ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์ พันธุศาสตร์

สาขา **ภาควิชา**

เรื่อง การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3 Pigm(t)* และ *Pi54* ในข้าวพื้นเมืองไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Screening Thai Landrace Rice for Blast Resistance Gene *Pid3, Pigm(t)* and *Pi54* Using DNA Markers

นามผู้วิจัย นายกฤตกิตติศักดิ์ ไพตรีจิตต์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(อาจารย์ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์ธานี ศรีวงศ์ชัย, วท.ด.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช, Dr.Agr.Sci)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3 Pigm(t)* และ *Pi54* ในข้าวพื้นเมืองไทย โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Screening Thai Landrace Rice for Blast Resistance Gene *Pid3*, *Pigm(t)* and *Pi54* Using DNA Markers

โดย

นายกฤตกิตติศักดิ์ ไพตรีจิตต์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กฤตกิตติศักดิ์ ไพตรีจิตต์ 2554: การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3 Pigm(t)* และ *Pi54* ในข้าวพื้นเมืองไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์, Ph.D. 185 หน้า

จากการสำรวจข้าวตัวอย่างจำนวน 226 พันธุ์ ซึ่งประกอบด้วยข้าวพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 203 พันธุ์ ข้าวพันธุ์ส่งเสริมจำนวน 21 พันธุ์ และข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานไม่ต้านทานโรคไหม้ 2 พันธุ์ คือข้าวนิปปอนบาร์เล่ย์และข้าวดอกมะลิ 105 โดยข้าวพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 226 พันธุ์ประกอบด้วย ข้าวไร่ภาคเหนือจำนวน 19 พันธุ์ ข้าวนาสวนภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 99 พันธุ์ ข้าวขึ้นน้ำภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 45 พันธุ์ และข้าวนาสวนภาคใต้จำนวน 40 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อยีนต้านทานโรคไหม้ 3 ตำแหน่ง คือยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3 Pigm(t)* และ *Pi54* พบว่า ข้าวพื้นเมืองของไทยส่วนใหญ่ (จำนวน 159 พันธุ์จาก 203 พันธุ์) มียีนต้านทานโรคไหม้อย่างน้อยหนึ่งตำแหน่ง และมีข้าวพื้นเมืองจำนวน 4 พันธุ์มียีนต้านทานโรคไหม้ทั้ง 3 ตำแหน่ง คือ ข้าวปือเกษตร ข้าวเหลืองหอม ข้าวลายซาน และข้าวเหนียวกล่ำหอมแสงลีซอ ซึ่งทั้งข้าวทั้ง 4 พันธุ์ดังกล่าวล้วนเป็นข้าวไร่พื้นเมืองของภาคเหนือ ข้อมูลจากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ต่อไปในอนาคต

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kritkittisak Phaitreejit 2011: Screening Thai Landrace Rice for Blast Resistance Gene *Pid3, Pigm(t)* and *Pi54* Using DNA Markers. Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Mr. Chatchawan Jantasuriyarat, Ph.D. 185 pages.

Rice blast caused by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*, is one of the most devastating diseases in rice production worldwide. Information on rice with disease resistant gene is important for rice cultivar development. The objective of this study was to identify rice blast disease resistant genes in 226 rice cultivars including 203 Thai landrace rice cultivars (19 cultivars from the North, 99 cultivars from the Northeast, 45 cultivars of floating rice from the Northeast and 40 cultivars from the South), 21 recommended rice and 2 susceptible checking (KDML105 and Nipponbarley) by using gene specific markers for blast resistant gene *Pid3, Pigm(t)* and *Pi54.* The results showed that 159 cultivars have at least one resistant gene and 4 cultivars have all three resistant genes. The outcome of this research will be very useful for development of new blast resistant elite rice cultivars in the future.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก อาจารย์ ดร.ธานี ศรีวงศ์ชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำตลอดช่วงเวลาทำการวิจัย รวมถึงตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ ประธานการสอบ และผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ดร. กาญจนา กล้าแข็ง และ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีพร เกตุงาม ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี สำหรับการอนุเคราะห์ตัวอย่างพันธุ์พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการวิจัย และตรวจทานแก้ไขในการตีพิมพ์เอกสารทางวิชาการ

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์ ขอขอบพระคุณภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ตลอดจนขอขอบคุณเพื่อนๆ โดยเฉพาะสมาชิกห้องปฏิบัติการ 4615 ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อเสนอแนะ ตลอดจนความสุขที่ได้มาที่ได้ศึกษา ณ สถาบันแห่งนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านทุกระดับชั้นที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาให้ข้าพเจ้ามีความรู้ความสามารถสำหรับการคงอยู่ในโลกใบนี้ตลอดมา

ท้ายที่สุดนี้ ข้าพเจ้าขอกราบเท้าขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ผู้เป็นที่รักเคารพ และเป็นครูคนแรก ที่ยังยืนเคียงข้างข้าพเจ้าตลอดมาแม้ในวันที่ข้าพเจ้าไม่มีใคร และขอขอบคุณน้องสาว และเพื่อนสนิททุกๆ ท่านที่ได้คอยเป็นกำลังใจ และสนับสนุนช่วยเหลือในทุกๆ ด้านจนสำเร็จการศึกษา

กฤตกิตติศักดิ์ ไพตรีจิตต์

ตุลาคม 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ (1)

สารบัญตาราง (3)

สารบัญภาพ (5)

คำนำ 1

วัตถุประสงค์ 3

การตรวจเอกสาร 4

อุปกรณ์และวิธีการ 37

อุปกรณ์ 37

วิธีการ 62

ผลและวิจารณ์ 67

สรุปและข้อเสนอแนะ 96

สรุป 96

ข้อเสนอแนะ 99

เอกสารและสิ่งอ้างอิง 100

ภาคผนวก 126

ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา 127

ภาคผนวก ข การสกัดดีเอ็นเอและข้อควรระวัง 131

ภาคผนวก ค การกระจายตัวของอัลลีลในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3 Pigm(t)* และ *Pi54* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-2 C5483 S29742 และ Pi54 MAS 145

ภาคผนวก ง การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาความเหมือนของข้าวพื้นเมืองพันธุ์ต่างๆ ในตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3 Pigm(t)* และ *Pi54* 164

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก จ การศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองทางโรคใบไหม้ต่อเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทย จำนวน 20 ไอโซเลท 172

ประวัติการศึกษาและการทำงาน 185

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ยีนต้านทานโรคไหม้ข้าวที่ได้ทำการโคลนแล้ว	21
2	ตัวอย่างข้าวพื้นเมืองที่ใช้ในการศึกษา	37
3	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย	52
4	รายการและปริมาณสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3*	53
5	รายการและปริมาณสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะด้วยเอ็นไซม์ *Bam*HI สำหรับการตราจหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3*	54
6	รายการและปริมาณสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)*	55
7	รายการและปริมาณสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะด้วยเอ็นไซม์ *Eco*RI สำหรับการตราจหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)*	56
8	องค์ประกอบและปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับตรวจสอบหายีนต้านทาน *Pi54*	57
9	รายชื่อพันธุ์ข้าวตัวอย่างที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาการตอบสนองต่อเชื้อราโรคไหม้	59
10	รายชื่อเชื้อราโรคไหม้ *M. grisea* เก็บรวบรวมเมื่อปี พ.ศ. 2547 และ พ.ศ. 2554 ที่ใช้ศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองต่อโรคไหม้	61
11	การตรวจวัดระดับความรุนแรงของการเกิดโรคใบไหม้ในข้าว	66
12	การกระจายตัวของแอลลีลยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-2	70
13	การกระจายตัวของแอลลีลยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483	76
14	การกระจายตัวของแอลลีลยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742	80
15	เปรียบเทียบจำนวนแอลลีลทั้ง 3 รูปแบบจากการตรวจหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 และเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742	85

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

16 การกระจายตัวของแอลลีลยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54 MAS 89

17 แสดงระดับความรุนแรงในการก่อโรคในข้าว 93

18 การกระจายตัวของแอลลีลยีนต้านทานโรคไหม้ 97

ตารางผนวกที่

ข1 ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอของข้าวพื้นเมือง 136

ค1 การกระจายตัวของอัลลีลในข้าวพันธุ์พื้นเมือง 146

จ1 แสดงระดับความรุนแรงในการก่อโรคในข้าว 173

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ภาพจำลอง แสดง polymorphism ที่เกิดจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ CAPS	33
2	ภาพจำลอง แสดง polymorphim ที่เกิดจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ InDel	34
3	พันธุ์ข้าวตัวอย่างที่ใช้สำหรับทดสอบฟีโนไทป์	60
4	แสดงการเพาะเมล็ดข้าวในจานเลี้ยงเชื้อ	62
5	ต้นกล้าข้าวขณะแรกย้ายลงดิน และย้ายลงดินเป็นเวลา 3 สัปดาห์	62
6	การเลี้ยงเชื้อราเพื่อเก็บเกี่ยวสปอร์	63
7	เครื่องปั๊มลม ที่ใช้ในการฉีดพ่นสปอร์ของเชื้อราโรคไหม้	64
8	การพ่นสารละลายสปอร์เชื้อราโรคไหม้ลงบนต้นกล้าข้าวที่มีอายุ 3 สัปดาห์	64
9	เกณฑ์การวัดระดับความรุนแรงของโรคใบไหม้ 6 ระดับ	65
10	ผลการตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิคดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel eletrophoresis ของตัวอย่างข้าวพันธุ์	67
11	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ Pid3-dCAPS-2 ที่มีความจำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* และตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ในตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยและข้าวพันธุ์ส่งเสริม	69
12	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาความเหมือนของข้าวพื้นเมืองพันธุ์ต่างๆ ในตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3*	71
13	ภาพจำลองแสดง polymorphism ที่เกิดจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-2	73
14	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 ที่มีความจำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pgm(t)* และตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ในตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยและข้าวพันธุ์ส่งเสริม	75
15	ภาพจำลองแสดง polymorphism ที่เกิดจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483	77

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 ที่มีความจำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ในตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยและข้าวพันธุ์ส่งเสริม	79
17	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาความเหมือนของข้าวพื้นเมืองพันธุ์ต่างๆ ในตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)*	82
18	ภาพจำลองแสดง polymorphism ที่เกิดจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742	83
19	ภาพจำลองเปรียบเทียบ polymorphism ที่เกิดจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 และ S29742	87
20	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54 MAS ที่มีความจำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ในตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยและข้าวพันธุ์ส่งเสริม	88
21	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาความเหมือนของข้าวพื้นเมืองพันธุ์ต่างๆ ในตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54*	90
22	ภาพจำลองแสดง polymorphism ที่เกิดจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54 MAS	91
23	แสดงใบข้าวพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคไหม้ และพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อโรคไหม้	92

ภาพผนวกที่

ก1	แถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา	130
ง1	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาความเหมือนของข้าวพื้นเมืองพันธุ์ต่างๆ ในตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3*	165
ง2	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาความเหมือนของข้าวพื้นเมืองพันธุ์ต่างๆ ในตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)*	166

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่ **หน้า**

ง3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาความเหมือนของข้าวพื้นเมืองพันธุ์ต่างๆ ในตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid54* 170

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3 Pigm(t)* และ *Pi54* ในข้าวพื้นเมืองไทย โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Screening Thai Landrace Rice for Blast Resistance Gene *Pid3, Pigm(t)* and *Pi54* Using DNA Markers

คำนำ

ประชากรโลกปัจจุบันมีจำนวนเกือบ 7 พันล้านคน ซึ่งกว่า 3,600 ล้านคน บริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก (วิไลลักษณ์, 2544) ดังนั้นข้าวจึงเป็นธัญพืชที่มีความสำคัญ และพบว่าปริมาณการบริโภคข้าว เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกๆ ปี เนื่องจากประชากรโลกมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น และมีประชากรชาวเอเชียอพยพเข้าไปตั้งถิ่นฐานในทวีปอเมริกาและยุโรป ส่งผลต่อความต้องการข้าวในตลาดอเมริกาและยุโรปและเพิ่มขึ้น รวมถึงมีสาเหตุจากประเทศแถบแอฟริกามีสภาวะทางเศรษฐกิจที่ดีขึ้น ทำให้ประชากรได้ปรับเปลี่ยนการบริโภคจากพืชอาหารเดิมมาเป็นข้าวมากขึ้น มีการคาดคะเนว่าในปี พ.ศ. 2568 ความต้องการข้าวของตลาดโลกจะมีมากถึง 840 ล้านตัน (เอี่ยม, 2538) ในปัจจุบันความต้องการข้าวสารของตลาดโลกมีประมาณ 420 ล้านตัน ประเทศไทยมีอุปทานผลผลิตข้าวสารประมาณ 20 ล้านตัน มีความต้องการใช้ข้าวสารภายในประเทศ 11 ล้านตัน ส่วนอีก 9 ล้านตันจะเป็นไปเพื่อส่งออก (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2551ก, ข) ถึงแม้ว่าประเทศไทยจะเป็นประเทศผู้ค้าข้าวที่สำคัญของโลก แต่ผลผลิตเฉลี่ยของประเทศยังจัดอยู่ในเกณฑ์ต่ำ เนื่องจากประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวประมาณ 60 ล้านไร่ แต่มีพื้นที่เพียงร้อยละ 20 เท่านั้นที่เหมาะสมสำหรับการปลูกข้าว (เอี่ยม, 2538) เพราะดินส่วนใหญ่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศเป็นดินเค็ม และนอกจากนี้ข้าวที่ปลูกในประเทศไทยส่วนใหญ่จะเป็นข้าวพันธุ์ที่รัฐบาลส่งเสริม เช่น ข้าว กข 6 และข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งข้าวทั้งสองชนิดนี้เป็นข้าวที่มีคุณภาพดี เมล็ดข้าวมีสีขาว หุงขึ้นหม้อ มีกลิ่นหอม อ่อนนุ่ม แต่ทนต่อสภาพความเค็มได้ปานกลาง และง่ายต่อการเป็นโรคไหม้ ซึ่งโรคไหม้ในข้าว (Rice blast) มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Magnaporthe grisea* โดยเชื้อโรคไหม้มีความสามารถในการปรับตัวสูง จึงมีความหลากหลายของสายพันธุ์ ดังนั้นวิธีการที่เหมาะสมและประสบความสำเร็จในการป้องกันการสูญเสียผลผลิตจากโรคไหม้ คือการลดความเสี่ยงของการระบาดของโรค โดยการเร่งรัดหาพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรค เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความสามารถในการต้านทานต่อโรคดังกล่าว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประเทศไทยนับว่าเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพของข้าวมากที่สุดประเทศหนึ่งของโลก การได้มาและการเก็บรักษายีนจากแหล่งพันธุกรรมข้าวป่าและข้าวพันธุ์พื้นเมือง ถือได้ว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการรักษาแหล่งพันธุกรรมข้าว และถือเป็นการปกป้อง คุ้มครองผลประโยชน์ทางชีวภาพของประเทศด้วย เพราะพันธุ์ข้าวพื้นเมืองเป็นพันธุ์ข้าวที่เกษตรกรได้คัดเลือกและเก็บรักษาสืบทอดกันมาหลายชั่วอายุ ทำให้ผ่านการถูกคัดเลือกโดยมนุษย์และธรรมชาติร่วมกัน จึงมีลักษณะเด่นคือ มีความสามารถในการต้านทานต่อโรคและแมลง มีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี อย่างไรก็ตามข้าวพันธุ์พื้นเมืองมักให้ผลผลิตต่ำ ดังนั้นจึงถูกแทนที่ด้วยข้าวพันธุ์ส่งเสริมได้โดยง่าย จึงเป็นเหตุให้ข้าวพันธุ์พื้นเมืองเหล่านี้ไม่ได้รับความสำคัญและส่งเสริมให้เพาะปลูก และมีแนวโน้มว่าจะค่อยๆ สูญหายไปในที่สุด

เพื่อที่จะทราบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองแต่ละพันธุ์มียีนต้านทานโรคใดบ้าง ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นดรรชนีชี้วัด โดยมียีนเป้าหมายคือ ยีนต้านโรคไหม้ *Pid3 Pigm(t)* และ *Pi54* เพื่อนำผลที่ได้จากการศึกษาไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของประเทศต่อไป และยังเป็นข้อมูลทางพันธุกรรมในระดับยีนเพื่อการเก็บรักษาและอนุรักษ์สายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของประเทศอีกด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1.เพื่อค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3 Pigm(t)* และ *Pi54* ในข้าวพื้นเมืองของไทยและข้าวพันธุ์ส่งเสริมสายพันธุ์ต่างๆ

2.เพื่อศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองทางโรคพืชของข้าวตัวอย่างที่ผ่านการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3 Pigm(t)* และ *Pi54* กับเชื้อราโรคไหม้ไอโลเลทต่าง ๆ ในประเทศไทย

3.เพื่อเป็นข้อมูลทางพันธุกรรมในระดับยีน เพื่อการเก็บรักษาและอนุรักษ์สายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของประเทศ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

โรคไหม้ในข้าว

โรคไหม้ในข้าว (Rice blast) มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Magnaporthe grisea* (Valent and Farrall, 1991) จัดเป็นปัญหาสำคัญของการผลิตข้าวทั่วโลก (Ou, 1985b; Zeigler *et al*., 1994) โดยเชื้อราโรคไหม้ได้ทำลายธัญพืชในประเทศสหรัฐอเมริกามากกว่าร้อยละ 70 (Lee, 1994) ซึ่งเป็นเหตุให้เกิดความสูญเสียเป็นมูลค่ากว่า 5 พันล้านดอลลาร์สหรัฐต่อปี (Moffat, 1994) และยังได้ทำลายผลผลิตในประเทศอินเดียถึงร้อยละ 50 (Widawsky and O'Toole, 1990) ทำลายผลผลิตในประเทศอินโดนีเซียมากกว่า 1.1 ล้านเฮกตาร์ และในบางปีมีการสูญเสียผลผลิตถึงร้อยละ 70-100 (Sobrizal, 2007) ส่วนประเทศจีนในปี ค.ศ. 1980 ถึงปี ค.ศ. 1990 เชื้อราโรคไหม้ได้สร้างความเสียหายต่อผลผลิตเป็นมูลค่าถึง 8.9 ล้านเหรียญ (Shen and Lin, 1994) สำหรับประเทศญี่ปุ่น ในปี ค.ศ. 1993 เชื้อราโรคไหม้สร้างความเสียหายต่อผลผลิตทั้งประเทศคิดเป็นร้อยละ 45.2 ส่งผลให้ประเทศญี่ปุ่นต้องมีการนำเข้าข้าวจากต่างประเทศ และในปี ค.ศ. 2000 ประเทศญี่ปุ่นต้องใช้งบประมาณของประเทศสำหรับการต่อต้านเชื้อราโรคไหม้มากกว่า 26 พันล้านเยน (หรือ 60 ล้านยูโร) (Yamaguchi, 2004) มีการคำนวณว่าผลผลิตของข้าวที่สูญเสียไปนี้สามารถนำไปเลี้ยงประชากรโลกได้กว่า 60 ล้านคนต่อปี (Zeigler *et al*., 1994)

เชื้อราโรคไหม้นี้มีชื่อสามัญตามลักษณะของอาการของโรค เช่น โรคไหม้คอรวง โรคเน่าคอรวง โรคข้อลำต้นเน่า แม้ในต่างประเทศก็มีการเรียกชื่อที่หลากหลาย เช่น โรค blast โรค rotten neck และโรค blue zone เป็นต้น (Rice knowledge bank, 2009) มีรายงานเกี่ยวกับโรคไหม้ครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1560 ที่ประเทศอิตาลี ต่อมาในปี ค.ศ. 1637 มีรายงานจากประเทศจีน โดยมีการบรรยายลักษณะอาการของโรคนี้ว่าเกิดจากความร้อนของแสงอาทิตย์ที่เมล็ดข้าวได้ดูดไปเก็บไว้ ในปี ค.ศ. 1704 มีรายงานว่าพบโรคนี้ในประเทศญี่ปุ่น และในปี ค.ศ. 1876 มีรายงานว่าพบโรคนี้ในประเทศสหรัฐอเมริกา (ชวาลา, 2531) จนกระทั่งในปัจจุบันพบว่าโรคไหม้มีการแพร่กระจายไป 85 ประเทศทั่วโลก เนื่องจากเชื้อราโรคไหม้มีความสามารถในการปรับตัวสูง จึงมีความหลากหลายของสายพันธุ์มาก สำหรับในประเทศไทยนั้น มีรายงานเกี่ยวกับโรคไหม้ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2496 โดยแผนกโรควิทยา กองพืชพันธุ์ กรมกสิกรรมได้รายงานว่า โรคไหม้ในข้าวได้เกิดกับข้าวพันธุ์หอมเศรษฐี ที่สถานีทดลองเกษตรกลางบางเขน และบริเวณใกล้สถานีรถไฟมักกะสัน ซึ่งสันนิษฐานว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โรคนี้อาจติดมาจากข้าวที่มาจากประเทศญี่ปุ่นในระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 ต่อมาพบโรคนี้ได้ระบาดไปทุกภูมิภาคของประเทศ โดยเชื้อราโรคไหม้สามารถแพร่กระจายไปกับเมล็ด เศษซากพืช กระแสลม (ชวาลา, 2531; ทัศนีย์, 2540) โดยใน ปี พ.ศ. 2535 เชื้อราโรคไหม้ได้ระบาดอย่างรุนแรงในเขตภาคเหนือและภาคอีสาน (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2544) ในปี พ.ศ. 2552 เชื้อราโรคไหม้ได้สร้างความเสียหายให้กับพื้นที่หลายจังหวัดในประเทศไทย เช่น จังหวัดนครสวรรค์มีพื้นที่เสียหายกว่า 25,000 ไร่ จังหวัดแม่ฮ่องสอนมีพื้นที่เสียหายกว่า 3,500 ไร่ จังหวัดเลยมีพื้นที่เสียหายกว่า 63,605ไร่ (กรมการข้าว, 2552ก,ข) ในปี พ.ศ. 2553 พบการระบาดของโรคไหม้ในจังหวัดมหาสารคาม มีพื้นที่เสียหายกว่า 60,000 ไร่ (บ้านเมือง, 2553) และในจังหวัดบุรีรัมย์มีพื้นที่เสียหายกว่า 33,200 ไร่ (ASTV ผู้จัดการ, 2553) แสดงได้เห็นว่าเชื้อราโรคไหม้นี้ได้สร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรไทยและเกษตรกรโลกอย่างมาก

อนุกรมวิธาน และจีโนมของเชื้อรา *Magnaporthe grisea*

Kingdom	: Fungi
Division	: Ascomycota
Class	: Sordariomycetes
Order	: Magnaporthales
Family	: Magnaporthaceae
Genus	: *Magnaporthe*
Species	: Magnaporthe grisea

เชื้อรา *Magnaporthe grisea* (anamorph : *Pyricularia grisea*) อยู่ในกลุ่มของเชื้อราแอสโคไมซิส มีจีโนมขนาดประมาณ 40 เมกกะเบส มีจำนวนโครโมโซม 7 แท่ง (Dean *et al*., 2005) สามารถเข้าทำลายพืชตระกูลหญ้าได้มากกว่า 50 พันธุ์ โดยการแพร่กระจายไปกับสายลม น้ำ หรือติดไปกับเมล็ด ใบ ข้อปล้อง ช่อดอก ต้นข้าว และฟางข้าว (Sesma and Osbourn, 2004) และพบว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถสร้างสายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีความรุนแรงในการทำลายยิ่งขึ้นกว่าเดิม ทำให้สามารถกลับเข้าไปทำลายข้าวพันธุ์ต้านทานเดิมนั้นได้อีกด้วย (Zeigler *et al*, 1998) ในประเทศสหรัฐอเมริกาสามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อราโรคไหม้ได้ 10 สายพันธุ์ คือ IB-1 IB-33 IB-45 IB-49 IB-54 IC-17 IE-1 IE-1K IG-1 และ IH-1 (Xia *et al*., 1993; Moldenhauer *et al*.,

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1998) สำหรับในประเทศไทยนั้น ในปี พ.ศ. 2550 พูนศักดิ์และคณะได้ศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราที่รวบรวมได้จากภาคเหนือของประเทศไทย และได้มีการจัดจำแนกกลุ่มของเชื้อราโรคไหม้ โดยอาศัยปฏิสัมพันธ์ระหว่างข้าวและเชื้อก่อโรคเป็นเกณฑ์ในการจำแนก (Mekwatanakarn *et al*., 1999, 2000; Sirithunya *et al*., 2008) แต่เนื่องจากการขาดแคลนเครื่องมือในระดับโมเลกุล ทำให้การศึกษายังเป็นไปได้ไม่มากเท่าที่ควร (Smitamana, 2000)

วงจรชีวิตของเชื้อราโรคไหม้

เชื้อราโรคไหม้มีวงชีวิตทั่วไปเป็นเส้นใยที่มีลักษณะคล้ายเส้นด้ายละเอียด มีการเจริญเป็นกลุ่มโคโลนีของเส้นใย และจะสร้างสปอร์ในการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยสปอร์จะงอกและเจริญเมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม โดยการแทงผ่านผิวพืชเข้าไปโดยตรง หรือแทงผ่านเข้าไปในพืชทางบาดแผล หรือแทงผ่านเข้าไปในพืชทางทางช่องเปิดตามธรรมชาติ เช่น ปากใบ โดยเมื่อเชื้อราเข้าไปในเซลล์พืชแล้วจะมีการสร้างสารเคมีและเอนไซม์ ต่างๆ เพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา ซึ่งสารดังกล่าวนี้จะทำให้พืชได้รับความเสียหาย (Talbot, 2003)

ลักษณะอาการของโรค

เชื้อราโรคไหม้สามารถเข้าทำลายต้นข้าวได้ทุกส่วนของพืช ตั้งแต่รากจรดใบ และทุกระยะตั้งแต่ระยะกล้าจนถึงระยะออกรวง (Sesma and Osbourn, 2004) โดยลักษณะอาการของโรคจะปรากฏให้เห็นบนส่วนของต้นข้าวที่อยู่เหนือพื้นดิน เช่น ใบ กาบใบ ข้อต่อระหว่างใบ ลำต้น คอรวง ทั้งนี้สามารถจะแบ่งอาการของโรคได้เป็น 3 ระยะ คือ อาการในระยะต้นกล้า อาการระยะหลังปักดำ และอาการระยะออกรวง (ชลาวา, 2531) โดยอาการในระยะต้นกล้า จะปรากฏให้เห็นเมื่อต้นข้าวแตกใบ ขั้นแรกจะเป็นจุดสีเทาช้ำๆ บนใบ หรือกาบใบ ต่อมารอยช้ำนั้นจะขยายกว้างขึ้นและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ตรงกลางจะเป็นสีขาวหรือสีฟางข้าว มีลักษณะคล้ายรูปกระสวย หากสิ่งแวดล้อมเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อโรค จำนวนแผลจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และแผลจะขยายขนาดติดกันทำให้ใบข้าวแห้งทั้งใบ ถ้าเป็นมากจะทำให้ต้นกล้าตายในที่สุด ซึ่งชาวบ้านเรียกว่าข้าวตายพราย แต่ถ้าสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม รอยช้ำนั้นจะปรากฏเป็นแค่เพียงจุดสีน้ำตาลเล็กๆ และเมื่อข้าวโตขึ้น รอยช้ำนั้นก็อาจหายไปในที่สุด นอกจากนี้ยังพบแผลที่ข้อต่อระหว่างใบกับกาบใบ ทำให้ใบหักพับลงมา ส่วนอาการระยะหลังปักดำนั้น จะปรากฏว่าให้เห็นเมื่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นำต้นกล้าไปปักดำ โดยต้นข้าวจะมีแผลลักษณะเดียวกับในระยะต้นกล้า คือมีลักษณะเป็นรอยช้ำสีน้ำตาล มีลักษณะคล้ายรูปกระสวย แต่ความรุนแรงจะลดลงตามอายุของต้นข้าว คือ ถ้าข้าวมีอายุมากขึ้นระดับความรุนแรงของอาการของโรคจะลดน้อยลง ส่วนอาการระยะออกรวงนั้นจะปรากฏรอยช้ำที่คอรวง ต่อมาจะกลายเป็นสีดำและแห้ง ถ้าเกิดกับต้นข้าวที่เพิ่งออกรวง จะทำให้เมล็ดข้าวลีบ รวงมีสีขาวเหมือนถูกหนอนกอทำลาย และถ้าเชื้อราโรคไหม้เข้าทำลายในระยะข้าวเป็นน้ำนม จะทำให้เมล็ดข้าวไม่สมบูรณ์ รวงหักพับลงมาและหลุดร่วงไปจากต้น

