



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พืชไร่)

ปริญญา

พืชไร่

สาขา

พืชไร่นา

ภาควิชา

เรื่อง การปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานโรคไหม้โดยวิธีผสมกลับ

Breeding of Aromatic Rice Variety Khao Dawk Mali 105 for Blast Disease Resistance
by Backcross Method

นามผู้วิจัย นางสาวเสาวลักษณ์ อัคราช

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ธานี ศรีวงศ์ชัย, วท.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ประภา ศรีพิจิตต์, D.Agr.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์รังสฤษฎ์ กาวิจักษณ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานโรคไหม้โดยวิธีผสมกลับ

Breeding of Aromatic Rice Variety Khao Dawk Mali 105 for Blast Disease Resistance
by Backcross Method

โดย

นางสาวเสาวลักษณ์ อัคราช

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)

พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เสาวลักษณ์ อัคราช 2554: การปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานโรคไหม้
โดยวิธีผสมกลับ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่) สาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่นา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ธานี ศรีวงศ์ชัย, วท.ด. 86 หน้า

ข้าวเป็นธัญพืชที่สำคัญชนิดหนึ่ง เนื่องจากประชากรมากกว่าครึ่งหนึ่งของโลกบริโภคข้าว
เป็นอาหารหลัก พันธุ์ข้าวไทยที่มีชื่อเสียงและได้รับความนิยมจากชาวไทยและชาวต่างประเทศ คือ
พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวที่มีคุณภาพหุงต้มดีและมีกลิ่นหอม แต่ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105
อ่อนแอต่อโรคไหม้ ในการวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อถ่ายทอดยีนต้านทานโรคไหม้ ซึ่งควบคุม
ด้วยยีนบนโครโมโซมที่ 11 จากข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล ไปยังข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธีการ
ผสมกลับ มีการทดสอบความต้านทานโรคไหม้ของต้นที่ได้เพื่อยืนยันการปรากฏของยีนต้านทานใน
รุ่นลูกก่อนการผสมกลับแต่ละครั้ง และประเมินค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity)
ของลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 เปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อ (เจ้าหอมนิล) และพันธุ์แม่ (ขาวดอกมะลิ 105)
โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ Simple Sequence Repeat (SSR) ทั้งหมด 31 เครื่องหมายที่กระจาย
ตัวอยู่ในบริเวณต่างๆของจีโนมข้าว และสามารถคัดเลือกลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 ที่มีค่าความเหมือน
ทางพันธุกรรมกับข้าวพันธุ์แม่สูงสุด 5 อันดับแรก ซึ่งมีค่าเท่ากับ 93.54 90.32 87.09 83.87 และ
83.87 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ยิ่งกว่านั้นสายพันธุ์ดังกล่าวยังคงคุณภาพหุงต้มและความหอมเหมือน
ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เมื่อทดสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับยีนที่ควบคุมคุณภาพหุง
ต้มและความหอม นอกจากนี้จากการประเมินความต้านทานโรคไหม้สายพันธุ์ทั้ง 5 นี้ พบว่ามียีน
ต้านทานของข้าวเจ้าหอมนิลบนโครโมโซมที่ 11 ในทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ และข้าวที่ได้ทั้ง 5 สาย
พันธุ์นั้นสามารถนำไปคัดเลือกต่อเพื่อให้ได้เป็นข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ต้านทานโรคไหม้

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

Saovaluck Uckarach 2011: Breeding of Aromatic Rice Variety Khao Dawk Mali 105 for Blast Disease Resistance by Backcross Method. Master of Science (Agronomy), Major Field: Agronomy, Department of Agronomy. Thesis Advisor: Mr. Tanee Sreewongchai, Ph.D. 86 pages.

Rice is one of the most important cereal crops. More than one half of the world's populations consume rice as staple food. Thai rice variety Khao Dawk Mali 105 (KDML 105) is famous and popular in Thailand and many countries. This variety has good cooking quality and aroma. However, KDML 105 is susceptible to blast disease. The objective of this study was to transfer blast disease resistance gene, which is located on chromosome 11 from rice variety Jao Hom Nin (JHN) to KDML 105 by backcross method. The progenies were inoculated by blast pathogen to identify the resistance gene before each backcrossing. Genetic similarity of the BC₂F₂ progenies were evaluated comparing with their parents by using 31 Simple Sequence Repeat (SSR) markers which were distributed at various regions of rice genome. Five lines of the BC₂F₂ progeny with high genetic similarity 93.54, 90.32, 87.09, 83.87 and 83.87 percent to KDML 105 were selected. Moreover, these 5 lines demonstrated genetic similarity in cooking quality and aroma KDML 105. Each validation, molecular marker specific to these controlling genes were applied. In addition, all selected lines exhibited the resistant allele on chromosome 11 of JHN when they were evaluated for blast resistance. These lines can be used for improving blast resistance of KDML 105.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ธานี ศรีวงศ์ชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร.ประภา ศรีพิจิตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อาจารย์เฉลิมพล ภูมิไชย ประธานในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และศาสตราจารย์ ดร.สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการศึกษาการทดลอง ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นาทุกท่าน ที่ถ่ายทอดความรู้ในด้านต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งที่ผู้วิจัยจะนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์กับการดำเนินการวิจัยและจัดทำวิทยานิพนธ์ และขอขอบคุณเจ้าของผลงานวิจัยทุกท่านที่นำผลงานวิจัยของท่านมาใช้เป็นเอกสารอ้างอิงในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนค่าใช้จ่ายในการทำวิจัยภายใต้โครงการ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ด้านทานโรคไหม้ ด้วยยีน Pi-1 และสำนักงานพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ที่สนับสนุนค่าใช้จ่ายในการเรียนระดับบัณฑิตศึกษาและการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสมบูรณ์ และคุณแม่พัสณีย์ อัคราช ญาติพี่น้องทุกท่านที่ให้การกำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณ พี่ๆ และน้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลืองานวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดี

เสาวลักษณ์ อัคราช

มิถุนายน 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	13
อุปกรณ์	13
วิธีการ	15
ผลและวิจารณ์	32
สรุปและข้อเสนอแนะ	53
สรุป	53
ข้อเสนอแนะ	54
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	55
ภาคผนวก	62
ภาคผนวก ก ภาพผลการทดลอง และตารางแสดงผล	63
ภาคผนวก ข ปริมาณสารเคมีที่ใช้และการเตรียม	
สารเคมีที่จำเป็นในขั้นตอนการทำ PAGE	83
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	86

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
1	ค่าความต้านทานต่อเชื้อโรคใหม่ 24 สายพันธุ์ ของข้าว 24 พันธุ์	35
2	ค่าความต้านทานต่อเชื้อโรคใหม่ 46 สายพันธุ์ ในข้าวพันธุ์ทดสอบ 3 พันธุ์	41
3	ผลอ่านค่าการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ ที่ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย Naro และ OSR19 เพื่อใช้ในการคัดเลือกลักษณะความหอมและปริมาณอะมิโลสในข้าว ตามลำดับ จากลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 เปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อแม่	45
4	จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ทำให้ความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวเจ้าหอมนิล ในการทำ PAGE	47
5	ผลอ่านค่าการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ ของลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 โดยประเมินจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ เปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อแม่	48
6	ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของข้าวลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล	51

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่

หน้า

ก1	รายชื่อเชื้อโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่บริเวณภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือในปีเพาะปลูก 2551/2552 แยกตามพื้นที่เก็บ พันธุ์ข้าวและส่วนที่เก็บ	64
ก2	การประเมินความต้านทานโรคไหม้ โดยการให้คะแนน 7 ระดับ คือ 0-6	69
ก3	เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ใช้ในการทดสอบ ทั้งหมด 120 เครื่องหมาย	71

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ขั้นตอนการแยกเชื้อราแบบสปอร์เดี่ยว	17
2	ขั้นตอนการปลูกเชื้อโรคใหม่โดยวิธีการฉีดพ่น	19
3	ลักษณะความต้านทานโรคใหม่ในข้าวพันธุ์ทดสอบด้วยเชื้อโรคใหม่	20
4	ขั้นตอนการผสมข้ามพันธุ์ข้าว	24
5	ห้องมืดสำหรับบังคับการออกดอกของข้าวไวต่อช่วงแสง	25
6	บริเวณพื้นที่ที่มีการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคใหม่	32
7	การเก็บรวบรวมตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคใหม่	33
8	การทดสอบความต้านทานโรคใหม่ในข้าวพันธุ์ทดสอบ	34
9	แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ในความต้านทานโรคใหม่ของข้าว 24 พันธุ์และค่าดัชนีความต้านทานแบบกว้างของข้าวพันธุ์ทดสอบ	37
10	แผนภาพแสดงความสัมพันธ์การต้านทานโรคใหม่ของเชื้อโรคใหม่ 24 สายพันธุ์และค่าดัชนีความรุนแรงของเชื้อ	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ก1 ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ใช้เป็นพันธุ์รับ (ก) และข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล ใช้เป็นพันธุ์ให้ (ข)	77
ก2 ภาพแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการทดสอบลักษณะความหอม (ก) และ ปริมาณอะมิโลส (ข) ตามลำดับ โดยใช้เทคนิค SSR ในลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 จำนวน 10 ต้น และเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และ ข้าวเจ้าหอมนิล	77
ก3 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ใช้ในการ ทดลองบนโครโมโซมที่ 1 และ 2	78
ก4 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ใช้ในการทดลองบน โครโมโซมที่ 3 4 และ 5	79
ก5 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ใช้ในการทดลองบน โครโมโซมที่ 6 7 และ 8	80
ก6 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ใช้ในการทดลองบน โครโมโซมที่ 9	81
ก7 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ใช้ในการทดลองบน โครโมโซมที่ 10 11 และ 12	82

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานโรคไหม้โดยวิธีผสมกลับ

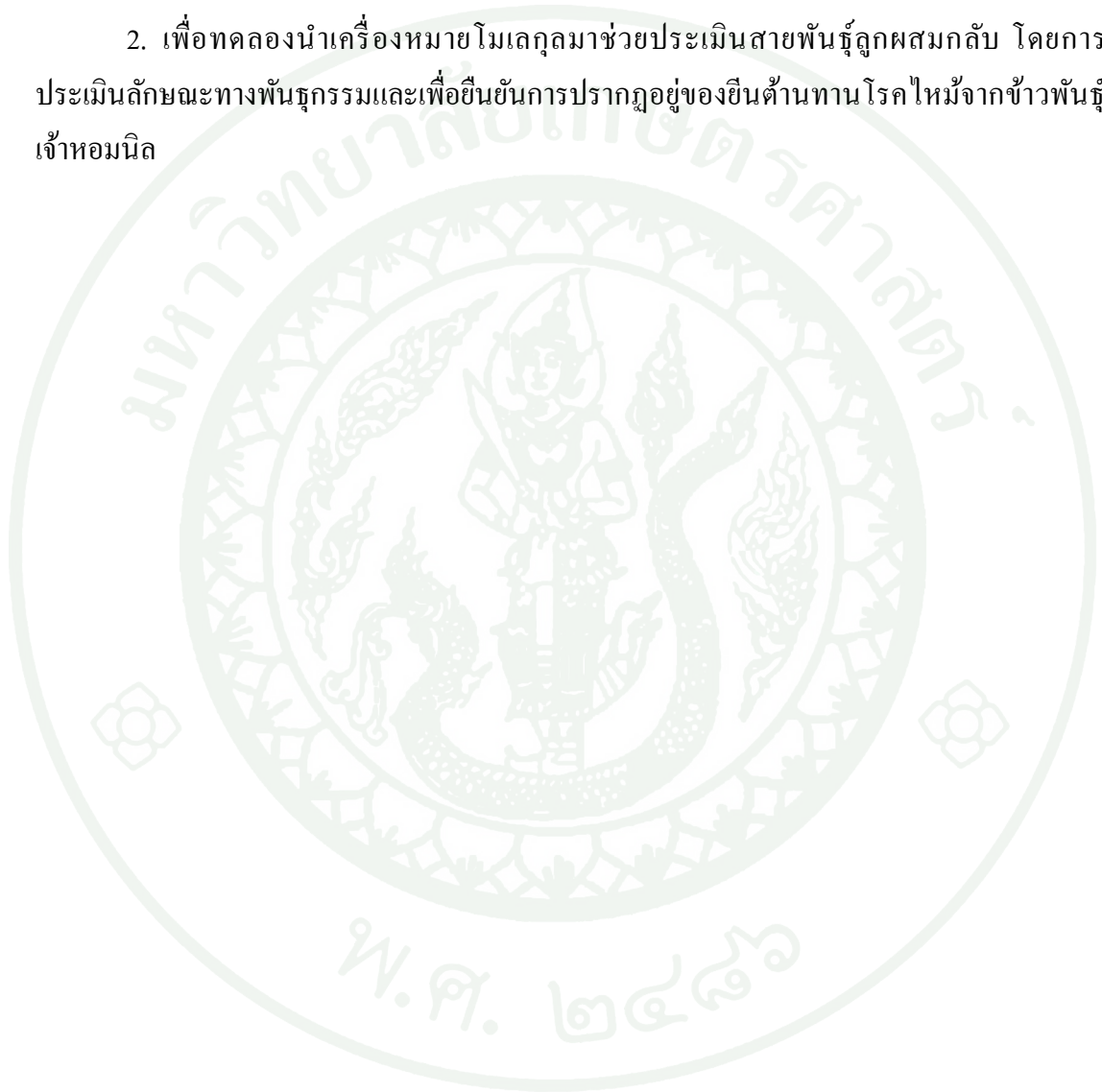
Breeding of Aromatic Rice Variety Khao Dawk Mali 105 for Blast Disease Resistance by Backcross Method

คำนำ

ข้าวเป็นธัญพืชที่สำคัญชนิดหนึ่ง เนื่องจากประชากรมากกว่าครึ่งหนึ่งของโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์การเกษตร, 2547) พันธุ์ข้าวไทยที่มีชื่อเสียงและได้รับความนิยมจากชาวไทยและชาวต่างประเทศ คือ พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (Khao Dawk Mali 105) ซึ่งเป็นข้าวที่มีคุณภาพหุงต้มดีและมีกลิ่นหอม แต่ข้าวพันธุ์นี้มีลักษณะไวต่อช่วงแสง ทำให้เพาะปลูกได้ปีละหนึ่งครั้ง โดยนิยมปลูกกันมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือของประเทศ ถึงแม้ว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีคุณภาพการหุงต้มดี แต่ก็มีลักษณะด้อยหลายประการ เช่น อ่อนแอต่อโรคและแมลงหลายชนิด โดยเฉพาะโรคไหม้ (blast disease) (ถัดดาวัลย์, 2550) โรคไหม้เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* เชื้อนี้สามารถเข้าทำลายข้าวได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง เนื่องจากเชื้อราสามารถแพร่กระจายได้ง่าย โดย ลม น้ำ ดิน ส่วนของพืชหรือเมล็ด ทำให้พบการระบาดของโรคไหม้ในพันธุ์ข้าวที่อ่อนแออยู่เสมอ (วัชร, 2534) อาการของโรคไหม้เกิดที่ใบ ผลจะมีลักษณะคล้ายรูปกระสวย (spindle shape) โดยอาการจะเริ่มจากจุดสีน้ำตาลเล็กๆ และขยายใหญ่ขึ้น ซึ่งทำให้ต้นข้าวแห้งตายในที่สุด (Tebeest *et al.*, 2007) Sriboonjit and Viboonpong (2000) ได้ประเมินผลผลิตที่เสียหายของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จากโรคไหม้ในแต่ละปี พบว่ามีค่าเฉลี่ยร้อยละ 5 ของผลผลิตที่ควรจะได้รับ เพื่อป้องกันผลผลิตข้าวที่จะเสียหายจากโรคไหม้ จึงจำเป็นต้องป้องกันและแก้ไขปัญหานี้ โดยสามารถทำได้หลายวิธี การวิจัยครั้งนี้เลือกใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานโรคไหม้โดยวิธีการผสมกลับ เนื่องจากวิธีการผสมกลับเป็นการถ่ายทอดลักษณะที่ต้องการเพียงหนึ่งหรือสองลักษณะเข้าไปให้พันธุ์พืชที่ด้อยอยู่แล้ว (กฤษฎา, 2551) อย่างไรก็ตามในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้ ต้องคำนึงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อโรคด้วย ซึ่งมักพบเสมอว่า ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคและแมลงนั้น เมื่อส่งเสริมพันธุ์พืชต้านทานให้เกษตรกรปลูกจะพบว่า เพียงไม่กี่ปีพันธุ์ดังกล่าวจะสูญเสียความต้านทานไป ดังนั้นนักปรับปรุงพันธุ์ข้าวจำเป็นต้องมีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคและแมลงอยู่เสมอ โดยการใช้แหล่งของความต้านทานใหม่ๆ (อภิชาติ และคณะ, 2544)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานโรคไหม้โดยวิธีผสมกลับโดยใช้ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิลเป็นพันธุ์ให้ความต้านทาน
2. เพื่อทดลองนำเครื่องหมายโมเลกุลมาช่วยประเมินสายพันธุ์ลูกผสมกลับ โดยการประเมินลักษณะทางพันธุกรรมและเพื่อยืนยันการปรากฏอยู่ของยีนต้านทานโรคไหม้จากข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล



การตรวจเอกสาร

ข้าว

ลักษณะทั่วไปของข้าว

ข้าว (rice) เป็นพืชสมตัวเองจัดอยู่ในวงศ์ (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 ปลูกเฉพาะในประเทศฟิลิปปินส์และอินโดนีเซียเท่านั้น ส่วน *O. glaberrima* มีปลูกเฉพาะในทวีปแอฟริกาเท่านั้น (Chang, 1976)

ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

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

วิตามินบี 1 และ บี 2 เท่ากับ 21.2 และ 6.4 ไมโครกรัม มีกรดอะมิโนไลซีน 1.3 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 9.5 เปอร์เซ็นต์ ข้อดีของข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 คือ ผลผลิตค่อนข้างต่ำ ไม่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง โรคไหม้ โรคจู้ และโรคใบหงิก ไม่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยจักจั่นสีเขียวและหนอนกอ และเป็นข้าวไวต่อช่วงแสงซึ่งสามารถเพาะปลูกได้เพียงปีละ 1 ครั้ง ในช่วงฤดูนาปี (วาสนา, 2538)

ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล

ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล (Jao Hom Nin, JHN) เป็นข้าวนาสวน ไม่ไวต่อช่วงแสง สามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี การแตกกอดี ไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้ง (bacterial leaf blight) และแมลง โดยทั่วไป ความสูงของต้น 75 เซนติเมตร ใบและลำต้นมีสีเขียวเข้มอมม่วง เมล็ดข้าวกลี้ยงยาวประมาณ 6.5 มิลลิเมตร มีสีม่วงดำ เปลือกหุ้มเมล็ดข้าวมีสีม่วงเข้ม อายุการเก็บเกี่ยว 95-100 วัน ผลผลิตเฉลี่ย 400-700 กิโลกรัมต่อไร่ ต้านทานต่อโรคไหม้ (blast) ทนทานต่อสภาพแล้ง (drought) และดินเค็ม (salinity) (อภิชาติและคณะ, 2553)

โรคไหม้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

โรคไหม้ (blast disease) เกิดจากเชื้อ *Pyricularia oryzae* Cav. ซึ่งเป็นเชื้อราในกลุ่ม imperfect fungi มีระยะ teleomorph คือ *Magnaporthe grisea* (Hebert, 1971)

อนงค์ และนันทินี (2542) รายงานว่า เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคไหม้สามารถจำแนกได้เป็น 2 ชนิด คือ *P. grisea* (Cooke) Sacc. และ *P. oryzae* Cav. เชื้อราทั้งสองมีลักษณะอาการและขนาดโคนิเดียแตกต่างกัน โดยเชื้อรา *P. grisea* เป็นสาเหตุของโรคไหม้ในหญ้าและพืชอื่นๆ ลักษณะอาการบนใบมีจุดสีน้ำตาลอมม่วงหรือน้ำตาล ขยายเป็นแผลวงกลมและขอบนอกสีน้ำตาลอมม่วง มีโคนิเดีย ขนาด 17-28 x 6-9 ไมครอน ส่วนเชื้อรา *P. oryzae* เป็นสาเหตุของโรคไหม้ในข้าว ลักษณะอาการบนใบมีจุดสีน้ำตาลปนเทา ตรงขอบแผลมีสีน้ำตาลตรงกลางมีสีเทา และเมื่อแผลขยายใหญ่ขึ้นจะมีรูปร่างคล้ายกระสวย (spindle shape) มีขนาดโคนิเดีย 17-23 X 8-11 ไมครอน

เชื้อรา *P. oryzae* นี้มีการสร้างโคนิเดีย บนก้านชูโคนิเดีย (conidiophores) เป็นกลุ่มบนเนื้อเยื่อพืชและก้านชูโคนิเดีย มีผนังกัน มีการสร้างโคนิเดียจำนวน 1-20 โคนิเดียต่อก้านชูโคนิเดีย

โดยโคนิเดีย มีรูปร่างลักษณะไม่แน่นอน อาจเป็นแบบ pyriform หรือ obclevate ปลายยอดของโคนิเดียแหลม (tapering) มี 3 เซลล์ บางครั้งตรงผนังกั้นเซลล์ (septate) อาจจะเว้า (constricted) เล็กน้อย ซึ่งมีลักษณะใส ไม่มีสี (hyaline) มีขนาด 8.1-10.3 X 19.2-27.3 ไมครอน (Ou, 1972)

