



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

ปริญญา

พันธุ์วิศวกรรม

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนก่อโรคในเชื้อราโรคไหม้ของข้าว
ในประเทศไทย

Sequence Variation of Avirulence Genes of Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae*
in Thailand

نامผู้วิจัย นายธีระพงศ์ เกษตรสมบูรณ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธานี ศรีวงศ์ชัย, วท.ด.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ พรพวงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนก่อโรคในเชื้อราโรคไหม้ของข้าวในประเทศไทย

Sequence Variation of Avirulence Genes of Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae* in Thailand

โดย

นายธีระพงศ์ เกษตรสมบูรณ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ธีระพงศ์ เกษตรสมบูรณ์ 2555: ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนก่อโรคในเชื้อราโรคไหม้ของข้าวในประเทศไทย ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม)
สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์, Ph.D.
134 หน้า

การเกิดความต้านทานต่อโรคไหม้ในข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *Magnaporthe oryzae* เป็นผลจากการทำงานร่วมกันระหว่างยีนต้านทาน (*R gene*) ในข้าว และยีนก่อโรค (*AVR gene*) ในเชื้อก่อโรค ซึ่งปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นเป็นไปตาม gene-for-gene concept การใช้พันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้เป็นวิธีการป้องกันการเกิดโรคไหม้ที่มีประสิทธิภาพ แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ค่อย ๆ สูญเสียไป อันเนื่องมาจากเชื้อรา มีการเปลี่ยนแปลงจนเกิดเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ๆ ขึ้น วัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้เพื่อศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนก่อโรคในเชื้อราโรคไหม้ *AVR-Pita1* *AVR-Pik* และ *AVR-Pii* ที่มีผลต่อการปรับตัวของสายพันธุ์เชื้อราให้สามารถก่อโรคไหม้ในข้าวได้ และศึกษารูปแบบของการเกิดวิวัฒนาการของยีนก่อโรคในเชื้อราโรคไหม้ ตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ถูกคัดแยกมาจากข้าวปลูกที่แสดงลักษณะอาการของโรคไหม้จากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งได้เก็บรวบรวมไว้เมื่อปี 2549 และปี 2553 จำนวน 78 isolated ตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนก่อโรคเพื่อวิเคราะห์หาความหลากหลายและการทดสอบสมมูลประชากรด้วยโปรแกรม DnaSP 5.0 และศึกษารูปแบบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA 5.0 ผลจากการวิจัยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนก่อโรคในเชื้อราโรคไหม้มีความหลากหลายมากน้อยแตกต่างกันในแต่ละยีนและยังแสดงให้เห็นถึงกลไกในการคัดเลือกรูปแบบทางวิวัฒนาการของตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทย รายละเอียดของการวิเคราะห์ได้อธิบายไว้ในบทความนี้ ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อราโรคไหม้

Teerapong Kasetsomboon 2012: Sequence Variation of Avirulence Genes of Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae* in Thailand. Master of Science (Genetic Engineering),
Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program.
Thesis Advisor: Assistant Professor Chatchawan Jantasuriyarat, Ph.D. 134 pages.

The interaction between rice, *Oryza sativa*, and rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, is triggered by an interaction between the protein products of the host resistant gene, and the pathogen avirulence gene. This interaction follows the idea of 'gene-for-gene concept'. The resistant gene has been effectively protecting rice plant from rice blast infection. However, the resistant genes usually break down several years after the release of the resistant rice varieties because the fungus has evolved to new races. The objective of this study is to investigate the nucleotide sequence variation of the *AVR-Pita1*, *AVR-Pik* and *AVR-Pii* gene that influences the adaption of rice blast fungus to overcome the resistant gene. Seventy eight rice blast fungus isolates were collected in 2549 and 2553 from infected rice plants in northern and northeastern Thailand. The nucleotide sequences of avirulence genes were amplified and analyzed using DnaSP 5. Phylogenetic analysis was conducted with MEGA 5.0 program. The results of this study revealed that the different level of nucleotide sequence polymorphisms and the genetic selection pressure in each *AVR*-gene in rice blast isolates. The details of sequence variation analysis were described in this article. The information from this study can be used for rice blast resistant breeding program in the future.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ ประธาน
กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก สำหรับการช่วยเหลือวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
ตลอดจนให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอขอบคุณ ดร. ธาณี ศรีวงศ์ชัย กรรมการ
ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ขอขอบพระคุณอาจารย์ และเจ้าหน้าที่โครงการสหวิทยาการสาขาพันธุ์วิศวกรรม และ
ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวก
ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนสำเร็จ

ธีระพงศ์ เกษตรสมบูรณ์

สิงหาคม 2555

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	22
ผลและวิจารณ์	40
สรุปและข้อเสนอแนะ	111
สรุป	111
ข้อเสนอแนะ	114
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	115
ภาคผนวก	132
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	134

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

1	การแสดงผลออกร่วมกันระหว่างยีนก่อโรคและยีนต้านทานตาม “gene-for-gene” concept	13
2	ยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวที่โคลนแล้ว	19
3	รายละเอียดตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ปี 2553	22
4	รายละเอียดตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ปี 2549	25
5	ลำดับเบสจาก 5’-3’ จำนวนนิวคลีโอไทด์ อุณหภูมิหลอมละลาย (T_m) และขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ	33
6	องค์ประกอบ PCR	35
7	ยีนก่อโรคและยีนต้านทานโรคไหม้ที่มีปฏิสัมพันธ์กันและก่อให้เกิดความต้านทาน	40
8	ค่าการทดสอบสมมูลประชากร (Neutrality test) ของยีน <i>AVR-Pita1</i>	61
9	ค่าการทดสอบสมมูลประชากร (Neutrality test) ของยีน <i>AVR-Pik</i>	83
10	องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ในยีนก่อโรคทั้ง 3 ชนิด	93
11	Haplotype ของเชื้อราโรคไหม้เมื่อเปรียบเทียบโดยใช้ความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโน <i>AVR-Pii</i>	101

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ภาพวาดลักษณะของเชื้อรา <i>M. oryzae</i> สาเหตุโรคไหม้ในข้าว	5
2 ลักษณะอาการของโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา <i>M. oryza</i>	6
3 วงจรการเข้าทำลายและการสร้างส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อ <i>M. oryza</i> สาเหตุของโรคไหม้	9
4 อธิบายกลไกการทำงานและการเกิดวิวัฒนาการร่วมกันของยีนต้านทานและยีนก่อโรคด้วย Zigzag model	17
5 ขั้นตอนการแยกเชื้อแบบสปอร์เดี่ยว	30
6 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อราให้มีการสร้างเส้นใย	31
7 แสดงตำแหน่งจับของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในยีนก่อโรคต่างๆ	34
8 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเชื้อราโรคไหม้ที่รวบรวมมาจากรปี 2549	41
9 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเชื้อราโรคไหม้ที่รวบรวมมาจากรปี 2553	42
10 ผลการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน <i>AVR-Pita1</i> โดยอ้างอิงจากรลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>AVR-Pita1</i> จากเชื้อราโรคไหม้ isolate O-137	46
11 haplotype ของเชื้อราโรคไหม้แต่ละ isolate และตำแหน่งที่มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันของยีน <i>AVR-Pita1</i>	59
12 Sliding window ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน <i>AVR-Pita1</i>	61
13 ค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคไหม้แต่ละตัวอย่างโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>AVR-Pita1</i>	64
14 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากวิธี NJ โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>AVR-Pita1</i>	67
15 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากวิธี MP โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>AVR-Pita1</i>	68
16 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากวิธี ML โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>AVR-Pita1</i>	69

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	ผลการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน <i>AVR-Pik</i> โดยอ้างอิงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>AVR-Pik</i> จากเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ Ina86	71
18	sliding window ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน <i>AVR-Pik</i>	83
19	ค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคไหม้แต่ละตัวอย่างโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>AVR-Pik</i>	86
20	สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากวิธี NJ โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>AVR-Pik</i>	90
21	สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากวิธี MP โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>AVR-Pik</i>	91
22	สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากวิธี ML โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>AVR-Pik</i>	92
23	ผลการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>AVR-Pii</i> โดยอ้างอิงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>AVR-Pii</i> จากเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ Ina168	94
24	ผลการ alignment ลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>AVR-Pii</i>	101
25	ค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคไหม้แต่ละตัวอย่างโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>AVR-Pii</i>	104
26	สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากวิธี NJ โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>AVR-Pii</i>	108
27	สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากวิธี MP โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>AVR-Pii</i>	109
28	สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากวิธี ML โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>AVR-Pii</i>	110

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

bp	=	base pair
CTAB	=	cetyltrimethylammonium bromide
DNA	=	deoxyribonucleic acid
DNase	=	deoxyribonuclease
dNTP	=	deoxynucleotide triphosphate
EDTA	=	ethylene diamine tetraacetic acid
EtBr	=	ethidium bromide
HCl	=	hydrochloric
kb	=	kilobasepair (1,000 base pair)
KCl	=	potassium chloride
M	=	molar
mg	=	milligram
MgCl ₂	=	magnesium chloride
mM	=	millimolar
NaCl	=	sodium chloride
ng	=	nanogram
PCR	=	polymerase chain reaction
RNase	=	ribonuclease
<i>Taq</i>	=	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	=	Tris-Borate-EDTA
TE	=	Tris-EDTA buffer
T _m	=	melting temperature
Tris	=	2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
UV	=	ultraviolet
μg	=	microgram
μl	=	microliter
μM	=	micromolar

ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนก่อโรค ในเชื้อราโรคไหม้ของข้าวในประเทศไทย

Sequence Variation of Avirulence Genes of Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae* in Thailand

คำนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากประชากรมากกว่าครึ่งหนึ่งของโลกบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก ในประเทศไทยข้าวเป็นสินค้าส่งออกหลักที่สำคัญและทำรายได้หลักเป็นอันดับหนึ่ง โดยในปี พ.ศ. 2552 มีปริมาณส่งออกมากถึง 8.5-9 ล้านตัน (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์) แต่ผลผลิตที่ได้ถูกจำกัดด้วยอิทธิพลจากโรคต่าง ๆ อันเนื่องมาจากปัญหาการเข้าทำลายของศัตรูพืชหลายชนิดทั้งที่เกิดจากเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และแมลง โรคข้าวที่สำคัญที่มีผลกระทบกับเศรษฐกิจได้แก่ โรคไหม้ โรคขอบใบแห้งและโรคใบจุดสีน้ำตาล โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคไหม้ของข้าว เนื่องจากเชื้อราสาเหตุโรคนี้นี้สามารถเข้าทำลายข้าวได้ในทุกระยะของการเจริญเติบโต ตั้งแต่ระยะต้นกล้าไปจนถึงระยะเก็บเกี่ยว ประเมินค่าได้ว่าข้าวที่เหลือจากการเข้าทำลายจากโรคไหม้ข้าวในแต่ละปีสามารถเลี้ยงประชากรได้ถึง 60 ล้านคน (Dean, 2005) เป็นผลทำให้ประเทศชาติต้องสูญเสียรายได้หลายร้อยล้านบาทต่อปี

โรคไหม้ในข้าว (rice blast) ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Magnaporthe oryzae* โรคนี้นี้สามารถแพร่ระบาดในทุกพื้นที่ของการเพาะปลูกข้าวอย่างกว้างขวางและรุนแรงมาก ส่งผลกระทบอย่างมากต่อผลผลิตข้าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะใบ (leaf blast) ทำให้การสังเคราะห์แสงมีประสิทธิภาพลดลง มีผลให้ข้าวชะงักการเจริญเติบโตจนในบางครั้งก็ทำให้ต้นข้าวตายได้ และในระยะคอรวง (neck blast) จะทำให้คอรวงหักและเมล็ดลีบหมด เชื้อรา *M. oryzae* ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคไหม้ของข้าวนี้มีหลายสายพันธุ์ (race) แต่ละสายพันธุ์มีระดับความรุนแรงในการทำให้ข้าวเกิดโรคแตกต่างกัน โดยปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมให้เกิดการระบาดของโรคนี้นี้ ได้แก่ สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา มีความชื้นสัมพัทธ์สูง การให้น้ำในโตรเจนในอัตราสูง และการปลูกพันธุ์ข้าวที่ไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ เช่น ข้าวพันธุ์ กข 6 และ กข 23 โดยเฉพาะข้าวหอมพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 นั้นอ่อนแอต่อโรคนี้นี้อย่างมาก ในปี พ.ศ. 2535 เกิดการระบาดของโรคไหม้คอรวงอย่างรุนแรงใน

เขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ทำความเสียหายแก่พื้นที่ปลูกข้าวนับล้านไร่ ทั้งนี้เนื่องจากสภาพอากาศเย็นและฝนตกติดต่อกันหลายวัน ทำให้เหมาะสมกับการเกิดโรคและเอื้อต่อการแพร่ระบาดของเชื้อได้เป็นอย่างดี (Disthaporn, 1994) จึงทำให้การปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานต่อโรคไหม้ที่ผ่านมาประสบปัญหาเป็นอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อสาเหตุของโรคมีความหลากหลายสูง

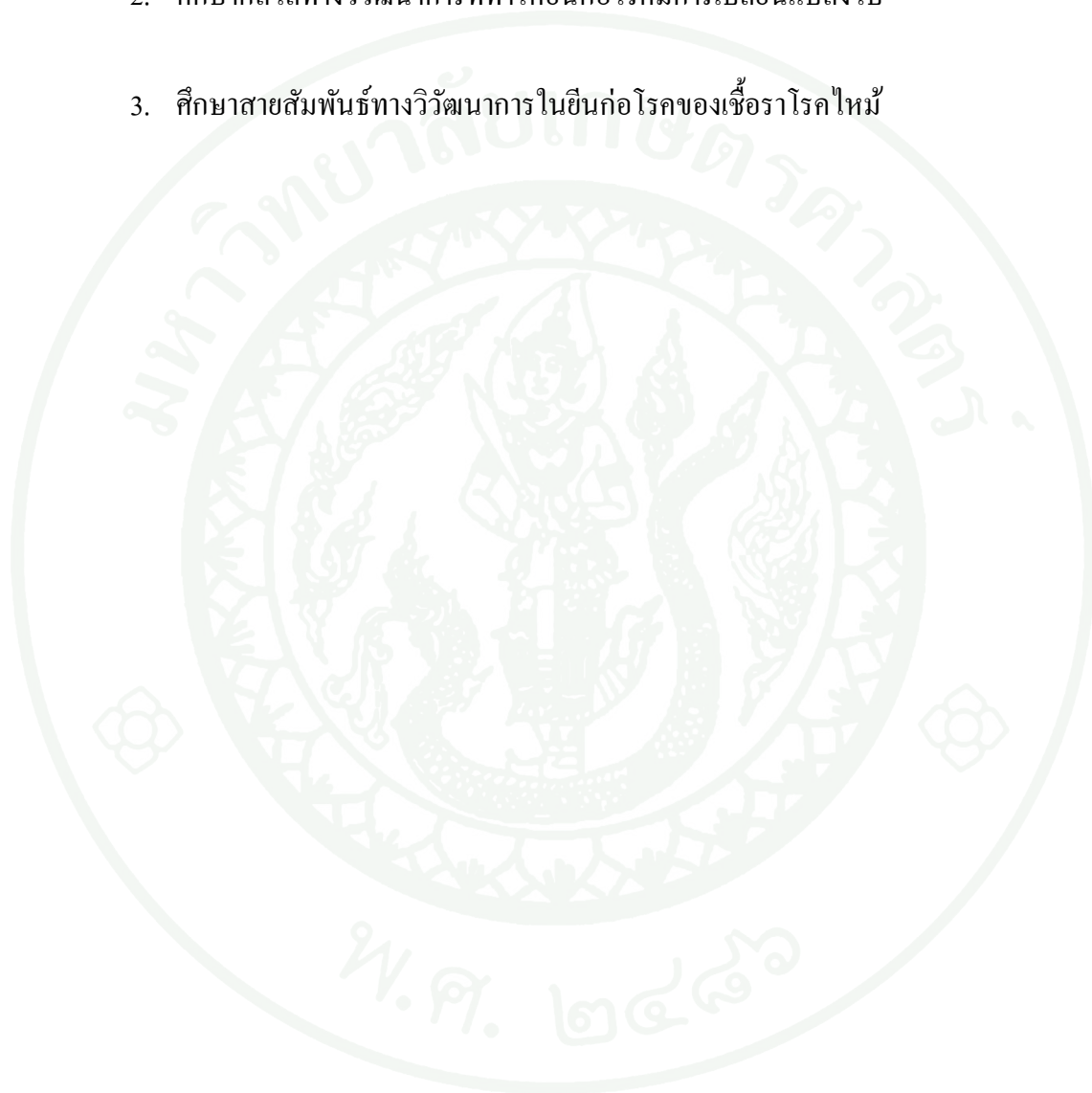
เชื้อราชนิดนี้มีความแปรปรวนของสายพันธุ์มากอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงไปของยีนก่อโรค (avirulence gene) ในเชื้อสาเหตุ ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในเวลาไม่กี่ชั่วอายุ *AVR* gene คือยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการก่อให้เกิดโรคโดยจะมีการแสดงออกเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ที่ใช้ในขบวนการเกิดโรคและถูกส่งผ่านเข้าไปภายในเซลล์พืช เมื่อเชื้อราโรคไหม้เข้าโจมตีข้าวที่มียีนต้านทาน (resistance gene) ต่อโรคไหม้ ยีนต้านทานจะมีการแสดงออกเพื่อสร้างโปรตีน receptor ที่มีคุณสมบัติสามารถตรวจจับโปรตีน *AVR* และกระตุ้นให้พืชเกิดขบวนการต้านทาน ซึ่งปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นเป็นไปตาม gene-for-gene concept ดังนั้นการใช้พันธุ์ข้าวต้านทานจึงเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันต่อการเกิดโรคไหม้ แต่เมื่อเวลาผ่านไปความสามารถในการต้านทานค่อย ๆ สูญเสียไป เนื่องจากเชื้อราโรคไหม้มีวิวัฒนาการจนเกิดสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้

ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีทางอนุพันธุศาสตร์มาใช้ในการจัดจำแนกยีนต้านทานเพื่อศึกษาโครงสร้าง หน้าที่ และวิวัฒนาการ เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้ และได้มีการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราโรคไหม้และเผยแพร่เป็นข้อมูลสาธารณะ โดยสามารถสืบค้นได้จากเว็บไซต์ www.broad.mit.edu/annotation/fungi/magnaporthe ซึ่งเป็นความร่วมมือกันระหว่าง International Rice Blast Genome Project กับ Center for Genome Research

ดังนั้นความเข้าใจเกี่ยวกับขบวนการเข้าโจมตีของเชื้อราโรคไหม้ *Magnaporthe oryzae* ต่อข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ ในระดับโมเลกุล ถือเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งต่อความเข้าใจในขบวนการเกิดวิวัฒนาการของเชื้อราโรคไหม้จนสามารถเข้าทำลายสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานอยู่ได้ ตลอดจนเป็นข้อมูลในการคาดคะเนความเป็นไปได้ของการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนก่อโรคที่มีผลต่อความสามารถในการก่อให้เกิดโรคและเป็นข้อมูลเพื่อให้เข้าใจในปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัยและเชื้อสาเหตุโรคพืชมากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาการเกิดการกลายพันธุ์ในยีนก่อโรคของเชื้อราโรคไหม้
2. ศึกษากลไกทางวิวัฒนาการที่ทำให้ยีนก่อโรคมีการเปลี่ยนแปลงไป
3. ศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในยีนก่อโรคของเชื้อราโรคไหม้



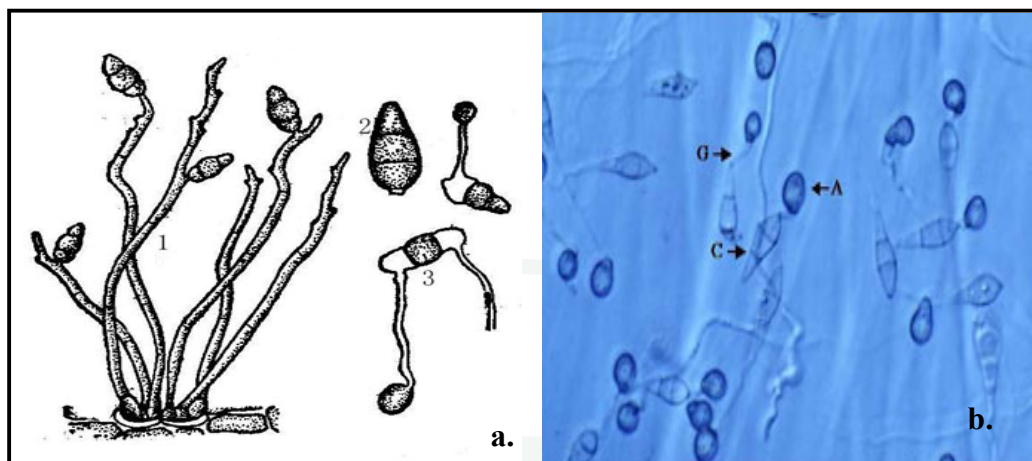
การตรวจเอกสาร

1. เชื้อสาเหตุโรคไหม้ในข้าว *Magnaporthe oryzae*

เชื้อรา *Magnaporthe oryzae* (anamorph : *Pyricularia oryzae*) อยู่ในกลุ่มของเชื้อราแอสโคไมซีต มีจีโนมขนาดประมาณ 40 เมกกะเบส มีจำนวนโครโมโซม 7 แท่ง (Dean *et al.*, 2005) โรคนี้จะทำความเสียหายทั่วทุกแห่งในบริเวณที่มีการเพาะปลูกข้าว มีกระบาดและเข้าทำลายข้าวทั้งในระยะกล้า แดกกอและออกรวง การเกิดและการแพร่ระบาดของโรคจะรุนแรงถ้าสภาพแวดล้อมเหมาะสม (อุณหภูมิ 24-32 °C ความชื้นในอากาศ 95% ขึ้นไป) เนื่องจากเชื้อราสาเหตุโรคไหม้มีหลายสายพันธุ์ (race) ดังนั้นจึงมีความสามารถในการเข้าทำลายพันธุ์ข้าวแตกต่างกัน ในพันธุ์ข้าวต้านทานจะสามารถต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ได้ แต่ความสามารถในการต้านทานของพันธุ์ข้าวจะสูญเสียไปเนื่องจากเชื้อราชนิดนี้สามารถสร้างเชื้อสายใหม่ ๆ ที่มีความรุนแรงในการเข้าทำลายและทำลายข้าวพันธุ์ต้านทานนั้น ๆ ได้ (Zeigler *et al.*, 1998)

ในประเทศไทยตามรายงานของแผนกโรคพืชวิทยา กองพืชพรรณ กรมกสิกรรม ยืนยันว่าพบโรคไหม้ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2496 ซึ่งเกิดกับข้าวพันธุ์เศรษฐี ที่สถานีทดลองเกษตรกลาง บางเขน และบริเวณมวกะสัน พระโขนง ซึ่งชาวบ้านเรียกว่าโรคตายพราย โรคไหม้นี้เป็นโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจเนื่องจากสามารถแพร่กระจายไปได้ทั่วทุกบริเวณที่มีการปลูกข้าวและยังมีพืชอาศัยที่กว้าง (Scardaci *et al.*, 2003)

เชื้อรามีการสร้างโคนิเดียบนโคนิดิโอฟอร์ (ภาพที่ 1) โดยที่เชื้อจะสร้างสปอร์เป็นกลุ่มบนเนื้อเยื่อพืชและโคนิดิโอฟอร์มีผนังกัน มีการสร้างโคนิเดีย จำนวน 1-20 โคนิเดียต่อโคนิดิโอฟอร์ และโคนิเดียมีรูปร่างลักษณะไม่แน่นอน อาจเป็นแบบ pyriform หรือ obclevate ปลายยอดของโคนิเดียแหลม (tapering) มี 3 เซลล์บางครั้งตรงผนังกันเซลล์ (septate) อาจจะเว้า (constricted) เล็กน้อย ซึ่งมีลักษณะใสไม่มีสี (hyaline) มีขนาดตั้งแต่ 8.1-10.3 X 19.2-27.3 ไมครอน (Ou, 1973) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 a. ภาพวาดลักษณะของเชื้อรา *M. oryzae* ที่มี (1) โคนิไดโอฟอร์ (2) โคนิเดียมที่มีรูปร่างเป็น pyriform และ (3) appressorium b. ลักษณะของ (A) appressorium (C) โคนิเดียม และ (G) germ tube ที่ย้อมสี cotton blue ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์ (x40)

ที่มา: Mehrotra, 2003

2. ลักษณะอาการของโรคไหม้

โรคนี้สามารถแพร่ระบาดในทุกพื้นที่ของการเพาะปลูกข้าว ลักษณะอาการเริ่มแรกคล้ายกันในระยะกล้าและระยะแตกกอ โดยเริ่มแรกมีแผลขนาดเล็กเป็นจุดกลมสีเทา ลักษณะเป็นจุดฉ่ำน้ำบนใบ ต่อมาแผลจะขยายใหญ่ขึ้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ลักษณะรูปร่างคล้ายตา แผลเกิดขึ้นตามความยาวของใบข้าว ปลายแผลทั้งสองด้านแหลม บริเวณตรงกลางแผลมีสีเทาหรือขาว ขอบแผลมีสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลแดง รูปร่างของแผลไม่แน่นอน แผลมีขนาดแตกต่างกันไปตามความต้านทานของสายพันธุ์ข้าว (ภาพที่ 2) ซึ่งมีความกว้างอยู่ระหว่าง 3-5 มิลลิเมตร และความยาว 10-15 มิลลิเมตร โดยถ้าแผลมีลักษณะเป็นจุดขนาดเล็กจัดเป็นพันธุ์ต้านทาน ส่วนแผลขนาดใหญ่หรือรูปตาจัดเป็นพันธุ์อ่อนแอ ถ้าสภาพแวดล้อมเอื้อต่อการพัฒนาของโรค แผลจะขยายลุกลามจนทั่วบริเวณใบ ในกรณีที่โรครุนแรงต้นกล้าจะแห้งและตาย มีอาการคล้ายถูกไฟไหม้ (blast) สำหรับโรคไหม้ที่ตรงข้อต่อใบ กาบใบ หรือคอรวง อาการจะเหมือนกับในระยะกล้า แต่แผลจุดสีน้ำตาลจะใหญ่ขึ้น และขอบแผลจะเป็นสีน้ำตาลเข้มบริเวณข้อต่อ ใบจะเป็นสีน้ำตาลดำและใบจะหลุดออกจากกาบใบ

ในที่สุด ส่วนในระยะคอรวงทำให้เกิดแผลสีน้ำตาล เรียกอาการของโรคที่เข้าทำลายในระยะนี้ว่า “ไหม้คอรวง” (neck blast neck rot หรือ rotten neck) เมื่อเชื้อนี้เข้าทำลายในระยะเริ่มให้รวงจะทำลายทุกส่วนของรวงข้าว การเข้าทำลายในระยะนี้จะทำให้เมล็ดลีบหมดเห็นเป็นสีขาว แต่ถ้าเชื้อราเข้าทำลายตอนรวงข้าวแก่ใกล้เก็บเกี่ยวทำให้เมล็ดข้าวสูญเสียความงอก คอรวงปรากฏรอยแผลสีน้ำตาลทำให้เปราะหักพับง่าย และเมล็ดข้าวร่วงหล่นเสียหาย (สมคิด, 2532)

ลักษณะแผลแบ่งออกเป็น 3 บริเวณ คือบริเวณรอบนอกสุดจะมีสีเหลือง (venerate zone) เป็นบริเวณที่เชื้อราปล่อยสารพิษ (toxin) ออกมา บริเวณที่สองถัดมามีสีน้ำตาล (necrotic zone) ส่วนบริเวณกลางแผลมีขนาดใหญ่ที่สุดจะเห็นแผลตรงกลางสีเทาบางหรือบางครั้งจะใสและลักษณะแผลจะชำ (disintegrated zone) (Ou, 1985)



ภาพที่ 2 ลักษณะอาการของโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *M. oryza* สามารถเข้าทำลายต้นข้าวเกิดความเสียหายทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ (a) ระยะกล้าที่ฟุบตายหมด (b) Leaf blast แผลบนใบมีลักษณะเป็นรูปตามความยาวของใบ (c) Collar blast แผลบริเวณกาบใบ และ (d) Neck blast ทำให้เกิดโรคไหม้คอรวง

ที่มา: Mehrotra, 2003

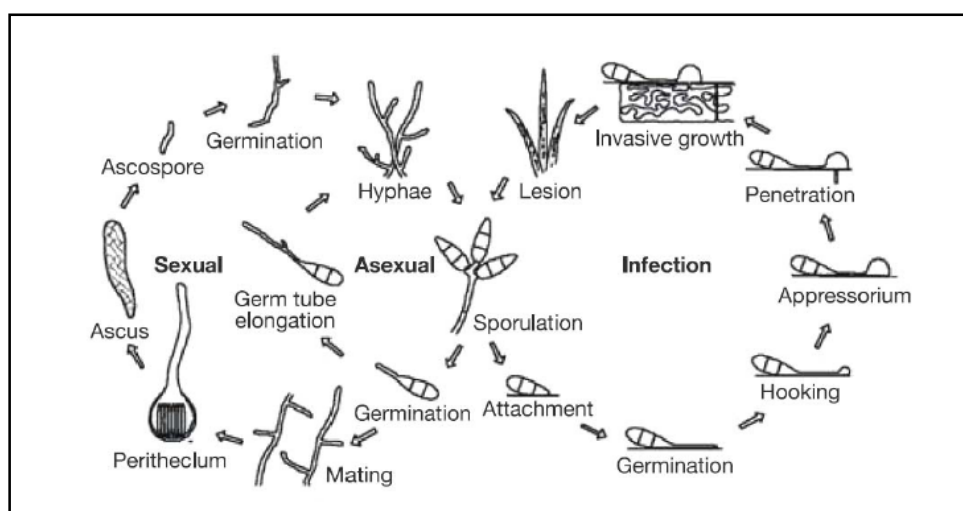
3. วงจรการเข้าทำลายและการระบาดของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

การแพร่กระจายของโรคนี้เชื้อสาเหตุสามารถติดไปกับเมล็ด ใบ ขอบปล้อง ช่อดอก และต้นข้าว (Sesma and Osbourn, 2004) แพร่กระจายตามดิน น้ำ ลม และเศษฟางข้าว การเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคนี้ในระยะแรกจะเกิดขึ้นหลังจากโคนิเดียสัมผัสกับผิวพืชโดยใช้ส่วนที่เรียกว่า “spore tip mucilage” ซึ่งอยู่บริเวณปลายสุดของโคนิเดีย โดยมีน้ำที่ให้ความชื้นอย่างเพียงพอต่อการกระตุ้นให้เกิดการงอกและพบว่าการงอกของโคนิเดียจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วโดยจะเกิดขึ้นภายในชั่วโมงแรกของการที่เชื้อเข้าสัมผัสกับพืช (Kang *et al.*, 2000) จากนั้นเชื้อจะสร้าง infection tube โดยใช้ appressorium แทะผ่านเนื้อเยื่อพืชชั้นคิวติเคิลและอีพิเดอร์มิส โดยการเข้าทำลายของเส้นใยเชื้อราเข้าไปในเซลล์พืชโดยผ่านทางปากใบ เนื่องจากใบข้าวถูกหุ้มด้วยชั้นคิวติเคิล เมื่อโคนิเดียสัมผัสบนผิวพืชจะงอกหลอดละอองเรณู ภายในเวลา 4 ชั่วโมงซึ่งมีลักษณะเป็นตะขอตงปลาย (germ-tube tip hook) และมีการบวมขึ้นเพื่อสร้างเป็น appressorium (Howard, 1994) ในระหว่างการพัฒนาของ appressorium จะมีการสะสมเม็ดสีเพิ่มมากขึ้นตรงบริเวณผนังเซลล์ที่อยู่ตรงรูระหว่าง appressorium กับใบข้าว จากนั้นเส้นใยเชื้อราจะทะลุเข้าไปยังเซลล์พืช โดยใช้แรงดันต่ง (turgor pressure) ขับเคลื่อนให้ penetration peg แทะเข้าไปในผิวพืช (Howard and Valent, 1996) เส้นใยของเชื้อราสามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วทั่วใบข้าวโดยใช้เวลาประมาณ 72 ชั่วโมง หลังการปลูกเชื้อ พบว่าส่วนประกอบของเชื้อราเป็น 10% ของมวลรวม (biomass) ใบพืชที่ถูกทำลาย (Talbot *et al.*, 1996) ลักษณะอาการในระยะนี้สามารถเห็นชัดและเริ่มเกิดแผลรูปไข่ขนาดเล็กและมีลักษณะเหลืองซีด (chlorosis) ต่อมาแผลลุกลามเชื่อมต่อกันเป็นแผลเนื้อเยื่อตาย (necrosis) ในที่สุด

ส่วนการแพร่ระบาดของเชื้อรา *M. oryzae* จัดเป็นพวก air borne โคนิเดียสามารถแพร่กระจายไปตามกระแสลมได้ในระยะไกล ๆ และสามารถปลิวขึ้นไปถึงสูงถึง 7,000 ฟุต (ชาตรี, 2540) โคนิเดียที่เข้าทำลายต้นข้าวในระยะแรกเรียกว่า primary inoculum นอกจากนี้เชื้อรายังสามารถอยู่ข้ามฤดูหนึ่งไปยังฤดูถัดไปได้บนพืชที่เป็นโรคและวัชพืชบางอย่างสามารถเป็น alternate host ได้ดีและเมล็ดข้าวที่ตกหล่นในลักษณะเส้นใยติดไปกับเมล็ด (seed borne) หรืออาจจะตกค้างอยู่กับเศษซากพืช (debris borne) ได้แก่ ฟางข้าวและตอซัง อีกทั้งยังพบว่าเชื้อรานี้สามารถเข้าทำลายพืชตระกูลหญ้าชนิดต่าง ๆ ได้อย่างน้อย 50 ชนิดและพืชเศรษฐกิจอื่น ๆ ได้แก่ ข้าว ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลีและข้าวฟ่าง (Zeigler, 1998) เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อเชื้อที่ฟักตัวอยู่จึงเจริญเติบโตเป็น secondary inoculum เข้าทำลายพืชอาศัยต่อไป ด้วยเหตุนี้เองจึงทำให้การแพร่ระบาดของโรคไหม้ในข้าวรุนแรงและต่อเนื่องตลอดทั้งปี

วัฏจักรของโรคเริ่มเกิดขึ้นเมื่อโคนิเดียเข้าทำลาย ทำให้เกิดแผลบนต้นข้าวและสิ้นสุดลงเมื่อเชื้อราสร้างโคนิเดียและโคนิเดียแพร่กระจายไป หากมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมวัฏจักรของโรค 1 รอบอาจใช้เวลาเพียง 1 สัปดาห์เท่านั้น สามารถเกิด infection ได้หลายครั้งและจะมีโคนิเดียจำนวนมาก เมื่อหมดฤดูปลูกแหล่งเชื้อจำนวนมากนี้สามารถเข้าทำลายข้าวได้อย่างรุนแรง (ภาพที่ 3) โรคไหม้อาจจะเจริญได้หลายระยะของต้นข้าว เริ่มจากใบไหม้และตามด้วยโรคไหม้คอรวง อาการใบไหม้มักจะเพิ่มมากขึ้นในช่วงต้นฤดูจากนั้นก็ลดลง ขณะที่ใบข้าวจะอ่อนแอน้อยลง สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคไหม้ในข้าวมีความชื้นอยู่ในช่วงระยะเวลาที่ยาวนาน ความชื้นสัมพัทธ์สูง มีลมไม่มากในเวลากลางคืน อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 22-28 °C ใบที่เปียกน้ำค้างมีส่วนช่วยให้เกิดการเข้าทำลายได้ดีขึ้น การสร้างโคนิเดียและปลดปล่อยโคนิเดียเกิดภายใต้ความชื้นสัมพัทธ์สูงและจะไม่สร้างโคนิเดีย หากความชื้นสัมพัทธ์ต่ำกว่า 89% และมีการสร้างโคนิเดียเพิ่มขึ้นเมื่อความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 93% และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกของโคนิเดียและการเกิดแผลคือ 28 °C

นอกจากนี้ปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมการเกิดโรคไหม้นั้น จะเกิดขึ้นได้ดีในสภาพดินที่แห้งแล้ง การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนอัตราสูงมากเกินไปเพื่อเร่งการเจริญเติบโตของต้นข้าว ยังส่งเสริมให้สภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการระบาดของโรคมากยิ่งขึ้น เนื่องจากต้นข้าวที่ได้รับไนโตรเจนมากเกินไปจะพบว่ามีธาตุซิลิกาในเซลล์ชั้นอีพิเดอร์มิสต่ำ เป็นสาเหตุที่ทำให้ความแข็งแรงของเซลล์พืชลดลง เชื้อราจึงสามารถเข้าทำลายได้ง่าย (Wakimoto and Yoshii, 1958) นอกจากนี้ Matsuyama (1975) รายงานว่า การใช้ปุ๋ยไนโตรเจนจะไปลดปริมาณสารเฮมิเซลลูโลสและลิกนินในผนังเซลล์ทำให้กลไกความต้านทานต่อโรคไหม้ลดลง เนื่องจากดินที่มีไนโตรเจนและไนโตรเจนในปริมาณสูงจะทำให้ต้นข้าวอ่อนแอมากขึ้น แอมโมเนียมจะเปลี่ยนรูปเป็นไนเตรทเมื่อระบายน้ำออกจากพื้นที่ปลูกและมีอากาศในดิน จึงช่วยอธิบายได้ว่าทำไมข้าวจึงอ่อนแอในพื้นที่ที่น้ำไม่ท่วมหรือสภาพแห้งแล้งและในแปลงนาที่มีการปลูกข้าวหนาแน่นเกินไปทำให้เกิดสภาพ microclimate ซึ่งส่งเสริมต่อการเกิดโรคมมากขึ้น



ภาพที่ 3 วงจรการเข้าทำลายและการสร้างส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อ *M. oryzae* สาเหตุของโรคไหม้

ที่มา: Dean *et al.*, 2005

4. สารพิษของเชื้อรา *Magnaporthe oryzae* และบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค

สารพิษที่สร้างโดยเชื้อรา *Magnaporthe oryzae* ได้แก่ piricularin (Tamari และ Kaji, 1954) picolinic acid และ tenuazonic acid (Narayana and Suryanarayanan, 1974) โดย piricularin มีผลทำให้เกิดอาการจุดสีน้ำตาล (necrosis) คล้ายคลึงกับลักษณะอาการของโรคไหม้และยับยั้งการเจริญของต้นกล้าข้าว (Tamari and Kaji, 1954) จากการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคพบว่า สารพิษ tenuazonic acid ที่ถูกสร้างขึ้นมาโดยเชื้อ *M. oryzae* จะยับยั้งการเจริญของยอดและรากของต้นข้าว โดยไปรบกวนกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนที่ระดับไรโบโซม จากการทดสอบสารพิษ 3 ชนิดได้แก่ piricularin picolinic acid และ tenuazonic acid บนใบข้าวพบว่า ขนาดของแผลจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารพิษเพิ่มขึ้น และไม่สามารถตรวจสอบสารพิษเหล่านี้จากสารละลายสปอร์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่า สปอร์ของเชื้อที่ปล่อยออกมาใหม่จะผลิตสารพิษชนิดใหม่ขึ้นมาอีก (Arase *et al.*, 1990) นอกจากนั้นสารเหล่านี้ยังสามารถระงับการงอกของโคนเดียวของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้อีกด้วย Ouyang และคณะ (1987) ใช้สปอร์และสารพิษของเชื้อรา *M. oryzae* ทดสอบกับต้นกล้าข้าวเพื่อชักนำให้ต้นกล้ามีความสามารถในการต้านทานต่อโรค พบว่าต้นกล้าจะมีความต้านทานต่อเชื้อมากขึ้นสามารถตรวจพบสารพิษที่สะสมในต้นกล้าเหล่านี้โดยใช้ปฏิกิริยา phenylalanine

amoniolyase นอกจากนี้ยังพบว่าสาร phenolics ที่พบในต้นข้าวซึ่งประกอบด้วย chlorogenic acid และ ferulic acid สามารถลดความเป็นพิษ (detoxification) ของสาร picrocarin ได้ (Mehrotra, 2003) อย่างไรก็ตาม วัชร (2534) รายงานว่าสาร picrocarin ที่เชื้อราสาเหตุโรคไหม้สร้างขึ้นนั้น ถ้าความเข้มข้นค่อนข้างต่ำจะมีผลเร่งการเจริญเติบโตและเพิ่มอัตราการหายใจในพืช แต่ถ้าความเข้มข้นอยู่ในระดับสูงจะมีผลทำให้การเจริญเติบโตและอัตราการหายใจช้าหรือหยุดชะงักลง วาสนา (2544) ได้ศึกษาผลของสารพิษของเชื้อรานี้จำนวน 118 ตัวอย่างโดยใช้ CET (crude extract toxins) ในการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพันธุ์ข้าวทดสอบ 34 สายพันธุ์ พบว่าให้ผล เช่นเดียวกับการปลูกเชื้อด้วยโคนิเดียของเชื้อรา

5. ความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

การศึกษาความผันแปรของยีนก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ของข้าวได้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย สาเหตุที่ทำให้เชื้อราสาเหตุโรคไหม้เกิดความผันแปรขึ้นได้ในสภาพธรรมชาตินั้น เนื่องจาก

จากผลการวิจัยของ Suzuki ในปี ค.ศ. 1965 และ 1967 ได้รายงานว่า conidia appressorium และ mycelial cell ของเชื้อราโรคไหม้ มีลักษณะเป็น heterokaryotic ซึ่งการรวมตัวกันของเซลล์ (anastomosis) ต่าง ๆ โดยสามารถเกิดขึ้นได้ง่าย ทำให้แต่ละเซลล์มีจำนวนนิวเคลียสต่างกันตั้งแต่ 3-7 อันต่อเซลล์ โดยผลการวิจัยนี้สรุปสาเหตุของความผันแปรของเชื้อน่าจะเกิดจากขบวนการ heterokaryosis

เกิดจาก parasexualism และ heterocytosome ดังเช่น Yamasaki และ Niizeki พบว่าเมื่อเส้นใยรวมตัวกัน (hyphal anastomosis) นิวเคลียสจะเคลื่อนย้ายจากเซลล์หนึ่งไปสู่เซลล์หนึ่ง และนิวเคลียส 2 อัน บางครั้งอาจจะรวมตัวกันทำให้เกิด heterozygous diploid หลังจากนั้นเกิด haploidization ขึ้น ขบวนการเช่นนี้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน เป็นเหตุให้เกิดสายพันธุ์ (race) ใหม่ ๆ ของ pathogen ขึ้นมา

จากการศึกษาพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าความผันแปรของยีนก่อโรคอาจเกิดขึ้นได้จาก transposition และ interconversion ระหว่าง chromosome ต่าง ๆ ได้ด้วย

การรวมตัวกันของเส้นใย (hyphal fusion) นั้นเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดความผันแปรของเชื้อราโรคไหม้ Tsujimoto และคณะ (1998) ได้ทดสอบการเกิด parasexual recombination ของเชื้อโดยใช้ auxotrophic complementation และ segregation of nutritional marker พบว่าการแลกเปลี่ยน mating type และความสามารถในการทำให้เกิดโรคนั้นเป็นที่ยืนยันการเกิด parasexual recombination นอกจากนี้ Shen และคณะ (1998) พบว่าการเกิด hyphal fusion เป็นสาเหตุสำคัญอันหนึ่งที่ทำให้เกิดการผันแปรของเชื้อ ซึ่งมีความสำคัญพอ ๆ กับ sexual hybridization heterokaryosis และทำให้เกิดการผันแปรในธรรมชาติ

จากการศึกษาค้นคว้าเรื่องการสืบพันธุ์ของเชื้อราโรคไหม้ นักวิจัยยังไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราชนิดนี้ในสภาพธรรมชาติ แต่ Hebert (1971) ได้รายงานว่าสามารถกระตุ้นให้เชื้อราโรคไหม้สร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศได้ในห้องปฏิบัติการโดยเขาได้แยกเชื้อดังกล่าวออกมาจากข้าว ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง เพื่อวิเคราะห์ลักษณะ mating type ของเชื้อรา *M. oryzae* ซึ่งเป็น teleomorph (sexual stage) ของเชื้อ *P. oryzae* และสามารถประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราชนิดนี้ได้ ซึ่งการค้นพบในครั้งนี้นำไปสู่วิธีการปรับปรุงพันธุ์เพื่อความต้านทานโรคเพื่อควบคุมโรคไหม้ของข้าวในปัจจุบัน (Mekwantanakarn, 1996; Hutamekalin *et al.*, 2001) ซึ่งงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงการเกิด sexual reproduction ในธรรมชาติและสามารถเกิดขึ้นในห้องปฏิบัติการได้โดยใช้เชื้อตัวทดสอบ (tester) ที่ทราบชนิดการผสมพันธุ์กับเชื้อที่ต้องการตรวจสอบซึ่งมีชนิดผสมพันธุ์ตรงข้ามกับชนิดของตัวทดสอบ หากเกิดการผสมพันธุ์กันระหว่างเชื้อที่มีชนิดการผสมพันธุ์ต่างกัน เชื้อจะสามารถสร้าง perithecia สีสน้ำตาลหรือน้ำตาลเข้มสามารถสังเกตเห็นภายใต้กล้อง stereomicroscope ได้ (Herbert, 1971 and Ou, 1985) ในประเทศไทย Sriprakhon และคณะ (2001) ได้จำแนกเพศของเชื้อรา *M. oryzae* ที่เป็นเชื้อสาเหตุของโรคไหม้ของข้าวจากพื้นที่เพาะปลูกในภาคกลางและภาคเหนือ พบว่า เชื้อราส่วนใหญ่ที่คัดแยกได้มีลักษณะเป็นหมัน (incompatibility) ซึ่งเป็น mating type 2 มากกว่า mating type 1

6. การตอบสนองของพืชที่ทำให้เกิดความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ

เชื้อราชนิดนี้ประกอบด้วยหลายสายพันธุ์ (race) แต่ละสายพันธุ์สามารถเข้าทำลายข้าวหลายสายพันธุ์แตกต่างกัน จึงทำให้พันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานต่อโรคไหม้ในแหล่งที่ปลูกแห่งหนึ่งอาจไม่ต้านทานเมื่อเปลี่ยนแหล่งที่ปลูกไปอีกแห่งหนึ่ง (ชาตรี, 2540) Goatgong และ Frederikson (1969) ได้ศึกษาเชื้อที่แยกมาจากโคนิเดียเดียวโดยศึกษาเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อรุ่นต่าง ๆ พบว่านอกจากมีลักษณะสีของเส้นใยไม่คงที่แล้วยังพบว่าเชื้อมี pathotype ที่ต่างไปจากเดิมด้วย Ou (1985) ให้เหตุผลว่า pathotype ของเชื้อที่มีความหลากหลายและเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เมื่อผลิตพันธุ์ข้าวต้านทานใหม่ ๆ มาได้ไม่นานเชื้อสามารถที่จะปรับตัวและสามารถเข้าทำลายพันธุ์ข้าวพันธุ์ใหม่ ๆ ได้ในที่สุด

พืชตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคโดยแสดงความต้านทานหรืออ่อนแอต่อการเกิดโรค การตอบสนองของพืชที่ทำให้เกิดความต้านทานมี 2 ลักษณะคือ 1. การแสดงความต้านทานโดยการยับยั้งกระบวนการเข้าทำลายของเชื้อเนื่องจากโครงสร้างที่มีอยู่ก่อนแล้วในพืช เช่น ความหนาของชั้นคิวติเคิลและอีพิเดอร์มิสและ 2. การแสดงความต้านทานที่พืชถูกชักนำให้เกิดขึ้นมาภายหลัง เนื่องจากถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ สารเคมี หรือวิถีกล ทำให้เกิดการตายของเซลล์อย่างรวดเร็วบริเวณที่เชื้อเข้าทำลายเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ เรียกปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้ว่า Hypersensitive response (HR) (Hammond-Kosack and Jones, 1996)

การเกิดปฏิกิริยา HR มีผลให้เกิดความต้านทานกับพืชทั้งต้นด้วยขบวนการ systemic acquired resistance (SAR) คือหลังจากเกิดการตายของเซลล์อย่างรวดเร็วบริเวณที่เชื้อเข้าทำลายแล้วส่งผลให้เกิดความต้านทานกับพืชทั้งต้น ซึ่งอาจต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคชนิดแรกที่เข้าทำลายหรือต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคอื่น ๆ (Schneider *et al.*, 1996)

การเกิด SAR เกิดขึ้นเมื่อเชื้อเข้าทำลายพืช หลังจากนั้นเชื้อจะมีการปล่อยสารที่เรียกว่า elicitor และพืชจะมีตัวรับที่เรียกว่า receptor ซึ่งเป็นกระบวนการจดจำของพืชต่อเชื้อ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของไอออนที่ชั้นพลาสมาเมมเบรน ทำให้เกิดการแตกตัวของออกซิเจนและสร้าง nitric oxide (NO) และสารพวก reactive oxygen intermediates (ROIs) ได้แก่ superoxide (O_2^-) และ Hydrogen peroxide (H_2O_2) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการสะสมของ salicylic acid (SA) ทั้ง NO, ROIs และ SA อาจมีผลโดยตรงต่อเชื้อหรือเป็นสารที่ส่งสัญญาณเพื่อให้พืชสร้างความต้านทาน เช่น การ

สร้างผนังเซลล์ให้หนาขึ้น หรือการสร้างสารเคมีเพื่อทำลายเชื้อ นอกจากนี้ในขบวนการ SAR ยังพบว่า jasmonic acid และ ethylene ซึ่งเป็นฮอร์โมนเกี่ยวข้องกับการตอบสนองเพื่อให้เกิดความต้านทานในพืช หลังจากพืชแสดงความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อพบว่าพืชสร้างโปรตีนที่เรียกว่า pathogenesis related protein (PR-protein) ชนิดของ PR-protein ที่พืชสร้างขึ้นจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพืชและเชื้อสาเหตุโรค ในข้าวที่แสดงความต้านทานต่อเชื้อ *Magnaporthe oryzae* สร้างโปรตีน Lipooxygenase (Hofmann and Babuin, 1993)

การเกิดปฏิกิริยา HR หลังจากเชื้อเข้าทำลายแล้วก่อให้เกิดความต้านทานโรคเป็นลักษณะที่ควบคุมด้วยสารพันธุกรรมของพืชและเชื้อสาเหตุตามทฤษฎี gene-for-gene ของ Flor (1971) โดยการทำปฏิกิริยากันระหว่างยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานของพืช (R gene) กับยีนที่ควบคุมลักษณะอ่อนแอของเชื้อ (AVR-gene) ซึ่งทั้งสองยีนเป็นยีนเดี่ยว (single gene) (ตารางที่ 1) การประเมินความแตกต่างของความรุนแรงของโรคระหว่างแต่ละสายพันธุ์ของประชากรเชื้อกับสายพันธุ์ข้าวที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติเป็นไปเป็นตามกฎ “gene-for-gene” ของ Flor’s (1971) ที่กล่าวว่า พืชมียีนที่กำหนดความต้านทาน (resistant) เป็นยีนเด่น (dominant) และยีนที่กำหนดความอ่อนแอ (susceptible) เป็นยีนด้อย (recessive) ในขณะที่เชื้อสาเหตุโรคมียีนที่กำหนดความไม่รุนแรง (avirulent) เป็นยีนเด่น และยีนที่กำหนดความรุนแรง (virulent) เป็นยีนด้อย ความสัมพันธ์ของยีนระหว่างพืชอาศัยกับเชื้อสาเหตุโรคพืชในลักษณะที่ไม่ทำให้พืชเกิดโรคมีอยู่กรณีเดียวคือ พืชอาศัยต้องมียีนต้านทาน และเชื้อสาเหตุโรคพืชมียีนอ่อนแอที่แสดงออก (ตารางที่ 1) ดังนั้นถึงแม้ว่าเชื้อจะมียีนที่แสดงความไม่รุนแรงแต่ถ้าพืชอาศัยมียีนอ่อนแอ เชื้อสาเหตุโรคนั้นก็ทำให้พืชอาศัยแสดงอาการของโรคได้ และพบว่า avirulence gene เป็นแหล่งโมเลกุลเครื่องหมายที่ดีในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อที่เข้าทำลายสายพันธุ์ข้าวโดยมีการพัฒนาสายพันธุ์ข้าวที่เป็น Standard sets of differential cultivars แสดง pathotype ต่าง ๆ ในการเปรียบเทียบ (Babujee and Gnanamanickam, 2000) ซึ่งในปัจจุบันสามารถแยกสกัดยีนต้านทานของพืชหลาย ๆ ชนิดได้สำเร็จ

ตารางที่ 1 การแสดงออกร่วมกันระหว่างยีนก่อโรคและยีนต้านทานตาม “gene-for-gene” concept

Host Pathogen	R	r
AVR	Resistance	susceptible
avr	susceptible	susceptible

ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อโรคเป็นงานที่ใช้เวลานานและค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานสูง ในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยามาเพื่อช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ที่ต้านทานโรค โดยนำความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพและมีความแม่นยำสูงมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์ เช่น การศึกษาดำแหน่งของยีน การตรวจสอบลักษณะ quantitative trait loci (QTL) ใช้เป็น marker-assisted selection และ map based cloning

7. ยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการก่อให้เกิดโรคใหม่

Avirulence protein คือ โปรตีนที่ได้จากการถอดรหัสและแปลรหัสของยีน *AVR* ที่มีความจำเป็นต่อการเข้าทำลายพืชของเชื้อ ยีนต้านทาน(resistant gene)ในพืชสามารถจดจำโปรตีนดังกล่าวได้ จึงทำให้เกิดขบวนการต้านทานต่อเชื้อ พืชจึงไม่มีการแสดงอาการของโรคใหม่ ซึ่ง avirulence protein นี้มักจะเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการก่อให้เกิดโรคของเชื้อราสาเหตุ ในปัจจุบันจึงได้มีการนำเทคโนโลยีทางอณูชีววิทยาใช้ในการจัดจำแนกยีนต้านทาน เพื่อศึกษาโครงสร้างหน้าที่ และวิวัฒนาการ เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อโรค มีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราสาเหตุโรคใหม่และเผยแพร่เป็นข้อมูลสาธารณะแล้วสามารถสืบค้นได้จาก *Magnaporthe oryzae* Genome ซึ่งเป็นความร่วมมือในการทำงานของ International Rice Blast Genome Project กับ Center for Genome Research

ปัจจุบันพบว่ามี *AVR* gene มากกว่า 25 ยีนที่ได้มีการศึกษา แต่มีเพียง 9 ยีนเท่านั้นที่ได้รับการโคลนและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว ประกอบไปด้วย *AVR-Pita* (Orbach *et al.*, 2000), *AVR1-CO39* (Farman and Leong, 1998), *PWL1* (Kang *et al.*, 1995), *PWL2* (Sweigard, 1995), *ACE1* (Fudal *et al.*, 2005), *AVR-Pizt* (Li *et al.*, 2009), *AVR-Pia*, *AVR-Pii*, และ *AVR-Pik/km/kp* (Yoshida *et al.*, 2009) Orbach และคณะ (2000) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *AVR-Pita* ของเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ในข้าวที่มียีน *Pita* พบว่า ยีน *AVR-Pita* วางอยู่บนปลายโครโมโซมที่ 3 ของเชื้อราโรคใหม่ประมาณ 1.5 kb จาก telomere ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สามารถเกิด rearrangement และ deletion ตรงตำแหน่ง *AVR-Pita* ได้ง่าย ซึ่งหมายถึงความไม่เสถียรของยีนนี้ นำไปสู่การสูญเสียหน้าที่ของยีน *AVR* นี้ได้ง่าย ส่วน Fudal และคณะ (2005) ได้ศึกษายีน *Avirulence Conferring Enzyme 1 (ACE 1)* เป็น avirulence gene แอลลีลที่ได้มาจากเชื้อรา *Magnaporthe oryzae* เชื้อสายพันธุ์ 2/0/3 ที่เป็น virulent isolate ซึ่งแทรกอยู่ตรง MINE retrotransposon ปลาย exon ที่ตำแหน่ง

1.9 kb *ACE1* ส่วน Bohnert และคณะ (2004) พบว่ายีน *ACE1* ที่ได้จากเชื้อ *Magnaporthe oryzae* นี้จดจำเฉพาะต่อยีนต้านทานในพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa*) ที่มียีน *Pi33* เท่านั้น และยังได้มีการศึกษายีนก่อโรค *AvrPiz-t* โดย Wei Li และคณะ (2009) พบว่ายีน *AvrPiz-t* ที่สามารถแยกได้จากเชื้อรา *M. oryzae* สามารถกระตุ้นให้ข้าวที่มียีนต้านทาน *Piz-t* เกิดความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อได้

จากการศึกษาของ Yoshida และคณะ (2009) ได้ทำการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (genome sequence) ของเชื้อราโรคไหม้ *M. oryzae* สายพันธุ์ Ina 168 และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนม เชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ 70-15 ที่ได้มีการรายงานก่อนหน้านี้ พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 1.68Mb ที่ไม่ปรากฏในจีโนม ของเชื้อราสายพันธุ์ 70-15 จากการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนพบว่ามียีนโปรตีน 3 ชนิดที่ลักษณะเกี่ยวข้องกับ avirulence protein โดยมีการแสดงออกของยีน 3 ยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน 3 ชนิดนั้นเมื่อเชื้อราเข้าโจมตีข้าว แต่ยังไม่สามารถทราบหน้าที่ได้อย่างแน่ชัด จากการศึกษาพบว่ายีนทั้ง 3 ยีนคือ *AVR-Pia* ซึ่งสามารถกระตุ้นให้พืชที่มียีนต้านทาน *Pia* แสดงความต้านทานต่อการเข้าโจมตีได้ *AVR-Pii* มีปฏิสัมพันธ์กับข้าวที่มียีนต้านทาน *Pii* ทำให้ข้าวมีการแสดงความต้านทานต่อโรคได้ และ *AVR-Pik/km/kp* สามารถกระตุ้นให้พืชที่มียีนต้านทาน 3 ชนิดคือ *Pik*, *Pik_m* และ *Pik_p* แสดงความต้านทานได้เมื่อเชื้อราที่มีการเข้าโจมตีกับข้าวสายพันธุ์ที่มียีนต้านทานนั้น ๆ

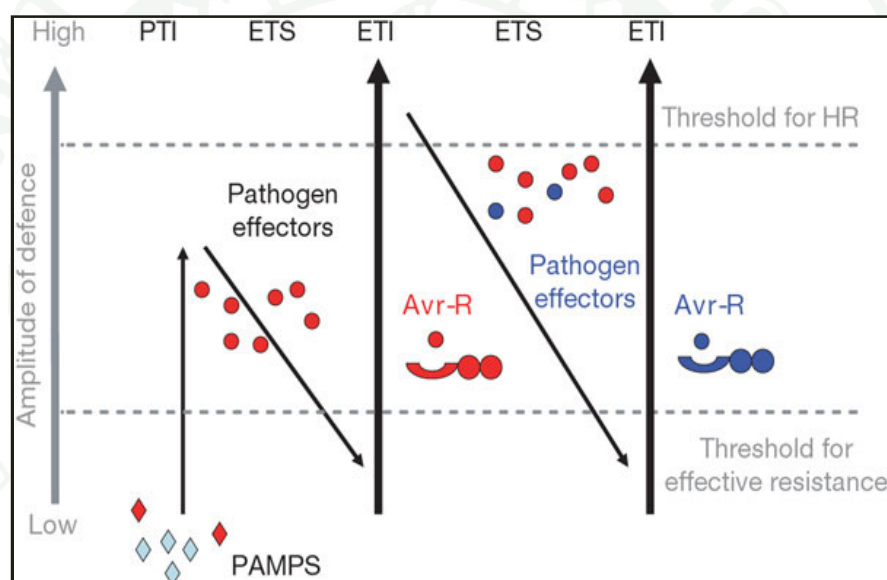
Couch และคณะ (2005) ได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่เฉพาะ *AVR-CO39*, *AVR-Pita1* และ *ACE1* มาตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำนวน 497 เชื้อสายพันธุ์ที่มาจากข้าวและหญ้า พบว่าสามารถจำแนกเชื้อราสาเหตุที่ได้จากใบไหม้ของข้าวและวัชพืชของข้าวอย่างชัดเจนและเชื้อราชนิดนี้มีความแปรปรวนสูงมาก

8. ปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนต้านทาน (R gene) และ ยีนก่อโรค (avirulence gene)

พืชมีกลไกเพื่อต่อต้านโรคพืชจากสาเหตุต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย ไวรัส รา หนอนด้วงกลมแมลง ฯลฯ โดยผ่านระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยกลไกในการตอบสนองของพืช สามารถ แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ basal และ R-gene-mediated resistance (Abramovitch *et al.*, 2006) ซึ่งการตอบสนองแบบ R-gene-mediated resistance มีประสิทธิภาพและเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ต่อไป (Flor, 1956) กระบวนการต้านทานนี้ *R gene* จะสร้าง receptor ที่สามารถจดจำ

และตอบสนองต่อ *AVR* gene ของเชื้อก่อโรค และกระตุ้นให้พืชแสดงกลไกในการตอบสนองในระดับต่าง ๆ ต่อไป (Baker *et al.*, 1997) (ภาพที่ 4) ปฏิสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองของยีนต้านทาน (resistance gene) และยีนก่อโรค (avirulence gene) เป็นไปตามทฤษฎี the gene-for-gene system (Flor, 1971) โดยเฉพาะอย่างยิ่งปฏิสัมพันธ์ระหว่างข้าวและเชื้อราโรคไหม้เป็นโมเดลที่นิยมใช้สำหรับศึกษาเรื่องของปฏิกิริยาระหว่างพืชและเชื้อก่อโรค (plant-microbe interactions) (Valent *et al.*, 1991) จากการศึกษาพบว่ายีนต้านทานมีลักษณะเป็นกลุ่มของยีนหลาย ๆ ซ้ำที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเป็นยีนแฟมิลี (Bai *et al.*, 2002) เช่น กลุ่มยีนต้านทาน *rp1* ในข้าวโพด (Saxena and Hooker, 1968; Collins *et al.*, 1999) กลุ่มยีนต้านทาน *Mla* ในข้าวบาเลย์ (Wei *et al.*, 2002) กลุ่มยีนต้านทาน *Pm3* ในข้าวสาลี (Yahiaoui *et al.*, 2004) กลุ่มยีนต้านทาน *Xa26* และกลุ่มยีนต้านทาน *Pi9* ในข้าว (Sun *et al.*, 2004) โดยการตอบสนองของยีนต้านทานต่อเชื้อชนิดต่าง ๆ จะมีความระบอบการตอบสนองที่หลากหลายแตกต่างกัน (Dangl and Jones 2001; Martin *et al.*, 2003) โดยสามารถจำแนกยีนต้านทานได้เป็น 7 ประเภท กลุ่มที่สำคัญและเป็นกลุ่มใหญ่ที่สุดคือ nucleotide-binding site plus leucine-rich repeat R genes (NBS-LRR) (Martin *et al.*, 2003; Dangl and Jones, 2001; Meyers *et al.*, 2003; Howles *et al.*, 2005; Dangl and Jones, 2001) โดย NBS-LRR ประกอบด้วย cytoplasmic protein ที่ประกอบด้วย leucine zipper, nucleotide-binding site (NBS) และ C-terminal leucine-rich repeat (LRR) motif (Bent *et al.*, 1994; Mindrinos *et al.*, 1994; Hammond-Kosack and Jones, 1997; Dangl and Jones, 2001; Martin *et al.*, 2003; Nimchuk *et al.*, 2003; Iyer and McCouch, 2004) และ NBS domain ในส่วนของ NBS-LRR protein นั้นจะประกอบด้วยส่วนอนุรักษ์หลาย ๆ ส่วน เช่น kinase-1a หรือ P-loop, kinase 2, และ kinase 3a ส่วนของ xxLxLxx motif ใน LRR domain สันนิษฐานว่ามีการจัดตัวของโครงสร้างแบบ a b-strand/b-turn เพื่อช่วยในปฏิสัมพันธ์ระหว่าง *Avr* gene ของเชื้อโรค (Hammond-Kosack and Jones, 1997; Jones and Jones, 1997) ที่อาจมีผลต่อการทำงานของ R protein โดยผ่าน nucleotide binding การ hydrolysis และการทำให้เซลล์ตาย (Martin *et al.*, 2003) NBS-LRR ในรัฐพืชส่วนใหญ่จะมีอินทรอนตรงบริเวณ NBS (Bai *et al.*, 2002) ตัวอย่างเช่น ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* (Wang *et al.*, 1999) มีอินทรอน 2 ตำแหน่ง ในบริเวณถอดรหัสยีน (1,340 และ 308 คู่เบส) ในขณะที่ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pita* มีอินทรอนขนาด 1,463 คู่เบสในบริเวณถอดรหัสยีน (Bryan *et al.*, 2000) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* มีอินทรอน 2 ตำแหน่ง ในบริเวณถอดรหัสยีน แต่อินทรอนในยีน *Pi9* หนึ่งอินทรอนมีขนาดใหญ่ (5,362 คู่เบส) กว่าอินทรอนในยีน *Pib* (Qu *et al.*, 2006) ส่วน R gene ในกลุ่มอื่นนั้นประกอบด้วย receptor-like kinases (RLKs) ที่มีโครงสร้างแบบ extracellular LRR และ intracellular serine-threonine kinase domain ซึ่งตัวอย่างของ R gene ในกลุ่มนี้ได้แก่ยีนต้านทาน

Xa21 และยีนต้านทาน *Xa26* ของข้าว (Sun *et al.*, 2004) ส่วน LRR ของ *R* gene นี้ ใช้สำหรับจดจำในกระบวนการต้านทาน (Parker *et al.*, 1997; Meyers *et al.*, 1998) โดย LRR domain จะมีส่วนร่วมในปฏิกิริยาระหว่าง avirulence (AVR) protein และเป็นตัวหลักที่ช่วยในการต้านทานต่อโรคอย่างเฉพาะเจาะจง (Ellis *et al.*, 1999; Hulbert *et al.*, 2001; Dodds *et al.*, 2001; Jia *et al.*, 2000) นอกจากนี้การแสดงออกของ *AVR* gene ในเชื้อก่อโรคจะไปกระตุ้นการทำงานของกลไกป้องกันจาก *R* gene ในพืช สมมติฐานที่เป็นไปได้ในการอธิบายถึงกลไกนี้ คือ ligand-receptor model กล่าวคือ ผลผลิตของ *R* gene เช่น receptor ที่สามารถจดจำ ligand ที่สร้างขึ้นโดย *AVR* gene เป็น protein – protein interaction motif (Jones and Jones, 1997) แล้วส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณเพื่อตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อก่อโรค



ภาพที่ 4 กลไกการทำงานและการเกิดวิวัฒนาการร่วมกันของยีนต้านทานและยีนก่อโรคด้วย
Zigzag model

ที่มา: Dangl and Jones, 2001

การศึกษาพันธุกรรมของความต้านทานของข้าวจะเป็นข้อมูลที่แสดงให้เห็นถึงความแปรปรวนของเชื้อและความขาดแคลนยีนที่ต้านทานต่อโรค (Mackill and Bonman, 1992) โดยศึกษาเกี่ยวกับเรื่องยีนต้านทานโรคใหม่นั้นสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ การนำเอาเทคนิคด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชทั้งแบบเก่า (conventional breeding) และแบบใหม่ (molecular breeding)

มาใช้ในการค้นหายีนต้านทานโรค และใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรคมาช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection: MAS) แต่ปัญหาที่สำคัญที่มักประสบอยู่เสมอ คือ ยีนต้านทานโรคเหล่านี้เป็นยีนที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อราโรคไหม้เพียงไม่กี่สายพันธุ์ จึงทำให้พันธุ์ข้าวที่ได้รับยีนต้านทานโรคนั้น ๆ จะสูญเสียความสามารถในการต้านทานต่อโรคไหม้ในระยะเวลาเพียงไม่กี่ปี (Lee and Cho, 1990) เนื่องจากการปรับตัวของสายพันธุ์เชื้อราโรคไหม้ให้สามารถทนทานต่อยีนต้านทานโรคนั้นได้ (Bonman *et al.*, 1992) โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้าวสายพันธุ์ที่มี *R* gene เพียงยีนเดียวจะสูญเสียความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว เนื่องจากความไม่เสถียรของยีน (Kiyosawa 1982; Bonman *et al.*, 1986; Valent *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 2007) และเนื่องจากเชื้อโรคไหม้มีความหลากหลายทางชีววิทยาสอง เป็นเหตุให้ข้าวมีความสามารถต้านทานโรคไหม้ได้เพียงบางสายพันธุ์เท่านั้น (Morris *et al.*, 1993; Dahu *et al.*, 1995) ดังนั้นการค้นหา ยีนต้านทานตัวใหม่ ๆ โดยเฉพาะยีนต้านทานประเภท Broad-spectrum คือ ยีนที่มีความสามารถในการต้านทานต่อสายพันธุ์เชื้อราโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์ เพื่อนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้ยาวนานมากขึ้น (Bonman *et al.*, 1992; Correa-Victoria *et al.*, 2002; Jia, 2003)

ในประเทศสหรัฐอเมริกามีการวิจัยเรื่องยีนต้านทานโรคไหม้ (*Pi* gene) อย่างแพร่หลาย เพราะเป็นส่วนหนึ่งในโครงการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ข้าวของประเทศ (Moldenhauer *et al.*, 1992) การรวมยีนต้านทานโรคไหม้หลาย ๆ ยีนมาไว้ในข้าวสายพันธุ์เดียวกัน ทำให้ข้าวสายพันธุ์ดังกล่าวมีความสามารถในการต้านทานเชื้อได้ดีขึ้น ข้อมูลเกี่ยวกับยีนต้านทานโรคไหม้ที่จำเพาะกับสายพันธุ์ของเชื้อราโรคไหม้ (race-specific *Pi* resistance gene) ได้ถูกนำมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประเทศสหรัฐอเมริกา ตัวอย่างเช่น ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta2* *Pi-k* และ *Pi-b* สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ในประเทศสหรัฐอเมริกาได้ถึง 8-10 สายพันธุ์ จึงมีการนำยีนดังกล่าวมาเป็นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้ต่อไป (Marchetti *et al.*, 1987; Tabien *et al.*, 2000)

ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่าได้มีการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวกว่า 73 ยีน กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมของข้าว (Ballini *et al.*, 2008) และกว่า 40 ยีนได้รับการทำแผนที่ลงบนโครโมโซม (Iwata, 1996; Nagato and Yoshimura 1998, 1999; Chen *et al.*, 2004) โดยส่วนใหญ่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6, 11 และ 12 ตัวอย่างเช่น ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2/PiZ* *Pi8* *Pi9* และ *Pi13(t)* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1* *Pi7* *Pi18* *Pif* *Pi34* *Pi38*

Pi44(t) มีตำแหน่งบนแขนข้างยาวของโครโมโซมที่ 11 (Koide *et al.*, 2009) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pita Pita-2 Pitq6 Pi6(t) Pi12(t) Pi12(t) Pi19(t) Pi20(t) Pi21(t) Pi24(t) Pi31(t) Pi32(t) Pi39(t) Pi62(t) Pi157(t) IPi* และ *IPi3* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 12 ใกล้กับเซนโตเมียร์ (Koide *et al.*, 2009) โดยยีนต้านทานส่วนใหญ่ที่มีการค้นพบจะเป็นยีนเด่น ยกเว้น *pi21* ที่เป็นยีนต้านทานที่เป็นยีนด้อย และมีบางยีนที่โดยธรรมชาติมีลักษณะทางปริมาณ (Fukuoka and Okuno, 2001) โดยยีนต้านทานส่วนใหญ่ได้มาจากข้าวพันธุ์พื้นเมือง (landrace variety) สายพันธุ์อินดิกา (indica variety) มีเพียงยีนต้านทาน *Pi9* ที่มีแหล่งกำเนิดมาจากข้าวป่า *Oryza minuta* (Liu *et al.*, 2002) แต่อย่างไรก็ตาม มียีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวเพียง 12 ยีนเท่านั้น ที่ได้มีการโคลนยีนและตรวจหาลำดับเบสสมบูรณ์แล้ว คือ *Pi2 Pi9 Pi36 Pi37 Pib Pid2 Pikh Pita Pizt Pid3 Pi5* และ *Pit* (ตารางที่ 2) (ชัชวาลและสุริพร, 2552; Wang *et al.*, 1999; Bryan *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Qu *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007)

ตารางที่ 2 ยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวที่โคลนแล้ว

ยีน	ลักษณะของยีน	โครโมโซม	เอกสารอ้างอิง
<i>Pib</i>	NBS-LRR	2	Wang <i>et al.</i> , 1999
<i>Pita</i>	NBS-LRR	12	Bryan <i>et al.</i> , 2000
<i>Pik^h</i>	NBS-LRR	11	Sharma <i>et al.</i> , 2005
<i>Pi9</i>	NBS-LRR	6	Qu <i>et al.</i> , 2006
<i>Pid2</i>	B-lectin receptor kinase	6	Chen <i>et al.</i> , 2006
<i>Pi2</i>	NBS-LRR	6	Zhou <i>et al.</i> , 2006
<i>Piz-t</i>	NBS-LRR	6	Zhou <i>et al.</i> , 2006
<i>Pi36</i>	NBS-LRR	8	Liu <i>et al.</i> , 2007
<i>Pi37</i>	NBS-LRR	1	Lin <i>et al.</i> , 2007
<i>Pid3</i>	NBS-LRR	-	Shang <i>et al.</i> , 2009
<i>Pi5</i>	NBS-LRR	-	Lee <i>et al.</i> , 2009
<i>Pit</i>	NBS-LRR	-	Hayashi and Yoshida, 2009

9. การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

รูปแบบความสัมพันธ์ของกลุ่มสิ่งมีชีวิตในสายวิวัฒนาการแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบคือ

1. Monophyletic group หรือ Monophyly คือ กลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีบรรพบุรุษร่วมกัน โดยลูกหลานที่เกิดขึ้นต้องมาจากบรรพบุรุษสุดท้าย (most recent common ancestor) เดียวกัน
2. Paraphyletic group หรือ Paraphyly คือ กลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีบรรพบุรุษร่วมกัน และมีลูกหลานบางส่วนที่แยกออกไป มาจากบรรพบุรุษเดียวกัน
3. Polyphyletic group หรือ Polyphyly คือ กลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีบรรพบุรุษสุดท้ายต่างกันแต่เมื่อพิจารณาสายใยที่อยู่ตอนต้น จะมีบรรพบุรุษร่วมกัน

10. การสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

การจัดเรียงลำดับสายดีเอ็นเอ (alignment of DNA sequence) โดยการจัดเรียงลำดับดีเอ็นเอหลาย ๆ สายจนกระทั่งมีความเหมือนกันอยู่ในระดับสูงสุด การจัดเรียงนี้อาจจะต้องอาศัยการแทรก gap ลงภายในสายดีเอ็นเอเพื่อที่จะได้ให้เกิดการเพิ่มหรือการลดจำนวนนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอ การจัดเรียงลำดับดีเอ็นเอให้ได้ดีที่สุดนั้น มักจะเป็นการพยายามที่จะทำให้ ทั้งจำนวน gap และลำดับดีเอ็นเอที่เข้าคู่ผิด (mismatch) มีค่าน้อยที่สุด ถึงแม้ว่าการลดจำนวนของลำดับดีเอ็นเอที่เข้าคู่ผิดนั้นมักจะทำให้จำนวน gap มีค่ามากขึ้น และในทางกลับกัน การลดจำนวน gap ก็มักจะทำให้จำนวนของคลีโอไทด์ที่เข้าคู่ผิดมีค่าสูงขึ้นเช่นกัน

การสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ มีหลายวิธีได้แก่

1. วิธี Distance matrix เป็นวิธีการทาง algorithm ที่ใช้ตารางความแตกต่างโดยรวมระหว่างสายดีเอ็นเอต่าง ๆ ที่ศึกษา โดยเริ่มจากการคำนวณค่าความคล้ายคลึง (similarity) หรือ ค่าความห่าง (distance) ของตัวอย่างแต่ละคู่ที่ทำการศึกษา จากนั้นนำมาจัดกลุ่ม เริ่มจากคู่ที่มีค่า similarity สูงสุด หรือค่า distance ต่ำที่สุด วิธีการนี้จะได้ผลวิเคราะห์เพียงหนึ่งเท่านั้น เรียก tree นี้ว่า phenogram เช่น วิธี UPGMA และ Neighbor-joining (NJ)

2. วิธี Maximum likelihood (ML) วิธีนี้อาศัยการคำนวณหาค่าความน่าจะเป็นที่ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอที่กำลังศึกษาจะเกิดขึ้นจากแผนภูมิวิวัฒนาการที่เป็นไปได้ประกอบกับแบบจำลองต่างๆ ของการเปลี่ยนแปลงเชิงวิวัฒนาการ โครงสร้างของ tree ใด ที่ทำให้ความน่าจะเป็นดังกล่าว มีค่าสูงสุด ก็จะเป็น tree ที่เป็นไปได้มากที่สุด เรียก tree นี้ว่า Maximum likelihood tree ตัวอย่างของแบบจำลอง ทางวิวัฒนาการที่นิยมใช้ในการทดสอบ ได้แก่ แบบจำลองพารามิเตอร์เดียวของ Jukes-Cantor (JC) ซึ่งจะให้นิวคลีโอไทด์ทั้งสี่มีความถี่ในการเกิดวิวัฒนาการเท่ากัน และแบบจำลองพารามิเตอร์คู่ของ Kimura ที่ให้อัตราการเกิด transition ซึ่งเป็นการเปลี่ยนระหว่างหมู่ purine กับหมู่ pyrimidine และอัตราการเกิด transversion ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงภายในหมู่ purine กับหมู่ pyrimidine เองนั้นเป็นอิสระต่อกัน

