4	4	5	4	5	5	0
16-3	1	1	1	1	4	6	5	4	5	4	0
16-4	1	1	1	1	4	6	4	5	5	5	0
17-1	1	1	1	1	4	5	5	4	5	4	0
17-2	1	1	1	1	5	6	5	4	4	4	0
17-3	1	1	1	1	4	4	5	3	4	4	0
17-4	1	1	1	1	5	5	6	4	4	3	0
18-1	1	1	1	1	4	5	5	5	4	4	0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 (ต่อ)

พันธุ์/สายพันธุ์	เครื่องหมายดีเอ็นเอ				สายพันธุ์เชื้อโรคไหม้						BSR
	RM208	RM85	RM38	RM179	THL196	BAG1.1	BAG7.1	BAG8.2	BAG43.2	BAG6.4	
19-3	1	1	1	1	3	6	3	4	4	5	0
19-4	1	1	1	1	4	5	6	5	3	4	0
20-1	1	1	1	1	5	5	5	5	4	4	0
20-2	1	1	1	1	4	5	5	4	3	4	0
20-3	1	1	1	1	4	5	6	4	5	4	0
20-4	1	1	1	1	5	4	4	3	4	4	0
21-1	1	1	1	1	4	4	4	5	4	5	0
21-2	1	1	1	1	4	5	5	4	4	4	0
21-3	1	1	1	1	4	5	4	4	4	4	0
21-4	1	1	1	1	4	5	4	4	5	5	0
22-2	1	1	1	1	0	6	5	5	4	5	0.17
22-3	1	1	1	1	5	6	6	6	5	5	0.17
22-4	1	1	1	1	3	6	5	4	5	4	0
23-1	1	1	1	1	4	4	6	4	5	5	0
23-2	1	1	1	1	4	5	6	4	5	5	0
23-3	1	1	1	1	4	5	6	4	3	5	0
23-4	1	1	1	1	5	5	6	3	2	4	0
24-1	1	1	1	1	5	4	5	4	3	4	0
24-2	1	1	1	1	4	4	4	2	4	4	0.17
24-3	1	1	1	1	4	5	5	3	5	3	0
24-4	1	1	1	1	0	5	5	3	4	4	0.17
25-1	1	1	1	1	0	6	6	4	5	5	0.17
25-2	1	1	1	1	0	6	6	5	5	5	0.17
25-3	1	1	1	1	4	6	5	4	4	4	0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 (ต่อ)

พันธุ์/สายพันธุ์	เครื่องหมายดีเอ็นเอ				สายพันธุ์เชื้อโรคไหม้						BSR
	RM208	RM85	RM38	RM179	THL196	BAG1.1	BAG7.1	BAG8.2	BAG43.2	BAG64	
25-4	1	1	1	1	4	4	6	3	4	4	0
26-1	1	1	1	1	4	5	4	3	4	3	0
26-2	1	1	1	1	4	6	5	3	4	4	0
26-3	1	1	1	1	4	5	5	4	4	4	0
27-1	1	1	1	1	3	4	4	5	4	3	0
27-2	1	1	1	1	4	5	4	4	4	3	0
28-1	1	1	1	1	5	4	5	4	4	2	0.17
30-3	1	1	1	1	3	4	5	4	5	4	0
32-1	1	1	1	1	3	4	4	5	5	4	0
32-2	1	1	1	1	3	4	3	4	5	4	0
33-2	1	1	1	1	3	5	6	6	6	5	0
34-2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	1	1
34-3	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	1
34-4	2	2	2	2	1	0	0	1	1	1	1
35-1	1	1	1	1	5	4	5	5	5	4	0
35-2	1	1	1	1	4	4	5	4	3	4	0
37-1	1	1	1	1	4	4	4	5	4	5	0
37-2	1	1	1	1	5	6	5	6	5	4	0
38-3	1	1	1	1	5	5	6	4	5	6	0
38-4	1	1	1	1	5	5	5	5	4	5	0
39-1	1	1	1	1	4	4	6	4	5	4	0
39-2	1	1	1	1	4	5	4	4	4	5	0
39-3	1	1	1	1	5	4	4	4	5	5	0
39-4	1	1	1	1	4	4	4	3	4	4	0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 (ต่อ)

พันธุ์/สายพันธุ์	เครื่องหมายดีเอ็นเอ				สายพันธุ์เชื้อโรคไหม้						BSR
	RM208	RM85	RM38	RM179	THL196	BAG1.1	BAG7.1	BAG8.2	BAG43.2	BAG6.4	
41-1	1	1	1	1	5	4	5	5	6	5	0
41-2	1	1	1	1	4	3	6	4	5	5	0
42-4	1	1	1	1	4	4	6	4	4	5	0
43-1	1	1	1	1	5	4	2	3	5	4	0.17
43-2	1	1	1	1	5	6	5	5	5	4	0
43-3	1	1	1	1	5	5	5	5	4	4	0
43-4	1	1	1	1	4	5	5	5	5	5	0
44-1	1	1	1	1	4	4	3	2	3	3	0.17
44-2	1	1	1	1	5	3	3	2	0	3	0.33
45-1	1	1	1	1	5	4	6	4	2	4	0.17
45-2	1	1	1	1	4	4	6	3	4	4	0
45-3	1	1	1	1	4	5	4	4	4	5	0
45-4	1	1	1	1	4	4	5	5	5	4	0
46-1	1	1	1	1	4	4	5	4	4	5	0
46-2	1	1	1	1	4	3	5	5	5	5	0
47-2	1	1	1	1	0	1	1	2	0	0	1
47-3	1	1	1	1	2	1	2	2	0	1	1
47-4	1	1	1	1	0	0	2	2	1	0	1
48-1	1	1	1	1	5	4	5	4	5	4	0
48-2	1	1	1	1	4	4	5	4	5	5	0
48-3	1	1	1	1	4	0	4	4	4	5	0.17
48-4	1	1	1	1	4	4	6	4	3	5	0
52-3	1	1	1	1	3	0	3	2	2	3	0.5
53-1	1	1	1	1	3	3	2	3	2	4	0.33

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 (ต่อ)

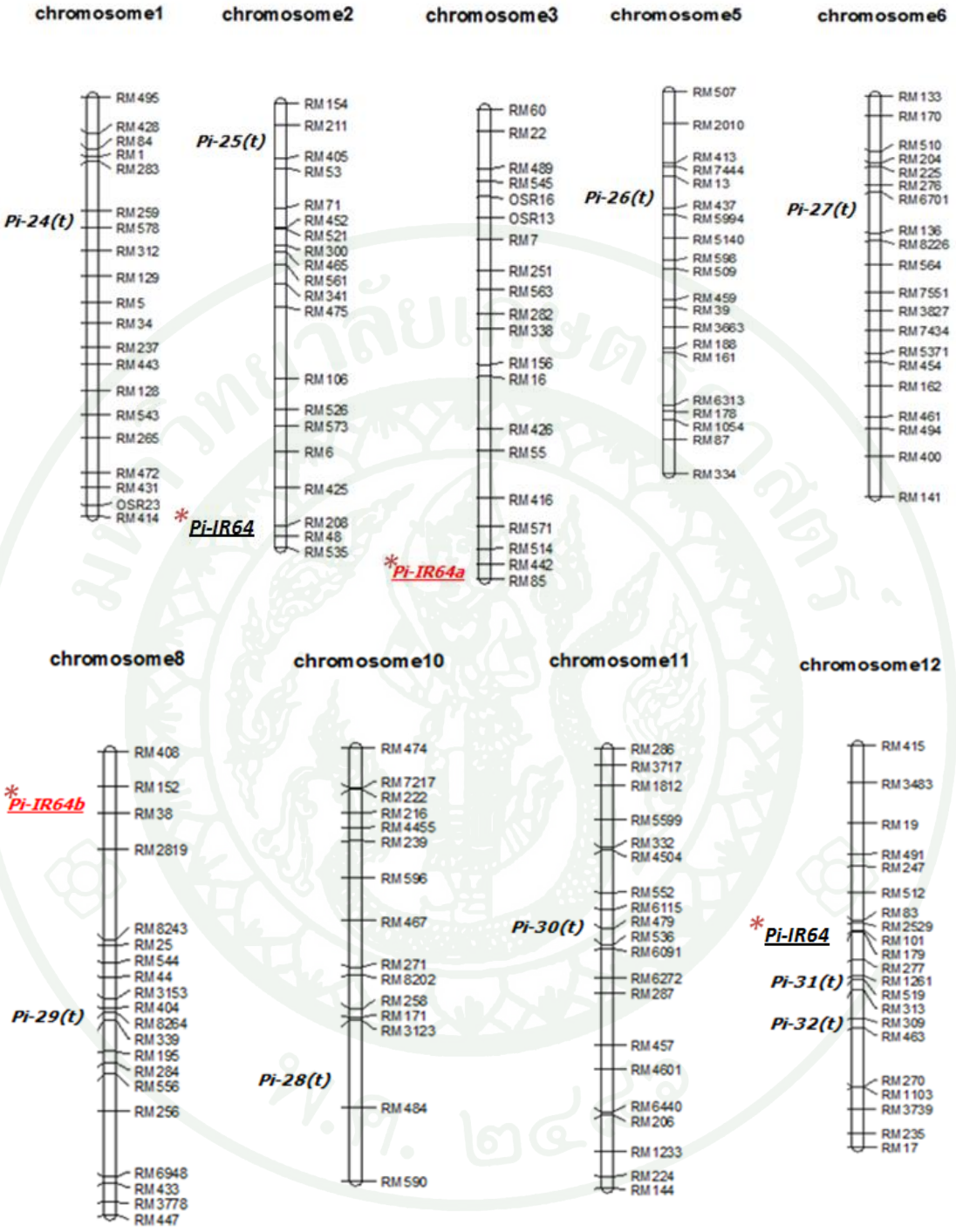
พันธุ์/สายพันธุ์	เครื่องหมายดีเอ็นเอ				สายพันธุ์เชื้อโรคไหม้						BSR
	RM208	RM85	RM38	RM179	THL196	BAG1.1	BAG7.1	BAG82	BAG432	BAG64	
54-1	1	1	1	1	5	2	6	0	4	4	0.33
54-2	1	1	1	1	4	2	5	4	5	4	0.17
54-3	1	1	1	1	4	3	5	4	5	4	0
54-4	1	1	1	1	5	4	4	0	5	5	0.17
55-1	1	1	1	2	5	5	1	5	0	4	0.33
55-2	1	1	1	2	5	4	0	0	0	3	0.5
55-3	1	1	1	1	4	4	5	4	0	4	0.17
56-1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
56-2	2	1	1	2	0	3	0	3	2	0	0.67
56-3	1	1	1	1	0	0	0	0	3	0	0.83
56-4	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
57-1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
57-2	2	1	1	2	0	0	0	0	0	0	1
59-1	1	1	1	1	5	5	5	4	4	4	0
59-2	1	1	1	1	4	4	4	4	4	4	0
59-3	1	1	1	1	4	4	4	0	3	4	0.17
59-4	1	1	1	1	0	0	4	4	4	3	0.33
62-1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
62-3	1	1	2	2	0	0	0	0	0	0	1
63-1	1	1	1	1	4	4	3	0	4	4	0.17
63-2	1	1	1	1	5	4	5	1	5	4	0.17
63-3	1	1	1	1	5	4	4	5	4	3	0
64-1	1	1	1	1	4	0	0	0	0	4	0.67
64-2	1	1	2	2	3	0	0	0	0	4	0.67

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 (ต่อ)

พันธุ์/สายพันธุ์	เครื่องหมายดีเอ็นเอ				สายพันธุ์เชื้อโรคไหม้						BSR
	RM208	RM85	RM38	RM179	THL196	BAG1.1	BAG7.1	BAG8.2	BAG43.2	BAG64	
64-3	1	1	2	2	4	0	0	0	4	3	0.5
64-4	1	1	1	1	5	5	6	4	4	3	0
65-4	1	1	1	1	4	3	5	3	4	4	0
66-1	1	1	1	1	6	3	6	3	3	0	0.17
66-2	2	1	1	2	0	0	6	3	0	0	0.67
66-3	1	1	1	1	3	0	0	3	0	3	0.5
66-4	1	1	1	1	4	0	4	2	0	4	0.5
67-2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
68-1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
68-2	1	1	2	2	0	1	0	0	1	0	1
68-4	1	1	1	1	0	1	0	1	3	1	0.83
69-1	1	1	1	1	4	4	4	0	4	4	0.17
69-2	1	1	1	2	4	4	0	0	4	4	0.33
69-3	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
69-4	1	1	1	1	4	4	0	0	0	4	0.5
70-2	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1
70-3	1	1	2	2	1	0	1	0	0	0	1
70-4	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1
71-1	1	1	1	1	4	4	4	4	4	4	0
72-1	1	1	1	1	4	5	5	5	4	4	0
73-1	1	1	1	1	4	4	5	5	5	4	0
73-2	1	1	1	1	4	4	5	4	5	5	0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 15 แสดงตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ 4 ตำแหน่งที่พบบนโครโมโซมที่ 2, 3, 8 และ 12

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคไหม้ รวมทั้งสิ้น 4 จังหวัด ได้แก่ พิษณุโลก ชัยภูมิ ลพบุรี และปทุมธานี สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 รวมทั้งสิ้น 6 ตัวอย่าง และแยกเก็บเชื้อราแบบสปอร์เดี่ยวรวมทั้งสิ้น 17 สายพันธุ์ ซึ่งพื้นที่ที่มีการเก็บรวบรวมเชื้อโรคไหม้ พบว่าส่วนใหญ่นิยมปลูกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เมื่อพิจารณาถึงความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ พบว่าเชื้อที่ทดสอบที่มีแหล่งมาจากพื้นที่ปลูกข้าวแตกต่างกันนั้นมีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคในข้าวได้แตกต่างกัน

2. จากการวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ IR64 โดยใช้ประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 ที่เป็น backcross inbred lines (BIL) พบว่ามียีนต้านทานโรคไหม้ทั้งหมด 4 ตำแหน่งคือ บนโครโมโซมที่ 2, 3, 8, 12 โดยมีระดับความสำคัญของตำแหน่งยีนต้านทานดังนี้ ตำแหน่งยีนที่อยู่โครโมโซมที่ 3 เป็นตำแหน่งที่สำคัญที่สุดรองลงมาคือตำแหน่งที่อยู่บนโครโมโซม 8 หรือ 12 โดยยีนที่วางตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 3 และ 8 เป็นตำแหน่งใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อนและพบว่ายีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ IR64 มีอย่างน้อย 4 ตำแหน่ง

3. ตำแหน่งยีนที่พบทั้งหมด 4 ตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 2, 3, 8, 12 วางตัวอยู่ใกล้กับเครื่องหมายดีอ็นเอ RM208 RM85 RM38 และ RM179 ตามลำดับ ซึ่งระบุได้ว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวมีความเฉพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

1. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ควรมีการคัดเลือกแหล่งพันธุกรรมที่จะนำมาใช้เป็นข้าวพันธุ์ให้ความต้านทาน และควรมีการประเมินความต้านทานเชื้อโรคไหม้ในลูกผสมกลับทุกๆชั่วที่ได้ และถ้ามีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกต้นลูกผสมกลับที่ได้ จะทำให้เกิดความแม่นยำสูงในการคัดเลือก

2. สายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่มีความรุนแรงมากๆ จะสามารถเข้าทำลายข้าวพันธุ์ที่อ่อนแอต่อเชื้อโรคไหม้ได้หลายพันธุ์

3. ในการทดสอบความต้านทานเชื้อโรคไหม้ ควรมีการใช้เชื้อโรคไหม้หลายๆสายพันธุ์เพื่อให้เกิดความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ และให้ได้ข้าวที่มีความต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง คือ สามารถต้านทานเชื้อโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์

4. ในการพัฒนาประชากรเพื่อการวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนควรมีจำนวนประชากรให้เพียงพอต่อการวิเคราะห์หาตำแหน่งยีน ในการศึกษาครั้งนี้พบตำแหน่งยีนที่ต้านทานโรคไหม้ทั้งหมด 4 ตำแหน่ง จากการใช้ประชากรทั้งหมด 192 สายพันธุ์ซึ่งเป็นจำนวนที่น้อยเกินไปเพราะเนื่องจากมีสายพันธุ์ที่ 5-1 ที่ยังไม่สามารถหาตำแหน่งยีนที่ต้านทานได้พบ

5. ในการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้จะต้องเพียงพอต่อการคัดเลือกในลักษณะนั้นๆ และควรจะใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในจำนวนมากที่สุดเท่าที่มีทรัพยากรอยู่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กมรินทร์ พรหมรัตน์รักษ์. 2548. **ผลของช่วงแสงต่อการเปลี่ยนแปลงด้านสัณฐานและกายวิภาคของปลายยอดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และสุพรรณบุรี 1**. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กรมการข้าว. 2538. **พันธุ์ข้าวและธัญพืชเมืองหนาว.** กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

กรมการข้าว. 2551. **ข้าว: เทคโนโลยีการปลูก และการจัดการหลังการเก็บเกี่ยว.** กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

กรมวิชาการเกษตร. 2539. **พันธุ์ข้าวไทย**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

กรมวิชาการเกษตร. 2546. **ข้าวและธัญพืชเมืองหนาวพันธุ์ดี**; 30 ปี กรมวิชาการเกษตร.เอกสารวิชาการลำดับที่ 16/2546. สถาบันวิจัยข้าว, กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. **ยุทธศาสตร์ข้าวปี 2547-2551**. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2519. **หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช.** ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2551. **ปรับปรุงพันธุ์พืช: พื้นฐานวิธีการและแนวคิด.** ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ชวาลา บุรณศิริ. 2531. **โรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา.** คณะเทคโนโลยีการเกษตรสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

ทัศนีย์ สงวนสัจ. 2540. **บทบาทของพันธุกรรมต้านทานโรคและแมลงกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของไทย.** เอกสารวิชาการ. ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประพาส วีระแพทย์. 2531**. ความรู้เรื่องข้าว.** พิมพ์ครั้งที่ 3. โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ.

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจ์, พยอม โคเบลลี่, อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ, ถนอมจิตร์ ฤทธิ์มนตรี, กุลชนา เกศสุวรรณ, ชนสิริน กลิ่นมณี และสงวน เที่ยงดีฤทธิ์. 2550. การตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทย. **วารสารวิชาการข้าว** 1 (1): 52-64.

ลัดดาวัลย์ กรรณนุช. 2550. **ข้าว การผลิตและการค้า**. กรมการข้าว, กรุงเทพฯ.

วัชระ ภูรีวิโรจน์กุล. 2534. **การปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคแมลง**. สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี, ปทุมธานี.

วาสนา วรมิศร์. 2538. **การปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมของไทย.** ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2528. **การปรับปรุงพันธุ์พืช.** ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรีพร เกตุงาม. 2546**.** เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช : DNA Markers in Plant Breeding**. วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี** 5: 37-54.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. **สถิติการเกษตรของประเทศไทยปี 2552**. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เสาวลักษณ์ อัคราช. 2554. **การปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานโรคไหม้โดยวิธีผสมกลับ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล และนันทินี ศรีจุมปา. 2542. โรคใบไม้ของต้นหงส์เหิร ก้ามกุ้งสีทอง ข้าว และวัชพืช. **เพื่อนเกษตร** 10 (10): 34-40.

อรรัตน์ มงคลพร. 2548. **เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์**. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน, นครปฐม.

อภิชาติ วรรณวิจิตร. 2540. **รายงานประจำปี 2540 โครงการวิจัย มหาวิยาลัยเกษตรศาสตร์.**

อภิชาติ วรรณวิจิตร, ธานี ศรีวงศ์ชัย และธีรยุทธ ตู้จินดา. 2553. **การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ในข้าว.** KURI. http://www.rdi.ku.ac.th/kasetresearch52/08-intregration /Apichart / intregration_00.html: 18 มีนาคม 2553.

อภิชาติ วรรณวิจิตร, สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง และธีรยุทธ ตู้จินดา. 2544. **วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับข้าวไทย:** เทคโนโลยีชีวภาพกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าว. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

Africa Rice Center. 2009. Marker assisted selection (MAS). **Assesing Technology Impact** 40 (2): 19-21.

Agrios ,G.N. 1988. **Plant Pathology**. 3rd ed. Academic press, Inc., London.

Allard, R.W. 1999. **Principles of Plant Breeding**. 2nd ed. Wiley, Inc., New York.

Ballini E., M. Jean-Benot, D. Gatan, P. Adam, C. Brigitte, N. Jean-Loup and T. Didier. 2008. A Genome-Wide Meta-Analysis of Rice Blast Resistance Genes and Quantitative Trait Loci Provides New Insights into Partial and Complete Resistance. **Molecular Plant-Mcrobe Interactions** 21: 859-868.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Benbouza, H., J.M. Jacquemin, J.P. Baudoin and G. Mergeai. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 10 (2): 77–81.**

Bonman, J.M., G.S. Khush and R.J. Nelson. 1992. Breeding rice for resistance to pest. **Annual Review of Phytopathology** 30: 507-528.

Brown, S.M., A. K. Szewc-McFadden and S. Kresovish. 1996. Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis, pp. 147-159. *In* P.P. Jauhar, eds. **Methods of plant genome analysis: Their merits and pitfalls**. CRS Press, Boca raton.

Chang, T.T. 1976. The origin, evolution, cultivation, dissemination and diversification of Asian and African rice. **Euphytica** 25: 435-441.

Collard, B. and D . Mackill. 2010. Marker-assisted breeding for rice improvement. **Euphytica** 142: 123–146.

Collard, B.C.Y., M.Z.Z. Jahufer, J.B. Brouwer and E.C.K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica** 142: 169–196.

Fuentes J.L., F.J. Correa-Victoria, F. Escobar, G. Prado, G. Aricapa, M.C. Duque and J. Tohme. 2008. Identification of microsatellite markers linked to the blast resistance gene *Pi-1(t)* in rice. **Euphytica** 160: 295-304.

Fukuoka, S. and K. Okuno. 2001. QTL analysis and mapping of *pi21*, a recessive gene for field resistance to rice blast in Japanese upland rice. **Theoretical and Applied Genetics** 103: 185-190.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Fukuoka S., K. Ebana, T. Yamamoto and M. Yano. 2010. Intregration of genomics into rice breeding. **Rice** 3: 131-137

Hackett, C.A. 2002. Statistical methods for QTL mapping in cereals. **Plant Molecular Biology** 48: 585 - 599.

Hebert, T.T. 1971. The perfect stage of *Pyricularia grisea*. **Phytopathology** 61: 83-87.

Jairin, J., S. Teangdeerith, P. Leelagud, J. Kothcharerk, K. Sansen, M. Yi, A. Vanavichit, T. toojinda. 2009. Development of rice introgression lines with brown planthopper resistance and KDML 105 grain quality characteristics through marker-assisted selection. **Field Crops Research** 110: 263-271.

Jongdee, B., G. Pantuwan and T. Toojinda. 2008. Integration of conventional and marker-assisted selections (MAS) under rainfed lowland rice breeding program for north and northeast Thailand. p. 451. *In* **Rice and temperate cereal crops annual conference (2008)**. 8-10 April 2008, Bangkok, Thailand.

Kaeppler, S.M., L. Phillips and T.S. Kim. 1993. Use of near-isogenic lines derived by backcrossing or selfing to map qualitative traits. **Theor. Appl. Genet.** 87: 233-237.

Kang, S., E. Mullins, T.M. Dezwaan and M.J. Orbach. 2000. **Pathogenesis and Genome Organization of The Rice Blast Fungus**. Fungal patholoty, Kluwer Acadamic publishers.

Kawamura, E. and K. Ono. 1948. Studies on the relation between the preinfection behaviour of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*, and water droplets on rice plant leaves. **Bulletin of The National Agricultural Experiment Station** 4: 1-12.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Khammone, T. 2006. **Genetic Diversity of Blast Isolates (*Pyricularia grisea*) from Laos and Quantitative Traits Loci Mapping of Selected Isolates in Rice (*Oryza sativa* L.)**. M.E. Thesis, Kasetsart University.

Kiyosawa, S. 1981. Gene analysis for blast resistance**. Oryza** 18: 196-203.

Kochert, G. 1994. RFLP technology, pp. 8-38. *In* T.L. Phillips and I.K. Vasil, eds. **DNA-based markers in plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

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

Li, W., C. Lei, Z. cheng, Y. Jia, D. Haung, J. Wang, J. Wang, X. Zhang, N. Su, X. Guo, H. Zhai and J.Wan. 2008. Identification of SSR markers for a broad-spectrum blast resistance gene *Pi20(t)* for marker assisted breeding. **Molecular breeding** 22: 141-149.

McCouch, S.R., R.J. Nelson, J Tohme and R.S. Zeigler. 1994. Mapping of blast resistance genes in rice, pp. 167-186. *In* R.S. Zeigler, S.A. Leong and P.S. Teng, eds. **Rice blast disease**. IRRI. Philippines.

McCouch, S.R. and R.W. Doerge. 1995. QTL mapping in rice. **Plants. Elsevier. Science**. 12: 482 – 487

McCouch, S.R. and S.D. Tanksley. 1991. Development and use of restriction fragment lengthpolymorphisms in rice breeding and genetic, pp. 109-133. *In* G.S. Khush and G.H. Toenniessen, eds. **Rice biotechnology, CAB International**. Wallingford. Oxon Press, UK.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

McCouch, S.R., X. Chen., O. Panaud., S. Teemnykh., Y. Xu., Y.G. Cho., N. Huang., T. Ishii. And M. Blair. 1997. Molecular mapping of rice chromosome. **Theor. Appl. Genet.** 76: 851 - 829.

Miyamoto, M., M. Yano and H. Hirasawa. 2001. Mapping of quantitative trait loci conferring blast field resistance in the Japanese upland rice variety Kahei. **Breeding Science** 51: 257-261.

Nguyen, T. T. T., S. Koizumi, T. N. La, K. S. Zenbayashi, T. Ashizawa, N. Yasuda, I. Imazaki and A. Miyasaka. 2006. *Pi35(t)*, a new gene confwerring partial resistance to leaf blast in the rice cultiva Hokkai 188**. Theoretical and Applied Genetics** 113: 679-704.

Noenplab, A., A. Vanavichit, T. Toojinda, P. Sirithunya, S. Tragoonrung, S. Sriprakhon and C. Vongsaprom. 2006. QTL Mapping for leaf and neck blast resistance in Khao Dawk Mali 105 and Jao Hom Nin recombinant inbred lines. **Science Asia** 32: 133-142.

Noriguni, S. 2006. A rice (*Oryza sativa* L.) breeding for field resistance to blast disease (*Pyricularia oryzae*) in mountainous region agricultural research institute, Aichi agricultural research center of Japan. **Plant Prod Sci**. 9 (1): 3-9.

Ou, S.H. 1972. **Rice Disease**. Commonwealth Mycological Institute. Kew, England.

Ou, S.H. 1985. **Rice Diseases**. Los Banos, Philippines; IRRI.

Powell, W., C. Machray and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Plant Sci**. 1: 215-222.

Prashanth, G.B., H. shailaja, Y. srinivasachary and H.E. Shashidar. 2000. Identification of DNA markers linked to partial resistance for blast disease in rice across four locations, pp. 34-42. *In* D Thareau., M.H. Lebrun, N.J. Talbot and J.L. Notteghem, eds. **Advances in Rice Blast Research.** Kluwer, Netherlands.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Roumen, E., M. Levy and J.L. Nottegham. 1997. Characterization of the European pathogen population of *Magnaporthe grisea* by DNA fingerprinting and pathotype analysis. **European J. Pl. Path**. 103: 363-371.

Sharma, T.M., B. Madhav, P. Singh, T. Shanker, V. Jana, A. Dalal, A. Pandit, K. Singh, H. Gaik and N. Singh. 2005. High-resolution mapping, cloning and molecular characterization of the Pi-kh gene of rice, which confer resistance to *Magnaporthe grisea*. **Molecular Genetics and Genomics** 274: 569-578.

Sirithunya, P., S. Sriprakhon, C. Wongsaprom, T. Sreewongchai, **A. Vanavichit** and T. Toojinda. 2004. Discovery of Broad Spectrum Blast Resistance in Rice. pp. 160. *In* **Proceedings The 1st International Conference on Rice for the Future.** 31 August -3 September, 2004. Kasetsart University, Bangkok, Thailand.

Sirithunya, P., T. Sreewongchai, S. Sriprokhon, C. Wongsaprom, A. Vanavichit and T. Toojinda. 2007. Prospect of rice blast in Thailand: from the pathogen population structure to an application in molecular breeding. **International Rice Blast Conference** 4: 69-78.

Sirithunya, P., T. Sreewongchai, S. Sriprokhon, C. Wongsaprom, T. Toojinda, S. Pimpisithavorn, C. Kosawong and P. Smitamana. 2008. Assessment of genetic diversity in Thai isolates of *Pyricularia grisea* by random amplification of polymorphic DNA. **Phytopathol.** 156: 196-204.

Sirithunya, P., T. Sreewongchai, S. Sriprakhon, C. Wongsaprom, S. Pimpisitithavorn and E. Roumen. 2001. **Genetic Analysis of Plantpathogen Interaction between Rice (Oryza sativa) and The Rice Blast Pathogen (Magnaporthe grisea): Project Report**. National Centre for Genetic Engineering and Biotechnology. Bangkok, Thailand.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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.

Sriboonjit, J. and A. Viboonpong. 2000. Evaluation of neck blast disease affected to KDML105 rice production by stochastic frontier method. **Economic Journal** 3: 39-52.

Sun, G., R. Cai, X. Du, R. Tao and S.Sun. 1999. The directional selection and stabilizing selection from the interaction between rice variety and blast fungus *M. grisea*. **Acta Phtopathologica Sin**. 45: 45-49.

Tabien, R.E., Z. Li, A.H. Paterson, J.W. Marchetti and S.R.M. stanel pinson. 2002. Mapping QTLs for Weld resistance to the rice blast pathogen and evaluating their individual and combined utility in improved varirties**. Theor. Appl. Genet.** 105: 313-324.

Tanksley, S.D., N. D. Young, A.H. Paterson and M. W. Bonierbale. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for and old. **Science Biotechnology** 7: 257-264.