ลักษณะอาการ การเข้าทำลาย และการแพร่ระบาดของโรคไหม้

เชื้อราเป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคข้าวหลายชนิด เชื้อราสามารถแพร่กระจายโดยลม น้ำ ดิน ขึ้นส่วนของพืชหรือเมล็ด และสภาพแวดล้อมรวมทั้งความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญแพร่พันธุ์เกือบตลอดปี (Agrios, 1988) โรคข้าวที่เกิดจากเชื้อราและมีความสำคัญต่อการปลูกข้าวของไทย ได้แก่ โรคไหม้ โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคใบขีดสีน้ำตาล โรคกาบใบเน่า โรคกาบใบแห้งและโรคเมล็ดด่าง ซึ่งโรคไหม้เป็นโรคที่สำคัญและระบาดมากในการปลูกข้าวของไทย (ทัศนีย์, 2540) และเป็นโรคที่สำคัญในการเพาะปลูกข้าวทั่วโลก การระบาดพบได้ทั่วโลก (Noriguni, 2006) โดยจะมีความรุนแรงในแหล่งปลูกข้าวที่มีความชื้นสูง ความอุดมสมบูรณ์ดี เช่น ในเขตพื้นที่ชลประทาน ที่มีการทำนาหว่านน้ำตาม โดยใช้อัตราเมล็ดพันธุ์ที่มีจำนวนสูงกว่าปกติ การใช้ปุ๋ยไม่ถูกต้อง หรือการปลูกข้าวไร่

เชื้อราจะเข้าทำลายข้าวได้ตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงออกรวง เชื้อราสามารถเข้าทำลายทุกส่วนของต้นข้าวที่อยู่เหนือดิน ในระยะกล้าและแตกกอเชื้อราจะเข้าทำลายใบข้าวทำให้เกิดเป็นจุดสีน้ำตาลเล็กๆ ในระยะแรก ต่อมาจะขยายใหญ่ขึ้นตรงกลางแผลมีสีเทา ในพันธุ์ข้าวไม่ต้านทาน แผลจะมีรูปร่างเรียวยาวคล้ายรูปกระสวย ตรงกลางแผลมีสีเทา ขอบแผลมีสีน้ำตาลขนาดของแผลยาวประมาณ 10-15 มิลลิเมตร กว้างประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ลักษณะของแผลอาจเปลี่ยนแปลงไปได้ตามสภาพแวดล้อมและอายุของแผล ถ้าความรุนแรงมีมากแผลจะขยายใหญ่ขึ้นติดต่อกันทำให้ใบข้าวไหม้และแห้งตายได้ ถ้าเชื้อเข้าทำลายข้าวในระยะออกรวงแล้ว เชื้อจะเข้าทำลายบริเวณคอรวงจะทำให้รวงข้าวขาวและแห้งตายในที่สุด (วัชร, 2534)

วงจรการเข้าทำลายและการระบาดของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

การเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ ในระยะแรกจะเกิดขึ้นหลังจากโคนิเดีย สัมผัสกับผิวพืชโดยใช้ส่วนที่เรียกว่า “spore tip mucilage” ซึ่งอยู่บริเวณปลายสุดของโคนิเดีย โดยมีน้ำที่ให้ความชื้นอย่างเพียงพอกระตุ้นให้เกิดการงอก และพบว่า การงอกของโคนิเดียจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยจะเกิดขึ้นภายในชั่วโมงแรกของการที่เชื้อเข้าสัมผัสกับพืช (Kang, 2000) และจะสร้าง appressorium และ infection peg เพื่อแทงทะลุผ่าน cuticle และ epidermis หรืออาจจะเข้าไปทาง

ปากใบ (stomata) ก็ได้ หลังจากนั้นเส้นใยจะเจริญอยู่ในเซลล์พืชมากมาย และสร้างโคนิเดียต่อไป ซึ่งโคนิเดียจะเริ่มสร้างหลังจากเชื้อเข้าไปแล้วประมาณ 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 ชั่วโมงและแผลจะเริ่มปรากฏภายใน 4-5 วัน โคนิเดียจะถูกสร้างขึ้นใหม่ภายใน 6-7 วัน ถ้าแผลขนาดใหญ่จะผลิตโคนิเดีย จำนวน 2,000-6,000 โคนิเดียต่อกิ่งและสามารถผลิตต่อเนื่องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในขณะที่แผลขนาดเล็กจะผลิตได้เพียง 50-300 โคนิเดียต่อกิ่งเป็นเวลา 5-7 วัน ในขณะที่มีน้ำค้างหรือมีฝนตกโคนิเดีย จะถูกปลดปล่อยในช่วงเวลากลางคืนเป็นจำนวนมาก

เชื้อจะเข้าทำลายต้นข้าวในระยะแรกเรียกว่า primary inoculum นอกจากนี้เชื้อยังสามารถอยู่ข้ามฤดูหนึ่งไปยังฤดูถัดไปได้ บนพืชที่เป็นโรคและวัชพืชบางอย่างสามารถเป็น alternate host ได้ดี และเมล็ดข้าวที่ตกหล่นในลักษณะเส้นใยติดไปกับเมล็ด (seed borne) หรืออาจจะตกค้างอยู่กับเศษซากพืช (debris borne) ได้แก่ ฟางข้าวและตอซัง อีกทั้งยังพบว่าเชื้อรานี้สามารถเข้าทำลายพืชตระกูลหญ้าชนิดต่าง ๆ ได้อย่างน้อย 50 ชนิดและพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ ได้แก่ ข้าว ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลีและข้าวฟ่าง (Zeigler, 1998) เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อเชื้อที่ฟักตัวอยู่จึงเจริญเติบโตเป็น secondary inoculum เข้าทำลายพืชอาศัยต่อไปด้วยเหตุนี้เองจึงทำให้การแพร่ระบาดของโรคไหม้ในข้าวรุนแรงและต่อเนื่องตลอดทั้งปี

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคไหม้ในข้าวมีความขึ้นอยู่ในช่วงระยะเวลาที่ยาวนาน ความชื้นสัมพัทธ์สูง มีลมไม่มากในเวลากลางคืนอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 22-28 องศาเซลเซียส ใบที่เปียกน้ำค้างมีส่วนช่วยให้เกิดการเข้าทำลายได้ดีขึ้น การสร้างโคนิเดีย และปลดปล่อยโคนิเดียเกิดขึ้นภายใต้ความชื้นสัมพัทธ์สูง และจะไม่สร้างโคนิเดีย หากความชื้นสัมพัทธ์ต่ำกว่า 89 เปอร์เซ็นต์ และมีการสร้างโคนิเดียเพิ่มขึ้นเมื่อความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 93 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกของโคนิเดีย และการเกิดแผลคือ 28 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ อาหารสังเคราะห์ ยังเป็นปัจจัยที่สำคัญที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *P. oryzae* ได้ดี เนื่องจากเชื้อ

สาเหตุนี้สามารถเจริญได้บนฟางข้าวหรือเมล็ดข้าวได้และสารอาหารที่มีอยู่ในแป้งข้าวมีส่วนสำคัญในการเจริญเติบโตของเชื้อนี้ด้วย (Ou, 1985)

การศึกษายีนควบคุมความต้านทานโรคไหม้ในประเทศไทย

จากการศึกษาของอภิชาติ (2540) พบว่ามี QTL อย่างน้อย 2 ตำแหน่ง เป็นตัวกำหนดความต้านทานโรคไหม้บนโครโมโซมที่ 7 และ 9 ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ใกล้กับยีน Pi-i และ Pi-ta นอกจากนั้นยังพบ QTL จำนวนอย่างน้อย 4 ตำแหน่ง อยู่บนโครโมโซมที่ 4 5 6 และ 11 ซึ่งมีผลต่อความต้านทานจำเพาะต่อเชื้อบางสายพันธุ์เท่านั้น จากการสืบหาตำแหน่งของความต้านทานโรคไหม้คอรวง (neck blast) ในประชากรเดียวกัน พบว่าตำแหน่งของ QTL แตกต่างไปจาก QTL ของความต้านทานโรคใบไหม้ และอยู่บนโครโมโซมที่ 5 และ 6 ดังนั้นจึงชี้ให้เห็นว่าพื้นฐานของความต้านทานโรคทั้งสองนั้นแตกต่างกัน และมีผลต่อความยุ่งยากในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานต่อโรคทั้งสอง ผลจากความรู้เรื่องตำแหน่งของยีนดังกล่าว สามารถนำไปพัฒนาระบบการคัดเลือกพันธุ์โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายได้

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 (marker assisted selection, MAS) ได้

อภิชาติ และคณะ (2553) รายงานว่าในการวิเคราะห์หาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้โดยวิธี Quantitative Trait Loci (QTL) นั้นมียีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล ซึ่งวางตัวอยู่บนโครโมโซม 1 และ 11 โดยอยู่ระหว่างโมเลกุลเครื่องหมาย RM212 - RM319 และ RM139 – RM144 ตามลำดับ โดยยีนที่อยู่บนโครโมโซมที่ 11 เป็นยีนหลัก และมีการใช้ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิลเป็นเชื้อพันธุ์กรรมในการปรับปรุงพันธุ์ต้านทานโรคไหม้อยู่ในปัจจุบัน (Sreewongchai *et al.*, 2010)

การผสมพันธุ์ การคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้

การคัดเลือกพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้มีวิธีการทดสอบทั้งปลูกทดสอบในสภาพธรรมชาติและวิธีการปลูกเชื้อ ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานแบบยั่งยืน

(durable resistance) โดยที่เชื้อโรคไม่สามารถเข้าทำลายพันธุ์ข้าวเหล่านั้นได้จึงเป็นเป้าหมายอันสำคัญยิ่ง (อภิชาติ และคณะ, 2544)

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีผสมกลับ

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีผสมกลับ เป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชเพียงวิธีเดียวที่สามารถคาดคะเน (predictable) ผลที่จะได้รับ และสามารถดำเนินการผสมกลับซ้ำ (repeatable) ได้หลายๆ ครั้ง โดยในแต่ละครั้งของการผสมกลับนั้นสัดส่วนของ homozygous genotype จะเพิ่มขึ้น โดยคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$[2^m - 1 / 2^m]$$

เมื่อ m = จำนวนครั้งของการผสมกลับ

จากสูตรดังกล่าว อาจใช้เป็นแนวทางประกอบการตัดสินใจว่าจะผสมกลับกี่ครั้งจึงจะพอ โดยปกติแล้วจำนวนการผสมกลับมีตั้งแต่ 3-10 ครั้ง ถ้าถึง 10 ครั้งลูกที่ได้อาจเหมือนกับพันธุ์รับ (recurrent parent) เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์

วิธีการผสมกลับนับเป็นวิธีการถ่ายทอดลักษณะที่ดีจากพันธุ์หนึ่งไปยังอีกพันธุ์หนึ่งอย่างได้ผล นิยมใช้ในพืชทั้งผสมตัวเองและผสมข้าม เหมาะกับการปรับปรุงพันธุ์พืชในลักษณะของความต้านทานโรค (สุทัศน์, 2528)

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีผสมกลับนั้นมักใช้ในกรณีที่มีพืชพันธุ์ดีอยู่แล้ว แต่พันธุ์ดีเหล่านั้นยังขาดลักษณะใดลักษณะหนึ่งอยู่ แต่ลักษณะที่ขาดควรเป็นลักษณะเชิงคุณภาพที่ควบคุมด้วยยีนน้อยคู่ (กฤษฎา, 2519) วิธีนี้นำรุ่นลูกผสมกลับไปยังพ่อแม่พันธุ์ดีหลายๆ ครั้ง เพื่อให้ลักษณะทุกอย่างเหมือนต้นพ่อแม่ แต่เพิ่มลักษณะพิเศษที่ต้องการรวมไว้ในพืชพันธุ์ดี (Allard, 1999)

วิธีการผสมกลับ

การผสมกลับจะต้องมีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ พันธุ์รับ ซึ่งเป็นพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ที่จะนำเอาลูกหรือหลานที่ได้กลับมาผสมเพื่อให้ได้ลักษณะที่ดีเกือบทั้งหมดเอาไว้และจะต้องเป็นพันธุ์ให้ผลผลิตสูงสามารถปรับตัวได้ดีในท้องถิ่นนั้นๆ พันธุ์ให้ (donor parent) เป็นพันธุ์ที่มีลักษณะพิเศษที่ต้องการซึ่งไม่มีในพันธุ์รับ และต้องการจะถ่ายทอดลักษณะที่ต้องการนี้ไปไว้ในพันธุ์รับ

วิธีการผสมกลับจะให้ผลเป็นที่พอใจก็ต่อเมื่อมีพันธุ์รับที่ดี ลักษณะที่ถ่ายทอดจากพันธุ์ให้จะต้องคงที่หลังจากผสมกลับไปหลายๆครั้งและจะต้องแสดงออกให้เห็น นอกจากนี้แล้ว จำนวนครั้งของการผสมกลับจะต้องมากพอที่จะรักษาเอาลักษณะของพันธุ์รับไว้ได้ วิธีการผสมกลับนี้แยกเป็น 2 กรณี คือ 1. กรณีที่พันธุ์ให้ถูกควบคุมด้วยยีนซ่ม และ 2. กรณีที่พันธุ์ให้ถูกควบคุมด้วยยีนแฝง

การจะพิสูจน์ว่าพันธุ์ให้ถูกควบคุมด้วยยีนซ่ม หรือยีนแฝงนั้นทำได้โดยการนำไปผสมข้ามกับพันธุ์ที่ไม่มีลักษณะนั้นๆอยู่ เช่นพันธุ์ให้มีลักษณะต้านทานโรค ถ้านำไปผสมข้ามกับพันธุ์ที่ไม่ต้านทานโรคแล้วลูกที่ได้แสดงความต้านทานออกมา ก็อาจสันนิษฐานได้ว่าพันธุ์ให้นั้นถูกควบคุมโดยยีนซ่ม แต่ถ้าปรากฏว่ารุ่นลูกที่ได้ไม่ต้านทานโรคก็แสดงว่าพันธุ์ให้ถูกควบคุมด้วยยีนแฝง ส่วนการพิสูจน์ว่ามียีนควบคุมก็จะต้องปล่อยให้ผสมตัวเองอีก 1 ครั้ง แล้วดูอัตราส่วนการกระจายตัวของลูกผสมรุ่น F_2 เช่น ถ้ามีลักษณะต้านทานโรค: ไม่ต้านทานโรคเท่ากับ 3: 1 ก็แสดงว่ามียีนควบคุมเพียงคู่เดียว (Allard, 1999) เป็นต้น

เครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมาย หรือ marker ใช้เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณและคุณภาพ เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) หมายถึงดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ (สุรินทร์, 2552) เครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1. hybridization-based marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอซึ่งพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเข้าคู่ของลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค hybridization ตัวอย่างได้แก่ RFLP marker (Tanksley *et al.*, 1989, McCouch and Tanksley, 1991, Kochert, 1994)

2. PCR-based marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอซึ่งพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ตัวอย่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ RAPD marker (William *et al.*, 1990) AFLP marker (Vos *et al.*, 1995) และ Microsatellite marker หรือ SSR marker (Brown *et al.*, 1996, Powell *et al.*, 1996)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ co-dominant marker และ dominant marker ซึ่ง co-dominant marker จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่สามารถ แยกต้นที่มีพันธุกรรมเป็น homozygous และ heterozygous ได้ ส่วน dominant marker นั้น จะปรากฏแถบดีเอ็นเอเมื่อต้นพืชมีพันธุกรรมเป็น homozygous และ heterozygous เครื่องหมายชนิดนี้จึงไม่สามารถแยก homozygous และ heterozygous ออกจากกันได้ (Collard *et al.*, 2005)

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก เพื่อเลือกต้นพืชที่มีจีโนไทป์ที่ต้องการนั้นมี 2 แบบ คือ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนที่ต้องการช่วยในการคัดเลือก (indirect MAS; iMAS หรือ linked marker หรือ flanking markers) และ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำแนกส่วนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีนช่วยในการคัดเลือก (direct MAS; dMAS หรือ functional marker assisted selection; fMAS) ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด iMAS นั้นจะมีความแม่นยำในการคัดเลือก น้อยกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด fMAS เนื่องจากมีโอกาสที่จะเกิด crossing over ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับตำแหน่งยีนที่ต้องการได้ ทำให้เกิดการผิดพลาดในการคัดเลือก ส่วนการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด fMAS นั้นมีความแม่นยำมาก เนื่องจากการใช้ตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีนที่ต้องการ มาเป็นเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก (Collard *et al.*, 2005; Sreewongchai *et al.*, 2010)

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับ

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบผสมกลับนั้นสามารถนำมาใช้ เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์แบบนี้ โดยสามารถนำมาใช้ได้ 3 แนวทางคือ (Collard and Mackill, 2010)

1. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอคัดเลือกยีนเป้าหมาย (target gene) ซึ่งในแต่ละขั้นตอนของการผสมกลับจะต้องมีการตรวจสอบหาต้นที่มีพันธุกรรมแบบ heterozygous ของลักษณะที่ต้องการปรับปรุง ซึ่งการตรวจสอบโดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนดังกล่าวจะทำให้การคัดเลือกกระทำได้ง่าย โดยเฉพาะเมื่อพันธุกรรมที่ควบคุมยีนดังกล่าวเป็นยีนแฝง (recessive gene)

2. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อป้องกันยีนที่ไม่ต้องการ (linkage drag) จากพันธุ์ให้ เนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับต้องการถ่ายทอดเฉพาะพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะที่

ต้องการเท่านั้น บางครั้งพันธุกรรมที่ไม่ต้องการของพันธุ์ให้ที่อาจจะวางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ต้องการจะถูกถ่ายทอดมาพร้อมกับการผสมกลับ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่คั่นกลางระหว่างยีนดังกล่าวจะทำให้สามารถคัดเลือกเฉพาะต้นที่มีพันธุกรรมที่ต้องการได้

3. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอคัดเลือกลักษณะที่มีพันธุกรรมเหมือนพันธุ์รับ (genetic background selection) เนื่องการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับต้องการให้ได้พันธุ์ที่พันธุกรรมเช่นเดิม โดยเพิ่มเพียงลักษณะที่ต้องการจากพันธุ์ให้เท่านั้น การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบพันธุกรรมของพันธุ์รับจะทำให้สามารถคัดเลือกลักษณะที่มีพันธุกรรมคล้ายกับพันธุ์รับมากที่สุดสำหรับใช้ในรอบการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว

Toojinda *et al.* (2006) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกร่วมกับวิธีการ RGA (rapid generation advance) โดยใช้วิธีผสมกลับในการถ่ายทอดยีนและตำแหน่ง QTL ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคขอบใบแห้ง (bacterial leaf blight resistance, BLB) การทนทานต่อการเกิดน้ำท่วม (submergence tolerance, SUB) การต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown planthopper resistance, BPH) และความต้านทานโรคไหม้ (blast resistance, BL) ให้กับ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีการทดสอบผลผลิตและคุณภาพเมล็ดของลูกในชั่วแรกๆ ลูกผสมที่ได้จากการคัดเลือกมีความสามารถทนทานต่อน้ำท่วม และต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง โรคไหม้และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล มีลักษณะทางกายภาพ และคุณภาพเมล็ดดีกว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ดั้งเดิม

Wongsaprom *et al.* (2010) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการรวมลักษณะความต้านทานแบบกว้างของโรคไหม้ในข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล เพื่อถ่ายทอดลักษณะดังกล่าวให้ข้าวพันธุ์ กข6 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับ (marker-assisted backcrossing, MAB) สามารถถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคไหม้จากข้าวเจ้าหอมนิลให้กับข้าวพันธุ์ กข6 ได้

Africa Rice Center (2009) ได้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคและทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ร่วมกับวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบปกติ (conventional plant breeding) โดยการผสมข้ามพันธุ์ข้าว (inter-specific varieties) ที่มีในท้องถิ่นของแอฟริกา และใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือกลักษณะความต้านทานโรคใบจุดสีส้ม (rice yellow mottle virus, RYMV) ให้กับข้าว 4 พันธุ์ที่นิยมปลูกกันมากในประเทศ Burkina

Fasco, Gambia, Guinea และ Mali สายพันธุ์ใหม่ที่ได้มีการทดสอบในแปลงปลูกข้าวของเกษตรกร และมีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีที่สุด

Sreewongchai *et al.* (2010) ได้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก เพื่อการรวมยีนต้านทานโรคไหม้จากข้าวเจ้าหอมนิล และ IR64 เข้าด้วยกันโดยการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ทั้งสอง และคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอและทำให้สามารถคัดเลือกได้ต้นที่มียีนต้านทานจากทั้งสองพันธุ์ และความต้านทานที่ได้มีเพิ่มขึ้นจากเดิม

Jairin (2009) ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายดีเอ็นเอ วิเคราะห์หาตำแหน่งต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Bph3* จากข้าวพันธุ์ Rathu Heenati โดยการพัฒนาประชากรข้าวลูกผสมกลับรุ่น BC₃F₂ จากคู่ผสม Rathu Heenati กับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เพื่อทดสอบความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและสร้างแผนที่พันธุกรรม พบว่ายีนต้านทาน *Bph3* มีตำแหน่งอยู่ระหว่างโมเลกุลเครื่องหมาย RM588 และ RM589 ซึ่งวางตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 6 และนอกจากนี้ยังสามารถแยกลักษณะพันธุกรรมที่ไม่ดีซึ่งติดไปกับยีนที่อยู่ระหว่างอัลลิล *Bph3* และ *Wx* ออกจากกันโดยการคัดเลือกฟีโนไทป์และการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอร่วมกัน