ข้าว

บนโลกใบนี้มีพืชอยู่ทั้งหมดประมาณ 250,000 ชนิด แต่พืชที่ใช้เป็นอาหารได้มีเพียง 3,000 ชนิด พืชที่ใช้เป็นอาหารหลักสำหรับการบริโภคมีเพียง 29 ชนิด และมีพืชเพียง 4 ชนิด เท่านั้นที่ใช้สำหรับเป็นอาหารหลักระดับสามารถเลี้ยงประชากรโลกได้ คือ ข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด และมันฝรั่ง (นิตศรีย์, 2551) โดยเฉพาะข้าวซึ่งเป็นอาหารหลักของชาวเอเชีย จะประกอบด้วยสารอาหารครบถ้วนทั้ง คาร์โบไฮเดรต โปรตีน วิตามิน ไขมัน เกลือแร่ ใยอาหาร นอกจากนั้นยังมีสรรพคุณทางยา เช่น ข้าวดอกมะขาม มีสรรพคุณบำรุงเลือด บำรุงไขข้อ ป้องกันอาหารเหน็บชา ข้าวเหนียวกัญญามีสรรพคุณบำรุงเลือด เป็นต้น (สายสนม, 2551) และเนื่องจากข้าวสามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น ตั้งแต่ระดับน้ำทะเลจนถึงระดับสูงกว่าระดับน้ำทะเลประมาณ 3,000 เมตร ดังนั้นประเทศต่างๆ ทั่วโลกจึงสามารถปลูกข้าวได้ (อรอนงค์, 2547)

อนุกรมวิธานของข้าว

Kingdom	: Plantae
Division	: Magnoliophyta
Class	: Angiospermae
Order	: Poales
Family	: Poaceae
Genus	: *Oryza*
Species	: *Oryza sativa* ข้าวปลูกเอเชีย
	: *Oryza glaberrima* ข้าวปลูกแอฟริกา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว วงค์หญ้า (Family: Poaceae) สกุลออริซา (Genus: *Oryza*) มีจำนวนพันธุ์มากกว่า 120,000 พันธุ์ โดยข้าวในโลกมีประมาณ 23 ชนิด แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ข้าวปลูกเอเชีย (*Oryza sativa*) ข้าวปลูกแอฟริกา (*Oryza glaberrima*) ส่วนข้าวที่เหลือ 21 ชนิดเป็นข้าวป่า (จำรัส, 2534; Chang,1976) โดยข้าวปลูกเอเชียสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อยตามถิ่นที่ปลูกและลักษณะของเมล็ดข้าว โดยกลุ่มที่ 1 คือข้าวอินดิกา (indica) เป็นข้าวที่ปลูกในประเทศเขตร้อน เช่น จีนตอนใต้ เอเชียใต้ เช่น ประเทศ อินเดีย บังคลาเทศ ศรีลังกา เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศไทย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ เป็นต้น โดยมีลักษณะลำต้นสูง แตกกอมาก ใบกว้างสีเขียวอ่อน เมล็ดยาว ค่อนข้างแบนและร่วงง่าย เมล็ดไม่มีหางหรือมีหางที่สั้นมาก ข้าวเปลือกมีขนสั้น ส่วนกลุ่มที่ 2 คือข้าวจาปอนิกา (japonica) เป็นข้าวที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตอบอุ่น เช่น จีน ญี่ปุ่น โดยมีลักษณะเมล็ดป้อม กลมรี มีอัตราส่วนของอะมิโลสต่ำ และกลุ่มที่ 3 คือข้าวจาวานิกา (javanica) เป็นข้าวที่ปลูกในอินโดเนียเซีย โดยสันนิษฐานว่าเกิดจากการคัดเลือกพันธุ์มาจากข้าวอินดิกาเข้ามาปลูกในอินโดนีเซีย (บุญหงษ์, 2549) โดยมีลักษณะลำต้นสูงและแข็ง ใบกว้างสีเขียวอ่อน แตกกอน้อย ข้าวเปลือกมีขนยาว เมล็ดป้อมใหญ่ ร่วงยากและมีหางข้าว แต่มักให้ผลผลิตต่ำ

กำเนิดและประวัติของข้าว

จากหลักฐานทางภูมิศาสตร์และโบราณคดีพบว่า ข้าวมีถิ่นกำเนิดในผืนแผ่นดินกอนด์วานา (Gondwanaland) ในสมัยมหายุคพาลีโอโซอิค (Paleozoic Era) เมื่อประมาณ 230-500 ล้านปีมาแล้ว ซึ่งต่อมาผืนแผ่นดินกอนด์วานาได้แยกเป็นทวีปแอฟริกา อเมริกากลาง อเมริกาใต้ แอนตาร์กติกา ออสเตรเลีย และอินเดีย (บุญหงษ์, 2549) โดยข้าวป่ากับข้าวปลูกเกิดจากบรรพบุรุษเดียวกัน ต่อมาข้าวปลูกได้เปลี่ยนแปลงจากพืชป่าไปเป็นพืชปลูก ซึ่งข้าวปลูกเอเชียเกิดจากมนุษย์โบราณชาวเอเชียได้นำข้าวป่ามาปลูกในบริเวณที่อาศัยเมื่อประมาณ 10,000 ปีที่แล้วจนกลายมาเป็นพืชปลูก โดยในยุคเริ่มแรกจะพบการปลูกข้าวแถบบริเวณตะวันออกถึงบริเวณตะวันตกเฉียงใต้ของเมดิเตอร์เรเนียน และต่อมาจึงพบอีกหลายแห่งในทวีปเอเชีย เช่น ดินแดนแถบภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย บังคลาเทศ ดินแดนแถบภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงใต้ ภาคตะวันตกเฉียงใต้ และภาคใต้ของจีน ดินแดนแถบภาคเหนือของพม่า ไทย ลาวและเวียดนาม (จำรัส, 2534) สำหรับในประเทศไทยนั้น พบหลักฐานการปลูกข้าวในยุคแรก ที่ถ้ำปุงฮุง จังหวัดแม่ฮ่องสอน และพบซากข้าวเปลือกเป็นจำนวนมากในเศษเครื่องปั้นดินเผาจาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หลุมฝังศพ ตำบลโนนนกทา อำเภอคูเวียง จังหวัดขอนแก่น ซึ่งสันนิษฐานว่าหลักฐานทั้งสองแห่งมีอายุมากกว่า 5,000 ปี (เอี่ยม, 2538; มูลนิธิข้าวไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์, 2547)

ยีน โครโมโซม จีโนมของข้าว

ข้าว *(Oryza sativa)* มีจำนวนโครโมโซมเป็นแบบดิพลอยด์ (Diploid, n=12 หรือ 2n=24) มีขนาดของจีโนมประมาณ 430 ล้านเบส มียีนอยู่ประมาณ 30, 000 ยีน ซึ่งยีนต่างๆ เหล่านี้แสดงออกในต่างส่วนของพืชและต่างเวลากัน (Arumuganathan and Earle, 1991) ในปีพ.ศ. 2545 โครงการวิจัยจีโนมข้าวนานาชาติ นำโดยญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกาได้ประสบความสำเร็จในการหาลำดับเบสของข้าว (ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว, 2549) โดยประเทศไทยได้รับผิดชอบในการหาลำดับเบสบนส่วนหนึ่งของโครโมโซมคู่ที่ 9 ประโยชน์ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ ทำให้สามารถศึกษายีนที่มีหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของคุณสมบัติของข้าวในด้านต่างๆ เช่น ความหอม ความเหนียว ความต้านทานต่อโรค แมลง สภาวะแวดล้อม เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

ประเภทของข้าว

ข้าวในโลกมีจำนวนพันธุ์กว่า 120,000 พันธุ์ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนและอบอุ่น ตั้งแต่ระดับน้ำทะเลจนถึงระดับสูงประมาณ 3,000 เมตร ดังนั้นข้าวจึงมีความหลากหลายในด้านต่างๆ มาก เกณฑ์ในการจำแนกข้าวจึงมีหลายเกณฑ์ตามไปด้วย (เอกสงวน, 2544; สุกัญญา, 2536) ดังเช่น

1. จำแนกตามชนิดของแป้งข้าว สามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภท คือ

1.1 ข้าวเจ้า ลักษณะเมล็ดข้าวสารสีขาวใส เมื่อหุงหรือนึ่งจนสุกจะมีสีขาวขุ่น ร่วนไม่เกาะติดกัน เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อเมล็ดข้าวมีปริมาณแป้งอะมิโลส (amylose) ประมาณร้อยละ 10-30 และอะมิโลแพกติน (amylopectin) ประมาณร้อยละ 70-90 ตัวอย่างเช่น ข้าวขาวดอกมะลิ 105

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 ข้าวเหนียว ลักษณะเมล็ดข้าวสารสีขาวขุ่น เมื่อนึ่งจนสุกข้าวจะจับตัวกันแน่นเหนียวติดมือ เป็นข้าวที่มีปริมาณแป้งอะมิโลแพกตินเป็นส่วนใหญ่ คือประมาณร้อยละ 95 ตัวอย่างเช่น ข้าว กข 6

2. จำแนกตามฤดูการปลูก สามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภท คือ

2.1 ข้าวนาปี คือ ข้าวที่ปลูกในฤดูการทำนาปกติตามฤดูฝน เริ่มตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงตุลาคมและเก็บเกี่ยวสิ้นสุดไม่เกินกุมภาพันธ์ ส่วนมากเป็นข้าวไวแสง ตัวอย่างเช่น ข้าวขาวดอกมะลิ 105

2.2 ข้าวนาปรัง คือ ข้าวที่ปลูกนอกฤดูทำนาปกติ เริ่มตั้งแต่เดือนมกราคม ได้รับน้ำจากการชลประทาน สามารถจะกำหนดอายุเก็บเกี่ยวของแต่ละพันธุ์ได้ค่อนข้างแน่นอน นิยมปลูกในพื้นที่ที่มีการชลประทานดี มักใช้พันธุ์ข้าวที่ไม่ไวแสง ตัวอย่างเช่น ข้าว กข 1

3. จำแนกตามนิเวศของพื้นที่ปลูกข้าว สามารถจำแนกได้เป็น 3 ประเภท คือ

3.1 ข้าวไร่ (upland rice) หมายถึง ข้าวที่ไม่ต้องการน้ำหล่อเลี้ยงในการเจริญเติบโต แต่ต้องการความชุ่มชื้นของดินเช่นเดียวกับพืชไร่ ข้าวไร่มักปลูกตามไหล่เขา ไม่ต้องมีน้ำขัง อาศัยน้ำค้าง น้ำฝน และอาจตายถ้ามีน้ำขังอยู่นาน ข้าวไร่จึงเป็นที่นิยมปลูกกันบนที่สูง ตัวอย่างเช่น ข้าวซิวแม่จันนิยมปลูกมากบนดอยทางภาคเหนือ และข้าวดอกพยอมนิยมปลูกแซมกล้ายางในภาคใต้

3.2 ข้าวนาสวน (lowland rice) หมายถึง ข้าวที่ต้องการน้ำหล่อเลี้ยงในระหว่างการเจริญเติบโต สามารถทนความลึกของน้ำได้ไม่เกิน 1 เมตร ปลูกได้ดีในนาที่มีน้ำขัง การทำนาใช้วิธีดำเป็นส่วนใหญ่ นิยมปลูกกันเป็นส่วนมากถึงร้อยละ 84 ของเนื้อที่นาในประเทศไทย เพราะให้ผลผลิตต่อไร่สูงถึง 30-50 ถังต่อไร่ ตัวอย่างเช่น ข้าวเหนียวดำ ข้าวดอกดู่

3.3 ข้าวขึ้นน้ำ (floating rice) เป็นข้าวที่ปลูกในพื้นที่ที่มีน้ำท่วมลึกในฤดูน้ำหลาก โดยในบางพื้นที่อาจมีน้ำลึกถึง 3-4 เมตร เพราะข้าวขึ้นน้ำจะสามารถปรับตัวให้สูงขึ้นไปตามระดับน้ำที่เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากมีความสามารถในการยืดปล้อง (Internode Elongation Ability) ความสามารถอยู่รอดในสภาพจมน้ำ (Submergence Tolerance Ability) ความสามารถในการแตกแขนงและรากที่ข้อเหนือผิวดิน (Upper Nodal Tillering and Rooting Ability) และมีความสามารถในการชูรวง (Kneeing Ability) ตัวอย่างเช่น ข้าวปิ่นแก้ว 56 ข้าวตะเภาแก้ว 161 ข้าวนางฉลอง ข้าวกข 17 และ ข้าวกข 19 เป็นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. จำแนกตามความไวช่วงแสง สามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภท คือ

4.1 ข้าวไวแสง (Photoperiod sensitive rice) คือข้าวที่เป็นพืชวันสั้น ใช้ปลูกในฤดูฝนเพื่อให้ออกดอกในฤดูหนาวที่มีช่วงกลางวันสั้นกว่ากลางคืน ข้าวไวแสงมีช่วงระยะเวลาการออกดอกที่แน่นอน ข้าวพันธุ์พื้นเมืองส่วนใหญ่จัดเป็นข้าวไวแสง ตัวอย่างเช่น ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ข้าว กข 6 ข้าวเฉี้ยงพัทลุง ข้าวเสาไห้

4.2 ข้าวไม่ไวแสง (Photoperiod insensitive rice) คือ ข้าวที่ออกดอกตามอายุเก็บเกี่ยวของข้าวโดยไม่ขึ้นอยู่กับช่วงแสง จะปลูกได้ตลอดปีถ้ามีน้ำเพียงพอ แต่จะให้ผลผลิตดีเมื่อปลูกในนาปรัง (ฤดูร้อน) เพราะมีช่วงแสงมากกว่าฤดูอื่น อายุการปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวประมาณ 110-150 วัน ตัวอย่างเช่น ข้าวปทุมธานี 80 ข้าวชัยนาท 1 ข้าวสันป่าตอง 1

5. จำแนกตามการวิวัฒนาการ สามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภท คือ

5.1 ข้าวป่า คือข้าวที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติพบทั้งในที่ลุ่มลึกและบนที่ดอน มีลักษณะสำคัญคือ มีหางยาว เยื่อหุ้มเมล็ดสีแดงอ่อนจนถึงแดงเข้ม เมล็ดในรวงเดียวกันสุกแก่ไม่พร้อมกันตั้งแต่ 9-30 วัน เมื่อสุกแก่ก็จะหลุดร่วงได้เอง เมล็ดมีระยะพักตัวหลากหลาย ตั้งแต่ไม่มีระยะพักตัวไปจนถึงมีระยะพักตัวหลายปี ถูกจัดเป็นวัชพืชที่ร้ายแรงในแปลงนาข้าว ตัวอย่างเช่น ข้าวนก ข้าวผี หญ้าสะแห

5.2 ข้าวปลูก คือพันธุ์ข้าวที่ถูกคัดเลือกให้มีลักษณะตามที่เกษตรกรต้องการ เช่น มีผลผลิตสูง ข้าวสารมีสีขาวใส คุณภาพหุงต้มนุ่มและหอม ต้านทานต่อโรคและแมลงได้ โดยข้าวปลูกจะมีลักษณะต่างๆ ทางการเกษตรคงตัว เช่น สีใบ ทรงกอ ความสูง การออกรวง สีเปลือก สีข้าวกล้อง เหมือนกันและคงตัว ระยะเวลาการสุกแก่ของเมล็ดใกล้เคียงกัน คือหลังดอกบานประมาณ 28-30 วัน เมล็ดไม่หลุดร่วงเอง ข้าวเปลือกจะไม่มีหางหรือถ้ามีก็จะสั้นมาก เป็นข้าวที่เกษตรกรปลูกกันโดยทั่วไป ตัวอย่างเช่น ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ข้าวป้องแอ้ว ข้าวเสาไห้

6. จำแนกตามแหล่งกำเนิด สามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภท คือ

6.1 ข้าวปลูกเอเชีย (*Oryza sativa*) คือ ข้าวที่มีถิ่นกำเนิดบริเวณประเทศอินเดีย บังคลาเทศ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ นิยมปลูกกันอย่างแพร่หลายตั้งแต่อินเดีย ตอนเหนือของบังคลาเทศ บริเวณดินแดนสามเหลี่ยมระหว่างพม่า ไทย ลาว เวียดนาม และจีนตอนใต้ โดยแบ่งเป็น 3 ชนิด คือ ข้าวอินดิกา ข้าวจาปอนิกา และข้าวจาวานิกา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.2 ข้าวปลูกแอฟริกา (*Oryza glaberrima*) คือ ข้าวที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา นิยมปลูกในบริเวณเขตร้อนของทวีปแอฟริกาเท่านั้น

7. จำแนกตามวิธีการทำนา สามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภท คือ

7.1 ข้าวนาดำ เป็นข้าวที่ปลูกโดยวิธีดำ โดยต้องตกกล้าก่อนแล้วจึงถอนไปปักดำในแปลงนา เมื่อปักดำแล้วจะต้องรักษาระดับน้ำให้อยู่ประมาณ 1 ใน 4 ของความสูงของต้นข้าว หรือไม่น้อยกว่า 10 เซนติเมตร ผลผลิตของข้าวนาดำจะมากกว่าข้าวนาหว่าน คือได้ข้าวประมาณ 40 – 60 ถังต่อไร่

7.2 ข้าวนาหว่าน เป็นข้าวที่ปลูกโดยวิธีหว่าน โดยใช้เมล็ดหว่านลงไปในนา ใช้เวลาประมาณ 5.5 – 6.5 เดือนจึงจะเก็บเกี่ยวได้ ผลผลิตจากข้าวนาหว่านจะได้ไร่ละ 30 – 35 ถัง

8. จำแนกตามอายุข้าว สามารถจำแนกได้เป็น 3 ประเภท คือ

8.1 ข้าวเบา มีช่วงการเจริญเติบโตถึงช่วงเก็บเกี่ยวสั้นไม่เกิน 100 วัน

8.2 ข้าวกลาง มีช่วงการเจริญเติบโตถึงช่วงเก็บเกี่ยวปานกลาง 100 -130 วัน

8.3 ข้าวหนัก มีช่วงการเจริญเติบโตถึงช่วงเก็บเกี่ยวยาวมากกว่า 130 วัน

9. จำแนกตามความยาวของเมล็ด สามารถจำแนกได้เป็น 4 ประเภท คือ

9.1 ข้าวเมล็ดสั้น มีความยาวของเมล็ดน้อยกว่า 5.5 มิลลิเมตร

9.2 ข้าวเมล็ดยาวปานกลาง มีความยาวของเมล็ดระหว่าง 5.5-6.0 มิลลิเมตร

9.3 ข้าวเมล็ดยาว มีความยาวของเมล็ดระหว่าง 6.0-7.0 มิลลิเมตร

9.4 ข้าวเมล็ดยาวมาก มีความยาวของเมล็ดมากกว่า 7.0 มิลลิเมตร

10. จำแนกตามแหล่งน้ำที่ใช้ปลูก สามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภท คือ

10.1 ข้าวนาชลประทาน คือ ข้าวที่ปลูกในที่สามารถควบคุมระดับน้ำได้ โดยอาศัยน้ำจากการชลประทาน ปลูกได้ตลอดทั้งปี ในประเทศไทยมีเนื้อที่สำหรับปลูกข้าวนาชลประทานร้อยละ 24 ของพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมด โดยส่วนใหญ่จะอยู่ในภาคกลาง

10.2 ข้าวนาน้ำฝน คือข้าวที่ปลูกในฤดูนาปีโดยอาศัยน้ำฝนตามธรรมชาติ ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำได้ ประเทศไทยมีเนื้อที่ปลูกข้าวนาน้ำฝนประมาณร้อยละ 70 ของพื้นที่ปลูกข้าวทั้งหมด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศัตรูข้าว

การเจริญเติบโตของข้าวสามารถจำแนกได้เป็น 3 ระยะ คือ การเจริญเติบโตทางลำต้น การเจริญเติบโตช่วงสืบพันธุ์ และการเจริญเติบโตช่วงเมล็ดแก่ ระยะการการเจริญเติบโตทางลำต้น (vegetative phase) นั้นเป็นการเจริญเติบโตเพื่อความเจริญของต้นข้าว โดยแบ่งเป็น 2 ระยะย่อยคือ ระยะกล้า (seeding stage) มีระยะเวลา 20-30 วัน และระยะแตกกอ (tillering stage) มีระยะเวลา 45-60 วัน ส่วนระยะการเติบโตช่วงสืบพันธุ์ (reproductive phase) มีระยะเวลา 30-35 วัน เพื่อการสร้างอวัยวะที่ใช้ในการสืบพันธุ์ของข้าว แบ่งเป็น 2 ระยะย่อย คือ ระยะการเกิดช่อดอก (panicle initiation) และระยะการออกรวง (heading stage) ส่วนระยะการเติบโตช่วงเมล็ดแก่ (ripening stage) นั้นแบ่งเป็น 3 ระยะย่อย คือ ระยะน้ำนม (milky stage) ระยะข้าวเริ่มแข็ง (dough stage) และระยะเมล็ดแก่ (เอกสงวน, 2544) ในการเจริญเติบโตของต้นกล้าข้าวนั้นต้องขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ได้แก่ ระดับน้ำ และปริมาณน้ำ ถ้ารัดับน้ำสูงและปริมาณของน้ำมากเกินไปจะทำให้ต้นข้าวมีรากน้อย ลำต้นสูง ปริมาณของแสงแดดถ้าน้อยเกินไปจะทำให้ต้นกล้าจะยืดยาวสูง อ่อนแอ เป็นต้น (เบนิโต, 2526) แต่ในธรรมชาติการเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าวมักถูกจำกัดด้วยอิทธิพลของศัตรูข้าวชนิดต่างๆ เช่นเชื้อราจะเป็นสาเหตุของ โรคไหม้ โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคกาบใบแห้ง ฯลฯ เชื้อแบคทีเรียจะเป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้ง โรคใบขีดโปร่งแสง ฯลฯ เชื้อไวรัสจะเป็นสาเหตุของโรคหูด โรคเขียวเตี้ย ฯลฯ เชื้อไมโคพลาสมาจะเป็นสาเหตุของโรคใบสีแสด โรคเหลืองเตี้ย ฯลฯ และนอกจากนี้ยังมีศัตรูของข้าวและวัชพืชที่จะทำลายและขัดขวางการเจริญเติบโตของข้าว เช่น ไส้เดือนฝอย ไส้เดือนฝอยรากข้าว ไส้เดือนฝอยรากปม ไส้เดือนฝอยรากแผล แมลง เพลี้ยไฟ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล หนอนกอข้าว หนอนกระทู้คอรวง ปู นา หอยเชอรี่ นก หนู หญ้าไม้กวาด กกหนวดปลาดุก สาหร่ายไฟ ผักแว่น เป็นต้น (บุญหงษ์, 2549) จากการคาดคะเนผลกระทบของโรคต่างๆ ที่เกิดกับข้าว แม้เพียงร้อยละ 10 – 15 ก็คิดเป็นมูลค่าที่สูญเสียไปกว่าหลายพันล้านบาท (ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี, 2553) ประกอบกับประเทศไทยมีพื้นที่ที่ใช้เพาะปลูกข้าวลดน้อยลง และเกษตรกรที่ประกอบอาชีพทำนาก็มีปริมาณลดลงด้วย ในขณะที่ประชากรของไทยและประชากรของโลกมีอัตราการเพิ่มขึ้นไปพร้อมๆ กับความต้องการข้าวเพื่อการบริโภค ดังนั้นการแก้ปัญหาผลผลิตของข้าวที่สูญเสียไปกับโรคต่างๆ เหล่านี้ จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการผลิตข้าวให้พอเพียงต่อความต้องการบริโภคของประชากรโลกในอนาคต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การปรับปรุงพันธุ์ข้าว

ประเทศไทยจัดได้ว่าเป็นประเทศที่มีเชื้อพันธุกรรมของข้าวมาก และมีชื่อเสียงด้านคุณภาพข้าวมานาน การปรับปรุงพันธุ์ข้าวของไทยเพื่อให้ได้ข้าวที่คุณภาพดีมีมายาวนาน จากหลักฐานที่ปรากฏ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเริ่มต้นครั้งแรกในรัชสมัยของพระบาทสมเด็จพระจุลจอมเกล้าเจ้าอยู่หัว ซึ่งได้มีการประกวดพันธุ์ข้าวครั้งแรกที่เมืองธัญบุรี เมื่อปี พ.ศ. 2450 (สุทัศน์, 2552) เพื่อเป็นการหาพันธุ์ข้าวที่ดีมาทำพันธุ์ และเพื่อให้ข้าวของประเทศสยามมีราคาเทียบเท่ากับข้าวของประเทศอื่น (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2544) และต่อมาทางราชการก็มีการประกวดคัดพันธุ์ข้าวขึ้นอย่างสม่ำเสมอ เพื่อมีจุดมุ่งหมายให้ชาวนาได้เลือกใช้พันธุ์ข้าวที่มีคุณภาพเมล็ดดี ตามความต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ และในเวลาเดียวกันนั้นพระยาโภชากร (ตรี มิลินทสูต)ได้รวบรวมพันธุ์ข้าวดีจากทั่วประเทศ ทั้ง 18 มณฑล จำนวน 4,764 ตัวอย่าง และคัดได้ 482 ตัวอย่าง หลังจากทำการทดสอบและคัดเลือกพันธุ์เป็นเวลา 3 ปี จึงสามารถคัดข้าวพันธุ์ดีได้ 8 พันธุ์ ที่ถือว่าเป็นข้าวชุดแรกที่รัฐบาลขยายพันธุ์และแนะนำให้ปลูกอย่างเป็นทางการเมื่อ ปี พ.ศ. 2478 ซึ่งได้แก่ ข้าวพวงเงิน ข้าวทองระย้าดำ ข้าวขาวทดลอง ข้าวจำปาซ้อน ข้าวปิ่นแก้ว ข้าวบางพระ ข้าวน้ำดอกไม้ ข้าวนางตานี (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2544) และในปี พ.ศ. 2476 ข้าวไทยพันธุ์ปิ่นแก้วได้รับรางวัลชนะเลิศในการประกวดพันธุ์ข้าวทั่วโลก ที่เมืองเจจินา ประเทศแคนนาดา ทำให้ข้าวไทยมีชื่อเสียงโด่งดังด้านคุณภาพ จึงเป็นที่ต้องการของตลาดโลกมาจนถึงปัจจุบัน (สถาบันวิจัยข้าว, 2544) โดยในปี พ.ศ. 2550 กินเนสส์บุ๊คได้ออกประกาศนียบัตรยกย่องว่าข้าวไทยมีคุณภาพดี และมีการส่งออกข้าวมากที่สุดในโลกมากกว่า 8 ล้านตัน คิดเป็นปริมาณถึงร้อยละ 27 ของปริมาณข้าวที่มีส่งออกทั่วโลก (ข่าวสด, 2552) โดยเฉพาะข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ (สถาบันวิจัยข้าว, 2544) เพราะข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวที่มีคุณภาพดี เมล็ดข้าวสารมีสีขาว กลิ่นหอม เมล็ดอ่อนนุ่ม และหุงขึ้นหม้อ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวไวแสง ออกดอกประมาณ วันที่ 20 ตุลาคม และสามารถเก็บเกี่ยวได้ประมาณวันที่ 20 พฤศจิกายนของทุกปี สามารถทนต่อสภาพดินเค็ม ดินเปรี้ยว และสภาพแล้งได้ปานกลาง (บุญหงษ์, 2549) ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เกิดจากจากคัดเลือกจากพันธุ์ข้าวพื้นเมืองจากนาเกษตรกร อำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา แล้วนำมาปรับปรุงพันธุ์โดยกรมการข้าว และได้ประกาศรับรองพันธุ์เพื่อนส่งเสริมการปลูกเมื่อวันที่ 25 พฤษภาคม พ.ศ. 2502 (สุทัศน์, 2552) ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เหมาะสมสำหรับการปลูกในพื้นที่ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาค

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลาง (สุวิตร ,2526) แต่พบว่าข้าวขาวดอกมะลิ 105 นี้มีความสามารถต้านทานต่อโรคไหม้ต่ำ ทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตเป็นจำนวนมาก (สมคิด และคณะ, 2542) ดังนั้นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการควบคุมการระบาดของโรคไหม้ คือ การลดความเสี่ยงของการระบาดของโรคโดยการเปลี่ยนมาปลูกข้าวสายพันธุ์ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ เช่น ข้าวสุพรรณบุรี 1 (สถาบันวิจัยข้าว, 2539) หรือโดยการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ได้พันธุ์ข้าวที่มียีนที่มีความสามารถในการต้านทานต่อโรค (Ou, 1985a,b,c)

วิธีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในปัจจุบันนั้นมีหลากหลายวิธี (บุญหงษ์, 2549) ได้แก่

1. การนำข้าวจากแหล่งอื่นเข้ามาปลูก (introduction) คือ การนำข้าวพันธุ์ดีจากแหล่งอื่นเข้ามาปลูก อาจทำให้ได้ข้าวที่มีลักษณะและมีผลผลิตที่ดีขึ้นกว่าเดิม เช่น การนำข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกเดิมในอำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา ไปปลูกในพื้นที่ของจังหวัดสุรินทร์ ทำให้มีผลผลิตดีขึ้นและคุณภาพในการหุงต้มเพิ่มขึ้น

2. การคัดเลือกพันธุ์จากพันธุ์ข้าวปลูก (selection) คือ การคัดเลือกต้นข้าวที่มีลักษณะดีจากประชากรรวมของข้าวปลูกพันธุ์ใดพันธุ์หนึ่ง แล้วนำไปปลูกเพื่อคัดเลือกต่อไปจนสามารถพัฒนาเป็นข้าวพันธุ์ดีในที่สุด

3. การผสมพันธุ์และการคัดเลือกพันธุ์ คือ การนำข้าวพันธุ์หนึ่งไปผสมพันธุ์กับอีกพันธุ์หนึ่ง โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะรวมเอาลักษณะที่ดีของพันธุ์ต่างๆ ไว้ด้วยกันในสายพันธุ์ใหม่

4. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (induce mutation) คือ การใช้รังสีหรือสารเคมีในการเปลี่ยนโครงสร้างของสารพันธุกรรม โครงสร้างหรือจำนวนของโครโมโซม เพื่อสร้างลักษณะใหม่ๆ ที่ต้องการขึ้นมา

5. การใช้เทคโนโลยีชีวภาพและพันธุวิศวกรรม (biotechnology and genetic engineering approach) เป็นการใช้เทคโนโลยีชีวภาพและพันธุวิศวกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อแก้ไขข้อจำกัดในการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีมาตรฐาน

การลดความเสี่ยงของการระบาดเชื้อโรคไหม้ โดยการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้พันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรค จะเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด (Ou, 1985; Bonman *et al*., 1992) ซึ่งวิธีการที่ดีที่สุดในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อโรคไหม้ คือการทำ pyramid resistance genes โดยการรวมเอายีนต้านทานโรคไหม้จำนวนหลายๆ ยีนเข้ามาอยู่รวมกันในข้าวพันธุ์เดียว จะทำให้ข้าวพันธุ์นั้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สามารถต้านทานเชื้อโรคไหม้แบบ Broad-spectrum disease resistance (Correa-Victoria *et al*., 2002; Bonman *et al*., 1992) คือ มีความสามารถในการต้านทานเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์หลักที่ระบาดมาก และมีความสามารถในการต้านทานเชื้อโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์ ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้พันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานต่อโรคนี้ จะเป็นการประหยัดเวลา พื้นที่ และค่าใช้จ่าย (Deng *at al*., 2006) ตัวอย่างเช่น ข้าวแอฟริการสายพันธุ์ Moroberekan มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ที่ระบาดในดินแดนแถบตะวันตกของแอฟริกา (Bonman and Mackill, 1988) ข้าวอินดิกาสายพันธุ์ Tetep จากประเทศเวียดนาม มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54 Pi-1(t)* และ *Pi-4b* (Mackill and Bonman ,1992; Inukai *et al*., 1994) มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมโดย International Rice Blast Nursery (IRBN) (Ahn, 1994) และจากสายพันธุ์ที่ระบาดในพื้นที่ตะวันตกเฉียงเหนือของเทือกเขาหิมาลัยในอินเดีย (Sharma *et al*., 2002) ข้าวอินดิกาสายพันธุ์ IR24 มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi20(t) Pib Piks* และ *Pia* สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมมาจากประเทศจีนและฟิลิปปินส์ได้ จึงเป็นข้าวที่ใช้ในโครงการ Chinese hybrid rice breeding programs เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้ (Imbe *et al*., 1997; Hang and Tai, 2001; Ebron *et al*., 2004) ข้าวอินดิกา สายพันธุ์ GM4 จากมณฑลเสฉวนประเทศจีน มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1 Pi2* และ *Pi3* จึงถูกใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์สำหรับโครงการปรับปรุงพันธุ์ในประเทศจีน (Peng *et al*., 1996; Shen *et al*., 2004) ข้าวป่าที่มียีนต้านทานทานโรคไหม้ *Pi9* สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ที่เก็บมาจากเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ได้ (Lu *et al*., 2004) เป็นต้น

ข้าวพื้นเมืองและการอนุรักษ์พันธุกรรมข้าว

ประเทศไทยจัดว่าเป็นประเทศที่มีฐานเชื้อพันธุกรรมของข้าวสูง เพราะอยู่ในบริเวณของแหล่งกำเนิดและแพร่กระจายของสปีชีส์ข้าว (origin of species) (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2544) ประกอบกับแต่ละภาคมีสภาพพื้นที่และภูมิอากาศที่แตกต่างกัน ทำให้เกิดความหลากหลายของพันธุ์ข้าว แต่ปัจจุบันความหลากหลายของพันธุ์ข้าวได้ลดลงไปมาก โดยมีสาเหตุเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมโลก เกษตรกรที่ประกอบอาชีพทำนามีจำนวนลดลง และการที่เกษตรกรนิยมใช้ข้าวพันธุ์ที่ทางราชการส่งเสริม เช่น ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปลูกเป็นพันธุ์เดียวแทนข้าวพันธุ์พื้นเมืองเดิม ข้าวพันธุ์พื้นเมืองเป็นข้าวที่บรรพบุรุษปลูกคัดเลือกมาเป็นเวลานับพัน ปี โดยการผ่านการเพาะพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่แข็งแรง ทนแล้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทนฝน เหมาะสมกับดินในท้องถิ่น หรือเกิดจากการกลายพันธุ์ของข้าวตามธรรมชาติทำให้ได้ข้าวที่มีลักษณะดีตรงตามความต้องการของเกษตรกร ตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่เกษตรกรนิยมปลูกในอดีต เช่น ข้าวพวงเงิน ข้าวทองระย้าดำ ข้าวขาวทดลอง ข้าวปิ่นแก้ว ข้าวจำปาซ้อน และข้าวนางตานี เป็นต้น ข้อดีของข้าวพันธุ์พื้นเมือง คือมีความหลากหลายของพันธุ์ค่อนข้างสูง คุณภาพเมล็ดดี มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม แมลงศัตรูพืช มีความต้านทานต่อโรคต่างๆ จึงเป็นเรื่องที่น่าตระหนักว่าในอนาคตอันใกล้นี้ ข้าวพันธุ์พื้นเมืองซึ่งเป็นแหล่งของฐานพันธุกรรมที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการปรับปรุงพันธุ์อาจสูญพันธุ์ไปได้ ซึ่งถ้าพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีคุณภาพได้สูญพันธุ์ไปจะไม่สามารถสร้างพันธุ์ข้าวที่มีคุณภาพดีในการปรับปรุงพันธุ์ที่ตรงตามความต้องการของตลาดได้ (ภัทรดา และ กมลพร, 2552) ดังนั้นนักปรับปรุงพันธุ์ข้าว และหน่วยงานที่รับผิดชอบด้านการวิจัยและพัฒนาข้าวได้ตระหนักถึงความสำคัญของเชื้อพันธุกรรมข้าวและผลเสียหายที่จะเกิดขึ้นจากการสูญหายทางพันธุกรรม จึงดำเนินการรวบรวมอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ข้าวมาอย่างต่อเนื่องตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน โดยในปี พ.ศ. 2524 ได้จัดตั้งศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติขึ้นที่ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี เพื่อให้เป็นแหล่งรวบรวม อนุรักษ์ และใช้ประโยชน์ทรัพยากรพันธุกรรมข้าว โดยศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติ มีห้องอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ในระยะเวลาต่างๆ 3 แบบ คือ ห้องอนุรักษ์ระยะสั้นมีอายุประมาณ 3-5 ปี ห้องอนุรักษ์ระยะปานกลางมีอายุประมาณ 20 ปี และห้องอนุรักษ์ระยะยาวสามารถรักษาพันธุ์ข้าวไว้ได้ประมาณ 50 ปีโดยศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติ ได้เริ่มดำเนินการสำรวจ รวบรวม เชื้อพันธุ์ข้าวจากแหล่งต่างๆ ทั่วประเทศ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2525 เป็นต้นมา ปัจจุบันมีเชื้อพันธุ์ข้าวที่รวบรวมและอนุรักษ์ไว้ไม่น้อยกว่า 20,000 ตัวอย่างเชื้อพันธุ์ ตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่เป็นแหล่งพันธุกรรมของลักษณะที่ดีต่างๆ เช่น ข้าผาเลือด ข้าวหางยี 71 ข้าวเหนียวสันป่าตอง มีความสามารถในการต้านทานต่อโรคไหม้ ข้าวเผือกน้ำ 43 ข้าวพวงไร่ 2 ข้าวเหลืองใหญ่ ข้าวเก้ารวง 88 ข้าวนางพญา 132 ข้าวหางยี 71 มีความสามารถในการต้านทานต่อโรคใบจุดสีน้ำตาล ข้าวเหมยนอง 62 เอ็ม มีความสามารถในการต้านทานต่อแมลงบั่ว ข้าวมันปู ข้าวแดงดอกกมีความทนทานต่อสภาพดินแค็ม ข้าวนางเขียว พลายงามปราจีนบุรีมีความสามารถในการขึ้นน้ำได้ดี นอกจากนี้ยังมีตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ในการพัฒนาข้าวพันธุ์รับรองของทางราชการ เช่น ข้าวเหลืองทอง ข้าว กข1 ข้าวพิษณุโลก 2 ข้าวสุพรรณบุรี 1 ขาวดอกมะลิ 105 ข้าวนางมล เอส 4 เป็นต้น (สมาคมเมล็ดพันธุ์แห่งประเทศไทย, 2549; กรมการข้าว, 2554)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยีนต้านทานโรคไหม้

พืชมีกลไกเพื่อต่อต้านโรคพืชจากสาเหตุต่างๆ เช่น แบคทีเรีย ไวรัส รา หนอนตัวกลม แมลง ฯลฯ ผ่านระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยกลไลในการตอบสนองของพืช สามารถ แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ basal และ R-gene-mediated resistance ซึ่งการตอบสนองแบบ R-gene-mediated resistance มีประสิทธิภาพและเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ต่อไป (Flor, 1971) โดยกระบวนการต้านทานนี้ R gene จะสร้าง receptor ที่สามารถจดจำและตอบสนองต่อ *avirulence* (*Avr*) gene ของเชื้อก่อโรค และจะกระตุ้นให้ต้นพืชแสดงกลไกการตอบสนองในระดับต่างๆ ต่อไป (Baker *et al*., 1997) ปฏิสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองของยีนต้านทาน (resistance genes) ระหว่างพืชและยีนก่อโรค (avirulence genes) เป็นไปตามทฤษฎี the gene-for-gene system (Flor, 1971; Silue *et al*, 1992) โดยเฉพาะอย่างยิ่งปฏิสัมพันธ์ระหว่างข้าวและเชื้อราโรคไหม้เป็นโมเดลที่นิยมใช้สำหรับศึกษาเรื่องของปฏิกิริยาระหว่างพืชและเชื้อก่อโรค (plant–microbe interactions) (Valent, 1990) จากการศึกษาพบว่ายีนต้านทานมีลักษณะเป็นกลุ่มของยีนหลายๆ ซ้ำที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเป็นยีนแฟมิลี่ (Bai *et al*.,2002) เช่น กลุ่มยีนต้านทานโรคราสนิม *rp1* ในข้าวโพด (Saxena and Hooker, 1974; Collins *et al*., 1999) กลุ่มยีนต้านทานโรคราแป้ง *Mla* ในข้าวบาร์เล่ย์ (Wei *et al*., 2002) กลุ่มยีนต้านทานโรคราแป้ง *Pm3* ในข้าวสาลี (Yahiaoui et al. 2004) กลุ่มยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *Xa*26 และกลุ่มยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi*9 ในข้าว (Sun *et al*., 2004) โดยกลุ่มยีนของยีนต้านทาน (R gene clusters) มีวิวัฒนาการเกิดมาจากการกลายแบบต่างๆ เช่น การเกิด duplications การเรียงตัวใหม่ของลำดับยีน การกลายแบบ point mutations หรือ deletion เป็นเหตุให้เกิดความแตกต่างขึ้นระหว่างยีนในกลุ่มเดียวกัน (Meyers *et al*., 2003) โดยการตอบสนองของยีนต้านทานต่อเชื้อชนิดต่างๆ จะมีความระบบการตอบสนองที่แตกต่างกัน (Dangl and Jones 2001; Martin *et al*., 2003) โดยสามารถจำแนกยีนต้านทานได้เป็น 7 ประเภท กลุ่มที่สำคัญและเป็นกลุ่มใหญ่ที่สุดคือ nucleotide-binding site plus leucine-rich repeat R genes (NBS–LRR) (Traut, 1994; Dangl and Jones, 2001; Martin *et al*., 2003; Meyers *et al*., 2003; Howles *et al*., 2005) 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 นั้นจะ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประกอบด้วยส่วนอนุรักษ์หลายๆ 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 ในธัญพืชส่วนใหญ่มักจะมีอินทรอนตรงบริเวณ 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 แต่อินทรอนในยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* หนึ่งอินทรอนมีขนาดใหญ่ (5,362 คู่เบส) กว่าอินทรอนในยีนต้านทานโรคไหม้ *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 และเป็นตัวหลักที่ช่วยในการการต้านทานต่อโรคอย่างจำเพาะ (Ellis *et al*., 1999; Hulbert *et al*., 2001; Dodds *et al*., 2001; Jia *et al*., 2000) นอกจากนี้การแสดงออกของ *avilurence* (*AVR*) gene ในเชื้อก่อโรคจะไปกระตุ้นการทำงานของกลไกป้องกันจากยีนต้านทาน(*R* gene) ในพืช สมมติฐานที่เป็นไปได้ในการอธิบายถึงกลไกนี้ คือ ligand-receptor model กล่าวคือ ผลผลิตของ *R* gene เช่น receptor ที่สามารถจดจำ ligand ที่สร้างขึ้นโดย *AVR* gene เป็น protein – protein interaction motif (Braun *et al*., 1994; Jones and Jones, 1997) แล้วส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณเพื่อตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อก่อโรค

การศึกษาเรื่องยีนต้านทานโรคไหม้สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ การนำเอาเทคนิคด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชทั้งมาตรฐาน (conventional breeding) และแบบใหม่ (molecular breeding) มาใช้ในการค้นหายีนต้านทานโรค และใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรคมาช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection: MAS) แต่ปัญหาที่สำคัญที่มักประสบอยู่เสมอ คือ เชื้อราโรคไหม้มีความหลากหลายทางชีววิทยาสูง เป็นเหตุให้ข้าวมีความสามารถในการต้านทานต่อโรคไหม้ได้ไม่ครอบคลุมทุกสายพันธุ์ (Morris *et al*., 1993; Dahu

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

et al., 1995) เนื่องจากยีนต้านทานโรคไหม้จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อราโรคไหม้เพียงไม่กี่สายพันธุ์ จึงทำให้ข้าวพันธุ์ที่มียีนต้านทานโรคไหม้นี้จะสูญเสียความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ที่เคยต้านทานได้ภายในระยะเวลาเพียงไม่กี่ปี เนื่องจากการปรับตัวของสายพันธุ์เชื้อราโรคไหม้ให้สามารถทนทานต่อยีนต้านทานโรคไหม้นั้นได้ (Lee and Cho, 1990; Boman *et al*., 1992) โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้าวสายพันธุ์ที่มี *R* gene เพียงยีนเดียวจะสูญเสียความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว เนื่องจากความไม่เสถียรของยีน (Kiyosawa 1982; Bonman *et al*. 1986; Valent *et al*., 1991; Zhou *et al*. 2007) ดังนั้นการค้นหายีนต้านทานตัวใหม่ๆ โดยเฉพาะยีนต้านทานประเภท Broad-spectrum คือ ยีนที่มีความสามารถในการต้านทานต่อสายพันธุ์เชื้อราโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์ เพื่อนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้ยาวนานขึ้น (Bonman *et al*., 1992; Correa-Victoria *et al*., 2002; Jia, 2003) ในประเทศสหรัฐอเมริกามีการวิจัยเรื่องยีนต้านทานโรคไหม้ (*Pi* gene) อย่างแพร่หลาย เพราะเป็นส่วนหนึ่งในโครงการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ข้าวของประเทศ (Moldenhauer *et al*., 1992) การรวมยีนต้านทานโรคไหม้หลายๆ ยีนมาไว้ในข้าวสายพันธุ์เดียวกัน จะทำให้ข้าวสายพันธุ์ดังกล่าวมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราก่อโรคได้ดีขึ้น ตัวอย่างเช่น ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pita2 Pik* และ *Pib* สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ในประเทศสหรัฐอเมริกาได้ถึง 8-10 สายพันธุ์ จึงมีการนำยีนดังกล่าวมาเป็นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้ต่อไป (Marchetti *et al*., 1987; Tabien *et al*., 2002)

จนถึงปัจจุบันนักวิจัยประสบความสำเร็จในการโคลนแยกยีนต้านทานโรคเป็นจำนวนมากทั้งจากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ (Martin *et al*., 2003) เช่น ยีนต้านทาน *RPM1* จากต้นอะราบิดอบซิส (Grant *et al*., 1995) ยีนต้านทาน *I2* จากต้นมะเขือเทศ (Ori *et al*., 1997) และยังมียีนต้านทานจำนวนกว่า 600 ยีน ได้ถูกค้นพบในข้าว (Bai *et al*., 2002) โดยเฉพาะยีนต้านทานโรคที่มีสาเหตุมากจากเชื้อรา สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ยีนที่มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราเฉพาะสายพันธุ์ และยีนที่มีความสามารถต้านทานเชื้อราได้หลากหลายสายพันธุ์ (Ou, 1985a,b,c ; Parveliet, 1979) สำหรับการศึกษาทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้ (*Pi* gene) ในข้าวนั้น เริ่มมีมาครั้งแรกตั้งแต่ปี ค.ศ. 1960 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น และได้มีการศึกษากันมาอย่างต่อเนื่อง แต่พบว่าในปัจจุบันยังมีปัญหาเกี่ยวกับการนับจำนวน และการจัดจำแนกยีนต้านทานโรคไหม้ เช่น มียีนต้านทานโรคไหม้จำนวนมากที่ไม่ได้รับการตั้งชื่อตามกฎการตั้งชื่อ (The Nomenclature of the Committee on Gene Symbolization) หรือมียีนต้านทานโรค

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไหม้หลายตัวที่มีชื่อเดียวกัน หรือมียีนต้านทานโรคไหม้ตัวเดียวกันแต่ได้รับการตั้งชื่อหลายชื่อต่างกัน และนอกจากนี้ยังเกิดจากยีนต้านทานโรคไหม้บางยีนที่มีความสามรถแสดงความต้านทานบางส่วน (partial resistance) เช่น ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pif Pi21 Pb1* และ *Pi34*(t) แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่าได้มีการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวกว่า 73 ยีน กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมของข้าว (Ballini *et al*. 2008) และกว่า 40 ยีนได้รับการทำแผนที่ลงบนโครโมโซม (Iwata, 1996; Nagato and Yoshimura 1998, 1999; Chen *et al*., 2004) โดยยีนต้านทานโรคไหม้ส่วนใหญ่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 โครโมโซมคู่ที่ 11 และโครโมโซมคู่ที่ 12 ตัวอย่างเช่น ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2*/*PiZ Pi8 Pi9* และ *Pi13(t)* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1 Pi7 Pi18 Pif Pi34 Pi38 Pi44*(t) มีตำแหน่งบนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 11 ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pita Pita2 Pi6*(t) *Pi12*(t) *Pi12*(t) *Pi19*(t) *Pi20*(t) *Pi21*(t) *Pi24*(t) *Pi31*(t) *Pi32*(t) *Pi39*(t) *Pi62*(t) และ *Pi3* มีตำแหน่งใกล้กับเซนโทรเมียร์บนโครโมโซมคู่ที่ 12 (Koide *at al*., 2009) โดยยีนต้านทานโรคไหม้ส่วนใหญ่ที่มีการค้นพบจะเป็นยีนเด่น ยกเว้น ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi21* ที่เป็นเป็นยีนด้อย และยีนต้านทานโรคไหม้ส่วนใหญ่ได้มาจากข้าวพันธุ์พื้นเมือง (landrace variety) สายพันธุ์อินดิกา (indica variety) มีเพียงยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ที่มีแหล่งกำเนิดมาจากข้าวป่า *Oryza minuta* (Liu *et al*., 2002) และนอกจากนี้ยังพบว่ามีบางยีนต้านทานโรคไหม้บางยีนมีลักษณะทางปริมาณ (Fukuoka and Okuno, 2001)แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้มียีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวเพียง 11 ยีนเท่านั้น (ตารางที่ 1) ที่ได้ทำการโคลนยีนและหาลำดับเบสเสร็จสมบูรณ์แล้ว คือ ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pita Pib Pi2/Pizt Pid2 Pi9 Pi36 Pi37 Pikm Pid3 Pi5* และ *Pit* (Dai *et al.,* 2010)

ตารางที่ 1 ยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวที่ได้ทำการโคลนแล้ว

ยีน	ลักษณะของยีน	โครโมโซม	เอกสารอ้างอิง
Pib	NBS-LRR	2	Miyamoto *et al*.,1996.
			Wang *et al*., 1999.
Pita	NBS-LRR	12	Bryan *et al*., 2000.
Pi2/Pizt	NBS-LRR	6	Zhou *et al*., 2006.
Pid2	B-lectin receptor kinase	6	Chen *et al*., 2006.
Pi9	NBS-LRR	6	Qu *et al*., 2006.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ยีน	ลักษณะของยีน	โครโมโซม	เอกสารอ้างอิง
Pi36	NBS-LRR	8	Liu *et al*., 2007b.
Pi37	NBS-LRR	1	Lin *et al*., 2007.
Pikm	NBS-LRR	11	Ashikawa *et al*., 2008.
Pid3	NBS-LRR	6	Shang *et al*.,2009.
Pi5	NBS-LRR	9	Lee *et al*., 2009.
Pit	NBS-LRR	1	Hayashi and Yoshida, 2009.