Tebeest, D.O., C. Guerber and I. Ditmore. 2007. **Rice Blast**. American Phytopathological Society Press, USA.

Toojinda, T., S. Tragoonrung, A. Vanavichit, J. L. Siangliw, N. Pa-In, J. Jantaboon, M. Siangliw and S. Fukai. 2006. Molecular breeding for rain lowland rice in the Mekong region. **Crop Science** 44: 420-426.

Veillet, S., I. C. Filippi and A. Gallais. 1996. Combined genetic analysis of partial blast resistance in upland rice population and recurrent selection for line hybrid values. **Theor. Appl. Genet**. 92: 644-653.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zebeau. 1995. AFLP a new technique for DNA fingerprintings. **Nucleic Acids Res**. 23: 4407-4414.

Wang, G-L., D.J. Mackill, J.M. Bonman, S.R. MacCouch, M.C. Champoux and R.J. Nelson. 1994. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in aduraby resistance rice cultivar. **Genetics** 136: 421-434.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.U. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res**. 18: 7213-7218.

Wongsaprom, C., P. Sirithunya, A. Vanavichit, G. Pantuwan, B. Jongdee, N. Sidhiwong, J. Lanceras-Siangliw, T. Toojinda. 2010. Two introgressed quantitative trait loci confer a broad-spectrum resistance to blast disease in the genetic background of the cultivar RD6 a Thai glutinous jasmine rice. **Field Crop Research** 119: 245-251.

Zeigler, R. S. 1998. Recombination in *Magnaporthe grisea*. **Phytopatho** 36: 249-275.

Zeigler, R.S., R.S, L.X. Cuoc, R.P. Scott, M.A. Bernardo, D.H. Chen, B. Valent. and R.J. Nelson. 1995. The relationship between lineage and vilurence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. **Phytopathology** 5: 443-451.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

ภาพผลการทดลอง และตารางแสดงผล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก1 รายชื่อเชื้อโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่บริเวณภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือในปีเพาะปลูก 2554/2555 ตามพื้นที่เก็บและส่วนที่เก็บ

ลำดับ	รหัสสายพันธุ์เชื้อ	สถานที่เก็บ	พันธุ์และสายพันธุ์ข้าว	ส่วนของข้าว
1	BAG1.1**	วังทอง, พิษณุโลก	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
2	BAG1.2**	วังทอง, พิษณุโลก	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
3	BAG2.4**	เมือง, อุบลราชธานี	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
4	BAG6.4**	เมือง, ชัยภูมิ	1030N.8	คอรวง
5	BAG7.3**	เมือง, หนองคาย	ขาวดอกมะลิ 105	ข้อต่อใบ
6	BAG8.1**	เมือง, อุบลราชธานี	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
7	BAG8.4**	เมือง, อุบลราชธานี	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
8	THL196**	เมือง, ขอนแก่น	ขาวดอกมะลิ 105	คอรวง
9	BAG40.1	เพนียด, ลพบุรี	ขาวดอกมะลิ 105	คอรวง
10	BAG41.1	เพนียด, ลพบุรี	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
11	BAG42.1	เมือง, พิษณุโลก	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
12	BAG42.2	เมือง, พิษณุโลก	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
13	BAG43.1	บ้านเขว้า, ชัยภูมิ	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
14	BAG43.2	บ้านเขว้า, ชัยภูมิ	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
15	BAG43.3	บ้านเขว้า, ชัยภูมิ	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
16	BAG43.4	บ้านเขว้า, ชัยภูมิ	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
17	BAG43.5	บ้านเขว้า, ชัยภูมิ	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
18	BAG44.1	เพนียด, ลพบุรี	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
19	BAG44.2	เพนียด, ลพบุรี	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
20	BAG44.3	เพนียด, ลพบุรี	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
21	BAG45.1	เมือง, ปทุมธานี	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
22	BAG45.2	เมือง, ปทุมธานี	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
23	BAG45.3	เมือง, ปทุมธานี	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
24	BAG45.4	เมือง, ปทุมธานี	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
25	BAG45.5	เมือง, ปทุมธานี	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ

หมายเหตุ: ** คือ เชื้อโรคไหม้จากห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีข้าว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก2 การพัฒนาประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 ของคู่ผสม KDML 105 x IR64

F_1	BC_1F_1	BC_2F_1	BC_2F_2	BC_2F_3	BC_2F_4	BC_2F_5	BC_2F_6	CODE
6 ต้น	7 ต้น	24 ต้น	1-1	1-1-1	1-1-1-1	1-1-1-1-1	1-1-1-1-1-1	1-1
					1-1-1-2	1-1-1-1-2	1-1-1-1-1-2	1-2
					1-1-1-3	1-1-1-1-3	1-1-1-1-1-3	1-3
					1-1-1-4	1-1-1-1-4	1-1-1-1-1-4	1-4
				1-1-2	1-1-2-1	1-1-2-1-1	1-1-2-1-1-1	2-1
					1-1-2-2	1-1-2-1-2	1-1-2-1-1-2	2-2
					1-1-2-3	1-1-2-1-3	1-1-2-1-1-3	2-3
					1-1-2-4	1-1-2-1-4	1-1-2-1-1-4	2-4
				1-1-3	1-1-3-1	1-1-3-1-1	1-1-3-1-1-1	3-1
					1-1-3-2	1-1-3-1-2	1-1-3-1-1-2	3-2
					1-1-3-3	1-1-3-1-3	1-1-3-1-1-3	
					1-1-3-4	1-1-3-1-4	1-1-3-1-1-4	
				1-1-4	1-1-4-1	1-1-4-1-1	1-1-4-1-1-1	4-1
					1-1-4-2	1-1-4-1-2	1-1-4-1-1-2	4-2
					1-1-4-3	1-1-4-1-3	1-1-4-1-1-3	4-3
					1-1-4-4	1-1-4-1-4	1-1-4-1-1-4	4-4
			1-2	1-2-1	1-2-1-1	1-2-1-1-1	1-2-1-1-1-1	5-1
					1-2-1-2	1-2-1-1-2	1-2-1-1-1-2	5-2
					1-2-1-3	1-2-1-1-3	1-2-1-1-1-3	5-3
					1-2-1-4	1-2-1-1-4	1-2-1-1-1-4	5-4
				1-2-2	1-2-2-1	1-2-2-1-1	1-2-2-1-1-1	6-1
					1-2-2-2	1-2-2-1-2	1-2-2-1-1-2	6-2
					1-2-2-3	1-2-2-1-3	1-2-2-1-1-3	6-3
					1-2-2-4	1-2-2-1-4	1-2-2-1-1-4	
				1-2-3	1-2-3-1	1-2-3-1-1	1-2-3-1-1-1	7-1
					1-2-3-2	1-2-3-1-2	1-2-3-1-1-2	7-2
					1-2-3-3	1-2-3-1-3	1-2-3-1-1-3	7-3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

F_1	BC_1F_1	BC_2F_1	BC_2F_2	BC_2F_3	BC_2F_4	BC_2F_5	BC_2F_6	CODE
					1-2-3-4	1-2-3-1-4	1-2-3-1-1-4	7-4
				1-2-4	1-2-4-1	1-2-4-1-1	1-2-4-1-1-1	8-1
					1-2-4-2	1-2-4-1-2	1-2-4-1-1-2	8-2
					1-2-4-3	1-2-4-1-3	1-2-4-1-1-3	8-3
					1-2-4-4	1-2-4-1-4	1-2-4-1-1-4	8-4
			2-1	2-1-1	2-1-1-1	2-1-1-1-1	2-1-1-1-1-1	9-1
					2-1-1-2	2-1-1-1-2	2-1-1-1-1-2	9-2
					2-1-1-3	2-1-1-1-3	2-1-1-1-1-3	9-3
					2-1-1-4	2-1-1-1-4	2-1-1-1-1-4	
			2-2	2-2-1	2-2-1-1	2-2-1-1-1	2-2-1-1-1-1	10-1
					2-2-1-2	2-2-1-1-2	2-2-1-1-1-2	10-2
					2-2-1-3	2-2-1-1-3	2-2-1-1-1-3	10-3
					2-2-1-4	2-2-1-1-4	2-2-1-1-1-4	
				2-2-2	2-2-2-1	2-2-2-1-1	2-2-2-1-1-1	11-1
					2-2-2-2	2-2-2-1-2	2-2-2-1-1-2	11-2
					2-2-2-3	2-2-2-1-3	2-2-2-1-1-3	11-3
					2-2-2-4	2-2-2-1-4	2-2-2-1-1-4	11-4
				2-2-3	2-2-3-1	2-2-3-1-1	2-2-3-1-1-1	12-1
					2-2-3-2	2-2-3-1-2	2-2-3-1-1-2	12-2
					2-2-3-3	2-2-3-1-3	2-2-3-1-1-3	
					2-2-3-4	2-2-3-1-4	2-2-3-1-1-4	
				2-2-4	2-2-4-1	2-2-4-1-1	2-2-4-1-1-1	14-1
					2-2-4-2	2-2-4-1-2	2-2-4-1-1-2	14-2
					2-2-4-3	2-2-4-1-3	2-2-4-1-1-3	14-3
					2-2-4-4	2-2-4-1-4	2-2-4-1-1-4	14-4
			3-1	3-1-1	3-1-1-1	3-1-1-1-1	3-1-1-1-1-1	15-1
					3-1-1-2	3-1-1-1-2	3-1-1-1-1-2	15-2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

F_1	BC_1F_1	BC_2F_1	BC_2F_2	BC_2F_3	BC_2F_4	BC_2F_5	BC_2F_6	CODE
					3-1-1-3	3-1-1-1-3	3-1-1-1-1-3	15-3
					3-1-1-4	3-1-1-1-4	3-1-1-1-1-4	15-4
				3-1-2	3-1-2-1	3-1-2-1-1	3-1-2-1-1-1	16-1
					3-1-2-2	3-1-2-1-2	3-1-2-1-1-2	16-2
					3-1-2-3	3-1-2-1-3	3-1-2-1-1-3	16-3
					3-1-2-4	3-1-2-1-4	3-1-2-1-1-4	16-4
				3-1-3	3-1-3-1	3-1-3-1-1	3-1-3-1-1-1	17-1
					3-1-3-2	3-1-3-1-2	3-1-3-1-1-2	17-2
					3-1-3-3	3-1-3-1-3	3-1-3-1-1-3	17-3
					3-1-3-4	3-1-3-1-4	3-1-3-1-1-4	17-4
				3-1-4	3-1-4-1	3-1-4-1-1	3-1-4-1-1-1	18-1
					3-1-4-2	3-1-4-1-2	3-1-4-1-1-2	18-2
					3-1-4-3	3-1-4-1-3	3-1-4-1-1-3	18-3
					3-1-4-4	3-1-4-1-4	3-1-4-1-1-4	18-4
			3-2	3-2-1	3-2-1-1	3-2-1-1-1	3-2-1-1-1-1	19-1
					3-2-1-2	3-2-1-1-2	3-2-1-1-1-2	19-2
					3-2-1-3	3-2-1-1-3	3-2-1-1-1-3	19-3
					3-2-1-4	3-2-1-1-4	3-2-1-1-1-4	19-4
				3-2-2	3-2-2-1	3-2-2-1-1	3-2-2-1-1-1	20-1
					3-2-2-2	3-2-2-1-2	3-2-2-1-1-2	20-2
					3-2-2-3	3-2-2-1-3	3-2-2-1-1-3	20-3
					3-2-2-4	3-2-2-1-4	3-2-2-1-1-4	20-4
				3-2-3	3-2-3-1	3-2-3-1-1	3-2-3-1-1-1	21-1
					3-2-3-2	3-2-3-1-2	3-2-3-1-1-2	21-2
					3-2-3-3	3-2-3-1-3	3-2-3-1-1-3	21-3
					3-2-3-4	3-2-3-1-4	3-2-3-1-1-4	21-4
				3-2-4	3-2-4-1	3-2-4-1-1	3-2-4-1-1-1	22-1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

F_1	BC_1F_1	BC_2F_1	BC_2F_2	BC_2F_3	BC_2F_4	BC_2F_5	BC_2F_6	CODE
					3-2-4-2	3-2-4-1-2	3-2-4-1-1-2	22-2
					3-2-4-3	3-2-4-1-3	3-2-4-1-1-3	22-3
					3-2-4-4	3-2-4-1-4	3-2-4-1-1-4	22-4
			4-1	4-1-1	4-1-1-1	4-1-1-1-1	4-1-1-1-1-1	23-1
					4-1-1-2	4-1-1-1-2	4-1-1-1-1-2	23-2
					4-1-1-3	4-1-1-1-3	4-1-1-1-1-3	23-3
					4-1-1-4	4-1-1-1-4	4-1-1-1-1-4	23-4
				4-1-2	4-1-2-1	4-1-2-1-1	4-1-2-1-1-1	24-1
					4-1-2-2	4-1-2-1-2	4-1-2-1-1-2	24-2
					4-1-2-3	4-1-2-1-3	4-1-2-1-1-3	24-3
					4-1-2-4	4-1-2-1-4	4-1-2-1-1-4	24-4
				4-1-3	4-1-3-1	4-1-3-1-1	4-1-3-1-1-1	25-1
					4-1-3-2	4-1-3-1-2	4-1-3-1-1-2	25-2
					4-1-3-3	4-1-3-1-3	4-1-3-1-1-3	25-3
					4-1-3-4	4-1-3-1-4	4-1-3-1-1-4	25-4
				4-1-4	4-1-4-1	4-1-4-1-1	4-1-4-1-1-1	26-1
					4-1-4-2	4-1-4-1-2	4-1-4-1-1-2	26-2
					4-1-4-3	4-1-4-1-3	4-1-4-1-1-3	26-3
					4-1-4-4	4-1-4-1-4	4-1-4-1-1-4	
			4-2	4-2-1	4-2-1-1	4-2-1-1-1	4-2-1-1-1-1	27-1
					4-2-1-2	4-2-1-1-2	4-2-1-1-1-2	27-2
					4-2-1-3	4-2-1-1-3	4-2-1-1-1-3	
					4-2-1-4	4-2-1-1-4	4-2-1-1-1-4	
				4-2-2	4-2-2-1	4-2-2-1-1	4-2-2-1-1-1	28-1
					4-2-2-2	4-2-2-1-2	4-2-2-1-1-2	
					4-2-2-3	4-2-2-1-3	4-2-2-1-1-3	
					4-2-2-4	4-2-2-1-4	4-2-2-1-1-4	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