Jongdee (2008) ได้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์ กข6 ให้ต้านทานโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ทนแล้ง ทนน้ำท่วม และทนเค็ม ซึ่งสามารถรักษาลักษณะที่ดีของข้าวพันธุ์รับไว้เช่นเดิม และนอกจากนี้ยังมีการปลูกเพื่อทดสอบลักษณะทรงต้น และปลูกเพื่อประเมินศักยภาพของสายพันธุ์ดังกล่าวในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. พันธุ์ข้าวและตัวอย่างข้าวที่ใช้ในการทดลอง

1.1 พันธุ์ข้าวที่ใช้ทดสอบความต้านทานโรคไหม้ มีทั้งหมด 24 พันธุ์

1.1.1 C101LAC

1.1.2 CT13432

1.1.3 IR64

1.1.4 เจ้าหอมนิล (JHN)

1.1.5 ขาวดอกมะลิ 105 (KDML 105)

1.1.6 กข6 (RD6)

1.1.7 กข29 (RD29)

1.1.8 กข31 (RD31)

1.1.9 กข35 (RD35)

1.1.10 สุพรรณบุรี1 (SPR1)

1.1.11 สุพรรณบุรี2 (SPR2)

1.1.12 สุพรรณบุรี3 (SPR3)

1.1.13 สุพรรณบุรี60 (SPR60)

1.1.14 สุพรรณบุรี90 (SPR90)

1.1.15 ปทุมธานี1 (PTT1)

1.1.16 ชัยนาท1 (CNT1)

1.1.17 พิษณุโลก2 (PSL2)

1.1.18 กข41 (RD41)

1.1.19 กข43 (RD43)

1.1.20 Qiqnizhan (CH1)

1.1.21 Yuexiang zhan (CH2)

1.1.22 Zhaoxiang zhan (CH3)

1.1.23 พิษณุโลก60-1 (PSL60-1)

1.1.24 พิษณุโลก60-2 (PSL60-2)

1.2 ตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมใหม่ในฤดูเพาะปลูก 2551/2552

2. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีในห้องปฏิบัติการ
 - 2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการแยกเชื้อโรคใหม่
 - 2.1.1 จานเลี้ยงเชื้อ
 - 2.1.2 แป้งข้าว (rice flour) 20 เปอร์เซ็นต์
 - 2.1.3 พงวุ้น (agar)
 - 2.1.4 ยีสต์ (yeast extract)
 - 2.1.5 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
 - 2.1.6 เจลาติน 5 เปอร์เซ็นต์ (0.5% gelatin)
 - 2.1.7 หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ (autoclave)
 - 2.1.8 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
 - 2.1.9 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)
 - 2.1.10 แท่งแก้วปลายแหลม
 - 2.1.11 ถาดความชื้น (desicator)
 - 2.1.12 แอลกอฮอล์ 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์
 - 2.1.13 ตะเกียงแอลกอฮอล์
 - 2.1.14 กระดาษกรอง
 - 2.1.15 ถุงกระดาษใบ
 - 2.1.16 ถุงพลาสติกแบบหนา
 - 2.1.17 เครื่องพ่นพลาสติก
 - 2.1.18 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส
 - 2.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล
 - 2.2.1 เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (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 μ mol forward primer
 - 2.2.3.3 5 μ mol reverse primer
 - 2.2.3.4 Phire[®] Hot Start DNA polymerase
 - 2.2.3.5 Sterile distilled H₂O
3. อุปกรณ์ที่ใช้ในเรือนปลูกพืชทดลอง
 - 3.1 กระถางพลาสติกแบบไม่มีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 นิ้ว
 - 3.2 ถุงดำขำยสีฟ้า

- 3.3 ขวดพลาสติกเจาะรูสำหรับคลุมช่อดอก
- 3.4 ไม้ไผ่
- 3.5 กรรไกร
- 3.6 ปืนลม (air brush pressure)
- 3.7 ถาดหลุมเพาะเมล็ด
- 3.8 เครื่องพ่นไอน้ำ
- 3.9 ห้องควบคุมอุณหภูมิ

วิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคไหม้

การสำรวจและเก็บตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคไหม้ ทำโดยสำรวจพื้นที่ปลูกข้าวบริเวณภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยรวม 7 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย พิชญ์โลก หนองคาย อุดรธานี ขอนแก่น ชัยภูมิ และอุบลราชธานี ในปีเพาะปลูก 2551/52

2. การแยกเก็บเชื้อโรคไหม้แบบสปอร์เดี่ยว

นำตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคไหม้มาแยกเก็บเชื้อแบบสปอร์เดี่ยวตามวิธีการของ Sirithunya *et al.* (2007) (ภาพที่ 1) ดังนี้

2.1 นำตัวอย่างข้าวที่เก็บรวบรวมมา มาตัดบริเวณที่เกิดแผลไหม้ เป็นชิ้นขนาดประมาณ 5 เซนติเมตร จากนั้นวางลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่รองพื้นด้วยกระดาษเพาะเมล็ดที่ชุ่มน้ำ ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมงเพื่อให้เชื้อราสร้างโคนิเดีย

2.2 นำชิ้นส่วนใบข้าวในจานเลี้ยงเชื้อมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นใช้แท่งแก้วปลายแหลมแตะโคนิเดียจากบริเวณที่เกิดโรคไหม้มาวางลงบนอาหารวุ้น (วุ้น 2 เปอร์เซ็นต์) ที่เตรียมไว้

2.3 นำจานเลี้ยงเชื้อที่มีชิ้นส่วนใบข้าวส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นใช้แท่งแก้วปลายแหลมแยกเชื้อให้ได้เป็น โคนิเดียเดี่ยวๆ ประมาณ 20-30 โคนิเดีย แล้วปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส โคนิเดียจะออกและสร้างเส้นใย

2.4 นำจานเลี้ยงเชื้อที่มีชิ้นส่วนใบข้าวจากข้อ 2.3 ส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นใช้หลอดปลายแหลมตัดวุ้นตรงที่โคนิเดียออก วางลงบนอาหารแป้งข้าว (rice flour agar, RFA; แป้งข้าว 2

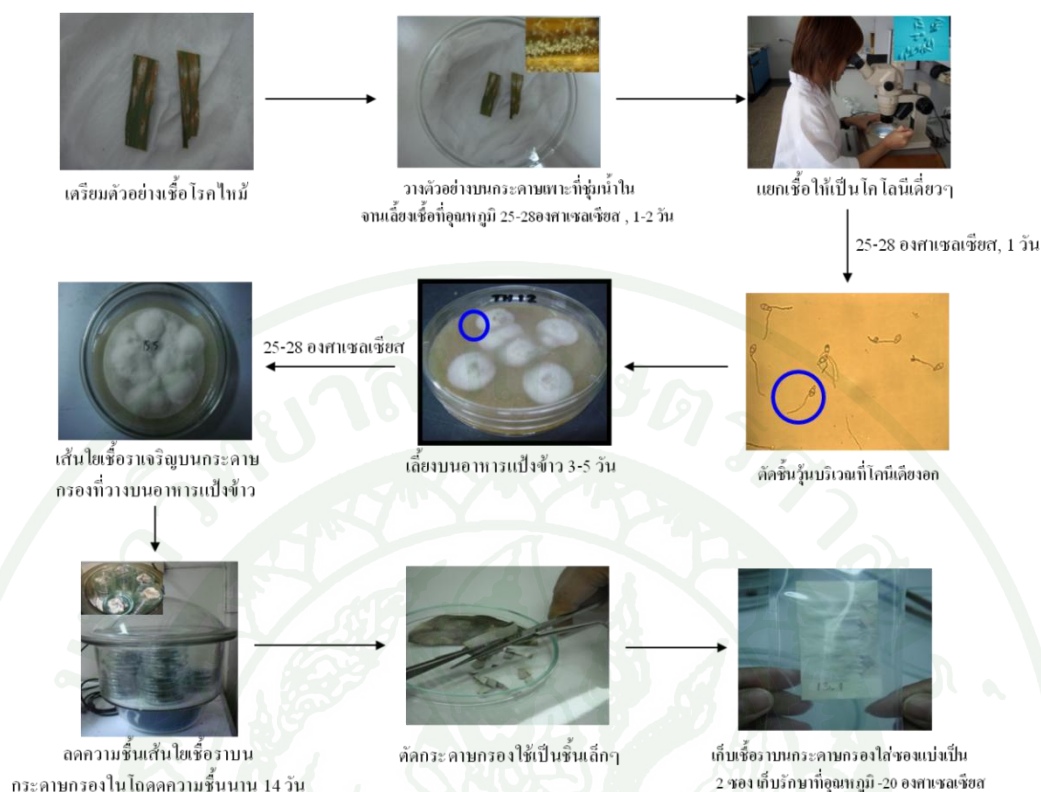
เปอร์เซ็นต์ ผงวัน 2 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์เอ็กซ์แทรก 0.2 เปอร์เซ็นต์) ในงานเลี้ยงเชื้อ แล้วเพาะบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน เชื้อจะสร้างเส้นใยสีขาวขึ้นมา

2.5 ใช้มีดผ่าตัด ตัดวันตรงบริเวณที่โคนเคียวสร้างเส้นใยในบริเวณที่อยู่ห่างจากโคนเคียวอื่นๆ

2.6 นำชิ้นวันที่โคนเคียวสร้างเส้นใย ที่ได้จากข้อ 2.5 วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่วางทับด้วยกระดาษกรองเป็นเวลา 7-14 วัน เชื้อจะสร้างเส้นใยจนเต็มแผ่นกระดาษกรอง

2.7 ลอกกระดาษกรองที่มีเส้นใยเชื้อราวางในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ 14 วันเพื่อให้กระดาษกรองแห้งสนิท

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



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการแยกเชื้อราแบบสปอร์เดี่ยว

3. การประเมินศักยภาพความต้านทานโรคไหม้ของข้าวพันธุ์ทดสอบ

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้มีทั้งหมด 24 พันธุ์ ได้แก่ C101LAC CT13432 IR64 เจ้าหอมนิล ขาวดอกมะลิ 105 กข6 กข29 กข31 กข35 สุพรรณบุรี1 สุพรรณบุรี2 สุพรรณบุรี3 สุพรรณบุรี60 สุพรรณบุรี90 ปทุมธานี1 ชัยนาท1 พิษณุโลก2 กข41 กข43 CH1 CH2 CH3 พิษณุโลก 60-1 และ พิษณุโลก60-2

ทดสอบการเกิดโรคไหม้ในระยะต้นกล้า โดยวิธีการปลูกเชื้อแบบฉีดพ่น ตามวิธีการของ Sirithunya *et al.* (2007) โดยใช้เชื้อโรคไหม้ที่แยกเก็บใหม่จำนวน 24 สายพันธุ์ในการทดสอบ ทำ 2 ซ้ำ นำข้อมูลศักยภาพความต้านทานโรคไหม้ที่ได้ในแต่ละสายพันธุ์ข้าวมาสร้างเป็นแผนภาพ (dendrogram) แสดงความต้านทานโรคไหม้ เพื่อจัดกลุ่ม pathogenicity race จากนั้นเลือกตัวแทนเชื้อโรคไหม้จำนวน 7 สายพันธุ์เพื่อใช้ประเมินความต้านทานโรคไหม้ในสายพันธุ์ปรับปรุงในขั้นตอนต่อไป

เมื่อได้พันธุ์ข้าวกลุ่มที่ผ่านการประเมินความต้านทานโรคไหม้แล้ว นำพันธุ์ดังกล่าวมาหาข้อมูลเพื่อการหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ แล้วนำพันธุ์ที่มีรายงานการสร้างแผนที่ยีนมาทดสอบความต้านทานโรคไหม้ โดยวิธีปลูกเชื้อแบบฉีดพ่นเช่นเดิม ซึ่งในขั้นตอนนี้จะมีการเพิ่มจำนวนสายพันธุ์เชื้อโรคไหม้ จาก 24 สายพันธุ์เป็น 46 สายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกข้าวพันธุ์ที่มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ได้ดีที่สุดมาใช้เป็นพันธุ์ให้ (donor parent) เพื่อถ่ายทอดความต้านทานโรคไหม้

3.1 การเตรียมเชื้อรา

เลี้ยงเชื้อรา *P. oryzae* ที่เก็บอยู่ในรูปเส้นใยแห้งบนกระดาษกรองบนอาหาร RFA ในจานเลี้ยงเชื้อโดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงฟลูออเรสเซนซ์เป็นเวลา 7-9 วัน จากนั้นกระตุ้นให้เกิดการสร้างโคนิเดีย โดยการถูบทำลายเส้นใยบนผิวหน้าอาหาร (scraping) ด้วยแท่งแก้วเบาๆ ให้เส้นใยของเชื้อราขาด แล้วย้ายไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 คืน ใช้น้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้วชะเอาโคนิเดียของเชื้อราออกมาจากเส้นใย นับจำนวนโคนิเดีย โดยใช้ haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วปรับความเข้มข้นโคนิเดียให้ได้ 5×10^4 โคนิเดีย / มิลลิลิตรในเจลาติน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำมาทดสอบการก่อให้เกิดโรค

3.2 การเตรียมพืชทดสอบ

นำเมล็ดข้าวที่ต้องการทดสอบมาปลูกในถาดหลุมสี่ด้านขนาด 2 x 2.5 เซนติเมตร โดยโรยเมล็ดข้าวที่ต้องการทดสอบพันธุ์ละ 4-5 เมล็ดต่อหลุม เก็บไว้ในโรงเรือนเพาะชำ ใส่ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) เมื่อต้นข้าวอายุ 13 วันหรือก่อนการปลูกเชื้อ 1 วัน เมื่อต้นข้าวอายุ 14 วัน จึงนำมาทดสอบความต้านทานโรคไหม้

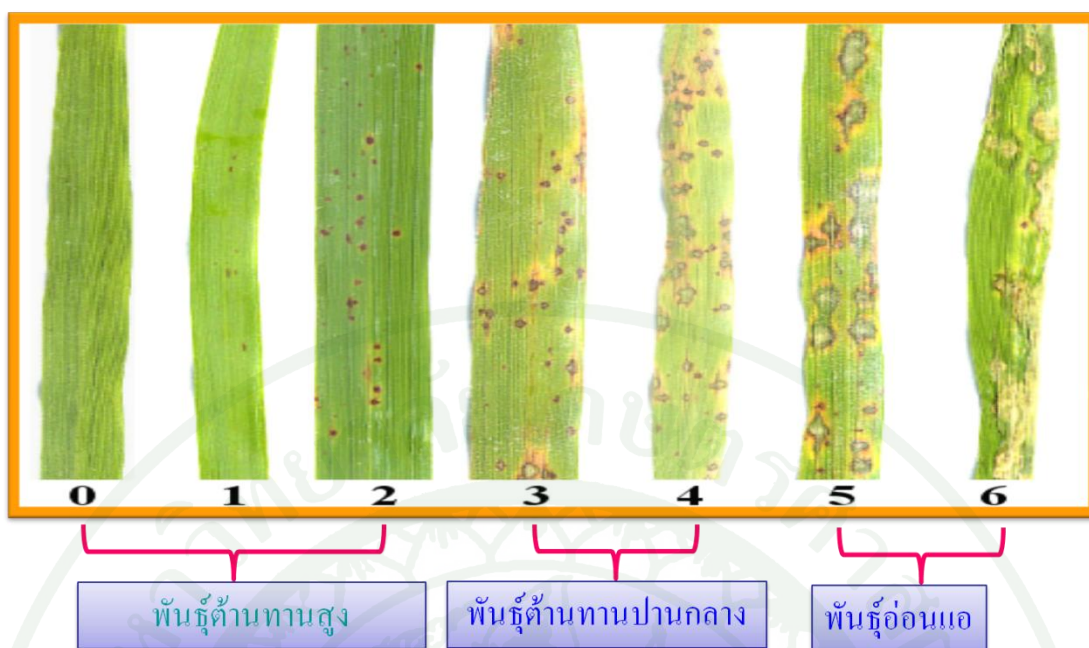
3.3 วิธีการทดสอบโรคโดยวิธีการปลูกเชื้อแบบฉีดพ่น

นำต้นข้าวที่อายุ 14 วันมาทดสอบกับเชื้อโรคไหม้ในห้องสำหรับปลูกเชื้อโดยใช้เครื่องปั๊มลม (air brush pressure) ฉีดพ่น (spraying) เชื้อโรคไหม้ให้ทั่วทั้งต้นและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในสภาพความชื้นสูง (moist chamber) เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมงหรือข้ามคืน (overnight) (Veillet *et al.*, 1996) จากนั้นย้ายมาเก็บรักษาในโรงเรือนที่มีการพรางแสงและสามารถ

ควบคุมความชื้นได้ เพื่อให้เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค รดน้ำด้วยระบบน้ำพ่นฝอยทุกวัน และประเมินระดับความรุนแรงของโรคหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน (ภาพที่ 2) บันทึกผลโดยการประเมินความรุนแรงของโรคเป็น 7 ระดับตั้งแต่ 0-6 (Roumen and Nottegham, 1997) โดยระดับ 0-2 เป็นปฏิกิริยาที่ข้าวต้านทานต่อเชื้อสูง (resistance) ระดับ 3-4 ต้านทานต่อเชื้อปานกลาง (intermediate) และระดับ 5-6 อ่อนแอ (susceptible) จากนั้นเก็บตัวอย่างใบข้าวแบบสุ่มที่แสดงการเกิดโรคที่ชัดเจน มาเก็บในรูป herbarium (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการปลูกเชื้อโรคไหม้โดยวิธีการฉีดพ่น



ภาพที่ 3 ลักษณะความต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ทดสอบด้วยเชื้อโรคไหม้

3.4 การทดสอบและประเมินระดับความรุนแรงของการเกิดโรคไหม้ของข้าวในระยะต้นกล้า

ทดสอบความต้านทานโรคไหม้ในระยะต้นกล้าอายุ 14 วัน ที่ปลูกในถาดหลุมๆละ 4 ต้น ตามวิธีของ Sirithunya *et al.* (2007) ในข้าวทั้งหมด 24 พันธุ์ โดยใช้เชื้อโรคไหม้ที่แยกเก็บใหม่จำนวน 24 สายพันธุ์ (isolate) จากเชื้อทั้งหมด 111 สายพันธุ์ และทดสอบ 2 ซ้ำ บันทึกผล พันธุ์ข้าวที่ผ่านการประเมินโดยการประเมินความรุนแรงของโรคเป็น 7 ระดับคะแนนตั้งแต่ 0-6 ตามวิธีของ Roumen and Nottegham (1997) และทำซ้ำเช่นเดิมแต่พันธุ์ข้าวที่ใช้ในขั้นตอนนี้จะต้องผ่านการประเมินรอบแรกก่อน และมีการเพิ่มจำนวนสายพันธุ์เชื้อโรคไหม้จาก 24 สายพันธุ์เป็น 46 สายพันธุ์ และบันทึกผลดังข้างต้น เลือกข้าวพันธุ์ที่ต้านทานโรคไหม้มาใช้เป็นพันธุ์ให้ สำหรับการผสมพันธุ์กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 เพื่อปรับปรุงพันธุ์ต่อไป โดยระดับคะแนนจะประเมินจากขนาดของแผลที่ปรากฏ ดังนี้

ระดับความรุนแรงในการเกิดโรคไหม้

ระดับ 0 ไม่มีแผลปรากฏ

ระดับ 1 แผลจุดกลมสีน้ำตาลเล็ก ๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร ไม่มีการสร้างโคนิเดีย

ระดับ 2 แผลกลมหรือรียาวขนาดเล็กน้อยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5-1 มิลลิเมตร แผลไม่มีการสร้างโคนิเดีย

ระดับ 3 แผลจุดเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1-3 มิลลิเมตร และมีจุดสีเทาตรงกลางแผล

ระดับ 4 แผลจุดเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตรหรือยาวกว่า แผลเป็นสีเทา และมีขอบแผลสีน้ำตาล

ระดับ 5 แผลสีเทาเกาะกันเป็นกลุ่ม มีขอบแผลสีน้ำตาล เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค

ระดับ 6 แผลลูกกลมยาวติดต่อกันเป็นสีเทา ไม่มีขอบแผลที่แน่นอน เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค

4. การคำนวณค่าดัชนีความต้านทานแบบกว้างของข้าว

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

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

5. การคำนวณค่าดัชนีความรุนแรงของเชื้อโรคไหม้

การคำนวณค่าดัชนีความรุนแรงของเชื้อโรคไหม้ (virulence index, VI) ในข้าวแต่ละพันธุ์ สามารถทำได้โดย นำจำนวนพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อเชื้อโรคไหม้สายพันธุ์นั้น (susceptible variety) หารด้วยจำนวนพันธุ์ข้าวทั้งหมดที่ทดสอบตามสูตร (ดัดแปลงจาก Sirithunya *et al.*, 2007)

$$\frac{\text{ค่าดัชนีความรุนแรงของเชื้อโรคใหม่}}{=} \frac{\text{จำนวนพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อเชื้อโรคใหม่สายพันธุ์นั้น}}{\text{จำนวนพันธุ์ข้าวทั้งหมดที่ทดสอบเชื้อโรคใหม่สายพันธุ์นั้น}}$$

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

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

7. การปรับปรุงความต้านทานโรคไหม้ในข้าวขาวดอกมะลิ 105

7.1 การผสมพันธุ์ข้าว (ภาพที่ 4)

7.1.1 ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล ซึ่งมีรายงานเบื้องต้นว่าเป็นข้าวสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ในประเทศไทยได้ดีสายพันธุ์หนึ่ง นำมาผสมกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวที่อ่อนแอต่อเชื้อโรคไหม้ เพื่อสร้างลูกผสมรุ่นที่ 1 (F_1) โดยปลูกข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิลและข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 5 ครั้งแต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์