2. วิธี Maximum parsimony (MP) เป็นวิธีที่อาศัยข้อกำหนดที่ว่า tree ที่ถูกต้องนั้น จะเป็น tree ที่มีระยะสั้นที่สุด คือ จะอาศัยจำนวนของการเปลี่ยนแปลงทางการกลายพันธุ์น้อยที่สุดในการอธิบายความแตกต่างที่พบได้จากข้อมูลลำดับดีเอ็นเอที่มีในลำดับแรกนั้น ความยาวของ tree จากโครงสร้างที่เป็นไปได้แต่ละแบบจะถูกประมาณขึ้นจากดีเอ็นเอตำแหน่งที่ให้ข้อมูล (informative site) บนตารางเมตริกซ์ tree ที่ถูกเลือกให้เป็น tree ที่มีระยะสั้นที่สุดนั้น จะมีจำนวนของการแทนที่ของดีเอ็นเอ (substitution) น้อยที่สุด จากนั้นความยาวของกิ่ง แต่ละกิ่งบนแผนภูมิจะถูกประมาณขึ้น และถูกจัดลงบนกิ่งของ tree ตามจำนวนของการเปลี่ยนแปลงในแต่ละตำแหน่ง

การกำหนดราก (rooting the tree) เป็นการกำหนดทิศทางให้กับสภาวะของลักษณะ (character state) ของสมาชิกภายในกลุ่มที่ศึกษา มักใช้สิ่งมีชีวิตที่เป็นกลุ่มที่กลุ่มน้อง (sister group) กับกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่กำลังศึกษา จำนวนหนึ่ง taxon หรือมากกว่า มาใส่เพิ่มเข้าไป เรียกว่าเป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม (outgroup) เพื่อที่จะเป็นกลุ่มเปรียบเทียบสำหรับการกำหนดรากที่เหมาะสม

เมื่อได้สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแล้วจะมีการประเมินระดับความเชื่อมั่นต่อ tree ที่ได้ โดยใช้วิธีทางสถิติมาช่วย ซึ่งวิธีการที่นิยมใช้ คือ วิธี bootstrap ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยการทดลองสับเปลี่ยนค่าข้อมูลโดยการแทนที่ กล่าวคือ จะเริ่มจากการสุ่มดึงเอาข้อมูลลักษณะบางอย่างออกจากตารางเมตริกซ์ แล้วทำให้เมตริกซ์นั้นมีขนาดเท่าเดิมโดยการเพิ่มจำนวนซ้ำของข้อมูลลักษณะอื่นขึ้นมาแทนที่ จากนั้นจึงคำนวณสร้าง tree ขึ้นมา หลังจากที่ทำทดลองดังกล่าวไปหลาย ๆ รอบ แล้ว tree ทั้งหมดที่สร้างขึ้นมานี้จะถูกนำมาวิเคราะห์หาความมั่นใจที่กิ่ง (branch) ต่าง ๆ บน tree จะเกิดขึ้น ออกมาในรูปของร้อยละ ถ้ามีค่าใกล้ 100 จะสามารถมั่นใจได้ว่า branch ดังกล่าว หรือ เคลด (clade) บน branch นั้น น่าจะเกิดขึ้นได้จริงบนสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อสาเหตุที่ใช้ในการทดสอบ

1.1 เชื้อราโรคไหม้ปี 2553

ตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ *M. oryzae* ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้รับการอนุเคราะห์จาก ดร.ธานี ศรีวงศ์ชัย ภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ซึ่งได้ทำการเก็บรวบรวม ตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ของข้าวจากต้นข้าวที่มีอาการของโรคใบไหม้ (ใบและคอรวง) ในบริเวณ ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (ตารางที่ 3)

1.2 เชื้อราโรคไหม้ปี 2549

ตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ *M. oryzae* ปี 2549 มีการเก็บรวบรวมไว้แล้วก่อนหน้านี้และเก็บรักษาไว้ที่ธนาคารเชื้อพันธุ์จากศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ BIOTEC Culture Collection (BCC) เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ตัวแทนจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยเป็นเชื้อก่อให้เกิดโรคใบไหม้ในข้าวอย่างกว้างขวาง (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 รายละเอียดตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ปี 2553

ลำดับ	รหัส	สถานที่	สายพันธุ์ข้าวที่เชื้อเข้าทำลาย	ส่วนของพืชที่เก็บตัวอย่าง
1.	BAG1.5	จ.พิษณุโลก	KDML105	Leaf
2.	BAG1.6	จ.พิษณุโลก	KDML105	Leaf
3.	BAG2.1	จ.อุบลราชธานี	KDML105	Leaf
4.	BAG2.2	จ.อุบลราชธานี	KDML105	Leaf
5.	BAG2.3	จ.อุบลราชธานี	KDML105	Leaf
6.	BAG4.4	อ.น้ำคำ จ.พิษณุโลก	KDML105	Neck

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ	รหัส	สถานที่	สายพันธุ์ข้าวที่เชื้อเข้าทำลาย	ส่วนของพืชที่ เก็บตัวอย่าง
7.	BAG4.5	อ.น้ำคำ จ.พิษณุโลก	KDML105	Neck
8.	BAG4.6	อ.น้ำคำ จ.พิษณุโลก	KDML105	Neck
9.	BAG5.1	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	1034N.110	Neck
10.	BAG5.2	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	1034N.110	Neck
11.	BAG5.3	อ.เมือง จ.ขอนแก่น	1034N.110	Neck
12.	BAG8.1	จ.อุบลราชธานี	KDML105	Leaf
13.	BAG8.2	จ.อุบลราชธานี	KDML105	Leaf
14.	BAG8.3	จ.อุบลราชธานี	KDML105	Leaf
15.	BAG10.1	อ.เมือง จ.หนองคาย	กข6	Leaf
16.	BAG10.2	อ.เมือง จ.หนองคาย	กข6	Leaf
17.	BAG11.1	อ.ท่าบ่อ จ.หนองคาย	กข6	Leaf
18.	BAG11.2	อ.ท่าบ่อ จ.หนองคาย	กข6	Leaf
19.	BAG12.3	อ.โพนพิสัย จ.หนองคาย	กข6	Leaf
20.	BAG13.1	อ.สังคม จ.หนองคาย	กข6	Leaf
21.	BAG13.2	อ.สังคม จ.หนองคาย	กข6	Leaf
22.	BAG14.2	อ.ศรีเชียงใหม่ จ.หนองคาย	KDML105	Leaf
23.	BAG14.3	อ.ศรีเชียงใหม่ จ.หนองคาย	KDML105	Leaf
24.	BAG15.1	อ.เมือง จ.อุดรธานี	KDML105	Leaf
25.	BAG15.2	อ.เมือง จ.อุดรธานี	KDML105	Leaf
26.	BAG16.1	อ.เพ็ญ จ.อุดรธานี	กข6	Leaf
27.	BAG17.1	อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี	กข6	Leaf
28.	BAG17.2	อ.บ้านผือ จ.อุดรธานี	กข6	Leaf
29.	BAG18.1	อ.สร้างคอม จ.อุดรธานี	กข6	Leaf
30.	BAG18.2	อ.สร้างคอม จ.อุดรธานี	กข6	Leaf

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ลำดับ	รหัส	สถานที่	สายพันธุ์ข้าวที่เชื้อเข้าทำลาย	ส่วนของพืชที่ เก็บตัวอย่าง
31.	BAG19.1	อ.กุฉีชัย จ.อุดรธานี	KDML105	Leaf
32.	BAG19.2	อ.กุฉีชัย จ.อุดรธานี	KDML105	Leaf
33.	BAG20.2	อ.หนองหาน จ.อุดรธานี	กข10	Leaf
34.	BAG20.3	อ.หนองหาน จ.อุดรธานี	กข10	Leaf
35.	BAG21.1	อ.สว่างแดนดิน จ.อุดรธานี	กข6	Leaf
36.	BAG21.2	อ.สว่างแดนดิน จ.อุดรธานี	กข6	Leaf
37.	BAG22.1	อ.ทุ่งฝน จ.อุดรธานี	กข10	Leaf
38.	BAG22.2	อ.ทุ่งฝน จ.อุดรธานี	กข10	Leaf
39.	BAG23.2	อ.จตุรัส จ.ชัยภูมิ	KDML105	Leaf
40.	BAG24.1	อ.เมือง จ.ชัยภูมิ	KDML105	Leaf
41.	BAG25.1	อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี	KDML105	Leaf
42.	BAG25.2	อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี	KDML105	Leaf
43.	BAG26.1	อ.โซ่พิสัย จ.หนองคาย	กข10	Leaf
44.	BAG27.1	อ.สระใคร จ.หนองคาย	กข10	Leaf
45.	BAG27.2	อ.สระใคร จ.หนองคาย	กข10	Leaf
46.	BAG28.1	อ.บึงกาฬ จ.หนองคาย	กข6	Leaf
47.	BAG29.2	อ.พังโคน จ.อุดรธานี	กข6	Leaf
48.	BAG30.1	อ.บ้านม่วง จ.อุดรธานี	กข6	Leaf
49.	BAG30.2	อ.บ้านม่วง จ.อุดรธานี	กข6	Leaf
50.	BAG33.2	อ.บึงโขงหลง จ. อุดรธานี	กข6	Leaf

ตารางที่ 4 รายละเอียดตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ปี 2549

ลำดับ	รหัส	สถานที่	สายพันธุ์ข้าวที่เชื้อเข้าทำลาย	ส่วนของพืชที่เก็บตัวอย่าง
1.	10100	จ.สระแก้ว	KDML105	-
2.	10301	จ.ศรีสะเกษ	KDML105	-
3.	10302	จ.ศรีสะเกษ	KDML105	-
4.	10459	จ.ลำปาง	KDML105	-
5.	10551	จ.นครราชสีมา	KDML105	-
6.	10552	จ.นครราชสีมา	KDML105	-
7.	10576	จ.กาฬสินธุ์	KDML105	-
8.	10577	จ.นครราชสีมา	KDML105	-
9.	10578	จ.นครราชสีมา	KDML105	-
10.	10581	จ.นครราชสีมา	KDML105	-
11.	10652	จ.มหาสารคาม	KDML105	-
12.	10681	จ.ร้อยเอ็ด	KDML105	-
13.	10694	จ.หนองคาย	KDML105	-
14.	10732	จ.กำแพงเพชร	KDML105	-
15.	10760	จ.กำแพงเพชร	KDML105	-
16.	10812	จ.เชียงราย	KDML105	-
17.	10837	จ.สุรินทร์	KDML105	-
18.	10873	จ.แม่ฮ่องสอน	KDML105	-
19.	10926	จ.พะเยา	KDML105	-
20.	10927	จ.พะเยา	KDML105	-
21.	10941	จ.ลำปาง	KDML105	-
22.	10945	จ.เชียงใหม่	KDML105	-
23.	10971	จ.น่าน	KDML105	-
24.	10985	จ.ศรีสะเกษ	KDML105	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ลำดับ	รหัส	สถานที่	สายพันธุ์ข้าวที่เชื้อเข้าทำลาย	ส่วนของพืชที่เก็บตัวอย่าง
25.	10987	จ.ศรีสะเกษ	KDML105	-
26.	10993	จ.บุรีรัมย์	KDML105	-
27.	11108	จ.อุบลราชธานี	KDML105	-
28.	11109	จ.อุบลราชธานี	KDML105	-

2. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีในห้องปฏิบัติการ

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราโรคไหม้

2.1.1 โกร่งบดตัวอย่าง

2.1.2 เครื่องแก้ว

2.1.3 หลอดพลาสติก (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตรและหลอดใส่สารขนาด 15 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตร

2.1.4 หลอดสำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR tube) ขนาด 200 ไมโครลิตร

2.1.5 ไมโครปิเปตต์ชนิดปรับปริมาตรได้บริษัท Biohit, Finland พร้อม Tip ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

2.1.6 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.1.7 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

2.1.8 ตู้อบปรับอุณหภูมิได้ (hot air oven)

2.1.9 เครื่องเขย่า (shaker)

2.1.10 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (refrigerated centrifuge)

2.1.11 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (microcentrifuge)

2.1.12 เครื่อง Thermocycler สำหรับ Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.1.13 ชุดเครื่องมือ agarose gel electrophoresis

2.1.14 เครื่องฉายแสง ultraviolet และเครื่องถ่ายภาพ (gel documentation)

2.1.15 Hotplate

- 2.1.16 ตู้ Laminar flow
- 2.1.17 Vortex
- 2.1.18 หม้อนึ่งความดันสูง (autoclave)
- 2.1.19 ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส
- 2.1.20 ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส
- 2.1.21 ตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส
- 2.1.22 เครื่องคอมพิวเตอร์ ASUS F80S ที่เชื่อมต่อกับอินเทอร์เน็ต
- 2.1.23 เครื่องพิมพ์เอกสาร
- 2.1.24 อุปกรณ์อื่น ๆ

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและกำจัดสิ่งแปลกปลอมใน PCR product

- 2.2.1 ไนโตรเจนเหลว
- 2.2.2 CTAB buffer [2% CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide), 1.5 M Tris-HCl pH 8.0, 30 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetate) pH 8.0 และ 2.1 M NaCl]
- 2.2.3 β -mercaptoethanol
- 2.2.4 10X CTAB buffer (10% CTAB, 0.7 M NaCl)
- 2.2.5 Chloroform:isoamylalcohol (24: 1)
- 2.2.6 TE buffer (10: 0.1 = 10 mM Tris: 0.1 mM EDTA)
- 2.2.7 Ethanol 70% และ 95 %
- 2.2.8 Enzyme RNase A
- 2.2.9 QIA quick PCR purification kit

2.3 สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ Agarose gel electrophoresis

- 2.3.1 Agarose
- 2.3.2 0.5X TBE buffer (Tris-borate EDTA pH 8.0)
- 2.3.3 Bromophenol blue
- 2.3.4 Xylene cyanol
- 2.3.5 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 1 Kb DNA
- 2.3.6 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ DNA ladder mix

2.4 โปรแกรมสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล

2.4.1 Nucleotide blast (Basic Local Alignment Search Tool-nucleotide) จาก <http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> ใช้เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการศึกษากับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

2.4.2 Bioedit software เวอร์ชัน 7 (Hall, T.A. 1999) ใช้เพื่อเชื่อมต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละครั้งจากชิ้นดีเอ็นเอเดียวกัน (sequence assembly) โดยใช้บริเวณเชื่อมต่อนั้นเป็นบริเวณที่เหมือนกันของผลที่ได้แต่ละครั้ง

2.4.3 ClustalW (Chenna *et al.*, 2003) ใช้เพื่อการทำ alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างไฟล์ที่จำเป็นเพื่อการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

2.4.4 DnaSP (DNA Sequence Polymorphism) version 5.0 (Rozas *et al.*, 2003) ใช้ในการหาค่าทดสอบทางสถิติของข้อมูล, การทดสอบ neutrality, ระบุจำนวน haplotype, นับจำนวนและระบุตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ (polymorphic site)

2.4.5 MEGA (Molecular Evolution Genetics Analysis) version 5 (Kumar *et al.*, 2008) ใช้เพื่อหาองค์ประกอบของลำดับนิวคลีโอไทด์, ระยะห่างทางพันธุกรรม, แบบจำลองการแทนที่เบสที่เหมาะสมต่อข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ Phylogenetic tree

3. การเตรียมตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จากตัวอย่างข้าวที่มีการอาการของโรคไหม้

ขั้นตอนการแยกเชื้อแบบสปอร์เดี่ยว (single spore isolation) มีวิธีการดังนี้ (ภาพที่ 5)

3.1 เก็บตัวอย่างใบข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่เป็นโรคไหม้ที่ส่วนต่าง เช่น ใบ เมล็ด คอรวง จากสถานที่ต่าง ๆ โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ เชื้อราก่อโรคใบไหม้ที่เก็บรวบรวมไว้ในปี พ.ศ. 2553 โดยภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน และเชื้อราก่อโรคใบไหม้ที่เก็บรวบรวมไว้ในปี พ.ศ. 2549 และมีการเก็บรักษาไว้ที่ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (Biotech)

3.2 นำตัวอย่างที่ได้มาตัดบริเวณที่เกิดแผลใหม่เป็นชิ้นขนาดประมาณ 5 เซนติเมตร จากนั้นวางลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่รองพื้นด้วยกระดาษทิชชูที่ชุ่มน้ำทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อรามีการสร้างโคนิเดีย

3.3 นำชิ้นส่วนใบข้าวในจานเลี้ยงเชื้อมาส่งใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นใช้แท่งแก้วปลายแหลมแตะโคนิเดียจากบริเวณที่เกิดโรคใหม่มาวางลงบนอาหารวุ้น ที่เตรียมไว้

3.4 ใช้แท่งแก้วปลายแหลมแยกเชื้อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ ประมาณ 20-30 โคนิเดียแล้ว ปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25-28 °C โคโลนีก็จะงอกและสร้างเส้นใย

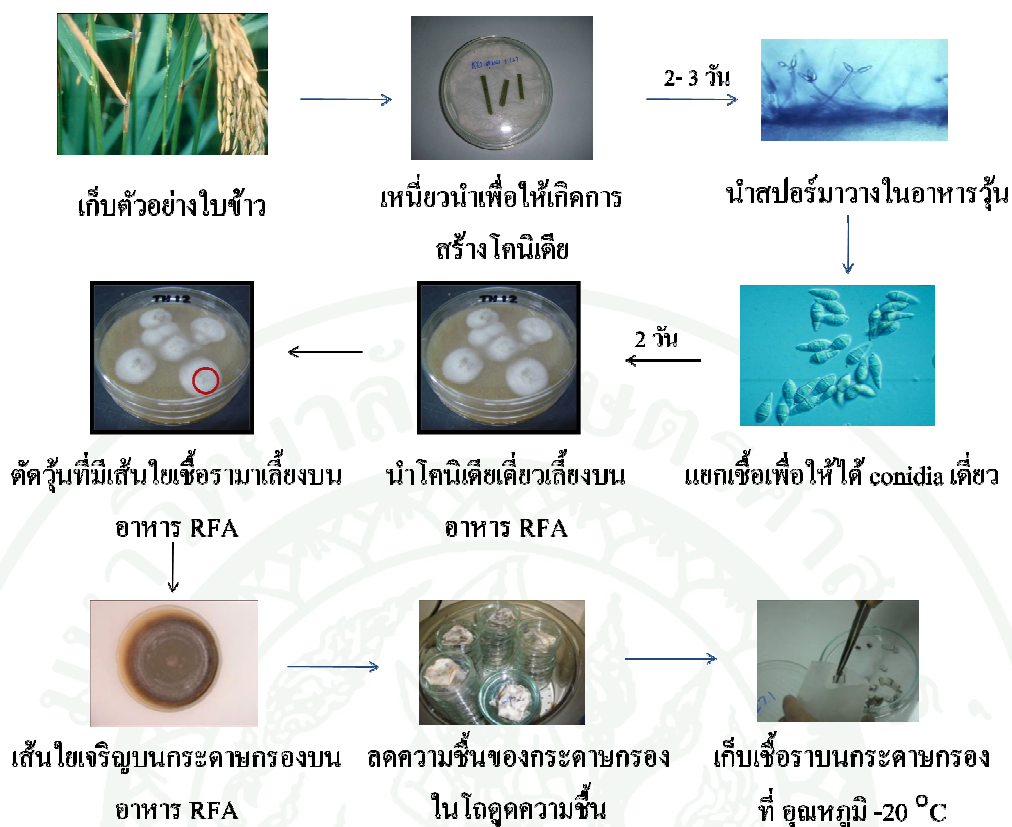
3.5 นำจานเลี้ยงเชื้อจากขั้นตอน 3.4 ส่งใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นใช้หลอดปลายแหลมตัดวุ้นที่โคโลนีงอกเส้นใย วางลงในจานเลี้ยงเชื้อบนอาหาร RFA (Rice Flour Agar) ที่อุณหภูมิ 25-28 °C เป็นเวลา 7-10 วัน เชื้อจะสร้างเส้นใยสีขาวขึ้น

3.6 ใช้มีดผ่าตัดตัดวุ้นบริเวณที่สปอร์สร้างเส้นใยในบริเวณที่อยู่ห่างจากโคนิเดียอื่น

3.7 นำส่วนที่ได้จากขั้นตอน 3.6 วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่วางทับด้วยกระดาษกรองเป็นเวลา 7-14 วัน เชื้อจะสร้างเส้นใยจนเต็มกระดาษกรอง

3.8 ลอกกระดาษกรองที่มีเส้นใยเชื้อราวางในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใส่ไว้ในโถดูดความชื้น (desicator) ทิ้งไว้ 14 วันเพื่อให้กระดาษกรองแห้งสนิท

3.9 ตัดกระดาษกรองที่ได้จากข้อ 3.8 ให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ บรรจุใส่ซองกระดาษไข เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C



ภาพที่ 5 ขั้นตอนการแยกเชื้อแบบสปอร์เดี่ยว

4. การเลี้ยงตัวอย่างเชื้อราให้มีการสร้างเส้นใย

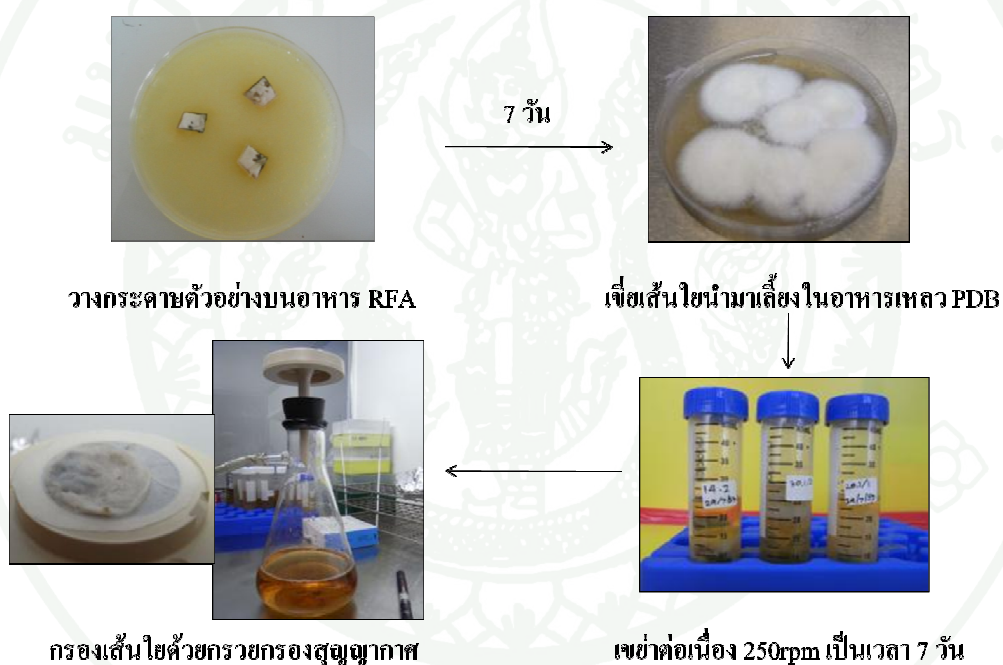
ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อราให้มีการสร้างเส้นใยมีวิธีการดังนี้ (ภาพที่ 6)

4.1 นำตัวอย่างเชื้อราที่อยู่บนกระดาศกรองมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ RFA (rice flavor agar) ประมาณ 3-5 แผ่นต่อจานเลี้ยงเชื้อ

4.2 นำจานเลี้ยงเชื้อที่ได้จากขั้นตอน 4.1 เก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เชื้อจะเจริญเติบโตและมีการสร้างเส้นใยเชื้อราที่มีสีขาว

4.3 ใช้ใบมีดเขี่ยเส้นใยเชื้อราเพื่อนำมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว PDB (Potato dextrose both) และเขย่าอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่อง shaker ที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7-10 วันภายใต้อุณหภูมิ 28 °C เพื่อเพิ่มปริมาณเส้นใยเชื้อรา เส้นใยเชื้อราจะเจริญเป็นก้อน คล้ายก้อนสำลี ภายในอาหารเหลว

4.4 กรองเส้นใยเชื้อราที่ได้จากข้อที่ 4.3 ด้วยกรวยกรองสุญญากาศ โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 เป็นตัวรองรับเส้นใย หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างที่ได้ไว้ที่ตู้ -80 °C เพื่อป้องกันการการสูญเสียสภาพของดีเอ็นเอ และเตรียมการสกัดดีเอ็นเอต่อไป



ภาพที่ 6 ขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อราให้มีการสร้างเส้นใย

5. การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเชื้อรา

5.1 นำเส้นใยเชื้อราที่ผ่านการกรองนำมาบดให้ละเอียดในโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำส่วนผงที่บดละเอียดใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 2 mL เติม warm 2X CTAB extraction buffer [2 % (w/v) CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) และ 0.2 % β -mercaptoethanol] ปริมาตร 700 μ l และผสมให้เข้ากันอย่างดี จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5.2 นำหลอดทดลองวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม chloroform:isoamylalcohol (24:1) ปริมาตร 840 μ l ผสมเบา ๆ ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 30 นาที

5.3 คูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ เติม iso- propanol ที่แช่เย็นปริมาตร 1 volume ของสารละลายที่คูดได้ ผสมเบา ๆ ให้เข้ากันนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 20 นาที

5.4 นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 20 นาทีเทส่วนใสทิ้ง และเก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้

5.5 ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 95 % ethanol 1 mL นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาทีเทส่วนใสทิ้ง

5.6 ล้างตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วย 70 % ethanol 1 mL นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาทีเทส่วนใสทิ้ง และตากดีเอ็นเอให้แห้ง

5.7 ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย สารละลาย TE buffer ปริมาณ 50 μ l และกำจัดอาร์เอ็นเอ โดยการเติม RNase A (10 mg/mL) 1 μ L ต่อสารละลายดีเอ็นเอ 100 μ l บ่มที่ 37 °C นาน 15 นาที

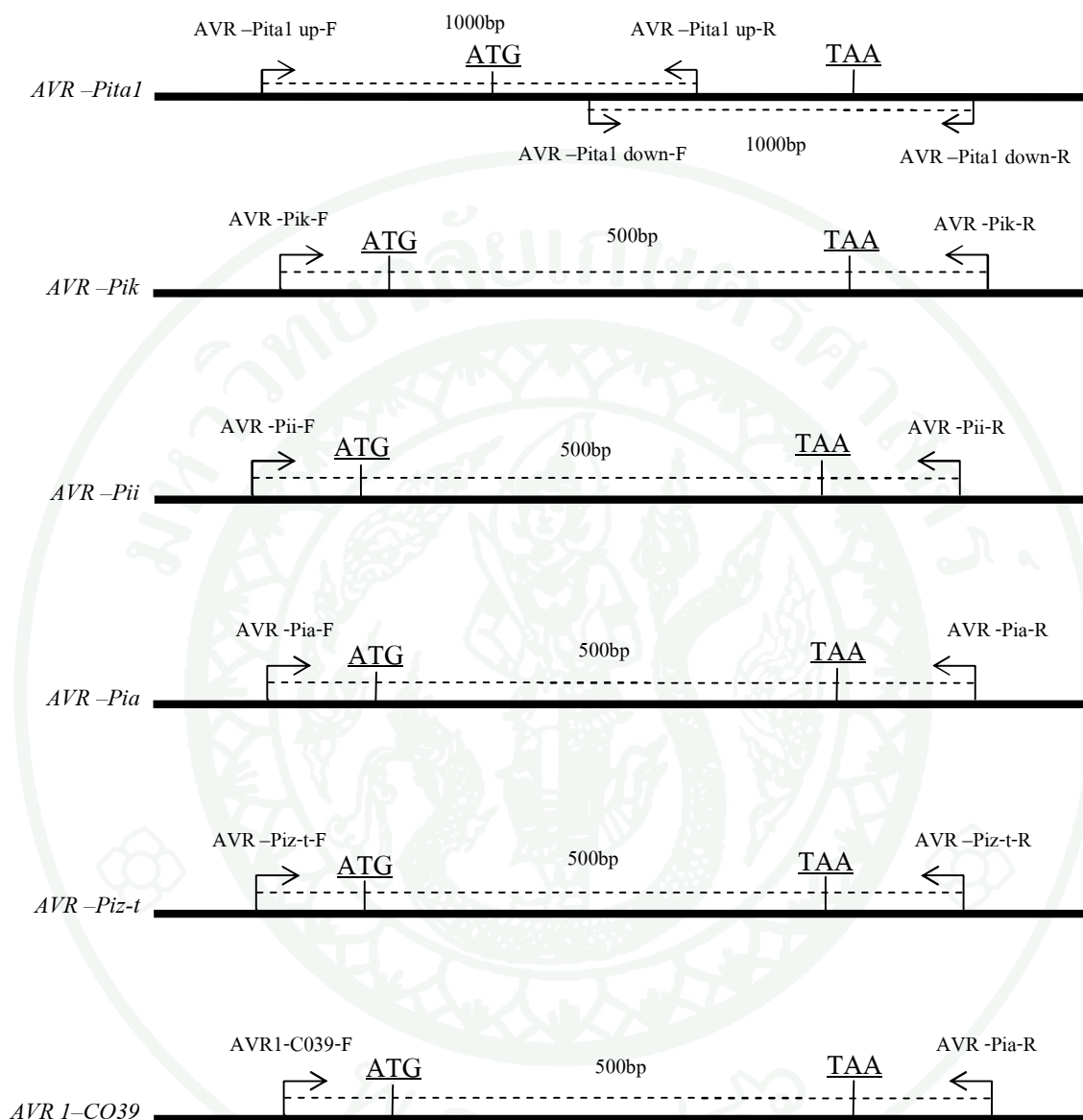
5.8 นำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และวัดปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Nano drop

6. การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนก่อโรค *AVR gene* (ตารางที่ 5) ให้สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ครอบคลุมทั้งบริเวณที่มีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน (coding region) (ภาพที่ 7) ไพรเมอร์ที่ออกแบบควรมีความยาวประมาณ 18-25 นิวคลีโอไทด์ ตรวจสอบระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแยกดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยวของไพรเมอร์ (T_m) ปริมาณของ G/C content ที่เหมาะสมการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ และการจับกันเองของคู่ไพรเมอร์ ด้วยโปรแกรม Fast PCR (Kalendar *et al.*, 2009)

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก 5'-3' จำนวนเบส อุณหภูมิหลอมละลาย (T_m) และขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	จำนวนเบส	(T_m , °C)	ขนาด (bp)
<i>AVR-Pita1 down-F</i>	CGCCTTTTATTGGTTTAATTCG	22	60	1063
<i>AVR-Pita1 down-R</i>	CCTCCATTCCAACACTAACG	20	60	
<i>AVR-Pita1 up-F</i>	AGTGGACCCTTGTCGATC	19	53	570
<i>AVR-Pita1 up-R</i>	CCGAAATCGCAACGGTGTG	19	55	
<i>AVR-Pik-F</i>	ATTCAACTGCCACTCTGCAC	20	56	534
<i>AVR-Pik-R</i>	TCAACCAAGCGTAAACCTCG	20	55	
<i>AVR-Pii-F</i>	TTATGCAGGCCCAAATCCG	19	56	534
<i>AVR-Pii-R</i>	TGAAATTCCCGCAATAGTCC	20	56	
<i>AVR-Pia-F</i>	TCAGCATCGCTTTGCCCTC	19	58	628
<i>AVR-Pia-R</i>	AAGCCTACCCTGGTTTCATCGTC	23	59	
<i>AVR-Piz-t-F</i>	ATTCTCCAGCTTGACATCG	20	55	629
<i>AVR-Piz-t-R</i>	GGACCTAAGTCGCAAGCCT	19	57	
<i>AVR1-CO39-F</i>	CCGCATTTTGCTAACCGCC	19	58	910
<i>AVR1-CO39-R</i>	GTGATAATTGCACACACGGCTG	22	57	



ภาพที่ 7 แสดงตำแหน่งจับของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในยีนก่อโรคต่าง ๆ

7. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยเตรียมในหลอด PCR ปริมาตร 0.2 mL ใส่ดีเอ็นเอตัวอย่าง 50 ng ลงที่ก้นหลอด โดยเคาะด้วยฝ่ามือเบา ๆ นำไปไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นผสมส่วนประกอบ (master mix) ใน eppendorf tube 1.5 mL ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของ PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (μl)
DNA template (50 ng/μL)	1.0
10X buffer	2.0
1 Mm dNTPs	2.0
5 μM AVR primer-F+R	1.0
1U TaqPolymerase	0.2
d.H ₂ O	13.8
Total	20

ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นเติมส่วนประกอบดังกล่าวปริมาตร 19 μL ลงในหลอดทำปฏิกิริยาที่เตรียมไว้เคาะด้วยฝ่ามือเบา ๆ นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบเท่าเดิม เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำมาทำ PCR ด้วยเครื่อง Thermal cycler (Bioer Technology, Hangzhou, China) โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่องดังนี้

- | | | |
|--------|-------------------------|----------|
| I. | 94 °C, 2 min | } 35 รอบ |
| II. | 94 °C, 30 s | |
| III. | (Primer AVR gene), 30 s | |
| V | 72 °C, 1 min | |
| IV. | 72 °C, 5 min | |
| และ VI | 16 °C; Hold | |

8. การตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

เตรียมถาดสำหรับเทเจลและหวีเสียบในชุดเตรียมเจลให้อยู่แนวระนาบ ชั่งผง agarose gel 1 กรัมลงใน 0.5X TBE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (1% agarose gel) หลอมเจลให้ละลายด้วยเตาไมโครเวฟแล้วค่อย ๆ เทลงบนถาดที่เตรียมไว้ให้หนาประมาณ 5 มิลลิเมตร ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว เติม 0.5X TBE buffer ให้ท่วมเจลถึงหวีเสียบออกจากเจลอย่างระมัดระวัง ยกถาดเจลออกจากชุดเตรียมเจลเบา ๆ วางใน electrophoresis chamber ใช้ไมโครปิเปตดูดสีย้อม (10X loading dye) ผสมกับดีเอ็นเอตัวอย่าง อัตราส่วน 4:1 หยดลงตรงช่องเจล หยดสารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้นมาตรฐาน (DNA Ladder) ที่ทราบความเข้มข้นตามลำดับเพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นกับดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบ โดยให้ด้านที่มีหลุมอยู่ด้านซ้าย โดยใส่กระแสไฟ 125 โวลต์นาน 1 ชั่วโมง ย้อมแผ่นเจลด้วย ethidium bromide (10 μ L ใน 0.5X TBE buffer 100 mL) โดยไม่ให้ถูกแสง ล้างน้ำกลั่น (de-stain) นาน 10 นาที นำแผ่นเจลตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV transilluminator อ่านค่าความเข้มข้นและขนาดโดยเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานและถ่ายภาพบันทึกผลการทดลอง

9. การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ และการหาลำดับเบส

สิ่งปนเปื้อนใน PCR product ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ DNA template, Taq polymerase dNTP, primer และ $MgCl_2$ จะถูกกำจัดเพื่อให้ได้ PCR product ที่บริสุทธิ์ (purification) โดยใช้ QIAquick PCR purification Kit จากนั้นส่งดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้คิวไพรเมอร์เดียวกันในกระบวนการ PCR ด้วยวิธี automated sequencing ที่ MACROGEN Inc., (เกาหลีใต้)

10. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนก่อโรคใหม่ *AVR-gene*

10.1 การทำ alignment ขึ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย *AVR-gene* (coding region)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของยีนก่อโรค *AVR-gene* ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละครั้งจะถูกตรวจสอบความถูกต้องซ้ำโดยการตรวจสอบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายอย่างแท้จริงโดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool-Nucleotide)

(Altschul *et al.*, 1990) จากนั้นทำการเชื่อมต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากแต่ละไพรเมอร์ เพื่อสร้างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของจีโนมเป้าหมาย โดยใช้โปรแกรม BioEdit 7.0 (Hall, 1999) ทำ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW (Thomson *et al.*, 1994) เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ของไฟล์ในรูปแบบต่าง ๆ (โดยเฉพาะ *.phy, *.fasta และ *.nxs) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลในขั้นต่อไป

10.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบนิวคลีโอไทด์ของยีนก่อโรค

วิเคราะห์หาองค์ประกอบของเบสในยีนก่อโรคซึ่งประกอบไปด้วย เบสไพริมิดีน ได้แก่ ไซโตซีน (C) ไทมิน (T) และยูราซิล (U) และเบสไพรีน ได้แก่ อะดีนีน (A) กวานีน (G) การเกิดรูปแบบของการกลายพันธุ์ ทั้งแบบ insertion/deletion และ base substitution หากตำแหน่งที่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (polymorphic sites) จัดรูปแบบ haplotype ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกัน ปริมาณการกลายพันธุ์แบบการแทนที่เบสอันประกอบด้วยจำนวนการกลายพันธุ์แบบ transition (TS) การกลายพันธุ์แบบ transversion (TV) การกลายพันธุ์ทั้งหมด (TS+TV) และสัดส่วนการกลายพันธุ์แบบ TS ต่อ TV (TS/TV) จะคำนวณด้วยโปรแกรม MEGA 5 (Kumar *et al.*, 2008)

10.3 การทดสอบสมดุลของประชากร (Neutrality test)

คำนวณหาค่าเฉลี่ยความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่งระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ (π) (Nei 1987) ค่าความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ของบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (θ) (Watterson, 1975) การหาอัตราส่วนของค่า K_a/K_s ratio [the ratio of the number of non-synonymous substitutions per non-synonymous site (K_a) to the number of synonymous substitutions per synonymous site (K_s)] เพื่อทดสอบกระบวนการคัดเลือก (selection) ตามธรรมชาติ กรณีที่ไม่มีภาวะการคัดเลือก (Neutral evolution) ค่าอัตราส่วนจะเท่ากับ 1 คือ $K_a=K_s$ ถ้ามีค่า >1 อาจเกิดจากการคัดเลือกแบบ positive Darwinian selection หากได้ค่า <1 อาจเกิดจากการคัดเลือกแบบ purifying (stabilizing) selection และทดสอบสมดุลของประชากร (Neutrality test) ด้วยการทดสอบทางสถิติ ประกอบไปด้วย Tajima's D test (Tajima, 1989), Fu and Li's D test (Fu and Li, 1993) และ Fu and Li's F test (Fu and Li, 1993) ด้วยโปรแกรม DnaSP เวอร์ชัน 5.0

10.4 การหาแบบจำลองการแทนที่เบส (nucleotide substitution) ที่เหมาะสม

แบบจำลองการแทนที่เบสที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม และการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี maximum likelihood ใช้การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA 5 (Kumar *et al.*, 2008) ซึ่งแบบจำลองเหล่านี้มีจุดประสงค์เพื่อป้องกันการประเมินจำนวนการแทนที่เบสที่น้อยกว่าความเป็นจริง (Nei and Kumar, 2000) โดยแบบจำลองการแทนที่เบสจะมีข้อกำหนดเกี่ยวกับค่าทางสถิติที่เกี่ยวข้อง เช่น ความถี่ของเบสแต่ละชนิด (base frequency; π) ตำแหน่งที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ (invariable site; I) อัตราการแทนที่ระหว่างนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิด (substitution rate among nucleotide; Φ) และความแตกต่างของอัตราการแทนที่เบสระหว่างเบสที่มีตำแหน่งแตกต่างกันในลำดับนิวคลีโอไทด์ (rate heterogeneity; Γ) (Posada and Buckley, 2004)