F_1	BC_1F_1	BC_2F_1	BC_2F_2	BC_2F_3	BC_2F_4	BC_2F_5	BC_2F_6	CODE
			5-1	5-1-2	5-1-2-1	5-1-2-1-1	5-1-2-1-1-1	
					5-1-2-2	5-1-2-1-2	5-1-2-1-1-2	
					5-1-2-3	5-1-2-1-3	5-1-2-1-1-3	
					5-1-2-4	5-1-2-1-4	5-1-2-1-1-4	
				5-1-3	5-1-3-1	5-1-3-1-1	5-1-3-1-1-1	
					5-1-3-2	5-1-3-1-2	5-1-3-1-1-2	
					5-1-3-3	5-1-3-1-3	5-1-3-1-1-3	30-3
					5-1-3-4	5-1-3-1-4	5-1-3-1-1-4	
				5-1-4	5-1-4-1	5-1-4-1-1	5-1-4-1-1-1	
					5-1-4-2	5-1-4-1-2	5-1-4-1-1-2	
					5-1-4-3	5-1-4-1-3	5-1-4-1-1-3	
					5-1-4-4	5-1-4-1-4	5-1-4-1-1-4	
			5-2	5-2-1	5-2-1-1	5-2-1-1-1	5-2-1-1-1-1	32-1
					5-2-1-2	5-2-1-1-2	5-2-1-1-1-2	32-2
					5-2-1-3	5-2-1-1-3	5-2-1-1-1-3	32-3
					5-2-1-4	5-2-1-1-4	5-2-1-1-1-4	
				5-2-2	5-2-2-1	5-2-2-1-1	5-2-2-1-1-1	
					5-2-2-2	5-2-2-1-2	5-2-2-1-1-2	33-2
					5-2-2-3	5-2-2-1-3	5-2-2-1-1-3	
					5-2-2-4	5-2-2-1-4	5-2-2-1-1-4	
				5-2-3	5-2-3-1	5-2-3-1-1	5-2-3-1-1-1	34-1
					5-2-3-2	5-2-3-1-2	5-2-3-1-1-2	34-2
					5-2-3-3	5-2-3-1-3	5-2-3-1-1-3	34-3
					5-2-3-4	5-2-3-1-4	5-2-3-1-1-4	34-4
				5-2-4	5-2-4-1	5-2-4-1-1	5-2-4-1-1-1	35-1
					5-2-4-2	5-2-4-1-2	5-2-4-1-1-2	35-2
					5-2-4-3	5-2-4-1-3	5-2-4-1-1-3	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

F_1	BC_1F_1	BC_2F_1	BC_2F_2	BC_2F_3	BC_2F_4	BC_2F_5	BC_2F_6	CODE
					5-2-4-4	5-2-4-1-4	5-2-4-1-1-4	
			6-1	6-1-4	6-1-4-1	6-1-4-1-1	6-1-4-1-1-1	37-1
					6-1-4-2	6-1-4-1-2	6-1-4-1-1-2	37-2
					6-1-4-3	6-1-4-1-3	6-1-4-1-1-3	
					6-1-4-4	6-1-4-1-4	6-1-4-1-1-4	
			6-2	6-2-4	6-2-4-1	6-2-4-1-1	6-2-4-1-1-1	
					6-2-4-2	6-2-4-1-2	6-2-4-1-1-2	
					6-2-4-3	6-2-4-1-3	6-2-4-1-1-3	38-3
					6-2-4-4	6-2-4-1-4	6-2-4-1-1-4	38-4
			7-1	7-1-4	7-1-4-1	7-1-4-1-1	7-1-4-1-1-1	39-1
					7-1-4-2	7-1-4-1-2	7-1-4-1-1-2	39-2
					7-1-4-3	7-1-4-1-3	7-1-4-1-1-3	39-3
					7-1-4-4	7-1-4-1-4	7-1-4-1-1-4	39-4
			7-2	7-2-4	7-2-4-1	7-2-4-1-1	7-2-4-1-1-1	
					7-2-4-2	7-2-4-1-2	7-2-4-1-1-2	
					7-2-4-3	7-2-4-1-3	7-2-4-1-1-3	
					7-2-4-4	7-2-4-1-4	7-2-4-1-1-4	
			8-1	8-1-4	8-1-4-1	8-1-4-1-1	8-1-4-1-1-1	41-1
					8-1-4-2	8-1-4-1-2	8-1-4-1-1-2	41-2
					8-1-4-3	8-1-4-1-3	8-1-4-1-1-3	
					8-1-4-4	8-1-4-1-4	8-1-4-1-1-4	
			8-2	8-2-3	8-2-3-1	8-2-3-1-1	8-2-3-1-1-1	
					8-2-3-2	8-2-3-1-2	8-2-3-1-1-2	
					8-2-3-3	8-2-3-1-3	8-2-3-1-1-3	
					8-2-3-4	8-2-3-1-4	8-2-3-1-1-4	42-4
			9-1	9-1-3	9-1-3-1	9-1-3-1-1	9-1-3-1-1-1	43-1
					9-1-3-2	9-1-3-1-2	9-1-3-1-1-2	43-2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

F_1	BC_1F_1	BC_2F_1	BC_2F_2	BC_2F_3	BC_2F_4	BC_2F_5	BC_2F_6	CODE
					9-1-3-3	9-1-3-1-3	9-1-3-1-1-3	43-3
					9-1-3-4	9-1-3-1-4	9-1-3-1-1-4	43-4
			9-2	9-2-3	9-2-3-1	9-2-3-1-1	9-2-3-1-1-1	44-1
					9-2-3-2	9-2-3-1-2	9-2-3-1-1-2	44-2
					9-2-3-3	9-2-3-1-3	9-2-3-1-1-3	
					9-2-3-4	9-2-3-1-4	9-2-3-1-1-4	
			10-1	10-1-3	10-1-3-1	10-1-3-1-1	10-1-3-1-1-1	45-1
					10-1-3-2	10-1-3-1-2	10-1-3-1-1-2	45-2
					10-1-3-3	10-1-3-1-3	10-1-3-1-1-3	45-3
					10-1-3-4	10-1-3-1-4	10-1-3-1-1-4	45-4
			10-2	10-2-3	10-2-3-1	10-2-3-1-1	10-2-3-1-1-1	46-1
					10-2-3-2	10-2-3-1-2	10-2-3-1-1-2	46-2
					10-2-3-3	10-2-3-1-3	10-2-3-1-1-3	
					10-2-3-4	10-2-3-1-4	10-2-3-1-1-4	
			11-1	11-1-3	11-1-3-1	11-1-3-1-1	11-1-3-1-1-1	47-1
					11-1-3-2	11-1-3-1-2	11-1-3-1-1-2	47-2
					11-1-3-3	11-1-3-1-3	11-1-3-1-1-3	47-3
					11-1-3-4	11-1-3-1-4	11-1-3-1-1-4	47-4
			11-2	11-2-3	11-2-3-1	11-2-3-1-1	11-2-3-1-1-1	48-1
					11-2-3-2	11-2-3-1-2	11-2-3-1-1-2	48-2
					11-2-3-3	11-2-3-1-3	11-2-3-1-1-3	48-3
					11-2-3-4	11-2-3-1-4	11-2-3-1-1-4	48-4
			12-1	12-1-3	12-1-3-1	12-1-3-1-1	12-1-3-1-1-1	
					12-1-3-2	12-1-3-1-2	12-1-3-1-1-2	
					12-1-3-3	12-1-3-1-3	12-1-3-1-1-3	
					12-1-3-4	12-1-3-1-4	12-1-3-1-1-4	
			12-2	12-2-3	12-2-3-1	12-2-3-1-1	12-2-3-1-1-1	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

F_1	BC_1F_1	BC_2F_1	BC_2F_2	BC_2F_3	BC_2F_4	BC_2F_5	BC_2F_6	CODE
					12-2-3-2	12-2-3-1-2	12-2-3-1-1-2	
					12-2-3-3	12-2-3-1-3	12-2-3-1-1-3	
					12-2-3-4	12-2-3-1-4	12-2-3-1-1-4	
			13-1	13-1-3	13-1-3-1	13-1-3-1-1	13-1-3-1-1-1	
					13-1-3-2	13-1-3-1-2	13-1-3-1-1-2	
					13-1-3-3	13-1-3-1-3	13-1-3-1-1-3	
					13-1-3-4	13-1-3-1-4	13-1-3-1-1-4	
			13-2	13-2-3	13-2-3-1	13-2-3-1-1	13-2-3-1-1-1	
					13-2-3-2	13-2-3-1-2	13-2-3-1-1-2	
					13-2-3-3	13-2-3-1-3	13-2-3-1-1-3	52-3
					13-2-3-4	13-2-3-1-4	13-2-3-1-1-4	
			14-1	14-1-3	14-1-3-1	14-1-3-1-1	14-1-3-1-1-1	53-1
					14-1-3-2	14-1-3-1-2	14-1-3-1-1-2	
					14-1-3-3	14-1-3-1-3	14-1-3-1-1-3	
					14-1-3-4	14-1-3-1-4	14-1-3-1-1-4	
			14-2	14-2-3	14-2-3-1	14-2-3-1-1	14-2-3-1-1-1	54-1
					14-2-3-2	14-2-3-1-2	14-2-3-1-1-2	54-2
					14-2-3-3	14-2-3-1-3	14-2-3-1-1-3	54-3
					14-2-3-4	14-2-3-1-4	14-2-3-1-1-4	54-4
			15-1	15-1-3	15-1-3-1	15-1-3-1-1	15-1-3-1-1-1	55-1
					15-1-3-2	15-1-3-1-2	15-1-3-1-1-2	55-2
					15-1-3-3	15-1-3-1-3	15-1-3-1-1-3	55-3
					15-1-3-4	15-1-3-1-4	15-1-3-1-1-4	
			15-2	15-2-3	15-2-3-1	15-2-3-1-1	15-2-3-1-1-1	56-1
					15-2-3-2	15-2-3-1-2	15-2-3-1-1-2	56-2
					15-2-3-3	15-2-3-1-3	15-2-3-1-1-3	56-3
					15-2-3-4	15-2-3-1-4	15-2-3-1-1-4	56-4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

F_1	BC_1F_1	BC_2F_1	BC_2F_2	BC_2F_3	BC_2F_4	BC_2F_5	BC_2F_6	CODE
			16-1	16-1-3	16-1-3-1	16-1-3-1-1	16-1-3-1-1-1	57-1
					16-1-3-2	16-1-3-1-2	16-1-3-1-1-2	57-2
					16-1-3-3	16-1-3-1-3	16-1-3-1-1-3	
					16-1-3-4	16-1-3-1-4	16-1-3-1-1-4	
			16-2	16-2-3	16-2-3-1	16-2-3-1-1	16-2-3-1-1-1	
					16-2-3-2	16-2-3-1-2	16-2-3-1-1-2	
					16-2-3-3	16-2-3-1-3	16-2-3-1-1-3	
					16-2-3-4	16-2-3-1-4	16-2-3-1-1-4	
			17-1	17-1-3	17-1-3-1	17-1-3-1-1	17-1-3-1-1-1	59-1
					17-1-3-2	17-1-3-1-2	17-1-3-1-1-2	59-2
					17-1-3-3	17-1-3-1-3	17-1-3-1-1-3	59-3
					17-1-3-4	17-1-3-1-4	17-1-3-1-1-4	59-4
			17-2	17-2-3	17-2-3-1	17-2-3-1-1	17-2-3-1-1-1	
					17-2-3-2	17-2-3-1-2	17-2-3-1-1-2	
					17-2-3-3	17-2-3-1-3	17-2-3-1-1-3	
					17-2-3-4	17-2-3-1-4	17-2-3-1-1-4	
			18-1	18-1-3	18-1-3-1	18-1-3-1-1	18-1-3-1-1-1	
					18-1-3-2	18-1-3-1-2	18-1-3-1-1-2	
					18-1-3-3	18-1-3-1-3	18-1-3-1-1-3	61-3
					18-1-3-4	18-1-3-1-4	18-1-3-1-1-4	
			18-2	18-2-3	18-2-3-1	18-2-3-1-1	18-2-3-1-1-1	62-1
					18-2-3-2	18-2-3-1-2	18-2-3-1-1-2	62-2
					18-2-3-3	18-2-3-1-3	18-2-3-1-1-3	62-3
					18-2-3-4	18-2-3-1-4	18-2-3-1-1-4	
			19-1	19-1-3	19-1-3-1	19-1-3-1-1	19-1-3-1-1-1	63-1
					19-1-3-2	19-1-3-1-2	19-1-3-1-1-2	63-2
					19-1-3-3	19-1-3-1-3	19-1-3-1-1-3	63-3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

F_1	BC_1F_1	BC_2F_1	BC_2F_2	BC_2F_3	BC_2F_4	BC_2F_5	BC_2F_6	CODE
					19-1-3-4	19-1-3-1-4	19-1-3-1-1-4	
			19-2	19-2-3	19-2-3-1	19-2-3-1-1	19-2-3-1-1-1	64-1
					19-2-3-2	19-2-3-1-2	19-2-3-1-1-2	64-2
					19-2-3-3	19-2-3-1-3	19-2-3-1-1-3	64-3
					19-2-3-4	19-2-3-1-4	19-2-3-1-1-4	64-4
			20-1	20-1-3	20-1-3-1	20-1-3-1-1	20-1-3-1-1-1	65-4
					20-1-3-2	20-1-3-1-2	20-1-3-1-1-2	
					20-1-3-3	20-1-3-1-3	20-1-3-1-1-3	
					20-1-3-4	20-1-3-1-4	20-1-3-1-1-4	
			20-2	20-2-3	20-2-3-1	20-2-3-1-1	20-2-3-1-1-1	66-1
					20-2-3-2	20-2-3-1-2	20-2-3-1-1-2	66-2
					20-2-3-3	20-2-3-1-3	20-2-3-1-1-3	66-3
					20-2-3-4	20-2-3-1-4	20-2-3-1-1-4	66-4
			21-1	21-1-3	21-1-3-1	21-1-3-1-1	21-1-3-1-1-1	67-1
					21-1-3-2	21-1-3-1-2	21-1-3-1-1-2	67-2
					21-1-3-3	21-1-3-1-3	21-1-3-1-1-3	
					21-1-3-4	21-1-3-1-4	21-1-3-1-1-4	
			21-2	21-2-3	21-2-3-1	21-2-3-1-1	21-2-3-1-1-1	68-1
					21-2-3-2	21-2-3-1-2	21-2-3-1-1-2	68-2
					21-2-3-3	21-2-3-1-3	21-2-3-1-1-3	68-3
					21-2-3-4	21-2-3-1-4	21-2-3-1-1-4	68-4
			21-3	22-1-3	22-1-3-1	22-1-3-1-1	22-1-3-1-1-1	69-1
					22-1-3-2	22-1-3-1-2	22-1-3-1-1-2	69-2
					22-1-3-3	22-1-3-1-3	22-1-3-1-1-3	69-3
					22-1-3-4	22-1-3-1-4	22-1-3-1-1-4	69-4
			22-2	22-2-3	22-2-3-1	22-2-3-1-1	22-2-3-1-1-1	70-1
					22-2-3-2	22-2-3-1-2	22-2-3-1-1-2	70-2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