ที่มา: ชัชวาล และ สุรีพร (2552); Dai *et al.* (2010)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* มีตำแหน่งอยู่ที่ปลายของโครโมโซมคู่ที่ 11 (Yu *et al*., 1996; Hittalmani *et al*., 2000) พบครั้งแรกในข้าวสายพันธุ์ LAC23 จากประเทศไลบีเรีย (Mackill and Bonman, 1992) จากการทำแผนที่โครโมโซมพบว่ายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* มีตำแหน่งอยู่ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RG303 และ RZ536 ใกล้กับเครื่องหมายดีเอ็นเอ RFLP Npb181 และ RZ536 โดยมีระยะห่างเป็นระยะทาง 3.5 และ 14.0 cM ตามลำดับ และมีตำแหน่งใกล้กับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pikc* ด้วย (Yu *et al*., 1996; Hittalmani *et al*., 2000) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* นี้ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ในละตินอเมริการ่วมกันกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* และ *Pi33(t)* (Correa-Victoria *et al*., 2002) และมีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ที่ระบาดในพื้นที่ต่างๆ เช่น ดินแดนแถบละตินอเมริกา ดินแดนแถบตะวันตกเฉียงเหนือของเทือกเขา หิมาลายัน ประเทศอินเดีย และสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมโดย International Rice Blast Nursery (IRBN) (Ahn 1994; Correa-Victoria *et al*., 2002; Sharma *et al*., 2002)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2* มีตำแหน่งใกล้กับเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 6 (Zhou *et al*., 2006; Qu *et al*., 2006) ได้รับการถ่ายทอดมาจากข้าวอินดิกาสายพันธุ์ 5173 (Amante-Bordeos *et al*., 1992; Liu *et al*., 2002) เป็น allelic กับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pizt* แต่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนจำนวน 8 ตัวทำให้เกิดเป็นความแตกต่างระหว่างยีน 2 ยีนดังกล่าว (Koide e*t al*, 2009) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2* มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ที่ระบาดในประเทศฟิลิปปินส์ได้ถึง 455 สายพันธุ์ และมีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมจากพื้นที่ปลูกข้าวสำคัญ 13 แหล่งในประเทศจีน จำนวน 792 สายพันธุ์ และจาก 13 ประเทศ จำนวน 36 สายพันธุ์ (Chen *et al*., 1996,1999; Liu *et al*., 2002)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* เป็นยีนเด่นมีขนาด 118 kb มีตำแหน่งบนโครโมโซมคู่ที่ 6 พบเป็นครั้งแรกในข้าวสายพันธุ์ near isogenic lines (NIL) C101A51 (Chen *et al*., 1996) จากการทำแผนที่โครโมโซมพบว่า ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* มีตำแหน่งระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RG64 และ RG138 เป็นระยtทาง 20 cM (Yu *et al*., 1991; Wu *et al*., 2002) และระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR 140 และ RFLP JSH12 เป็นระยะทาง 118 kb (Jiang and Wang, 2002) และระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RG64 และ RG445 เป็นระยะทาง 2.4 cM (Wu et al. 2002) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* นี้มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้แบบ broad resistance spectrum เช่น มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมจากประเทศฟิลิปปินส์ถึง 455 สายพันธุ์ จากสายพันธุ์ในภาคกลางและภาคใต้ของจีน จำนวน 13 สายพันธุ์ และจากสายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมมาจาก16 ประเทศ จำนวน 18 สายพันธุ์ (Chen *et al*., 1996; 2001)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi5*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi5* มีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 9 พบในข้าวสายพันธุ์ RIL260 จากการทำแผนที่โครโมโซมพบว่า ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi5* มีตำแหน่งอยู่ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ S04G03 และเครื่องหมายดีเอ็นเอ C1454 (Lee *et al*., 2009) มี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมจากประเทศเกาหลีและประเทศฟิลิปปินส์ (Wang *et a*l., 1994; Chen *et al*., 2000; Han, 2001)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* มีตำแหน่งอยู่ที่บริเวณใกล้กับเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมข้าวคู่ที่ 6 (Liu *et al*., 2002) พบครั้งแรกในข้าวอินดิกาสายพันธุ์ 75-1-127 มีต้นกำเนิดมาจากข้าวป่า *Oryza minuta* (Liu *et al*., 2002) ยีน *Pi9* อยู่ในกลุ่ม NBS-LRR (nucleotide-binding site (NBS) และ leucine-rich repeat) มีอินทรอน 2 ตำแหน่ง ในบริเวณถอดรหัสยีน โดยอินทรอนแรกมีขนาดใหญ่ (5,362 คู่เบส) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* นี้มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้แบบ broad resistance spectrum เช่น มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมจากสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (The International Rice Research Institute, IRRI) จำนวนกว่า 100 สายพันธุ์ และจากสายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมมาจาก 13 ประเทศ จำนวน 43 สายพันธุ์ (Liu *et al*., 2002; Qu *et al*., 2006)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi20(t)*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi20(t)* มีตำแหน่งใกล้กับเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมข้าวคู่ที่ 12 จากการทำแผนที่โครโมโซมพบกว่า มีระยะห่างจากเซนโทรเมียร์เป็นระยะทาง 4.1 Mb มีตำแหน่งห่างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR OSR32 เป็นระยะทาง 0.2 cM และห่างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR RM28050 เป็นระยะทาง 0.4 cM. นอกจากนี้ยังเป็น co-segregate กับเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR RM1337 RM5364 และ RM7102 ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi20(t)* นี้เป็นยีนที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ต้านทานต่อโรคไหม้ในประเทศจีน (Li *et al*., 2008) เนื่องจากมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้จากประเทศจีนได้ถึง 160 สายพันธุ์

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมข้าวคู่ที่ 8 มี พบครั้งแรกในข้าวอินดิกาสายพันธุ์ Kasalath รหัส Q61 เป็น single copy gene มีโครงสร้างแบบ NBS และ LRR motif ประกอบด้วยโปรตีนจำนวน 1,056 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรคราแป้ง *Mla*1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และ *Mla*6 ในข้าวบาร์เล่ย์ มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศจีน (Liu *et al*., 2005, 2007)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* พบครั้งแรกในข้าวนิปปอนบาเล่ร์สายพันธุ์ St. No. 1 จากการทำ in silico map-based cloning พบว่า ยีนต้านทาน *Pi37* มีตำแหน่งของ nucleotide-binding site-leucine-rich repeat motif 4 ตำแหน่ง (*Pi37-1*,*-2*, *-3* และ-4) แต่พบว่ามีเพียง *Pi37-3* ที่มีความสามารถในการต้านทานต่อโรคไหม้ ในขณะที่ motif ตำแหน่งที่เหลือ (*Pi37-1*, *Pi37-2* และ *Pi37-4* เป็นแค่โครงสร้างที่เหมือนยีนแต่ไม่ใช่ยีน (Pseudogenes) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* มีผลผลิตเป็นโปรตีนที่มีกรดอะมิโนจำนวน 1,290 ตัว ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยีน *rp1* ในข้าวโพดมากกว่ายีนต้านทานโรคไหม้ *Pita Pib Pi9 Pi2 Pi36* และ *Piz-t* ในข้าว (Liu *et al*., 2007a) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ในประเทศญี่ปุ่นได้เพียงบางส่วน (partial resistance) แต่มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์จากประเทศจีน (Chen *et al*., 2005)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi40(t)*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi40(t)* มีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 6 พบครั้งแรกในข้าวสายพันธุ์ IR65482-4-136-2-2 ที่ถ่ายทอดมาจากข้าวป่า (*O. australiensis*) มีความสามารถต้านทานโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์และหลายพื้นที่ โดยสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์จากประเทศเกาหลีและฟิลิปปินส์ (Jeung *et al*., 2007)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ชื่อเดิมคือยีน *Pi-kh* หรือ *Pi-k*^{h} (Sharma *et al*., 2010) มีตำแหน่งบนส่วนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมข้าวคู่ที่11 มีความยาว 1.5 Kb เป็นยีนเด่น พบครั้งแรกในข้าวอินดิกา สายพันธุ์ Tetep (Kiyosawa and Murty, 1969) ต่อมาพบในข้าวอีกหลายสายพันธุ์ เช่น ข้าวสายพันธุ์ Charnak ของประเทศอินเดีย ข้าวสายพันธุ์ Tadukan ของประเทศฟิลิปปินส์ ข้าวสายพันธุ์ Roshia 33 ของประเทศรัสเซีย ข้าวสายพันธุ์ Dawn ของประเทศอเมริกา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้าวสายพันธุ์ Fuji120 สายพันธุ์ Mutsunishiki และสายพันธุ์ Chugoku 31 ของประเทศญี่ปุ่น (Kiyosawa, 1978,1981) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* นี้เป็น single dominant มีโครงสร้างของยีนแบบ nucleotide-binding site–leucine-rich repeat (NBS–LRR) domain (Sharma *et al.,* 2005) จัดอยู่ในกลุ่มของ *Pik* cluster ที่มีตำแหน่งอยู่ที่ส่วนปลายของแขนข้างยาวของโครโมโซมข้าวคู่ที่ 11 ซึ่งยีนในกลุ่มนี้ได้แก่ ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pik Piks Pikp Pikm Pikh Pi44(t) Pi1* และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *Xa3 Xa4 Xa22(t)* และ *Xa26* (Kiyosawa,1972; McCouch *et al*., 1994; Hayasaka *et al*, 1996; Yu *et al*., 1996; Chen *et al*., 1999; Wang *et al*., 2003; Sun *et al*., 2004; Xiang *et al*., 2006; Li *et* al., 2007; Costanzo *et al*., 2010) โดยยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* นี้จากการกลายในบางส่วนทำให้เกิดความแตกต่างไปจากกลุ่มของ *Pik* (Xu *et al*., 2008) ในปัจจุบันนี้มีการจำแนกความแตกต่างระหว่างยีนต้านทานโรคไหม้ *Pik Piks Pikp* และ *Pi1* แล้ว แต่ความแตกต่างระหว่างยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* และ *Pikm* ยังยากที่จะจำแนก (Hayashi, 2005; Tsunematsu *et al*., 2000) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* นี้มีความสำคัญต่อโครงการปรับปรุงพันธุ์เป็นอย่างมาก (Jia *et al.,* 2002) เนื่องจากมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ เช่น เชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ PLP-1 จากดินแดนแถบตะวันตกเฉียงเหนือของเทือกเขาหิมาลายัน เชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ NLR- 1 จากดินแดนแถบ Nellore และ Andhra Pradesh ประเทศอินเดีย (Ramkumar *et al*., 2011) รวมถึงเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ ที่เก็บรวบรวมโดย International Rice Blast Nursery (IRBN) (Ahn, 1994; Sharma *et al*., 2002) และ Directorate of Rice Research ประเทศอินเดีย (Peng and Shishiyama, 1988)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* มีตำแหน่งอยู่บนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 2 (Shinoda *et al*., 1971) เป็นยีนต้านทานโรคไหม้ตัวแรกที่ได้ถูกโคลนสำเร็จ โดย Wang และคณะในปี ค.ศ.2001a ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* นี้ได้ถูกถ่ายทอดมาจากแหล่งกำเนิดสองแหล่ง คือ ข้าวอินโดนีเซียและข้าวมาเลเซีย ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 1,251 ตัว มีโครงสร้างแบบ nuclear binding site (NBS) และ leucine rich repeat motif (LRR) โดยส่วนของ C-terminal LRR domain ประกอบด้วยส่วนที่คล้ายกับส่วนอนุรักษ์ของ cytoplasmic LRR จำนวน 17 ซ้ำ และมีส่วนของ cysteine residue clustered จำนวน 8 ซ้ำในส่วนของ LRR (Wang *et al*., 1999) และจากการศึกษาการตอบสนองของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* พบว่าสมาชิกในกลุ่มยีนนี้คือ ยีน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ต้านทานโรคไหม้ *Pib PibH8 HPibH1-8* และ *HPibH2-8* มีการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสัญญาณจากสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น อุณหภูมิ แสง น้ำ และ สารเคมี เช่น jasmonic acid salicylic acid ethylene และ probenazole (Wang *et al*., 2001b) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศญี่ปุ่น (Wang *et al*., 1999)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid(t)1*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid(t)1* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมข้าวคู่ที่ 2 พบครั้งแรกในข้าวอินดิกาพันธุ์ Digu ของประเทศจีน มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ จากประเทศจีนและประเทศญี่ปุ่น จำนวน 156 สายพันธุ์ จึงถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประเทศจีน และจากการศึกษาทางพันธุศาสตร์พบว่าข้าวสายพันธุ์ Digu มียีนต้านทานโรคไหม้อยู่หลายยีนด้วยกัน เช่น ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid(t)1 Pid2* และ *Pid3* (Chen *et al*., 2006; Shang *et al*., 2009)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* มีตำแหน่งอยู่ใกล้กับเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมข้าวคู่ที่ 6 พบครั้งแรกในข้าวสายพันธุ์ Digu ของประเทศจีน ถูกโคลนขึ้นสำเร็จในปี ค.ศ. 2006 โดย Chen และคณะ จากการทำแผนที่โครโมโซมพบว่า มีตำแหน่งอยู่ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM3และ RM527 (Chen *et al*., 2004) ซึ่งต่อมายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* นี้ได้ ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* มีโครงสร้างของโปรตีนที่แตกต่างจากยีนต้านทานตัวอื่นๆ คือ มีส่วนของน้ำตาลแมนโนสที่สามารถจับกับแลคตินได้อยู่ภายนอกเซลล์ (a bulb-type mannose specific binding lectin, B-lectin) และในส่วนภายในเซลล์มีโครงสร้าง serine-threonine kinase domain ซึ่งโปรตีนจากยีนต้านทาน *Pid2* นี้จะมีตำแหน่งอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยข้าวที่มีแอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานมีความแตกต่างจากแอลลีลไม่ต้านทานเพียงแค่กรดอะมิโนหนึ่งตัวที่ตำแหน่ง 441 ของโปรตีนเท่านั้น (Chen *et al*., 2006) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ จากประเทศจีนและประเทศญี่ปุ่น จำนวน 156 สายพันธุ์ และถูกนำมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประเทศจีน (Chen *et al*., 2006)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* ชื่อเดิมคือยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi25* มีตำแหน่งบนโครโมโซมคู่ที่ 6 พบครั้งแรกในข้าวสายพันธุ์ Gumei2 โดย Shang และคณะ ในปี ค.ศ. 2009 มีลำดับของนิวคลีโอไทด์ จำนวน 2,772 นิวคลีโอไทด์จัดอยู่ในกลุ่มของ nucleotide-binding site–leucine rich repeat (NBS–LRR) โดยแอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* นั้นเกิดจากการกลายแบบ nonsense mutation เป็น stop codon ที่ตำแหน่งลำดับเบสที่ 2,208 จากตำแหน่งเริ่มต้นของการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้สังเคราะห์ได้โปรตีนที่มีขนาดสั้นลง และการกลายเป็น pseudogene ของยีน *Pid3* นี้เกิดขึ้นภายหลังจากการวิวัฒนาการแยกกันระหว่างข้าวอินดิกาและ จาปอนิกา (Wang *et al*., 1999; Shang *et al*., 2009) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* มีความสามารถในการต้านทานโรคไหม้แบบ broad-spectrum resistance (Lin *et al*., 2007; Liu *et al*., 2007; Shang *et al*., 2009)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* มีตำแหน่งบนโครโมโซมคู่ที่ 6 เป็นยีนเด่น มีขนาดประมาณ 70 kb พบในข้าวอินดิกา สายพันธุ์ Gumei 4 (GM4) จากมณฑลเสฉวนประเทศจีน มีโครงสร้างแบบ NBS-LRR จากการทำแผนที่โครโมโซมพบว่ายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* มีตำแหน่งอยู่ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 และ C0428 และระหว่างเครื่องเครื่องหมายดีเอ็นเอ C26348 และ S47656 มีตำแหน่งใกล้กับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9*/*Pi2 Pi26(t) Pi25(t)* (Liu *et al*., 2002) เป็น tightly linked กันกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2* และ *Pi9* และอาจเป็น allelic กับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi26(t)* อีกด้วย (Deng *et al*., 2006) มีความสามารถต้านทานโรคไหม้แบบ broad-spectrum resistance จึงถูกนำมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของประเทศจีนมามากกว่า 20 ปี (Deng *et al*., 2006)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pit*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pit* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 1 มีโครงสร้างแบบ nucleotide-binding site leucine-rich repeat (NBS-LRR) (Hayashi, K. and H. Yoshida, 2009)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากการทำแผนที่โครโมโซมพบว่ายีนต้านทานโรคไหม้ *Pit* มีตำแหน่งอยู่ใกล้กับเครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP t256 และอยู่ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ t283 และ 2516 (Hayashi *et al*., 2006) สันนิษฐานว่าตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pit* นี้อาจเกิดมาจากการกลายแบบ duplication หรืออาจเกิดจากการมีทรานโพซอนเข้ามาแทรก และพบว่ายีนต้านทานโรคไหม้ *Pit* ในข้าวนี้มีความสัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคไหม้ *bbr3H* ในข้าวบาร์เล่ย์ (Chen *et al.,* 2003)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pita*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pita* มีตำแหน่งใกล้กับเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 12 (Bryan *et al*., 2000; Orbach *et al*, 2000; Fjellstrom *et al*, 2004) มีกำเนิดในสายพันธุ์ข้าวอินดิกาและถ่ายทอดไปสู่ข้าวสายพันธุ์จาปอนิกา ต่อมาพบในข้าวปลูกเอเชียสายพันธุ์ IR8 IR36 IR64 และ IR72 ส่วนในข้าวปลูกในอเมริกาพบในสายพันธุ์ Katy (Jia *et al*., 2003) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pita* ถูกโคลนสำเร็จเป็นครั้งแรกโดย Bryan และคณะในปี ค.ศ. 2000 โดย เป็นยีนที่มี single copy มีโครงสร้างของยีนเป็นแบบ encodes a putative NBS-LRD protein (Bryan *et al*., 2000) และ receptor ในส่วนของ ไซโทพลาสซึมและมี NBS และ LRR motif ที่ปลาย C-terminus ของโปรตีน โดยปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนต้านทานโรคไหม้ *Pita* และยีน *Avr-Pita* ที่ก่อให้เกิดโรคจะสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อโรคพืชตามทฤษฎี gene-for-gene (Bryan *et al*., 2000) โดยโปรตีน Avr-*Pita* สามารถจับกันได้อย่างเฉพาะเจาะจงกับ LRR motif ของโปรตีนจากยีนต้านทาน *Pita* และกระตุ้นระบบต้านทานของยีน *Pita* (Jia *et al*., 2000) ในข้าวสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อโรคไหม้จะมีรูปแบบของยีนที่แตกต่างจากรูปแบบต้านทานเพียงกรดอะมิโนจำนวน 1ตัวเท่านั้น (Jia 2003, 2004) จากการทำแผนที่โครโมโซมพบว่า ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pita* มีตำแหน่งอยู่ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM155 และ RM7102 (Jia *et al*., 2003) และระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ SP4B9 และ SP9F3 (Rybka *et al*., 1997) และเป็น allelic กับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pita2* และ *P-4b* (Yu *et al*., 1991, 1996; Rybka *et al*., 1997) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pita* มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ IC-17 และ IB-49 (Jia *et al*., 2003) จึงนิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1950 (Rybka *et al*., 1997)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Piz*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Piz* มีตำแหน่งอยู่ที่บริเวณใกล้กับเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมข้าวคู่ที่ 6 (Yu *et al*., 1991; Liu *et al*., 2002) ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกโดย Kiyosawa ในปี ค.ศ. 1967 จากข้าวของอเมริกาสายพันธุ์ Zeuith (Amante-Bordeos *et al*., 1992) การหาตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ *Piz* นี้ในช่วงแรกมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย Conaway-Bormans และคณะในปี ค.ศ. 2003 แต่ต่อมาได้มีการพัฒนาให้ได้เครื่องหมายดีเอ็นเอ AP5659-1 AP5659-3 และ AP5659-5 ที่มีตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจงกับปลายทั้งสองข้างของยีน *Piz* ยิ่งขึ้นโดย Fjellstrom และคณะในปี ค.ศ. 2006 ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกันกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ *Piz* SNP ที่ถูกพัฒนาโดย Hayashi และคณะ ในปี ค.ศ. 2004 (Conaway-Bormans *et al*, 2003) และพบว่า ยีนต้านทานโรคไหม้ *Piz* เป็น allelic กับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* (Inukai *et a*l., 1996) มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ 433.5 ได้ (Pan *et al*., 1998)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Piz-t*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Piz-t* มีตำแหน่งใกล้กับเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมข้าวคู่ที่ 6 (Liu *et al*., 2002) เป็นยีนเด่น ได้รับการถ่ายทอดมาจากข้าวอินดิกาสายพันธุ์ TKM1 (Amante-Bordeos *et al*., 1992) มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์ แต่ไม่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ 433.5 ได้ (Pan *et al*., 1998)

จากข้อมูลดังกล่าวได้แสดงให้เห็นว่ายีนต้านทานโรคไหม้จะมีความจำเพาะกับสายพันธุ์ของเชื้อราโรคไหม้ และยีนต้านทานโรคไหม้แต่ละชนิดยังมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้แตกต่างกัน ดังเช่น ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ในประเทศญี่ปุ่นได้เพียงบางส่วน (partial resistance) แต่มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์จากประเทศจีนได้ (Chen *et al*., 2005) และยังมียีนต้านทานโรคไหม้หลายชนิดที่มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้แบบ broad-spectrum resistance เช่น ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1 Pi6 Pi3/Pi5 Pi9 Pi33 Pi2 Pizt* และ *Piz* (Yu *et al*., 1991; Chen *et al*., 1996; Liu *et al*., 2002; Berruyer *et al*., 2003; Jeon *et al*., 2003) ตัวอย่างเช่นยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ในข้าวสายพันธุ์ 127-1-75 มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประเทศฟิลิปปินส์ ได้กว่า100 สายพันธุ์และมีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ที่เก็บรวมรวมมาจาก 13 ประเทศ จำนวน 43 สายพันธุ์ได้ (Liu *et al*., 2002) หรือยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid(t)1* และยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* ในข้าวสายพันธุ์ Digu ของประเทศจีนมีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศจีนและในประเทศญี่ปุ่นได้ถึง 156 สายพันธุ์ จึงถูกนำมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประเทศจีน (Chen *et al.,* 2006) จะเห็นได้ว่าการหาข้อมูลของยีนที่มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ จะเป็นประโยชน์เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวที่มีความสามารถในการต้านทานต่อโรค จะเป็นการลดความเสี่ยงของการระบาดของโรคที่ดีและเหมาะสมที่สุด (Ou, 1985)

เครื่องหมายชีวภาพ (Biological markers)

เครื่องหมายชีวภาพ คือตัวบ่งชี้ที่มีความจำเพาะเจาะจงในด้านต่างๆ ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ได้นำเอาเครื่องหมายที่เป็นเครื่องบ่งชี้ลักษณะทางด้านการเกษตรต่างๆ มาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปฏิบัติให้สูงขึ้น ซึ่งเครื่องหมายที่ใช้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker) เป็นตัวบ่งชี้ทางสรีรวิทยา คือ ลักษณะที่ปรากฏทั่วไปที่สังเกตได้ ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือใดๆ เป็นตัวบ่งชี้ เป็นลักษณะที่แสดงออกภายนอก เช่น ลักษณะความสูงของต้นพืช ลักษณะสีของดอก ลักษณะความแตกต่างของใบ เป็นต้น

2. เครื่องหมายชีวเคมี (Biochemical marker) เป็นตัวระบุถึงความแตกต่างในตัวอย่างที่ทำการศึกษา เช่น การใช้ไอโซเอ็นไซม์ หรือโปรตีนในการศึกษาตัวอย่างต่างชนิดกัน หรือต่างพันธุ์กัน

3. เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) คือ การใช้ดีเอ็นเอมาเป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบถึงความแตกต่างในระดับของยีนหรือดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ทำการศึกษา ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำ และมีความจำเพาะมากกว่าเครื่องหมายชนิดอื่น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เครื่องหมายโมเลกุล

เครื่องหมาย (marker) คือ สิ่งที่ใช้บ่งชี้ความแตกต่างและความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ โดยอาจใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างแต่ละตัว แต่ละบุคคล ระหว่างและภายในสปีชีส์ ระหว่างและภายในประชากรได้ ซึ่งการตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายแต่ละประเภทจะมีข้อเด่นข้อด้อยแตกต่างกัน เช่น การตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ มีข้อเด่นกว่าการตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา คือ ผลที่ได้ไม่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม และมีข้อเด่นกว่าเครื่องหมายโปรตีน คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าโมเลกุลของโปรตีน จึงสามารถตรวจสอบจากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นระยะเวลายาวนานได้ และเนื่องจากดีเอ็นเอมีปริมาณเท่ากันในทุกเซลล์ จึงสามารถตรวจสอบได้จากเนื้อเยื่อทุกชนิด ทุกระยะเวลา โดยไม่ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม และสามารถตรวจสอบจากดีเอ็นเอในส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ ในส่วนที่มีการแสดงออกหรือไม่มีการแสดงออกก็ได้ และนอกจากนี้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ยังมีความหลากหลายของวิธีการในการตรวจสอบที่เหมาะสมสำหรับการบ่งชี้เฉพาะ (สุรินทร์, 2552)

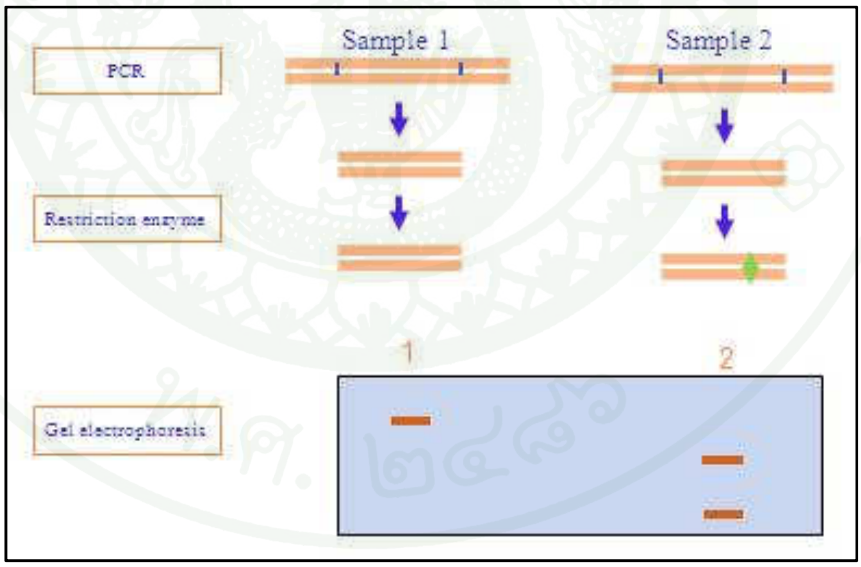
เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาจมีตำแหน่งบนโครโมโซม ในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือในออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA หรือ chloroplast DNA) และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ โดยอาศัยความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์บนโมเลกุลดีเอ็นเอมาเป็นตัวที่ใช้สำหรับบ่งชี้ความแตกต่าง เพราะสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ จึงทำให้เกิดความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุล ที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ (สุรีพร, 2546)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เครื่องหมายดีเอ็นเอ cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ CAPS เป็นการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งผลผลิตจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นจะถูกนำไปตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ โดยที่โพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นนั้น เป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างของตำแหน่งภายในลำดับเบสที่เกิด single nucleotide polymorphism (SNPs) หรือ จากการเพิ่มของตำแหน่งลำดับเบส (addition) และการขาดหายไปของลำดับเบส (deletion) และเป็นบริเวณที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งเมื่อนำไปแยกโดยใช้ agarose gel electrophoresis หรือ polyacrylamind gel electrophoresis ก็จะได้ขนาดหรือรูปแบบของชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ดังภาพที่ 1 ข้อดีของเครื่องหมายชนิดนี้คือ ส่วนใหญ่เป็นเครื่องหมายชนิด co-dominant มีความจำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งที่สนใจศึกษา ง่ายต่อการบันทึกผลและทำซ้ำยังคงให้ผลเหมือนเดิม สำหรับข้อจำกัดคือจะต้องมีข้อมูลลำดับเบสสำหรับหาตำแหน่งตัดของเอ็นไซม์จึงจะสามารถแยกโพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นจากประชากรที่ศึกษาได้ (Konieczny and Ausubel, 1993)

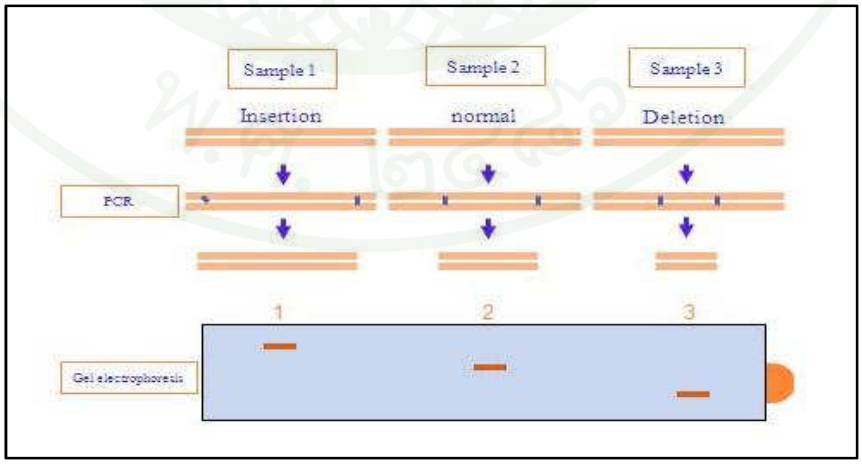


ภาพที่ 1 ภาพจำลองแสดง polymorphism ที่เกิดจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ CAPS

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เครื่องหมายดีเอ็นเอ InDel

InDel คือ การกลายที่เกิดจาก insertion หรือ deletion หรืออาจเกิดจากทั้ง insertion และ deletion รวมกันทำให้เกิด polymorphism ในระหว่างตัวอย่าง ซึ่งการกลายที่เกิดจาก Indel จะแตกต่างกันกับการกลายที่เกิดจาก point mutation โดยการกลายที่เกิดจาก Indel นั้นจะมีลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์จำนวนหนึ่งที่ถูกเพิ่มเข้ามาหรือขาดหายไปจากนิวคลีโอไทด์เดิม แต่การกลายที่เกิดจาก point mutation นั้นเกิดจากนิวคลีโอไทด์จำนวน 1 ตัวถูกแทนที่ด้วยนิวคลีโอไทด์ตัวอื่น การเกิด indel จะมีผลทำให้เกิดการเลื่อนตำแหน่งในการแปลรหัส (frameshift) และอาจเกิดเป็น stop codon ในเฟรมต่างๆ ดังนั้นโพลีมอร์ฟิซึม ที่เกิดจาก InDel สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ โดยการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยออกแบบไพรเมอร์ให้คร่อมลำดับของเบสที่เกิดการกลายนั้น โพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นนั้นเป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างจากการเพิ่มของตำแหน่งลำดับเบส (insertion) หรือการขาดหายไปของลำดับเบส (deletion) ซึ่งนำผลผลิตจากพีซีอาร์ไปแยกโดยใช้ agarose gel electrophoresis ก็จะได้ขนาดหรือรูปแบบของชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ดังภาพที่ 2 ข้อดีของเครื่องหมาย InDel นี้คือ เป็นเครื่องหมายชนิด co-dominant มีความจำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งที่สนใจศึกษา สะดวกต่อการทำการทดลอง ไม่ต้องทำการตัดด้วยเอ็นไซม์ สะดวกต่อการบันทึกผลและการทำซ้ำ สำหรับข้อจำกัดคือจะต้องมีข้อมูลลำดับเบสที่เกิดการกลายจากการเพิ่มของตำแหน่งลำดับเบส (insertion) หรือการขาดหายไปของลำดับเบส (deletion) เพื่อจะได้ออกแบบไพรเมอร์ให้คร่อมตำแหน่งที่เกิดการกลายนั้น