7.1.2 ทดสอบความต้านทานโรคไหม้ที่ระยะต้นกล้าของลูกผสมรุ่นที่ 1 ด้วยตัวแทนเชื้อที่เลือกไว้ (ข้อ 3) แล้วคัดเลือกต้นที่ต้านทานของลูกผสมรุ่นที่ 1 เป็นต้นพันธุ์พ่อแม่ผสมกลับไปยังข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นต้นพันธุ์แม่ เพื่อสร้างลูกผสมกลับรุ่น BC_1F_1 โดยปลูกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 5 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์

7.1.3 ทดสอบความต้านทานโรคไหม้ที่ระยะต้นกล้าของลูกผสมกลับรุ่น BC_1F_1 ด้วยตัวแทนเชื้อที่เลือกไว้ (ข้อ 3) แล้วคัดเลือกต้นที่ต้านทานของลูกผสมกลับรุ่น BC_1F_1 เป็นต้นพันธุ์พ่อแม่ผสมกลับไปยังข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นต้นพันธุ์แม่ เพื่อสร้างลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_1 โดยมีการปลูกข้าวขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 5 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 1 สัปดาห์เพื่อใช้เป็นต้นแม่

7.1.4 ทดสอบความต้านทานโรคไหม้ที่ระยะต้นกล้าของลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_1 ด้วยตัวแทนเชื้อที่เลือกไว้ (ข้อ 3) แล้วคัดเลือกต้นที่ต้านทานของลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_1 ปลูกปล่อยให้ผสมตัวเอง เพื่อสร้างลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2

7.1.5 ทดสอบความต้านทานโรคไหม้ที่ระยะต้นกล้าของลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 ด้วยตัวแทนเชื้อที่เลือกไว้ (ข้อ 3) แล้วคัดเลือกต้นที่ต้านทาน โรคของลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 มาผสมตัวเองเพื่อสร้างลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_3

7.1.6 ทดสอบความต้านทานโรคไหม้ที่ระยะต้นกล้าของลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 ด้วยตัวแทนเชื้อที่เลือกไว้ (ข้อ 3) โดยการปลูกทดสอบโรคไหม้นั้นจะใช้ต้นกล้าจำนวนมากในแต่ละสายพันธุ์ จากนั้นเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทาน โรคมาปักดำเพื่อประเมิน ลักษณะคุณภาพ เปรียบเทียบกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ดำเนินการคัดเลือกต้นที่มีพันธุกรรมคล้ายคลึงกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 มากที่สุด แล้วเก็บเมล็ดเป็นลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_3



(ก)

(ข)



(ค)

(ง)

ภาพที่ 4 ขั้นตอนการผสมข้ามพันธุ์ข้าว

- (ก) ขั้นตอนการตัดดอกเพื่อเตรียมทำหมันข้าว
- (ข) ขั้นตอนการกำจัดเกสรตัวผู้ออกจากดอกข้าว
- (ค) ภาพดอกข้าวที่ทำหมันแล้ว
- (ง) ภาพการผสมข้าม

7.2 การชักนำให้ข้าวออกดอก

ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพืชวันสั้น (short day plant) ต้องการช่วงแสงสั้นเพื่อกระตุ้นการออกดอก ซึ่งปกติจะออกดอก 1 ครั้งต่อปี งานวิจัยครั้งนี้จึงได้สร้างห้องมืดเพื่อควบคุมความยาวนานของช่วงแสงในแต่ละวันที่ข้าวได้รับ กล่าวคือเมื่อปลูกข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในช่วงแสงยาวจะต้องมีการบังคับช่วงแสงโดยจะนำข้าวเข้าห้องมืด (ภาพที่ 5) เวลา 17.00 น. และนำออกในเวลา 08.00 น. ในวันรุ่งขึ้น ซึ่งจะทำให้ข้าวได้รับแสง 9 ชั่วโมงต่อวัน ซึ่งโดยปกติแล้วข้าวขาวดอกมะลิ 105 จะออกดอกเมื่อได้รับแสงน้อยกว่า 11 ชั่วโมง 52 นาที ต่อวัน เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 15 วันติดต่อกัน หากไม่ได้รับช่วงแสงที่เหมาะสมและครบจำนวนวันตามที่ข้าวต้องการก็จะมีผลต่อการเจริญ

ทางลำต้นต่อไปทำให้ข้าวไม่ออกดอก (กมรินทร์, 2548) โดยข้าวที่จะนำเข้าห้องมืดต้องเป็นข้าวที่อยู่ในระยะแตกกอ เมื่อข้าวเริ่มตั้งท้อง ก็จะนำข้าวออกจากห้องมืดเพื่อผสมพันธุ์ต่อไป



ภาพที่ 5 ห้องมืดสำหรับบังคับการออกดอกของข้าวไว้ต่อช่วงแสง

8. การคัดเลือกสายพันธุ์ลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

8.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ และการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

8.1.1 เจาะใบข้าวด้วย *Harris* UNI-CORE™ จะได้น้ำเนื้อเยื่อรูปวงกลมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร (จำนวน 5 ชิ้น) ใส่ลงในหลอด PCR

8.2.2 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 H ₂ O	-	3.8
Total	-	10

8.2.3 เมื่อผสม PCR reaction ในหลอด PCR เรียบร้อยแล้วให้หยด mineral oil 1 หยด

8.2.4 นำหลอด PCR ใส่ลงในเครื่อง PCR ตั้งโปรแกรมเครื่อง PCR ตามเงื่อนไข

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

8.2 วิธีการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสและการย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์สเตน (silver stain)

8.2.1 การเตรียมกระจก (glass)

8.2.1.1 ใช้กระดาษทิชชูเช็ดกระจกด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 3 รอบ

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

8.2.1.3 ใช้กระดาษกิมไวฟ์เช็ดกระจกด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 2 รอบ

8.2.2 การเตรียมแชมเบอร์ (chamber)

8.2.2.1 ใช้กระดาษทิชชูเช็ดแชมเบอร์ด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 3 รอบ

8.2.2.2 ใช้กระดาษกิมไวฟ์เช็ดแชมเบอร์ด้วยเคลียร์วิว (clear view)

8.2.2.3 ใช้กระดาษกิมไวฟ์เช็ดแชมเบอร์ด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 2 รอบ

8.2.3 การเตรียมชุดโพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส

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

8.2.3.2 วางสเปเซอร์ตามยาวที่ขอบของแชมเบอร์ จากนั้นวางกระจกด้านที่เช็ดทำความสะอาดแล้วทับลงไปบนแชมเบอร์

8.2.3.3 ใช้แคลมป์ (clamps) ครอบตรงขอบของแชมเบอร์ทั้ง 2 ข้าง

8.2.4 การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel)

8.2.4.1 เตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจลปริมาตร 50 มิลลิลิตร เกิดจากการผสมระหว่าง 6 เปอร์เซ็นต์ โพลีอะคริลาไมด์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร 10 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (10% ammonium persulfate) และเติม TEMED ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

8.2.4.2 เทโพลีอะคริลาไมด์เจลที่เตรียมไว้ในช่องว่างระหว่างกระจกกับแชมเบอร์

8.2.4.3 ใช้สันหวีเสียบในช่องว่างระหว่างกระจกกับแชมเบอร์ให้ลึกประมาณ 1 เซนติเมตร

8.2.4.4 ทิ้งโพลีอะคริลาไมด์เจลไว้ประมาณ 90 นาที เจลจะเกิดการแข็งตัว

8.2.5 การตรวจสอบดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

8.2.5.1 ตั้งชุดเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสพร้อมกับติดแถบวัดอุณหภูมิตรงบริเวณกลางกระจก

8.2.5.2 เติมน้ำบัฟเฟอร์ (running buffer, 1xTBE) ลงในแชมเบอร์และ spout

8.2.5.3 ดึงหวีออก จากนั้นใช้ดรอปปเปอร์ (dropper) ไล่เศษเจลออกจากขอบเจล

8.2.5.4 ฟรีรันนิ่ง โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 วัตต์ เป็นเวลา 30 นาที

8.2.5.6 ปิดเครื่องพาวเวอร์ซัพพลาย (power supply) แล้วถอดชุดครอบออก

8.2.5.7 ใช้วาสลินทาซี่หวีให้ทั่ว จากนั้นเสียบหวีเข้าไปในช่องว่างระหว่างกระจกกับแชมเบอร์ให้ปักลงไปในเนื้อเจลเล็กน้อย

8.2.5.8 หยดดีเอ็นเอตัวอย่างละ 2 ไมโครลิตร ลงในช่อง (wells) จากด้านบนบนเจล เมื่อครบตามจำนวนดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการทดสอบแล้ว ติดตั้งชุดเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสให้เรียบร้อย

8.2.5.9 ตั้งค่าที่เครื่องพาวเวอร์ซัพพลายโดยให้กระแสไฟฟ้า 45 วัตต์

8.2.5.10 หยุดการให้กระแสไฟฟ้าชุดเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเมื่อไซเลนไซยานอลดาาย (xylene cyanol dye) เคลื่อนตัวต่ำลงมาเป็นระยะทาง 15 เซนติเมตร

8.2.6 การย้อมสีแถบดีเอ็นเอ

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

8.2.6.2 ล้างเจลใน silver stain solution ในปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร พร้อมกับการเขย่านาน 7 นาที

8.2.6.3 จุ่มเจลลงในน้ำกลั่นในปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร อย่างเร็ว นาน 10-15 วินาที 1 ครั้ง

8.2.6.4 จุ่มเจลลงใน developed ในปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร พร้อมกับการเขย่า ที่อุณหภูมิห้องทำนานจนกว่าแถบดีเอ็นเอจะปรากฏ

8.2.6.5 เมื่อแถบดีเอ็นเอปรากฏชัดเจนแล้ว จุ่มเจลลงใน fixing solution ในปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

8.2.6.6 จุ่มเจลลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นาน 1 นาที

8.2.6.7 ผึ่งเจลไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเจลแห้งแถบดีเอ็นเอจะปรากฏเด่นชัดขึ้น

8.3 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับลักษณะคุณภาพของข้าวขาวดอกมะลิ 105

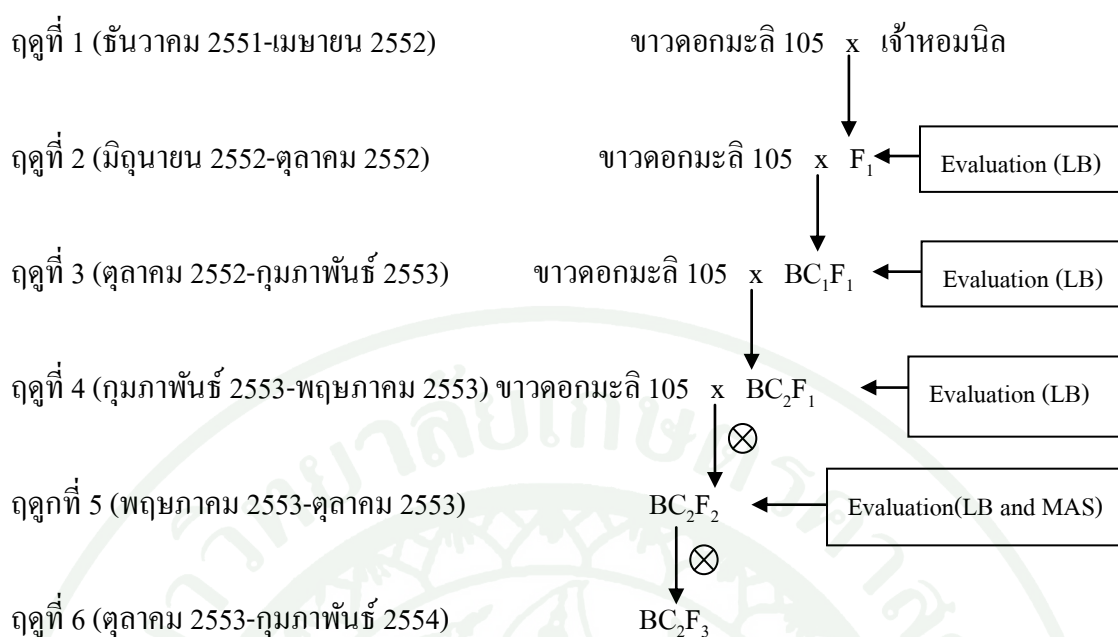
เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับลักษณะคุณภาพของข้าวคือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ Naro และ OSR19 สำหรับลักษณะความหอม และปริมาณอะมิโลสในเมล็ด ตามลำดับ นำมาทดสอบในลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 จากทั้งหมด 20 ต้น ตามวิธีของ ปรีฉัตร และคณะ 2554

8.4 การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่

นำเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR จำนวน 120 ไพรเมอร์ โครโมโซมละ 10 ไพรเมอร์ มาทดสอบในพันธุ์พ่อแม่เพื่อหาความแตกต่างพันธุกรรม (polymorphism) ระหว่างข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์เปรียบเทียบกับ ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิลและ IR64 โดยใช้เทคนิค SSR ตามวิธีของ Benbouza *et al.* (2006) เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เลือกใช้นี้มีทั้งสำหรับการตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเครื่องหมายดีเอ็นเอ สำหรับตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวเจ้าหอมนิล

8.5 การคำนวณหาค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2

คัดเลือกต้นลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 ที่มีลักษณะคุณภาพหุงต้มและปริมาณอะมิโลสต่ำเหมือนข้าวขาวดอกมะลิ 105 มาทดสอบด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 30 ไพรเมอร์ ที่เลือกจากข้อ 8.4 โดยใช้เทคนิค SSR แล้วอ่านผลแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏนำมาคำนวณและวิเคราะห์ค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) ของลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 เปรียบเทียบกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวเจ้าหอมนิล คัดเลือกต้นลูกผสมรุ่น BC_2F_2 ที่มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 สูงสำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชในรอบต่อไป



หมายเหตุ LB คือ การประเมินโรคไหม้

MAS คือ การประเมินด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

แผนผังแสดงขั้นตอนการดำเนินงานเป็นขั้นตอนการดำเนินการในขั้นตอนการผสมข้าว
ในหัวข้อรองที่ 7. การปรับปรุงความต้านทานโรคไหม้ในข้าวขาวดอกมะลิ 105

สถานที่และระยะเวลาการทําวิจัย

1. สถานที่การทําวิจัย

3.1 โรงเรือนปลูกพืชทดลองภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
บางเขน กรุงเทพมหานคร

3.2 ห้องปฏิบัติการหน่วยพัฒนาทรัพยากรพันธุ์กรรมและการพัฒนาพันธุ์พืช อาคาร
วชิรานุสรณ์ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพมหานคร

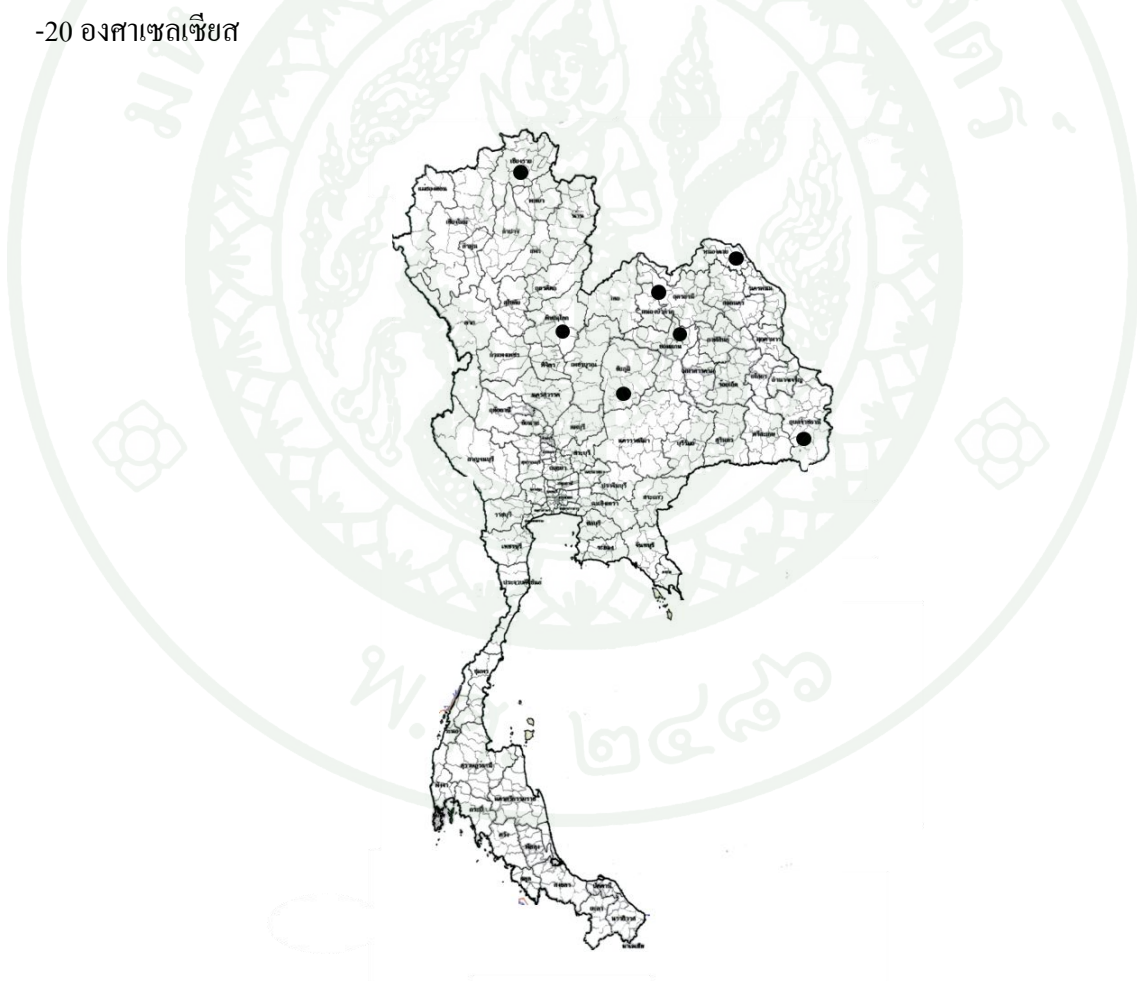
2. ระยะเวลาการทําวิจัย

ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2551 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2554

ผลและวิจารณ์

การสำรวจ เก็บตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคไหม้ และการแยกเก็บเชื้อราแบบสปอร์เดี่ยว

การสำรวจและเก็บตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคไหม้ ทำโดยการสำรวจพื้นที่ปลูกข้าวและศูนย์วิจัยข้าวในบริเวณเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย รวมทั้งสิ้น 7 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย พะเยา โคราช นครราชสีมา ขอนแก่น ชัยภูมิและอุบลราชธานี (ภาพที่ 6 และ 7) โดยเก็บรวบรวมตัวอย่างข้าวพันธุ์และสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ พันธุ์ กข6 กข10 ขาวดอกมะลิ 105 สายพันธุ์เบอร์ 1034N.110 และสายพันธุ์เบอร์ 1030N.8 รวมทั้งสิ้น 33 ตัวอย่างและแยกเก็บเชื้อราแบบสปอร์เดี่ยวรวมทั้งสิ้น 111 สายพันธุ์ (ตารางผนวกที่ ก1) โดยเก็บรักษาเชื้อราไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 6 บริเวณพื้นที่ที่มีการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคไหม้
คือ จังหวัดที่สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อโรคไหม้ในข้าว



ภาพที่ 7 การเก็บรวบรวมตัวอย่างข้าวที่เป็นโรคไหม้

การทดสอบความต้านทานโรคไหม้

จากการทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ของข้าว (ภาพที่ 8) ทั้ง 24 พันธุ์ด้วยเชื้อ 24 สายพันธุ์ พบว่าข้าวแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ได้แตกต่างกัน เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาจัดกลุ่มของพันธุ์ข้าวสามารถแบ่งข้าวออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 9)

1. กลุ่มพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อเชื้อทดสอบทั้งหมด ได้แก่ พันธุ์ชยันต IR64 เจ้าหอมนิล กข29 กข31 กข41 และ CT13432 โดยมีค่าความต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง เท่ากับ 1.0 ทั้งหมด
2. กลุ่มพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อเชื้อทดสอบบางสายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์พิษณุโลก2 สุพรรณบุรี 60 กข43 สุพรรณบุรี2 สุพรรณบุรี3 CH1 สุพรรณบุรี90 CH2 สุพรรณบุรี1 CH3 ปทุมธานี1 กข35 C101LAC พิษณุโลก60-1 และ พิษณุโลก60-2 โดยมีค่าความต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง อยู่ในช่วง 0.58 – 0.96
3. กลุ่มพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อเชื้อทดสอบทั้งหมด ได้แก่พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และ กข6 โดยมีค่าความต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง เป็น 0 ทั้งสองพันธุ์

พันธุ์ข้าวแต่ละพันธุ์มีความสามารถในการต้านทานเชื้อที่แตกต่างกัน โดยพันธุ์ปรับปรุงใหม่มีทั้งข้าวที่ต้านทานโรคไหม้ได้ดีและต้านทานเชื้อบางสายพันธุ์ เมื่อเกษตรกรนำไปเพาะปลูกจะต้องมีป้องกันในการทำลายของโรคไหม้ โดยเฉพาะการเพาะปลูกข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และ

กข6 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sirithunya *et al.* (2007) ที่ทดสอบความต้านทานโรคไหม้ด้วยเชื้อที่เก็บในช่วงปี 2542 – 2545 และ Khammone (2006) ได้รายงานไว้เช่นกันว่าเชื้อโรคไหม้จากเมืองสุวรรณเขตของประเทศไทย มีความสามารถในการเข้าทำลายข้าวไทยได้ไม่แตกต่างจากเชื้อโรคไหม้ของประเทศไทย