F_1	BC_1F_1	BC_2F_1	BC_2F_2	BC_2F_3	BC_2F_4	BC_2F_5	BC_2F_6	CODE
					22-2-3-3	22-2-3-1-3	22-2-3-1-1-3	70-3
					22-2-3-4	22-2-3-1-4	22-2-3-1-1-4	70-4
			23-1	23-1-3	23-1-3-1	23-1-3-1-1	23-1-3-1-1-1	71-1
					23-1-3-2	23-1-3-1-2	23-1-3-1-1-2	71-2
					23-1-3-3	23-1-3-1-3	23-1-3-1-1-3	71-3
					23-1-3-4	23-1-3-1-4	23-1-3-1-1-4	
			23-2	23-2-3	23-2-3-1	23-2-3-1-1	23-2-3-1-1-1	72-1
					23-2-3-2	23-2-3-1-2	23-2-3-1-1-2	72-2
					23-2-3-3	23-2-3-1-3	23-2-3-1-1-3	
					23-2-3-4	23-2-3-1-4	23-2-3-1-1-4	
			24-1	24-1-3	24-1-3-1	24-1-3-1-1	24-1-3-1-1-1	73-1
					24-1-3-2	24-1-3-1-2	24-1-3-1-1-2	73-2
					24-1-3-3	24-1-3-1-3	24-1-3-1-1-3	
					24-1-3-4	24-1-3-1-4	24-1-3-1-1-4	
			24-2	24-2-3	24-2-3-1	24-2-3-1-1	24-2-3-1-1-1	
					24-2-3-2	24-2-3-1-2	24-2-3-1-1-2	
					24-2-3-3	24-2-3-1-3	24-2-3-1-1-3	
					24-2-3-4	24-2-3-1-4	24-2-3-1-1-4	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก3 เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ใช้ในการทดสอบ ทั้งหมด 230 เครื่องหมาย

ลำดับ	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	โครโมโซมที่	ค่าการอ่านแถบดีเอ็นเอ*	
			KDML105	IR64
1	RM495	1	1	2
2	RM1	1	1	2
3	RM283	1	1	1
4	RM259	1	1	1
5	RM312	1	1	1
6	RM129	1	1	1
7	RM5	1	1	2
8	RM237	1	1	1
9	RM543	1	1	2
10	RM431	1	1	1
11	RM428	1	1	2
12	RM84	1	1	1
13	RM578	1	1	1
14	RM34	1	1	2
15	RM443	1	1	2
16	RM128	1	1	2
17	RM265	1	1	1
18	RM472	1	1	1
19	OSR23	1	1	2
20	RM414	1	1	1
21	RM154	2	1	1
22	RM53	2	n/a	n/a
23	RM452	2	n/a	n/a
24	RM300	2	1	2
25	RM465	2	n/a	n/a
26	RM561	2	n/a	n/a
27	RM106	2	1	2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก3 (ต่อ)

ลำดับ	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	โครโมโซมที่	ค่าการอ่านแถบดีเอ็นเอ*	
			KDML105	IR64
28	RM6	2	1	2
29	RM208	2	1	2
30	RM535	2	1	1
31	RM211	2	1	2
32	RM405	2	1	2
33	RM71	2	1	2
34	RM521	2	1	1
35	RM341	2	1	2
36	RM475	2	1	2
37	RM526	2	1	2
38	RM573	2	1	2
39	RM425	2	1	2
40	RM48	2	1	1
41	RM22	3	1	2
42	RM489	3	1	1
43	OSR13	3	1	1
44	RM251	3	1	1
45	RM338	3	1	1
46	RM16	3	1	1
47	RM426	3	1	2
48	RM55	3	1	2
49	RM571	3	1	1
50	RM514	3	1	2
51	RM60	3	1	1
52	RM545	3	1	2
53	OSR16	3	1	2
54	RM7	3	1	2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก3 (ต่อ)

ลำดับ	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	โครโมโซมที่	ค่าการอ่านแถบดีเอ็นเอ*	
			KDML105	IR64
55	RM563	3	1	1
56	RM282	3	1	1
57	RM156	3	1	1
58	RM416	3	1	2
59	RM442	3	1	2
60	RM85	3	1	2
61	RM307	4	1	1
62	RM551	4	1	2
63	RM518	4	1	2
64	RM471	4	1	2
65	RM564	4	1	2
66	RM252	4	1	2
67	RM303	4	1	1
68	RM124	4	1	1
69	RM280	4	1	2
70	RM559	4	1	2
71	RM5688	4	1	1
72	RM6314	4	n/a	n/a
73	RM7396	4	1	1
74	RM3524	4	1	2
75	RM1136	4	1	2
76	RM241	4	1	2
77	RM317	4	1	2
78	RM6748	4	1	2
79	RM3335	4	1	1
80	RM6441	4	1	1
81	RM507	5	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก3 (ต่อ)

ลำดับ	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	โครโมโซมที่	ค่าการอ่านแถบดีเอ็นเอ*	
			KDML105	IR64
82	RM413	5	1	2
83	RM13	5	1	1
84	RM437	5	1	2
85	RM509	5	1	1
86	RM39	5	1	1
87	RM161	5	1	1
88	RM178	5	1	1
89	RM87	5	1	1
90	RM334	5	1	2
91	RM2010	5	n/a	n/a
92	RM7444	5	1	1
93	RM5994	5	1	1
94	RM5140	5	1	1
95	RM598	5	1	1
96	RM459	5	1	1
97	RM3663	5	1	2
98	RM188	5	1	1
99	RM6313	5	1	1
100	RM1054	5	1	1
101	RM133	6	1	1
102	RM170	6	1	1
103	RM510	6	1	1
104	RM204	6	1	2
105	RM225	6	1	2
106	RM136	6	1	1
107	RM454	6	1	1
108	RM162	6	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก3 (ต่อ

ลำดับ	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	โครโมโซมที่	ค่าการอ่านแถบดีเอ็นเอ*	
			KDML105	IR64
109	RM400	6	1	1
110	RM141	6	1	1
111	RM276	6	1	2
112	RM6701	6	1	1
113	RM8226	6	1	2
114	RM564	6	1	2
115	RM7551	6	1	1
116	RM3827	6	1	1
117	RM7434	6	1	2
118	RM5371	6	1	1
119	RM461	6	1	1
120	RM494	6	1	1
121	RM436	7	1	2
122	RM125	7	1	1
123	RM501	7	1	2
124	RM11	7	1	1
125	RM10	7	1	2
126	RM455	7	1	1
127	RM234	7	1	2
128	RM118	7	1	1
129	RM172	7	1	2
130	RM428	7	1	2
131	RM295	7	1	1
132	RM4098	7	1	2
133	RM6872	7	1	1
134	RM1253	7	1	2
135	RM7110	7	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก3 (ต่อ)

ลำดับ	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	โครโมโซมที่	ค่าการอ่านแถบดีเอ็นเอ*	
			KDML105	IR64
136	RM533	7	1	1
137	RM1973	7	n/a	n/a
138	RM1132	7	1	2
139	RM134	7	1	1
140	RM6650	7	1	1
141	RM408	8	1	1
142	RM152	8	1	2
143	RM25	8	1	1
144	RM544	8	1	1
145	RM44	8	1	2
146	RM404	8	1	2
147	RM339	8	1	1
148	RM284	8	1	1
149	RM433	8	1	1
150	RM447	8	1	1
151	RM38	8	1	2
152	RM2819	8	1	1
153	RM8243	8	1	1
154	RM3153	8	1	1
155	RM8264	8	n/a	n/a
156	RM195	8	1	1
157	RM556	8	1	1
158	RM256	8	1	2
159	RM6948	8	1	1
160	RM3778	8	1	2
161	RM316	9	1	1
162	RM444	9	1	2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก3 (ต่อ)

ลำดับ	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	โครโมโซมที่	ค่าการอ่านแถบดีเอ็นเอ*	
			KDML105	IR64
163	RM524	9	1	1
164	RM105	9	1	2
165	RM409	9	1	1
166	RM410	9	1	1
167	RM288	9	1	1
168	RM201	9	1	1
169	RM215	9	1	2
170	RM205	9	1	1
171	RM3912	9	1	1
172	RM5122	9	1	2
173	RM3600	9	1	1
174	RM1553	9	n/a	n/a
175	RM6971	9	1	1
176	RM474	10	1	2
177	RM222	10	1	2
178	RM216	10	1	1
179	RM239	10	1	1
180	RM467	10	1	1
181	RM271	10	1	2
182	RM258	10	1	1
183	RM171	10	1	1
184	RM484	10	1	1
185	RM590	10	1	2
186	RM7217	10	1	2
187	RM4455	10	1	2
188	RM596	10	1	1
189	RM8202	10	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก3 (ต่อ)

ลำดับ	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	โครโมโซมที่	ค่าการอ่านแถบดีเอ็นเอ*	
			KDML105	IR64
190	RM3123	10	1	2
191	RM286	11	1	2
192	RM332	11	1	1
193	RM552	11	1	2
194	RM479	11	1	1
195	RM536	11	1	1
196	RM287	11	1	2
197	RM457	11	1	1
198	RM206	11	1	2
199	RM224	11	1	1
200	RM144	11	1	2
201	RM3717	11	1	1
202	RM1812	11	1	1
203	RM5599	11	1	1
204	RM4504	11	1	2
205	RM6115	11	1	1
206	RM6091	11	1	1
207	RM6272	11	1	1
208	RM4601	11	n/a	n/a
209	RM6440	11	1	1
210	RM1233	11	1	1
211	RM415	12	1	2
212	RM19	12	1	1
213	RM247	12	1	1
214	RM83	12	1	1
215	RM101	12	1	1
216	RM277	12	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก3 (ต่อ)

ลำดับ	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	โครโมโซมที่	ค่าการอ่านแถบดีเอ็นเอ*	
			KDML105	IR64
217	RM519	12	1	1
218	RM313	12	1	2
219	RM270	12	1	1
220	RM235	12	1	2
221	RM3483	12	1	1
222	RM491	12	1	1
223	RM512	12	1	1
224	RM2529	12	1	1
225	RM1261	12	1	1
226	RM309	12	1	1
227	RM463	12	1	1
228	RM1103	12	1	2
229	RM3739	12	n/a	n/a
230	RM179	12	1	2

หมายเหตุ: * ค่าอ่านผลแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ

1 คือ พันธุ์ที่มีลักษณะพันธุกรรมเหมือนพันธุ์แม่ (KDML105)

2 คือ พันธุ์ที่มีลักษณะพันธุกรรมเหมือนพันธุ์พ่อ (IR64)

n/a คือ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก4 ค่าปรากฏของแถบดีเอ็นเอของประชากรลูกผสมกลับชั่วที่ BC_2F_6 ที่ประเมินโดยอาศัยเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 93 เครื่องหมาย เปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อแม่

ลำดับ	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	โคโมโซมที่	KDML105	IR64	ผลการอ่านแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ * ลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_6									
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	RM495	1	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
2	RM5	1	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
3	RM543	1	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
4	RM237	1	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
5	RM431	1	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
6	RM300	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1
7	RM106	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1
8	RM6	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
9	RM208	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
10	RM211	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
11	RM465	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
12	RM71	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
13	RM475	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
14	RM526	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
15	RM573	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
16	RM48	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
17	RM425	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
18	RM166	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
19	RM22	3	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
20	RM426	3	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
21	RM55	3	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
22	RM514	3	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
23	RM545	3	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก4 (ต่อ)

ลำดับ	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	โครโมโซมที่	KDML105	IR64	ผลการอ่านแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ * ลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_6									
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
24	OSR16	3	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
25	RM7	3	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
26	RM416	3	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
27	RM442	3	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
28	RM85	3	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
29	RM551	4	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
30	RM518	4	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
31	RM471	4	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
32	RM465	4	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
33	RM252	4	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
34	RM280	4	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
35	RM559	4	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
36	RM3524	4	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
37	RM1136	4	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
38	RM241	4	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
39	RM317	4	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
40	RM6748	4	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
41	RM413	5	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
42	RM437	5	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
43	RM334	5	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
44	RM3663	5	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
45	RM204	6	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
46	RM255	6	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
47	RM276	6	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก4 (ต่อ)

ลำดับ	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	โครโมโซมที่	KDML105	IR64	ผลการอ่านแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ * ลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_6									
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
48	RM8226	6	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
49	RM564	6	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
50	RM7434	6	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
51	RM436	7	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
52	RM501	7	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
53	RM10	7	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
54	RM234	7	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
55	RM172	7	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
56	RM428	7	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
57	RM4098	7	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
58	RM1253	7	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
59	RM1132	7	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
60	RM152	8	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
61	RM44	8	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
62	RM404	8	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
63	RM38	8	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
64	RM256	8	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
65	RM3778	8	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
66	RM444	9	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
67	RM105	9	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
68	RM215	9	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
69	RM5122	9	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
70	RM474	10	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
71	RM222	10	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ก4 (ต่อ)

ลำดับ	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	โครโมโซมที่	KDML105	IR64	ผลการอ่านแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ * ลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_6									
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
73	RM590	10	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
74	RM7271	10	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
75	RM4455	10	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
76	RM3123	10	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
77	RM286	11	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
78	RM552	11	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
79	RM287	11	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
80	RM206	11	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
81	RM144	11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
82	RM4504	11	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
83	RM415	11	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
84	RM101	12	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
85	RM313	12	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
86	RM235	12	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
87	RM1103	12	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
88	RM277	12	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
89	RM512	12	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
90	RM309	12	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
91	RM179	12	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	1
92	RM415	12	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1
93	RM27970	12	1	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1

หมายเหตุ: * ค่าอ่านผลแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ

1 คือ พันธุ์ที่มีลักษณะพันธุกรรมเหมือนพันธุ์แม่ (KDML105)

2 คือ พันธุ์ที่มีลักษณะพันธุกรรมเหมือนพันธุ์พ่อ (IR64)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



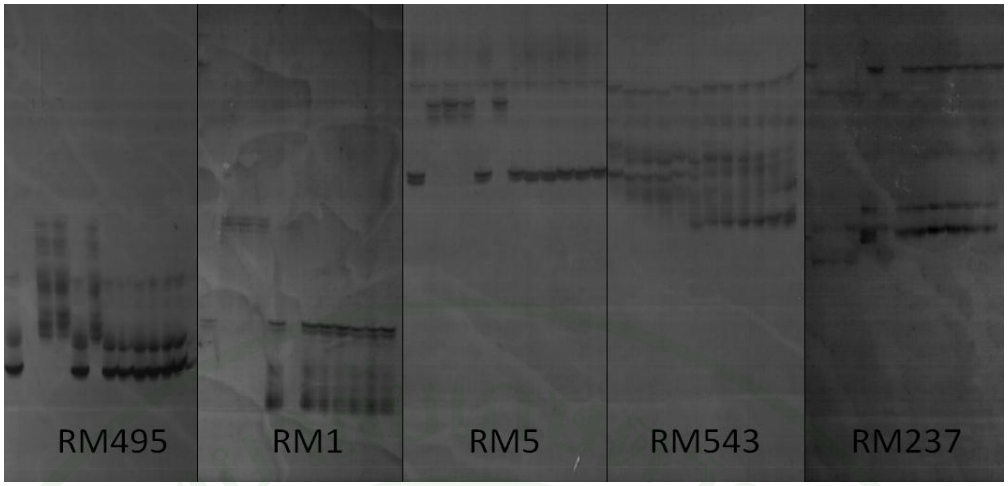
(ก)