ภาพที่ 2 ภาพจำลองแสดง polymorphism ที่เกิดจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ InDel

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Marker-assisted selection (MAS)

ในปัจจุบันเทคนิคทางด้านเครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการทำแผนที่จีโนม และใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ (marker-assisted selection : MAS) เพื่อหาตำแหน่งของยีนที่อยู่ใกล้กับเครื่องหมายดีเอ็นเอนั้น เพื่อใช้ในการคัดเลือก (marker-assisted selection) และปรับปรุงพันธุ์ข้าว โดยวิธีการคัดเลือกแบบนี้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional breeding) โดยจะใช้ประโยชน์จากข้อมูลการวางตำแหน่งของยีนบนแผนที่จีโนมข้าว ซึ่งเป็นการหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอและลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจโดยใช้หลักการวิเคราะห์ตำแหน่งของยีนควบคุมลักษณะปริมาณ (QTL analysis) ทำให้ทราบถึงจำนวน ตำแหน่ง และผลกระทบของแต่ละยีนบนแผนที่จีโนม จากข้อมูลดังกล่าว เครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางบนตำแหน่งยีนโดยตรง หรือวางอยู่ใกล้ชิดกับบริเวณที่มียีนที่ต้องการ (tightly linked markers) จะนำมาใช้ประโยชน์ช่วยในการคัดเลือกต้นพืชที่มียีนดังกล่าว โดยไม่ต้องรอจนกว่าพืชจะเจริญเติบโตและแสดงลักษณะนั้นออกมา และเป็นการคัดเลือกโดยตรงที่จีโนไทป์ ดังนั้นสภาพแวดล้อมจึงไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออก เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถตรวจสอบได้ในทุกระยะเวลาของการเจริญเติบโต ทำให้ลดระยะเวลา ลดค่าใช้จ่ายสถานที่ รวมถึงผลของสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย (Mohan *et al*., 1997; Witcombe and Hash, 2000) ในปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการหายีนต้านทานโรค เช่น ใน ปี พ.ศ. 2553 อิงออน และคณะ ได้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* ในข้าวพื้นเมืองของไทย หรือใน ปี ค.ศ. 2003 Jeon และคณะ ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ AFLP ในการหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi5(t)* หรือการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอไปใช้ในการทำแผนที่โครโมโซม เช่น ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-1(t) Pik Pish Pif* และ *Pi18(t)* มีตำแหน่งอยู่ที่ส่วนปลายของโครโมโซมคู่ที่ 11 (Ahn *et al*., 2000; Sallaud *et al*., 2003) หรือการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอในการการหาตำแหน่งอย่างละเอียดของยีนบนแผนที่โครโมโซม เช่น การทดลองหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi20(t)* ในระยะแรกมีการใช้ RFLP marker ในการทำแผนที่ต่อมามีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR เนื่องจากมีความระเอียดมากขึ้นกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอเดิม หรือในการหายีนต้านทานโรคไหม้ *Piz* นี้ในช่วงแรกมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR ซึ่งถูกพัฒนาขึ้นโดย Conaway-Bormans และคณะในปี ค.ศ. 2003 ต่อมาได้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ AP5659-1 AP5659-3 และ AP5659-5 ที่มีตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจงกับปลายทั้งสองข้างของยีนต้านทานโรคไหม้ *Piz* ยิ่งขึ้น (Fjellstrom *et al*., 2006) และในปัจจุบันมีการค้นพบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งติดกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi* เช่น ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* และ *Pita* (Monna *et al*., 1997; Nakamura *et al*., 1997) จะเห็นได้ว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ สะดวกและรวดเร็วในการตรวจสอบคัดเลือกหายีนต้านทานโรคไหม้เพื่อเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวที่มีความสามารถต้านทานต่อโรคไหม้ได้ต่อไปในอนาคต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองส่วนที่ 1 การค้นหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ *Pid3 Pigm(t)* และ *Pi54* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

อุปกรณ์

ตัวอย่างข้าว

ตัวอย่างข้าวจำนวน 226 พันธุ์ (ตารางที่ 2) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. สุรีพร เกตุงาม หัวหน้าโครงการการค้นหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยโดยการใช้ดีเอ็นเอเทคโนโลยี ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โดยข้าวตัวอย่างทั้ง 226 พันธุ์ นี้ สามารถแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ตามแหล่งที่มาและประเภทของข้าว ได้แก่

1. ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 19 พันธุ์
2. ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 40 พันธุ์
3. ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 99 พันธุ์
4. ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 45 พันธุ์
5. ข้าวพันธุ์พันธุ์ส่งเสริมจำนวน 21 พันธุ์
6. ข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่ไม่มีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ (susceptible check variety) จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวนิปปอนบาร์เร่ย์ (NPB) ประเทศญี่ปุ่น และข้าวขาวดอกมะลิ 105

ตารางที่ 2 ตัวอย่างข้าวที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว
1	U 38	งอเพื่อน	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
2	U 39	ดยาหลี่	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
3	U 41	ปือก่อ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
4	U 42	ปือเกษตร	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว
5	U 43	เหนียวแสงมูเวอ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
6	U 44	กะเหรี่ยงขาว	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
7	U 45	เหลืองหอม	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
8	U 46	จะนอไหน	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
9	U 48	ลายซาน	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
10	U 49	ปิอิ แม่ละ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
11	U 50	ห้วยแล้ง	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
12	U 51	ปิอิ ซูแม่ฟาง	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
13	U 52	ข้าวกอแผ่	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
14	U 53	บือขอพอ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
15	U 55	เหลืองลีซอ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
16	U 56	ข้าวแดง (TRI 8409149)	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
17	U 57	ข้าวมันหมู	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
18	U 60	งอเซระ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
19	U 61	เหนียวกล่ำหอม แสงลีซอ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
20	S 71	หนานหนัก (Gs.no 10284)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
21	S 72	นางมา (Gs.no 7414)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
22	S 73	เหนียวนาคราช (Gs.no 9982)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
23	S 74	เหนียวหอม	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
24	S 75	แมะแยง (Gs.no 10060)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
25	S 76	ดอกพวง (Gs.no 10062)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
26	S 77	ขืนดิน (Gs.no 4290)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
27	S 78	ดอกพิกุล (Gs.no 9754)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
28	S 79	ค้ำฉาง (Gs.no 10243)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
29	S 80	สายบัว (Gs.no 10346)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
30	S 81	ซ่อนิมิต (Gs.no 10354)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว
31	S 82	ไร่ไทร (Gs.no 11185)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
32	S 83	เบาซะมวง (Gs.no 11211)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
33	S 84	ลูกขอ (Gs.no 11148)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
34	S 85	ซุกิกูลอง (Gs.no 12704)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
35	S 86	หลายอด (Gs.no 12716)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
36	S 87	ลาเก๊ะงอ (Gs.no 12717)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
37	S 88	นางทอง (Gs.no 12731)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
38	S 89	ลูกหวาย (จุด) (Gs.no 12736)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
39	S 90	ลูกดำ (Gs.no 12737)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
40	S 91	เชียงใหม่ (Gs.no 12739)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
41	S 92	ลูกแดง (Gs.no 12740)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
42	S 93	เล็บนกเบา (Gs.no 12743)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
43	S 94	ช่อ (Gs.no 12749)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
44	S 95	ช่อแดง (Gs.no 12751)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
45	S 96	กูนิง (Gs.no 12766)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
46	S 97	ดอกไม้ไทร (Gs.no 12777)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
47	S 98	รวงทอง (Gs.no 12779)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
48	S 99	ลูกปลา (Gs.no 12788)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
49	S 100	นางกลายแดง (Gs.no 12789)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
50	S 101	ลากอ (Gs.no 12790)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
51	S 102	กูนิง (Gs.no 12794)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
52	S 103	มือจระเข้ (Gs.no 12800)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
53	S 104	ตุลาถัว (Gs.no 12802)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
54	S 105	หอม (Gs.no 12817)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
55	S 106	กือแซะดำ (Gs.no 12821)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
56	S 107	ลือบูมาเซาะ (Gs.no 12826)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว
57	S 108	นางรอง (Gs.no 12836)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
58	S 109	อีกู้ 3 (Gs.no 12845)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
59	S 110	อามะ	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
60	L 1	เก้ารวง 17-2-106 (Gs.no 536)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
61	L 2	กู้เมือง (Gs.no 539)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
62	L 3	ขาวดอกมะลิ 41-1-173	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
63	L 4	ขาวตาแห้ง 55-5-55	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
64	L 5	ขาวใหญ่ 33-22-61	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
65	L 6	ขาวปากหม้อ 74 (Gs.no 548)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
66	L 7	หลุดหนี้ 75-3-2 (Gs.no 549)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
67	L 8	เม็ดใหญ่ 94-4-87 (Gs.no 550)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
68	L 9	ขาวพวง 74-3-38 (Gs.no 551)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
69	L 10	เจ้าหางหมูใหญ่ 32-27	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
70	L 11	เจ้าหางหมูใหญ่ 32-27	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
71	L 12	เจ้าหอม 32-18-69	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
72	L 13	ใบลด 36-10-90 (Gs.no 559)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
73	L 14	เจ้าเหลือง 27-3-19	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
74	L 15	เจ้าเหลือง 27-3-91	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
75	L 16	เจ้าแผ่ 31-28-1 (Gs.no 566)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
76	L 17	ดอกมะลิ 109-1-119	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
77	L 18	ใบลด 36-19-40 (Gs.no 572)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
78	L 19	ใบลด 36-27-29 (Gs.no 573)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
79	L 20	รวงเดียว 68-10-85	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
80	L 21	เหลืองใหญ่ (Gs.no 584)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
81	L 22	เหลืองเล็ก 30-1-57	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
82	L 23	เหลืองนูน 6-4-102	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว
83	L 24	บีเค 289 (Gs.no 591)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
84	L 25	บีเค 563 (Gs.no 592)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
85	L 26	ตี้ 569 (Gs.no 593)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
86	L 27	ขี้ตม 222-24-72 (Gs.no 595)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
87	L 28	ขี้ตมใหญ่ 35-16-45	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
88	L 29	ขี้ตมขาว 222-42-3	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
89	L 30	ขี้ตมขาว 222-42-5	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
90	L 31	งันดง 34-3-95 (Gs.no 599)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
91	L 32	ดอดอกพร้าว 48-3-123	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
92	L 33	ขี้ตมหอม (Gs.no 2720)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
93	L 34	เหนียวดำ (Gs.no 2723)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
94	L 35	ดอป้องแอ้ว (Gs.no 2725)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
95	L 36	ดอกดู่ (Gs.no 2872)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
96	L 37	ทอง (Gs.no 2942)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
97	L 38	มันเป็ด (Gs.no 2943)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
98	L 39	ขาว (Gs.no 3356)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
99	L 40	นางนวล (Gs.no 3357)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
100	L 41	ขาวกรุง (Gs.no 3358)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
101	L 42	เหนียวแดง (Gs.no 3360)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
102	L 43	ขาว (Gs.no 3361)	ข้านาสวนวพื้นเมืองภาคอีสาน
103	L 44	ดอขาว (Gs.no 3363)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
104	L 45	เหลืองบุญมา (Gs.no 3364)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
105	L 46	หมากแข็ง (Gs.no 3365)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
106	L 47	ขาวเศรษฐี	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
107	L 48	เหนียวนางนวล (Gs.no 3367)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
108	L 49	ดออ่าง (Gs.no 3368)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว
109	L 50	ข้าวก่ำ (Gs.no 3369)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
110	L 51	ป้องแอ้ว (Gs.no 3370)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
111	L 52	อีปง (Gs.no 3372)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
112	L 53	นางนวล (Gs.no 3373)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
113	L 54	แม่ห้าง (Gs.no 3374)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
114	L 55	พานทอง (Gs.no 3375)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
115	L 56	อีปี๊ด (Gs.no 3376)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
116	L 57	ดอสามเดือน (Gs.no 3377)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
117	L 58	ข้าวปน (Gs.no 3378)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
118	L 59	อีโตน (Gs.no 3379)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
119	L 60	นางนวล (Gs.no 3380)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
120	L 61	ดวงจันทร์ (Gs.no 3382)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
121	L 62	ปลาแข็ง (Gs.no 3384)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
122	L 63	เป็ดน้ำ (Gs.no 3385)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
123	L 64	พันธุ์หลัก (Gs.no 3386)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
124	L 65	ข้าวหาง (Gs.no 3387)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
125	L 66	สามเดือน (Gs.no 3892)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
126	L 67	ป้องแอ้ว 1(Gs.no 3893)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
127	L 68	ป้องแอ้ว 2 (Gs.no 3894)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
128	L 69	ป้องแอ้ว (Gs.no 3895)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
129	L 70	มะปราง (Gs.no 3897)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
130	L 71	นางคำผาย (Gs.no 4373)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
131	L 72	ขาวใหญ่ (Gs.no 4375)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
132	L 73	โอล่อน (Gs.no 4377)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
133	L 74	ข้าวหอม (Gs.no 4809)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
134	L 75	ข้าวหอม (Gs.no 4810)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว
135	L 76	ข้าวหอม (Gs.no 4814)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
136	L 77	ข้าวหอม (Gs.no 4815)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
137	L 78	ข้าวหอม (Gs.no 4816)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
138	L 79	ข้าวหอม (Gs.no 4817)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
139	L 80	ข้าวหอม (Gs.no 4818)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
140	L 81	ข้าวหอม (Gs.no 4829)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
141	L 82	ข้าวหอม (Gs.no 4831)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
142	L 83	ข้าวหอม (Gs.no 4832)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
143	L 84	ข้าวหอม (Gs.no 4833)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
144	L 85	ข้าวหอม (Gs.no 4834)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
145	L 86	ข้าวหอม (Gs.no 4835)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
146	L 87	ข้าวหอม (Gs.no 4869)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
147	L 88	ข้าวหอม (Gs.no 4870)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
148	L 89	กะทิ (Gs.no 5565)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
149	L 90	ข้าวดอ (Gs.no 5566)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
150	L 91	ดอเหลือง (GS.no 5567)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
151	L 92	เจ้าขาว (Gs.no 5572)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
152	L 93	ขาวใหญ่ (Gs.no 5573)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
153	L 94	เหลือง (Gs.no 13232)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
154	L 95	กระดูกเสือ (Gs.no 13233)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
155	L 96	หอมมะลิ (Gs.no 18418)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
156	L 97	หอมมะลิ (Gs.no 18419)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
157	L 98	หอมมะลิ (Gs.no 18420)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
158	L 99	หอมมะลิ (Gs.no 19398)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
159	E 100	พวงทอง	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
160	E 101	พวงมาลัย 31-5-6	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว
161	E 102	พวงมาลัย 35-10-8	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
162	E 103	โพธิฉลอง 31-34-20	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
163	E 104	จำปาจีน 84-8-16	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
164	E 105	จำปาจีน 84-8-22	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
165	E 106	สว่างอารมณ์ 84-4-118	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
166	E 107	ข้าวเบาที่หนึ่ง 95-1-180	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
167	E 108	ไข่แมงดา 59-2-73	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
168	E 109	ลอยใหญ่ 62-40-140	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
169	E 110	เม็ดเล็กหนัก	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
170	E 111	พญาชม	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
171	E 112	เขียว	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
172	E 113	ขาวปราจีน	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
173	E 114	เจ๊กกระโดด	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
174	E 115	รวงเดียว	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
175	E 116	เจ้าลอย	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
176	E 117	เหลืองกล้วย	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
177	E 118	คุณแม่	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
178	E 119	ขาวยายคลี่	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
179	E 120	ขาวเสมอ	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
180	E 121	เหลืองพวงทอง	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
181	E 122	เหลืองอนันต์	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
182	E 123	ขาวลี้	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
183	E 124	ขาวตาหยัด	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
184	E125	นางเขียว	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
185	E 126	ลอยสายบัว	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
186	E 127	นางเขียว	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว
187	E 128	นางเขียว	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
188	E 129	เกวียนหัก	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
189	E 130	ขาวโพธิ์	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
190	E 131	สามพราน	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
191	E 132	เหนียวบายสี	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
192	E 133	เหลืองบังใบ	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
193	E 134	ขาวนครไชยศรี	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
194	E 135	เจ้าลอย	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
195	E 136	ข้าวลอย	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
196	E 137	ทานตะวัน	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
197	E 138	ขาวเศรษฐี	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
198	E 139	สามรวง	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
199	E 140	หอมทุ่ง	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
200	E 141	หอมทุ่ง	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
201	E 142	ไอ้โหม่ง	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
202	E 143	พวงหนัก	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
203	E 144	พวงเงิน	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
204	R 1	สุพรรณบุรี 60	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม กรมการข้าว
205	R 2	ชัยนาท 1	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม กรมการข้าว
206	R 3	สุพรรณบุรี 1	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม กรมการข้าว
207	R 4	สันป่าตอง 1	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม กรมการข้าว
208	R 5	ปทุมธานี 1	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม กรมการข้าว
209	R 6	เหนียวอุบล 2	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม กรมการข้าว
210	R 7	กข 10	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม กรมการข้าว
211	R 8	กข 33	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม กรมการข้าว
212	R 9	ปราจีนบุรี 2	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม กรมการข้าว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว
213	R 10	C101A51	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์
214	R 12	C101PKT	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์
215	R 13	C102PKT	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์
216	R 14	C104PKT	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์
217	R 15	C101TTP	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์
218	R 16	C101TTP	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์
219	R 17	C105TTP 4-1-23	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์
220	R 18	CO39	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์
221	R 19	AZUCENA	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์
222	R 20	IR64	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์
223	R 21	CT9933	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์
224	R 22	JHN	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม RGDU ไทย
225	C 1	KDML 105	กรมการข้าว
226	C 2	NPB	ญี่ปุ่น

เครื่องมือสำหรับการทดลอง

1. โกร่งบดตัวอย่าง
2. เครื่องแก้ว เช่น กระบอกตวง และบีกเกอร์ ฟลาสต์ขนาดต่างๆ เป็นต้น
3. หลอดพลาสติก (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และหลอดใส่สารขนาด 15 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตร
4. หลอดสำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR tube) ขนาด 200 ไมโครลิตร
5. ไมโครปิเปตต์ชนิดปรับปริมาตรได้ บริษัท Biohit, Finland พร้อม Tip ขนาด 10 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
6. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น ScoutPro บริษัท Ohaus, USA
7. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) บริษัท Gibthai

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. ตู้อบปรับอุณหภูมิได้ (hotbox oven) บริษัท ไทยโพลี่เมดิค จำกัด

9. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น ZHYW บริษัท Lio lab International

10. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (refrigerated centrifuge) รุ่น 3K20 บริษัท Sigma

11. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (microcentrifuge) รุ่นSX5204-532 บริษัท Daihan Sciencetific, Korea

12. เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR) รุ่น GenePro บริษัท Bioer, China

13. ชุดเครื่องมือ agarose gel electrophoresis รุ่น EP-150 บริษัท Gibthai

14. เครื่องฉายแสง ultraviolet และเครื่องภาพถ่าย (gel documentation) รุ่น Benchtop. บริษัท Major Science, Taiwan

15. hotplate รุ่น MP-3000 บริษัท OSKON

16. dry bath incubator รุ่น MD-01N บริษัท Major Science, Taiwan

17. vortex รุ่น G-560E บริษัท Lio lab

18. หม้อนึ่งความดันสูง (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tommy Seiko, Japan

19. ตู้เย็น รุ่น Hybrid cooling system ของบริษัท Sharp

20. ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส รุ่น Deep freezer ของบริษัท Haier

21. ตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส รุ่น 8558 S/N 86939-206 Bio-freezer บริษัท Forma, USA

22. เครื่องคอมพิวเตอร์ Dell ที่เชื่อมต่อกับอินเตอร์เน็ท

23. เครื่องพริ้นต์เอกสาร Brother

24. อุปกรณ์อื่นๆ เช่น กระดาษชั่งสาร กระดาษติดป้าย ช้อนตักสาร ปากกาเคมี ปากคีบ ถุงมือ ถุงพลาสติกใส แผ่นพลาสติกใส แผ่นอลูมิเนียมฟอยด์ ถาดพลาสติก หนังยาง เป็นต้น

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

1. ไนโตรเจนเหลว

2. 2X CTAB buffer [2% CTAB (cethyl trimethyl ammonium bromide), 1.5 M Tris-HCl pH 8.0, 30 mM EDTA (ethylenediamine tetraacetate) pH 8.0, 2.1 M NaCl]

3. β-mercaptoethanol

4. 10X CTAB buffer (10% CTAB, 0.7 M NaCl)

5. chloroform : isoamylalcohol (24 : 1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. TE buffer (10 : 0.1 = 10 mM Tris : 0.1 mM EDTA)
7. ethanol 70% และ 95 %
8. RNase

สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการ agarose gel electrophoresis

1. agarose บริษัท Vivantis, USA
2. 0.5X TBE buffer (Tris-borate EDTA pH 8.0)
3. bromophenol blue
4. xylene cyanol
5. แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler^{TM} 1 Kb DNA บริษัท Fermentas, USA
6. แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler^{TM} DNA ladder mix บริษัท Fermentas, USA

สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์

1. 10X PCR buffer
2. 10X $MgCl_2$
3. 25mM dNTP
4. เอนไซม์ i-*Taq* DNA polymerase บริษัท Intron biotechnology
5. primers บริษัท Pacific science
6. ultra pure water บริษัท Invitrogen

เอนไซม์ตัดจำเพาะ

1. *Bam*HI บริษัท Roche, Germany
2. *Eco*RI บริษัท Roche, Germany

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

การสกัดดีเอ็นเอ

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ข้าวพันธุ์พื้นเมือง ทั้งหมด 226 พันธุ์ (ตารางที่ 2) จากพื้นที่ต่างๆ ของภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ของประเทศไทย โดยแบ่งเป็น ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือจำนวน 19 พันธุ์ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 40 พันธุ์ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 99 พันธุ์ ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 45 พันธุ์ ข้าวพันธุ์ส่งเสริมจำนวน 21 พันธุ์ และข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่ไม่มีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ (susceptible check variety) จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ นิปปอนบาเร่ย์ และข้าวขาวดอกมะลิ 105 นำตัวอย่างใบของตัวอย่างข้าวดังกล่าวมาสกัดดีเอ็นเอ (total genomic DNA) (Murray and Thompson, 1980; Doyle and Doyle, 1990; Lodhi *et al*, 1994) โดยใช้วิธี CTAB ของ Lodhi และคณะ (1994) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. นำตัวอย่างใบข้าวสดมา 0.3-0.5 กรัม บดให้ละเอียดในโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลว
2. ตักตัวอย่างข้าวใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 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 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาเบาๆ เป็นครั้งคราว
3. นำหลอดทดลองมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24 : 1) ปริมาตร 840 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
5. ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดทดลองใหม่ เติม สารละลายไอโซโพรพานอลเย็น ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายที่ดูดได้ ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
6. นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และ เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้
7. ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยเอธิลแอลกอฮอล์เย็น 95% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ครั้งที่สอง ด้วย เอธิลแอลกอฮอล์เย็น 70 % ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

9. นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

10. เทส่วนใสทิ้ง และตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

11. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

12. เมื่อดีเอ็นเอละลายหมดแล้ว กำจัดอาร์เอ็นเอโดยการเติม RNase A (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบคุณภาพ ของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

1. ละลายผงวุ้น agarose ในบัปเฟอร์ 0.5X TBE แล้วนำไปหลอมในตู้ไมโครเวฟเป็นเวลาประมาณ 2 นาที จนวุ้นหลอมเหลวเป็นเนื้อเดียวกัน

2. รอให้วุ้นเย็นลงประมาณอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทลงในถาดที่วางซี่หวี (comb) เพื่อทำให้เกิดช่องสำหรับเติมตัวอย่าง ทิ้งไว้ประมาณประมาณ 30 นาที เพื่อ รอวุ้นแข็งตัว

3. ดึงซี่หวีออก วางถาดเจลลงในแท๊งค์ที่มีบัปเฟอร์ 0.5X TBE

4. เตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร สี 4X loading dye ปริมาตร 1ไมโครลิตร และบัปเฟอร์ 0.5X TBE ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบนแผ่นพาราฟิล์ม

5. ดูดตัวอย่างทั้งหมด แล้วหยดลงในช่องที่เตรียมไว้ ปิดฝาแท๊งค์แล้วต่อสายไฟ โดยให้ด้านของตัวอย่างอยู่ด้านขั้วลบ

6. เมื่อครบกำหนดเวลา ให้นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ (0.5ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ประมาณ 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำประปา 10 นาที

7. นำแผ่นเจลไปดูผลใต้แสงอุลตราไวโอเลต จะเห็นแถบดีเอ็นเอ เรืองแสงอุลตราไวโอเลต

8. บันทึกภาพ อ่านค่าความเข้มข้นโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน เพื่อตรวจสอบ คุณภาพ ขนาด และปริมาณของดีเอ็นเออย่างคร่าวๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจสอบดีเอ็นเอเชิงปริมาณและคุณภาพโดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมีเตอร์

1. เมื่อสกัดดีเอ็นเอได้แล้วก็จะนำมาตรวจสอบเชิงปริมาณและคุณภาพโดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมีเตอร์

2. นำสารละลายดีเอ็นเอ 6 ไมโครลิตร มาเจือจางในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 294 ไมโครลิตรและใช้น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นมาตรฐาน (blank)

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

4. นำผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอจากสูตร ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = A_{260}× 50 × dilution factor

5. การตรวจสอบคุณภาพ ดูได้จากอัตราส่วนของ A_{260}/A_{280} ดีเอ็นเอคุณภาพดีจะมีค่า อยู่ระหว่าง 1.7-1.8 ถ้าได้ค่าน้อยกว่า 1.7 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอและถ้ามีค่ามากกว่า 1.8 แสดงว่าในสารละลายดีเอ็นเอมีอาร์เอ็นเอปนเปื้อน

สืบค้นและตรวจสอบข้อมูลของไพรเมอร์ที่ควบคุมลักษณะการต้านทานโรคไหม้

สืบค้นและตรวจสอบข้อมูลไพรเมอร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งใกล้กับยีนควบคุมลักษณะการต้านทานเชื้อราโรคไหม้ในข้าว โดยเฉพาะเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ประเภท gene specific marker เพราะมีความจำเพาะเจาะจงกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่ศึกษา (ตารางที่ 3)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ในของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย

ยีนต้านทานโรคไหม้	เครื่องหมายดีเอ็นเอ	ชนิดของเครื่องหมายดีเอ็นเอ	ระยะห่างจากยีน (cM)	ลำดับของไพรเมอร์	เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ	เอกสาร อ้างอิง
Pid3	Pid3-dCAPS-2	CAPS	0	F 5'-TACTACTCATGGAAGCTAGTTCTC-3' R 5'-AGCACTTCTTGACTACTGTCTGCCT-3'	*Bam*HI	Shang *et al*., 2009
Pigm(t)	C5483	CAPS	0	F5'-TTAGGCTGCTTGTCTTGGG-3' R5'-GGGAGGAGGAATGGTAGGAA-3'	*Eco*RI	Deng *et al*., 2006
Pigm(t)	S29742	InDels	0	F5'-CAGTGAAACGAACGCTATG-3' R5'-AATAGGAAGGGTTGATGTTG-3'	-	Deng *et al*., 2006
Pi54	Pi54 MAS	InDels	0	F5'-CAATATCCAAAGTTTTCAGG-3' R5'-GCTTCAATCACTGCTAGAACC-3'	-	Ramkumar *et al*., 2010