10.5 การหาระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance)

การคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม เป็นการคำนวณความแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา โดยใช้ข้อมูลการแทนที่เบสที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตตัวอย่าง ในการศึกษาครั้งนี้จะคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมของยีนก่อโรคแต่ละยีนด้วยวิธี pairwise distance ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนก่อโรคในแต่ละตัวอย่างของเชื้อราโรคไหม้ที่ทดสอบเป็นคู่หารด้วยจำนวนเบสบนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปรียบเทียบ ตามสมการที่พัฒนาโดย Nei and Li (1979) ซึ่งจะคำนวณค่าเฉลี่ยความแตกต่างของ นิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่งระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) ทั้งสอง ที่เรียกว่า nucleotide diversity โดยระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนก่อโรคแต่ละคู่ (pairwise distance) จะใช้ในการสร้าง phylogenetic tree ของยีนก่อโรคโดยมีสมการการคำนวณดังนี้

$$\pi = \sum_{x_i \neq x_j} \pi_{ij}$$

x_i คือความถี่ของชนิดของเบสบน sequence ใด ๆ ในแถว i และคอลัมน์ j

x_j คือความถี่ของชนิดของเบสบน sequence ใด ๆ ในแถว i และคอลัมน์ j

π_{ij} คือจำนวนความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่งระหว่างคู่ sequence ที่อยู่ในแถว i และคอลัมน์ j

10.6 การสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

10.6.1 การสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ)

สร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี NJ โดยใช้โปรแกรม MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) ประเมินความเชื่อมั่นของ tree ที่ได้ด้วยการทดสอบ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำแล้วสร้าง consensus tree ด้วยวิธี 50% majority rule ซึ่งจะแสดง branch ใด ๆ ใน consensus tree ก็ต่อเมื่อ branch นั้นปรากฏใน tree ที่ได้จากการทดสอบ bootstrap มากกว่าครึ่งหนึ่งของ tree ทั้งหมด

10.6.2 การสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum parsimony (MP)

สร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี MP โดยใช้โปรแกรม MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) กำหนดให้หาสัณฐาน (topology) ที่ดีที่สุดโดย Close-Neighbor-Interchange (CNI) ใช้ข้อมูลเฉพาะ parsimony informative site กำหนดให้ตำแหน่ง gap เป็นข้อมูลสูญหาย (missing data) สร้างprovisional MP tree ด้วยวิธี Stepwise addition algorithm โดยให้ลำดับการใช้ข้อมูลเป็นไปโดยสุ่มการทำ branch swapping ใช้วิธี tree-bisection-reconnection (TBR) rearrangement ไม่กำหนดจำนวนสูงสุดของสัณฐานที่ทดสอบและทดสอบความเชื่อมั่นของ tree ที่ได้ด้วย bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำโดยให้สุ่มดึงข้อมูลและเพิ่มจำนวนซ้ำของข้อมูลทุก ๆ 10 รอบ

10.6.3 การสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum likelihood (ML)

สร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี ML โดยใช้โปรแกรม MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) ใช้แบบจำลองการแทนที่เบสที่เหมาะสม ให้โปรแกรมคำนวณความถี่ของนิวคลีโอไทด์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่กำหนดให้ substitution rate categories เท่ากับ 4 และทดสอบความเชื่อมั่นของ tree ด้วย bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ

ผลและวิจารณ์

1. การสืบค้นข้อมูลยีนก่อโรค *AVR Gene* ที่มีผลเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรคไหม้

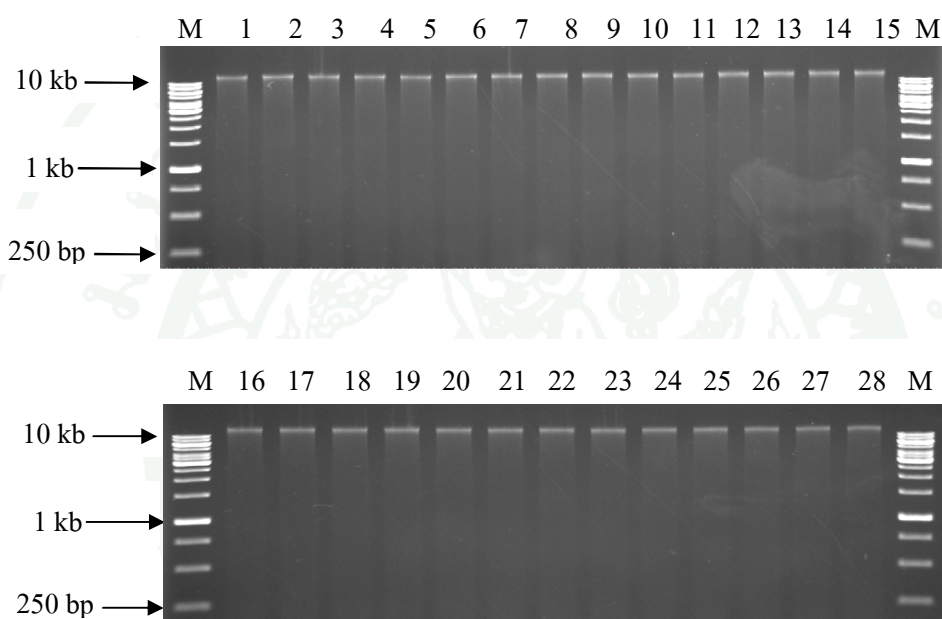
การสืบค้นหาข้อมูลของยีนก่อโรค *AVR gene* จากฐานข้อมูล http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/magnaporthe_grisea/MultiHome.html พบว่ายีนก่อโรคของเชื้อราโรคไหม้ *Magnaporthe oryzae* ที่มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนและมีปฏิสัมพันธ์กับยีนต้านทาน (resistance gene) ในข้าว ประกอบไปด้วยยีน *AVR-Pita* *AVR1-CO39* *AVR-Pizt* *AVR-Pia* *AVR-Pii* และ *AVR-Pik/Pikm/Pikp* ดังข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 7 โดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ต่อไป

ตารางที่ 7 ยีนก่อโรคและยีนต้านทานโรคไหม้ที่มีปฏิสัมพันธ์กันและก่อให้เกิดความต้านทาน

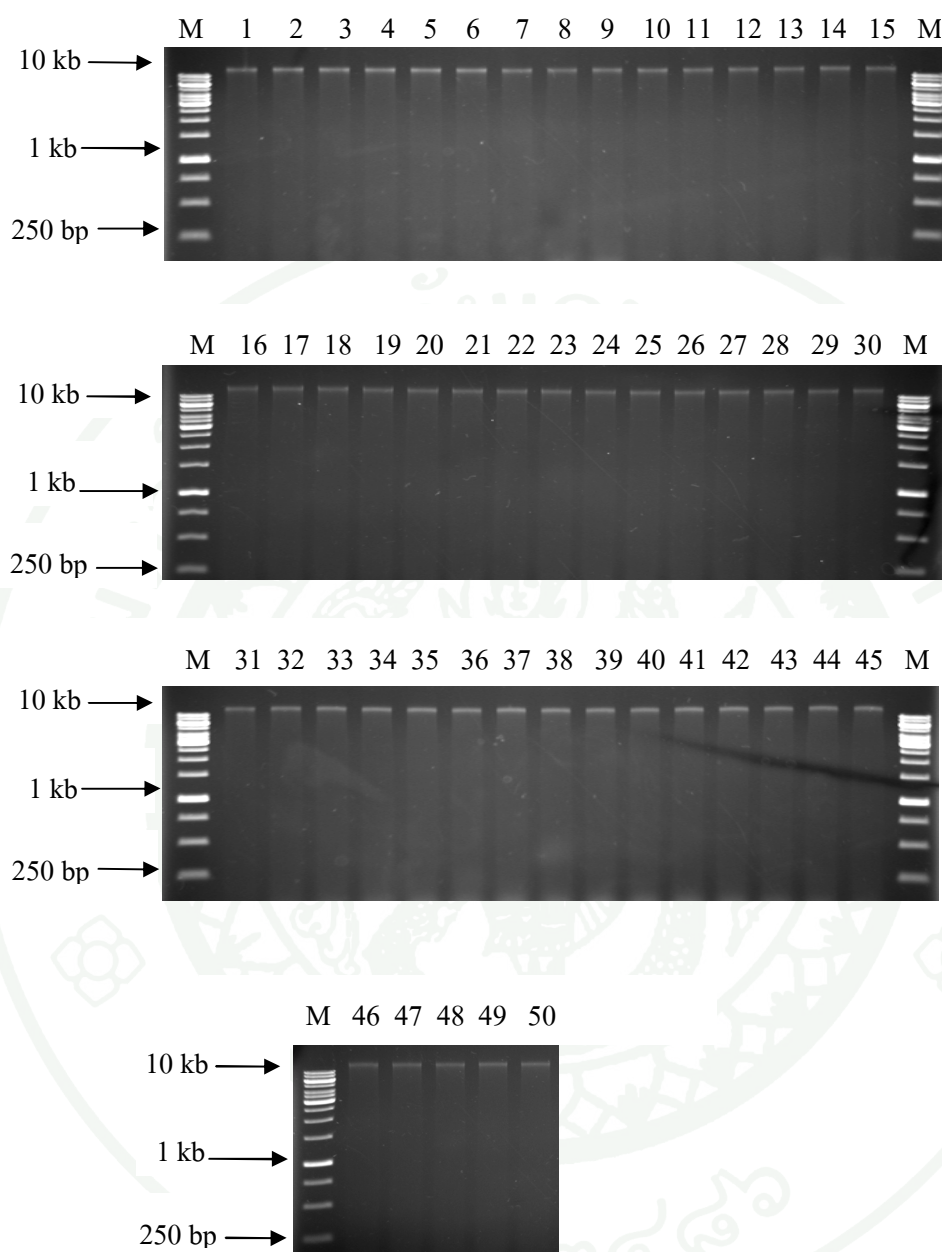
<i>Magnaporthe oryzae</i> (AVR-gene)		<i>Oryza sativa</i> (R-gene)	
Name	Reference	Name	Reference
<i>AVR-Pita1</i>	Orbach <i>et al.</i> , 2000	<i>Pita</i>	Bryan <i>et al.</i> 2000 Jia <i>et al.</i> , 2000
<i>AVR1-CO39</i>	Farman <i>et al.</i> , 2002	<i>Pi-CO39</i>	Chauhan <i>et al.</i> , 2002
<i>AVR-Pizt</i>	Li <i>et al.</i> , 2009	<i>Pizt</i>	Zhou <i>et al.</i> , 2006
<i>AVR-Pia</i>	Miki <i>et al.</i> , 2009 Yoshida <i>et al.</i> , 2009	<i>Pia</i>	Okuyama <i>et al.</i> , 2011
<i>AVR-Pii</i>	Yoshida <i>et al.</i> , 2009	<i>Pii</i>	Lee <i>et al.</i> , 2009
<i>AVR-Pik/Pikm/Pikp</i>	Yoshida <i>et al.</i> , 2009	<i>Pikm</i>	Ashikawa <i>et al.</i> , 2008 Costanzo and Jia 2010

2. การสกัดดีเอ็นเอ

ผลการสกัดดีเอ็นเอ (ภาพที่ 8) จากเส้นใยของเชื้อราโรคไหม้ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB โดยเป็นตัวอย่างที่รวบรวมมาจากปี 2549 และปี 2553 จำนวน 78 ตัวอย่าง ด้วยวิธี CTAB extraction เมื่อนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้



ภาพที่ 8 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเชื้อราโรคไหม้ที่รวบรวมมาจากปี 2549 โดย M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐานและลำดับตัวอย่าง 1-28 ตามตารางที่ 4



ภาพที่ 9 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเชื้อราโรคไหม้ที่รวบรวมมาจากรปี 2553 โดย M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐานและลำดับตัวอย่าง 1-50 ตามตารางที่ 3

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR

3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอเชื้อราโรคไหม้ (IDM)

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับดีเอ็นเอของเชื้อราโรคไหม้เพื่อใช้ในการตรวจสอบคุณภาพในการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR และเพื่อเป็นการตรวจสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอที่สกัดได้ว่าเป็นดีเอ็นเอของเชื้อราโรคไหม้ *Magnaporthe oryzae* โดยใช้ไพรเมอร์ IDM (5'-GACCTATGCAATCACCAC-3') และ (5'-CGTACTCGAGTGTAATCTCG-3') พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้โดยมีขนาดประมาณ 600 คู่เบส และสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่าง

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนก่อโรค *AVR-Pita1*

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีนก่อโรค *AVR-Pita1* โดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ AVR-Pita1 Up F (5' AGTGGACCCTTGTCGATC 3') AVR-Pita1 Up R (5' CCGAAATCGCAACGGTGTG 3') AVR-Pita1 down F (5' CGCCTTTTATTGGTTTAATTTCG3') และ AVR-Pita1 down R (5' CCT CCATTCCAACACTAACG 3') พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนก่อโรค *AVR-Pita1* ได้โดยมีขนาดประมาณ 570 และ 1,063 คู่เบส ตามลำดับ จากขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์ ได้ออกแบบไพรเมอร์ให้เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้อนเหลื่อมกัน (overlap) หลังจากการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต PCR (sequencing) สามารถรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence assembly) ที่ได้จากไพรเมอร์ทั้งสองคู่ จากนั้นกำจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนเกินออกจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่หามาได้ ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ที่ครอบคลุมตั้งแต่ตำแหน่งเริ่มต้น (start codon) จนถึงตำแหน่งสิ้นสุดของยีน (stop codon) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป จากตัวอย่างดีเอ็นเอเชื้อราโรคไหม้ทั้งหมดมี 30 ตัวอย่างที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ทั้งสองคู่ได้

3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนก่อโรค *AVR-Pik*

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนก่อโรค *AVR-Pik* โดยใช้ไพรเมอร์ *AVR-Pik-F* (5'ATTCAACTGCCACTCTGCAC 3') และ *AVR-Pik-R* (5'TCAACCAAGCGTAAACCTCG 3') พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน *AVR-Pik* ได้โดยมีขนาดประมาณ 500 คู่เบส โดยสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีนดังกล่าวได้ทั้งหมด 53 ตัวอย่าง ซึ่งครอบคลุมลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ตำแหน่งเริ่มต้น (start codon) จนถึงตำแหน่งสิ้นสุด (stop codon) ของยีน เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

3.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนก่อโรค *AVR-Pii*

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนก่อโรค *AVR-Pii* โดยใช้ไพรเมอร์ *AVR-Pii-F* (5' TTA TGCAGGCCCAAATCCG 3') และ *AVR-Pii-R* (5' TGAAATTCCCGCAATAGTCC 3') พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน *AVR-Pii* ได้โดยมีขนาดประมาณ 500 คู่เบส โดยสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีนดังกล่าวได้ทั้งหมด 41 ตัวอย่าง ซึ่งครอบคลุมลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ตำแหน่งเริ่มต้น (start codon) จนถึงตำแหน่งสิ้นสุด (stop codon) ของยีน เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

3.5 ยีนก่อโรคที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR

เมื่อพยายามเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *AVR1-CO39*, *AVR-Piz-t* และ *AVR-Pia* ด้วยไพรเมอร์ที่แสดงไว้ในตารางที่ 5 พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของทั้งสามยีนได้ถึงแม้จะปรับปรุงความเข้มข้นของส่วนประกอบต่าง ๆ ในปฏิกิริยา PCR แล้ว ได้แก่ เพิ่มความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ไพรเมอร์ ปริมาณของดีเอ็นเอต้นแบบ และชนิดของเอนไซม์ Taq polymerase รวมถึงปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในระยะ denaturing annealing และ extension แล้ว

4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนก่อโรค *AVR-Pita1*

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบนิวคลีโอไทด์ยีนก่อโรค *AVR-Pita1*

เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์และแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่าง ที่พบว่ามีการนิวคลีโอไทด์ผิดพลาดแล้ว จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *AVR-Pita1* ที่ได้จากเชื้อราโรคไหม้ทั้ง 30 ตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ายีน *AVR-Pita1* มีความเหมือนกันในลำดับนิวคลีโอไทด์ (identity) ที่ 93-100 % จากนั้นใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 885 ตำแหน่งในการวิเคราะห์องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGA 5 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *AVR-Pita1* ของเชื้อราโรคไหม้ *M. oryzae* มีองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ A=34.4% T=31.6% C=16.9% และ G=17.1% แสดงให้เห็นว่าในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pita1* มีลักษณะเป็น A+T bias คือพบนิวคลีโอไทด์ A มากที่สุดประมาณ 34.4% และพบนิวคลีโอไทด์ T ประมาณ 31.6%, นิวคลีโอไทด์ C ประมาณ 16.9% และ นิวคลีโอไทด์ G ประมาณ 17%

Sample	Nucleotide position							
								
	5	15	25	35	45	55	65	
O-137 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATT---	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CGATTTTCGGC	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
2.3 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CGATTTTCGGG	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
13.2 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CGATTTTCGGC	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
16.1 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CGATTTTCGG-	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
16.2 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CG-TTTCGGC	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
17.2 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATGCATTGTT	ATTTTCTTTT	CACACCGTTG	CCGTTCCGGG	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
19.2 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CCAATTTCGGA	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
20.2 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CGGTTTCGG-	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
21.2 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CGATTTTCGG-	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
22.1 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	C-GTTTCGG-	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
23.2 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	C-GTTTCGG-	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
24.1 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CGATTTTCGG-	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
25.1 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CGATTTTCGG-	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
32.1 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CCATTTTCGGA	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
10100 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CGATTTTCGGC	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
10301 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CGATTTTCGG-	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
10302 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CGATTTTCGG-	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
10459 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	C-GTTTCGG-	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
10551 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	C-GTTTCGG-	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
10581 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CG-TTTC-G-	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
10732 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CG-TTTCGGC	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
10760 AVR-Pita	ATGCTCTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGCTG	CG-TTTCGGC	CTTCACCAAC	ATAAGCACCT	
10812 AVR-Pita	ATGAT-CTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACTGTCC	CC-TTTCTG-	CTCCACCAAC	AATGGCACCT	
10837 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CGATTTTCGG-	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
10941 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTATT	ATTTT-TTTT	CACACCGTTG	CGATTTTCGG-	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
10945 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATT---	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CGATTTTCGG-	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
10971 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CGATTTTCGG-	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
10985 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CGATTTTCGG-	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
10993 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CGATTTTCGG-	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
11108 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CGATTTTCGGC	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
11109 AVR-Pita	ATGCTTTTTT	ATTCATTGTT	ATTTTTTTTTT	CACACCGTTG	CGATTTTCGG-	CTTCACCAAC	ATTGGCACCT	
Clustal Consensus	*** * ***	** *****	***** *****	***** *	* * * *	** ***** *	*****	

ภาพที่ 10 ผลการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *AVR-Pita1* โดยอ้างอิงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pita1* จากเชื้อราโรคไหม้ isolate O-137

Sample	Nucleotide position							
								
	75	85	95	105	115	125	135	
O-137 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
2.3 AVR-Pita	TTTCACGCCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
13.2 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
16.1 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
16.2 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
17.2 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
19.2 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
20.2 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
21.2 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
22.1 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
23.2 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
24.1 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
25.1 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
32.1 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
10100 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
10301 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
10302 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
10459 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
10551 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
10581 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
10732 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
10760 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
10812 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
10837 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
10941 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
10945 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
10971 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
10985 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
10993 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
11108 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
11109 AVR-Pita	TTTCACACCC	AGTTTACGAT	TACAATCCAA	TTCCAAACCA	TATCCACGGA	GATTTAAAAA	GGCGGGCTTA	
Clustal Consensus	*****	***	*****	*****	*****	*****	*****	

Sample	Nucleotide position							
								
	145	155	165	175	185	195	205	
O-137 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
2.3 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
13.2 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
16.1 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAAAT	
16.2 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
17.2 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
19.2 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
20.2 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
21.2 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
22.1 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
23.2 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
24.1 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
25.1 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
32.1 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
10100 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
10301 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
10302 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
10459 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
10551 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
10581 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
10732 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
10760 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
10812 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
10837 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
10941 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
10945 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
10971 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
10985 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
10993 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
11108 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
11109 AVR-Pita	TATTGAACGC	TATTCCCAAT	GTTTCAGATTC	GCAGGCCTCC	GAAATTCGTG	CCGCGCTAAA	AAGGTAAATT	
Clustal Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	***** *	

Sample		Nucleotide position							
									
		215	225	235	245	255	265	275	
O-137 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
2.3 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
13.2 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
16.1 AVR-Pita		GAAATCTTTT	AAAACAAAT	TGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
16.2 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
17.2 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
19.2 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
20.2 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
21.2 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
22.1 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
23.2 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
24.1 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
25.1 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
32.1 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
10100 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
10301 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
10302 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
10459 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
10551 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
10581 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
10732 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
10760 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
10812 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
10837 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
10941 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
10945 AVR-Pita		GAAACTCATT	AAAACAAATT	CAGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
10971 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
10985 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
10993 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
11108 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
11109 AVR-Pita		GAAACTCTTT	AAAACAAATT	CGGAAAACAA	TGTTAAATAT	TTTGTTTAGT	TGTGCCGAGC	TCGCCTCGTG	
Clustal Consensus		****	**	*****	*	*****	*****	*****	*****

Sample	Nucleotide position							
								
	285	295	305	315	325	335	345	
O-137 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
2.3 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
13.2 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
16.1 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
16.2 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
17.2 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
19.2 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
20.2 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
21.2 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
22.1 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
23.2 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
24.1 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
25.1 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCAGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
32.1 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
10100 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
10301 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
10302 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
10459 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
10551 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
10581 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
10732 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
10760 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
10812 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
10837 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
10941 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
10945 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
10971 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
10985 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
10993 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
11108 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
11109 AVR-Pita	GGGCTATCAC	GCCGTTAAAA	ATGACAATCG	GTTATTTAGA	TTAATCTTTA	AAACTGACAG	CACAGATATT	
Clustal Consensus	*****	** *****	*****	*****	*****	*****	*****	

Sample	Nucleotide position							
								
	355	365	375	385	395	405	415	
O-137 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
2.3 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
13.2 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
16.1 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
16.2 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
17.2 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
19.2 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
20.2 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
21.2 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
22.1 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
23.2 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
24.1 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
25.1 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
32.1 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
10100 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
10301 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
10302 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
10459 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
10551 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
10581 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
10732 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
10760 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
10812 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
10837 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
10941 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
10945 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
10971 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
10985 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
10993 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
11108 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
11109 AVR-Pita	CAAAACTGGG	TTCAAAAGAA	TTTTAACGAA	ATTTACAAGG	AATGTAACAG	GGACGCGGAC	GAAATTTCTC	
Clustal Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	

Sample		Nucleotide position							
									
		425	435	445	455	465	475	485	
O-137 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
2.3 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
13.2 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
16.1 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
16.2 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
17.2 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
19.2 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
20.2 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
21.2 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
22.1 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
23.2 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
24.1 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
25.1 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
32.1 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
10100 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
10301 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
10302 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
10459 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
10551 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
10581 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
10732 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
10760 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
10812 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
10837 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
10941 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
10945 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
10971 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
10985 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
10993 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
11108 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
11109 AVR-Pita		TAACCTGCCA	CGATAAAAAAT	GTTTATACGT	GCGTCCGAGA	AGGAGTTCAT	AATTTGGCGT	ATGCACTTAT	
Clustal Consensus		*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	

Sample		Nucleotide position							
									
		495	505	515	525	535	545	555	
O-137 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
2.3 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
13.2 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
16.1 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
16.2 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
17.2 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
19.2 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
20.2 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
21.2 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
22.1 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
23.2 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
24.1 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
25.1 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
32.1 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
10100 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
10301 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
10302 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
10459 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCG	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
10551 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
10581 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
10732 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
10760 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
10812 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
10837 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
10941 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
10945 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
10971 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
10985 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
10993 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
11108 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
11109 AVR-Pita		TAACGAAAA	GAAATTGTTA	TATGCCCTCC	TTTCTTCAAC	AACCCCGTAA	ACAGCAGGGA	AATTACTGCC	
Clustal Consensus		*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	

Sample		Nucleotide position							
									
		565	575	585	595	605	615	625	
O-137 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
2.3 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
13.2 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
16.1 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
16.2 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
17.2 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
19.2 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
20.2 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
21.2 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
22.1 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
23.2 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
24.1 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
25.1 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
32.1 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
10100 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
10301 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
10302 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
10459 AVR-Pita		GTTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
10551 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
10581 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
10732 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
10760 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
10812 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
10837 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
10941 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
10945 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGAATA	TAATTTAAAG	TAAATTTGCT	TTT-ACAAAT	
10971 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
10985 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
10993 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
11108 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
11109 AVR-Pita		GGTAACCAAG	ATACAGTTAT	ATTACATGAA	ATGGTGCATA	TAATTTTAAG	TAAGTTTGCT	TTT-ACAAAT	
Clustal Consensus		* *	*****	*****	*****	***	*****	***	*****

Sample	Nucleotide position							
								
	705	715	725	735	745	755	765	
O-137 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTA	CGAATGGGAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
2.3 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTCAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
13.2 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
16.1 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
16.2 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	AATTGCTGAA	
17.2 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
19.2 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
20.2 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
21.2 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
22.1 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
23.2 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
24.1 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GTGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
25.1 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
32.1 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	ATTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
10100 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTA	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
10301 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTA	CGAATGGGAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
10302 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
10459 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTA	CGAATGGGAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
10551 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
10581 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
10732 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
10760 AVR-Pita	GAGTGGAGAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
10812 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
10837 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
10941 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
10945 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
10971 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
10985 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTG	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
10993 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTA	CGAATGGGAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
11108 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTA	CGAATGGCAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
11109 AVR-Pita	GAGTGGAAAG	ATTATGGTTA	CGAATGGGAT	GGGATTCACA	AGTAAGTTGT	CGAAAAACAA	ATTTGCTGAA	
Clustal Consensus	***** **	***** **	***** **	* *****	* * *****	***** **	* *****	

Sample	Nucleotide position							
								
	775	785	795	805	815	825	835	
O-137 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
2.3 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTCATTAAT	ATTAGGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTCA	AAACCCCGAC	
13.2 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
16.1 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
16.2 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
17.2 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
19.2 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
20.2 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
21.2 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
22.1 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
23.2 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
24.1 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATACAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AATGTATTAA	AAACCCCGAC	
25.1 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
32.1 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATCAAT	TCTAATTAAT	GTTAAGTTTT	TATGGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
10100 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
10301 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
10302 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
10459 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
10551 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
10581 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
10732 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
10760 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
10812 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
10837 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
10941 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
10945 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
10971 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
10985 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
10993 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
11108 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
11109 AVR-Pita	TGTTGTTTAT	GTTGATAAAT	TCTAATTAAT	ATTAAGATTG	GATAGTACAG	AAAGTATTAA	AAACCCCGAC	
Clustal Consensus	*****	*****	**	***	*****	***	* **	

Sample	Nucleotide position				
					
	845	855	865	875	885
O-137 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTTGCACA	ATGTGCACGT	TATAAATATT	GTTAA
2.3 AVR-Pita	AGTTATGTTA	TTTTTGCACA	ATGTGCACGT	TATAAATATT	GTTAA
13.2 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTT-GCACA	ATGTGCACGT	TATAAATATT	GTTAA
16.1 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTG-----	-----	-----	-----
16.2 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTTGCACA	ATGTGCACGT	TATAA-TATT	GTTAA
17.2 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTTGCACA	ATGTGCACGT	TATAA--ATT	GTTAA
19.2 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTTGCACA	ATGTGCACGT	TATAA-TATT	GTTAA
20.2 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTT-GCACA	ATGTGCACGT	TATAA--ATT	GTTAA
21.2 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTCTTGCACA	ATGTGCACGT	TATAAATATT	GTTAA
22.1 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTTGCACA	ATGTGCACGT	TATAAATATT	GTTAA
23.2 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTTGCACA	ATGTGCACGT	TATAA-TATT	GTTAA
24.1 AVR-Pita	AGT-ATGCTT	GGATAGTACA	GAATGT--AT	TA-AAACCCC	GACAG
25.1 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTG-----	-----	-----	-----
32.1 AVR-Pita	AG-----	-----	-----	-----	-----
10100 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTTGCACA	ATGTGCACGT	TATAAATATT	GTTAA
10301 AVR-Pita	AGTTATGCT-	-----	-----	-----	-----
10302 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTTGCACA	ATG-----	-----	-----
10459 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTTGCACA	ATGTGCACGT	TATAAATATT	GTTAA
10551 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTTGCACA	ATGTGCACGT	TATAAATATA	GTTAA
10581 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTTGCACA	ATGTGCACGT	TATAA-TATT	GTTAA
10732 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTTGCACA	ATGTGCACGT	TATAAATATT	GTTAA
10760 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTTGCACA	TTGTGCACGT	TATAAATAAT	AGTAA
10812 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTTGCACA	ATGTGCACGT	TATAAATATT	GTTAA
10837 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTTGCACA	ATGTGCACGT	TATAAATATT	GTTAA
10941 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTTGCACA	ATGTGCACGT	-----	-----
10945 AVR-Pita	AGTT-----	-----	-----	-----	-----
10971 AVR-Pita	AGTTATGC--	-----	-----	-----	-----
10985 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTTGCACA	ATGTGCAC--	-----	-----
10993 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTTGCACA	ATGT-----	-----	-----
11108 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTTGCACA	ATGTGCACGT	TATAAATATT	GTTAA
11109 AVR-Pita	AGTTATGCTA	TTTTTGCACA	ATGTGCACGT	TATAAAAATT	GTTAA
Clustal Consensus	**				

4.2 ตำแหน่งที่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (polymorphic site) ในยีน *AVR-Pita1*

ผลการ alignment เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pita1* จากตัวอย่างเชื้อราโรคราไหม้ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อราโรคราไหม้สายพันธุ์ O-137 ที่มีการเผยแพร่ในฐานข้อมูล (GenBank ID: AF207841) (Orbach *et al.*, 2000) มีตำแหน่งของการเปรียบเทียบทั้งหมด 885 ตำแหน่ง เป็นตำแหน่งที่มีช่องว่าง (gap) ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์แบบ insertion/deletion ทั้งหมด 53 ตำแหน่ง เป็นตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์แบบแทนที่นิวคลีโอไทด์ 47 ตำแหน่ง ซึ่งแบ่งได้เป็น parsimony-informative site 2 ตำแหน่ง และ single variable site 45 ตำแหน่ง โดยเป็นตำแหน่งที่ไม่มีการกลายพันธุ์ 785 ตำแหน่ง เมื่อพิจารณาดำแหน่งของการกลายพันธุ์ทั้งหมด (insertion/deletion+substitution) ที่เกิดขึ้นทั้งหมด 100 ตำแหน่ง (ตารางที่ 8) เป็นการกลายพันธุ์ในบริเวณที่มีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน (exons) ทั้งหมด 53 ตำแหน่ง เป็นการกลายพันธุ์ที่รหัสพันธุกรรม (codon) ตำแหน่งที่ 1 2 และ 3 เท่ากับ 19 18 และ 16 ตำแหน่ง ดังจะเห็นได้ว่ารหัสพันธุกรรมตำแหน่งที่ 1 และ 2 จะเกิดการแทนที่นิวคลีโอไทด์สูงที่สุดและรหัสพันธุกรรมตำแหน่งที่ 3 เป็นตำแหน่งที่มีการอนุรักษ์สูงที่สุด เหตุที่เป็นเช่นนั้นเนื่องจากการกลายพันธุ์ของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 1 และ 2 ของรหัสพันธุกรรม จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน (non-synonymous substitution) มากกว่าการกลายพันธุ์ที่เกิดในตำแหน่งที่ 3 ดังนั้น นิวคลีโอไทด์ของรหัสพันธุกรรมในตำแหน่งที่ 1 และ 2 จึงอยู่ภายใต้การคัดเลือกมากกว่านิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 3 ในรหัสพันธุกรรม ซึ่งผลที่ได้คือนิวคลีโอไทด์ของรหัสพันธุกรรมตำแหน่งที่ 1 และ 2 มีอัตราการแทนที่เร็วกว่าตำแหน่งที่ 3 (Kumura, 1993) ทำการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นกรดอะมิโนและเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนยีน *AVR-Pita1* ที่มาจากเชื้อราโรคราไหม้สายพันธุ์ O-137 สามารถจัดจำแนกเป็นโปรตีนได้ 15 haplotype ซึ่งมีตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีความแตกต่างกันทั้งหมด 35 ตำแหน่ง รูปแบบ haplotype ที่พบมากที่สุดคือ haplotype II มีทั้งหมด 13 ตัวอย่างและพบลำดับกรดอะมิโนที่เป็น leucine insertion ในทุก ๆ ตัวอย่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 9) โดยความผันแปรของ AVR-Pita1 Protein ที่เกิดขึ้นเป็นการเกิดการกลายพันธุ์แบบ insertion/deletion และ substitution มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pita1*

Protein ^a	Allele ^b	3	5	c	8	12	13	14	15	16	17	20	21	25	154	168	180	183	187	191	194	195	198	199	200	201	204	206	212	213	214	215	216	217	222	223
AVR-Pita1	n/a	F	S	-	F	V	A	I	S	A	F	I	G	H	P	G	H	L	K	Y	D	G	K	L	D	S	S	K	A	I	F	A	Q	C	Y	C
I	1	F	S	L	F	V	A	I	S	G	F	I	G	R	P	G	H	L	K	C	H	G	K	L	D	S	S	Q	V	I	F	A	Q	C	Y	C
II	2, 7-10, 16	F	S	L	F	V	A	V	S	G	F	I	G	H	P	G	H	L	K	C	H	G	K	L	D	S	S	K	V	I	F	A	Q	C	Y	C
	18-20, 23-24	F	S	L	F	V	A	V	S	A	F	I	G	H	P	G	H	L	K	C	H	G	K	L	D	S	S	K	A	I	F	A	Q	C	Y	C
	26-27	F	S	L	F	V	A	V	S	A	F	I	G	H	P	G	H	L	K	C	H	G	K	L	D	S	S	K	A	I	F	A	Q	C	Y	C
III	3	F	S	L	F	V	A	I	S	A	F	I	G	H	P	G	H	L	K	C	H	G	K	L	D	S	S	K	A	I	L	A	Q	C	Y	S
IV	4	F	S	L	F	V	A	I	S	A	F	I	G	H	P	G	H	L	K	C	H	G	K	L	D	S	S	K	A	I	F	A	Q	C	Y	S
V	5	F	A	L	S	V	A	V	P	G	F	I	G	H	P	G	H	L	K	C	H	G	K	L	D	S	S	K	A	I	F	A	Q	C	Y	S
VI	6	F	S	L	F	V	A	I	S	D	F	I	G	H	P	G	H	L	K	C	H	G	K	L	D	S	S	K	A	I	F	A	Q	C	Y	S
VII	11	F	S	L	F	V	A	I	S	A	F	I	G	H	P	G	H	L	K	C	H	V	K	L	D	S	C	K	A	W	I	V	Q	N	P	R
VIII	12	F	S	L	F	V	A	I	S	A	F	I	G	H	P	G	H	L	K	C	H	G	K	L	D	S	S	K	A	I	L	A	Q	C	Y	S
IX	13	F	S	L	F	V	A	I	S	D	F	I	G	H	P	G	H	L	K	C	H	G	N	F	Y	G	S	K	A	I	F	A	Q	C	Y	S
X	14, 29	F	S	L	F	V	A	I	S	A	F	I	G	H	P	G	H	L	K	Y	D	G	K	L	D	S	S	K	A	I	F	A	Q	C	Y	S
XI	15, 28, 30	F	S	L	F	V	A	I	S	A	F	I	G	H	P	G	H	L	K	Y	D	G	K	L	D	S	S	K	A	I	F	A	Q	C	N	S
XII	19	F	S	L	F	V	A	V	S	A	F	I	G	H	R	V	H	L	K	Y	D	G	K	L	D	S	S	K	A	I	F	A	Q	C	Y	S
XIII	21	F	S	L	F	A	A	I	S	A	F	I	N	H	P	G	H	L	R	C	H	G	K	L	D	S	S	K	A	I	F	A	H	C	Y	S
XIV	22	L	S	L	F	V	P	I	S	A	S	N	G	H	P	G	H	L	K	C	H	G	K	L	D	S	S	K	A	I	F	A	Q	C	Y	S
XV	25	F	S	L	F	V	A	I	S	A	F	I	G	H	P	G	N	I	K	C	H	G	K	L	D	S	S	K	A	I	F	A	Q	C	Y	S

ภาพที่ 11 Haplotype ของเชื้อราโรคไหม้แต่ละ isolated และตำแหน่งที่มีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันของยีน *AVR-Pita1*

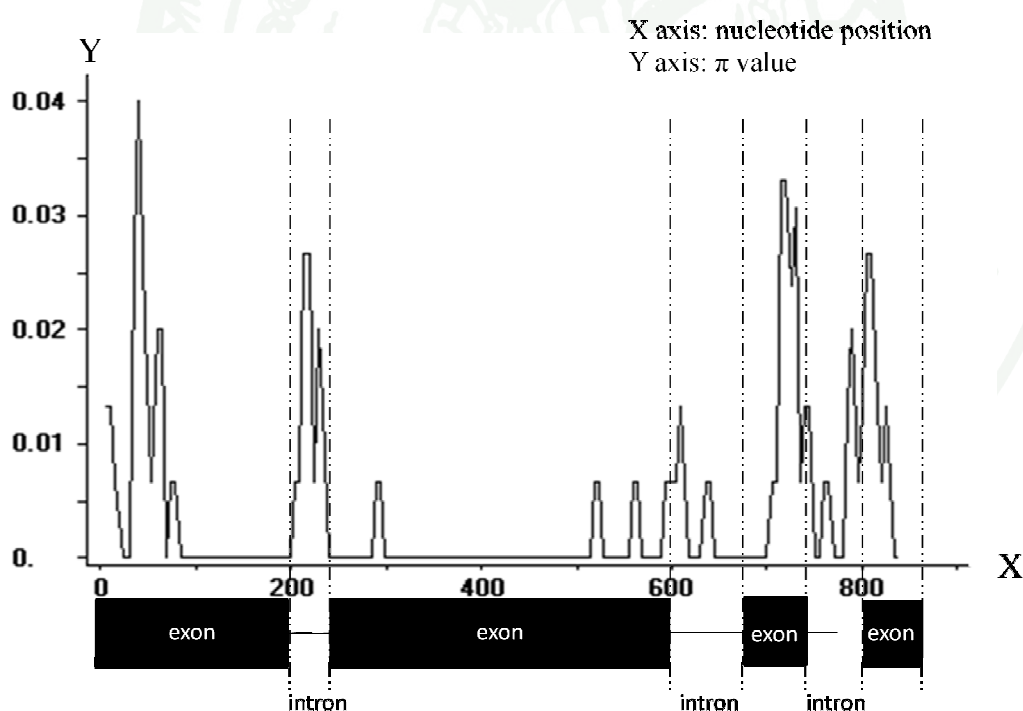
4.3 การทดสอบสมมูลของประชากร (Neutrality test)

ผลการหาค่าเฉลี่ยความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่งระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ (π) มีค่าเท่ากับ 0.00429 ซึ่งมีค่าค่อนข้างต่ำ แสดงให้เห็นว่ามีความผันแปรที่เกิดขึ้นในยีน *AVR-Pita1* ทั้ง 30 ตัวอย่าง โดยความแปรผันที่เกิดขึ้นมากจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ coding และ non-coding region จากการวิเคราะห์ดังกล่าว sliding window สามารถแสดงให้เห็นถึงรูปแบบของความผันแปรและค่าเฉลี่ยของความแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 10) โดยตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างและส่งผลถึงความผันแปรของยีน *AVR-Pita1* มักจะพบอยู่ในส่วนของ coding region โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.00378 และในส่วนของ non coding region มีค่าเท่ากับ 0.00577 ค่าความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ของบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (θ) ในบริเวณส่วนของ coding region มีค่าเท่ากับ 0.01143 และในส่วนของ non-coding region มีค่าเท่ากับ 0.02184 (ตารางที่ 10) การหาอัตราส่วนของค่า K_a/K_s ratio [the ratio of the number of non-synonymous substitutions per non-synonymous site (K_a) to the number of synonymous substitutions per synonymous site (K_s)] มีค่าเท่ากับ 3.995 (ตารางที่ 10) จากผลการทดสอบอัตราส่วนของค่า K_a/K_s มีค่า >1 ผลการทดสอบทางสถิติได้ค่า Tajima's D (Tajima, 1989) Fu and Li's D (Fu and Li, 1993) และ Fu and Li's F (Fu and Li, 1993) ได้ค่าที่เป็นลบและมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 10) ผลการทดสอบทางสถิติแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของยีน *AVR-Pita1* ในกลุ่มตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมมาจากประเทศไทยมีความเบี่ยงเบนไปจากทฤษฎี Neutral (Kimura, 1983) จากผลการทดสอบสมมูลประชากรด้วยค่าทดสอบต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pita1* เกิดจากอิทธิพลของกลไกทางวิวัฒนาการและการปรับตัวของเชื้อราโรคไหม้ ซึ่งเป็นกระบวนการคัดเลือกแบบ positive selection

ตารางที่ 8 ค่าการทดสอบสมมติฐานการ (Neutrality test) ยีน *AVR-Pita1*

Coding sites	H	S	π	θ	Tajima's D	Fu and Li's D*	Fu and Li's F*
<i>AVR-Pita1</i>							
Coding	12	26	0.00378	0.01143	-2.3910**	-4.3022**	-4.3405**
Non coding	7	18	0.00577	0.02184	-2.5346***	-4.5233**	-4.5733**
Entire gene	15	47	0.00429	0.01426	-2.5979***	-4.8486**	-4.8486**

หมายเหตุ H คือ Number of haplotypes, S คือ Number of segregating sites, π คือ nucleotide diversity, θ คือ Watterson's estimators และ * คือค่าความเชื่อมั่น * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.