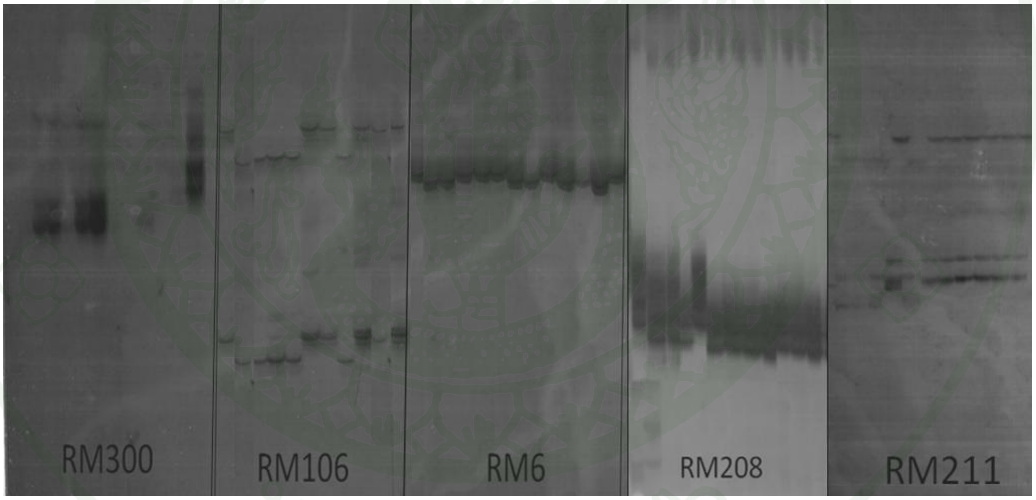
(ข)

ภาพผนวกที่ ก1 ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ใช้เป็นพันธุ์รับ (ก) และข้าวพันธุ์ IR64 ที่ใช้เป็นพันธุ์ให้ (ข)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

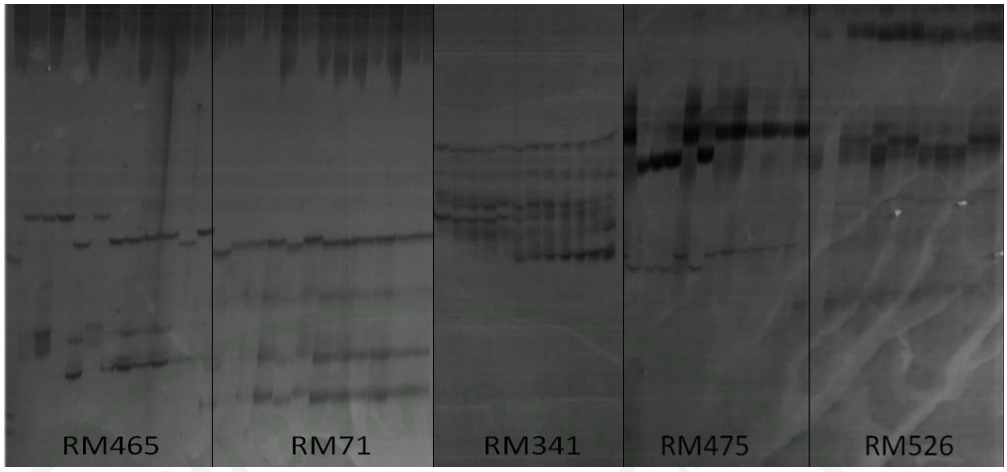


ภาพผนวกที่ ก2 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 1

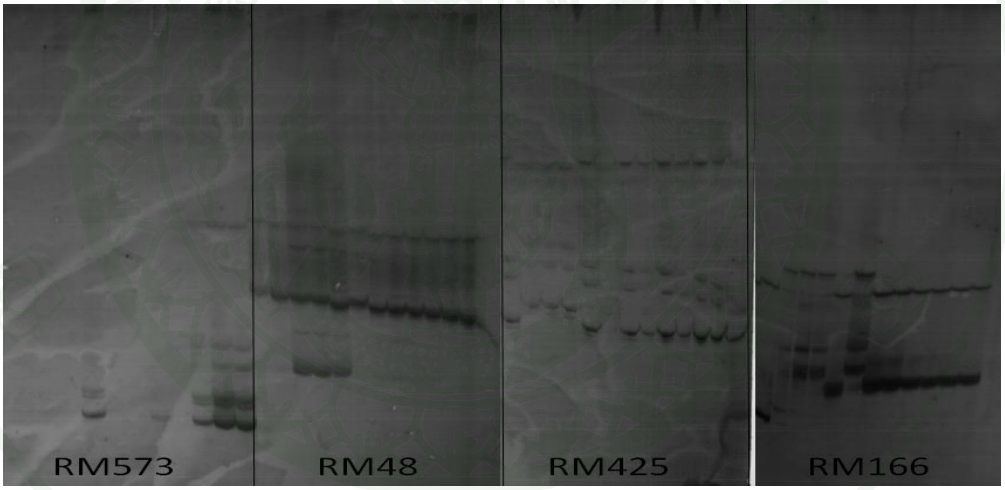


ภาพผนวกที่ ก3 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

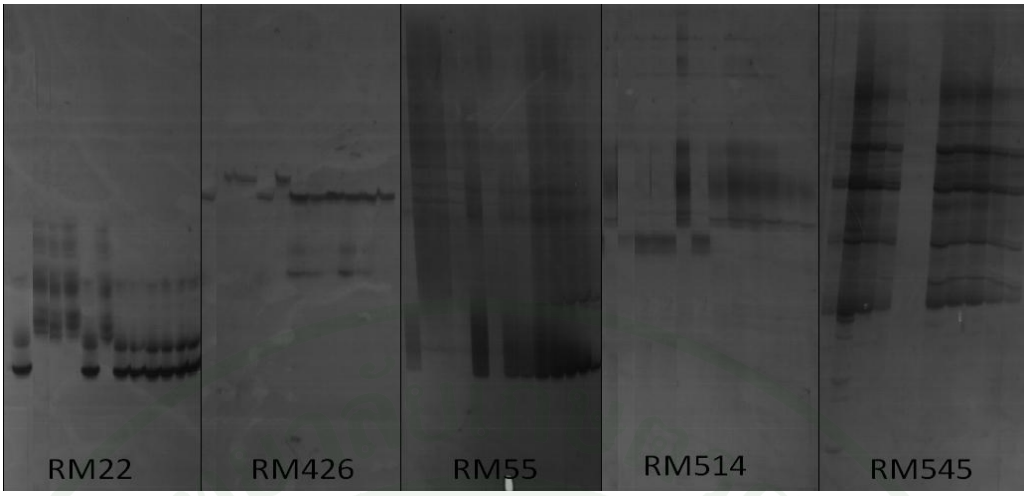


ภาพผนวกที่ ก4 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 2

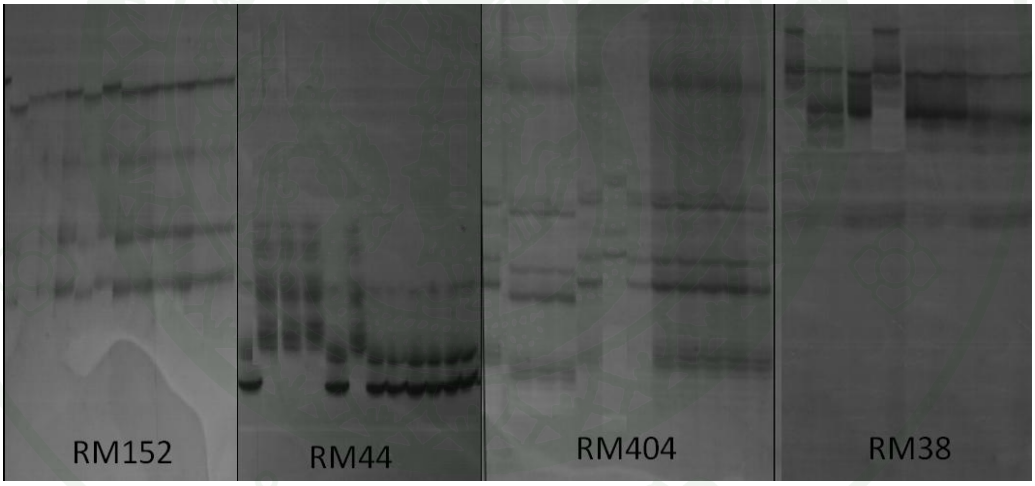


ภาพผนวกที่ ก5 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

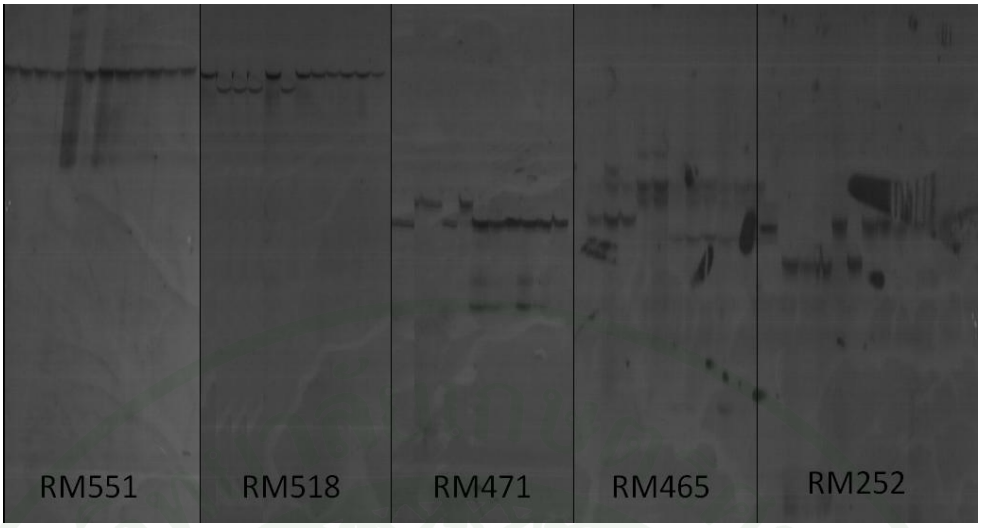


ภาพผนวกที่ ก6 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 3

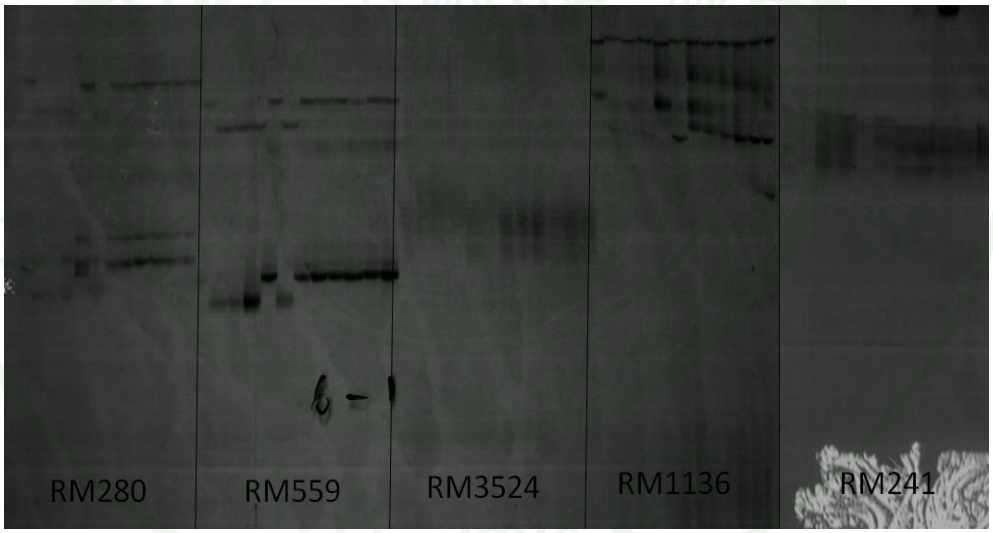


ภาพผนวกที่ ก7 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

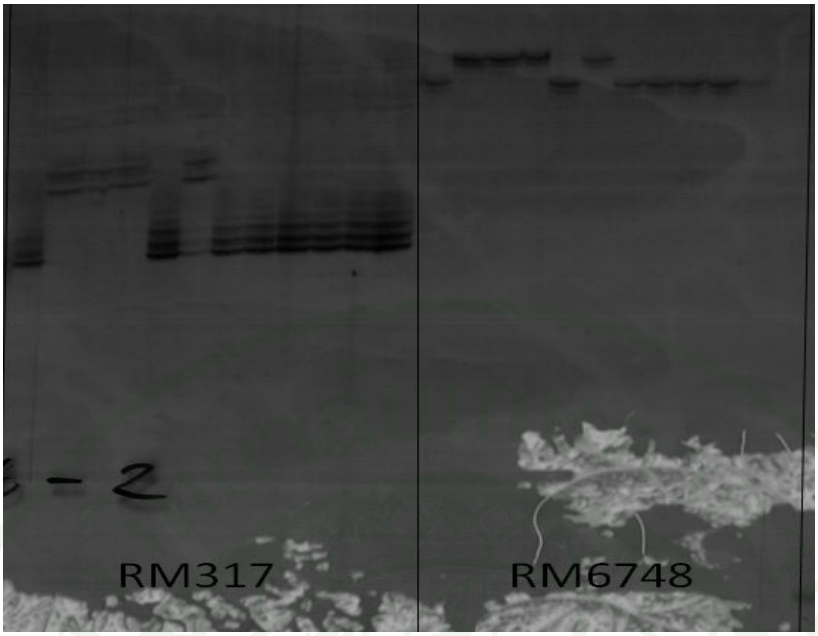


ภาพผนวกที่ ก8 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 4

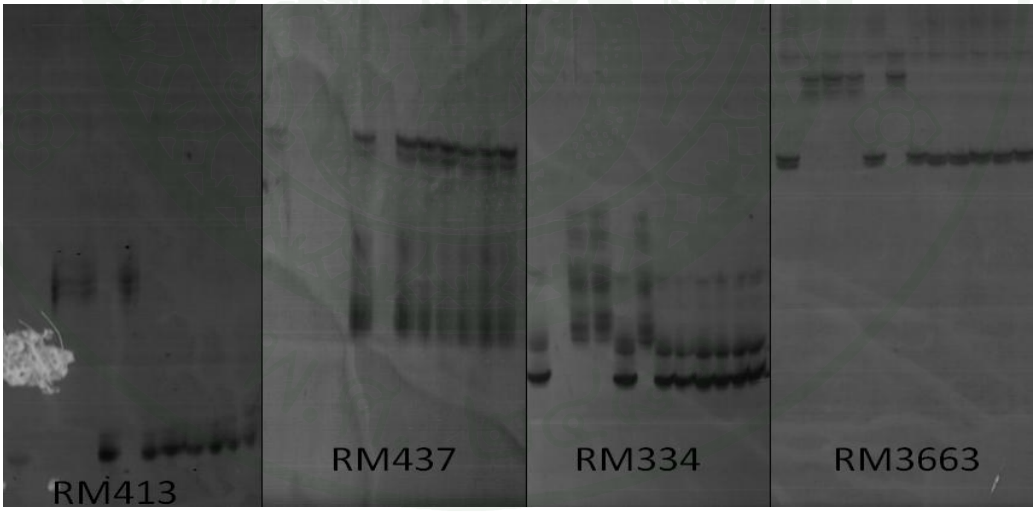


ภาพผนวกที่ ก9 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ก10 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 4