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* มีตำแหน่งบนโครโมโซมคู่ที่ 6 โดยแอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทานเกิดจากการกลายแบบ nonsense mutation ที่ตำแหน่งลำดับเบสที่ 2,208 จากตำแหน่งเริ่มต้นของการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้สังเคราะห์ได้โปรตีนที่มีขนาดสั้นลง จึงสูญเสียความสามารถในการแสดงออกแบบต้านทานต่อโรคไหม้ เป็นเหตุให้ข้าวอินดิกาและข้าวจาปอนิกามีความต้านทานต่อโรคไหม้ได้แตกต่างกัน ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* มีความสามารถในการต้านทานโรคไหม้แบบ broad-spectrum resistance (Shang *et al*., 2009) การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* โดยการนำดีเอ็นเอตัวอย่างไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS2 ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* (Shang *et al*., 2009) (ตารางที่ 3) โดยใช้สารต่างๆ ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังตารางที่ 4 และใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามด้วย 35 รอบ ของ denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่ 52 อุณหภูมิองศาเซลเซียส นาน 30 วินาทีและ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

ตารางที่ 4 รายการและปริมาณสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3*

สารเคมี	ปริมาตร(μL)	ความเข้มข้นสุดท้าย
ultra pure water	13.8	-
10X PCR buffer	2.0	1X
dNTPs (2.0 mM)	1.0	0.1 mM
forward primer (5 μM)	1.0	0.25 μM
reverse primer (5 μM)	1.0	0.25 μM
Taq DNA polymerase (5U/μL)	0.2	1 unit
DNA (100 ng/μL)	1.0	100 ng/20 μL
รวม	20	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หลังจากนั้นนำ PCR product ไปทำการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI โดยการนำส่วนผสมของสารต่างๆ ดังตารางที่ 5 มาผสมเข้าด้วยกัน แล้วบ่มทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะทำงาน หลังจากนั้นทำการ Inactivate เอ็นไซม์ ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ตารางที่ 5 รายการและปริมาณสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะด้วยเอ็นไซม์ *Bam*HI สำหรับการตราจหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3*

สารที่ใช้	ปริมาตร(µL)	ความเข้มข้นสุดท้าย
ultra pure water	3.0	-
10X buffer	1.5	1X
DNA (PCR product)	10.0	1 µg
*Bam*HI enzyme (10 U/µL)	0.5	5 U
รวม	15	

การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ทำได้โดยการนำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์และตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI แล้วมาตรวจสอบโดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 150 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด เป็นเวลา 5 นาที ดูผลภายใต้แสง UV บันทึกผลที่ได้ ทำการทดลองซ้ำสองครั้งเพื่อความแม่นยำ

การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 และ C0428 และระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ C26348 และ S47656 และยังมีตำแหน่งใกล้กับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9*/*Pi2 Pi26(t) Pi25(t)* (Liu *et al*., 2002; Wu *et al*., 2005) เป็น tightly linked กันกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2* และ *Pi9* และอาจเป็น allelic กับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi26(t)* (Deng *et al*., 2006) ต่อมา ในปี ค.ศ. 2006 Deng และคณะได้พัฒนา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เครื่องหมายดีเอ็นเอ CAPS และ InDels ที่มีความจำเพาะกับยีนมากขึ้น การตรวจหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* โดยการนำดีเอ็นตัวอย่างไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 และ S29742 ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* (Deng *et al.*, 2006) (ตารางที่ 3) โดยใช้สารต่างๆ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังตารางที่ 6 และใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสนาน 4 นาที ตามด้วย 35 รอบ ของ denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

ตารางที่ 6 รายการและปริมาณสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)*

สารเคมี	ปริมาตร (µL)	ความเข้มข้นสุดท้าย
ultra pure water	13.8	-
10X PCR buffer	2.0	1X
dNTPs (2.0 mM)	1.0	0.1 mM
forward primer (5 µM)	1.0	0.25 µM
reverse primer (5 µM)	1.0	0.25 µM
Taq DNA polymerase(5U/µL)	0.2	1 unit
DNA (100 ng/µL)	1.0	100 ng/20 µL
รวม	20.0	

สำหรับการตรวจหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS นั้น มีวิธีการคือ หลังจากได้ PCR product แล้วจึงทำการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI โดยนำส่วนผสมของสารต่างๆ ดังตารางที่ 7 มาผสมเข้าด้วยกัน แล้วบ่มทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำการ Inactivate เอ็นไซม์ ที่ 65 เซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 รายการและปริมาณสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาตัดจำเพาะด้วยเอ็นไซม์ *Eco*RI สำหรับการตราจหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)*

สารที่ใช้	ปริมาตร (µL)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Ultra pure water	3.0	-
10X buffer	1.5	1X
DNA (PCR product)	10.0	1 µg
*Eco*RI enzyme(10 U/µL)	0.5	5 U
รวม	15	

การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ทำได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยนำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ของการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด InDel มาตรวจสอบปริมาณและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 150 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 45 นาที สำหรับดีเอ็นเอตัวอย่างที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ของการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS นั้นหลังจากย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI แล้วมาตรวจสอบปริมาณและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 150 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดเป็นเวลา 5 นาที ดูผลภายใต้แสง UV บันทึกผลที่ได้ ทำการทดลองซ้ำสองครั้งเพื่อความแม่นยำ

การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* มีตำแหน่งอยู่บริเวณทีโลเมียบนแขนข้างยาวของโครโมโซมข้าวคู่ที่ 11 มีความยาว 1.5 Kb เป็นยีนเด่น พบครั้งแรกในข้าวอินดิกา สายพันธุ์ Tetep (Kiyosawa and Murty, 1969) ต่อมาพบในข้าวหลายสายพันธุ์ เช่น ข้าวสายพันธุ์ Charnak ของอินเดีย ข้าวสายพันธุ์ Tadukan ของฟิลิปปินส์ ข้าวสายพันธุ์ Roshia 33 ของรัสเซีย ข้าวสายพันธุ์ Dawn ของอเมริกา (Kiyosawa, 1981) และข้าวสายพันธุ์ Fuji120 สายพันธุ์ Mutsunishiki และสายพันธุ์ Chugoku 31 ของญี่ปุ่น (Kiyosawa, 1978) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* นี้เป็น single dominant

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

gene ที่มีโครงสร้างของยีนแบบ NBS–LRR (Sharma *et al.,* 2005) การหาตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ในครั้งแรกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RAPD S129700 ทำให้ทราบว่ายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* อยู่บนตำแหน่งแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 11 (Sharma *et al*. 2003, 2005) และต่อมาพบว่ามีตำแหน่งอยู่ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ S129700 และ RM 206 เป็นระยะทาง 4.5 and 0.7 cM และห่างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ TRS26 และTRS33 เป็นระยะทาง 0.7 and 0.5 cM, (Sharma *et al*., 2005) ต่อมาพบว่ามีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 144 คู่เบส ที่เกิดจากการขาดหายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วน exon ทำให้เกิด polymorphism ระหว่างแอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานและอัลลีลแบบไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ (Sharma *et al*., 2005) จึงได้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54 MAS ที่เฉพาะเจาะจงกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ขึ้น (Ramkumar *et al*., 2011) (ตารางที่ 3) โดยใช้สารต่างๆ ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังตารางที่ 8 และใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ตามด้วย 35 รอบ ของ denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที

ตารางที่ 8 องค์ประกอบและปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับตรวจสอบหายีนต้านทาน *Pi54*

สารเคมี	ปริมาตร (µL)	ความเข้มข้นสุดท้าย
ultra pure water	13.8	-
10X PCR buffer	2.0	1X
dNTPs (2.0 mM)	1.0	0.1 mM
forward primer (5 µM)	1.0	0.25 µM
reverse primer (5 µM)	1.0	0.25 µM
Taq DNA polymerase (5U/µL)	0.2	1 unit
DNA (100 ng/µL)	1.0	100 ng/20µL
รวม	20.0	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยนำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์มาตรวจสอบปริมาณและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 150 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 45 นาที แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด เป็นเวลา 5 นาที ดูผลภายใต้แสง UV บันทึกผลที่ได้ ทำการทดลองซ้ำสองครั้งเพื่อความแม่นยำ

การวิเคราะห์หาลำดับเบสของดีเอ็นเอ ทำโดยการส่งตัวอย่างผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3 Pigm(t)* และ *Pi54* ทั้งแอลลีลที่ต้านทานโรคไหม้และแอลลีลที่ไม่ต้านทานโรคไหม้ เพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี โดยใช้ไพรเมอร์ในตารางที่ 3 แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปทำการ alignment กับฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม Nucleotide-nucleotide blast (blastn)

การทดลองส่วนที่สอง การศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองต่อโรคไหม้ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองและข้าวพันธุ์ส่งเสริม ต่อเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทย จำนวน 20 ไอโซเลท

ตัวอย่างข้าวที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างข้าวที่ใช้ในการตรวจสอบปฏิกิริยาการตอบสนองต่อเชื้อราโรคไหม้ จำนวน 30 พันธุ์ (ตารางที่ 9 และภาพที่ 3) โดยแบ่งเป็นข้าวพื้นเมืองจำนวน 27 พันธุ์ ข้าวพันธุ์ส่งเสริมจำนวน 2 พันธุ์ และข้าวพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่ไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ (susceptible check variety) คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) โดยข้าวตัวอย่างทั้ง 29 พันธุ์ คือข้าวพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 27 พันธุ์ และข้าวพันธุ์ส่งเสริมจำนวน 2 พันธุ์ดังกล่าวนี้ มีรายงานจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีพร เกตุงาม หัวหน้าโครงการการค้นหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยโดยการใช้ดีเอ็นเอเทคโนโลยี ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ว่ามียีนควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคไหม้ในหลายตำแหน่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 รายชื่อพันธุ์ข้าวตัวอย่างที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาการตอบสนองต่อเชื้อราโรคไหม้

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา
1	งอเพื่อน	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
2	ปือก่อ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
3	ปือเกษตร	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
4	เหนียวแสงมูเวอ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
5	กะเหรี่ยงขาว	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
6	เหลืองหอม	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
7	จะนอไหน	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
8	ลายซาน	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
9	ห้วยแล้ง	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
10	ปิอิ ซูแม่ฟาง	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
11	ข้าวกอแผ่	ข้าวไร่นาพื้นเมืองภาคเหนือ
12	เหลืองลีซอ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
13	ข้าวแดง (TRI 8409149)	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
14	ข้าวมันหมู	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
15	งอเซระ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ
16	หมานหนัก	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
17	นางมา	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
18	เหนียวนาคราช	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
19	เหนียวหอม	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
20	แมะแยง	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
21	ดอกพวง	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
22	ขืนดิน	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้
23	แม่ห้าง	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
24	พานทอง	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
25	อีปี๊ด	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา
26	ป้องแอ้ว 2	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน
27	หอมทุ่ง 20990	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน
28	ชัยนาท 1	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม กรมการข้าว
29	IR64	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์
30	KDML 105	กรมการข้าว

ภาพที่ 3 พันธุ์ข้าวตัวอย่างที่ใช้สำหรับทดสอบฟีโนไทป์

ตัวอย่างเชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ *Magnaporthe grisea* ที่ใช้สำหรับตรวจสอบปฏิกิริยาการตอบสนองต่อเชื้อราโรคไหม้ได้รับการอนุเคราะห์เชื้อราโรคไหม้ จำนวน 20 ไอโซเลท (ตารางที่ 10) จาก ดร.ธานี ศรีวงศ์ชัย ภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาเกษตรศาสตร์ บางเขน ซึ่งเป็นไอโซเลทที่มี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความรุนแรงและก่อให้เกิดโรคไหม้ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ของประเทศไทย โดยเชื้อราโรคไหม้ที่ใช้นี้แบ่งเป็นเชื้อที่เก็บรวบรวมมาในปี พ.ศ. 2547 และ 2554

ตารางที่ 10 ไอโซแลทของเชื้อราโรคไหม้ *M. grisea* เก็บรวบรวมเมื่อปี พ.ศ. 2547 และ 2554 ที่ใช้ศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองต่อโรคไหม้

ลำดับที่	รหัส	แหล่งที่มา	ปี พ.ศ ที่เก็บตัวอย่าง
1	10301	จ. ศรีษะเกศ	2547
2	10551	จ. นครราชสีมา	2547
3	10576	จ. กาฬสิน	2547
4	10760	จ. กาฬสินธุ์	2547
5	10927	จ. พะเยา	2547
6	10941	จ. ลำปาง	2547
7	10945	จ. เชียงใหม่	2547
8	10971	จ. น่าน	2547
9	10993	จ. บุรีรัมย์	2547
10	11108	จ. อุบลราชธานี	2547
11	3.2	จ.พิษณุโลก	2554
12	5.1	จ.ขอนแก่น	2554
13	8.4	จ.อุบลราชธานี	2554
14	9.4	จ.เชียงราย	2554
15	12.5	จ.หนองคาย	2554
16	14.3	จ.หนองคาย	2554
17	16.2	จ.อุดรธานี	2554
18	22.1	จ.อุดรธานี	2554
19	17.2	จ.ชัยภูมิ	2554
20	29.2	จ.อุดรธานี	2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

การเตรียมตัวอย่างข้าว

ข้าวที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้มีจำนวน 30 สายพันธุ์ (ตารางที่ 9) โดยนำเมล็ดข้าวที่ต้องการทดสอบมาเพาะในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่รองด้วยกระดาษชำระ (ภาพที่ 4) เป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ หลังจากนั้นก็ย้ายปลูกลงดิน โดยปลูกในถาดหลุมพลาสติกขนาด 5× 5 เซนติเมตร โดยปลูกหนึ่งหลุมต่อหนึ่งสายพันธุ์ แต่ละหลุมปลูกเรียงกัน 4 ต้น (ภาพที่ 5) แต่ละตัวอย่างทำการปลูก 3 ซ้ำ โดยปลูกเป็นเวลา 3 สัปดาห์ สถานที่ปลูกคือ โรงเรือนของภาควิชาพันธุศาสตร์ ชั้น 6 ตึกจุลชีวะ – พันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

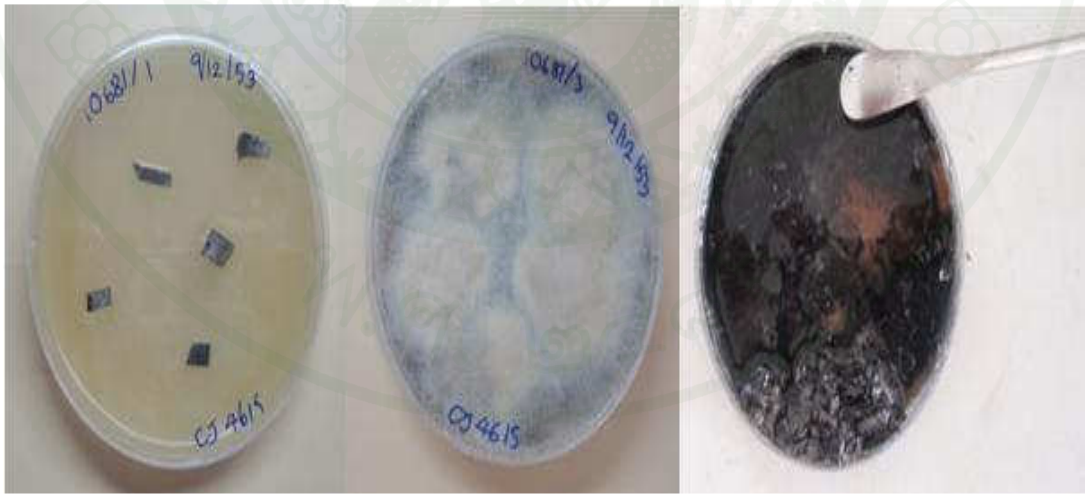
ภาพที่ 4 แสดงการเพาะเมล็ดข้าวในจานเลี้ยงเชื้อ

ภาพที่ 5 ต้นกล้าข้าวขณะแรกย้ายลงดิน (ซ้าย) และย้ายลงดินเป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ขวา)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเตรียมตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้

นำตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ (ตารางที่ 10) ที่ได้มาในรูปของกระดาษกรองวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำจากแป้งข้าว (Rice Flour Agar (RFA); แป้งข้าว 2.0%, agar 2.0% และผงสกัดยีสต์ 0.2%) ในจานเลี้ยงเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อให้เชื้อราเริ่มสร้างเส้นใย จากนั้นเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสปอร์ โดยการถูผิวหน้าอาหาร (scraping) ด้วยแท่งแก้วเบาๆ ให้เส้นใยของเชื้อราขาด แล้วนำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิห้อง โดยให้แสงฟลูออเรสเซนต์เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นให้ทำการเก็บเชื้อ โดยเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อราแต่ละจาน แล้วใช้ spreader ขูดที่ผิวหน้าของจานอาหารเลี้ยงเชื้อราเบาๆ เพื่อเก็บเกี่ยวสปอร์ของเชื้อรามาใช้ในการทดลอง (ภาพที่ 6) จากนั้นนำสารละลายสปอร์ของเชื้อราที่เก็บได้มาผ่านผ้ากรองเพื่อกำจัดเศษอาหารวุ้นและเศษเส้นใยของเชื้อราที่ไม่ต้องการออก ปริมาณสปอร์ของเชื้อราจะถูกนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วย heamacytometer และปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 5×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นผสมเจลลาติน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และสารลดแรงตึงผิว (Roumen *et al*., 1997) แล้วนำไปทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 6 การเลี้ยงเชื้อราเพื่อเก็บเกี่ยวสปอร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การปลูกเชื้อราโดยวิธี Spraying method

นำสารละลายสปอร์ของเชื้อราโรคไหม้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วที่ติดกับเครื่องปั๊มลม (ภาพที่ 7) แล้วฉีดพ่นให้ทั่วต้นกล้าข้าวอายุ 21 วัน ที่บรรจุในกล่องพลาสติกขนาดใหญ่และมีน้ำภายในเพื่อให้มีความชื้นร้อยละ 25-100 หลังจากนั้นทำการปิดฝากล่อง แล้วนำไปเก็บไว้ในห้องมืด ที่อุณหภูมิ 25 องศาซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้มีสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเข้าทำลายต้นข้าวของสปอร์เชื้อรา แล้วย้ายไปเลี้ยงในโรงเรือนเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (Shang *et al*., 2009)

ภาพที่ 7 เครื่องปั๊มลม ที่ใช้ในการฉีดพ่นสปอร์ของเชื้อราโรคไหม้

ภาพที่ 8 การพ่นสารละลายสปอร์เชื้อราโรคไหม้ลงบนต้นกล้าข้าวที่มีอายุ 3 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจวัดปริมาณการเกิดโรคไหม้ในข้าว

การวัดความรุนแรงของโรคไหม้ในข้าวจะทำการประเมินผล 7 วัน หลังจากผ่านการฉีดด้วยสปอร์ของเชื้อรา เกณฑ์การวัดระดับความรุนแรงของโรคใช้การแยกลักษณะของแผลเป็น 6 ระดับ โดยความรุนแรงที่ระดับ 0-2 แสดงว่าข้าวมีความต้านทานต่อโรคได้ดี (resistance) ความรุนแรงที่ระดับ 3-4 แสดงว่าข้าวมีความต้านทานต่อโรคระดับปานกลาง (moderate resistance) และความรุนแรกที่ระดับ 5-6 แสดงว่าข้าวไม่มีความต้านทานต่อโรค (susceptible) (Roumen *et al.*, 1997) (ภาพที่ 9 และตารางที่ 11)

ภาพที่ 9 เกณฑ์การวัดระดับความรุนแรงของโรคไหม้ 6 ระดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 11 การตรวจวัดระดับความรุนแรงของการเกิดโรคไหม้ในข้าว

ระดับความรุนแรง	ลักษณะของแผลบนใบข้าว	การประเมินความรุนแรง
0	ไม่มีการเข้าทำลายด้วยเชื้อราโรคไหม้	
1	จุดสีน้ำตาลขนาดเล็กกว่า 0.5 มิลลิเมตรไม่มีการสร้างสปอร์	ต้านทานต่อโรค
2	จุดสีน้ำตาลขนาด 0.5 – 1.0 มิลลิเมตร ไม่มีการสร้างสปอร์	
3	แผลรูปร่างกลมถึงเรียวยาวขนาด 1.0-3.0 มิลลิเมตร มีสีเทาตรงกลาง และมีสีน้ำตาลตามขอบ ไม่มีการสร้างสปอร์	ต้านทานต่อ
4	มีแผลเป็นรูปกระสวยที่สามารถสร้างสปอร์ได้ ขนาดตั้งแต่ 3.0 มิลลิเมตร ขึ้นไป แผลมีสีเทาตรงกลางและสีน้ำตาลแดงโดยรอบ	โรคระดับปานกลาง
5	มีแผลเหมือนระดับ 4 แต่มีขนาดของแผลกว้างขึ้น	ไม่ต้านทานต่อโรค
6	ขนาดของแผลแต่ละแผลลุกลามติดต่อถึงกัน	

ที่มา: Roumen *et al*., 1997

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

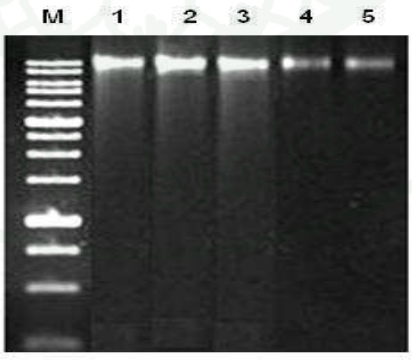
ผลและวิจารณ์

ผลการทดลองส่วนที่ 1

การค้นหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ *Pid3 Pigm(t)* และ *Pi54* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยและข้าวพันธุ์ส่งเสริมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอ

ผลจากการสกัด DNA จากการนำตัวอย่างของใบข้าวสด 0.3-0.5 กรัม 1-2 กรัม มาสกัดด้วยวิธี CTAB extraction procedure ตามวิธีของ Lodhi และคณะ (1994) แล้วตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิคดีเอ็นเอ โดยวิธี agarose gel eletrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ agarose 1% และใช้กำลังไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลล์ เป็นเวลา 20 นาที พบว่า DNA ที่สกัดได้มีความบริสุทธิ มีคุณภาพดี และมีปริมาณเหมาะสมที่จำนำไปทำการทดลองต่อไป (ภาพที่ 10) หลังจากนั้นนำจีโนมิค ดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเป็คโทรมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และที่ 280 นาโนเมตร พบว่าปริมาณจีโนมิคดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณสูง อัตราส่วนระหว่าง ค่า OD ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อที่ 280 นาโนเมตร แสดงถึงความบริสุทธิ์ของจีโนมิคดีเอ็นเอ ซึ่งอัตราส่วนของค่า A_{260}/A_{280} มีค่าประมาณ 1.6 -1.9



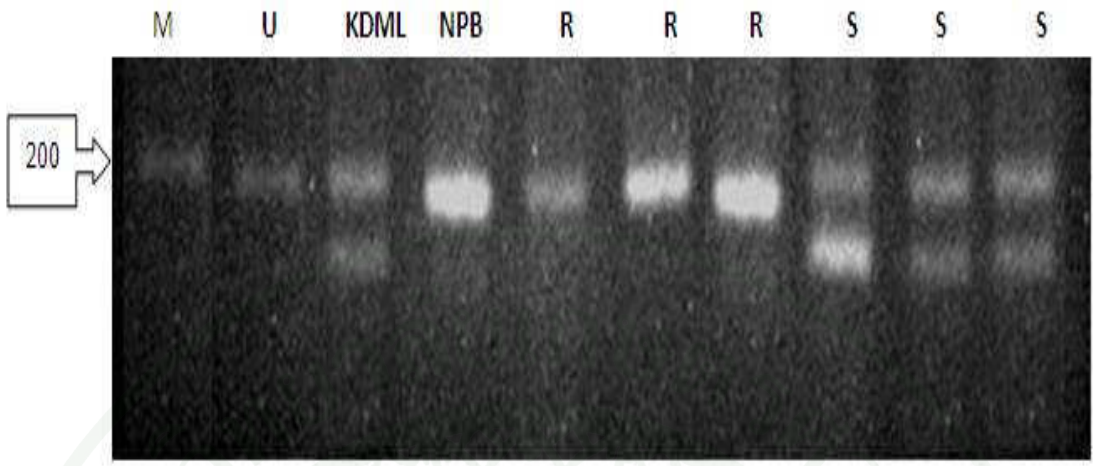
ภาพที่ 10 ผลการตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิคดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel eletrophoresis ของตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมือง (M คือ GeneRuler™ 1 Kb DNA และ 1-5 คือ ตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-2

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* มีตำแหน่งบนโครโมโซมคู่ที่ 6 มีนิวคลีโอไทด์จำนวน 2,772 นิวคลีโอไทด์จัดอยู่ในกลุ่มของ nucleotide-binding site–leucine rich repeat (NBS–LRR) (Chen *et al*., 2011) โดยแอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทานโรคไหม้นั้น เกิดจากการกลายแบบ nonsense ที่ตำแหน่งของนิวคลีโอไทป์ลำดับที่ 2,208 จากตำแหน่งเริ่มต้นของการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้โปรตีนที่สังเคราะห์ได้มีขนาดสั้นลง และสูญเสียความสามารถในการต้านทานต่อโรคไหม้ แต่แอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานนั้นจะไม่มีการกลายในตำแหน่งนี้ จึงทำให้โปรตีนที่สังเคราะห์ออกมาได้มีลักษณะที่ปกติ จึงสามารถแสดงออกถึงความต้านทานต่อโรคไหม้ได้ ด้วยเหตุนี้จึงเป็นเหตุให้ข้าวอินดิกาและข้าวจาปอนิกามีความสามารถในการต้านทานต่อโรคไหม้ *Pid3* ได้แตกต่างกัน (Shang *et al*., 2009) จากการตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* ในข้าวตัวอย่าง โดยนำดีเอ็นเอของข้าวตัวอย่าง จำนวน 266 พันธุ์ มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-2 ซึ่งเป็นเครื่องหมายชนิด CAPS ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* (ตารางที่ 3) แล้วตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI (Shang *et al*., 2009) หลังจากนั้นนำมาหาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel eletrophoresis จากข้าวตัวอย่างทั้งหมด 226 พันธุ์ พบว่ามีข้าวจำนวน 24 พันธุ์ ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 178 คู่เบส และข้าวจำนวน 202 พันธุ์ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 153 คู่เบส โดยข้าวตัวอย่างที่ให้แถบดีเอเอ็นขนาด 178 คู่เบส จำนวน 24 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือจำนวน 10 พันธุ์ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 5 พันธุ์ ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 2 พันธุ์ ข้าวพันธุ์ส่งเสริมจำนวน 6 พันธุ์ และข้าวนิปปอนบาร์เลย์ ส่วนข้าวตัวอย่างที่ให้แถบดีเอเอ็นขนาด 153 คู่เบส ได้แก่ ข้าวไร่พื้นเมืองเมืองภาคเหนือ จำนวน 9 พันธุ์ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 40 พันธุ์ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 94 พันธุ์ ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 43 พันธุ์ และข้าวขาวดอกมะลิ 105 (ภาพที่ 11 และตารางที่ 12)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 11 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ Pid3-dCAPS-2 ที่มีความจำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* แล้วตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ในตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยและข้าวพันธุ์ส่งเสริม

M	คือ GeneRuler™ 200 คู่เบส DNA
U	คือ ชิ้นดีเอ็นเอก่อนตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI
KDML	คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105
NPB	คือ ข้าวนิปปอนบาร์เรย์
R	คือ แอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 178 คู่เบส
S	คือ แอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทานโรคไหม้ ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 153 คู่เบส

(จากรูปเป็นการตัดไม่สมบูรณ์ จึงทำให้ได้แถบดีเอ็นเอทั้ง 2 ขนาด)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 12 การกระจายตัวของแอลลีลยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-2