ข้าวที่จัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ต้านทาน ได้แก่ ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล และ IR64 ที่แสดงความต้านทานได้ดีต่อเชื้อโรคไหม้ที่เก็บใหม่นั้น ซึ่งทั้ง 2 พันธุ์นี้ได้มีการใช้เป็นเชื้อพันธุ์กรรมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ต้านทานโรคไหม้อยู่ในปัจจุบันอยู่แล้ว (Sreewongchai *et al.*, 2010) การค้นหาแหล่งพันธุ์กรรมของความต้านทานเชื้อโรคไหม้ใหม่นั้นมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อการวางแผนการพัฒนาพันธุ์พืชให้สอดคล้องกับความหลากหลายทางพันธุ์กรรมของเชื้อโรคไหม้ที่มีอยู่ (พูนศักดิ์ และคณะ, 2550)



(ก)



(ข)

ภาพที่ 8 การทดสอบความต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ทดสอบ

(ก) คือ การเก็บรักษาต้นกล้าข้าวหลังจากการปลูกเชื้อแล้วในภาพการพรางแสง

(ข) คือ ลักษณะอาการ โรคไหม้บนใบข้าว

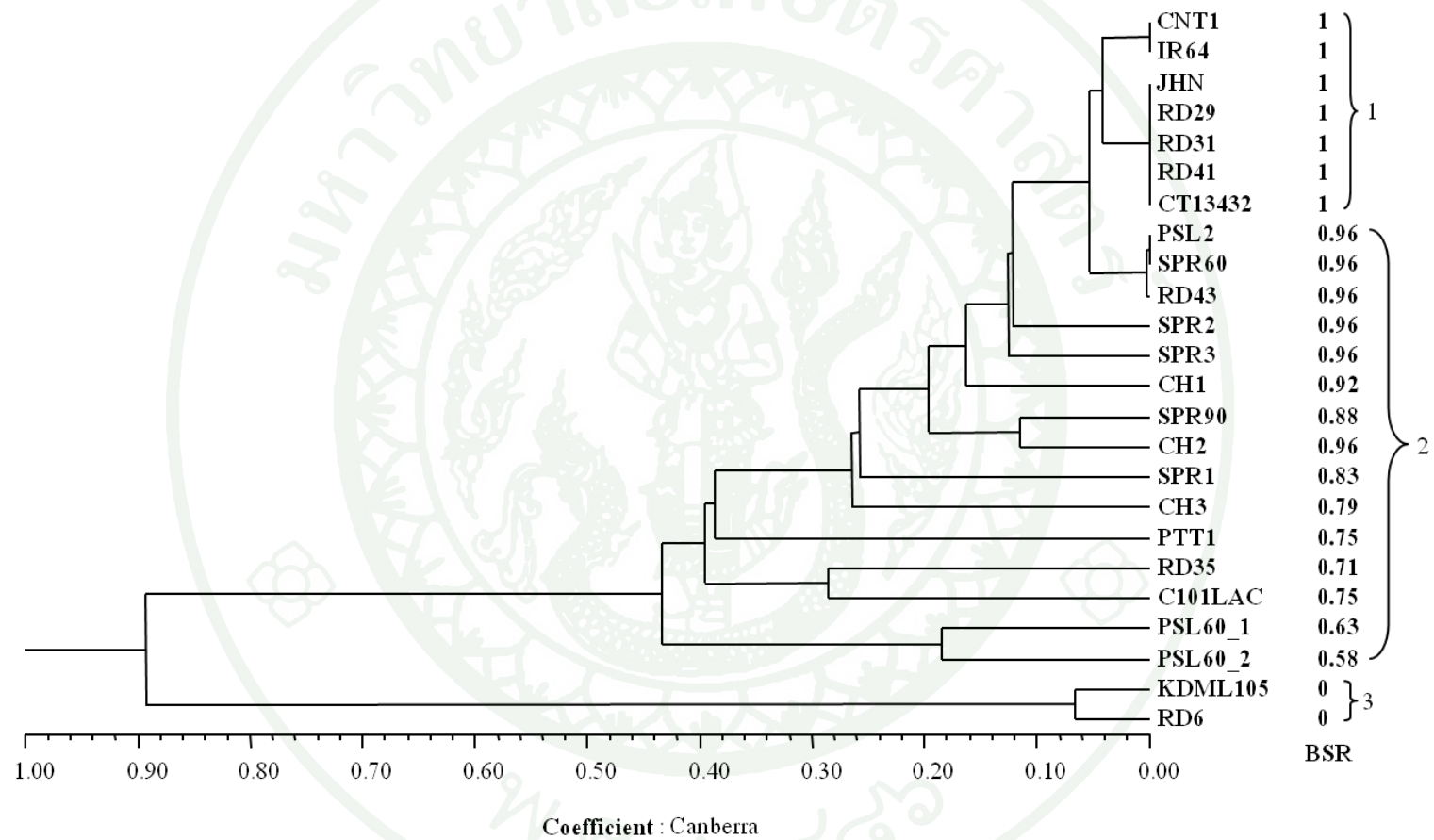
ตารางที่ 1 ค่าความต้านทานต่อเชื้อโรคใหม่ 24 สายพันธุ์ของข้าว 24 พันธุ์

สายพันธุ์ ชื่อ	จังหวัด	ประเทศ	CNT1	JHN	KDML105	PSL2	PSL60-1	PSL60-2	PTT1	RD6	RD29	RD31	RD35	RD41	RD43	SPR1	SPR2	SPR3	SPR60	SPR90	C10ILAC	CT13432	CH1	CH2	CH3	IR64	VI
BAG1.1	พิษณุโลก	ไทย	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0.13
BAG1.3	พิษณุโลก	ไทย	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0.08
BAG2.4	อุบลราชธานี	ไทย	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	0.21
BAG17.2	ชัยภูมิ	ไทย	R	R	S	R	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	0.08
BAG6.4	ขอนแก่น	ไทย	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0.08
BAG12.4	หนองคาย	ไทย	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	0.08
BAG9.6	เชียงราย	ไทย	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	0.13
BAG14.3	หนองคาย	ไทย	R	R	S	R	R	R	I	S	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0.08
BAG8.2	อุบลราชธานี	ไทย	R	R	S	S	S	R	I	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	I	R	I	R	0.42
BAG9.2	เชียงราย	ไทย	R	R	S	R	S	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0.13
BAG11.5	หนองคาย	ไทย	R	R	S	R	S	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	0.17
BAG20.2	อุดรธานี	ไทย	R	R	S	R	S	S	I	S	R	R	I	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	I	R	R	0.17
BAG24.1	ชัยภูมิ	ไทย	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	0.17
BAG31.1	อุดรธานี	ไทย	R	R	S	R	S	S	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	0.21

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สายพันธุ์ เชื้อ	จังหวัด	ประเทศ	CNT1	JHN	KDML105	PSL2	PSL60-1	PSL60-2	PTT1	RD6	RD29	RD31	RD35	RD41	RD43	SPR1	SPR2	SPR3	SPR60	SPR90	C101LAC	CT13432	CH1	CH2	CH3	IR64	VI
BAG2.3	อุบลราชธานี	ไทย	R	R	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	0.08
BAG3.3	พิษณุโลก	ไทย	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0.08
BAG4.4	ขอนแก่น	ไทย	R	R	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0.04
BAG6.2	ขอนแก่น	ไทย	R	R	S	R	R	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0.08
BAG16.1	อุดรธานี	ไทย	R	R	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0.04
BAG9.4	เชียงราย	ไทย	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0.08
BAG24.2	ชัยภูมิ	ไทย	R	R	S	R	I	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	0.08
LPB2.1	หลวงพระบาง	ลาว	R	R	I	R	S	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0.04
LPB4.1	หลวงพระบาง	ลาว	R	R	S	R	R	I	R	S	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	0.08
LPB6.1	หลวงพระบาง	ลาว	R	R	S	R	I	I	S	S	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	0.13
BSR			1	1	0	0.96	0.58	0.63	0.75	0	1	1	0.71	1	0.96	0.83	0.92	0.96	0.96	0.88	0.75	1	0.92	0.96	0.79	1	

หมายเหตุ: R = พันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานโรคสูง, I = พันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานโรคปานกลาง, S = พันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อโรคไหม้



ภาพที่ 9 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ในความต้านทานโรคไหม้ของข้าว 24 พันธุ์ และค่าดัชนีความต้านทานแบบกว้างของข้าวพันธุ์ทดสอบ

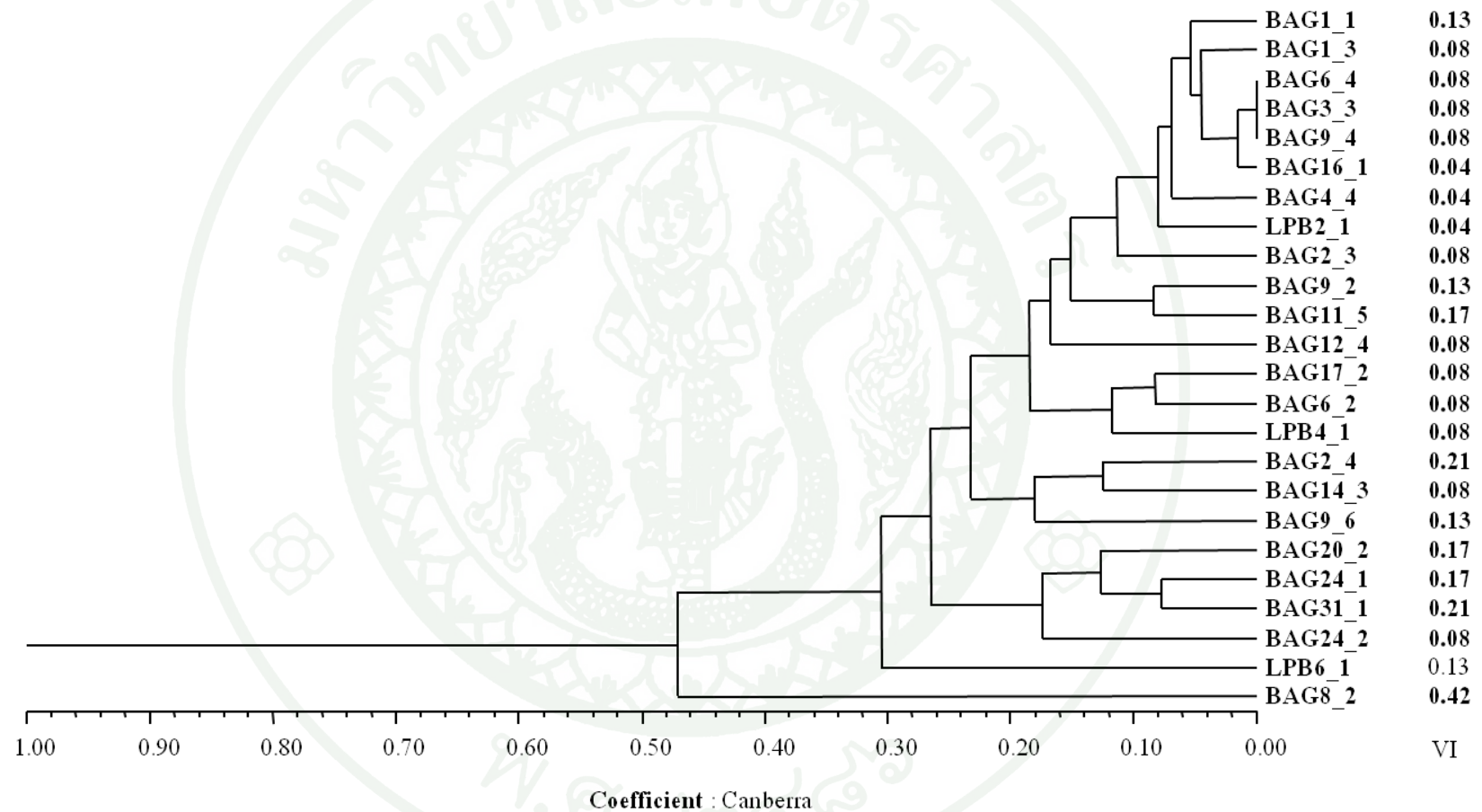
ความหลากหลายของในความรุนแรงของเชื้อโรคไหม้

เชื้อโรคไหม้จำนวน 24 สายพันธุ์ที่เก็บจากสถานที่ต่างๆ เมื่อนำมาทดสอบความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ทดสอบนั้นพบว่า เชื้อแต่ละสายพันธุ์มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคต่อพันธุ์ข้าวต่างกัน โดยเชื้อจากประเทศลาวทั้ง 3 สายพันธุ์มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคคล้ายกับเชื้อจากประเทศไทย ซึ่งไม่สามารถแยกกลุ่มออกจากกันได้ ส่วนเชื้อของประเทศไทยทั้ง 21 สายพันธุ์นั้นไม่สามารถจัดกลุ่มเชื้อตามสถานที่เก็บเชื้อมาได้ (ตารางผนวกที่ ก1 และภาพที่ 10)

เมื่อพิจารณาถึงความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคเชื้อแต่ละสายพันธุ์ พบว่า

1. เชื้อที่ทดสอบจำนวน 24 สายพันธุ์ ที่มีแหล่งมาจากพื้นที่ปลูกข้าวแตกต่างกันนั้นมีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคในข้าวได้แตกต่างกัน โดยกลุ่มเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคในข้าวมากที่สุดจะมีค่า VI สูงสุด ซึ่งกลุ่มเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคสูงสุด คือ BAG8_2 มีค่า $VI = 0.42$ ซึ่งเก็บรวบรวมจาก จ.อุบลราชธานี ส่วนเชื้อที่มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคในข้าวได้น้อยที่สุดคือ BAG16_1 และ BAG4_4 มีค่า $VI = 0.04$ เท่ากันซึ่งเก็บรวบรวมจาก จ.อุดรธานี และ จ.ขอนแก่น ตามลำดับ เชื้อจากประเทศลาว ได้แก่ LPB2_1, LPB4_1 และ LPB6_1 มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคในข้าวได้ในระดับใกล้เคียงกับเชื้อของประเทศไทย

2. ความหลากหลายของเชื้อโรคไหม้ในตัวอย่างเดียวกันซึ่งแยกออกเป็น 5 สายพันธุ์เมื่อนำมาทดสอบการเกิดโรคไหม้พบว่ามีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคไหม้บนใบข้าวพันธุ์ทดสอบมากกว่า 1 แบบโดยเชื้อ 4 สายพันธุ์ มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคไหม้เหมือนกัน และมีเชื้อ 1 สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคไหม้แตกต่างกันออกไป ทำให้ทราบว่าเชื้อโรคไหม้ในตัวอย่างเดียวกันประกอบด้วยเชื้อที่เป็นเชื้อหลักและมีเชื้อในสัดส่วนรองลงมา ทำให้จำเป็นต้องแยกเก็บเชื้อโรคไหม้จาก 1 ตัวอย่าง เป็นหลายๆสายพันธุ์เชื้อ



ภาพที่ 10 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์การด้านทานโรคใหม่ของเชื้อโรคไหม้ 24 สายพันธุ์ และค่าดัชนีความรุนแรงของเชื้อ

การทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ของข้าว 3 พันธุ์ด้วยเชื้อโรคไหม้ 46 สายพันธุ์

จากการทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ของข้าวทั้ง 24 พันธุ์ด้วยเชื้อโรคไหม้ 24 สายพันธุ์ พบว่ากลุ่มสายพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อเชื้อทดสอบทั้งหมด ได้แก่พันธุ์ ชัยนาท1 IR64 เจ้าหอมนิล กข29 กข31 กข41 และ CT13432 และจากการรายงานของอภิชาติ และคณะ (2553) พบว่าข้าวพันธุ์ IR64 และเจ้าหอมนิลมีการทำแผนที่ยีนไว้แล้ว จึงนำข้าวทั้งสองพันธุ์ดังกล่าว และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อเชื้อโรคไหม้ทุกสายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถความต้านทานเชื้อโรคไหม้ด้วยเชื้อโรคไหม้ทั้งหมด 46 สายพันธุ์ พบว่า ข้าว พันธุ์ IR64 และเจ้าหอมนิล สามารถต้านทานเชื้อโรคไหม้ได้ทุกเชื้อสายพันธุ์ และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อ่อนแอต่อเชื้อโรคไหม้ในสายพันธุ์เชื้อส่วนใหญ่ (ตารางที่ 2 และตารางผนวกที่ ก2) ในการวิจัยครั้งนี้เลือกใช้ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล เป็นพันธุ์ให้ และใช้ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์รับ เนื่องจากข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล มีการค้นพบตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ไว้แล้วซึ่งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 และ 11 โดยยีนบนโครโมโซมที่ 11 เป็นยีนหลัก ส่วนพันธุ์ IR64 มียีนต้านทานอยู่หลายตำแหน่ง (อภิชาติ และคณะ, 2553)

ตารางที่ 2 ค่าความต้านทานต่อเชื้อโรคใหม่ 46 สายพันธุ์ ในข้าวพันธุ์ทดสอบ 3 พันธุ์

ลำดับที่	รหัสสายพันธุ์เชื้อ	ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล	ข้าวพันธุ์ IR64	ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105
1	BAG1.1	R	R	S
2	BAG1.2	R	R	I
3	BAG1.3	R	R	I
4	BAG1.4	R	R	S
5	BAG1.5	R	R	S
6	BAG1.6	R	R	S
7	BAG2.1	R	R	S
8	BAG2.2	R	R	S
9	BAG2.3	R	R	S
10	BAG2.4	R	R	S
11	BAG3.1	R	R	I
12	BAG3.2	R	R	S
13	BAG3.3	R	R	I
14	BAG3.4	R	R	S
15	BAG3.5	R	R	S
16	BAG4.1	R	R	S
17	BAG4.2	R	R	I
18	BAG4.3	R	R	R
19	BAG4.4	R	R	I
20	BAG4.5	R	R	S
21	BAG4.6	R	R	I
22	BAG4.7	R	R	S
23	BAG5.1	R	R	R
24	BAG5.2	R	R	I
25	BAG5.3	R	R	S
26	BAG5.4	R	R	S
27	BAG6.1	R	R	I

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสสายพันธุ์เชื้อ	ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล	ข้าวพันธุ์ IR64	ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105
28	BAG6.2	R	R	R
29	BAG6.3	R	R	R
30	BAG6.4	R	R	I
31	BAG6.5	R	R	S
32	BAG6.6	R	R	I
33	BAG7.1	R	R	S
34	BAG7.2	R	R	S
35	BAG7.3	R	R	S
36	BAG8.1	R	R	R
37	BAG8.2	R	R	I
38	BAG8.3	R	R	R
39	BAG8.4	R	R	R
40	BAG8.5	R	R	R
41	BAG9.1	R	R	S
42	BAG9.2	R	R	S
43	BAG9.3	R	R	S
44	BAG9.4	R	R	S
45	BAG9.5	R	R	S
46	BAG9.6	R	R	S
ค่าความต้านทานเชื้อโรคไหม้		1	1	0.152

หมายเหตุ: R = พันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานโรคสูง, I = พันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานโรคปานกลาง,
S = พันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อโรคไหม้

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานโรคไหม้

การสร้างลูกผสมรุ่นที่ 1

จากการผสมข้ามระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งอ่อนแอต่อโรคไหม้และทำหน้าที่เป็นพันธุ์รับ และ ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล ซึ่งต้านทานโรคไหม้และทำหน้าที่เป็นพันธุ์ให้ (ภาพผนวกที่ ก1) ได้เมล็ดข้าวลูกผสมรุ่นที่ 1 ได้จำนวน 7 เมล็ด

การสร้างลูกผสมกลับรุ่น BC_1F_1

จากการทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ของลูกผสมรุ่นที่ 1 ที่ระยะต้นกล้า (14 วันหลังปลูก) พบว่าเมล็ดลูกผสมรุ่นที่ 1 จำนวน 7 เมล็ด ปลูกแล้วตายไป 3 ต้น เหลือ 4 ต้น และมี 3 ต้นที่ต้านทานต่อเชื้อที่ทดสอบเช่นเดียวกับพันธุ์เจ้าหอมนิล จำนวน 3 ต้น ส่วนอีก 1 ต้นอ่อนแอต่อโรคไหม้เช่นเดียวกับพันธุ์แม่ นำต้นลูกผสมรุ่นที่ 1 ทั้ง 3 ต้นที่ต้านทานโรคไหม้ ผสมกลับไปยังพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เพื่อสร้างลูกผสมกลับรุ่นที่ BC_1F_1 ได้ทั้งหมด 13 เมล็ด

ในลูกผสมรุ่นที่ 1 ที่ได้นั้นแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มต้นที่ต้านทานโรคไหม้เหมือนพันธุ์พ้อมีจำนวน 3 ต้น ซึ่งยืนยันต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล มีรายงานไว้แล้วว่าเป็นยีนข่ม (Neonplub *et al.*, 2006) จึงทำให้ลูกผสมที่ได้แสดงความต้านทานโรคไหม้ให้เห็นตั้งแต่รุ่นที่ 1 ส่วนอีกกลุ่มหนึ่ง คือ กลุ่มต้นที่อ่อนแอต่อโรคไหม้เช่นเดียวกับพันธุ์แม่ ซึ่งอาจจะเกิดจากสาเหตุที่เมล็ดดังกล่าวได้รับการผสมตัวเองจึงทำให้ได้เมล็ดที่มีพันธุกรรมอ่อนแอต่อโรคไหม้เช่นเดียวกับพันธุ์แม่