ภาพที่ 12 sliding window ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *AVR-Pita1*

4.4 การวิเคราะห์ molecular phylogenetics ของลำดับนิวคลีโอไทด์

4.4.1 การหาแบบจำลองการแทนที่เบส (nucleotide substitution model) ที่เหมาะสม

ก่อนการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ จำเป็นต้องวิเคราะห์หาแบบจำลองการแทนที่เบสที่เหมาะสม จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *AVR-Pita1* ทั้ง 885 ตำแหน่ง ด้วยโปรแกรม MEGA 5 (Kumar *et al.*, 2008) ซึ่งจะทำนายความเป็นไปได้หรือสัดส่วนของการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่คาดว่าจะเกิดขึ้นในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนั้น จากผลการวิเคราะห์พบว่าแบบจำลองการแทนที่เบสของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ดีที่สุด คือ GTR+I+G (GTR = General Time Reversible I = invariable G = gamma) GTR model มีข้อกำหนดคือ ความถี่เบสแต่ละชนิดไม่เท่ากัน (variable base frequencies; $\pi_A \neq \pi_C \neq \pi_G \neq \pi_T$) อัตราการแทนที่เบสแต่ละรูปแบบมีความถี่ไม่เท่ากัน โดยมีความถี่เบสแต่ละชนิดคือ $\pi_A=0.3444$ $\pi_C=0.1690$ $\pi_G=0.1702$ และ $\pi_T=0.3164$ และกำหนด substitution rate matrix ดังต่อไปนี้

	A	U	C	G
A	-	7.60	3.99	6.81
U	8.27	-	8.72	5.22
C	8.14	16.34	-	5.74
G	13.77	9.70	5.70	-

แบบจำลองนี้มีการกำหนดค่าให้กับรูปแบบการแทนที่เบส 6 แบบ (Φ_{A-C} , Φ_{A-G} , Φ_{A-T} , Φ_{C-G} , Φ_{C-T} , Φ_{G-T} ; nst = 6) แบบจำลองการแทนที่เบสที่ได้จะถูกใช้เป็นข้อมูลในการคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) และการสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) Maximum likelihood (ML) และ Maximum parsimony (MP)

4.4.2 การหาระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance)

ผลการคำนวณค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ทั้ง 30 ตัวอย่าง จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pita* พบว่าได้ค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคไหม้มีค่า 0.004 โดยมีค่าต่ำสุดคือ 0.000 และมีค่าสูงสุดคือ 0.017 (ตารางที่ 11) จากข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่ายีน *AVR-Pita1* มีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยมากและยังแสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงกันของยีน *AVR-Pita1* ในเชื้อราโรคไหม้ได้เป็นอย่างดีเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมของยีน *AVR-Pita1* นั้นจะใช้ประกอบการวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกับผลการสร้างสายพันธุ์ทางวิวัฒนาการซึ่งจะได้กล่าวต่อไป

	Avr-Pital	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
(1)Avr-Pital																							
(2)2.3	0.009																						
(3)13.2	0.002	0.006																					
(4)16.1	0.010	0.013	0.007																				
(5)16.2	0.004	0.007	0.001	0.009																			
(6)17.2	0.005	0.009	0.002	0.010	0.004																		
(7)19.2	0.004	0.007	0.001	0.009	0.002	0.004																	
(8)20.2	0.002	0.006	0.000	0.007	0.001	0.002	0.001																
(9)21.2	0.002	0.006	0.000	0.007	0.001	0.002	0.001	0.000															
(10)22.1	0.002	0.006	0.000	0.007	0.001	0.002	0.001	0.000	0.000														
(11)23.2	0.002	0.006	0.000	0.007	0.001	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000													
(12)24.1	0.007	0.011	0.005	0.012	0.006	0.007	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005												
(13)25.1	0.004	0.007	0.001	0.009	0.002	0.004	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001	0.006											
(14)32.1	0.011	0.015	0.009	0.016	0.010	0.011	0.010	0.009	0.009	0.009	0.009	0.013	0.010										
(15)10100	0.001	0.007	0.001	0.009	0.002	0.004	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001	0.006	0.002	0.010									
(16)10301	0.000	0.009	0.002	0.010	0.004	0.005	0.004	0.002	0.002	0.002	0.002	0.007	0.004	0.011	0.001								
(1)10302	0.002	0.006	0.000	0.007	0.001	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.001	0.009	0.001	0.002							
(18)10459	0.002	0.011	0.005	0.012	0.006	0.007	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005	0.010	0.006	0.013	0.004	0.002	0.005						
(19)10551	0.002	0.006	0.000	0.007	0.001	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.001	0.009	0.001	0.002	0.000	0.005					
(20)10581	0.002	0.006	0.000	0.007	0.001	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.001	0.009	0.001	0.002	0.000	0.005	0.000				
(21)10732	0.002	0.006	0.000	0.007	0.001	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.001	0.009	0.001	0.002	0.000	0.005	0.000	0.000			
(22)10760	0.007	0.011	0.005	0.012	0.006	0.007	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005	0.010	0.006	0.013	0.006	0.007	0.005	0.010	0.005	0.005	0.005		
(23)10812	0.011	0.015	0.009	0.016	0.010	0.011	0.010	0.009	0.009	0.009	0.009	0.013	0.010	0.017	0.010	0.011	0.009	0.013	0.009	0.009	0.009	0.013	

ภาพที่ 13 ค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคไหม้แต่ละตัวอย่างโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AVR-Pital

	Avr-Pital	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
(24)10837	0.002	0.006	0.000	0.007	0.001	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.001	0.009	0.001	0.002	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.005	0.009
(25)10941	0.002	0.006	0.000	0.007	0.001	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.001	0.009	0.001	0.002	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.005	0.009
(26)10945	0.009	0.012	0.006	0.013	0.007	0.009	0.007	0.006	0.006	0.006	0.006	0.011	0.007	0.015	0.007	0.009	0.006	0.011	0.006	0.006	0.006	0.011	0.015
(27)10971	0.002	0.006	0.000	0.007	0.001	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.001	0.009	0.001	0.002	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.005	0.009
(28)10985	0.002	0.006	0.000	0.007	0.001	0.002	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.001	0.009	0.001	0.002	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.005	0.009
(29)10993	0.000	0.009	0.002	0.010	0.004	0.005	0.004	0.002	0.002	0.002	0.002	0.007	0.004	0.011	0.001	0.000	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.007	0.011
(30)101108	0.001	0.007	0.001	0.009	0.002	0.004	0.002	0.001	0.001	0.001	0.001	0.006	0.002	0.010	0.000	0.001	0.001	0.004	0.001	0.001	0.001	0.006	0.010
(31)101109	0.000	0.009	0.002	0.010	0.004	0.005	0.004	0.002	0.002	0.002	0.002	0.007	0.004	0.011	0.001	0.000	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.007	0.011

	24	25	26	27	28	29	30	31
(24)10837								
(25)10941	0.000							
(26)10945	0.006	0.006						
(27)10971	0.000	0.000	0.006					
(28)10985	0.000	0.000	0.006	0.000				
(29)10993	0.002	0.002	0.009	0.002	0.002			
(30)101108	0.001	0.001	0.007	0.001	0.001	0.001		
(31)101109	0.002	0.002	0.009	0.002	0.002	0.000	0.001	

ภาพที่ 13 (ต่อ)

4.4.3 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของเชื้อราโรคไหม้แต่ละตัวอย่างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pita1*

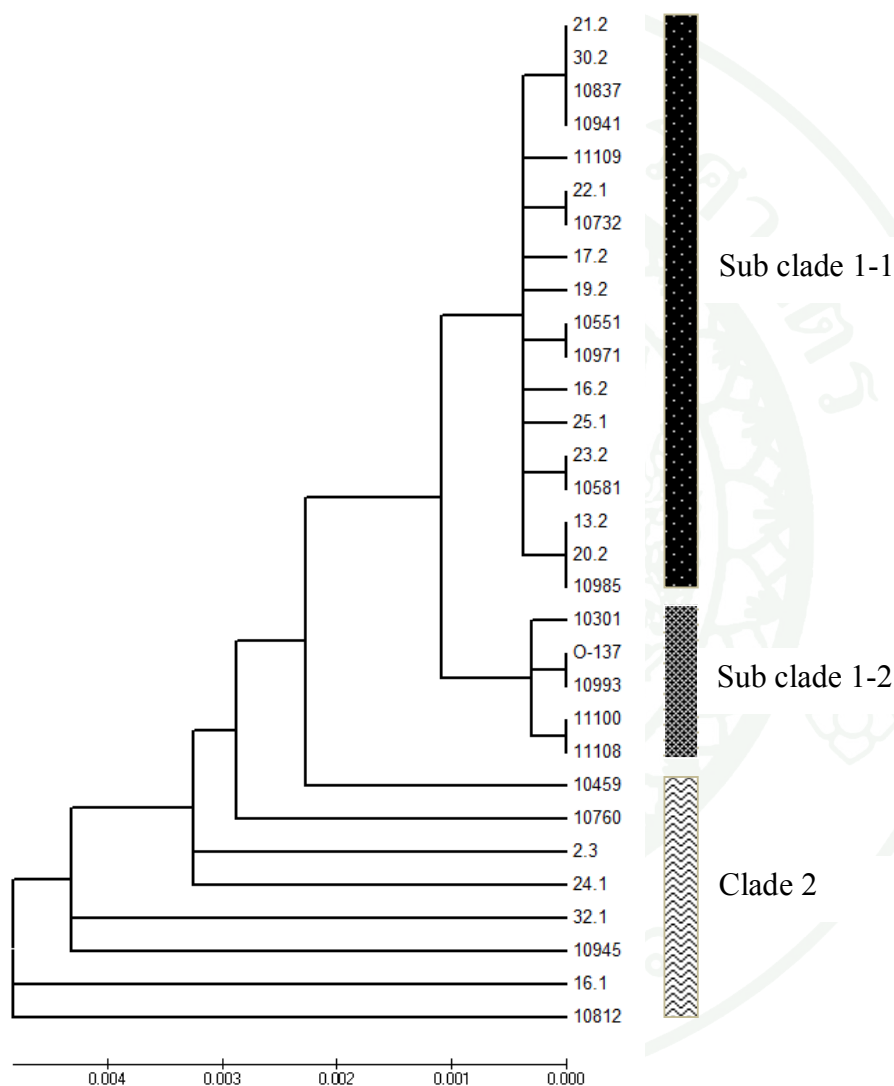
ผลการสร้าง phylogenetic tree ของยีน *AVR-Pita1* ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) โดยใช้เชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ 0-137 เป็น Reference วิธี NJ (ภาพที่ 11) ที่ใช้ข้อมูลระยะห่างทางพันธุกรรม ทดสอบ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ สร้าง consensus tree ด้วยวิธี 50% majority-rule พบว่า สามารถจัดลำดับความสัมพันธ์ของเชื้อราโรคไหม้โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pita1* ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ clade 1 แบ่งออกเป็น sub clade 1-1 และ sub clade 1-2 และ clade 2 (ภาพที่ 11)

ผลการสร้าง phylogenetic tree ของยีน *AVR-Pita1* ด้วยวิธี Maximum parsimony (MP) โดยใช้เชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ 0-137 เป็น Reference วิธี MP (ภาพที่ 12) ทดสอบ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยมี parsimony-informative site จำนวน 6 ตำแหน่งสร้าง consensus tree ด้วยวิธี 50% majority-rule พบว่าสามารถจัดลำดับความสัมพันธ์ของเชื้อราโรคไหม้โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pita1* ได้เป็น 2 กลุ่มเช่นเดียวกับวิธี NJ (ภาพที่ 12)

ผลการสร้าง phylogenetic tree ของยีน *AVR-Pita1* ด้วยวิธี Maximum likelihood (ML) โดยใช้เชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ 0-137 เป็น Reference วิธี MP (ภาพที่ 13) หา tree ที่มีความน่าจะเป็นสูงสุดจาก tree ที่เป็นไปได้ประกอบด้วยแบบจำลอง GTR+G+I ทดสอบ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ พบว่า ได้ phylogenetic tree ที่มีค่า $-\ln \text{likelihood} = -1791.2$ สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้มีพื้นฐานสอดคล้องกับ phylogenetic tree ที่สร้างโดยวิธี NJ และ MP

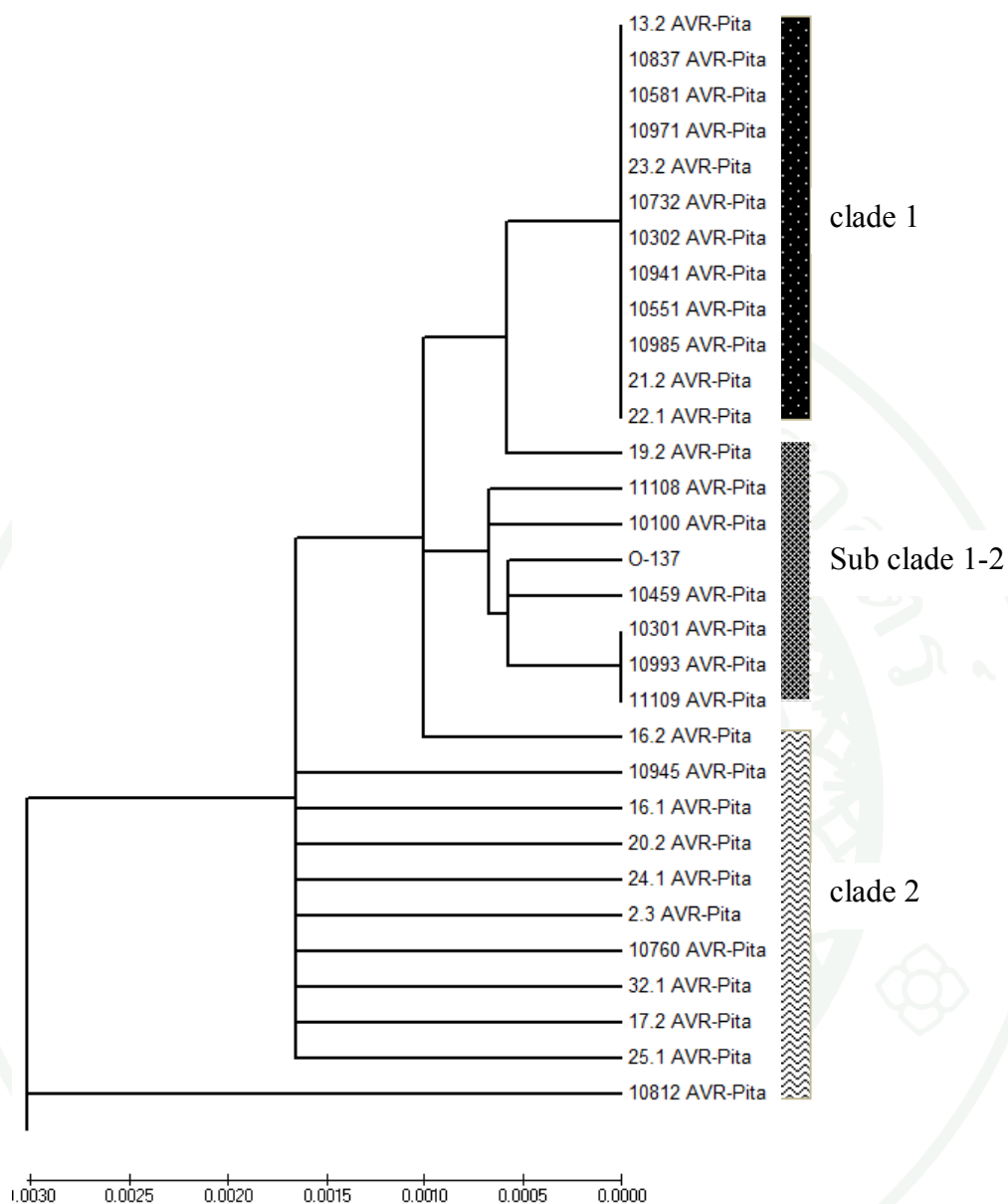
ผลที่ได้จากการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี NJ MP และ ML แสดงให้เห็นว่า tree มีพื้นฐานคล้ายคลึงกัน โดยความแตกต่างระหว่าง phylogenetic tree ที่สร้างจากแต่ละวิธีเป็นความแตกต่างของความสัมพันธ์ภายในเท่านั้น ซึ่ง tree ที่ได้สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของตัวอย่างออกเป็น clade 1 มีวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกันสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้เป็น sub clade 1-1 และ sub- clade 1-2 ส่วน clade 2 เป็นกลุ่มตัวอย่างที่มีวิวัฒนาการแยกกันอย่างชัดเจนและไม่มีตัวอย่างใดที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันเลย จากผลการสร้าง phylogenetic tree จะเห็นว่าช่วงเวลาและภูมิภาคที่แตกต่างกันในการเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ไม่มีผลต่อความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่เกิดขึ้น วิวัฒนาการของยีน *AVR-Pita1* มี

ความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน มีเพียงบางตัวอย่างเท่านั้นที่แสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์แยกออกมาจากกลุ่มอย่างชัดเจน ผลที่ได้นั้นมีความสอดคล้องกันกับผลการหาค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีค่าต่ำเช่นเดียวกับค่าเฉลี่ยระยะทางพันธุกรรมของตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ที่มีค่าต่ำเช่นเดียวกัน

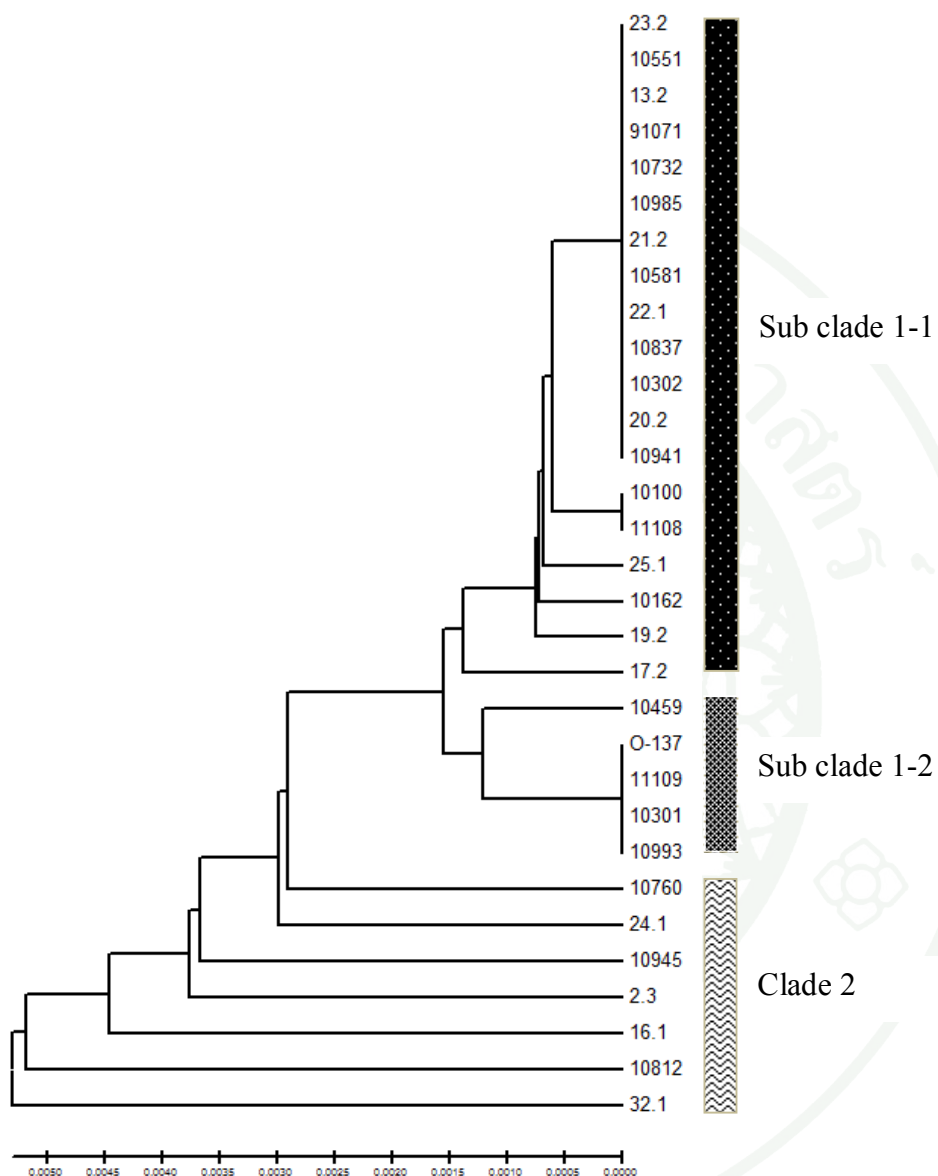


ภาพที่ 14 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากวิธี NJ โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

AVR-Pita1



ภาพที่ 15 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากวิธี MP โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pita1*



ภาพที่ 16 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากวิธี ML โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pita1*

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนก่อโรค *AVR-Pik*

5.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบนิวคลีโอไทด์ยีนก่อโรค *AVR-Pik*

เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์และแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่าง ที่พบว่ามีการนิวคลีโอไทด์ผิดพลาดแล้ว นำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *AVR-Pik* ที่ได้จากเชื้อราโรคไหม้ทั้ง 53 ตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ายีน *AVR-Pik* มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ (identity) 54-100% จากนั้นใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 342 ตำแหน่งในการวิเคราะห์องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGA 5 พบว่าลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *AVR-Pik* ของเชื้อราโรคไหม้ *M. oryzae* มีองค์ประกอบของเบส A=28.1% T=29.4% C=22.0% และ G=20.5% แสดงให้เห็นว่าในบริเวณของดีเอ็นเอเป้าหมายของยีน *AVR-Pik* มีลักษณะเป็น A+T bias ก็คือพบนิวคลีโอไทด์ A มากที่สุดประมาณ 28.1% และพบนิวคลีโอไทด์ T ประมาณ 29.4% นิวคลีโอไทด์ C ประมาณ 22.0% และ นิวคลีโอไทด์ G ประมาณ 20.5% จากข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการใช้นิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดไม่เท่ากัน ซึ่งการเกิด A+T bias ที่พบจากการวิเคราะห์องค์ประกอบนิวคลีโอไทด์ยีน *AVR-Pik* สอดคล้องกับการเกิด A+T bias เมื่อวิเคราะห์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pita1*

Sample	Nucleotide position							
								
	5	15	25	35	45	55	65	
Ina86 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
1.1 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
2.3 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
3.1 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
5.1 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
6.5 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
8.2 AVR-Pik	ATGTATGTTT	GTTACTTCTT	CACATTCCTT	CTCTCTTTGT	TTGCTGTCTG	TCTCTGCCAT	GACTACCCAG	
9.1 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
11.2 AVR-Pik	ATGCATGTTA	GCACTTTTCAT	CACATTCCTT	CTCTCTTTCT	TAAGTGAAGT	TGTCGTCAAT	GATGACCCAG	
13.2 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
14.2 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
15.1 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
16.1 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
16.2 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
17.2 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
18.3 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
19.2 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
20.2 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
21.2 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
22.1 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
23.2 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
24.1 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
25.1 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
27.1 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
28.1 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
32.1 AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAAGTGTTCG	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
Clustal Consensus	** **		** ** *	** *	*	* * * * *		

ภาพที่ 17 ผลการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ AVR-Pik โดยอ้างอิงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ AVR-Pik จากเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ Ina86

Sample		Nucleotide position							
									
		5	15	25	35	45	55	65	
10100	AVR-Pik	ATGCATGCGG	CCTATTCTTA	CACCATCATT	CCTTCTTTTCG	TAACGGGCTG	TGGCGGCAAT	GCCTAACGAA	
10301	AVR-Pik	ATGCGTGCGA	CCTATTTTAA	CACCTTCATT	CCTACTTTTCG	TAACGGGCTG	TGGCGGCAAT	GCCTACCGAA	
10302	AVR-Pik	ATGTATGTGA	GTTATTTTTT	CACATTCCTT	CCTTCTTTGT	TAACGACTG	TGTCTGCCAT	GCATGACCAG	
10459	AVR-Pik	ATGTATGTGA	GTTACCACTT	TTAACTCCTT	CCTTCTTTTCG	TAACGAACTG	TCTCTGCCAT	GCATGCCCAA	
10551	AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAACGTGCGC	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
10552	AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAACGTGCGC	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
10576	AVR-Pik	ATGTATGTGA	GTTACTTCTT	CACATTCCTT	CCTTCTTTGT	TAACGACTG	TGTCTGCCAT	GCATGCCCAG	
10577	AVR-Pik	ATGCATGTGA	GCACCTTCTT	CACATTCCTT	CCTTCTTTGT	TAACGACTG	TGTCTGCCAT	GCATAACCAG	
10578	AVR-Pik	ATGCATGTGA	GTTATTTTTT	CACATTCCTT	CTTCTTTTGT	TAACGACTG	TGTCTGCAAT	GCCTGCCCAG	
10581	AVR-Pik	ATGCATGTGA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCTCTTTGG	GAACGTGACG	TGTCTTCAAT	GCCTAACCAG	
10652	AVR-Pik	ATGCATGTGA	GTTACTTCTT	CACATTCCTT	CCTTCTTTGT	TAACGGACTG	TCTCTGCCAT	GACTGCCCAG	
10681	AVR-Pik	ATGTATGTGA	GTTACTTTTT	CACATTCCTT	CCTTCTTTGT	TAACGACTG	TGTCTGCCAT	GCCTAACCAG	
10694	AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAACGTGCGC	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
10732	AVR-Pik	ATGTATGTGA	GTTATTTTTT	CACATTCCTT	CCTTCTTTGT	TAACGACTG	TGTCTGCCAT	GCATAACCAG	
10760	AVR-Pik	ATGTATGCGT	GTTACTACTT	CACATTCCTT	CCTTCTTTGT	TAACGACTG	TGTCTGCCAT	GCCTGCCCAA	
10812	AVR-Pik	ATGCATGTGA	GTTATTTCTT	CACATTCCTT	CCTTCTCTGT	TTGCTGACTG	TGTCTGCCAT	GCCTGCCCAG	
10837	AVR-Pik	ATGCATGTGA	GTTACTACTT	CACATTCCTT	CCTTCTTTGT	TAACGACTG	TGTCTGCCAT	GCATGACCAG	
10873	AVR-Pik	ATGCATGTGA	GCACCTTCTT	CACATTCCTT	CCCTCTTTGT	TAACGACTG	TGTCTGCCAT	GCCTGCCCAG	
10926	AVR-Pik	ATACATGTGA	GTTACTTCTT	CACATTCCTT	CCTTCTTTGT	TAACGACTG	TGTCTGCCAT	GCATGCCCAG	
10927	AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAACGTGACG	TGTCTTCAAT	GCCGAAACGG	
10941	AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAACGTGCGC	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
10945	AVR-Pik	ATATATGTGA	GTTACTACTT	CACACTCCTT	CCTTCTTTGT	TAACGACTG	TCTCTGCCAT	GCATAACCAG	
10971	AVR-Pik	ATGTATGTTT	GTTATTTCTT	CACATTCCTT	CCTTCTTTGT	TAACGACTG	TGTCTGCCAT	GCATGCCCAG	
10985	AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAACGTGCGC	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
10987	AVR-Pik	ATGCATGTGA	GTTACTTTTT	CACATTCCTT	CCTTCTTTGT	TAACGACTG	TGTCTGCCAT	GCATGACCAG	
10993	AVR-Pik	ATGTATGTGA	GCACCTTCAT	CACCTTCCTT	CCCTCTTTGT	TAACGACTG	TGTCTGCCAT	GAATGCCCAG	
11108	AVR-Pik	ATGCGTGTTA	CCACTTTTAA	CACATTCCTT	CTCACTTTGG	GAACGTGCGC	TGTCGTCAAT	GCCGAAACGG	
11109	AVR-Pik	ATGTATGTGA	GCACCTTCTT	CACATTCCTT	CCCTCTTTGT	TAACGACTG	TGTCTGCCAT	GCCTGCCCAG	
Clustal Consensus		**	**	**	**	*	*	*	*

ภาพที่ 17 (ต่อ)

Sample	Nucleotide position							
	 75	 85	 95	 105	 115	 125	 135	
Ina86 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
1.1 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
2.3 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
3.1 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
5.1 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
6.5 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
8.2 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATATAAAAA	AAAGCTCTCT	ATCTACCTCA	ATAGAGAGAC	CCTACCTTTT	TCTACCACCC	
9.1 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
11.2 AVR-Pik	GCGGCAAATA	TATATATAAA	AACGCTCTCT	ATCTACCTCA	ATAGAGAGAC	CCTCCCTTTC	TCTTCCACCC	
13.2 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
14.2 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
15.1 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
16.1 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
16.2 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
17.2 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
18.3 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
19.2 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
20.2 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
21.2 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
22.1 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
23.2 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
24.1 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
25.1 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
27.1 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
28.1 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
32.1 AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
Clustal Consensus	* ** *	*** * ***	* **	* *** *	* * ***	* **	* *****	

ภาพที่ 17 (ต่อ)

Sample		Nucleotide position							
									
		75	85	95	105	115	125	135	
10100	AVR-Pik	GCAAGCAATA	TATATAAAAA	AAAACGCTCT	ATCTAACTAA	ATCGCGAGAG	CGACACTTTT	TTTTTCACCC	
10301	AVR-Pik	GCAACCAATA	TATATAAAAA	AAAACGCTCT	ACCTAACTCG	AACGCGAGAC	CGACCCTTTT	TTATTCACCC	
10302	AVR-Pik	GCAGCAAATA	TATATAAAAA	AAAACCTCTCT	ATCTACCTAA	ATAGAGAGAC	CCTCCCTTTT	TTTACCACCC	
10459	AVR-Pik	GCAGGCAACA	AATATAAAAA	AAAACCTCTCT	ATCTACCTAA	ATAGAGAGCC	CCTCCCTTTT	TTTACCACCC	
10551	AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
10552	AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
10576	AVR-Pik	GCAGCAAATA	AATATAAAAA	AAAACCTCTCT	ATCTACCTAA	ATAGAGAGAC	CCTCCCTTTT	TTTACCACCC	
10577	AVR-Pik	GCAACAAATA	TATATAAAAA	AAAACCTCTCT	ATCTACCTCA	ATAGAGAGAC	CCTCCCTTTT	TTTACCACCC	
10578	AVR-Pik	GCAGCAAATA	TATATAAAAA	AAAACCTCTCT	ATCTACCTCA	ATAGAGAGAC	CCTCCCTTTT	TTTACCACCC	
10581	AVR-Pik	GCAACAAATA	TATATAAAAA	AAAGCTATCT	ATCTAACTCG	ATAGCGAGAC	CCTCCCTTTT	TTTACCACCC	
10652	AVR-Pik	GCAGGCAACA	AATATAAAAA	AAAACCTCTCT	ATCTACCTAA	ATAGAGAGAC	CCTCCCTTTT	TTTACCACCC	
10681	AVR-Pik	GCAACAAATA	TATATAAAAA	AAAACCTCTCT	ATCTACCTAA	ATAGAGAGAC	CCTCCCTTTT	TTTACCACCC	
10694	AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
10732	AVR-Pik	GCAGCAAATA	TATATAAAAA	AAAACCTCTCT	ATCTACCTAA	ATAGAGAGAC	CCTCCCTTTT	TTTACCACCC	
10760	AVR-Pik	ACAACAAATA	TATATAAAAA	AAAACCTCTCT	ATCTACCTAA	ATAGAGAGAC	CCTCACTTTC	TCTACCACCC	
10812	AVR-Pik	ACAGGCAATA	TATATAAAAA	AAAACCTCTCT	ATCTACCTAA	ATAGAGAGAC	CCTCACTAAC	TCTACCACCC	
10837	AVR-Pik	GCAGGCAATA	AATATAAAAA	AAAACCTCTCT	ATCTACCTAA	ATAGAGAGAC	CCTCCCTTTT	TTTACCACCC	
10873	AVR-Pik	GCAGGAAATA	TATATAAAAA	AAAACCTCTCT	ATCTACCTCA	ATAGAGAGAC	CCTCCCTTTT	TTTACCACCC	
10926	AVR-Pik	GCAGCAAATA	TATATAAAAA	AAAACCTCTCT	ATCTACCTCA	ATAGAGAGAC	CCTCCCTTTT	TTTACCACCC	
10927	AVR-Pik	GCAACAAATA	TATATAAAAA	AAAACCTATCT	ACCTAACTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCTACCACCC	
10941	AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
10945	AVR-Pik	GCAACAAATA	AATATAAAAA	AAAACCTCTCT	ATCTACCTAA	ATAGAGAGAC	CCTCCCTTTT	TTTACCACCC	
10971	AVR-Pik	GCAGCAAATA	TATATATAAA	AAAACCTCTCT	ATCTACCTCA	ATAGAGAGAC	CCTCCCTTTT	TCTACCACCC	
10985	AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
10987	AVR-Pik	GCAGGAAATA	AATATAAAAA	AAAGCTCTCT	ACCTACCTCA	ATAGAGAGAC	CCTCCCTTTT	TTTACCACCC	
10993	AVR-Pik	GCAGCAAATA	TATATATAAA	AAAACCTCTCT	ATCTACCTAA	ATAGAGAGAC	CCTCCCTTTC	TTTACCACCC	
11108	AVR-Pik	GCAACAAATA	TATAGAAAAA	CGCGCTATCG	ACCTAAGTCG	AGAGCGAGAC	CCTAACTTTT	TCGACCACCC	
11109	AVR-Pik	GCAGCAAATA	TATATAAAAA	AAAACCTCTCT	ATCTACCTCA	ATAGAGAGAC	CCTCCCTTTT	TTTACCACCC	
Clustal Consensus		*	** *	*** * ***	* **	* *** *	* * ***	* **	* *****

ภาพที่ 17 (ต่อ)

Sample	Nucleotide position							
	 145	 155	 165	 175	 185	 195	 205	
Ina86 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
1.1 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
2.3 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
3.1 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
5.1 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
6.5 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
8.2 AVR-Pik	TCCCTGTCCT	GCCTGTAACC	GTTTGTGGTT	GATGTATGTA	AACAACCTAC	GTACATATGC	AGGATCCAGC	
9.1 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
11.2 AVR-Pik	TGGCAGACCT	GCCTGCACCT	GAATGTGGTT	GATGTATGTT	AACAACCAAC	GTAAATATGC	AGGATCCAGC	
13.2 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
14.2 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
15.1 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
16.1 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
16.2 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
17.2 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
18.3 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
19.2 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
20.2 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
21.2 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
22.1 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
23.2 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
24.1 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
25.1 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
27.1 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
28.1 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
32.1 AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
Clustal Consensus	*	*	* * * **	* * *	** ** **	** * *	** *	

ภาพที่ 17 (ต่อ)