		Pid3 CAPS2 marker		
พันธุ์ข้าว	จำนวนพันธุ์ที่ตรวจสอบ	จำนวนพันธุ์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้	จำนวนพันธุ์ที่มีอัลลิล R*	จำนวนพันธุ์ที่มีอัลลิล S**
ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	19	19	10	9
ช้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	40	40	0	40
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	144	144	7	137
- ข้าวนาสวนพื้นเมือง	99	99	5	94
- ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง	45	45	2	43
ข้าวพันธุ์ส่งเสริม	21	21	6	15
Susceptible check	2	2	1	1
- KDML 105	1	1	0	1
- นิปปอนบาร์เล่ย์	1	1	1	0
รวม	226	226	24	202

หมายเหตุ R* หมายถึง แอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-2 ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* แล้วตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 178 คู่เบส

s** หมายถึง หมายถึง แอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-2 ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* แล้วตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 153 คู่เบส

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* โดยการส่งตัวอย่างพันธุ์ข้าวพื้นเมืองจำนวน 10 พันธุ์ ซึ่งประกอบด้วยข้าวที่ให้แถบดีเอ็นขนาด 178 คู่เบส จำนวน 5 พันธุ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คือ ข้าวปือเกษตร ข้าวเหลืองหอม ข้าวปิอิแม่ละ และข้าวดยาหลี่ และข้าวที่ให้แถบดีเอ็นขนาด 153 คู่เบส จำนวน 5 พันธุ์ คือ ข้าวงอเพื่อน ข้าวดอกมะลิ 109-1-119 (Gs.no 569) ข้าวอีปี๊ด (Gs.no 3376) ข้าวพญาชม และข้าวเขียว เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปทำการ alignment กับฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม Nucleotide-nucleotide blast (blastn) ได้ผลดังภาพที่ 12

```
NPB       GTTGCCATTGTGAGCAGTTGTTCATGGCCATCACTAATATGATTCATCTTACCCGTCTTG 116
U42       GTTGCCATTGTGAGCAGTTGTTCATGGCCATCACTAATATGATTCATCTTACCCGTCTTG 116
U45       GTTGCCATTGTGAGCAGTTGTTCATGGCCATCACTAATATGATTCATCTTACCCGTCTTG 116
U49       GTTGCCATTGTGAGCAGTTGTTCATGGCCATCACTAATATGATTCATCTTACCCGTCTTG 117
U39       GTTGCCATTGTGAGCAGTTGTTCATGGCCATCACTAATATGATTCATCTTACCCGTCTTG 120
U38       GTTGCCATTGTGAGCAGTTGTTCATGGCCATCACTAATATGATTCATCTTACCCGTCTTG 117
L17       GTTGCCATTGTGAGCAGTTGTTCATGGCCATCACTAATATGATTCATCTTACCCGTCTTG 117
L56       GTTGCCATTGTGAGCAGTTGTTCATGGCCATCACTAATATGATTCATCTTACCCGTCTTG 117
E111      GTTGCCATTGTGAGCAGTTGTTCATGGCCATCACTAATATGATTCATCTTACCCGTCTTG 117
E112      GTTGCCATTGTGAGCAGTTGTTCATGGCCATCACTAATATGATTCATCTTACCCGTCTTG 116
          ************************************************************


NPB       GGATCTAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGCTAA-- 149
U42       GGATCTAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGCTAA-- 149
U45       GGATCTAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGCTAA-- 149
U49       GGATCTAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGCTAA-- 150
U39       GGATCTAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGCTAAGG 155
U38       GGATCCAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGCTAA-- 150
L17       GGATCCAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGCTAA-- 150
L56       GGATCCAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGCTAA-- 150
E111      GGATCCAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGCTAA-- 150
E112      GGATCCAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGCTAA-- 149
```

ภาพที่ 12 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาความเหมือนของข้าวพื้นเมืองพันธุ์ต่างๆ ในตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* (ลำดับเต็มดูในภาคผนวก ง1)

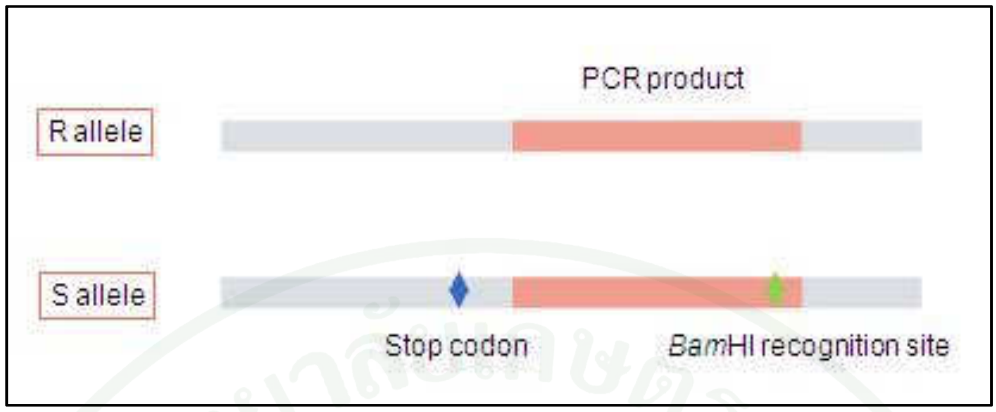
พบว่าข้าวที่ให้แถบดีเอ็นขนาด 178 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับจุดตัดจำเพาะของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ที่มีจุดตัดจำเพาะ คือ GGATCC พบว่าแถบดีเอ็นเอของข้าวตัวอย่างขนาด 178 คู่เบส นี้ไม่สามารถถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ได้เนื่องจากมีลำดับของนิวคลีโอไทป์เป็น GGATCT ที่ต่างกันกันจุดตัดจำเพาะของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ส่วนข้าวตัวอย่างที่ให้แถบดีเอ็นขนาด 153 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จะพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI เนื่องจากมีลำดับของนิวคลีโอไทป์เป็น GGATCC ซึ่งเป็นจุดตัดจำเพาะของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอตัวอย่างถูกตัดได้โดยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI จึงเป็นให้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ให้แถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดสั้นลงจาก 178 คู่เบสมาเป็น 153 คู่เบส ซึ่งผลที่ได้เหมือนกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานไม่ต้านทานโรคที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาดขนาด 153 คู่เบส หลังจากถูกตัดโดยเอ็นไซม์ ตัดจำเพาะ *Bam*HI เช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างข้าวที่ให้แถบดีเอ็นเอหลังจากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ขนาดอ็นเอขนาด 153 คู่เบสนี้เป็นข้าวที่มีแอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทานโรคไหม้ของยีน *Pid3*

ผลการทดลองพบว่าข้าวนิปปอนบาร์เลย์ ซึ่งมีข้อมูลว่าเป็นข้าวที่ไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ และมักถูกใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานไม่ต้านทานโรค กลับให้แถบดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI ขนาด 178 คู่เบส เหมือนกันกับข้าวพันธุ์ที่มีแอลลีลที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ และเมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ก็พบว่า ไม่มีลำดับนิคลีโอไทด์ที่เป็นจุดตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI แสดงให้เห็นว่าข้าวนิปปอนบาร์เล่ย์นี้มีแอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* ตรงกับผลการทดลองของ Shang และคณะ (2009) ที่ได้ใช้ข้าวจาปอนิกาสายพันธุ์ Digu เป็นพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานต้านทานโรค (resistance cheking) ซึ่ง Shang และคณะ (2009) พบว่าข้าวที่มีแอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคไหม้ *Pid3* มีความแตกต่างกันกับข้าวที่มีแอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทานโรคไหม้ *Pid3* เนื่องจากมีการกลายแบบ nonsense เกิดขึ้น โดยข้าวที่มีแอลลีลที่ควบคุมลักษณะไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ที่จำเพาะยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* นี้มีการกลายแบบ nonsense เกิดขึ้น ทำให้สังเคราะห์ได้โปรตีนที่มีขนาดสั้นลง และไม่สามารถแสดงออกถึงความต้านทานต่อโรคไหม้ได้ โดยการกลายแบบ nonsense ที่เกิดขึ้นนี้ไม่พบในข้าวจาปอนิกา แต่พบในในข้าวอินดิกา ข้าวปลูกแอฟริกา และข้าวป่าที่มีจีโนมแบบ AA จึงแสดงให้เห็นว่าการกลายเป็น pseudogene ของยีน *Pid3* ในข้าวจาปอนิกานี้เกิดขึ้นภายหลังจากการวิวัฒนาการแยกกันระหว่างข้าวอินดิกาและจาปอนิกา (Shang และคณะ, 2009) และทำให้ข้าวทั้งสองชนิดนี้มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราโรคที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* ได้แตกต่างกัน และพบว่าส่วนที่เกิดการกลายนี้จะเกิดนอกส่วนของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-sCAPS-2 ดังภาพที่ 13

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 13 ภาพจำลองแสดง polymorphism ที่เกิดจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-2

เพื่อให้การตรวจสอบความต้านทานด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอถูกต้องแม่นยำมากขึ้นนั้น ในการทดลองแต่ละครั้งควรมี พันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานต้านทานโรค เช่น ข้าวพันธุ์ Digu เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบผล และเพื่อยืนยันให้เห็นว่าข้าวที่มีแอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ *Pid3* นี้ ได้ผลเหมือนกันกับข้าวพันธุ์ Digu ที่เป็นพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานต้านทานโรค แต่ในการทดลองนี้ไม่สามารถหาข้าวพันธุ์ Digu ได้ จึงต้องอาศัยการเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทดลอง กับขนาดของแถบดีเอ็นของข้าว Digu ในการทดลองของ Shang และคณะ (2009)

จากผลการทดลองพบว่า ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้ทั้งหมดจำนวน 40 พันธุ์มีแอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทานโรคไหม้สำหรับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* สาเหตุอาจเกิดจากตัวอย่างของเชื้อราก่อโรคส่วนใหญ่เก็บมาจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากข้าวและเชื้อราก่อโรคจะมีวิวัฒนาการร่วมกัน และยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวจะมีความจำเพาะกันกันสายพันธุ์ของเชื้อราก่อโรคไหม้ (Lee and Cho, 1990) ดังนั้นข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้ที่ใช้ในการทดลองจึงอาจไม่มีความจำเพาะต่อเชื้อราสายพันธุ์ทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และเนื่องจากการระบาดของโรคไหม้นี้ส่วนใหญ่จะระบาดในภาคเหนือ ทำให้พันธุ์ข้าวในภาคเหนือมีโอกาสในการปรับตัวเพื่อให้ต้านทานต่อโรคไหม้สายพันธุ์ต่าง ๆ ได้มากกว่าข้าวพื้นเมืองภาคใต้ที่มีการระบาดของโรคน้อยกว่านั่นเอง จึงเป็นเหตุให้ให้ข้าวพื้นเมืองในภาคเหนือมีแอลลีลที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้เป็นจำนวนมากกว่าข้าวพื้นเมืองภาคอื่นๆ

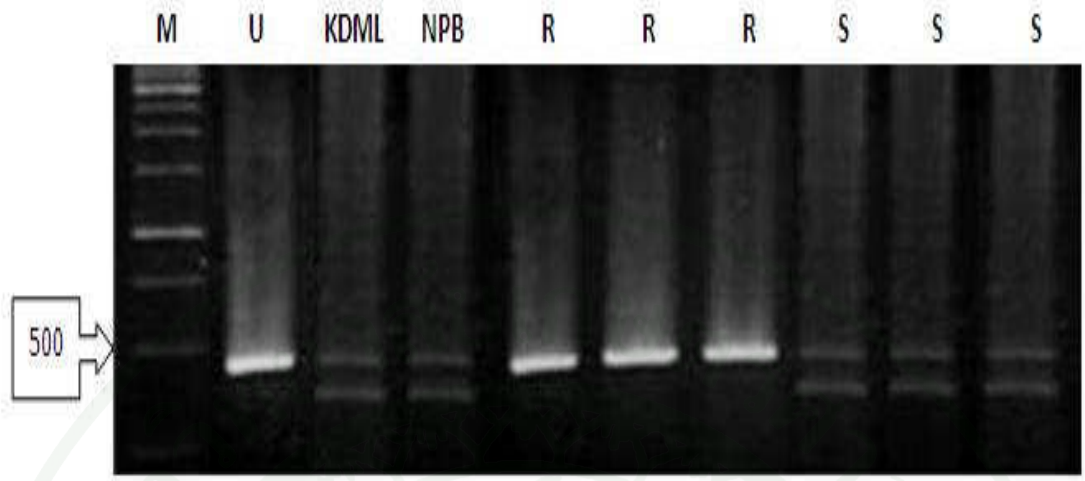
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ส่วนข้าวพื้นเมืองในภาคใต้จึงไม่พบแอลลลีลที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* ดังกล่าวนี้

การหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* เป็นยีนเด่น มีขนาดประมาณ 70 kb มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 มีโครงสร้างแบบ nucleotide-binding site–leucine rich repeat (NBS-LRR) มีความต้านทานแบบ broad-spectrum resistance ดังนั้นยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* นี้จึงถูกนำมาใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของประเทศจีนมาเป็นเวลายาวนานกว่า 20 ปี (Deng *et al*., 2006) จากการตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ในข้าวตัวอย่าง โดยนำดีเอ็นเอของข้าวตัวอย่าง จำนวน 266 พันธุ์ มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 ซึ่งเป็นเครื่องหมายชนิด CAPS ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* และตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI (Deng *et al*., 2006) (ตารางที่ 3) หลังจากนั้นทำการหาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยวิธี agarose gel eletrophoresis จากผลการทดลองพบว่าข้าวตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 226 พันธุ์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้จำนวน 221 พันธุ์ ส่วนอีก 5 พันธุ์ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ อาจเกิดเนื่องจากตัวอย่างดีเอ็นเอมีการเสียสภาพเนื่องจากมีการเก็บตัวอย่างมาแล้วเป็นระยะเวลานาน ข้าวตัวอย่างที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้นี้ พบว่ามีจำนวน 215 พันธุ์ ไม่สามารถตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ได้จึงให้แถบดีเอ็นเอขนาด 468 คู่เบส และข้าวตัวอย่างจำนวน 6 พันธุ์ สามารถตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ได้จึงให้แถบดีเอ็นเอขนาดน้อยกว่า 468 คู่เบส โดยข้าวตัวอย่างที่ให้แถบดีเอเอ็นขนาด 468 คู่เบส จำนวน 215 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือจำนวน 17 พันธุ์ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 40 พันธุ์ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 99 พันธุ์ ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 45 พันธุ์ ข้าวพันธุ์ส่งเสริมจำนวน 14 พันธุ์ ส่วนข้าวตัวอย่างที่ให้แถบดีเอเอ็นขนาดน้อยกว่า 468 คู่เบส ได้แก่ ข้าวไร่พื้นเมืองเมืองภาคเหนือ จำนวน 2 พันธุ์ คือ ข้าวจะนอไหน และข้าวปิอิ ซูแม่ฟาง และข้าวพันธุ์ส่งเสริมจำนวน 2 พันธุ์ คือ ข้าว AZUCENA และข้าว CT9933 ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์ส่งเสริม จาก IRRI ประเทศฟิลิปปินส์ โดยให้ผลตรงกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวนิปปอนบาร์เลย์ที่ใช้เป็นพันธุ์ susceptible checking (ภาพที่ 14 และตารางที่ 13)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 14 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 ที่มีความจำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pgm(t)* แล้วตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ในตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยและข้าวพันธุ์ส่งเสริม

M คือ GeneRuler™ 200 คู่เบส DNA

U คือ ชิ้นดีเอ็นเอก่อนตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

KDML คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105

NPB คือ ข้าวนิปปอนบาร์เรย์

R คือ แอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 468 คู่เบส

S คือ แอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทานโรคไหม้ ให้แถบดีเอ็นเอขนาดน้อยกว่า 468 คู่เบส

(จากรูปเป็นการตัดไม่สมบูรณ์ จึงทำให้ได้แถบดีเอ็นเอทั้ง 2 ขนาด)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 13 การกระจายตัวของแอลลีลยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483

พันธุ์ข้าว	จำนวนพันธุ์ที่ตรวจสอบ	*Pigm(t)* C5483 marker		
		จำนวนพันธุ์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลีล R*	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลีล S**
ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	19	19	17	2
ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	40	40	40	0
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	144	144	144	0
- ข้าวนาสวนพื้นเมือง	99	99	99	0
- ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง	45	45	45	0
ข้าวพันธุ์ส่งเสริม	21	16	14	2
Susceptible check	2	2	0	2
- KDML 105	1	1	0	1
- นิปปอนบาร์เล่ย์	1	1	0	1
รวม	226	226	215	6

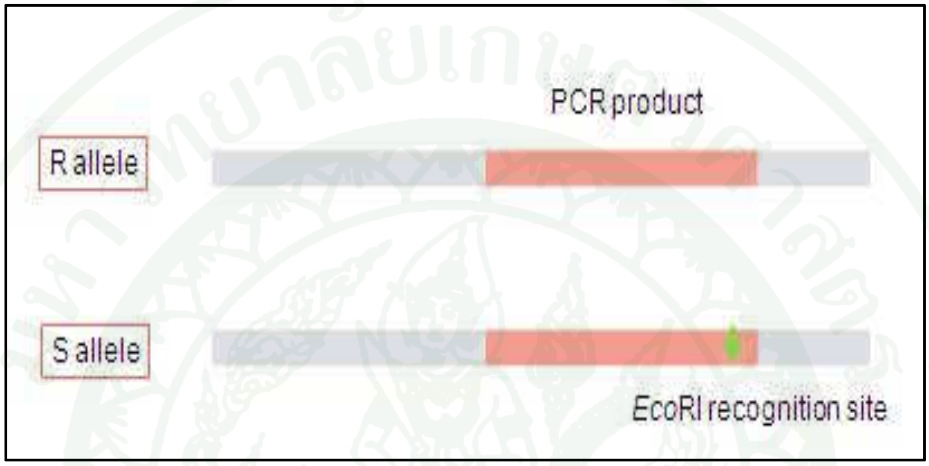
หมายเหตุ R* หมายถึง แอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* และตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 468 คู่เบส

S** หมายถึง หมายถึง แอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 ที่จำเพาะกับยีน ต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* แล้วตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดน้อยกว่า 468 คู่เบส

แอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานโรคและแอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทานโรคมีความแตกต่างกันในลำดับของนิวคลีโอไทป์ที่สามารถใช้เป็นจุดตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะได้โดย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นิวคลีไทป์ที่ได้หลังจากการทำปฏิกิยาพีซีอาร์ในแอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานโรคจะมีลำดับของเบสที่ไม่สามารถตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ได้ ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 468 คู่เบส แต่แอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทานโรคจะมีลำดับของเบสที่สามารถตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ได้ ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอขนาดเล็กกว่า 468 คู่เบส ดังภาพที่ 15



ภาพที่ 15 ภาพจำลองแสดง polymorphism ที่เกิดจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483

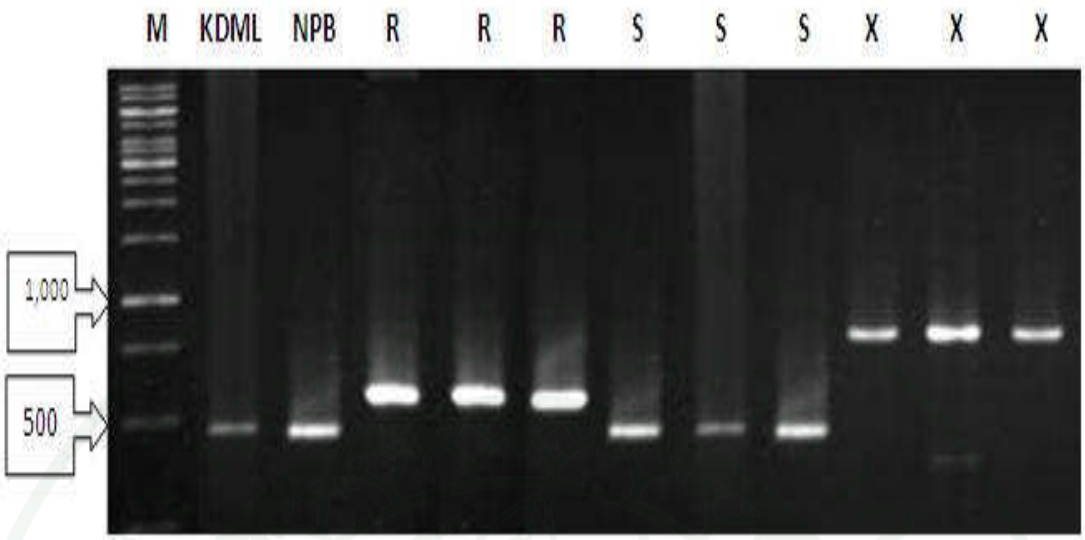
จากผลการทดลองพบว่าข้าวส่วนใหญ่ (215 พันธุ์ จาก 266 พันธุ์) มีความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ และพบว่าข้าวพื้นเมืองของไทยส่วนใหญ่ (201 พันธุ์ จาก 203 พันธุ์) มีความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ จึงอาจเป็นไปได้ว่า สายพันธุ์ของโรคไหม้ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* นี้ อาจเป็นสายพันธุ์ปกติที่พบได้ในพื้นที่ของประเทศไทย จึงทำให้พันธุ์ข้าวมีความสามารถในการปรับตัว ให้ต้านทานต่อเชื้อราสายพันธุ์นี้ได้ เนื่องจากข้าวและเชื้อราก่อโรคจะมีวิวัฒนาการร่วมกัน และยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวจะมีความจำเพาะกับสายพันธุ์ของเชื้อราก่อโรคไหม้ (Lee and Cho, 1990) จึงเป็นเหตุให้ผลการทดลองในครั้งนี้ พบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองส่วนใหญ่ของประเทศไทยส่วนใหญ่มียีนต้านทานต่อโรคไหม้ *Pigm(t)*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742

การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ในข้าวตัวอย่าง โดยนำดีเอ็นเอของข้าวตัวอย่าง จำนวน 266 พันธุ์ มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 ซึ่งเป็นเครื่องหมายชนิด InDel ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* (Deng *et al*., 2006) (ตารางที่ 3) แล้วหาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยวิธี agarose gel eletrophoresis จากข้าวตัวอย่างทั้งหมด 226 พันธุ์ พบว่า จากข้าวตัวอย่างทั้งหมด 226 พันธุ์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ 223 พันธุ์ ส่วนข้าวตัวอย่างอีก 3 พันธุ์ไม่สามารถเพิ่มปริมาณจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ อาจเกิดเนื่องจากตัวอย่างดีเอ็นเอมีการเสียสภาพเนื่องจากมีการเก็บตัวอย่างมาแล้วเป็นระยะเวลานาน จากจำนวนข้าวตัวอย่างที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้นี้ พบว่ามีตัวอย่างข้าวตัวอย่างจำนวน 160 พันธุ์ ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 555 คู่เบส ข้าวตัวอย่างจำนวน 46 พันธุ์ ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 461 คู่เบส และข้าวตัวอย่างจำนวน 17 พันธุ์ ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 คู่เบส โดยข้าวตัวอย่างที่ให้แถบดีเอเอ็นขนาด 555 คู่เบส จำนวน 160 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือจำนวน 15 พันธุ์ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 33 พันธุ์ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 66 พันธุ์ ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 37 พันธุ์ และข้าวพันธุ์ส่งเสริมจำนวน 9 พันธุ์ ส่วนข้าวตัวอย่างที่ให้แถบดีเอเอ็นขนาด 461 คู่เบส จำนวน 46 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 4 พันธุ์ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 2 พันธุ์ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 22 พันธุ์ ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 7 พันธุ์ และข้าวพันธุ์ส่งเสริมจำนวน 9 พันธุ์ ซึ่งให้ผลตรงกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวนิปปอนบาร์เลย์ที่ใช้เป็นพันธุ์ susceptible checking ส่วนข้าวตัวอย่างที่ให้แถบดีเอเอ็นขนาดประมาณ 900 คู่เบส จำนวน 17 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 5 พันธุ์ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 11 พันธุ์ ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 1 พันธุ์ (ภาพที่ 16 และตารางที่ 14)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 16 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 ที่มีความจำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ในตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยและข้าวพันธุ์ส่งเสริม

M คือ GeneRuler™ DNA

KDML คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105

NPB คือ ข้าวนิปปอนบาร์เรย์

R คือ แอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ หลังจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 555 คู่เบส

S คือ แอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทานโรคไหม้ หลังจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 461 คู่เบส

X คือ แอลลีลใหม่ หลังจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะให้แถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 14 การกระจายตัวของแอลลีลต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742

พันธุ์ข้าว	จำนวนพันธุ์ที่ตรวจสอบ	Pigm(t) S29742 marker			
		จำนวนพันธุ์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้	จำนวนพันธุ์ที่มีอัลลิล R*	จำนวนพันธุ์ที่มีอัลลิล S+	จำนวนพันธุ์ที่มีอัลลิล X#
ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	19	19	15	4	0
ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	40	40	33	2	5
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	144	144	103	29	12
- ข้าวนาสวนพื้นเมือง	99	99	66	22	11
- ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง	45	45	37	7	1
ข้าวพันธุ์ส่งเสริม	21	18	9	9	0
Susceptible check	2	2	0	2	0
- KDML 105	1	1	0	1	0
- นิปปอนบาร์เล่ย์	1	1	0	1	0
รวม	226	223	160	46	17

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 14 (ต่อ)

หมายเหตุ R* หมายถึง แอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 ที่จำเพาะกับยีน *Pigm(t)* ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 555 คู่เบส

S^{+} หมายถึง แอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 ที่จำเพาะกับยีน *Pigm(t)* ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 461 คู่เบส

$X^{\#}$ หมายถึง แอลลีลใหม่ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 ที่จำเพาะกับยีน *Pigm(t)* ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 คู่เบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลจากการส่งตัวอย่างพันธุ์ข้าวพื้นเมือง จำนวน 12 พันธุ์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาดต่างๆ 3 รูปแบบ ประกอบด้วยข้าวตัวอย่างที่ให้แถบดีเอ็นขนาด 555 คู่เบส จำนวน 5 พันธุ์ คือ ข้าวเชียงใหม่ (Gs.no 12739) ข้าวลูกแดง (Gs.no 12740) ข้าวเล็บนกเบา (Gs.no 12743) ข้าวช่อ (Gs.no 12749) และข้าวช่อแดง (Gs.no 12751) ข้าวตัวอย่างที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 461 คู่เบส จำนวน 5 พันธุ์ คือ ข้าวปิอิ ซูแม่ฟาง ข้าวกอแผ่ ข้าวบือขอพอ ข้าวมันหมู และข้าวนิปปอนบาร์เล่ย์ และข้าวตัวอย่างที่ให้แถบดีเอ็นขนาดประมาณ 900 คู่เบส จำนวน 2 พันธุ์ คือ ข้าวหลุดหนี้ 75-3-2 (Gs.no 549) และข้าวเม็ดใหญ่ 94-4-87 (Gs.no 550) ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปทำการ alignment กับฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม Nucleotide-nucleotide blast (blastn) ได้ผลดังภาพที่ 17