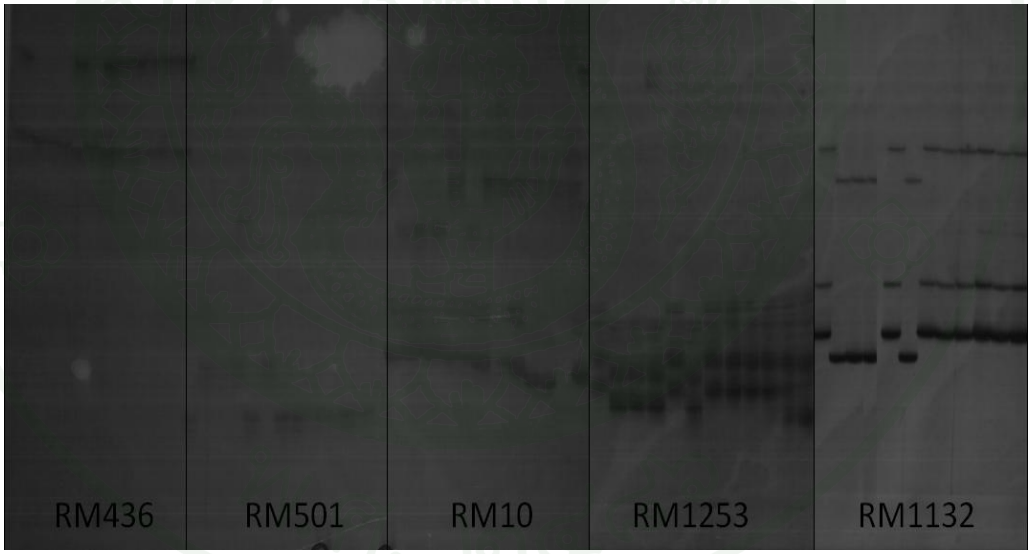


ภาพผนวกที่ ก11 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

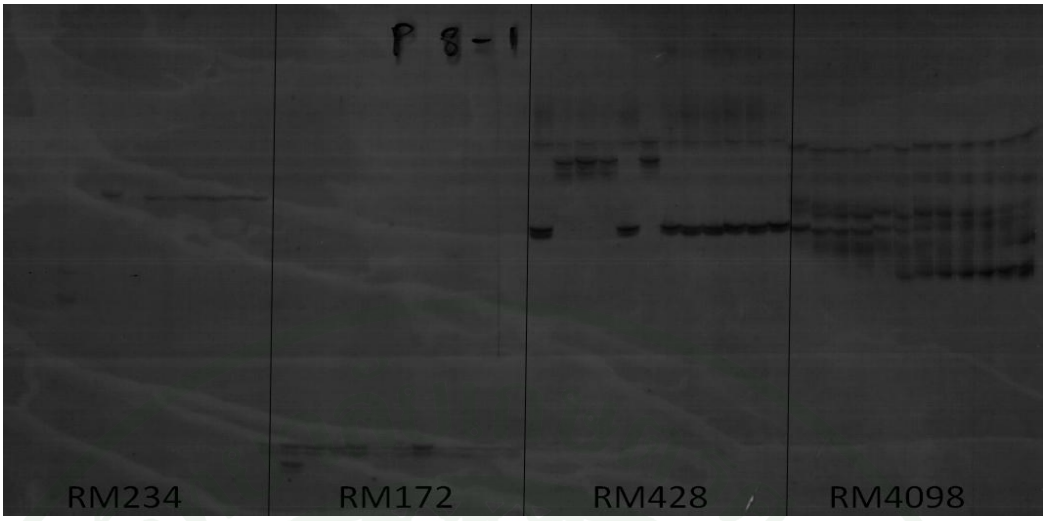


ภาพผนวกที่ ก12 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 6

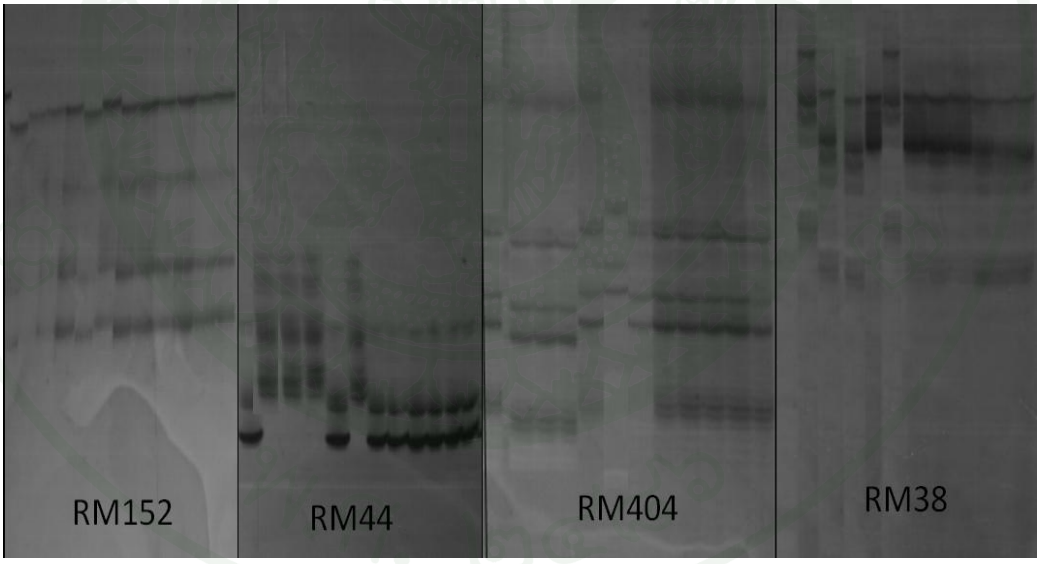


ภาพผนวกที่ ก13 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 7

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

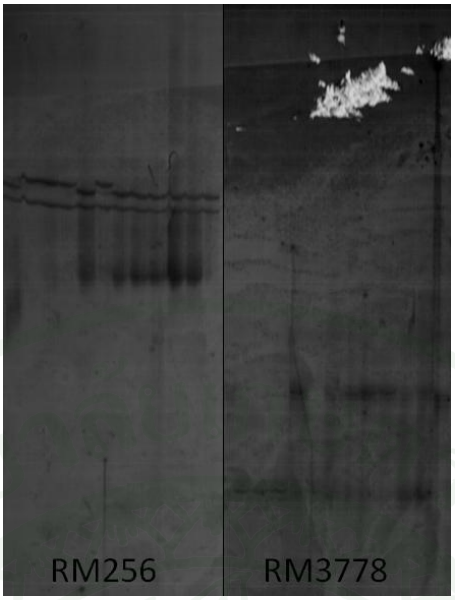


ภาพผนวกที่ ก14 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 7

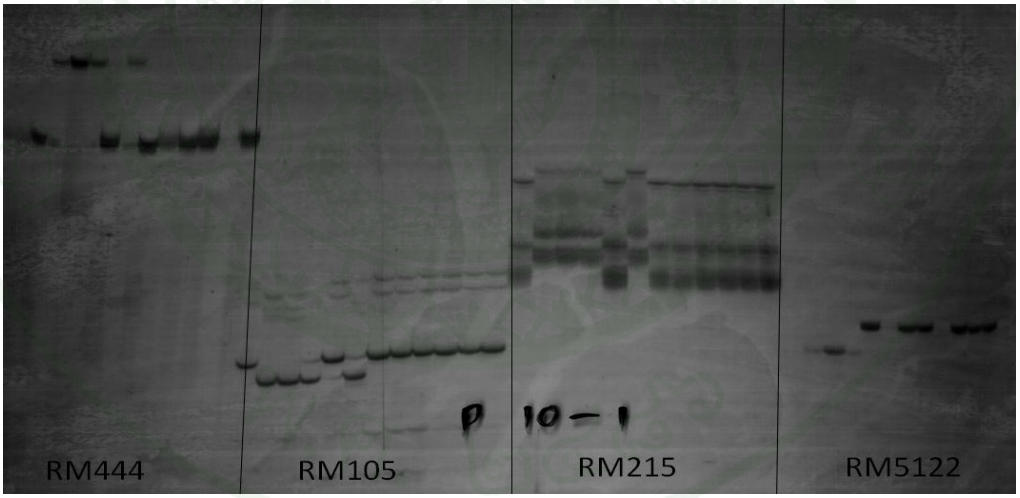


ภาพผนวกที่ ก15 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 8

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

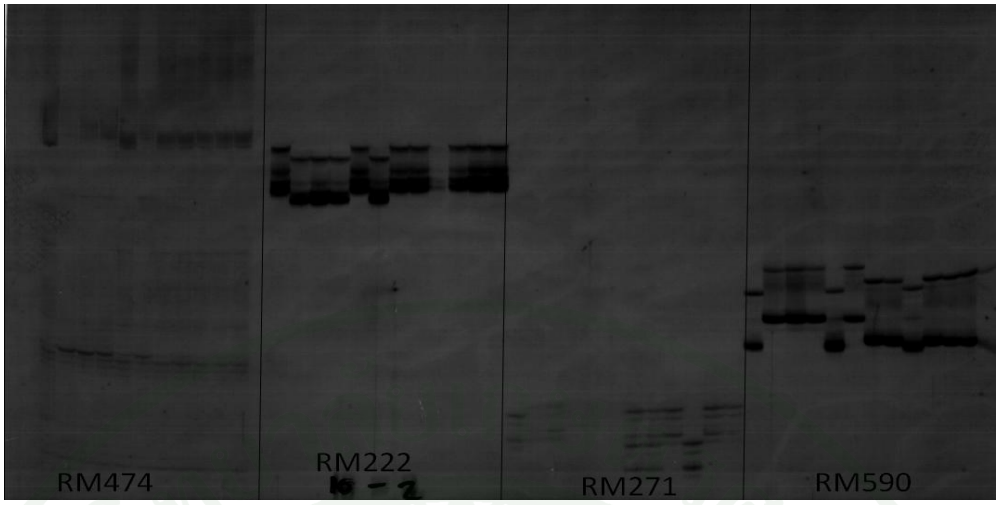


ภาพผนวกที่ ก16 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 8

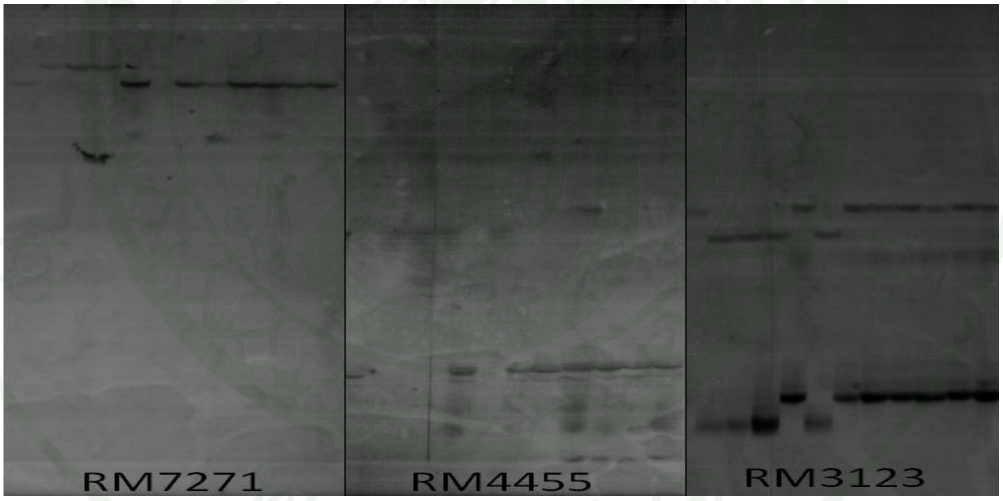


ภาพผนวกที่ ก17 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 9

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

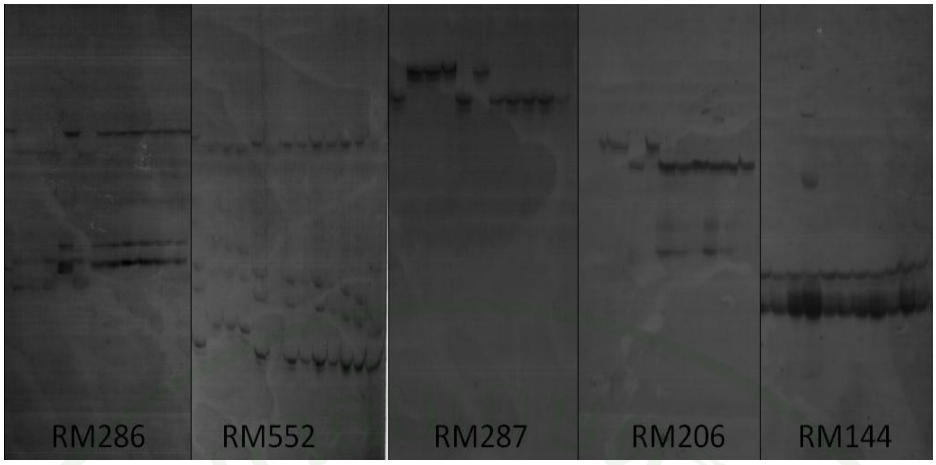


ภาพผนวกที่ ก18 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 10

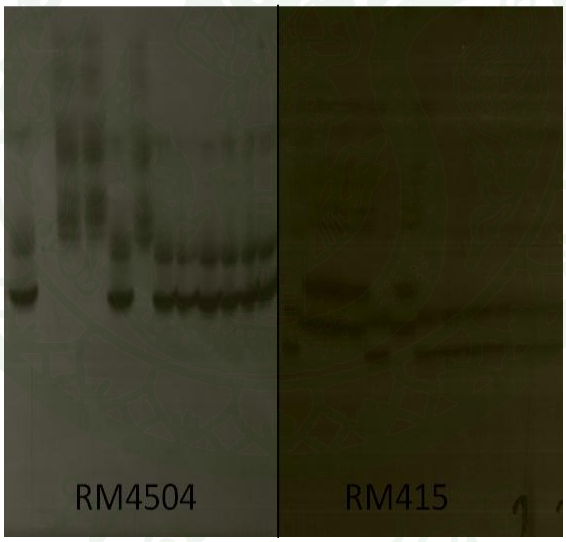


ภาพผนวกที่ ก19 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 10

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

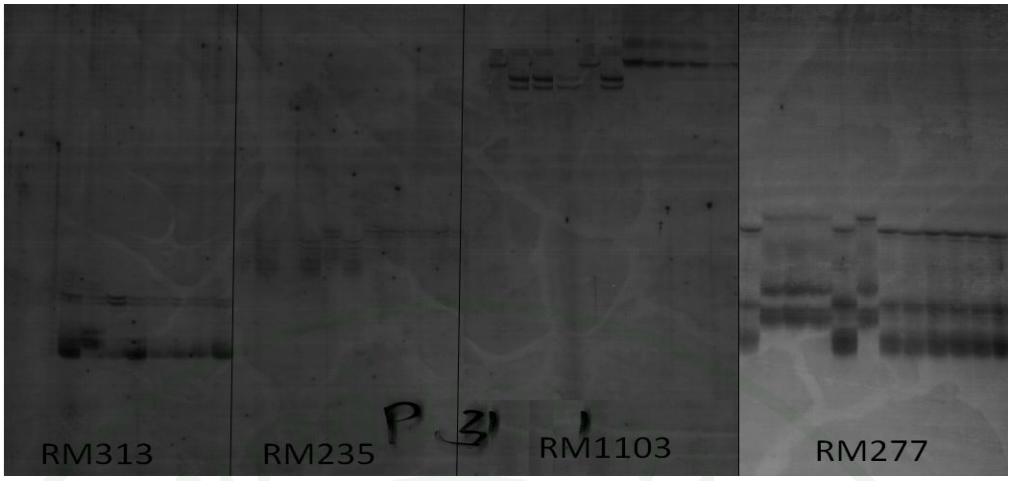


ภาพผนวกที่ ก20 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกใช้ในการทดลองบนโครโมโซมที่ 11