การสร้างลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_1

ปลูกลูกผสมกลับรุ่นที่ BC_1F_1 ที่ได้ทั้งหมด 13 ต้น ตายไป 6 ต้น มีชีวิตรอด 7 ต้นทดสอบความต้านทานโรคไหม้ของต้นที่มีชีวิตเพื่อคัดเลือกต้นที่ต้านทานโรคไหม้ พบว่าสามารถคัดเลือกได้ต้นที่ต้านทานต่อโรคไหม้ในระยะต้นกล้าจำนวน 2 ต้น แล้วนำต้นผสมกลับไปยังพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เพื่อสร้างลูกผสมกลับรุ่นที่ BC_2F_1 ได้เมล็ดทั้งหมด 48 เมล็ด เนื่องจากการปลูกในช่วงวันสั้น จึงไม่จำเป็นมีการบังคับให้ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และลูกผสมกลับรุ่น BC_1F_1 ออกดอก

ในลูกผสมกลับรุ่นที่ 1 ที่ได้นั้นแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มต้นที่ต้านทานโรคไหม้เหมือนพันธุ์พ้อมีจำนวน 2 ต้น ซึ่งยืนยันต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล ส่วนอีกกลุ่มหนึ่ง คือกลุ่ม

ต้นที่อ่อนแอต่อโรคไหม้เช่นเดียวกับพันธุ์แม่ ซึ่งอาจจะเกิดจากสาเหตุที่เมล็ดดังกล่าวได้รับการผสมตัวเองจึงทำให้ได้เมล็ดที่มีพันธุกรรมอ่อนแอต่อโรคไหม้เช่นเดียวกับพันธุ์แม่ หรือเกิดจากการจับคู่กันของยีนแฝงจึงทำให้ต้นดังกล่าวแสดงลักษณะที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ออกมา

การสร้างลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2

ปลูกลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_1 ที่ได้ทั้งหมด 30 ต้น ตายไป 12 ต้น มีชีวิตรอด 18 ต้น แล้วทดสอบความต้านทานโรคไหม้ของต้นที่มีชีวิตด้วยเชื้อทดสอบ พบว่ามีต้นที่ต้านทานโรคไหม้จำนวน 4 ต้น แล้วนำไปปลูกในกระถางเพื่อปล่อยให้เกิดการผสมตัวเองเพื่อสร้างลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 ได้ทั้งหมด 60 เมล็ด

ในลูกผสมกลับรุ่นที่ BC_2F_1 ที่ได้นั้นแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มต้นที่ต้านทานโรคไหม้เหมือนพันธุ์พ่อแม่จำนวน 4 ต้น ซึ่งยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งคือกลุ่มต้นที่อ่อนแอต่อโรคไหม้เช่นเดียวกับพันธุ์แม่ ซึ่งอาจจะเกิดจากสาเหตุที่เมล็ดดังกล่าวได้รับการผสมตัวเองจึงทำให้ได้เมล็ดที่มีพันธุกรรมอ่อนแอต่อโรคไหม้เช่นเดียวกับพันธุ์แม่ หรือเกิดจากการจับคู่กันของยีนแฝงจึงทำให้ต้นดังกล่าวแสดงลักษณะที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ออกมา

การดำเนินการในขั้นตอนนี้เป็นช่วงแสงยาว จึงต้องมีการบังคับให้ต้นข้าวที่ได้ดอกออกโดยนำต้นข้าวทั้งหมดเข้าห้องมืดตามเวลาที่กำหนด ต้นข้าวทั้งหมดจะออกดอกสำหรับใช้ในการผสมพันธุ์

การสร้างลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_3

ปลูกลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 ที่ได้ทั้งหมด 40 ต้น ตายไป 6 ต้น มีชีวิตรอด 34 ต้น แล้วทดสอบความต้านทานโรคไหม้ของต้นที่มีชีวิตด้วยเชื้อทดสอบ พบว่ามีต้นที่ต้านทานโรคไหม้จำนวน 20 ต้น เมื่อนำปลูกลงแปลงเพื่อคัดเลือกต้นที่มีลักษณะทรงต้น (plant type) ลักษณะคล้ายคลึงกับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่าสามารถคัดเลือกได้ 20 ต้น

การประเมินลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

การประเมินด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับลักษณะคุณภาพ ปาริฉัตร และคณะ (2554) ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ co-dominance ที่เฉพาะกับลักษณะคุณภาพหุงต้มของข้าว 2

เครื่องหมาย คือ Naro และ OSR19 เพื่อใช้ในการคัดเลือกลักษณะความหอมและปริมาณอะมิโลสในข้าว ตามลำดับ จากลูกผสมรุ่น BC_2F_2 ที่ผ่านการประเมินความต้านทานโรคไหม้และคัดเลือกต้นที่มีลักษณะทรงต้นใกล้เคียงกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 20 ต้น โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ทั้ง 2 เครื่องหมาย พบว่า มี 10 ต้นที่มีการปรากฏของแถบดีเอ็นเอทั้งสองลักษณะที่ทดสอบเหมือนกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 (ตารางที่ 3 และภาพผนวกที่ ก2)

ตารางที่ 3 ผลอ่านค่าการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ ที่ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย Naro และ OSR19 เพื่อใช้ในการคัดเลือกลักษณะความหอมและปริมาณอะมิโลสในข้าว ตามลำดับ จากลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 เปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อแม่

พันธุ์ / ต้นที่ใช้ทดสอบ	เครื่องหมาย	
	Naro	OSR19
ขาวดอกมะลิ 105	1	1
เจ้าหอมนิล	3	3
ต้นลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2		
1	n/a	1
2	1	n/a
3	n/a	1
4	1	1
5	1	1
6	1	1
7	1	n/a
8	2	1

ตารางที่ 3 (ต่อ)

พันธุ์ / ต้นที่ใช้ทดสอบ	เครื่องหมาย	
	Naro	OSR19
9	1	1
10	1	1
11	2	1
12	3	3
13	1	1
14	3	3
15	1	1
16	1	1
17	1	1
18	1	1
19	1	1
20	1	1

หมายเหตุ: 1 คือ ค่าอ่านแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนข้าวขาวดอกมะลิ 105 (พันธุ์แม่)

2 คือ ค่าอ่านแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล (พันธุ์พ่อ)

n/a คือ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

การประเมิน genetic background ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อหาความแตกต่างทางพันธุกรรม ระหว่างข้าวพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล

จากการประเมิน genetic background ของลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 จำนวน 10 ต้น โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR จำนวน 120 เครื่องหมาย ที่มีตำแหน่งกระจายตัวอยู่บนโครโมโซม ต่างๆ โครโมโซมละ 10 ไพรเมอร์ เพื่อหาความแตกต่างพันธุกรรม (polymorphism) ระหว่างข้าว พันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิลแล้วคัดเลือกไพรเมอร์มาใช้ในการ ทดสอบขั้นต่อไป ภายหลังจากการทำ polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) พบว่าสามารถ เลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอ ที่ให้ความแตกต่างทางระหว่างข้าวพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 และ ข้าวเจ้าหอมนิลได้จำนวน 64 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (ตารางที่ 4 ตารางผนวกที่ ก3 ภาพผนวกที่ ก3 ก4 ก5 ก6 และ ก7)

ตารางที่ 4 จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 กับข้าว เจ้าหอมนิล ในการทำ PAGE

โครโมโซมที่	จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างข้าวพันธุ์ ชาวดอกมะลิ 105กับข้าวเจ้าหอมนิล
1	6
2	6
3	6
4	6
5	5
6	8
7	5
8	7
9	3
10	4
11	7
12	1
รวม	64

คัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอ ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่จำนวน 29 เครื่องหมาย เพื่อนำมาประเมินพันธุกรรมในลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 จำนวน 10 ต้นที่คัดเลือกไว้ โดยภาพหลังจากการทำ PAGE อ่านผลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ได้ แล้วบันทึกเป็นลักษณะพันธุกรรมเหมือนพันธุ์พ่อหรือแม่ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลอ่านค่าการปรากฏของแถบดีเอ็นเอของลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 โดยประเมินจาก

เครื่องหมายดีเอ็นเอ เปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อแม่

ลำดับ	ชื่อเครื่องหมายดีเอ็นเอ	โคโมโซมที่	ผลการอ่านแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ *											
			พันธุ์แม่-พ่อ		ลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2									
			KDML 105	JHN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	RM495	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	RM5	1	1	3	1	1	n/a	1	1	n/a	1	1	n/a	1
3	RM543	1	1	3	1	1	1	1	1	1	n/a	1	1	1
4	RM106	2	1	3	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1
5	RM208	2	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	RM22	3	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	RM16	3	1	3	3	1	1	1	1	2	2	2	2	2
8	RM514	3	1	3	2	3	2	2	2	2	2	1	3	2
9	RM280	4	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	RM559	4	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	RM471	4	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	RM509	5	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	RM13	5	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	RM225	6	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	RM136	6	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	RM510	6	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	RM11	7	1	3	1	2	1	2	3	3	3	1	1	1

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อเครื่องหมาย	โครโมโซมที่	ผลการอ่านแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ *											
			พันธุ์แม่-พ่อ		ลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2									
			KDML 105	JHN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
18	RM234	7	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19	RM428	7	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	RM152	8	1	3	3	1	1	1	1	1	1	2	2	2
21	RM544	8	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
22	RM404	8	1	3	1	1	1	3	2	2	2	3	2	2
23	RM215	9	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	RM216	10	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
25	RM258	10	1	3	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3
26	RM590	10	1	3	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3
27	RM332	11	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
28	RM224	11	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
29	RM144	11	1	3	3	1	1	2	1	3	1	1	2	2
30	RM270	12	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

หมายเหตุ: * ค่าอ่านผลแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ

1 คือ พันธุ์ที่มีลักษณะพันธุกรรมเหมือนพันธุ์แม่ (KDML105)

2 คือ พันธุ์ที่มีลักษณะพันธุกรรมแบบ heterozygous

3 คือ พันธุ์ที่มีลักษณะพันธุกรรมเหมือนพันธุ์พ่อ (JHN)

n/a คือ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

การประเมินค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 กับข้าวขาวดอกมะลิ 105

จากการปลูกทดสอบทรงต้นและใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย Naro และ OSR19 เพื่อการคัดเลือกลักษณะความหอมและปริมาณอะมิโลสในข้าว ตามลำดับ ทำในลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 เปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อแม่ สามารถคัดเลือกลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 จำนวน 10 ได้ผลดังตารางที่ 6 ซึ่งในทางทฤษฎีแล้ว ค่าพันธุกรรมของลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 ที่เป็น homozygous เหมือนพันธุ์รับมีค่าเท่ากับ 81.25 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองได้ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่เป็น homozygous กับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีค่าเฉลี่ย 81.61 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า homozygosity เท่ากับ 91.3 เปอร์เซ็นต์ โดยต้นที่มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่เป็น homozygous กับข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีค่าสูงสุด 5 อันดับแรกคือ ต้นที่ 3 2 1 4 และ 5 ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ซึ่งมีการคัดเลือกสำหรับการดำเนินการในขั้นต่อไป

ตารางที่ 6 ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของข้าวลูกผสมกลับรุ่น BC₂F₂ เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 และข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล

ลูกผสมกลับรุ่น BC ₂ F ₂ ต้นที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	เฉลี่ย
จำนวนดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีค่าแถบดีเอ็นเอเหมือนข้าว ชาวดอกมะลิ 105	27	28	29	26	26	23	23	25	23	23	25.3
จำนวนดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีค่าแถบดีเอ็นเอเหมือนข้าว JHN	3	2	1	2	3	5	5	4	4	3	3.2
จำนวนดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีค่าแถบดีเอ็นเอเป็น heterozygous	1	1	1	3	2	3	3	2	4	5	2.5
จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งหมดที่ใช้ทดสอบ	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31
ค่า heterozygosity (%)	3.23	3.23	3.23	9.68	6.45	9.68	9.68	6.45	12.9	16.13	8.01
ค่า homozygosity (%)	96.77	96.77	96.77	90.32	93.55	90.32	90.32	93.55	87.1	83.87	91.3
- ข้าวพันธุ์ ชาวดอกมะลิ 105	87.09	90.32	93.54	83.87	83.87	74.19	74.19	80.65	74.2	74.19	81.61
- ข้าวพันธุ์ JHN	9.68	6.45	3.23	6.45	9.68	16.13	16.13	12.9	12.9	9.68	10.32

การประเมินยีนต้านทานโรคไหม้ในลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2

ยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล ได้มีการศึกษาไว้แล้วว่าวางตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 1 และ 11 โดยอยู่ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM212 ถึง RM319 และ RM139 ถึง RM144 ตามลำดับ และยังพบอีกว่ายีนต้านทานที่อยู่บนโครโมโซมที่ 11 เป็นยีนหลัก (Neolplub *et al.*, 2006) จากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM224 และ RM144 ในการตรวจสอบยีนบนโครโมโซมที่ 11 พบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM224 ให้ค่าพันธุกรรมเหมือนข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล ทั้ง 10 ต้นในลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 ที่เลือกมา ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM144 ให้ค่าพันธุกรรมเหมือนข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล เพียง 2 ต้นในลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 ที่เลือกมา (ตารางที่ 5) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM224 มีตำแหน่งที่อยู่ใกล้กับยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล มากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM144 จึงทำให้ปรากฏพันธุกรรมของข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล ในลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 ที่ต้านทานทุกต้น

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. ได้ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่มีความต้านทานโรคไหม้ โดยนำอินต้านทานโรคไหม้มาจากข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล โดยใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมกลับ

2. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยวิธีผสมกลับ ลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 ที่ได้จะมีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่เป็น homozygous เหมือนข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ที่เป็นพันธุ์รับ มีค่าเท่ากับ 81.25 เปอร์เซ็นต์ ตามทฤษฎี ซึ่งค่าเฉลี่ยของประชากรจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือกลูกต้นที่มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่สูงขึ้นจะทำให้การปรับปรุงพันธุ์มีความก้าวหน้าเร็วขึ้น จากการวิจัยครั้งนี้ได้ลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 ที่มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมกับพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 สูงสุด 5 อันดับแรกเท่ากับ 93.54 90.32 87.09 83.87 และ 83.87 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังนั้นการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจึงสามารถช่วยคัดเลือกลูกต้นที่มีพันธุกรรมคล้ายกับข้าวพันธุ์รับได้

ข้อเสนอแนะ

1. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ควรมีการคัดเลือกแหล่งพันธุ์กรรมที่จะนำมาใช้เป็นข้าวพันธุ์ให้ความต้านทาน และมีการประเมินความสามารถต่อการต้านทานเชื้อโรคไหม้ในลูกผสมกลับทุกรุ่นที่ได้ และถ้ามีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกลูกผสมกลับที่ได้ จะทำให้เกิดความแม่นยำสูงในการคัดเลือก
2. สายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่มีความรุนแรงมากๆ จะสามารถเข้าทำลายข้าวพันธุ์ที่อ่อนแอต่อเชื้อโรคไหม้ได้หลายพันธุ์
3. ในการทดสอบความสามารถต่อการต้านทานเชื้อโรคไหม้ ควรมีการใช้เชื้อโรคไหม้หลายๆสายพันธุ์ เพื่อให้เกิดความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ และให้ได้ข้าวที่มีความต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง คือ สามารถต้านทานเชื้อโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์
4. ในการผสมข้ามพันธุ์ข้าวระหว่างพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งทำหน้าที่เป็นพันธุ์รับ และลูกผสมที่ได้ในแต่ละรุ่นของการผสมข้ามที่ทำหน้าที่เป็นพันธุ์ให้ จะมีปัญหาในเรื่องการบานของดอก คือ ในพันธุ์ให้ดอกจะบานที่ละหนึ่งดอกและใช้เวลาในการบานของดอกในแต่ละวันยาวนาน ทำให้เกิดปัญหาในการผสมเกสรข้าว คือ ปริมาณละอองเกสรตัวผู้ไม่เพียงพอต่อการผสม ทำให้ได้ลูกผสมกลับในแต่ละรุ่นได้จำนวนที่น้อย ทำให้อัตราส่วนของต้นที่ต้านทานโรคไหม้ต่อต้นที่อ่อนแอไม่เป็นไปตามทฤษฎี
5. ในการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้จะต้องเพียงพอต่อการคัดเลือกในลักษณะนั้นๆ และควรจะใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในจำนวนมากที่สุดเท่าที่มีทรัพยากรอยู่

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.

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. ยุทธศาสตร์ข้าวปี 2547-2551. กระทรวงเกษตรและ สหกรณ์, กรุงเทพฯ.

กฤษฎา สัมพันธ์รักษ์. 2519. หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

กฤษฎา สัมพันธ์รักษ์. 2551. ปรับปรุงพันธุ์พืช: พื้นฐานวิธีการและแนวคิด. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ชวลา บุณศิริ. 2531. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา. คณะเทคโนโลยีการเกษตรสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

ทัศนีย์ สงวนสำ. 2540. บทบาทของพันธุกรรมด้านทานโรคและแมลงกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของไทย. เอกสารวิชาการ. ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร.

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

ปาริฉัตร รัตนผล, ประภา ศรีพิจิตต์ และธานี ศรีวงศ์ชัย. 2554. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับการทำหน้าที่ของยีนความหอมในข้าว, น. 574-580. ใน รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49 (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์, พยอม โคเบลลี, อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ, ณอมจิตร ฤทธิมนตรี, กุลชญา เกศสุวรรณ, ชนสิริน กลั่นมณี และสงวน เทียงดีฤทธิ์. 2550. การตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทย. วารสารวิชาการข้าว 1 (1): 52-64.

ลัดดาวัลย์ วรรณนุช. 2550. ข้าว การผลิตและการค้า. กรมการข้าว, กรุงเทพฯ.

วัชร ภูริวิโรจน์กุล. 2534. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคแมลง. สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี, ปทุมธานี.

วาสนา วรมิสร์. 2538. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมของไทย. ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

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

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อนงค์ จันทรศรีกุล และนันท์นที ศรีจุมปา. 2542. โรคใบไหม้ของต้นหงส์เหิร ก้ามกุ้งสีทอง ข้าวและวัชพืช. เพื่อนเกษตร 10 (10): 34-40.

อภิชาติ วรรณวิจิตร. 2540. รายงานประจำปี 2540 โครงการวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อภิชาติ วรรณวิจิตร, ธานี ศรีวงศ์ชัย และธีรยุทธ ตูจันดา. 2553. การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ในข้าว. KURI. http://www.rdi.ku.ac.th/kasetresearch52/08-integration/Apichart/integration_00.html: 18 มีนาคม 2553.

อภิชาติ วรรณวิจิตร, สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง และธีรยุทธ ตูจันดา. 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.

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.

Brown, S.M., A. K. Szewc-McFadden and S. Kresovich. 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.

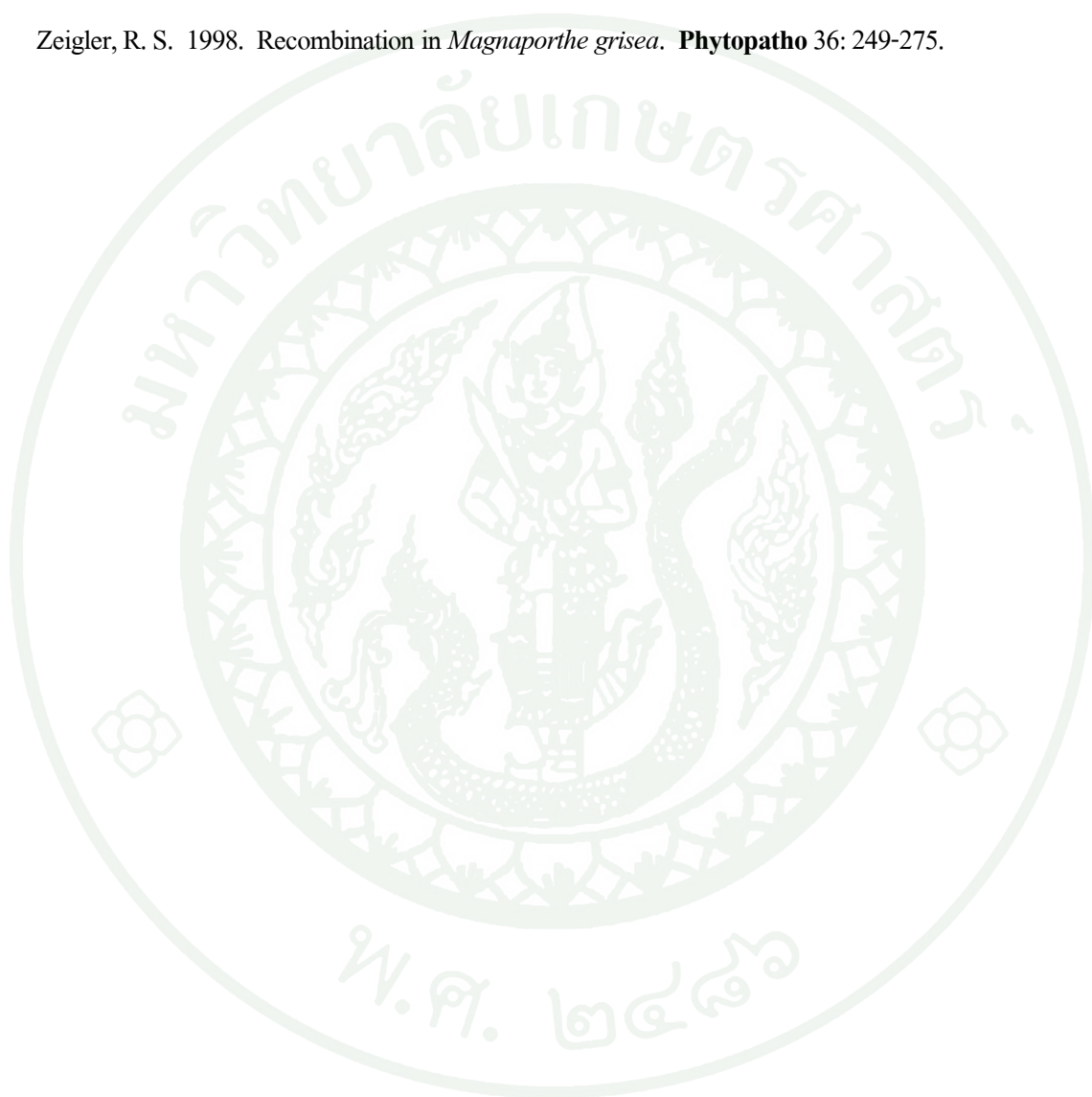
- Collard, B.C.Y., M.Z.Z. Jahufer, J.B. Brouwer and E.C.K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica** 142: 169–196.
- Hebert, T.T. 1971. The perfect stage of *Pyricularia grisea*. **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.
- Kang, S., E. Mullins, T.M. Dezwaan and M.J. Orbach. 2000. **Pathogenesis and Genome Organization of The Rice Blast Fungus**. Fungal pathology, Kluwer Academic 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.
- 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.
- 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.