Sample		Nucleotide position							
									
		145	155	165	175	185	195	205	
10100	AVR-Pik	TGGCTTATGT	GCCCGTAACT	GAATGTTTTT	GGTGTGTTGTT	AAAAAACAAC	GTCGGTAAGC	TGGAAGGAGC	
10301	AVR-Pik	TGGCTTATGT	GCCTGTACCT	GAATGTGGTT	TTTGTGTTGTT	AAAAAACAAC	GTCCGGATGC	TTGATGGAGC	
10302	AVR-Pik	TGGTTTTTCT	GCCTGCAACT	GATTGTGTTT	GGTGTATGAA	AAAAAACAAC	GTAAATATGG	AGGATCGAGC	
10459	AVR-Pik	AGGCTTATCT	GCCTGTAACC	GATTGTGGTT	GGTTTATGTA	AACAACAAC	GTACGTATGC	AGGATCGAGC	
10551	AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
10552	AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
10576	AVR-Pik	AGGCTTTCCT	GCCCGTAACT	GATTGTGGTT	GGTTTATGTT	AACAACCAAC	GTAAATATGC	ATGATCGAGC	
10577	AVR-Pik	TGGTTTTCCT	GCCCGCAACT	GATTGTGGTT	GGTTTTTGTA	AACAACCAAC	GTAAATATGC	TGGATCCAGC	
10578	AVR-Pik	TGGTTTTCCT	GCCCGCAACT	GATTGTGGTT	GGTGTGTTGTA	AACAACCAAC	GTAAATATGC	AGGATCCAGC	
10581	AVR-Pik	TGGTTTTCCT	GTCCCCAAAT	GTTTGTGTTT	TATGTTTAAA	AACAACCTAC	GTCAATATGC	TGGATCCTGT	
10652	AVR-Pik	AGGCTTTCCT	GCCCGTAAACC	GATTGTGTTT	GGTTTTTGTT	AACAACCAAC	GTAAATATGC	AGGATCGAGC	
10681	AVR-Pik	TGGTTTTCCT	GCCTGTAACCT	GATTGTGTTT	GGTTTTTGTT	AACAACCAAC	GTAAATATGC	AGGATCCAGC	
10694	AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
10732	AVR-Pik	AGGCTTTCCT	GCCCGTAAACC	GATTGTGGTT	GGTTTTTGTA	AACAACCAAC	GTACATATGC	ATGATCCAGC	
10760	AVR-Pik	TGGCTTTCCT	GCCCGCACCT	GTTTGTGGTT	GGTGTATGAA	AACAACCTAC	GTAAATATGC	AGGATCGAGC	
10812	AVR-Pik	AGGCTTTCCT	GCACGCACAC	GTTTGTGGTT	GGTTTTTGTT	AACAACCAAC	GTAAATATGC	ATGATCCAGC	
10837	AVR-Pik	TGGTTTTCCT	GCCTGTAACCT	GATTGTGGTT	GGTTTTTGTT	AACAACCAAC	GTAAATATGC	ATGATCCAGC	
10873	AVR-Pik	AGGTTTTCCCT	GCCCGTAAACC	GATTGTGGTT	GGTTTTTGTT	AACAACCAAC	GTAAATATGC	AGGATCCAGC	
10926	AVR-Pik	AGGCTTTCCT	GCCCGTAAACC	GATTGTGTTT	GGTTTTTGTT	AACAACCAAC	GTACATATGC	AGGATCCAGC	
10927	AVR-Pik	TGGTTTTCCT	GTCCCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AAAAACCAAC	GTAAAGATGC	TGGAACCTGT	
10941	AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
10945	AVR-Pik	AGGCTTTCCT	GCCCGTAAACC	GATTGTGGTT	GGTTTTTGTA	AACAACCTAC	GTAAATATGC	AGGATCCAGC	
10971	AVR-Pik	AGGCTTTCCT	GCCCGTAAACC	GATTGTGGTT	GGTTTTTGTA	AACAACCTAC	GTAAATATGC	AGGATCCAGC	
10985	AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
10987	AVR-Pik	TGGCTTTCCT	GCCTGTAACC	GATTGTGGTT	GGTTTTTAAA	AAAAACCAAC	GTAAATATGC	AGGATCCAGC	
10993	AVR-Pik	AGGCTTTCCT	GCCTGTAAAT	GATTGTGGTT	GGTGTATGAA	AACAACCTAC	GTAAATATGC	ATGATCCAGC	
11108	AVR-Pik	TGGTATTCCT	GTACCCGAAT	GTTTTTGGTT	TATGTTTAAA	AACAACGTAC	GTCAAGATGC	TGGAACCTGT	
11109	AVR-Pik	TGGTTTATCT	GTCTGTAACCT	GATTGTGGTT	GGTTTTTGTT	AACAACCAAC	GTAAATATGC	AGGATCCAGC	
Clustal Consensus		* *		* * * *	* * *	** ** *	**	* *	** *

ภาพที่ 17 (ต่อ)

Sample	Nucleotide position							
	 215	 225	 235	 245	 255	 265	 275	
Ina86 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
1.1 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
2.3 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
3.1 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
5.1 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
6.5 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
8.2 AVR-Pik	CTGTTATCTC	GCAAGAAAAA	CGTAAATGAT	GGTCGGTCCT	GACTGCATCC	ATATTAAAC	AAACAATGCT	
9.1 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
11.2 AVR-Pik	CAGTTCTCTC	GCAAAAAAAA	CGGAAAAGAT	GGTCGGACCT	GACTCCATAT	ATATTCAAAC	AAACAATGAT	
13.2 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
14.2 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
15.1 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
16.1 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
16.2 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
17.2 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
18.3 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
19.2 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
20.2 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
21.2 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
22.1 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
23.2 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
24.1 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
25.1 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
27.1 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
28.1 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
32.1 AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
Clustal Consensus	**	* * *	** *	*****	* * *	* * * *	* * **	

ภาพที่ 17 (ต่อ)

Sample		Nucleotide position							
									
		215	225	235	245	255	265	275	
10100	AVR-Pik	CGAGTCTCTC	GAAAGAAGAA	TGGAAAAGAT	GGTCGGAAC	GGGTGGGTAT	AAATTAAAAC	AAAAAATGAT	
10301	AVR-Pik	CGAGTCTCTC	TAAAGAAAAA	TGGAAAAGAA	GGTCGGACCT	GGCTGCATCT	TTAATAAAAC	AAAAAATGAT	
10302	AVR-Pik	CTGTTATCTC	GCTAGAAGAA	TGGAAAAGAA	GGTCGGAAC	GA CTGCGTCT	TTATTAAAAC	AAACAATGAT	
10459	AVR-Pik	CTGTTCCCTC	GCTAGAAGAA	TGGAAAAGAA	GGTCGGTCC	GA CTGGGTCC	ATATTAAAAC	AAACAATGAT	
10551	AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
10552	AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
10576	AVR-Pik	CTGTTCTCTC	GCAAGAAGAA	TGGAAAAGAA	GGTCGGTCC	GGCTGCATAT	ATATTCAAAC	AAACAATGCT	
10577	AVR-Pik	CTGTTCTCTC	GCAAGAAGAA	TGTAAGAGAT	GGTCCGAAC	GGGTGCATAT	TAATTAAAAC	AAAAAATGAT	
10578	AVR-Pik	CTGTTCTCTC	GCAAGAAGAA	TGTAAGAGAT	GGTCCGAAC	GGGTGCATAT	ATATTAAAAC	AAACAATGAT	
10581	AVR-Pik	TAGTTCTCTT	GCAAAATGAA	CGTGAAAGTT	GGTCCGAAC	GGGTGCATAT	TAAATCAAAC	AAAAAATGCT	
10652	AVR-Pik	CTGTTCCCTC	GCAAGAAGAA	TGGAAAAGAT	GGTCGGTCC	GA CTGCGTCC	ATATTAAAAC	AAACAATGAT	
10681	AVR-Pik	CTGTTCTCTC	GCAAGAAGAA	TGTAAGAGAT	GGTCGGACCT	GGGTGCGTAT	TAATTAAAAC	AAAAAATGAT	
10694	AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
10732	AVR-Pik	CTGTTCTCTC	GCTAGAAGAA	TGGAAAAGAA	GGTCGGTCC	GA CTGGGTAT	AAATTAAAAC	AAACAATGAT	
10760	AVR-Pik	CTGTTATCTC	GCAAGAAAAA	TGGAAAAGAA	GGTCGGTCC	GA CTGCATAT	ATAATCAAAC	AAACAATGCT	
10812	AVR-Pik	CTGTTATCTC	GCAAGAAGAA	TGGAAAAGAA	GGTCGGTCC	GA CTGCATAT	TTATTCAAAC	AAACAATGAT	
10837	AVR-Pik	CTGTTCTCTC	GCAAGAAGAA	TGGAAAAGAA	GGTCGGACCA	GA CTGCATCC	AAAATAAAAC	AAAAAATGAT	
10873	AVR-Pik	CAGTTCTCTC	GCAAGAAGAA	CGGAAAAGAT	GGTCCGTCC	GGGTGCGTAT	TAATTAAAAC	AAAAAATGAT	
10926	AVR-Pik	CTGTTCTCTC	GCAAGAAGAA	TGGAAAAGAT	GGTCGGTCC	GA CTGCGTCC	TAATTAAAAC	AAAAAATGAT	
10927	AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGAT	GGTCCGAAC	GGGTGCATAT	TAAATCAAAC	GAAAAATTGCA	
10941	AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
10945	AVR-Pik	CTGTTCTCTC	GCTAGAAGAA	TGGAAAAGAT	GGTCGGTCC	GGGTGCGTAT	ATATTCAAAC	AAACAATGAT	
10971	AVR-Pik	CTGTTCTCTC	GCAAGAAGAA	TGGAAAAGAT	GGTCCGTCC	GA CTGCATAT	TTATTCAAAC	AAACAATGCT	
10985	AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
10987	AVR-Pik	CTGTTCCCTT	GCAAGAAAAA	CGGAAAAGAT	GGTCCGACCT	GA CTGCATCC	TAATTAAAAC	AAAAAATGAT	
10993	AVR-Pik	CTGTTCTCTC	GCAAGAAGAA	TGGAAAAGAT	GGTCCGAAC	GA CTGCATAT	ATATTAAAAC	AAAAAATGAT	
11108	AVR-Pik	TACAGCTCTT	GGAAAATGGA	CATGAAAGTT	GGTCCAACT	GGGTCCATAT	TAAATCAGAC	GATAATTGCA	
11109	AVR-Pik	CTGTTCTCTC	GCAAGAAGAA	TGTAAGAGAT	GGTCGGAAC	GGGTGGGTAT	TAATTAAAAC	AAAAAATGAT	
Clustal Consensus		**	* * *	** *	*****	* * *	* * * *	* * *	

ภาพที่ 17 (ต่อ)

Sample	Nucleotide position							
	 285	 295	 305	 315	 325	 335	..	
Ina86 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
1.1 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
2.3 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
3.1 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
5.1 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
6.5 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
8.2 AVR-Pik	TTTTGTTTGG	CGACTTCCCT	CCCTGCTGGA	TGGATTGGTT	GAAGAAAAAG	ACCGGCCTTT	AA	
9.1 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
11.2 AVR-Pik	TGTTGTTTGG	CGACTTCCCT	CCCTGCTGGA	TGGATTGGGG	TAAAAAAAAG	ACCGGCTTTT	AA	
13.2 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
14.2 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
15.1 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
16.1 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
16.2 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
17.2 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
18.3 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
19.2 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
20.2 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
21.2 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
22.1 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
23.2 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
24.1 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
25.1 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
27.1 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
28.1 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
32.1 AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAGG	CCCGGCTTTT	AA	
Clustal Consensus	**** **	*** * * *	** * ***	* * * * *	* * * * *	* * *		

ภาพที่ 17 (ต่อ)

Sample		Nucleotide position							
								..	
		285	295	305	315	325	335		
10100	AVR-Pik	TGTTGTTTGG	CGAGTTCCTT	CCCTGCTGGA	TGGATTGGGG	GAAAAAAAAG	AAGGGCTTTT	TT	
10301	AVR-Pik	TGTTGTTTGG	CGACTTACTT	CCCTGCTGGA	TGGTTTGGGG	GAAAAAAAAG	ACCGGCTTTT	TT	
10302	AVR-Pik	TGTTGTTTGG	CGACTTCCTT	CCCTGCTGGA	TGGATTGGGG	GAAAAAAAAG	AACGGCTTTT	TT	
10459	AVR-Pik	TGTTGTTTGG	CGAGTACTT	CCCTGCTGGA	TGGATTGGGG	GAAGAAAAAG	AACGGCCGGT	TT	
10551	AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAAG	CCCGGCTTTT	AA	
10552	AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAAG	CCCGGCTTTT	AA	
10576	AVR-Pik	TGTTGTTTGG	CGACTTACCT	CCCTGCTGGA	TGGATTGGTT	TAAGAAAAAG	AACGGCTTTT	TT	
10577	AVR-Pik	TGTTGTTTGG	CGACTTCCCT	CCCTGCTGGA	TGGATTGGGG	GAAAAAAAAG	ACCGGCTTTT	TT	
10578	AVR-Pik	TGTTGTTTGG	CGACTTCCCT	CCCTGCTGGA	TGGATTGGGG	GAAGAAAAAG	ACCGCCTTTT	TT	
10581	AVR-Pik	TTTTGTCTGG	CGACTTCCCT	CCCTGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAAG	ACCGGCTTTT	AA	
10652	AVR-Pik	TGTTGTTTGG	CGAGTACTT	CCCTGCTGGA	TGGATTGGTG	GAAAAAAAAG	ACCGGCTTGC	TT	
10681	AVR-Pik	TGTTGTTTGG	CGACTTCCTT	CCCTGCTGGA	TGGATTGGGG	GAAGAAAAAG	ACCGGCTTTT	TT	
10694	AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAAG	CCCGGCTTTT	AA	
10732	AVR-Pik	TGTTGTTTGG	CGACTTCCCT	CCCTGCTGGA	TGGATTGGGG	GAAAAAAAAG	AACGGCTTGT	TT	
10760	AVR-Pik	TTTTGTTTGG	CGACTTCCTT	CCCTGCTGGT	TGGATTGGGG	GAAAAAAAAG	ACCGGCCGGT	AA	
10812	AVR-Pik	TTTTGTTTGG	CGACCTCCTT	CCCTGCTGGA	TGGATTGGTT	TGAGAAAAAG	ACCGGCTTTT	AA	
10837	AVR-Pik	TGTTGTTTGG	CGACTTACTT	CCCTGCTGGA	TGGATTGGGG	GAAAAAAAAG	AACGGCTTGT	TT	
10873	AVR-Pik	TGTTGTTTGG	CGACTTCCTT	CCCTGCTGGA	TGGATTGGGG	GAAAAAAAAG	ACCGGCTTTT	TT	
10926	AVR-Pik	TGTTGTTTGG	CGACTTCCTT	CCCTGCTGGA	TGGATTGGGG	GAAAAAAAAG	ACCGGCTTGC	TT	
10927	AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCCTGCTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAAG	ACCGGCTTTT	AA	
10941	AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAAG	CCCGGCTTTT	AA	
10945	AVR-Pik	TGTTGTTTGG	CGACTTCCCT	CCCTGCTGGA	TTGATTGGTT	TAAGAAAAAG	ACCGGCTTTT	AA	
10971	AVR-Pik	TGTTGTTTGG	CGACTTCCTT	CCCTGCTGGT	TGGATTGGGG	TAAGAAAAAG	ACCGGCTTTT	TA	
10985	AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAAG	CCCGGCTTTT	AA	
10987	AVR-Pik	TGTTGTTTGG	CGACTTCCTT	CCCTGCTGGA	TGGATTGGGG	GAAAAAAAAG	ACCGGCTTTT	TT	
10993	AVR-Pik	TGTTGTTTGG	CGACTTCCTT	CCCTGCTGGA	TGGATTGGGG	GAAAAAAAAG	AACGGCTTTT	TT	
11108	AVR-Pik	ATTTGTCGGG	CGACTTCCCT	CCAGGTTGGA	TTGTTTTGGG	GAAAAAAAAG	CCCGGCTTTT	AA	
11109	AVR-Pik	TGTTGTTTGG	CGACTTCCTT	CCCTGCTGGA	TGGATTGGGG	GAAAAAAAAG	ACCGGCTTTT	TT	
Clustal Consensus		****	**	***	* * *	**	* **	* * * * *	* * * * *

ภาพที่ 17 (ต่อ)

5.2 ตำแหน่งที่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (polymorphic site) ในยีน *AVR-Pik*

ผลการ alignment เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pik* จากตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *AVR-Pik* ของเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ Ina86 ที่มีการเผยแพร่ในฐานข้อมูล (GenBank ID: AB498875) (Yoshida *et al.*, 2009) มีตำแหน่งของการเปรียบเทียบทั้งหมด 342 ตำแหน่ง เป็นตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์แบบแทนที่เบส 210 ตำแหน่ง ซึ่งแบ่งได้เป็น parsimony-informative site 187 ตำแหน่ง และ single variable site 23 ตำแหน่ง โดยเป็นตำแหน่งที่ไม่มีการกลายพันธุ์ 132 ตำแหน่งเมื่อพิจารณาตำแหน่งของการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นทั้งหมด 210 ตำแหน่ง (ตารางที่ 12) เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในบริเวณที่มีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน (exons) ทั้งหมด การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้น เกิดในรหัสพันธุกรรม (codon) ตำแหน่งที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 75, 62 และ 73 ตำแหน่ง ตามลำดับ ดังจะเห็นได้ว่า รหัสพันธุกรรมตำแหน่งที่ 1 จะเกิดการแทนที่เบสสูงที่สุด รองลงมาคือรหัสพันธุกรรมตำแหน่งที่ 3 และรหัสพันธุกรรมตำแหน่งที่ 2 เป็นตำแหน่งที่มีการอนุรักษ์สูงที่สุด เหตุที่เป็นเช่นนั้นเนื่องจากการกลายพันธุ์ของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 1 และ 2 ของรหัสพันธุกรรม จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน (non-synonymous substitution) มากกว่าการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในตำแหน่งที่ 3 ทำการแปลรหัสจากลำดับ นิวคลีโอไทด์เป็นโปรตีน สามารถจัดจำแนกโปรตีนได้ 25 haplotype ซึ่งมีตำแหน่งของกรด อะมิโนที่มีความแตกต่างกันทั้งหมด 95 ตำแหน่ง ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์แบบ base substitution เนื่องจากรูปแบบของ haplotypes ที่พบมีความสัมพันธ์กับช่วงเวลาของการเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ จึงจัดกลุ่มของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นสองกลุ่มประชากรเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดย G2005 กำหนดเป็นกลุ่มของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *AVR-Pik* ที่เพิ่มปริมาณได้จากเชื้อราโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมไว้เมื่อปี 2549 จำนวน 28 ตัวอย่าง และ G2010 กำหนดเป็นกลุ่มของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *AVR-Pik* ที่เพิ่มปริมาณได้จากเชื้อราโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมไว้เมื่อปี 2553 จำนวน 25 ตัวอย่าง จากผลการทำ alignment สามารถสังเกตได้ว่า ลักษณะรูปแบบของความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้น เป็นไปในสองรูปแบบก็คือ ตัวอย่างที่ลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น consensus sequence กับลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *AVR-Pik* จากเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ Ina86 และอีกหนึ่งรูปแบบคือ ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *AVR-Pik* จากเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ Ina86 (ตารางที่ 12)

5.3 การทดสอบสมมูลของประชากร (Neutrality test)

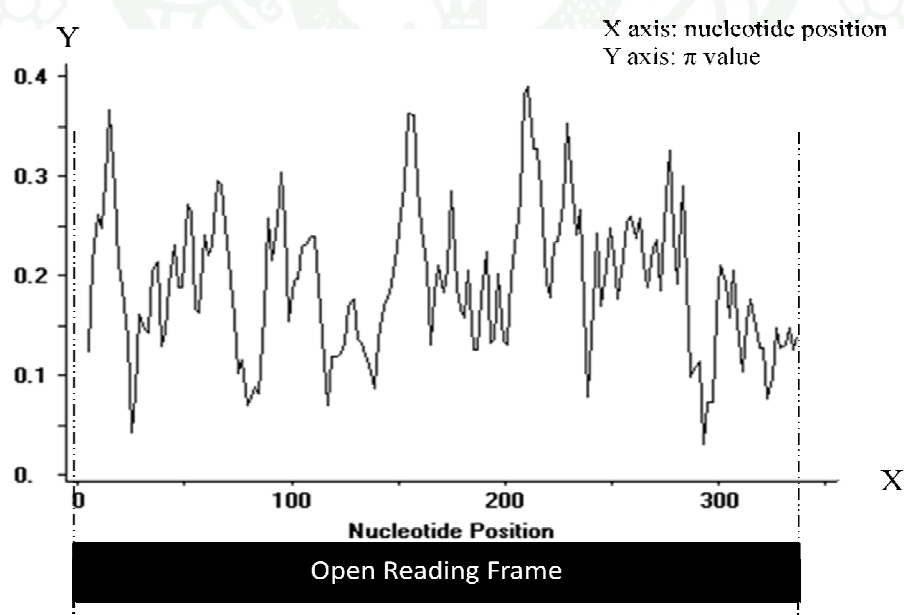
ผลการหาค่าเฉลี่ยความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่งระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ (π) โดยคิดจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราทั้งหมด กลุ่ม G2005 และ G2010 มีค่าเท่ากับ 0.8871 0.19991 และ 0.04940 ตามลำดับ (ตารางที่ 13) ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่ามีความผันแปรเกิดขึ้นสูง (high polymorphism) ในยีน *AVR-Pik* มีผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่มีการแปรรหัสเป็นกรดอะมิโน แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย sliding window แสดงให้เห็นถึงรูปแบบของความผันแปรและค่าเฉลี่ยของความแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 14) โดยตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างและส่งผลถึงความผันแปรของยีน *AVR-Pik* ค่าความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ของบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (Θ) ในของตัวอย่างทั้งหมด กลุ่มตัวอย่าง G2005 และ G2010 มีค่าเท่ากับ 0.13677 0.14931 และ 0.10546 ตามลำดับ (ตารางที่ 13) การหาอัตราส่วนของค่า K_a/K_s ratio [the ratio of the number of non-synonymous substitutions per non-synonymous site (K_a) to the number of synonymous substitutions per synonymous site (K_s)] มีค่าเท่ากับ 1.040 จากผลการทดสอบอัตราส่วนของค่า K_a/K_s มีค่า >1 เป็นไปได้ว่ารูปแบบการเกิดวิวัฒนาการของยีน *AVR-Pik* มีลักษณะเป็นแบบ neutral evolution หรือ positive Darwinian selection ผลการทดสอบทางสถิติได้ค่า Tajima's D (Tajima, 1989) Fu and Li's D (Fu and Li, 1993) และ Fu and Li's F (Fu and Li, 1993) ได้ค่าที่เป็นบวกโดยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.10$) ในกลุ่มตัวอย่าง G2010 ให้ผลการทดสอบสมมูลประชากรที่มีรูปแบบไม่แตกต่างกันยกเว้นการทดสอบด้วย Tajima's D test (ตารางที่ 13) ที่ได้ค่าติดลบและมีนัยสำคัญทางสถิติ (-2.11588) ส่วนในกลุ่มตัวอย่าง G2005 ให้ค่าที่เป็นบวกโดยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกันยกเว้นการทดสอบด้วย Fay and Wu's H test ที่ให้ค่าติดลบ (-53.28042) (ตารางที่ 13) ผลการทดสอบทางสถิติแสดงให้เห็นว่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่พบในยีนก่อโรค *AVR-Pik* ไม่มีการเบี่ยงเบนไปจากการทดสอบสมมูลประชากร (neutrality test) ซึ่งน่าจะเกิดจากปัจจัยทางวิวัฒนาการระหว่าง mutation และ random genetic drift ซึ่งเป็นกระบวนการอิสระในการคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมที่หลากหลายที่สามารถควบคุมให้ประชากรสามารถอยู่รอดและขยายพันธุ์ได้ โดยสภาวะแวดล้อมจะเป็นตัวกำหนดหรือคัดเลือกลักษณะพันธุกรรมที่เหมาะสมที่สุดไว้ อีกนัยหนึ่งก็คือ การแปรผันทางพันธุกรรมเป็นผลมาจากการอยู่รอด แม้ว่าการแปรผันในแต่ละรุ่นอาจจะเกิดเพียงเล็กน้อยแต่ลักษณะเหล่านี้จะมีการสะสมจากรุ่นสู่รุ่นจนกระทั่งเวลาผ่านไปจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมไป ซึ่งลักษณะรูปแบบความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนมากที่พบในประชากรปี 2553 จะมีความคล้ายคลึงกันกับลักษณะยีน *AVR-Pik* ของเชื้อราโรคไหม้สาย

พันธุ์ Ina68 ที่มีการรายงานไว้โดย Yoshida และคณะในปี 2009 แต่พบรูปแบบนี้น้อยมากในตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ที่รวบรวมมาจากปี 2549 ในทางตรงกันข้ามลักษณะรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการพบมากในกลุ่มประชากร ปี 2549 แต่กลับพบได้น้อยในกลุ่มประชากรปี 2553 ซึ่งลักษณะรูปแบบทางพันธุกรรมที่หายไปนั้นน่าจะเกิดจาก population bottlenecks ทำให้เมื่อระยะเวลาผ่านไปรูปแบบทางพันธุกรรมที่พบมากในปี 2549 กลับหายไปหรือปรากฏน้อยลงเหลือเพียงรูปแบบที่ถูกคัดเลือกให้สามารถดำรงชีวิตอยู่รอดได้

ตารางที่ 9 ค่าการทดสอบสมมติฐานของประชากร (Neutrality test) ยีน *AVR-Pik*

Coding sites	H	S	π	θ	Tajima's D	Fu and Li's D	Fu's Fs	Fay and Wu's H
All isolated	25	254	0.18871	0.13677	1.3639	1.0517	16.745	37.90636
G2005	23	251	0.19991	0.14931	1.0524	1.0340	1.811	-53.28042
G2010	4	178	0.04940	0.10546	2.11588*	-0.8770	21.694	20.41000

หมายเหตุ H คือ Number of haplotypes, S คือ Number of segregating sites, π คือ nucleotide diversity, θ คือ Watterson's estimators และ * คือ ค่าความเชื่อมั่น * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.



ภาพที่ 18 sliding window ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *AVR-Pik*

5.4 การวิเคราะห์ Molecular phylogenetics ของลำดับนิวคลีโอไทด์

5.4.1 การหาแบบจำลองการแทนที่เบส (nucleotide substitution model) ที่เหมาะสม

ก่อนการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ จำเป็นต้องวิเคราะห์หาแบบจำลองการแทนที่เบสที่เหมาะสมจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *AVR-Pik* ทั้ง 342 ตำแหน่ง ด้วยโปรแกรม MEGA 5 (Kumar *et al.*, 2008) ซึ่งจะทำนายความเป็นไปได้หรือสัดส่วนของการเปลี่ยนแปลง นิวคลีโอไทด์ที่คาดว่าจะเกิดขึ้นในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนั้น จากผลการวิเคราะห์พบว่าแบบจำลองการแทนที่เบสของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ดีที่สุด คือ GTR+I+G (GTR = General Time Reversible I = Invariable G = gamma) GTR model มีข้อกำหนดคือ ความถี่เบสแต่ละชนิดไม่เท่ากัน (variable base frequencies; $\pi_A \neq \pi_C \neq \pi_G \neq \pi_T$) อัตราการแทนที่เบสแต่ละรูปแบบมีความถี่ไม่เท่ากัน โดยมีความถี่เบสแต่ละชนิดคือ $\pi_A=0.2811$ $\pi_C=0.2203$ $\pi_G=0.2046$ $\pi_T=0.2940$ และกำหนด substitution rate matrix ดังต่อไปนี้

	A	U	C	G
A	-	11.90	9.26	5.95
U	10.42	-	7.81	5.72
C	11.82	10.42	-	5.45
G	8.17	8.21	5.87	-

แบบจำลองนี้มีการกำหนดค่าให้กับรูปแบบการแทนที่เบส 6 แบบ (Φ_{A-C} , Φ_{A-G} , Φ_{A-T} , Φ_{C-G} , Φ_{C-T} , Φ_{G-T} ; nst = 6) แบบจำลองการแทนที่เบสที่ได้จะถูกใช้เป็นข้อมูลในการคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) และการสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) Maximum likelihood (ML) และ Maximum parsimony (MP)

5.4.2 การหาระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance)

ผลการคำนวณค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ทั้ง 53 ตัวอย่างของยีน *AVR-Pik* พบว่าได้ค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรม มีค่า 0.193 โดยมีค่าต่ำสุดคือ 0.000 และมีค่าสูงสุดคือ 0.459 ค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างภายในกลุ่ม G2005 มีค่าเท่ากับ 0.204 และภายในกลุ่ม G2010 เท่ากับ 0.051 โดยค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสองกลุ่มตัวอย่างนี้มีค่าเท่ากับ 0.252 (ตารางที่ 14) จากข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่ารูปแบบของยีน *AVR-Pik* จากเชื้อราโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมไว้เมื่อปี 2549 และปี 2553 นั้นมีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ระยะเวลาที่ผ่านไปส่งผลให้ยีน *AVR-Pik* มีวิวัฒนาการเกิดขึ้น ค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมของยีน *AVR-Pik* นั้นจะใช้ประกอบการวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกับผลการสร้างสายพันธุ์ทางวิวัฒนาการซึ่งจะได้กล่าวต่อไป

	Avr-Pik	1.1	2.3	3.1	5.1	6.5	8.2	9.1	11.2	13.2	14.2	15.1	16.1	16.2	17.2	18.3	19.2	20.2	21.2	22.1	23.2	24.1	25.1	26.1	28.1	32.1	10100
Avr-pik	-																										
1.1	0.000	-																									
2.3	0.000	0.000	-																								
3.1	0.000	0.000	0.000	-																							
5.1	0.000	0.000	0.000	0.000	-																						
6.5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-																					
8.2	0.345	0.345	0.345	0.345	0.345	0.345	-																				
9.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	-																			
11.2	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.158	0.310	-																		
13.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	-																	
14.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	-																
15.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	-															
16.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	0.000	-														
16.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	0.000	0.000	-													
17.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-												
18.3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-											
19.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-										
20.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-									
21.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-								
22.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-							
23.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-						
24.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-					
25.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-				
27.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-			
28.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-		
32.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-	
10100	0.383	0.383	0.383	0.383	0.383	0.383	0.298	0.383	0.254	0.383	0.383	0.383	0.383	0.383	0.383	0.383	0.383	0.383	0.383	0.383	0.383	0.383	0.383	0.383	0.383	0.383	-

ภาพที่ 19 ค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคไหม้แต่ละตัวอย่างโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AVR-Pii

	Avr-Pik	1.1	2.3	3.1	5.1	6.5	8.2	9.1	11.2	13.2	14.2	15.1	16.1	16.2	17.2	18.3	19.2	20.2	21.2	22.1	23.2	24.1	25.1	26.1	28.1	32.1	10100
10301	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.278	0.354	0.237	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.123
10302	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.167	0.354	0.143	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.202
10459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.184	0.459	0.208	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.459	0.234
10551	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.383
10552	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.383
10576	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.140	0.368	0.140	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.368	0.234
10577	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.161	0.278	0.126	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.278	0.196
10578	0.295	0.295	0.295	0.295	0.295	0.295	0.143	0.295	0.132	0.295	0.295	0.295	0.295	0.295	0.295	0.295	0.295	0.295	0.295	0.295	0.295	0.295	0.295	0.295	0.295	0.295	0.208
10581	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.231	0.137	0.202	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.137	0.275
10652	0.398	0.398	0.398	0.398	0.398	0.398	0.152	0.398	0.170	0.398	0.398	0.398	0.398	0.398	0.398	0.398	0.398	0.398	0.398	0.398	0.398	0.398	0.398	0.398	0.398	0.398	0.216
10681	0.319	0.319	0.319	0.319	0.319	0.319	0.143	0.319	0.143	0.319	0.319	0.319	0.319	0.319	0.319	0.319	0.319	0.319	0.319	0.319	0.319	0.319	0.319	0.319	0.319	0.319	0.184
10694	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.383
10732	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.149	0.354	0.149	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.354	0.205
10760	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.132	0.348	0.149	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.249
10812	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.158	0.363	0.158	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.275
10837	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.170	0.363	0.146	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.363	0.213
10873	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.158	0.310	0.123	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.208
10926	0.360	0.360	0.360	0.360	0.360	0.360	0.143	0.360	0.143	0.360	0.360	0.360	0.360	0.360	0.360	0.360	0.360	0.360	0.360	0.360	0.360	0.360	0.360	0.360	0.360	0.360	0.216
10927	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.289	0.079	0.260	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.079	0.319
10941	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.383
10945	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.126	0.348	0.155	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.348	0.237
10971	0.336	0.336	0.336	0.336	0.336	0.336	0.126	0.336	0.120	0.336	0.336	0.336	0.336	0.336	0.336	0.336	0.336	0.336	0.336	0.336	0.336	0.336	0.336	0.336	0.336	0.336	0.246
10985	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.383
10987	0.325	0.325	0.325	0.325	0.325	0.325	0.149	0.325	0.137	0.325	0.325	0.325	0.325	0.325	0.325	0.325	0.325	0.325	0.325	0.325	0.325	0.325	0.325	0.325	0.325	0.325	0.231
10993	0.327	0.327	0.327	0.327	0.327	0.327	0.158	0.327	0.111	0.327	0.327	0.327	0.327	0.327	0.327	0.327	0.327	0.327	0.327	0.327	0.327	0.327	0.327	0.327	0.327	0.327	0.228
11108	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.345	0.000	0.310	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.383
11109	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.164	0.310	0.123	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.310	0.193

	10301	10302	10459	10551	10552	10576	10577	10578	10581	10652	10681	10694	10732	10760	10812	10837	10873	10926	10927	10941	10945	10971	10985	10987	10993	11108	11109
10301	-																										
10302	0.211	-																									
10459	0.251	0.129	-																								
10551	0.354	0.354	0.459	-																							
10552	0.354	0.354	0.459	0.000	-																						
10576	0.225	0.096	0.120	0.368	0.368	-																					
10577	0.211	0.094	0.181	0.278	0.278	0.102	-																				
10578	0.216	0.088	0.170	0.295	0.295	0.091	0.053	-																			
10581	0.269	0.216	0.327	0.137	0.137	0.237	0.146	0.170	-																		
10652	0.237	0.114	0.091	0.398	0.398	0.082	0.126	0.114	0.260	-																	
10681	0.205	0.076	0.152	0.319	0.319	0.085	0.053	0.064	0.181	0.096	-																
10694	0.354	0.354	0.459	0.000	0.000	0.368	0.278	0.295	0.137	0.398	0.319	-															
10732	0.222	0.076	0.111	0.354	0.354	0.067	0.082	0.088	0.222	0.091	0.070	0.354	-														
10760	0.240	0.123	0.164	0.348	0.348	0.114	0.146	0.135	0.228	0.143	0.135	0.348	0.129	-													
10812	0.266	0.149	0.190	0.363	0.363	0.105	0.143	0.132	0.249	0.129	0.137	0.363	0.126	0.120	-												
10837	0.208	0.091	0.114	0.363	0.363	0.076	0.091	0.102	0.231	0.076	0.073	0.363	0.073	0.132	0.135	-											
10873	0.222	0.114	0.155	0.310	0.310	0.094	0.056	0.079	0.178	0.088	0.061	0.310	0.085	0.149	0.123	0.088	-										
10926	0.216	0.094	0.123	0.360	0.360	0.085	0.082	0.094	0.222	0.056	0.064	0.360	0.058	0.135	0.126	0.067	0.056	-									
10927	0.292	0.275	0.386	0.079	0.079	0.295	0.205	0.228	0.094	0.325	0.246	0.079	0.281	0.281	0.295	0.289	0.237	0.287	-								
10941	0.354	0.354	0.459	0.000	0.000	0.368	0.278	0.295	0.137	0.398	0.319	0.000	0.354	0.348	0.363	0.363	0.310	0.360	0.079	-							
10945	0.263	0.123	0.135	0.348	0.348	0.067	0.099	0.105	0.216	0.102	0.082	0.348	0.076	0.129	0.126	0.114	0.102	0.094	0.281	0.348	-						
10971	0.240	0.105	0.146	0.336	0.336	0.067	0.088	0.082	0.211	0.102	0.088	0.336	0.076	0.099	0.096	0.108	0.079	0.070	0.269	0.336	0.076	-					
10985	0.354	0.354	0.459	0.000	0.000	0.368	0.278	0.295	0.137	0.398	0.319	0.000	0.354	0.348	0.363	0.363	0.310	0.360	0.079	0.000	0.348	0.336	-				
10987	0.216	0.094	0.146	0.325	0.325	0.114	0.088	0.099	0.199	0.096	0.082	0.325	0.094	0.152	0.149	0.073	0.079	0.070	0.251	0.325	0.123	0.094	0.325	-			
10993	0.231	0.091	0.161	0.327	0.327	0.094	0.085	0.096	0.196	0.123	0.102	0.327	0.091	0.132	0.140	0.099	0.088	0.102	0.260	0.327	0.126	0.085	0.327	0.108	-		
11108	0.354	0.354	0.459	0.000	0.000	0.368	0.278	0.295	0.137	0.398	0.319	0.000	0.354	0.348	0.363	0.363	0.310	0.360	0.079	0.000	0.348	0.336	0.000	0.325	0.327	-	
11109	0.208	0.091	0.155	0.310	0.310	0.105	0.050	0.073	0.178	0.117	0.050	0.310	0.091	0.155	0.152	0.094	0.047	0.079	0.237	0.310	0.120	0.096	0.310	0.102	0.082	0.310	-

ภาพที่ 19 (ต่อ)

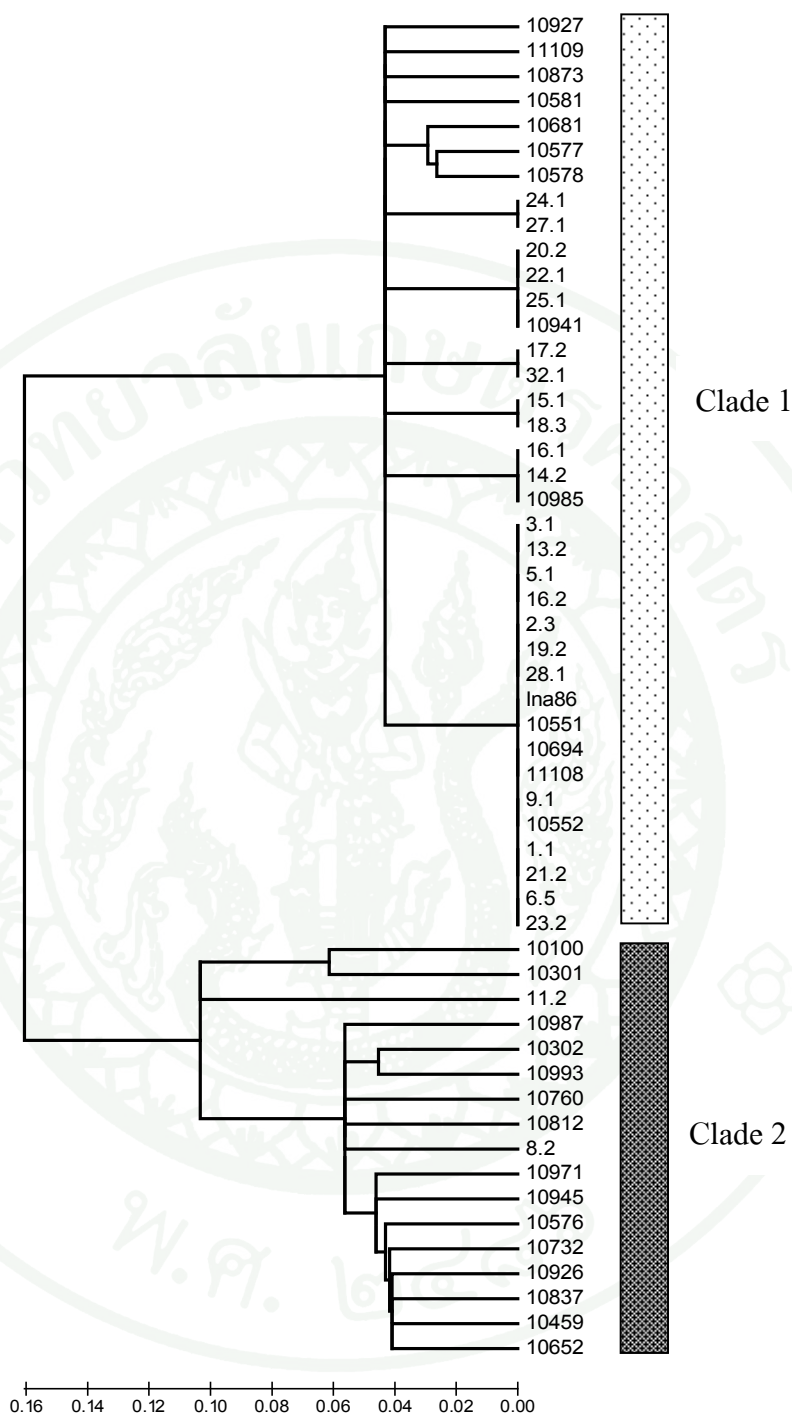
5.4.3 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของเชื้อราโรคไหม้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pik*

ผลการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor-Joining (NJ) ของยีน *AVR-Pik* โดยใช้เชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ Ina86 เป็น Reference ด้วยวิธี NJ (ภาพที่ 15) ที่ใช้ข้อมูลระยะห่างทางพันธุกรรม ทดสอบ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ สร้าง consensus tree ด้วยวิธี 50% majority-rule พบว่าสามารถจัดลำดับสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราโรคไหม้โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *AVR-Pik* ได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ clade 1 และ clade 2 (ภาพที่ 15)

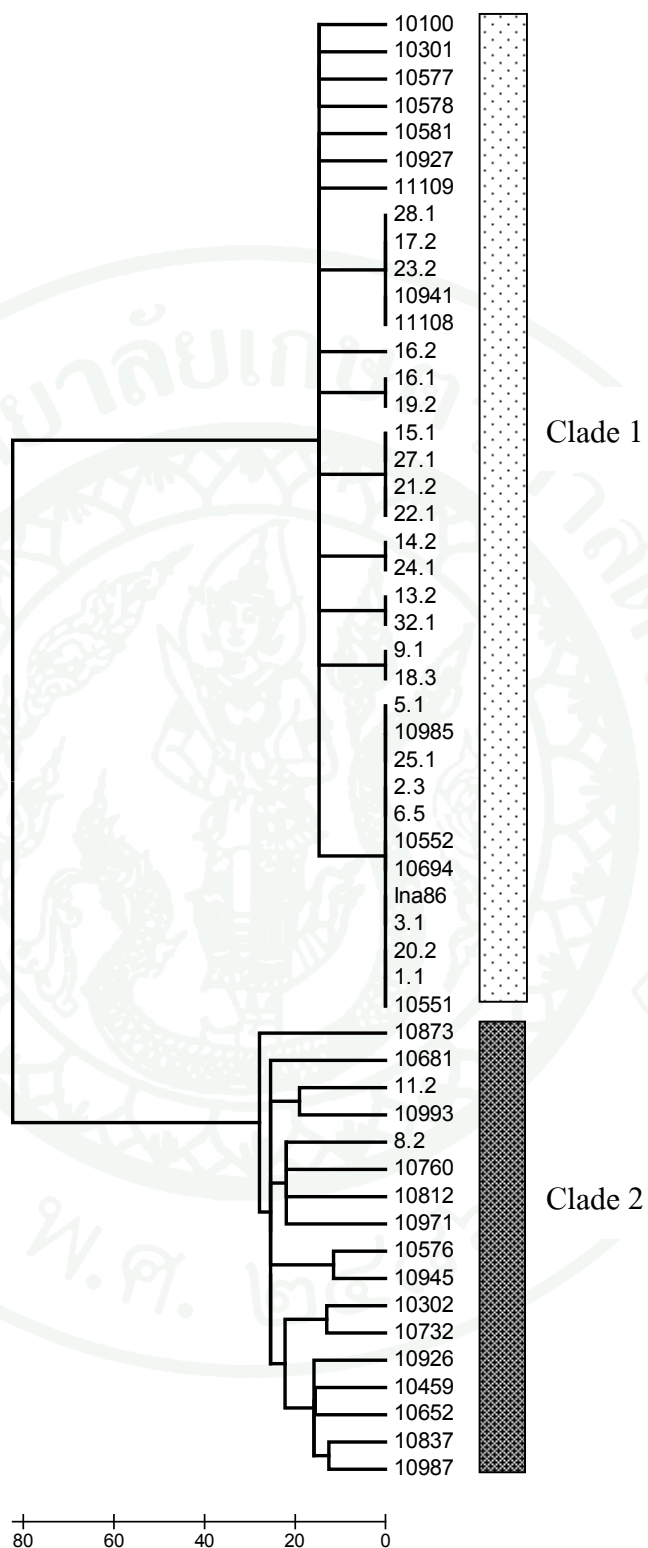
ผลการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum parsimony (MP) ของยีน *AVR-Pik* โดยใช้เชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ Ina86 เป็น Reference ด้วยวิธี MP (ภาพที่ 16) ทดสอบ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยมี parsimony-informative site จำนวน 87 ตำแหน่งสร้าง consensus tree ด้วยวิธี 50% majority-rule พบว่าสามารถจัดลำดับสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราโรคไหม้โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *AVR-Pik* ได้เป็น 2 กลุ่มเช่นเดียวกับวิธี NJ (ภาพที่ 16)

ผลการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum likelihood (ML) ของยีน *AVR-Pik* โดยใช้เชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ 0-137 เป็น Reference ด้วยวิธี ML (ภาพที่ 17) หา tree ที่มีความน่าจะเป็นสูงสุดจาก tree ที่เป็นไปได้ประกอบกับแบบจำลอง GTR+G+I ทดสอบ bootstrap จำนวน 1000 ซ้ำ พบว่า ได้ phylogenetic tree ที่มีค่า $-\ln \text{likelihood} = -3188.5$ สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้มีพื้นฐานสอดคล้องกับ phylogenetic tree ที่สร้างโดยวิธี NJ และ MP

ผลที่ได้จากการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี NJ MP และ ML แสดงให้เห็นว่า tree มีพื้นฐานคล้ายคลึงกันมาก โดยความแตกต่างระหว่าง phylogenetic tree ที่สร้างจากแต่ละวิธีเป็นความแตกต่างของความสัมพันธ์ภายในซึ่ง tree ที่ได้สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้อย่างชัดเจน สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของตัวอย่างในแต่ละ clade มีวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกันมาก พบว่าตัวอย่างที่อยู่ใน clade 1 เป็นเชื้อราโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมไว้เมื่อปี 2549 ส่วน clade 2 เป็นเชื้อราโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมไว้เมื่อปี 2553 ดังจะเห็นได้ว่าช่วงเวลาที่แตกต่างกันในการเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้มีผลต่อความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่เกิดขึ้น ซึ่งผลที่ได้ นั้นมีความสอดคล้องกันกับผลการหาค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีค่าสูงเช่นเดียวกับค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างของเชื้อราโรคไหม้ที่มีค่าสูงด้วยเช่นกัน

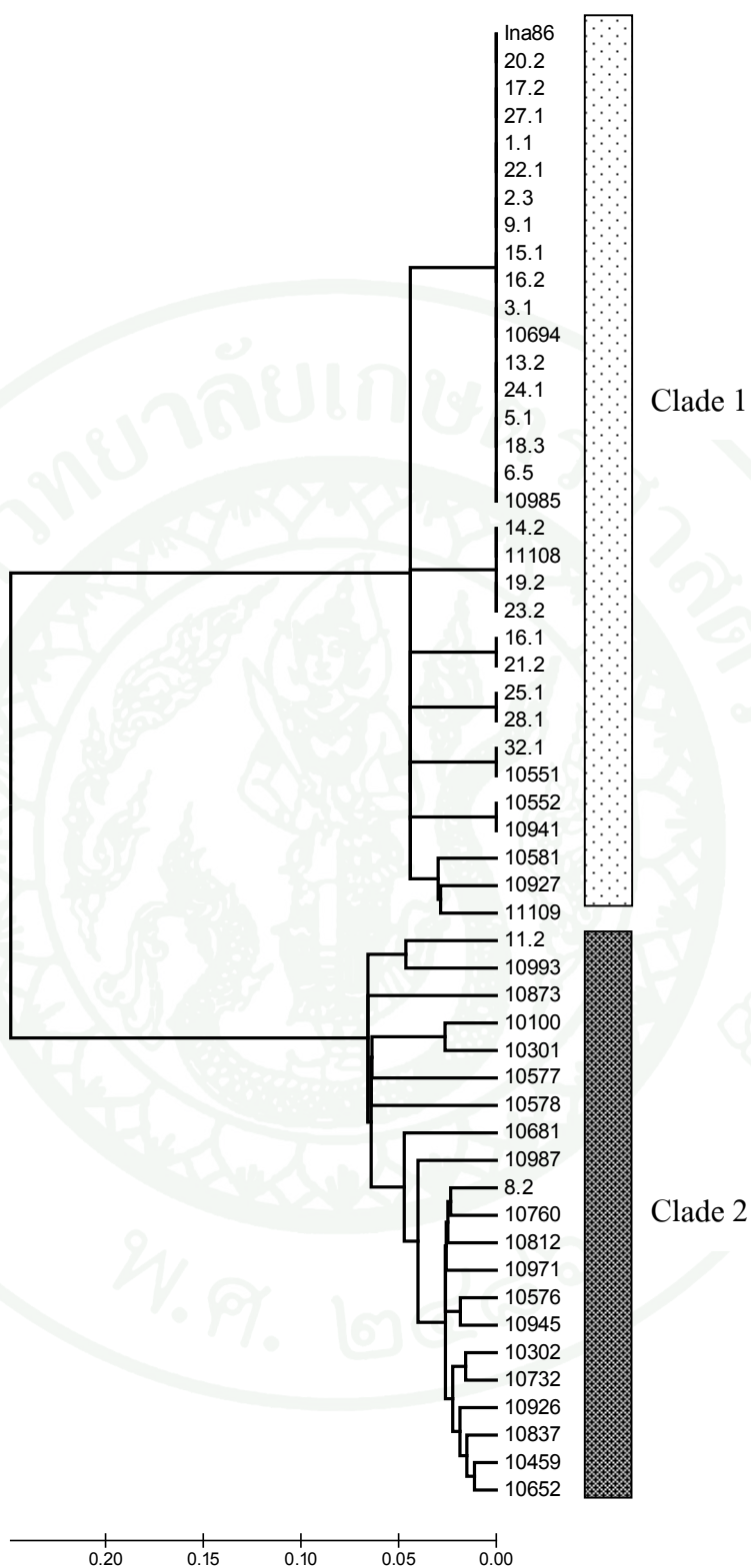


ภาพที่ 20 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากวิธี NJ โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pik*



ภาพที่ 21 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากวิธี MP โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

AVR-Pik



ภาพที่ 22 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากวิธี ML โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pik*

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนก่อโรค *AVR-Pii*

6.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบนิวคลีโอไทด์ยีนก่อโรค *AVR-Pii*

เมื่อพิจารณาลำดับเบสและแก้ไขลำดับเบสของแต่ละตัวอย่าง ที่พบว่ามิเบสผิดพลาดไป แล้วนำลำดับเบสบริเวณยีน *AVR-Pii* ที่ได้จากเชื้อราโรคไหม้ทั้ง 41 ตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank พบว่ายีน *AVR-Pii* มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (identity) ที่ 92.9-100 % จากนั้นใช้ลำดับเบสทั้ง 214 ตำแหน่งในการวิเคราะห์องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGA 5 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *AVR-Pik* ของเชื้อราโรคไหม้ *M. oryzae* มีองค์ประกอบของเบส A=29.0% T=24.9% C=27.8% และ G=18.3% จากข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการใช้นิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดของยีน *AVR-Pii* ไม่แสดงลักษณะเป็น A+T bias (A+T= 53.9%), (G+C=56.1%) ซึ่งแตกต่างกับยีน *AVR-Pita1* และ *AVR-Pik* (ตารางที่15) ที่แสดงลักษณะเป็น A+T bias ดังที่ได้แสดงให้เห็นก่อนหน้านี้

ตารางที่ 10 องค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์ในยีนก่อโรคทั้ง 3 ชนิด

	Nucleotide composition (%)					
	A	C	G	T	A+T	G+C
<i>AVR-Pita1</i>	34.4%	16.9%	17.1%	31.6%	66.0%	43.0%
<i>AVR-Pik</i>	28.1%	22.0%	20.5%	29.4%	57.5%	42.5%
<i>AVR-Pii</i>	29.0%	27.8%	18.3%	24.9%	53.9%	56.1%

หมายเหตุ A คือเบสอะดีนีน, C คือเบสไซโทซีน, G คือเบสกวานีน, T คือเบสไทมีน

Sample	Nucleotide position								
									
	5	15	25	35	45	55	65	75	
Ina168 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
1.1 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
2.1 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
2.3 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
3.1 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
4.1 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
4.2 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
9.1 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
9.3 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
11.1 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
11.2 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
13.2 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
15.1 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
16.1 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
16.2 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
17.2 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
18.3 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
19.2 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
20.2 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
23.2 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
25.1 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
27.1 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
28.1 AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA	
Clustal Consensus	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	

ภาพที่ 23 ผลการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pii* โดยอ้างอิงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *AVR-Pii* จากเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ Ina168

Sample		Nucleotide position									
											
		5	15	25	35	45	55	65	75		
10100	AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA		
10301	AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA		
10302	AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA		
10551	AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA		
10552	AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA		
10577	AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA		
10578	AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA		
10581	AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA		
10694	AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA		
10732	AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA		
10760	AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA		
10812	AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA		
10837	AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA		
10873	AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA		
10926	AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA		
10971	AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATCAC	TTTCGCTATT	GCATTTTATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA		
10985	AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA		
10987	AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA		
11108	AVR-Pii	ATGCAACTTT	CCAAAATTAC	TTTCGCTATT	GCATTATATG	CAATCGGAAT	CGCAGCACTT	CCCACTCCGG	CCAGCCTGAA		
Clustal Consensus		*****	*****	**	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

ภาพที่ 23 (ต่อ)

Sample	Nucleotide position							
								
	85	95	105	115	125	135	145	155
Ina168 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
1.1 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
2.1 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
2.3 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
3.1 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
4.1 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
4.2 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
9.1 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
9.3 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
11.1 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
11.2 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
13.2 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
15.1 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
16.1 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
16.2 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
17.2 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
18.3 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
19.2 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
20.2 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
23.2 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
25.1 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
27.1 AVR-Pii	GGGCAACACT	GAGGTCGCCA	CCAT-CCCCG	ACGTTAAACT	TGGGGCCCGC	AGCGACCCCC	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
28.1 AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCATTCCCCG	ACGTTAAACT	TGAGCCCCCA	ACCGCCACCA	CTCACCATAA	ATGTTCCAAA
Clustal Consensus	*****	***** *	***** *	***** *	***** *	***** *	***** *	***** *

ภาพที่ 23 (ต่อ)

Sample		Nucleotide position							
									
		85	95	105	115	125	135	145	155
10100	AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
10301	AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
10302	AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
10551	AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
10552	AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
10577	AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
10578	AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
10581	AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
10694	AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
10732	AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
10760	AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
10812	AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
10837	AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
10873	AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
10926	AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
10971	AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CATTG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCTTA
10985	AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
10987	AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
11108	AVR-Pii	TGGCAACACT	GAGGTCGCAA	CCAT-CTCCG	ACGTTAAACT	TGAGGCCCGC	AGCGACACCA	CTTATCATAA	ATGCTCCAAA
Clustal Consensus		*****	***** *	**** *	*****	** * **	* ** * **	** * *****	*** ** *

ภาพที่ 23 (ต่อ)

Sample	Nucleotide position					
						
	165	175	185	195	205	
Ina168 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
1.1 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
2.1 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
2.3 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
3.1 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
4.1 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
4.2 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
9.1 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
9.3 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
11.1 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
11.2 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
13.2 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
15.1 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
16.1 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
16.2 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
17.2 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
18.3 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
19.2 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
20.2 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
23.2 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
25.1 AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
27.1 AVR-Pii	TGGGGTTAGG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	GTAGAGGCCA	GTAA
28.1 AVR-Pii	TGCGGGTATG	GCAGCGATGA	TTCCAACGCG	TATTCTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
Clustal Consensus	** ** *	** *	**** *	**** *	** *	***

ภาพที่ 23 (ต่อ)

Sample		Nucleotide position					
							
		165	175	185	195	205	
10100	AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
10301	AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
10302	AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
10551	AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
10552	AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
10577	AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
10578	AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
10581	AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
10694	AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
10732	AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
10760	AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
10812	AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
10837	AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
10873	AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
10926	AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
10971	AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCTGCGATGA	TTCCGACCCG	TATTTTATTC	ATAAATGCAA	CTAA
10985	AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
10987	AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
11108	AVR-Pii	TGCGGTTATG	GCAGCGATGA	TTCCGACGCG	TATTTTAATC	ATAAATGCAA	CTAA
Clustal Consensus		** ** *	** *	*****	**** *	**** *	***

ภาพที่ 23 (ต่อ)

6.2 ตำแหน่งที่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (polymorphic site) ในยีน *AVR-Pii*

ผลการ alignment เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pii* จากตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้กับลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ Ina168 ที่มีการเผยแพร่ในฐานข้อมูล (GenBank ID: AB498874) (Yoshida *et al.*, 2009) มีตำแหน่งของการเปรียบเทียบทั้งหมด 214 ตำแหน่ง เป็นตำแหน่งที่มีตำแหน่งที่มีช่องว่าง (gap) ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์แบบ insertion/deletion ทั้งหมด 1 ตำแหน่ง เป็นตำแหน่งที่มีการกลายพันธุ์แบบแทนที่เบส 35 ตำแหน่ง ซึ่งแบ่งได้เป็น parsimony-informative site 1 ตำแหน่ง และ single variable site 34 ตำแหน่ง โดยเป็นตำแหน่งที่ไม่มีการกลายพันธุ์ 178 ตำแหน่งเมื่อพิจารณาตำแหน่งของการกลายพันธุ์ทั้งหมด(insertion/deletion+substitution) ที่เกิดขึ้นทั้ง 35 ตำแหน่ง (ตารางที่ 16) เป็นการกลายพันธุ์ในบริเวณที่มีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน (exon) เป็นการกลายพันธุ์ที่รหัสพันธุกรรม (codon) ตำแหน่งที่ 1 2 และ 3 เท่ากับ 10 11 และ 14 ตำแหน่ง ดังจะเห็นได้ว่า รหัสพันธุกรรมตำแหน่งที่ 3 จะเกิดการแทนที่เบสสูงที่สุด รองลงมาคือรหัสพันธุกรรมตำแหน่งที่ 2 และรหัสพันธุกรรมตำแหน่งที่ 1 เป็นตำแหน่งที่มีการอนุรักษ์สูงที่สุด เหตุที่เป็นเช่นนั้นเนื่องจากการกลายพันธุ์ของนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 2 ของรหัสพันธุกรรม จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน (non-synonymous substitution) มากกว่าการกลายพันธุ์ที่เกิดในตำแหน่งที่ 1 และตำแหน่งที่ 3 ดังนั้นนิวคลีโอไทด์ของรหัสพันธุกรรมในตำแหน่งที่ 2 จึงอยู่ภายใต้การคัดเลือกมากกว่านิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1 และ 3 ในรหัสพันธุกรรม ซึ่งผลที่ได้คือ นิวคลีโอไทด์ของรหัสพันธุกรรมตำแหน่งที่ 3 และ 1 จะมีอัตราการแทนที่เร็วกว่าตำแหน่งที่ 2 (Kumura, 1993) การหารูปแบบ haplotype โดยเปรียบเทียบจากลำดับกรดอะมิโนของยีน *AVR-Pii* 42 ตัวอย่าง พบว่าสามารถจำแนกได้ทั้งหมด 4 haplotype โดย haplotype A พบมากที่สุดคือ 39 ตัวอย่างโดยลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *AVR-Pii* จากเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ Ina168 ที่ใช้ในการเปรียบเทียบก็อยู่ในกลุ่มนี้ด้วย และ haplotype B C และ D มี haplotype อย่างละ 1 ตัวอย่าง

ตารางที่ 11 รูปแบบ haplotype ของเชื้อราโรคไหม้เมื่อเปรียบเทียบโดยใช้ความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนยีน *AVR-Pii*

Haplotype group	Number of isolates
Haplotype A*	39
Haplotype B	1
Haplotype C	1
Haplotype D	1

หมายเหตุ *คือ haplotype ที่มีตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ Ina168

Isolates	Amino acid sequence							
Ina 186	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
1.1 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
2.1 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
2.3 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
3.1 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
4.1 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
4.2 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
9.1 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
9.3 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
11.1 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
11.2 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
13.2 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
15.1 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
16.1 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
16.2 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
17.2 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
18.3 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
19.2 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
20.2 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
23.2 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
25.1 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
27.1 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
28.1 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
10100 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
10301 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
10302 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
10551 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
10552 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
10577 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
10578 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
10581 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
10694 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
10732 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
10760 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
10812 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
10837 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
10873 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
10926 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
10971 AVR-Pii	MQLSKITFAI	AFYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATIDVKL	EARSDDTTYHK	CSLCCGYGDD	SDPYFIHHCN	
10985 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
10987 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
11108 AVR-Pii	MQLSKITFAI	ALYAIGIAAL	PTPASLNGNT	EVATISDVKL	EARSDDTTYHK	CSKCGYGSDD	SDAYFNHHCN	
Consensus	*****	*:***	****	*.****:***	*****	***	. : . : **	** * . ** * : . : :

ภาพที่ 24 ผลการ alignment ลำดับกรดอะมิโนของยีน *AVR-Pii*

6.3 การทดสอบสมดุลของประชากร (neutrality test)

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 42 ตัวอย่าง มีเพียงสามตัวอย่างเท่านั้นที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 17 และ 18 ซึ่งประกอบลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *AVR-Pii* ที่มาจากตัวอย่าง 2.1 28.1 และ 10971 การหาค่าเฉลี่ยความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตำแหน่งระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ (π) ค่าที่ได้ ในบริเวณส่วนของ coding sequence มีค่าเท่ากับ 0.00837 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความผันแปรที่เกิดขึ้นน้อยมาก (low polymorphism) และค่าความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ของบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (θ) มีค่าเท่ากับ 0.03873 เนื่องด้วยมีเพียงสามตัวอย่างเท่านั้นที่แสดงลักษณะแตกต่างไปจากตัวอย่างอื่น ดังนั้นในการคำนวณหาค่า K_a/K_s ratio [the ratio of the number of non-synonymous substitutions per non-synonymous site (K_a) to the number of synonymous substitutions per synonymous site (K_s)] และการทดสอบสมดุลประชากรด้วยการทดสอบทางสถิติ (Tajima's D Fu and Li's D และ Fu and Li's F) อาจให้ผลการทดสอบที่ไม่น่าเชื่อถือหรือคลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริงในการอธิบายรูปแบบกลไกในการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pii* จากตัวอย่างเชื้อราทั้ง 42 ตัวอย่างได้ ดังนั้นจึงไม่แสดงผลการทดสอบดังกล่าว ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pii*

6.4 การวิเคราะห์ Molecular phylogenetics ของลำดับนิวคลีโอไทด์

6.4.1 การหาแบบจำลองการแทนที่เบส (nucleotide substitution model) ที่เหมาะสม

ก่อนการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจำเป็นต้องวิเคราะห์หาแบบจำลองการแทนที่เบสที่เหมาะสม จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *AVR-Pii* ทั้ง 214 ตำแหน่ง ด้วยโปรแกรม MEGA 5 (Kumar *et al.*, 2008) ซึ่งจะทำนายความเป็นไปได้หรือสัดส่วนของการเปลี่ยนแปลง นิวคลีโอไทด์ที่คาดว่าจะเกิดขึ้นในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนั้น จากผลการวิเคราะห์พบว่าแบบจำลองการแทนที่เบสของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ดีที่สุด คือ GTR (GTR = General Time Reversible) GTR model มีข้อกำหนดคือ ความถี่เบสแต่ละชนิดไม่เท่ากัน (variable base frequencies; $\pi_A \neq \pi_C \neq \pi_G \neq \pi_T$) อัตราการแทนที่เบสแต่ละรูปแบบมีความถี่ไม่เท่ากัน โดยมีความถี่เบสแต่ละชนิดคือ $\pi_A=0.2899$ $\pi_C=0.2485$ $\pi_G=0.2782$ $\pi_T=0.1834$ และกำหนด substitution rate matrix ดังต่อไปนี้

	A	U	C	G
A	-	6.37	8.98	4.68
U	7.43	-	11.39	5.46
C	9.36	10.18	-	5.29
G	7.40	7.40	5.69	-

แบบจำลองนี้มีการกำหนดค่าให้กับรูปแบบการแทนที่เบส 6 แบบ (Φ_{A-C} , Φ_{A-G} , Φ_{A-T} , Φ_{C-G} , Φ_{C-T} , Φ_{G-T} ; nst = 6) แบบจำลองการแทนที่เบสที่ได้จะถูกใช้เป็นข้อมูลในการคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) และการสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ), Maximum likelihood (ML) และ Maximum parsimony (MP)

6.4.2 การหาระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance)

ผลการคำนวณค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ทั้ง 42 ตัวอย่าง เมื่อใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pii* ในการคำนวณ (ตารางที่ 19) พบว่าได้ค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมมีค่า 0.008 โดยมีค่าต่ำสุดคือ 0.000 และมีค่าสูงสุดคือ 0.117 จากค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมแสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *AVR-Pii* ของเชื้อราโรคไหม้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยมากโดยมีเพียง 3 isolates (27.1 28.1 และ 10971) เท่านั้นที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างชัดเจนและยังแสดงให้เห็นถึงความคล้ายคลึงกันของยีน *AVR-Pii* ในเชื้อราโรคไหม้ได้เป็นอย่างดีเมื่อเปรียบเทียบกับจากลำดับนิวคลีโอไทด์ ค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมนั้นจะใช้ประกอบการวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกับผลการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการซึ่งจะได้กล่าวต่อไป

AVR-Pii	AVR-Pii	1.1	1.2	2.3	3.1	4.1	4.2	9.1	9.3	11.1	11.2	13.2	15.1	16.1	16.2	17.2	18.3	19.2	20.2	25.1	23.2	27.1	28.1
1.1	0.000																						
2.1	0.000	0.000																					
2.3	0.000	0.000	0.000																				
3.1	0.000	0.000	0.000	0.000																			
4.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																		
4.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																	
9.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																
9.3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000															
11.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000														
11.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000													
13.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000												
15.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000											
16.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000										
16.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000									
17.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000								
18.3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000							
19.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000						
20.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000					
25.1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000				
23.2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
27.1	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061	0.061		
28.1	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.066	0.117	

ภาพที่ 25 ค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคราไหม้แต่ละตัวอย่างโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AVR-Pii

	10100	10301	10302	10551	10577	10578	10581	10694	10732	10760	10812	10837	10873	10926	10971	10985	10987	10987	11108
10100																			
10301	0.000																		
10302	0.000	0.000																	
10551	0.000	0.000	0.000																
10552	0.000	0.000	0.000	0.000															
10577	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000														
10578	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000													
10581	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000												
10694	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000											
10732	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000										
10760	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000									
10812	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000								
10837	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000							
10873	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000						
10926	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000					
10971	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047	0.047				
10985	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.047			
10987	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.047	0.000		
11108	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.047	0.000	0.000	

ภาพที่ 25 (ต่อ)

6.4.3 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของเชื้อราโรคไหม้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pii*

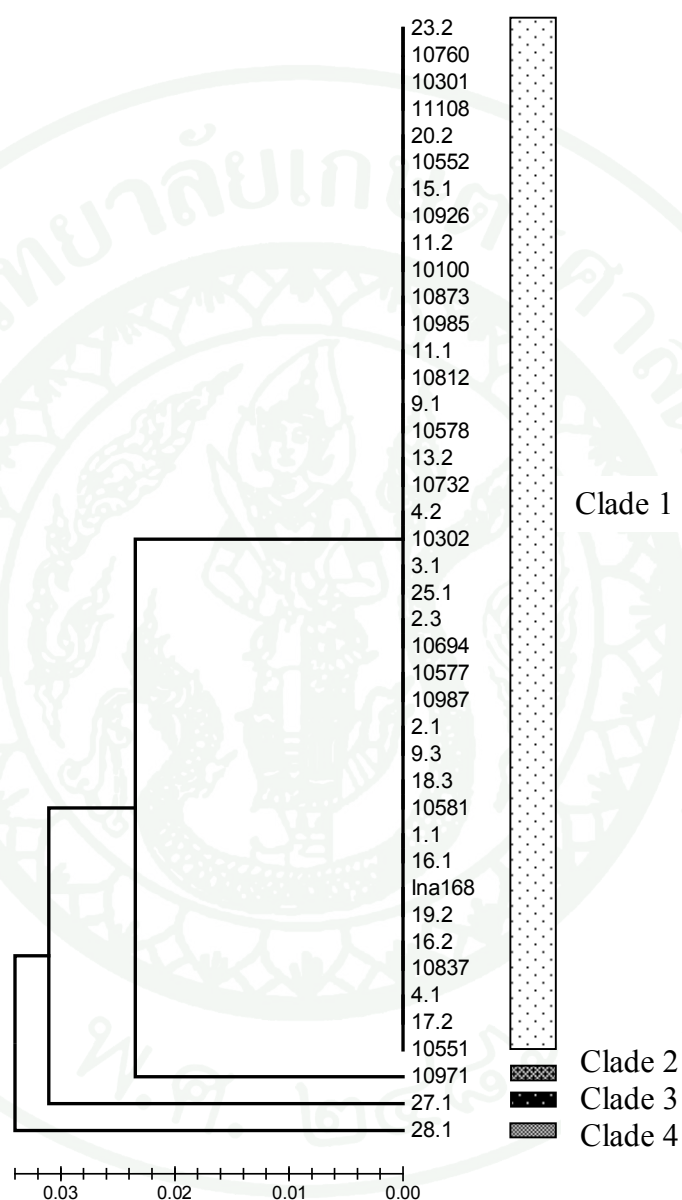
ผลการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor-Joining (NJ) ของยีน *AVR-Pii* โดยใช้เชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ Ina168 เป็น Reference ด้วยวิธี NJ (ภาพที่ 18) ที่ใช้ข้อมูลระยะห่างทางพันธุกรรม ทดสอบ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ สร้าง consensus tree ด้วยวิธี 50% majority-rule สามารถจัดลำดับความสัมพันธ์ของเชื้อราโรคไหม้โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *AVR-Pii* ได้เป็น 2 กลุ่มด้วยกัน (ภาพที่ 18)

ผลการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum parsimony (MP) ของยีน *AVR-Pii* โดยใช้เชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ Ina168 เป็น Reference ด้วยวิธี MP (ภาพที่ 19) ทดสอบ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยมี parsimony-informative site จำนวน 1 ตำแหน่งสร้าง consensus tree ด้วยวิธี 50% majority-rule สามารถจัดลำดับความสัมพันธ์ของเชื้อราโรคไหม้โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *AVR-Pii* ได้เป็น 2 กลุ่มเช่นเดียวกับวิธี NJ (ภาพที่ 19)

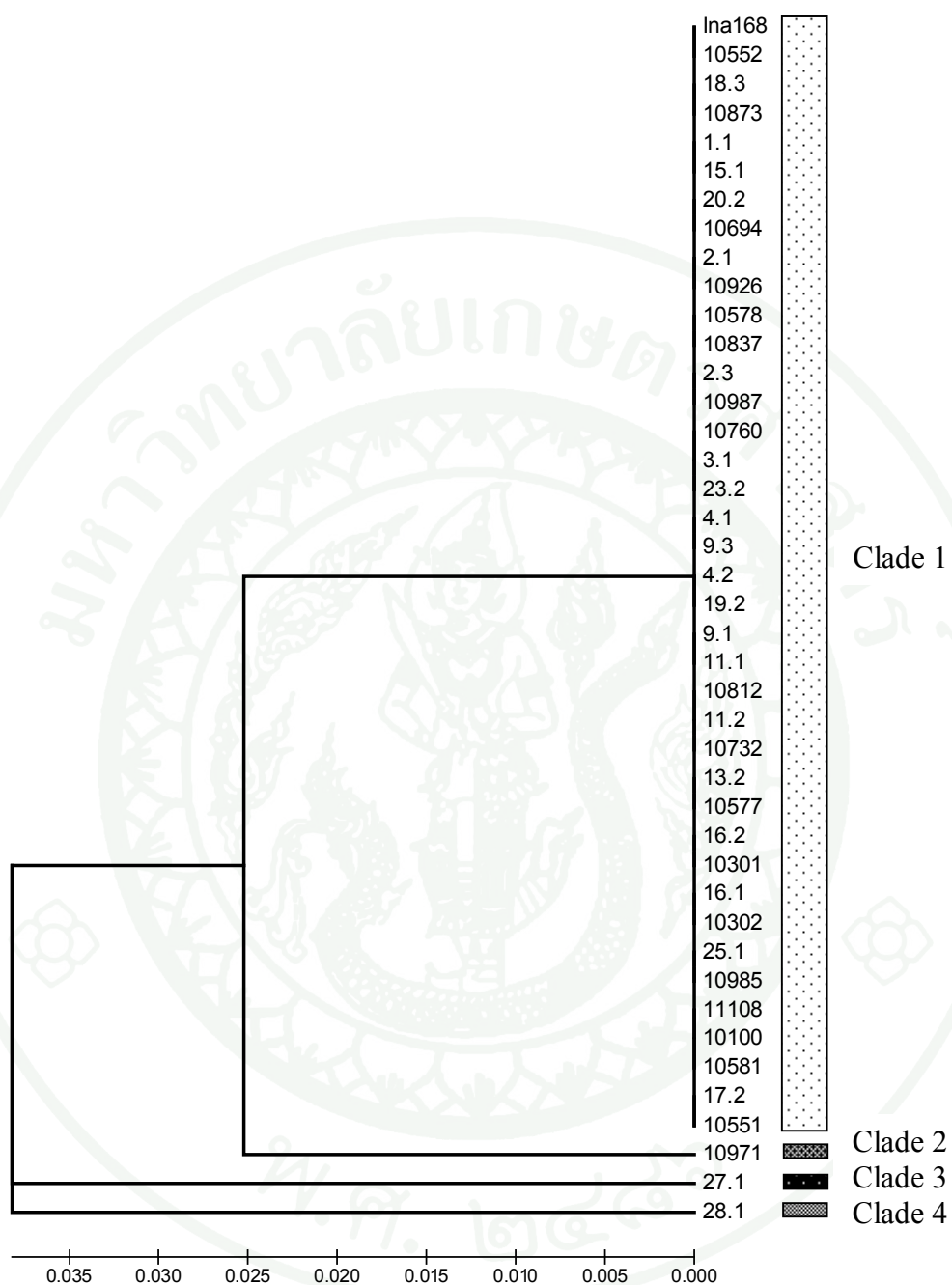
ผลการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี Maximum likelihood (ML) ของยีน *AVR-Pii* โดยใช้เชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ Ina168 เป็น Reference ด้วยวิธี ML (ภาพที่ 20) หา tree ที่มีความน่าจะเป็นสูงสุดจาก tree ที่เป็นไปได้ประกอบกับแบบจำลอง GTR ทดสอบ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ พบว่าได้ phylogenetic tree ที่มีค่า $-\ln \text{likelihood} = -474.14$ สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้สนับสนุนสอดคล้องกับ phylogenetic tree ที่สร้างโดยวิธี NJ และ MP (ภาพที่ 20)

ผลที่ได้จากการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี NJ MP และ ML แสดงให้เห็นว่า tree มีฐานคล้ายคลึงกันมาก โดยความแตกต่างระหว่าง phylogenetic tree ที่สร้างจากแต่ละวิธีเป็นความแตกต่างของความสัมพันธ์ภายใน สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของตัวอย่างส่วนใหญ่จะจัดอยู่ใน clade 1 ซึ่งมีวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกัน ส่วน clade 2, 3 และ 4 นั้นเป็นตัวอย่างที่สายสัมพันธ์แตกต่างอย่างชัดเจน สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีน *AVR-Pii* นั้นมีความใกล้เคียงมากซึ่งสอดคล้องกับผลการหาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่มตัวอย่างของเชื้อราโรคไหม้ซึ่งค่าที่ได้มีค่าที่ต่ำมาก จากผลการสร้าง phylogenetic tree จะเห็นว่าช่วงเวลาและภูมิภาคที่แตกต่างกันในการเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ไม่มีผลต่อความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่เกิดขึ้น วิวัฒนาการของยีน *AVR-Pii* มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน มีเพียงบางตัวอย่างเท่านั้นที่แสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์แยกออกมาจากกลุ่ม