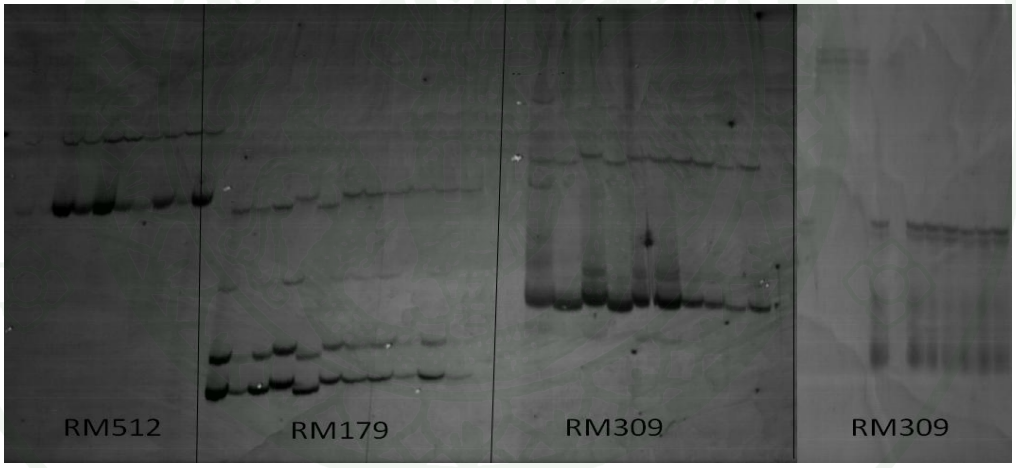


ภาพผนวกที่ ก21 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 11

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

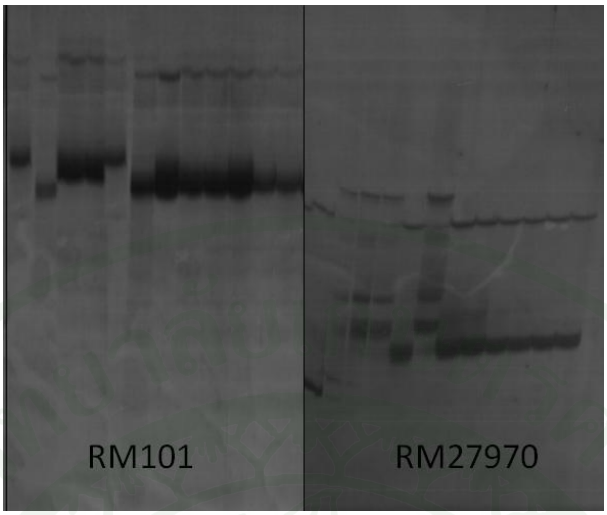


ภาพผนวกที่ ก22 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกใช้ในการทดลองบนโครโมโซมที่ 12



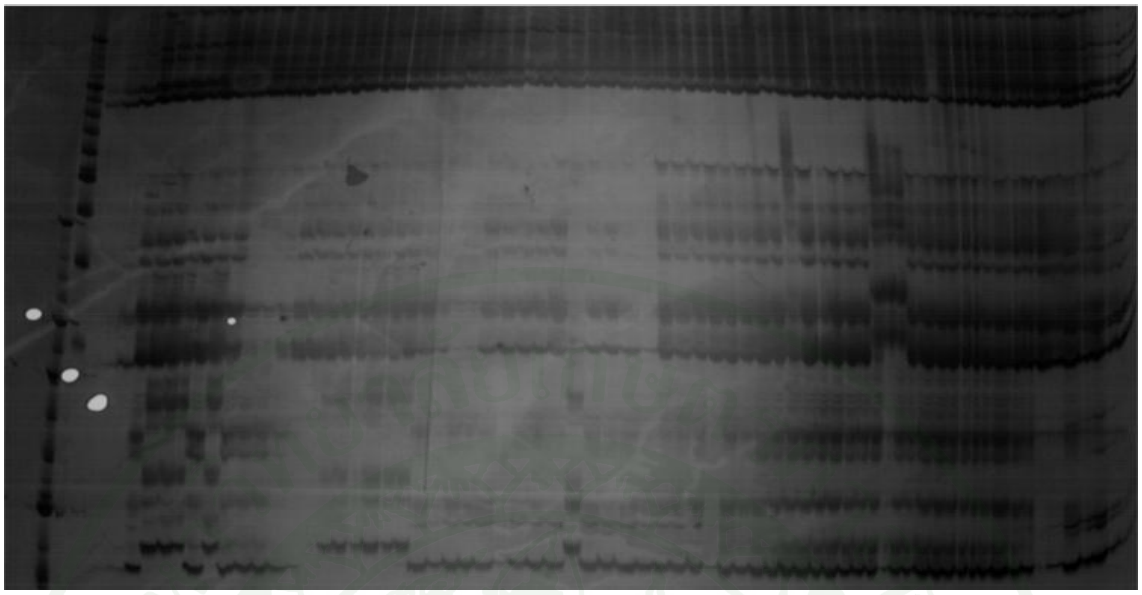
ภาพผนวกที่ ก23 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 12

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

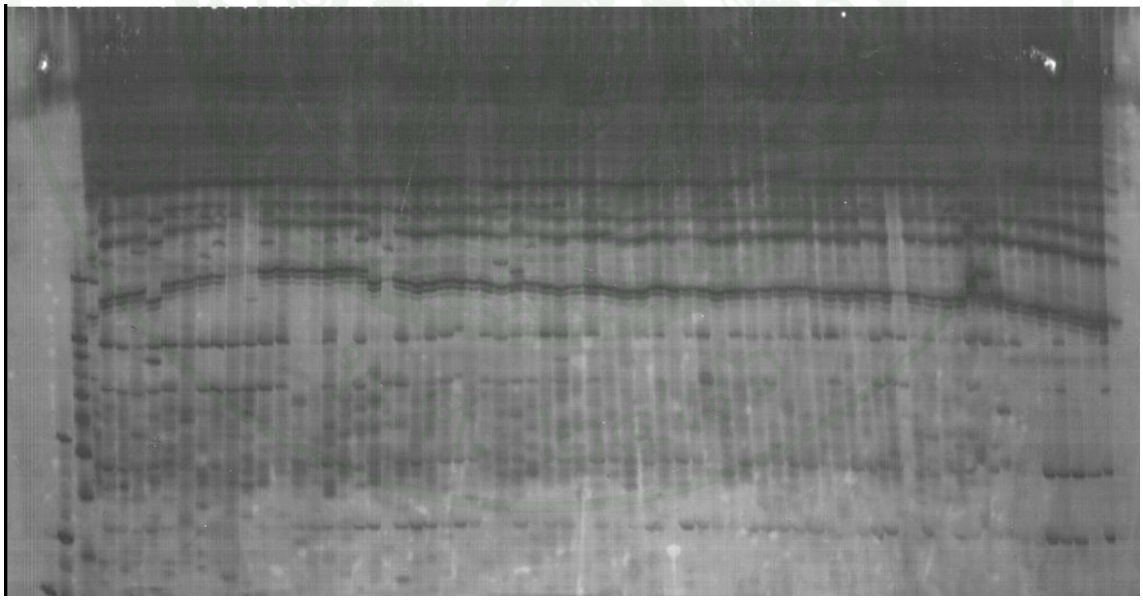


ภาพผนวกที่ ก24 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่ มาทดสอบในประชากรที่คัดเลือกในการทดลองบนโครโมโซมที่ 12

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

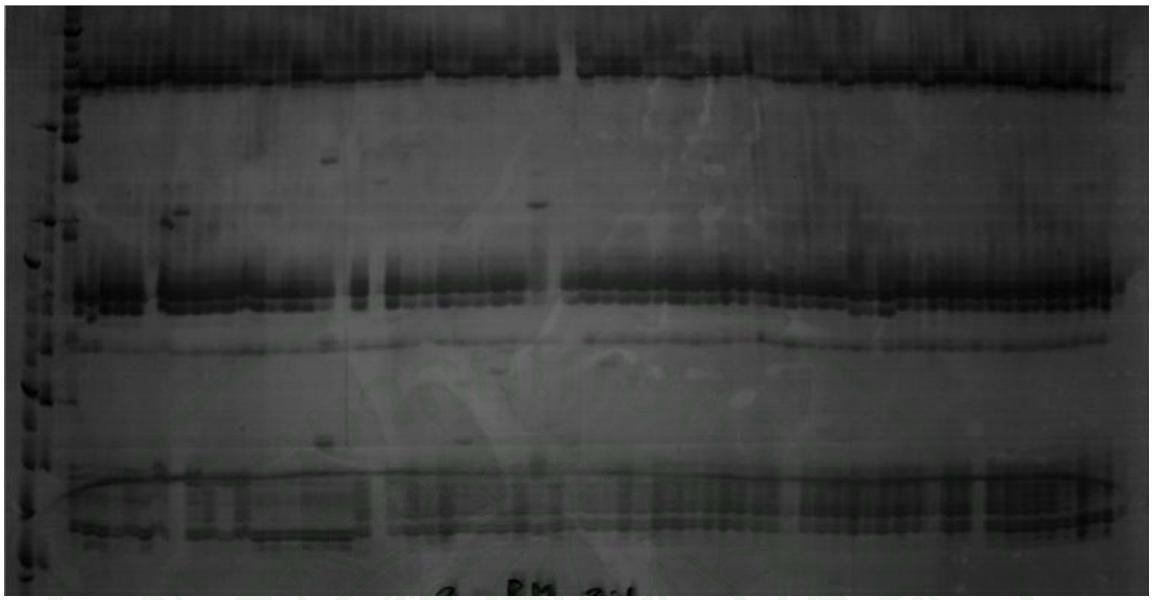


ภาพผนวกที่ ก25 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM208 ที่ให้ผลการประเมินจีโนไทป์สอดคล้องกับฟีโนไทป์มาทดสอบในประชากรทั้งหมด

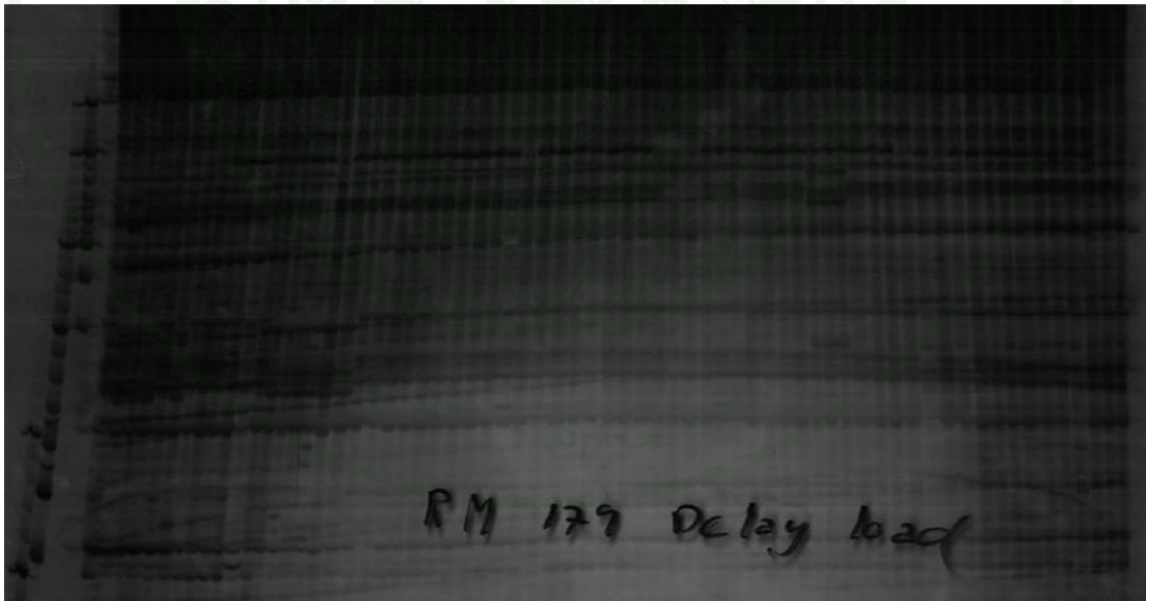


ภาพผนวกที่ ก26 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM85 ที่ให้ผลการประเมินจีโนไทป์สอดคล้องกับฟีโนไทป์มาทดสอบในประชากรทั้งหมด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ก27 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM38 ที่ให้ผลการประเมินจีโนไทป์สอดคล้องกับฟีโนไทป์มาทดสอบในประชากรทั้งหมด



ภาพผนวกที่ ก28 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM179 ที่ให้ผลการประเมินจีโนไทป์สอดคล้องกับฟีโนไทป์มาทดสอบในประชากรทั้งหมด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

ปริมาณสารเคมีที่ใช้และการเตรียมสารเคมีที่จำเป็นในขั้นตอนการทำ PAGE

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณสารเคมีที่ใช้และการเตรียมสารเคมีที่จำเป็นในขั้นตอนการทำ PAGE

สารละลาย Sequencing stop solution (sequencing dye)ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

98 เปอร์เซ็นต์ฟอร์มามายด์ (formamide)	49	มิลลิลิตร
0.025 เปอร์เซ็นต์บรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue)	0.0125	กรัม
0.025 ไซเลนไซยานอล	0.0125	กรัม
10 มิลลิโมล 0.5 โมล EDTA พีเอช 8.0	1	มิลลิลิตร

ปั่นนาน 30 นาที

สารละลายกรดอะซิติก + แอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

100 เปอร์เซ็นต์กรดอะซิติก	250	ไมโครโมล
แอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์	475	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

สารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (10% APS) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	3	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 30 มิลลิลิตร
หุ้มด้วยฟรอยด์เก็บไว้ในตู้เย็น

สารละลาย 5xTBE ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Tris base	54	กรัม
กรดบอริค	27.5	กรัม
0.5 MEDTA พีเอช 8.0	20	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมตร 1,000 มิลลิลิตร

สารละลาย 6 เปอร์เซ็นต์อะคริลามายด์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

40 เปอร์เซ็นต์อะคริลามายด์	75	มิลลิลิตร
ยูเรีย	210	กรัม
5xTBE	100	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตรหุ้มด้วยฟรอยด์เก็บไว้ในตู้เย็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารละลาย Fixer ปริมาตร 110 มิลลิลิตร

แอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์	105	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก 100 เปอร์เซ็นต์	5	มิลลิลิตร

แช่ตู้เย็นให้ได้อุณหภูมิ 10 - 12 องศาเซลเซียส

สารละลาย Silver staining ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

AgNO3	15	กรัม
37 เปอร์เซ็นต์ HCOH	1.5	มิลลิลิตร

เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

สารละลาย Developer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

NaOH	1.5	กรัม
37 เปอร์เซ็นต์ HCOH	2	มิลลิลิตร

เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวอุษณีย์ ไวยเลิศ
วัน เดือน ปี	12 มกราคม 2532
สถานที่เกิด	จ. นครนายก
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เกษตรศาสตร์) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ (ถ้ามี)	ทุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาเพื่อการตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติประจำปีงบประมาณ 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์