- McCouch, S. and S.D. Tanksley. 1991. Development and use of restriction fragment length polymorphisms 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.
- Noenplab, A., A. Vanavichit, T. Toojinda, P. Sirithunya, S. Tragoonrung, S. Sriprakhon and C. Wongsaprom. 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.
- Roumen, E., M. Levy and J.L. Nottigham. 1997. Characterization of the European pathogen population of *Magnaporthe grisea* by DNA fingerprinting and pathotype analysis. **European J. Pl. Path.** 103: 363-371.
- Sirithunya, P., T. Sreewongchai, S. Sriprakhon, 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. Sriprakhon, C. Wongsaprom, S. Pimpisitthavorn 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.

- 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.
- 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. Dittmore. 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.
- 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.
- 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.







ตารางผนวกที่ ก1 รายชื่อเชื้อโรคใหม่ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่บริเวณภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในปีเพาะปลูก 2551/2552 แยกตามพื้นที่เก็บพันธุ์ข้าวและส่วนที่เก็บ

ลำดับ	รหัสสายพันธุ์เชื้อ	สถานที่เก็บ	พันธุ์และสายพันธุ์ข้าว	ส่วนของข้าว
1	BAG1.1	วังทอง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
2	BAG1.2	วังทอง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
3	BAG1.3	วังทอง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
4	BAG1.4	วังทอง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
5	BAG1.5	วังทอง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
6	BAG1.6	วังทอง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
7	BAG2.1	เมือง, อุบลราชธานี	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
8	BAG2.2	เมือง, อุบลราชธานี	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
9	BAG2.3	เมือง, อุบลราชธานี	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
10	BAG2.4	เมือง, อุบลราชธานี	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
11	BAG3.1	วังทอง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
12	BAG3.2	วังทอง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
13	BAG3.3	วังทอง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
14	BAG3.4	วังทอง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
15	BAG3.5	วังทอง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
16	BAG4.1	เมือง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	คอรวง
17	BAG4.2	เมือง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	คอรวง
18	BAG4.3	เมือง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	คอรวง
19	BAG4.4	เมือง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	คอรวง
20	BAG4.5	เมือง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	คอรวง
21	BAG4.6	เมือง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	คอรวง
22	BAG4.7	เมือง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	คอรวง
23	BAG5.1	เมือง, ขอนแก่น	1034N.110	คอรวง
24	BAG5.2	เมือง, ขอนแก่น	1034N.110	คอรวง
25	BAG5.3	เมือง, ขอนแก่น	1034N.110	คอรวง

ตารางผนวกที่ ก1 (ต่อ)

ลำดับ	รหัสสายพันธุ์เชื้อ	สถานที่เก็บ	พันธุ์และสายพันธุ์ข้าว	ส่วนของข้าว
26	BAG5.4	เมือง, ขอนแก่น	1034N.110	คอรวง
27	BAG6.1	เมือง, ขอนแก่น	1030N.8	คอรวง
28	BAG6.2	เมือง, ขอนแก่น	1030N.8	คอรวง
29	BAG6.3	เมือง, ขอนแก่น	1030N.8	คอรวง
30	BAG6.4	เมือง, ขอนแก่น	1030N.8	คอรวง
31	BAG6.5	เมือง, ขอนแก่น	1030N.8	คอรวง
32	BAG6.6	เมือง, ขอนแก่น	1030N.8	คอรวง
33	BAG7.1	เมือง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	ข้อต่อใบ
34	BAG7.2	เมือง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	ข้อต่อใบ
35	BAG7.3	เมือง, พิษณุโลก	ข้าวดอกมะลิ 105	ข้อต่อใบ
36	BAG8.1	เมือง, อุบลราชธานี	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
37	BAG8.2	เมือง, อุบลราชธานี	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
38	BAG8.3	เมือง, อุบลราชธานี	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
39	BAG8.4	เมือง, อุบลราชธานี	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
40	BAG8.5	เมือง, อุบลราชธานี	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
41	BAG9.1	เมือง, เชียงราย	ข้าวดอกมะลิ 105	คอรวง
42	BAG9.2	เมือง, เชียงราย	ข้าวดอกมะลิ 105	คอรวง
43	BAG9.3	เมือง, เชียงราย	ข้าวดอกมะลิ 105	คอรวง
44	BAG9.4	เมือง, เชียงราย	ข้าวดอกมะลิ 105	คอรวง
45	BAG9.5	เมือง, เชียงราย	ข้าวดอกมะลิ 105	คอรวง
46	BAG9.6	เมือง, เชียงราย	ข้าวดอกมะลิ 105	คอรวง
47	BAG10.1	เมือง, หนองคาย	กข6	ใบ

ตารางผนวกที่ ก1 (ต่อ)

ลำดับ	รหัสสายพันธุ์เชื้อ	สถานที่เก็บ	พันธุ์และสายพันธุ์ข้าว	ส่วนของข้าว
48	BAG10.2	เมือง, หนองคาย	กข6	ใบ
49	BAG10.3	เมือง, หนองคาย	กข6	ใบ
50	BAG11.1	ท่าบ่อ, หนองคาย	กข6	ใบ
51	BAG11.2	ท่าบ่อ, หนองคาย	กข6	ใบ
52	BAG11.3	ท่าบ่อ, หนองคาย	กข6	ใบ
53	BAG11.4	ท่าบ่อ, หนองคาย	กข6	ใบ
54	BAG11.5	ท่าบ่อ, หนองคาย	กข6	ใบ
55	BAG12.1	โพนพิสัย, หนองคาย	กข6	ใบ
56	BAG12.2	โพนพิสัย, หนองคาย	กข6	ใบ
57	BAG12.3	โพนพิสัย, หนองคาย	กข6	ใบ
58	BAG12.4	โพนพิสัย, หนองคาย	กข6	ใบ
59	BAG12.5	โพนพิสัย, หนองคาย	กข6	ใบ
60	BAG13.1	สังคม, หนองคาย	กข6	ใบ
61	BAG13.2	สังคม, หนองคาย	กข6	ใบ
62	BAG13.3	สังคม, หนองคาย	กข6	ใบ
63	BAG14.1	ศรีเชียงใหม่, หนองคาย	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
64	BAG14.2	ศรีเชียงใหม่, หนองคาย	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
65	BAG14.3	ศรีเชียงใหม่, หนองคาย	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
66	BAG14.4	ศรีเชียงใหม่, หนองคาย	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
67	BAG14.5	ศรีเชียงใหม่, หนองคาย	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
68	BAG15.1	เมือง, อุดรธานี	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
69	BAG15.2	เมือง, อุดรธานี	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ

ตารางผนวกที่ ก1 (ต่อ)

ลำดับ	รหัสสายพันธุ์เชื้อ	สถานที่เก็บ	พันธุ์และสายพันธุ์ข้าว	ส่วนของข้าว
70	BAG15.3	เมือง, อุตรธานี	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
71	BAG16.1	เพี้ย, อุตรธานี	กข6	ใบ
72	BAG16.2	เพี้ย, อุตรธานี	กข6	ใบ
73	BAG17.1	จตุรัส, ชัยภูมิ	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
74	BAG17.2	จตุรัส, ชัยภูมิ	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
75	BAG18.1	สร้างคอม, อุตรธานี	กข6	ใบ
76	BAG18.2	สร้างคอม, อุตรธานี	กข6	ใบ
77	BAG18.3	สร้างคอม, อุตรธานี	กข6	ใบ
78	BAG19.1	กุดจับ, อุตรธานี	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
79	BAG19.2	กุดจับ, อุตรธานี	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
80	BAG19.3	กุดจับ, อุตรธานี	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
81	BAG19.4	กุดจับ, อุตรธานี	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
82	BAG20.1	หนองหาน, อุตรธานี	กข10	ใบ
83	BAG20.2	หนองหาน, อุตรธานี	กข10	ใบ
84	BAG20.3	หนองหาน, อุตรธานี	กข10	ใบ
85	BAG20.4	หนองหาน, อุตรธานี	กข10	ใบ
86	BAG21.1	วังสามหมอ, อุตรธานี	กข6	ใบ
87	BAG21.2	วังสามหมอ, อุตรธานี	กข6	ใบ
88	BAG21.3	วังสามหมอ, อุตรธานี	กข6	ใบ
89	BAG22.1	ทุ่งฝน, อุตรธานี	กข10	ใบ
90	BAG22.2	ทุ่งฝน, อุตรธานี	กข10	ใบ
91	BAG22.3	ทุ่งฝน, อุตรธานี	กข10	ใบ

ตารางผนวกที่ ก1 (ต่อ)

ลำดับ	รหัสสายพันธุ์เชื้อ	สถานที่เก็บ	พันธุ์และสายพันธุ์	ส่วนของข้าว
92	BAG23.1	บ้านฝื่อ, อุตรธานี	กข6	ใบ
93	BAG23.2	บ้านฝื่อ, อุตรธานี	กข6	ใบ
94	BAG24.1	เมือง, ชัยภูมิ	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
95	BAG24.2	เมือง, ชัยภูมิ	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
96	BAG25.1	กุมภวาปี, อุตรธานี	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
97	BAG25.2	กุมภวาปี, อุตรธานี	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
98	BAG26.1	โซ่พิสัย, หนองคาย	กข10	ใบ
99	BAG27.1	สระใคร, หนองคาย	กข10	ใบ
100	BAG27.2	สระใคร, หนองคาย	กข10	ใบ
101	BAG28.1	บึงกาฬ, หนองคาย	กข6	ใบ
102	BAG28.2	บึงกาฬ, หนองคาย	กข6	ใบ
103	BAG29.1	หนองวอซอ, อุตรธานี	กข6	ใบ
104	BAG29.2	หนองวอซอ, อุตรธานี	กข6	ใบ
105	BAG30.1	หนองแขง, อุตรธานี	กข6	ใบ
106	BAG30.2	หนองแขง, อุตรธานี	กข6	ใบ
107	BAG31.1	บ้านดุง, อุตรธานี	กข6	ใบ
108	BAG32.1	พรเจริญ, หนองคาย	กข6	ใบ
109	BAG33.1	บึงโขงหลง, หนองคาย	กข6	ใบ
110	BAG33.2	บึงโขงหลง, หนองคาย	กข6	ใบ
111	BAG33.3	บึงโขงหลง, หนองคาย	กข6	ใบ

ตารางผนวกที่ ก2 การประเมินความต้านทานโรคไหม้ โดยการให้คะแนน 7 ระดับ คือ 0-6

ลำดับ	รหัสสายพันธุ์ เชื้อโรคไหม้	ระดับคะแนนจากการเกิดโรคไหม้ในข้าว*					
		ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2		
		JHN	IR64	KDML105	JHN	IR64	KDML105
1	BAG1.1	0	0	4	0	0	5
2	BAG1.2	0	0	4	0	0	4
3	BAG1.3	0	0	4	0	0	3
4	BAG1.4	0	0	6	0	0	6
5	BAG1.5	0	0	6	0	0	4
6	BAG1.6	0	0	5	0	0	6
7	BAG2.1	0	0	5	0	0	5
8	BAG2.2	0	0	6	0	0	6
9	BAG2.3	0	0	6	0	0	6
10	BAG2.4	0	0	6	0	0	6
11	BAG3.1	0	0	4	0	0	4
12	BAG3.2	0	0	6	0	0	6
13	BAG3.3	0	0	4	0	0	3
14	BAG3.4	0	0	6	0	0	6
15	BAG3.5	0	0	6	0	0	6
16	BAG4.1	0	0	0	0	0	0
17	BAG4.2	0	0	6	0	0	4
18	BAG4.3	0	0	1	0	0	2
19	BAG4.4	0	0	4	0	0	5
20	BAG4.5	0	0	6	0	0	5
21	BAG4.6	0	0	6	0	0	4
22	BAG4.7	0	0	6	0	0	6
23	BAG5.1	0	0	0	0	0	0
24	BAG5.2	0	0	3	0	0	6
25	BAG5.3	0	0	5	0	0	5

ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

ลำดับ	รหัสสายพันธุ์เชื้อโรคใหม่	ระดับคะแนนจากการเกิดโรคใหม่ในข้าว					
		ซ้ำที่ 1			ซ้ำที่ 2		
		JHN	IR64	KDML 105	JHN	IR64	KDML 105
26	BAG5.4	0	0	5	0	0	5
27	BAG6.1	0	0	5	0	0	3
28	BAG6.2	0	0	0	0	0	0
29	BAG6.3	0	0	0	0	0	0
30	BAG6.4	0	0	3	0	0	6
31	BAG6.5	1	0	6	0	0	6
32	BAG6.6	0	0	3	0	0	5
33	BAG7.1	1	0	6	0	0	6
34	BAG7.2	0	0	6	0	0	6
35	BAG7.3	0	0	6	0	0	6
36	BAG8.1	0	0	0	0	0	0
37	BAG8.2	0	0	1	0	0	4
38	BAG8.3	0	0	0	0	0	0
39	BAG8.4	-	0	0	0	0	1
40	BAG8.5	0	0	0	0	0	0
41	BAG9.1	0	0	5	0	0	5
42	BAG9.2	0	0	6	0	0	5
43	BAG9.3	0	0	4	0	0	6
44	BAG9.4	0	0	6	0	0	6
45	BAG9.5	0	0	6	0	0	6
46	BAG9.6	0	0	5	0	0	6

ตารางผนวกที่ ก3 เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ใช้ในการทดสอบ ทั้งหมด 120 เครื่องหมาย

ลำดับ	ดีเอ็นเอ เครื่องหมาย	โครโมโซมที่	ค่าการอ่านแถบดีเอ็นเอ*	
			KDML105	JHN
1	RM495	1	1	2
2	RM11	1	n/a	n/a
3	RM283	1	1	1
4	RM259	1	2	1
5	RM312	1	n/a	n/a
6	RM129	1	1	1
7	RM5	1	1	2
8	RM237	1	1	2
9	RM543	1	1	2
10	RM431	1	2	1
11	RM154	2	1	1
12	RM53	2	n/a	n/a
13	RM452	2	2	1
14	RM300	2	2	1
15	RM465	2	1	1
16	RM561	2	2	1
17	RM106	2	1	2
18	RM6	2	2	1
19	RM208	2	2	1
20	RM535	2	1	1
21	RM22	3	1	2
22	RM489	3	1	2
23	OSR13	3	2	2
24	RM251	3	2	1
25	RM33	3	1	1

ตารางผนวกที่ ก3 (ต่อ)

ลำดับ	ดีเอ็นเอเครื่องหมาย	โครโมโซมที่	ค่าการอ่านแถบดีเอ็นเอ*	
			KDML105	JHN
26	RM16	3	2	1
27	RM426	3	1	1
28	RM55	3	1	1
29	RM571	3	2	1
30	RM514	3	1	2
31	RM307	4	1	1
32	RM551	4	2	1
33	RM518	4	2	1
34	RM471	4	1	2
35	RM564	4	1	2
36	RM252	4	n/a	n/a
37	RM303	4	n/a	n/a
26	RM16	3	2	1
27	RM426	3	1	1
28	RM55	3	1	1
29	RM571	3	2	1
30	RM514	3	1	2
31	RM307	4	1	1
32	RM551	4	2	1
33	RM518	4	2	1
34	RM471	4	1	2
35	RM564	4	1	2
36	RM252	4	n/a	n/a
37	RM303	4	n/a	n/a

ตารางผนวกที่ ก3 (ต่อ)

ลำดับ	ดีเอ็นเอเครื่องหมาย	โครโมโซมที่	ค่าการอ่านแถบดีเอ็นเอ*	
			KDML105	JHN
38	RM124	4	1	1
39	RM280	4	1	2
40	RM559	4	1	2
41	RM507	5	2	2
42	RM413	5	n/a	n/a
43	RM13	5	n/a	n/a
44	RM437	5	2	2
45	RM509	5	1	2
46	RM39	5	1	1
47	RM161	5	1	2
48	RM178	5	2	1
49	RM87	5	2	1
50	RM334	5	2	1
51	RM133	6	1	2
52	RM170	6	2	1
53	RM510	6	2	1
54	RM204	6	n/a	n/a
55	RM225	6	1	2
56	RM136	6	1	2
57	RM454	6	2	2
58	RM162	6	2	1
59	RM400	6	2	1
60	RM141	6	1	2
61	RM436	7	1	1
62	RM125	7	1	1

ตารางผนวกที่ ก3 (ต่อ)

ลำดับ	ดีเอ็นเอเครื่องหมาย	โครโมโซมที่	ค่าการอ่านแถบดีเอ็นเอ*	
			KDML105	JHN
63	RM501	7	1	1
64	RM11	7	1	2
65	RM10	7	1	2
66	RM455	7	1	2
67	RM234	7	2	1
68	RM118	7	1	2
69	RM172	7	1	1
70	RM428	7	n/a	n/a
71	RM408	8	2	1
72	RM152	8	2	1
73	RM25	8	2	2
74	RM544	8	1	2
75	RM44	8	1	1
76	RM404	8	1	2
77	RM339	8	2	1
78	RM284	8	1	1
79	RM433	8	1	2
80	RM447	8	1	2
81	RM316	9	2	2
82	RM444	9	1	2
83	RM524	9	1	2
84	RM105	9	1	1
85	RM409	9	1	1
86	RM410	9	2	1
87	RM288	9	1	1

ตารางผนวกที่ ก3 (ต่อ)

ลำดับ	ดีเอ็นเอเครื่องหมาย	โครโมโซมที่	ค่าการอ่านแถบดีเอ็นเอ*	
			KDML105	JHN
88	RM201	9	1	1
89	RM215	9	n/a	n/a
90	RM205	9	1	1
91	RM474	10	1	1
92	RM222	10	1	2
93	RM216	10	1	2
94	RM239	10	n/a	n/a
95	RM467	10	n/a	n/a
96	RM271	10	n/a	n/a
97	RM258	10	1	2
98	RM484	10	1	1
99	RM590	10	2	1
100	RM591	10	1	1
101	RM286	11	2	1
102	RM332	11	2	1
103	RM552	11	n/a	n/a
104	RM479	11	1	n/a
105	RM536	11	1	1
106	RM287	11	2	1
107	RM457	11	1	2
108	RM206	11	1	2
109	RM224	11	1	2
110	RM144	11	2	1
111	RM415	12	1	1
112	RM19	12	1	1

ตารางผนวกที่ ก3 (ต่อ)

ลำดับ	ดีเอ็นเอเครื่องหมาย	โครโมโซมที่	ค่าการอ่านแถบดีเอ็นเอ*	
			KDML105	JHN
113	RM247	12	1	1
114	RM83	12	1	1
115	RM101	12	1	1
116	RM277	12	1	1
117	RM519	12	1	1
118	RM313	12	2	2
119	RM270	12	2	1
120	RM235	12	1	1

หมายเหตุ: * ค่าอ่านผลแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ

1 คือ พันธุ์ที่มีลักษณะพันธุกรรมเหมือนพันธุ์แม่ (KDML105)

2 คือ พันธุ์ที่มีลักษณะพันธุกรรมแบบ heterozygous

3 คือ พันธุ์ที่มีลักษณะพันธุกรรมเหมือนพันธุ์พ่อ (JHN)

n/a คือ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

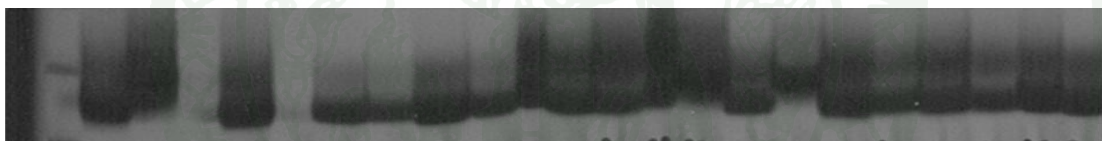


(ก)

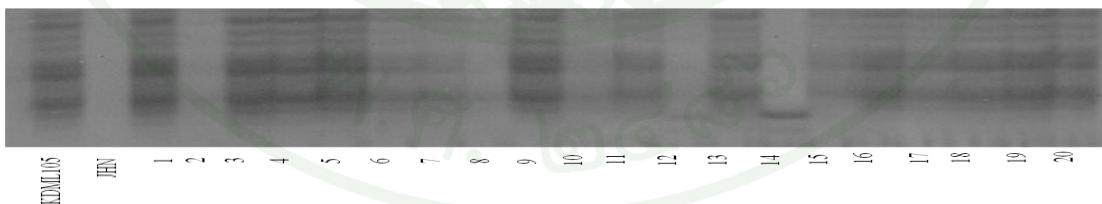


(ข)