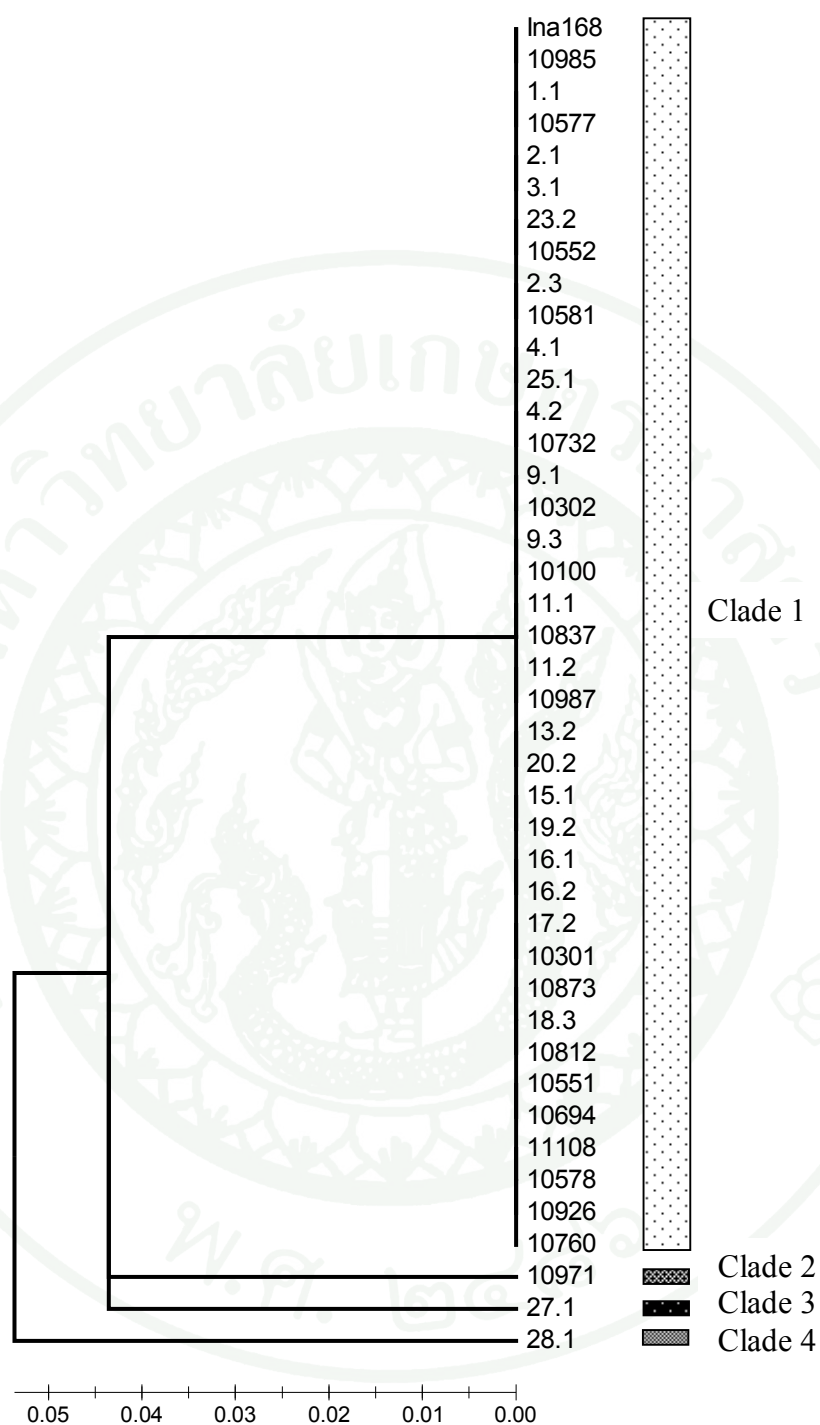
อย่างชัดเจน ผลที่ได้นั้นมีความสอดคล้องกันกับผลการหาค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีค่าต่ำเช่นเดียวกับค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ที่มีค่าต่ำเช่นเดียวกัน



ภาพที่ 26 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากวิธี NJ โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pii*



ภาพที่ 27 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากวิธี MP โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pii*



ภาพที่ 28 สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ได้จากวิธี MP โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pii*

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การเพิ่มปริมาณยีนก่อโรค *AVR gene* ด้วยวิธี PCR

ยีนก่อโรค *AVR gene* ที่มีการโคลนและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และมีปฏิสัมพันธ์กับยีนต้านทาน *R gene* ในข้าวประกอบไปด้วยยีน *AVR-Pita* *AVR1-CO39* *AVR-Pizt* *AVR-Pia* *AVR-Pii* และ *AVR-Pik/Pikm/Pikp* โดยในการศึกษารั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวทั้งหมดเพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละยีนจากตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ที่มีการเก็บรวบรวมมาจากแปลงเพาะปลูกข้าวที่แสดงอาการของโรคไหม้ขึ้น โดยตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมไว้นั้นเก็บมาจากปี พ.ศ. 2549 และปี พ.ศ. 2553 ซึ่งต้องการเปรียบเทียบถึงความแตกต่างของเวลาที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีนก่อโรคแต่ละยีน การใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนก่อโรค (specific primer) ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีนในบริเวณที่มีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน (coding region) และนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) เพื่อตรวจดูความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนก่อโรคของ *AVR gene* ต่าง ๆ ในแต่ละ isolates ของเชื้อราโรคไหม้ในการศึกษารั้งนี้สามารถเพิ่มปริมาณยีนขึ้นได้สามยีนด้วยกันคือ *AVR-Pita1* *AVR-Pik/Pikm/Pikp* และ *AVR-Pii* ซึ่งรูปแบบความหลากหลายที่เกิดขึ้นในแต่ละยีนมีความแตกต่างกัน ทั้งองค์ประกอบของลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่แสดงให้เห็นว่ายีน *AVR-Pita1* และ *AVR-Pik/Pikm/Pikp* มีลักษณะเป็น A+T bias ซึ่งแตกต่างจากยีน *AVR-Pii* ซึ่งไม่แสดงลักษณะดังกล่าว

2. ตำแหน่งที่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (polymorphic site) ในยีน *AVR*

2.1 การทำ Alignment เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR* แต่ละยีนโดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการเผยแพร่ในฐานข้อมูล GenBank พบการกลายพันธุ์เป็นแบบ insertion/deletion และ base substitution มีผลให้ตำแหน่งที่เกิดการกลายพันธุ์มีการแทนที่เบสเป็นแบบ singleton variable site และ parsimony-informative site การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดในบริเวณ exon ของแต่ละยีน ซึ่งมีผลทำให้การแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้เป็นโปรตีนที่แตกต่างกัน

2.2 ช่วงเวลาที่แตกต่างกันของการเก็บรวบรวมตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้จากข้าวที่แสดงอาการไหม้ มีความเกี่ยวข้องกับความหลากหลายที่เกิดขึ้นในยีน *AVR-Pik* จากผลการทดสอบความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์และการทดสอบสมมูลประชากรแสดงให้เห็นว่ารูปแบบของการเกิดวิวัฒนาการในยีน *AVR-Pik* นั้นไม่มีการเบี่ยงเบนไปจากทฤษฎี Neutral กระบวนการคัดเลือกที่ส่งผลต่อความหลากหลายเป็นกลไกการคัดเลือกแบบ neutral selection สาเหตุที่ทำให้เกิดการคัดเลือกแบบ neutral selection ในยีน *AVR-Pik* ของตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ที่ใช้ในการศึกษานี้ เป็นผลมาจากการเกิด genetic drift ทำให้เมื่อระยะเวลาผ่านไปรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เคยพบอยู่มากกลับสูญหายไปหรือพบได้น้อยลงและมีเพียงบางรูปแบบเท่านั้นที่สามารถถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมไปยังเชื้อราโรคไหม้รุ่นต่อ ๆ ไปได้ ซึ่งสาเหตุที่ทำให้รูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน *AVR-Pik* สูญหายไปมีสาเหตุมาจาก bottleneck effect ดังนั้นการอธิบายถึงรูปแบบความหลากหลายของยีน *AVR-Pik* อาจจะกล่าวได้ว่า เชื้อราโรคไหม้ที่มีการแพร่ระบาดในปี พ.ศ. 2549 เกิดกระบวนการ population bottleneck ทำให้รูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์บางลักษณะเกิดสูญหายไปเหลือเพียงบางรูปแบบเท่านั้นที่สามารถขยายพันธุ์และอยู่รอดมาได้ ลักษณะประชากรของเชื้อราโรคไหม้ในปี พ.ศ. 2553 จึงเป็นแบบ population expansion คือเป็นการขยายตัวของประชากรที่เหลือรอดมาจาก bottleneck effect

2.3 การเกิด positive selection มีผลต่อความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน *AVR-Pita1* ทำให้ผลการทดสอบสมมูลประชากรมีการเบี่ยงเบนไปจากทฤษฎี Neutral (Kimura, 1968) เป็นผลจากแรงผลักดันในธรรมชาติที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน *AVR-Pita1* โดยส่งผลโดยตรงต่อผลผลิต AVR protein ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกลไกการเกิดวิวัฒนาการมีความสอดคล้องกับงานทดลองที่เคยมีการรายงานมาแล้วก่อนหน้านี้ (Kang *et al.*, 2001, Zhou *et al.*, 2007, Dai *et al.*, 2010, Takahashi *et al.*, 2010) การเปลี่ยนแปลงทางด้านองค์ประกอบของกรดอะมิโนและชนิดของ AVR protein จะส่งผลโดยตรงต่อการทำงานของ *resistance gene* ซึ่งจะไม่สามารถกระตุ้นให้พืชนั้นเกิดความสามารถในการต้านทานต่อการเข้าทำลาย เหตุผลของการเกิดวิวัฒนาการของยีน *AVR-Pita1* นั้นก็เพื่อให้เชื้อสามารถเข้าทำลายข้าวและก่อให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคไหม้ได้

2.4 ยีน *AVR-Pii* เป็นยีนที่มีรูปแบบความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับยีน *AVR-Pita1* *AVR-Pik* จากผลการทดลองมีเพียง 3 isolates เท่านั้นที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันไปจาก isolate อื่น ๆ เป็นไปได้ว่ายีน *AVR-Pii* ยังไม่ได้รับผลกระทบจากกระบวนการคัดเลือกหรือกลไกใด ๆ ที่จะทำให้ยีน *AVR-Pii* มีวิวัฒนาการเกิดขึ้น รูปแบบของยีน

AVR-Pii ที่เราพบส่วนใหญ่เป็นลักษณะที่สามารถทำงานร่วมกันกับยีนต้านทาน *Pii* แล้วกระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทานขึ้นได้ (Yoshida *et al.*, 2009) ดังนั้นจึงเป็นข้อมูลที่ดีสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์ข้าวในการเลือกใช้ยีนต้านทาน *Pii* ที่มีความจำเพาะต่อยีน *AVR-Pii* เพื่อกระตุ้นให้ข้าวเกิดกระบวนการต้านทานเมื่อถูกเชื้อราโรคไหม้เข้าทำลาย

3. ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราโรคไหม้

ผลที่ได้จากการสร้าง phylogenetic tree ของยีน *AVR-Pita1* และ *AVR-Pii* แสดงให้เห็นถึงลำดับของวิวัฒนาการที่มีความใกล้เคียงกันภายในตัวอย่างของแต่ละยีน ช่วงเวลาและภูมิภาคที่แตกต่างกันของตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ไม่แสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์กับวิวัฒนาการที่เกิดขึ้น การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน *AVR-Pita1* และ *AVR-Pii* ให้ผลการทดสอบที่ใกล้เคียงกันกับการวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์และการทดสอบสมมูลประชากร

ผลที่ได้จากการสร้าง phylogenetic tree ของยีน *AVR-Pik* สามารถแบ่งสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการออกเป็น 2 กลุ่มได้อย่างชัดเจน โดยในแต่ละกลุ่มจะเป็นกลุ่มที่มีรูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกัน ผลที่ได้มีความสอดคล้องกันกับการวิเคราะห์หาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์และการทดสอบสมมูลประชากร ผลจากการสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี NJ MP และ ML มีฐานฐานคล้ายคลึงกันมาก โดยความแตกต่างระหว่าง phylogenetic tree ที่สร้างจากแต่ละวิธีจะเป็นความแตกต่างของความสัมพันธ์ภายในของ *AVR* gene แต่ละกลุ่ม

ข้อเสนอแนะ

1. ตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ *M. oryzae*

ควรเก็บรวบรวมตัวอย่างของเชื้อราโรคไหม้เพื่อให้ครอบคลุมทุกพื้นที่ของประเทศไทย เพราะโรคไหม้เป็นโรคที่มีการระบาดอย่างกว้างขวางและยังสามารถเข้าทำลายได้ทุกพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกข้าว ระดับความรุนแรงของการเข้าทำลายของเชื้อราชนิดนี้มีความรุนแรงที่แตกต่างกันตามสภาวะภูมิประเทศและสายพันธุ์ข้าว

2. ตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธี PCR

การอธิบายถึงสาเหตุที่ว่า เพราะอะไรตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อราโรคไหม้บางสายพันธุ์ถึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธี PCR ไม่สามารถสรุปได้ว่าตัวอย่างเชื้อราสายพันธุ์นั้นไม่มี *AVR* gene ที่เราสนใจ จากการรายงานของ Dai และคณะในปี 2553 ได้อธิบายถึงสาเหตุไว้คือ การเกิด deletion ในส่วนปลาย 5' หรือ 3' และการเกิด complete deletion ของ *AVR* gene ซึ่งลักษณะที่เกิดขึ้นทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอบริเวณที่เกิด deletion ไปได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ชาตรี สิทธิกุล. 2540. โรคของพืชไร่. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ และ สุริพร เกตุงาม. 2552. โรคไหม้ในข้าวและสถานการณ์ปัจจุบันของงานวิจัยด้านยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าว. *แก่นเกษตร* 37: 69-78.
- สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2552. การปรับปรุงพันธุ์พืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์, พะยอม โคเบลลี, อัจฉาพร ณ ลำปาง เนินพลับ, ถนอมจิตร ฤทธิมนต์, กุลชญา เกศสุวรรณ, ชนสิริน กลิ่นมณี และ สงวน เทียงดีฤทธิ. 2550. การตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทย. *Thai Rice Res. J.* 1: 52-64.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สมคิด ดิสถาพร. 2532. ขาวนาปราบโรคข้าว. กลุ่มงานวิจัยโรคข้าวและธัญพืชเมืองหนาว กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- วัชร ภูริวิโรจน์กุล. 2534. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคแมลง. ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี สถาบันวิจัยข้าว. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- วาสนา พุ่มสคติย์. 2544. ความหลากหลายทางชีวภาพและความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราโรคใบไหม้ของข้าวในจังหวัดเชียงใหม่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

- Ahiaoui , N., P. Srichumpa, R. Dudler and B. Keller. 2004. Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat. **Plant J.** 37: 528-538.
- Abramovitch, R.B., J.C. Anderson and G.B. Martin. 2006. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 7: 601-611.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** 215: 403-410.
- Allen, R.L., B. Bittner Baker, P. Zambryski, B. Staskawicz and S.P. Dinesh-Kumar. 1997. Signaling in plant-microbe interactions. **Science** 276: 726-733.
- Arase, S., S.K. Onoshita, M. Kono, M. Nozu, E. Tanaka and S. Nishimaru. 1990. Studies on host-selective infection mechanism of *Pyricularia oryzae* Cavara (2). Production of susceptibility-inducing factor from germinating spores and their phytotoxicity. **Annual of the Phytopathological Society of Japan** 56: 322-330.
- Ashikawa, I., N. Hayashi, H. Yamane, H. Kanamori, J. Wu, T. Matsumoto, K. Ono and M. Yano. 2008. Two adjacent nucleotide-binding-site leucine-rich-repeat class genes are required to confer *Pikm*-specific rice blast resistance. **Genetics** 180: 2267-2276.
- Babujee, L. and S.S. Gnanamanickam. 2000. Molecular tools for characterization of rice blast pathogen (*Magnaporthe grisea*) population and molecular marker-assisted breeding for disease resistance. **Current Science** 78: 248-257.
- Ballini, E., J.B. Morel, G. Droc, A. Price, B. Courtois, J.L. Notteghem and D. Tharreau. 2008. A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 21: 859-568.

- Bai, J., L.A. Pennill, J. Ning, S.W. Lee, J. Ramalingam, C.A. Webb, B. Zhao, Q. Sun, J.C. Nelson, J.E. Leach and S.H. Hulbert. 2002. Diversity in nucleotide binding site-leucine-rich repeat genes in cereals. **Genome Research**. 12: 1871-1884.
- Bent, A.F., B.M. Kunkel, D. Dahlbeck, K.L. Brown, R. Schmidt, J. Giraudat, J. Leung and B.J. Staskawicz. 1994. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. **Science** 265: 1856-1860.
- Bonman, J.M., T.I. Vergel de Dedios and M.M. Khin. 1986. Physiological specialization of *Pyricularia oryzae* in the Philippines. **Plant Dis.** 70:767-769.
- Bonman, J.M., G.S. Khush and R. Nelson. 1992. Breeding rice for resistance to pests. **Annu. Rev. Phytopathol** 30: 507-528.
- Bowman, B.H., J.W. Taylor and T.J. White. 1992. Molecular evolution of the fungi: human pathogens. **Mol. Biol. Evol.** 9: 893-904.
- 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, U.S.A.
- Bryan, G.T., K. Wu, L. Farrall, Y. Jia, H.P. Hershey, S.A. McAdams, K.N. Faulk, G.K. Donaldson, R. Tarchini and B. Valent. 2000. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of rice blast resistance gene *Pi-ta*. **Plant Cell** 12: 2033-2045.
- Chauhan, S., M.L. Farman, H.B. Zhang and A. Leong. 2002. Genetic and physical mapping of a rice blast resistance locus, *PiCO39* (t), that corresponds to the avirulence gene *AVR1-CO39* of *Magnaporthe grisea*. **Mol Genet Genomics** 267: 603-612.

- Chen, X.W., S.G. Li, J.C. Xu, W.X. Zha, Z.Z. Ling, B.T. Ma, Y.P. Wang, W.M. Wang, G. Cao, Y.Q. Ma, J.J. Shang, X.F. Zhao, K.D. Zhou and L.H. Zhu. 2004. Identification of two blast resistance genes in a rice variety, Digu. **Phytopathology** 152: 77-85.
- Chen, X., J. Shang, D. Chen, C. Lei, Y. Zou, W. Zhai, G. Liu, J. Xu, Z. Ling, G. Cao, B. Ma, Y. Wang, X. Zhao, S. Li and L. Zhu. 2006. A β -lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. **Plant J.** 46: 794-804.
- Chenna, R., H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T.J. Gibson, D.G. Higgins and D. Thompson. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. **Nucleic Acids Res.** 31: 3497-3500.
- Collins, N., J. Drake, M. Ayliffe, Q. Sun, J. Ellis, S. Hulbert and T. Pryor. 1999. Molecular characterization of the maize *Rp1-D* rust resistance haplotype and its mutants. **Plant Cell** 11: 1365-1376.
- Correa-Victoria, F.J., D. Tharreau, C. Martinez, M. Vales, F. Escobar, G. Prado and G. Aricada. 2002. Combinacio'n de genes en arroz para el desarrollo de resistencia durable a *Pyricularia grisea* en Colombia. **Fitopatologi'a Colombiana** 26: 47-54.
- Costanzo, S. and Y. Jia. 2010. Sequence variation at the rice blast resistance gene Pi-km locus: Implications for the development of allele specific markers. **Plant Science** 178: 523-530.
- Couch, B.C. and L.M. Kohn. 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. **Mycologia** 94: 683-693.
- Dangl, J.L. and J.D. Jones. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature** 411: 826-833.

- Dai, Y., Y. Jia, J. Correll, X. Wang and Y. Wang. 2010. Diversification and evolution of the avirulence gene *AVR-Pita1* in field isolates of *Magnaporthe oryzae*. **Fungal Genet. Biol.** 37: 973-980.
- Dean, R.A., N. J. Talbot, D.J. Ebbole, M.L. Farman, T.K. Mitchell, M.J. Orbach, M. Thon, R. Kulkarni, J.R. Xu, H. Pan, N.D. Read, Y.H. Lee, I. Carbone, D. Brown, Y.Y. Oh, N. Donofrio, J.S. Jeong, D.M. Soanes, S. Djonovic, E. Kolomiets, C. Rehmeier, W. Li, M. Harding, S. Kim, M.H. Lebrun, H. Bohnert, S. Coughlan, J. Butler, S. Calvo, L.J. Ma, R. Nicol, S. Purcell, C. Nusbaum, J.E. Galagan and B.W. Birren. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Nature** 434: 980-986
- Disthaporn, S. 1994. **Rice Disease Control by farmers**. Thai Phytopathology Society, Thailand.
- Dodds, P.N., G.J. Lawrence, T. Pryor and J.G. Ellis. 2001. Six amino acid changes confined to the leucine-rich repeat β -strand/ β -turn motif determine the difference between the *P* and *P2* rust resistance specificities in flax. **Plant Cell** 13: 163-178.
- Ellis, J.G., G.J. Lawrence, J.E. Luck and P.N. Dodds. 1999. Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene *L* that determine differences in gene-for-gene specificity. **Plant Cell** 11: 495-506.
- Farman, M.L. and S.A. Leong. 1998. Chromosome walking to the *AVR1-CO39* avirulence gene of *Magnaporthe grisea*: discrepancy between the physical and genetic maps. **Genetics** 150: 1049-1058.
- Farman, M.L., Y. Eto, T. Nakao, Y. Tosa, H. Nakayashiki, S. Mayama and S.A. Leong. 2002. Analysis of the Structure of the *Avr1-CO39* Avirulence Locus in Virulent Rice-Infecting Isolates of *Magnaporthe grisea*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 15: 6-16.

- Flor, H.H. 1971. Current status of gene-for-gene concept. **Annu. Rev. Phytopathology**. 9: 275-296.
- Fu, Y.X. and W.H. Li. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics** 133: 693-709.
- Fudal, I., H.U. Bohnert, D. Tharreau, M.H. Lebrun and H.L. Marc. 2005. Transposition of MINE, a composite retrotransposon in the avirulence gene *ACE1* of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Fungal Genetics and Biology** 42: 761-772.
- Fukuoka, S. and K. Okuno. 2001. QTL analysis and mapping of *pi21*, a recessive gene for field resistance to rice blast in Japanese upland rice. **Theor. Appl. Genet.** 103: 185-190.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp. Ser.** 41: 95-98.
- Hammond-Kosack, K. E. and J.D.E. Jones. 1996. Inducible plant defense mechanisms and resistance gene function. **The Plant Cell** 8: 1773-1791.
- Hammond-Kosack, K.E. and J.E. Parker. 2003. Deciphering plant-pathogen communication: Fresh perspectives for molecular resistance breeding. **Curr. Opin. Biotechnol.** 14: 177-193.
- Hayashi, K. and H. Yoshida. 2009. Refunctionalization of the ancient rice blast disease resistance gene *Pit* by the recruitment of a retrotransposon as a promoter. **Plant J.** 57: 413-425.
- Hebert, T.T. 1971. The perfect stage of *Pyricularia grisea*. **Phytopathology** 61: 83-87.

- Hofmann, C. and K. Babuin. 1993. Lipoxygenase activity in rice treated with resistance inducers. **Plant-Microbe Interact.**, pp 21-24. Rutgers university, Abstr.
- Howard, R.J. 1994. Cell Biology of pathogenesis, pp. 3-22. *In* R. S. Zeigler, L. S.A. and P.S. Teng., eds. **Rice Blast Disease**. CAB International/IRRI, Wallingford, UK.
- Howard, R.J. and B. Valent. 1996. Breaking and entering: Host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **Annu. Rev. Microbiol.** 50: 491-512.
- Howles, P., G. Lawrence, J. Finnegan, H. McFadden, M. Ayliffe, P. Dodds and J. Ellis. 2005. Autoactive alleles of the flax *L6* rust resistance gene induce non-race-specific rust resistance associated with the hypersensitive response. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 18: 570-582.
- Hutamekalin, P., T. Veerapraditsin, S. Pimpisithavorn, T. Sreewongchai and P. Sirithunya. 2001. AFLP analysis of blast pathogen diversity in Thailand, pp. 42-54. *In* **Conference on Functional Genomics of Rice and Seed Biotechnology**. Bangkok, Thailand.
- Iwata, N. 1996. Report of the committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups. **Rice Genet Newsl.** 13: 12-35.
- Iyer, A.S. and S.R. McCouch. 2004. The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 17: 1348-1354.
- Jia, Y., S.A. McAdams, G.T. Bryan, H.P. Hershey and B. Valent. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. **EMBO J.** 19: 4004-4014.
- Jia, Y. 2003. Marker assisted selection for the control of rice blast disease. **Pestic Outlook** 14: 150-152.

Jones, D.A. and J.D.E. Jones. 1997. The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences. **Adv. Bot. Res.** 24: 89-167.

Kalendar, R., D. Lee, A.H. Schulman. 2009. FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. **Genes, Genomes and Genomics** 3: 1-14.

Kang, S., J.A. Sweigard and B. Valent. 1995. The *PWL* host specificity gene family in the blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Mol. Plant- Microbe Interact.** 8: 939-948.

Kang, S., E. Mullins, T.M. Dezwaan and M.J. Orbach. 2000. **Pathogenesis and genome organization of the rice blast fungus.** Kluwer Academic publishers, USA.

Kang, S., M.H. Lebrun, L. Farrall and B. Valent. 2001. Gain of virulence caused by insertion of a Pot3 transposon in a *Magnaporthe grisea* avirulence gene. **Mol. Plant Microbe Interact.** 14: 671-674.

Kimura, M. 1983. **The neutral theory of molecular evolution.** Cambridge University Press, Cambridge, U.K.

Kiyosawa, S. 1982. Genetic and epidemiological modeling of breakdown of plant disease resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.** 20: 93-117.

Koide, Y., N. Kobayashi, D. Xu and Y. Fukuta. 2009. Blast resistance genes and their selection markers in rice (*Oryza sativa*), pp. 95-122. In Y. Fukuta C.M. Vera Cruz and N. Kobayashi., eds. **Development and characterization of blast resistance using differential varieties in rice.** Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan.

- Kumar S., M. Nei, J. Dudley and K. Tamura. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in Bioinformatics**. 9: 299-306.
- Lee, E.J. and S.Y. Cho. 1990. Variation in races of rice blast disease and varietal resistance in Korea. *In Paper presented at the Focus on Irrigated Rice*. 27-31 August 1990. Seoul. Korea.
- Lee, S.K., M.Y. Song, Y.S. Seo, H.K. Kim, S. Ko, P.J. Cao, J.P. Suh, G. Yi, J.H. Roh, S. Lee, G. An, T.R. Hahn, G.L. Wang, P. Ronald and J.S. Jeon. 2009. Rice *Pi5*-mediated resistance to *Magnaporthe oryzae* requires the presence of two coiled-coil–nucleotide-binding-leucine-rich repeat genes. **Genetics** 181: 1627-1638.
- Li, W., B. Wang, J. Wu, G. Lu, Y. Hu, X. Zhang, Z. Zhang, Q. Zhao, Q. Feng, H. Zhang, Z. Wang, G.L. Wang, B. Han, Z. Wang and B. Zhou. 2009. The *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AVRPiz-t* encodes a predicted secreted protein that triggers the immunity in rice mediated by the blast resistance gene *Piz-t*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 22: 411-420.
- Lin, F., S. Chen, Z. Que, L. Wang, X. Liu and Q. Pan. 2007. The blast resistance gene *Pi37* encodes a nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a resistance gene cluster on rice chromosome 1. **Genetics** 177: 1871-1880.
- Liu, G., G. Lu, L. Zeng and G.L. Wang. 2002. Two broad-spectrum blast resistance genes, *Pi9(t)* and *Pi2(t)*, are physically linked on rice chromosome 6. **Mol. Genet. Genomics** 267: 472-480.
- Liu, X., L. Wang, S. Chen, F. Lin and Q. Pan. 2005. Genetic and physical mapping of *Pi36(t)*, a novel rice blast resistance gene located on rice chromosome 8. **Mol. Genet. Genomics** 274: 394-401.

- Liu, J.L., X.L. Liu, L.Y. Dai and G.L. Wang. 2007a. Recent progress in elucidating the structure, function and evolution of disease resistance genes in plants. **J. Genet. Genomics** 34: 765-776.
- Liu, X., F. Lin, L. Wang and Q. Pan. 2007b. The in silico map-based cloning of *Pi36*, a rice coiled-coil-nucleotide-binding site-leucine-rich repeat gene that confers race-specific resistance to the blast fungus. **Genetics** 176: 2541-2005.
- Liu, X., Q. Yang, F. Lin, L. Hua, C. Wang, L. Wang and Q. Pan. 2007c. Identification and fine Mapping of *Pi39(t)*, a major gene conferring the broad-spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae*. **Mol. Genet. Genomics**. 278: 403-410.
- Lodhi, M.A., G.N. Ye, N.F. Weeden and B.I. Reisch. 1994. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. **Plant Mol. Biol. Rept.** 12: 6-13.
- Mackfl, D.J. and J.M. Bonman. 1992. Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice. **Phytopathology** 82: 746-749.
- Marchetti, M.A., X. Lai and C.N. Bollich. 1987. Inheritance of resistance to *Pyricularia oryzae* in rice cultivars grown in the United States. **Phytopathology** 77:799-804.
- Martin, G.B., A.J. Bogdanove and G. Sessa. 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. **Annu. Rev. Plant Biol.** 54: 23-61.
- Matsuyama, N. 1975. The effect of ample nitrogen fertilizer on cell wall material and its significance to rice blast disease. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**. 41: 56-61.
- Mehrotra, R.S. and A. Aggarwal. 2003. **Plant Pathology: Blast Disease of Rice**. Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited. New Delhi India.

- Mekwantanakarn, P. 1996. Characterization of *Pyricularia grisea* population by lineage using MGR-DNA fingerprinting in Thailand, p. 66, *In Third Asia Pacific Conference on Agricultural Biotechnology*. Hua-Hin, Prachupkirihaan, Thailand.
- Meyers, B.C., D.B. Chin, K.A. Shen, S. Sivaramakrishnan, D.O. Lavelle, Z. Zhang and R.W. Michelmore. 1998. The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. **Plant Cell** 10: 1817-1832.
- Meyers, B.C., A. Kozik, A. Griego, H. Kuang and R.W. Michelmore. 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. **Plant Cell** 15: 809-834.
- Miki, S., M. Kotaro, K. Hideki, O. Keisuke, A. Taketo, Y. Nobuko, F. Satoru, S. Junko, H. Kazuyuki, F. Yoshikatsu *et al.* 2009. Molecular cloning and characterization of the AVR-Pia locus from a Japanese field isolate of *Magnaporthe oryzae*. **Mol Plant Pathol.** 10: 361-374.
- Mindrinis, M., F. Katagiri, G.L. Yu and F.M. Ausubel. 1994. The *A. thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. **Cell** 78: 1089-1099.
- Moldenhauer, K.A.K., A.O. Bastawisi and F.N. Lee. 1992. Inheritance of resistance in rice to races IB-49 and IC-17 of *Pyricularia grisea* rice blast. **Crop Sci.** 32: 584-588.
- Morris, L., J.C. Fernando, S.Z. Robert, X. Shizong and E.H. John. 1993. Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. **Phytopathology** 83: 1427-1433.
- Nagato, Y. and A. Yoshimura. 1998. Report of the committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups. **Rice Genet Newsl.** 15: 13-74.

- Narayana, R. and K. Suryanarayanan. 1974. Studies on the toxins *Pyricularia* 2). Detection of pyriculol in blast disease leaves of Gramineae. **Current Sci.** 43: 3348-3349.
- Nei, M. and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 76: 5269-5273.
- Nei, M. 1987. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University, New York.
- Nei, M. and S. Kumar. 2000. **Molecular evolution and phylogenetics**. Oxford University Press, New York.
- Nimchuk, Z., T. Eulgem, B.F. III. Holt and J.L. Dangl. 2003. Recognition and response in the plant immune system. **Annu. Rev. Genet.** 37: 579-609.
- Orbach, M.J., L. Farrall, J.A. Sweigard, F.G. Chumley and B. Valent. 2000. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. **Plant Cell** 12: 2019-2032.
- Ou, S.H. 1972. **Rice disease**. Commonwealth Mycological Institute. Kew, England.
- Ou, S.H. 1985. **Rice diseases**. IRRI, Los Banos, Philippines.
- Ouyang, G.C., C.Y. Ying, M.H. Zhu and Y.L. Xue. 1987. Inducing of disease resistance by spores and toxins of *Pyricularia oryzae* in rice and its relation to the phenylpropane pathway. **Plant Physiology communications**. 4: 40-42.
- Parker, J.E. and M.J. Coleman. 1997. Molecular intimacy between proteins specifying plant-pathogen recognition. **Trends Biochem. Sci.** 22: 291-296.

- Posada, D. and T.R. Buckley. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches Over Likelihood Ratio Tests. **Syst. Biol.** 53: 793-808.
- Powell, W., C. Machray and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Sci.** 1: 215-222.
- Qu, S., G. Liu, B. Zhou, M. Bellizzi, L. Zeng, L. Dai, B. Han and G.-L. Wang. 2006. The Broad-Spectrum Blast Resistance Gene *Pi9* Encodes a Nucleotide-Binding Site–Leucine-Rich Repeat Protein and Is a Member of a Multigene Family in Rice. **Genetics** 172: 1901-1914.
- Rozas, J., J.C. Sanchez-Delbarrio, X. Messeguer and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. **Bioinformatics** 19: 2496-2497.
- Saxena, K.M.S. and A.L. Hooker. 1968. On the structure of a gene for disease resistance in maize. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 68: 1300-1305.
- Scardaci, S.C., R.K. Webster, C.A. Greer, J.E. Hill, J.E. Williams, R.G. Mutters, D.M. Brandon, K.S. McKenzie and J.J. Oster. 2002. **Rice Blast : A New Disease in california. Department of Agronomy and Range Science University of California.** Available Source: <http://www.agronomy.ucdavis.edu/uccerice/AFS/agfs0297.html>, May 2, 2003.
- Schneider M., P. Schweizer, P. Meuwly and J.P. Métraux. 1996. Systemic Acquired Resistance in Plants. **Int. Rev. Cytology.** 168: 303-340.
- Sesma, A and A.E. Osbourn. 2004. The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. **Nature** 431: 582-586.

- Shang, J.J., Y. Tao, X.W. Chen, Y. Zou, C.L. Lei J. Wang X.B. Li, X.F. Zhao, M.J. Zhang, Z.K. Lu, J.C. Xu, Z.K. Cheng, J.M. Wan and L.H. Zhu. 2009. Identification of a new rice blast resistance gene, *Pid3*, by genomewide comparison of paired NBS-LRR genes and their pseudogene alleles between the two sequenced rice genomes. **Genetics** 182: 1303-1311
- Sharma, T.R., B. Madhav, P. Singh, T. Shanker, V. Jana, A. Dalal, A. Pandit, K. Singh, H. Gaik and N. Singh. 2005. High-resolution mapping, cloning and molecular characterization of the *Pi-kh* gene of rice, which confer resistance to *Magnaporthe grisea*. **Mol. Genet. Genomics** 274: 569-578.
- Shen, Y., X.P. Yuan, C.Y. Li, J. Manry, P.L. Zhu, Z.X. Luo, Y.L. Wang and M. Levy. 1998. Genetic diversity in *Magnaporthe grisea* & pathogenic variation of its progeny by hyphal fusion. In **International Congress of Plant Pathology 7th**. Montpellier, France.
- Sriprakhon, S., E. Roumen, A. Surin, J.J. Luangsa-ard, T. Veerapraditsin, S. Pimpisitthavorn and P. Sirithunya. 2001. Fertility and mating type of *Magnaporthe grisea* rice in pathogen in Thailand, pp. 33-41. In **Conference on Functional Genomics of Rice and Seed Biotechnology**. Bangkok, Thailand.
- Sun, X., Y. Cao, Z. Yang, C. Xu, X. Li, S. Wang and Q. Zhang. 2004. *Xa26*, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encoding a LRR receptor kinase-like protein. **Plant J.** 37: 517-527.
- Sweigard, J.A. 1995. Identification, cloning, and characterization of *PWL2*, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. **Plant Cell** 7: 1221-1233.
- Tabien, R.E., Z. Li, A.H. Paterson, M.A. Marchetti, J.W. Stansel and S.R.M. Pinson. 2002. Mapping QTLs for field resistance to the rice blast pathogen and evaluating their individual and combined utility in improved varieties. **Theor. Appl. Genet.** 105: 313-324.

- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics** 123: 585-595.
- Talbot, N.J., M.J. Kershaw, G.E. Wakley, V.O.M.H. De, J.G.H. Wessels and J.E. Hamer. 1996. *MPG1* encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-relates development of *Magnaporthe grisea*. **Plant Cell** 8: 985-999.
- Tamari, K. and J. Kaji. 1954. Biochemmical studies of the blast fungus (*Pyricularia oryzae*), the causative fungus of the blast disease of rice plant I. Studies on the toxin produced by blast fungus. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan** 28: 254-258.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 22: 4673-4680.
- Tsujimoto, M., N. Yasuda and Y. Fujita. 1998. Evidence of parasexual recombination of *Magnaporthe grisea*. **International rice blast conference 2^{ed}**. Montpellier, France
- Valent, B., L. Farrall and F.G. Chumley. 1991. *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. **Genet.** 127: 87-101.
- 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.
- Wakimoto, S. and H. Yoshii. 1958. Relation between polyphenols contained in plant and phytopathogenic fungi(1) Polyphenoles contained in rice plants. **Annals of the Phytopathological Society of Japan** 23: 79-84.

Wang, X., M. Yano, U. Yamanouchi, M. Iwamoto, L. Monna, H. Hayasaka, Y. Katayose and T. Sasaki. 1999. The *Pi-b* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. **The Plant J.** 19: 55-64.

Watterson, G.A. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. **Theor. Popul. Biol.** 7: 256-276.

Wei, F., R.A. Wing and R.P. Wise. 2002. Genome dynamics and evolution of the *Mla* (powdery mildew) resistance locus in barley. **Plant Cell** 14: 1903-1917.

Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic. Acids Res.** 18: 7213-7218.

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.

Yoshida, K., H. Saitoh, S. Fujisawa, H. Kanzaki, H. Matsumura, K. Yoshida, Y. Tosa, L. Chuma, Y. Takano, J. Win, S. Kamoun and R. Terauchi. 2009. Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Plant Cell** 21: 1573-1591.

Zeigler, R.S. 1998. Recombination in *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Phytopathology** 36: 249-275.

Zhou, E., Y. Jia, P. Singh, J.C. Correll and F.N. Lee. 2007. Instability of the *Magnaporthe oryzae* avirulence gene AVR-Pita alters virulence. **Fungal Genet. Biol.** 44: 1024-1034.

Zhou, B., S. Qu, G. Liu, M. Dolan, H. Sakai, G. Lu, M. Bellizzi and G.L. Wang. 2006. The eight amino acid differences within three leucine-rich repeats between *Pi2* and *Piz-t* resistance proteins determine the resistance specificity *Magnaporthe grisea*. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 19: 1216–122.





1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

Rice Flour Agar (RFA) ประกอบด้วย

แป้งข้าวบดละเอียด 20 กรัม

Yeast extract 2 กรัม

ผงวุ้น 20 กรัม

น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดรวมกันแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เทในขวดอาหารแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที

Potato Dextrose Broth (PDB) ประกอบด้วย

ผง PDB 24 กรัม

น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดรวมกันแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เทในขวดอาหารแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที

2. การเตรียมสารเคมี และสารละลายในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดย agarose gel

10XTBE และ 0.5XTBE

ละลาย Tris Base 108 กรัมในน้ำกลั่น (dH_2O) 800 มิลลิลิตร กวนด้วย magnetic stirrer เติม boric acid 55 กรัม ปั่นจนสารละลายใส จากนั้นเติม 0.5M EDTA.2Na 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในขวดสีชา เก็บไว้เป็น stock ใช้เตรียม 0.5X TBE โดยผสมน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตรต่อ 10X TBE ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

Agarose gel 1% และ 3%

ละลายผงวุ้น agarose 1 และ 3 กรัมในสารละลาย 0.5X TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปหลอมละลายโดยใช้เตาไมโครเวฟ จนให้สารละลายใสและรอให้อุ่นก่อนเทลงถาด

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นายธีระพงศ์ เกษตรสมบูรณ์
 เกิดวันที่ 4 กันยายน พ.ศ. 2528
 สถานที่เกิด อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร
 ประวัติการศึกษา วท.บ. (เคมีเกษตร)
 คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน (2550)
 ทุนการศึกษาที่ได้รับ ทุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ
 ปีงบประมาณ 2554