ภาพผนวกที่ ก1 ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ใช้เป็นพันธุ์รับ (ก) และข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิลใช้เป็นพันธุ์ให้ (ข)

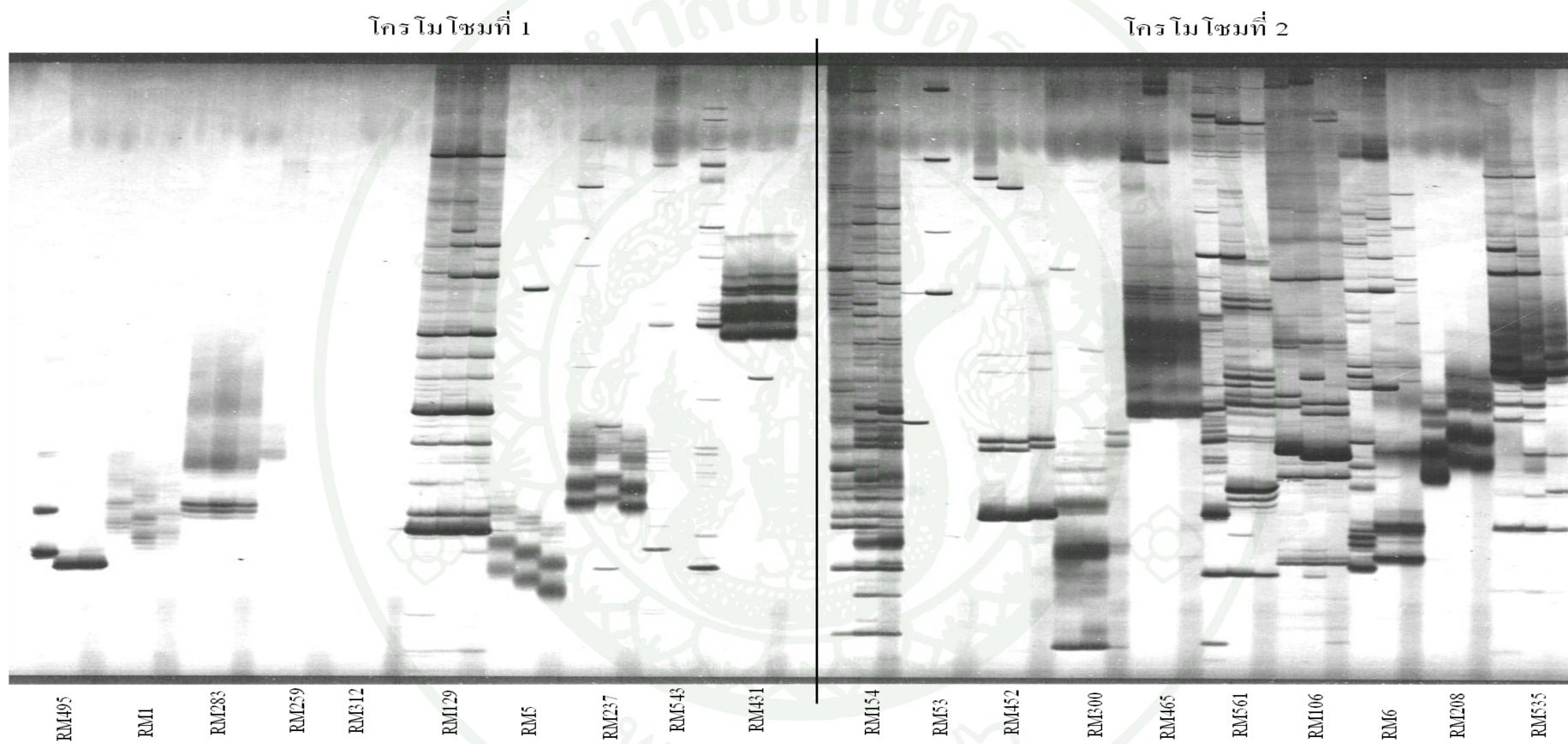


(ก)

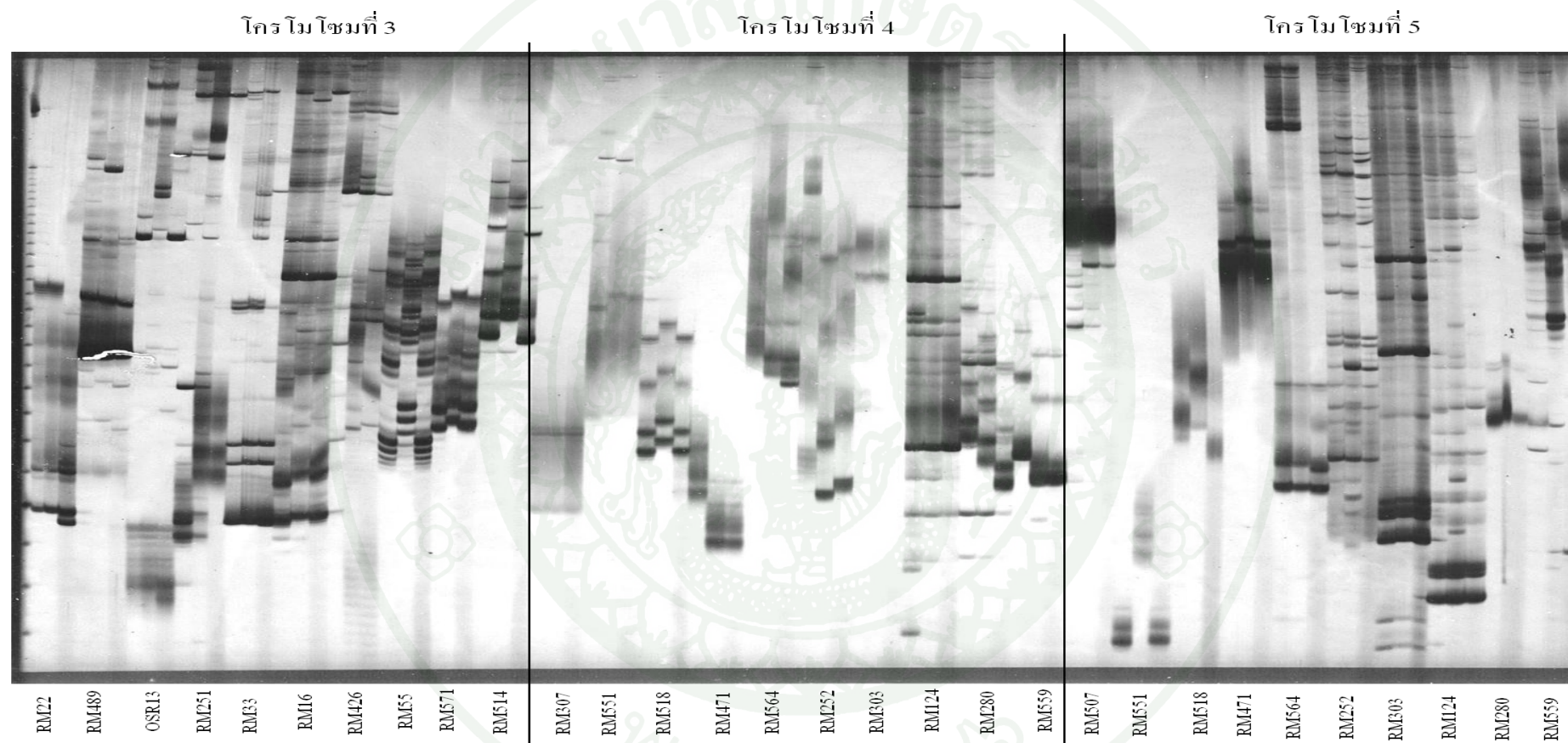


(ข)

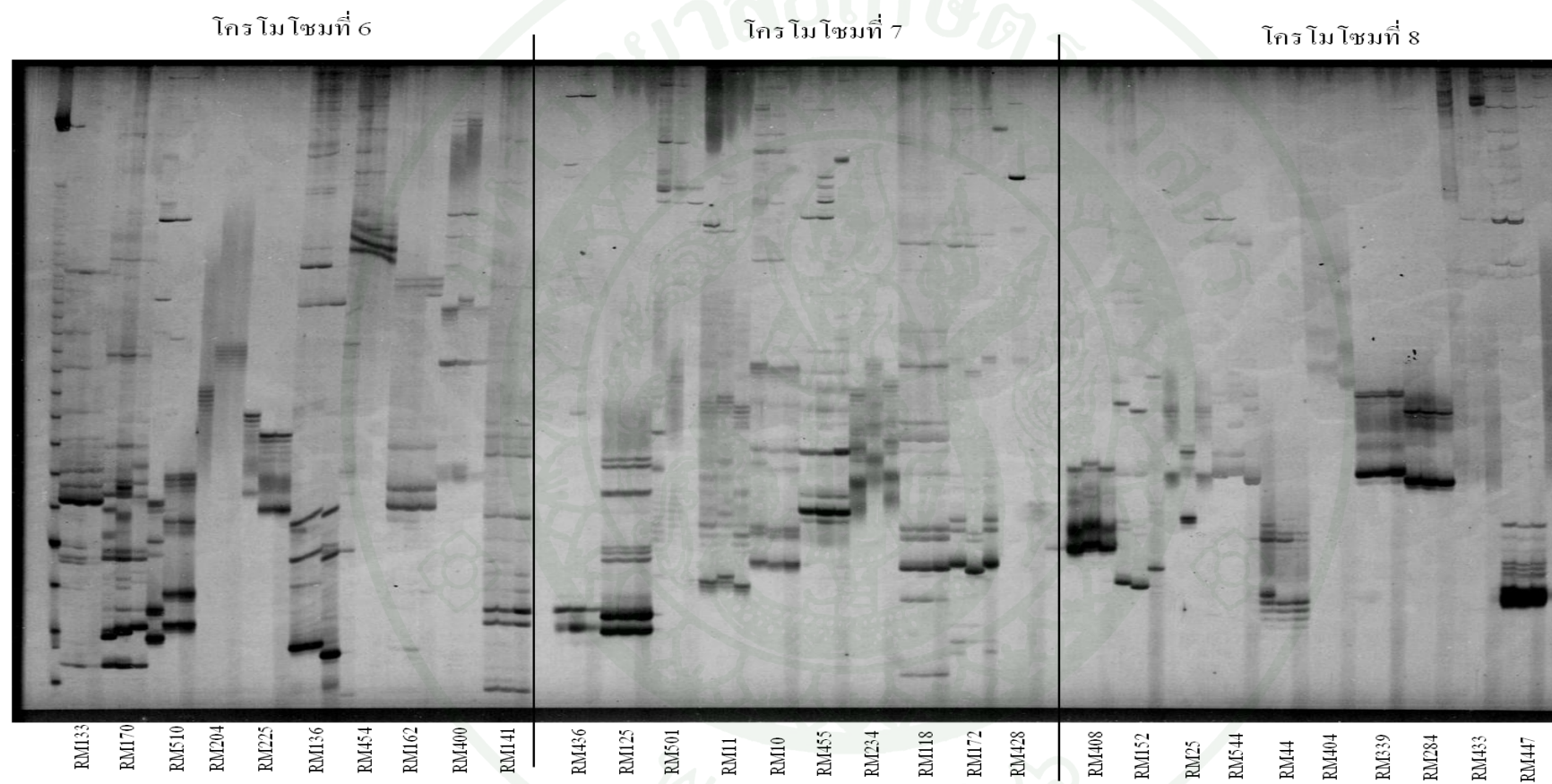
ภาพผนวกที่ ก2 ภาพแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการทดสอบลักษณะความหอม (ก) และปริมาณอะมิโลสตาม ลำดับ โดยใช้เทคนิค SSR ในลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 จำนวน 10 ต้น และเปรียบเทียบกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวเจ้าหอมนิล



ภาพผนวกที่ 3 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ใช้ในการทดลองบนโครโมโซมที่ 1 และ 2

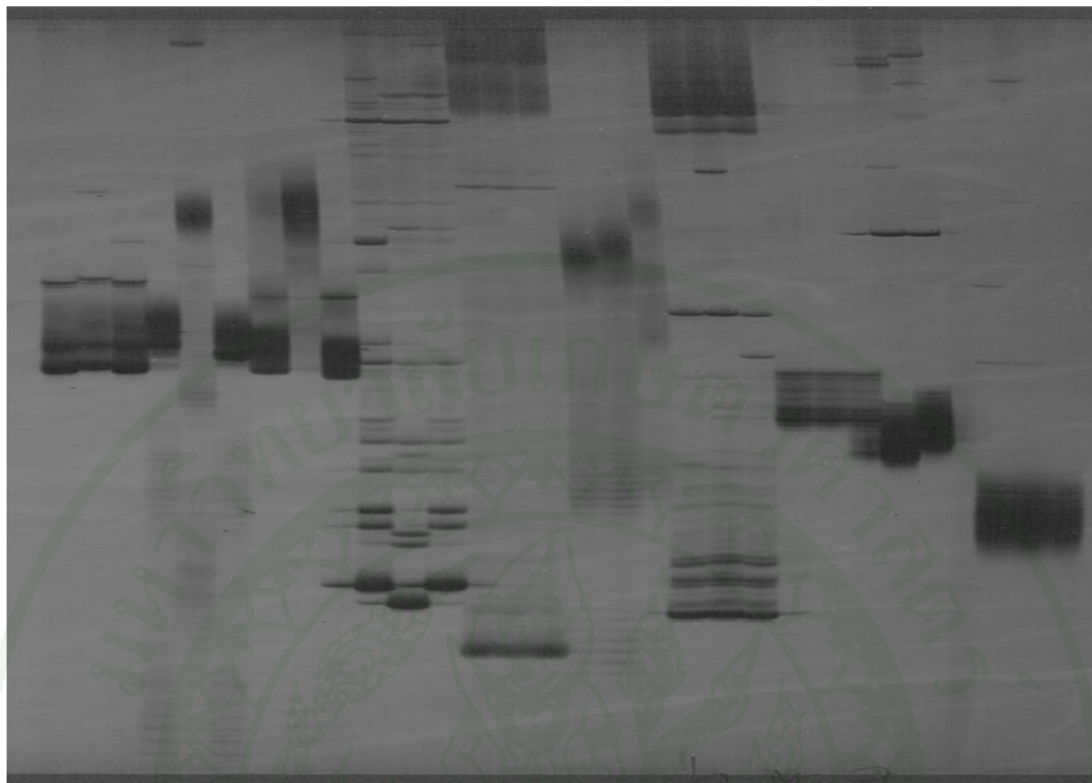


ภาพผนวกที่ ก4 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ใช้ในการทดลองบนโครโมโซมที่ 3 4 และ 5



ภาพผนวกที่ ก5 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ใช้ในการทดลองบนโครโมโซมที่ 6 7 และ 8

โครโมโซมที่ 9



RM316

RM444

RM524

RM105

RM409

RM410

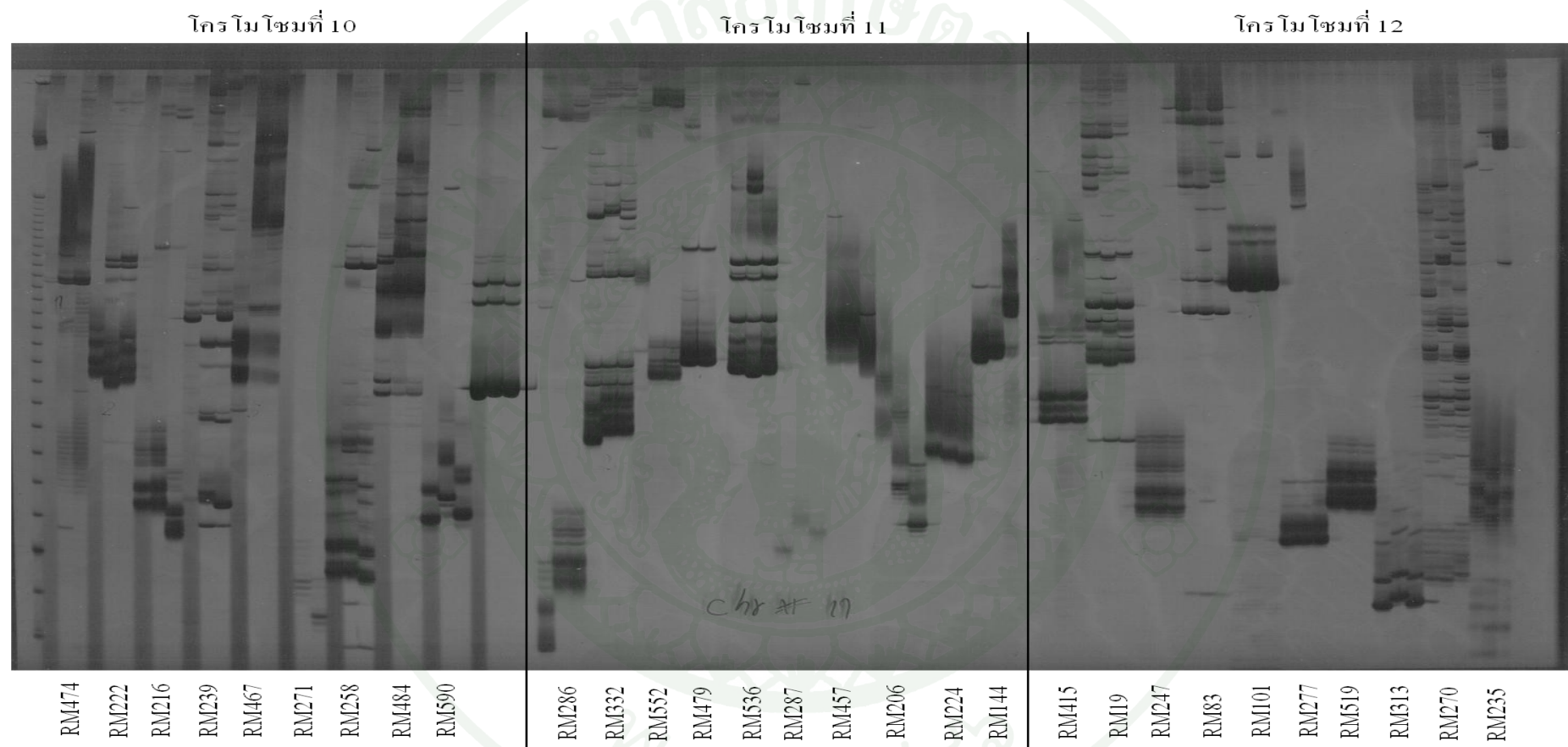
RM288

RM201

RM215

RM205

ภาพผนวกที่ ก6 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ใช้ในการทดลองบนโครโมโซมที่ 9



ภาพผนวกที่ 7 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR ที่ใช้ในการทดลองบนโครโมโซมที่ 10 11 และ 12



ปริมาณสารเคมีที่ใช้และการเตรียมสารเคมีที่จำเป็นในขั้นตอนการทำ PAGE

1. สารละลาย Sequencing stop solution (sequencing dye) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

98 เปอร์เซนต์ฟอร์มามายด์ (formamide)	49	มิลลิลิตร
0.025 เปอร์เซนต์บรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue)	0.0125	กรัม
0.025 ไฮเลนไฮยานอล	0.0125	กรัม
10 มิลลิโมล 0.5 โมล EDTA พีเอช 8.0	1	มิลลิลิตร

ปั่นนาน 30 นาที
2. สารละลายกรดอะซิติก + แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

100 เปอร์เซนต์กรดอะซิติก	250	ไมโครโมล
แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์	475	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น
3. สารละลาย 10 เปอร์เซนต์แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (10% APS) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	3	กรัม
-----------------------	---	------

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 30 มิลลิลิตร
หุ้มด้วยฟรอยด์เก็บไว้ในตู้เย็น
4. สารละลาย 5xTBE ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

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

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

5. สารละลาย 6 เปอร์เซนต์อะคริลาไมด์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
- | | | |
|--------------------------|-----|-----------|
| 40 เปอร์เซนต์อะคริลาไมด์ | 75 | มิลลิลิตร |
| ยูเรีย | 210 | กรัม |
| 5xTBE | 100 | มิลลิลิตร |
- เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
- หุ้มด้วยฟรอยด์เก็บไว้ในตู้เย็น
6. สารละลาย Fixer ปริมาตร 110 มิลลิลิตร
- | | | |
|---------------------------|-----|-----------|
| แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ | 105 | มิลลิลิตร |
| กรดอะซิติก 100 เปอร์เซนต์ | 5 | มิลลิลิตร |
- แช่ตู้เย็นให้ได้อุณหภูมิ 10 - 12 องศาเซลเซียส
7. สารละลาย Silver staining ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร
- | | | |
|-----------------------------|-----|-----------|
| AgNO_3 | 15 | กรัม |
| 37 เปอร์เซนต์ HCOH | 1.5 | มิลลิลิตร |
- เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร
8. สารละลาย Developer ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร
- | | | |
|-----------------------------|-----|-----------|
| NaOH | 1.5 | กรัม |
| 37 เปอร์เซนต์ HCOH | 2 | มิลลิลิตร |
- เติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวเสาวลักษณ์ อัคราช
วัน เดือน ปี	28 กันยายน 2528
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดหนองคาย
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (วิทยาศาสตร์เกษตร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ (ถ้ามี)	สำนักงานพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ที่สนับสนุนค่าใช้จ่ายในการเรียนระดับบัณฑิตศึกษาและการทำงานวิจัย