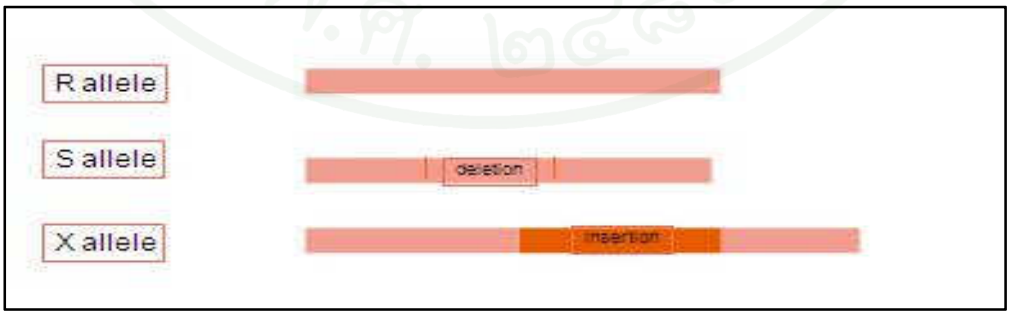
```
S91     TCTTTTTAATAATGAATAAAAACCCGGACTTGTTATCCATAAG---------------- 338
S92     TCTTTTTAATAATGAATAAAAACCCGGACTTGTTATCCATAAG---------------- 336
S93     TCTTTTTAATAATGAATAAAAACCCGGACTTGTTATCCATAAG---------------- 334
S94     TCTTTTTAATAATGAATAAAAACCCGGACTTGTTATCCATAAG---------------- 336
S95     TCTTTTTAATAATGAATAAAAACCCGGACTTGTTATCCATAAG---------------- 334
U51     ------------------------------------------------------------
L52     ------------------------------------------------------------
L53     ------------------------------------------------------------
L57     ------------------------------------------------------------
NPB     ------------------------------------------------------------
L7      TCTTTTTAATAATGAATAAAAACCCGGACTTGTTATCCATAAGGGCACCCACAATGGTTA 353
L8      TCTTTTTAATAATGAATAAAAACCCGGACTTGTTATCCATAAGGGCACCCACAATGGTTA 355


S91     ------------------------------------------------------------
S92     ------------------------------------------------------------
S93     ------------------------------------------------------------
S94     ------------------------------------------------------------
S95     ------------------------------------------------------------
U51     ------------------------------------------------------------
L52     ------------------------------------------------------------
L53     ------------------------------------------------------------
L57     ------------------------------------------------------------
NPB     ------------------------------------------------------------
L7      TCTATAGGCTCTCTATAAGAGATCTATGTCAGCATATTTTCCTACTTGGAAGGTATTAAA 413
L8      TCTATAGGCTCTCTATAAGAGATCTATGTCAGCATATTTTCCTACTTGGAAGGTATTAAA 415
```

ภาพที่ 17 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาความเหมือนของข้าวพื้นเมืองพันธุ์ต่างๆ ในตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* (ลำดับเต็มดูในภาพผนวก ง2)

ผลการทดลองพบว่าข้าวตัวอย่างที่มีแอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานโรค ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 555 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จะเห็นว่า มีลำดับเบสที่ยาวกว่าข้าวตัวอย่างที่มีแอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทานโรค คือ 461 คู่เบส ความแตกต่างจากจำนวน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นิวคลีโอไทป์ที่เปลี่ยนแปลงไประหว่าง 2 แอลลีลนี้ อาจเกิดการกลายชนิด InDel โดยอาจเกิดจากการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทป์ (deletion) ในแอลลีลควบคุมลักษณะต้านทาน ทำให้กรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสเป็นโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป เมื่อเกิดการแปรรหัสเป็นโปรตีนต้านทานโรคเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ความสามารถในการต้านทานต่อโรคไหม้ เปลี่ยนไปเป็นไม่สามารถต้านทานต่อโรคไหม้ได้ หรืออาจเกิดจากการเพิ่มขึ้นของลำดับนิวคลีโอไทป์ (insertion) ในแอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทาน ทำให้กรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสเป็นโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป ทำให้มีความสามารถในการต้านทานต่อโรคไหม้เพิ่มขึ้นมา และลักษณะนี้ก็ถูกคัดเลือกเก็บไว้โดยการคัดเลือกตามธรรมชาติ (natural selection) ส่วนพันธุ์ข้าวที่ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอประมาณ 900 คู่เบสนั้นเป็นแอลลีลใหม่ ซึ่งอาจเกิดจากมีทรานโพซอนแทรกเข้ามาในลำดับนิวคลีโอไทป์เดิม ดังภาพที่ 16 ซึ่งเมื่อเกิดการแปรรหัสเป็นโปรตีนแล้ว จะทำให้ข้าวพันธุ์ที่มีแอลลีลใหม่นี้ มีความต้านทานต่อโรคหรือไม่ ซึ่งจำเป็นต้องมีการทดลองกันต่อไป และถ้าทรานโพซอนดังกล่าวนั้นได้แทรกกลางตัวยีน ก็จะมีผลทำให้ความสามารถในการต้านทานโรคเปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากยีนต้านทานโรคที่ถูกทรานโพซอนแทรกนั้น ไม่สามารถแปลรหัสได้เป็นโปรตีนต้านทานโรคได้เหมือนเดิม และจากผลการทดลองพบกว่าข้าวส่วนใหญ่ (160 พันธุ์ จาก 223 พันธุ์) มีความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า สายพันธุ์ของโรคไหม้ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* นี้ อาจเป็นสายพันธุ์ปกติที่พบได้ในพื้นที่ของประเทศไทย จึงทำให้พันธุ์ข้าวมีความสามารถในการปรับตัว ให้ต้านทานต่อเชื้อราสายพันธุ์นี้ได้ เนื่องจากข้าวและเชื้อราก่อโรคจะมีวิวัฒนาการร่วมกัน และยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวจะมีความจำเพาะกับสายพันธุ์ของเชื้อราก่อโรคไหม้ (Lee and Cho, 1990) จึงเป็นเหตุให้ผลการทดลองในครั้งนี้ พบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองส่วนใหญ่ของประเทศไทยส่วนใหญ่มียีนต้านทานต่อโรคไหม้ *Pigm(t)*



ภาพที่ 18 ภาพจำลองแสดง polymorphism ที่เกิดจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แต่เมื่อนำผลการทดลองจากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS มาเปรียบเทียบกับผลการทดลองโดยกับผลการทดลองจากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด InDel พบว่า มีจำนวนแอลลีลทั้ง 3 รูปแบบมีความแตกต่างกัน ดังตารางที่ 15 ตัวอย่างเช่น ในข้าวพื้นเมืองภาคเหนือพบว่า มีพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคไหม้ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 พบว่ามีจำนวน 17 พันธุ์ แต่ผลจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 พบว่ามีจำนวน 15 พันธุ์ ส่วนพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 พบว่ามีจำนวน 2 พันธุ์ แต่ผลจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 พบว่ามีจำนวน 4 พันธุ์ เป็นต้น และนอกจากนี้ยังพบว่า ในการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด InDel นี้พบแอลลีลใหม่จำนวน 17 พันธุ์ แต่ในการใช้ตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย ดีเอ็นเอ C5483 ตรวจสอบกับข้าวตัวอย่างจำนวน 17 พันธุ์ ดังกล่าวนั้นให้ผลเหมือนกันกับแอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคไหม้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบจำนวนแอลลีลทั้ง 3 แอลลีลจากการตรวจหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)*ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 และเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742

พันธุ์ข้าว	จำนวนพันธุ์ที่ตรวจสอบ	จำนวนพันธุ์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้		จำนวนพันธุ์ที่มีอัลลิล R		จำนวนพันธุ์ที่มีอัลลิล S		จำนวนพันธุ์ที่มีอัลลิล X	
		C5483 marker	S29742 marker	C5483 marker	S29742 marker	C5483 marker	S29742 marker	C5483 marker	S29742 marker
ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	19	19	19	17	15	2	4	0	0
ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	40	40	40	40	33	0	2	0	5
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	144	144	144	144	103	0	29	0	12
- ข้าวนาสวนพื้นเมือง	99	99	99	99	66	0	22	0	11
- ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง	45	45	45	45	37	0	7	0	1
ข้าวพันธุ์ส่งเสริม	21	16	18	14	9	2	9	0	0
Susceptible check	2	2	2	0	0	2	2	0	0
- KDML 105	1	1	1	0	0	1	1	0	0
- นิปปอนบาร์เล่ย์	1	1	1	0	0	1	1	0	0
รวม	226	226	223	215	160	6	46	0	17

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความแตกต่างระหว่างการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 2 ประเภทนั้น อาจเกิดจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS นั้น ไม่ได้เป็นเครื่องหมายที่อยู่ในตัวยีน แต่เป็นเครื่องหมายที่ลิงค์อยู่กับยีน แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด InDel นั้นเป็นเครื่องหมายที่อยู่ในตัวยีนโดยตรง (Deng *et al*., 2006) จึงเป็นเหตุให้ผลการทดลองที่ได้จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 และเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 แตกต่างกันออกไป โดยผลที่ได้จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 อาจเกิดความแตกต่างกันออกไปเนื่องจากการเกิดครอสซิ่งโอเวอร์ในกระบวนการสืบพันธุ์ของพันธุ์ข้าวนั้น เป็นผลให้ตำแหน่งของตัวยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคหรือไม่ต้านทานทานโรคนั้น กับลำดับนิวคลีโอไทป์ที่ลิงค์อยู่กับเครื่องหมายดีเอ็นเอไม่ได้ไปด้วยกัน จึงเป็นเหตุให้สัดส่วนที่ได้จากผลการตรวจสอบจึง แตกต่างไปจากการตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด InDel ที่อยู่ในตัวยีนโดยตรง ดังนั้นข้อมูลของผลการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ในข้าวตัวอย่างโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในครั้งนี้นั้น จึงควรยึดเอาผลของการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 ที่เป็นเครื่องหมายที่อยู่ในตัวยีนโดยตรงเป็นหลัก

ส่วนผลจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 ในการตรวจสอบแล้วพบว่ามีแอลลีลใหม่เป็นจำนวน 17 พันธุ์ ซึ่งไม่พบในการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 นั้นอาจเกิดจากการใช้ไพรเมอร์ต่างชนิดกัน ทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้น เป็นชิ้นส่วนต่างตำแหน่งกัน กล่าวคือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จากเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 เป็นส่วนที่อยู่ใกล้กับยีน แต่ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จากเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 นั้นเป็นส่วนที่อยู่ในตัวยีน และเนื่องจากจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS นั้น อาศัยแค่จุดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และดีเอ็นเอของแอลลีลใหม่ที่พบนั้นอาจไม่มีจุดตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ทำให้ผลที่ได้แสดงออกมาเหมือนกันกับแอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ ดังภาพที่ 19 ซึ่งข้าวพันธุ์ที่มีแอลลีลใหม่จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 จำนวน 17 พันธุ์นี้ จำเป็นต้องมีการทดลองกันต่อไปว่ามีความสามารถในการต้านทานโรคไหม้หรือไม่

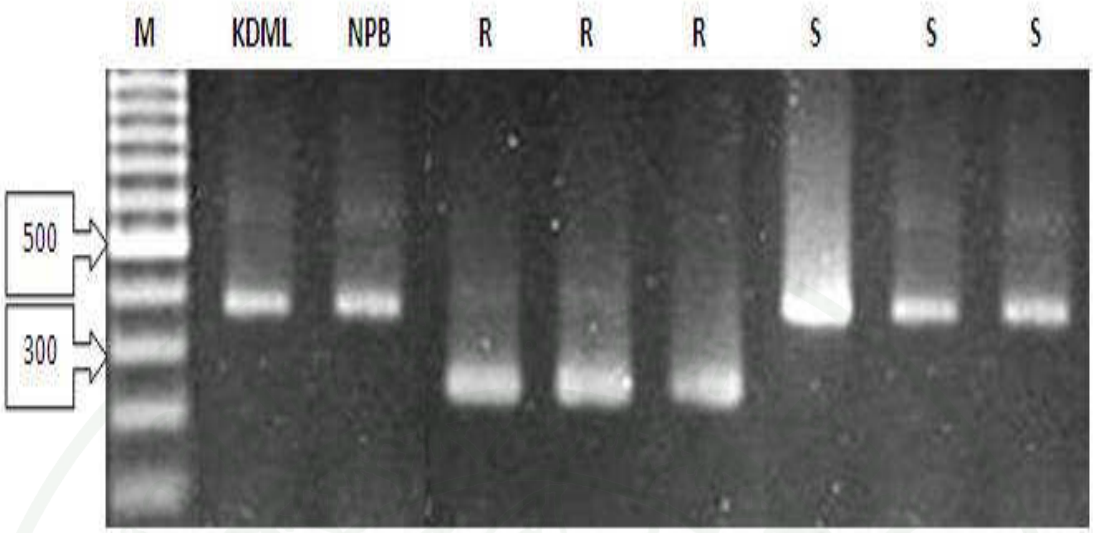
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 19 ภาพจำลองเปรียบเทียบ polymorphism ที่เกิดจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 และ S29742

การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54 MAS

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* มีตำแหน่งบนส่วนปลายแขนข้างยาวของโครโมโซมข้าวคู่ที่ 11 มีความยาว 1.5 Kb เป็นยีนเด่น เป็น single dominant มีโครงสร้างของยีนแบบ nucleotide-binding site–leucine-rich repeat (NBS–LRR) domain (Sharma *et al*., 2005) การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ในข้าวตัวอย่าง โดยนำดีเอ็นเอของข้าวตัวอย่าง จำนวน 266 พันธุ์ มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54 MAS ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* (Ramkumar *et al*., 2010) (ตารางที่ 3) แล้วหาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยวิธี agarose gel eletrophoresis จากข้าวตัวอย่างทั้งหมด 226 พันธุ์ พบว่า มีข้าวตัวอย่างจำนวน 16 พันธุ์ ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 216 คู่เบส ข้าวตัวอย่างจำนวน 210 พันธุ์ ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 359 คู่เบส โดยข้าวตัวอย่างจำนวน 16 พันธุ์ ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 216 คู่เบส ได้แก่ ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือจำนวน 10 พันธุ์ และข้าวพันธุ์ส่งเสริมจำนวน 6 พันธุ์ ส่วนข้าวตัวอย่างที่ให้แถบดีเอเอ็นขนาด 359 คู่เบส จำนวน 210 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวไร่พื้นเมืองเมืองภาคเหนือ จำนวน 9 พันธุ์ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 40 พันธุ์ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 99 พันธุ์ ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 45 พันธุ์ และข้าวพันธุ์ส่งเสริมจำนวน 15 พันธุ์ ซึ่งให้ผลตรงกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 และข้าวนิปปอนบาร์เลย์ที่ใช้เป็นพันธุ์ susceptible checking (ภาพที่ 20 และตารางที่ 16)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 20 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54 MAS ที่มีความจำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ในตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยและข้าวพันธุ์ส่งเสริม

M คือ GeneRuler™ DNA

KDML คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105

NPB คือ ข้าวนิปปอนบาร์เรย์

R คือ แอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 261 คู่เบส

S คือ แอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทานโรคไหม้ ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 359 คู่เบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 16 การกระจายตัวของแอลลีลยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54 MAS

		Pi54 MAS marker		
พันธุ์ข้าว	จำนวนพันธุ์ที่ตรวจสอบ	จำนวนพันธุ์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลีล R*	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลิล S**
ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	19	19	10	9
ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	40	40	0	40
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	144	144	0	144
- ข้าวนาสวนพื้นเมือง	99	99	0	99
- ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง	45	45	0	45
ข้าวพันธุ์ส่งเสริม	21	21	6	15
Susceptible check	2	2	0	2
- KDML 105	1	1	0	1
- นิปปอนบาร์เล่ย์	1	1	0	1
รวม	226	226	16	210

หมายเหตุ R* หมายถึง แอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ *Pi54* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54 MAS ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 216 คู่เบส

s** หมายถึง แอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54 MAS ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 395 คู่เบส

การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* จากการส่งตัวอย่างพันธุ์ข้าวพื้นเมือง จำนวน 10 พันธุ์ ซึ่งประกอบด้วยข้าวที่ให้แถบดีเอ็นขนาด 216 คู่เบสจำนวน 5 พันธุ์ คือ ข้าวงอเพื่อน ข้าวปือเกษตร ข้าวจะนอไหน ข้าวห้วยแล้ง และข้าวกอแผ่ ข้าวที่ให้แถบดีเอ็นขนาด 395 คู่เบส จำนวน 5 พันธุ์ คือ ข้าวขืนดิน (Gs.no 4290) ข้าวเบาชะมวง (Gs.no 11211)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้าวลูกแดง (Gs.no 12740) ข้าวขาวพวง 74-3-38 (Gs.no 551) และข้าวนิปปอนบาร์เล่ย์ เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปทำการ alignment กับฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม Nucleotide-nucleotide blast (blastn) ได้ผลดังภาพที่ 21

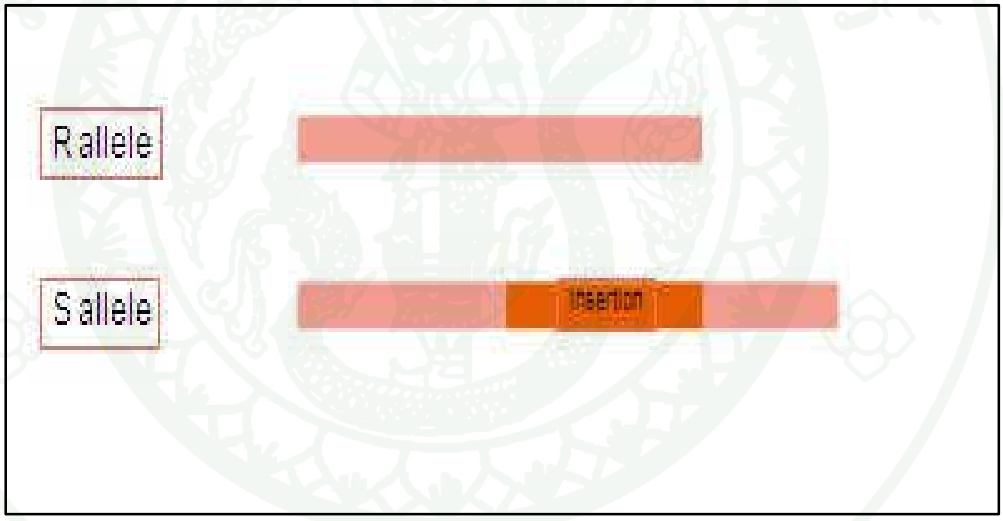
```
U38      ATCTTCAGTGTCTGAAACCTTTTCAAGGTTCACTAGTGATAG------------------ 156
U42      ATCTTCAGTGTCTGAAACCTTTTCAAGGTTCACTAGTGATAG------------------ 159
U48      ATCTTCAGTGTCTGAAACCTTTTCAAGGTTCACTAGTGATAG------------------ 157
U50      ATCTTCAGTGTCTGAAACCTTTTCAAGGTTCACTAGTGATAG------------------ 155
U52      ATCTTCAGTGTCTGAAACCTTTTCAAGGTTCACTAGTGATAG------------------ 157
S77      ATCTTCAGTGTCTGAAACCTTTTCAAGGTTCACTAGTGATAGGCTATGTTTAGTTCAGCG 176
S83      ATCTTCAGTGTCTGAAACCTTTTCAAGGTTCACTAGTGATAGGCTATGTTTAGTTCAGCG 173
S92      ATCTTCAGTGTCTGAAACCTTTTCAAGGTTCACTAGTGATAGGCTATGTTTAGTTCAGCG 178
L9       ATCTTCAGTGTCTGAAACCTTTTCAAGGTTCACTAGTGATAGGCTATGTTTAGTTCAGCG 180
NPB      ATCTTCAGTGTCTGAAACCTTTTCAAGGTTCACTAGTGATAGGCTGTGTTTAGTTCAGCG 176
         ****************************************

U38      ------------------------------------------------------------
U42      ------------------------------------------------------------
U48      ------------------------------------------------------------
U50      ------------------------------------------------------------
U52      ------------------------------------------------------------
S77      CAAAGTTTGAAAAAGGATTAAAATTAGAGATGATGTGACTGAAAAGTTATGTGTATATGA 236
S83      CAAAGTTTGAAAAAGGATTAAAATTAGAGATGATGTGACTGAAAAGTTATGTGTATATGA 233
S92      CAAAGTTTGAAAAAGGACTAAAATTAGAGATGATGTGACTGAAAAGTTATGTGTGTATGA 238
L9       CAAAGTTTGAAAAAGGACTAAAATTAGAGATGATGTGACTGAAAAGTTATGTGTGTATAA 240
NPB      CAAAGTTTGAAAAATGACTAAAATTAGAGATGATGTGACTGAAAAGTTGTGTGTGTATGA 236
```

ภาพที่ 21 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาความเหมือนของข้าวพื้นเมืองพันธุ์ต่างๆ ในตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* (ลำดับเต็มดูในภาพผนวก ง3)

ผลการทดลองพบว่าข้าวมีแอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานโรค ให้แถบดีเอ็นขนาด 216 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จะเห็นว่า มีลำดับเบสที่สั้นกว่าข้าวที่มีแอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทานโรค คือ 359 คู่เบส ความแตกต่างจากจำนวนนิวคลีโอไทป์ที่เปลี่ยนแปลงไประหว่าง 2 แอลลีลนี้ อาจเกิดการกลายชนิด Insertion โดยอาจเกิดจากมีทรานโพซอนแทรกเข้ามาในช่วงของยีน ทำให้ความสามารถในการต้านทานโรคหายไป เนื่องจากมีการเปลี่ยนของรหัสนิวคลีโอไทป์ที่สังเคราะห์โปรตีนออกมา และชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 144 คู่เบส ที่เกิดจาก InDel (insertion/deletion) ในส่วนของ exonic region ของยีน *Pi54* ทำให้เกิด polymorphism ระหว่างรูปแบบของยีน ซึ่งการกลายของชิ้นส่วน ดีเอ็นเอที่เกิดจาก InDel นี้ อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน (Sharma et al. 2005) ดังภาพที่ 22 และจากผลการทดลองพบกว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้าวส่วนใหญ่ (210 พันธุ์ จาก 226 พันธุ์) ไม่มีความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ และ พบว่าข้าวพื้นเมืองภาคใต้ และข้าวพื้นเมืองภาคอีสานไม่มีพันธุ์ใดที่สามารถต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ได้ ส่วนในข้าวพื้นเมืองภาคเหนือนั้นมีพันธุ์ที่มีแอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานโรค และแอลลีลควบคุมลักษณะไม่ต้านทานโรค ในสัดส่วนที่เท่าๆ กัน ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจาก สายพันธุ์ของโรคไหม้ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* นี้ อาจเป็นสายพันธุ์ที่พบได้มากในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย จึงทำให้พันธุ์ข้าวในภาคเหนือมีความสามารถในการปรับตัว ให้ต้านทานต่อเชื้อราสายพันธุ์นี้ได้ แต่ปรากฏการณ์นี้ไม่ได้เกิดขึ้นในข้าวพื้นเมืองภาคอื่นๆ เนื่องจากข้าวและเชื้อราก่อโรคจะมีวิวัฒนาการร่วมกัน และยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวจะมีความจำเพาะกันกันสายพันธุ์ของเชื้อราก่อโรคไหม้ (Lee and Cho, 1990) จึงเป็นเหตุให้ผลการทดลองในครั้งนี้ พบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองส่วนใหญ่ของประเทศไทยส่วนใหญ่ไม่มียีนต้านทานทานต่อโรคไหม้ *Pi54*



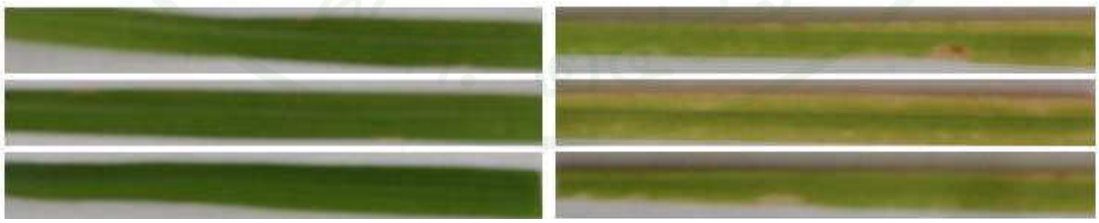
ภาพที่ 22 ภาพจำลองแสดง polymorphism ที่เกิดจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54MAS

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลการทดลองส่วนที่ 2

การศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองต่อโรคไหม้ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองและข้าวพันธุ์ส่งเสริมต่อเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทย จำนวน 20 ไอโซเลท

จากการนำตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ *Magnaporthe grisea* จำนวน 20 ไอโซเลท (ตารางที่ 10) ที่เก็บรวบรวมมาในปี พ.ศ. 2547 และ 2554 มาทำการการปลูกเชื้อราโดยวิธี Spraying method ลงบนต้นกล้าข้าวตัวอย่างที่มีอายุ 21 วัน จำนวน 30 พันธุ์ ที่มีข้อมูลจากโครงการการค้นหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยโดยการใช้ดีเอ็นเอเทคโนโลยี คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ว่ามีแอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคจำนวนหลายแอลลีล โดยแบ่งเป็น ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 15 พันธุ์ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 7 พันธุ์ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 4 พันธุ์ ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 1พันธุ์ ข้าวพันธุ์ส่งเสริม จำนวน 2 พันธุ์ และข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ใช้เป็นพันธุ์ susceptible checking (ตารางที่ 17) หลังจากนั้น 7 วัน ทำการตรวจวัดปริมาณการเกิดโรคไหม้ในข้าว โดยใช้เกณฑ์การวัดระดับความรุนแรงของโรคแยกลักษณะของแผลเป็น 6 ระดับ โดยความรุนแรงที่ระดับ 0-2 แสดงว่าข้าวมีความต้านทานต่อโรคได้ดี (resistance) ความรุนแรงที่ระดับ 3-4 แสดงว่าข้าวมีความต้านทานต่อโรคระดับปานกลาง (moderate resistance) และความรุนแรกที่ระดับ 5-6 แสดงว่าข้าวไม่มีความต้านทานต่อโรค (susceptible) (Roumen *et al*., 1997) (ภาพที่ 9 และตารางที่ 11) พบว่าข้าวตัวอย่างมีระดับความรุนแรงของโรคตั้งแต่ระดับ 0 ถึง 6 (ภาพที่ 23 ตารางที่ 17 และภาคผนวก จ)



ภาพที่ 23 แสดงใบข้าวพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคไหม้ (ซ้าย) และพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ (ขวา) (ภาพเต็มดูในภาพผนวก จ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 17 แสดงระดับความรุนแรงในการก่อโรคในข้าว

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	แหล่งที่มา	จำนวนแอลลีลต้านทาน	ระดับความรุนแรง
1	งอเพือน	U 38	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	3	0
2	ปือก่อ	U 41	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	2	0
3	ปือเกษตร	U 42	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	4	2
4	เหนียวแสงมูเวอ	U43	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	3	0
5	กะเหรี่ยงขาว	U44	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	2	0
6	เหลืองหอม	U 45	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	4	0
7	จะนอไหน	U 46	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	2	5
8	ลายซาน	U 48	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	4	5
9	ห้วยแล้ง	U 50	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	3	2
10	ปิอิซูแม่ฟาง	U 51	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	2	3
11	ข้าวกอแผ่	U 52	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	3	2
12	เหลืองลีซอ	U 55	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	2	5
13	ข้าวแดง	U 56	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	1	3
14	ข้าวมันหมู	U57	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	1	1
15	งอเซระ	U 60	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	3	0
16	หมานหนัก	S 71	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	2	6
17	นางมา	S 72	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	2	6
18	เหนียวนาคราช	S 73	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	2	5
19	เหนียวหอม	S 74	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	2	6
20	แมะแยง	S 75	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	2	5
21	ดอกพวง	S 76	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	2	2
22	ขืนดิน	S 77	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	2	5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 17 (ต่อ)

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	แหล่งที่มา	จำนวนแอลลีลต้านทาน	ระดับความรุนแรง
23	แม่ห้าง	L54	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	2	0
24	พานทอง	L 55	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	2	1
25	อีปี๊ด	L 56	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	2	0
26	ป้องแอ้ว 2	L 68	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	1	5
27	หอมทุ่ง 20990	E 141	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	2	5
28	ชัยนาท 1	R 2	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม	1	4
29	IR64	R 20	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม	2	5
30	KDML 105	C1	susceptible checking	0	6

จากข้อมูลการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3 Pigm(t)* และ *Pi54* พบว่าข้าวตัวอย่างส่วนใหญ่มีแอลลีลต้านทานอย่างน้อย 1 ตำแหน่ง และพบว่าข้าวที่มียีนต้านทานหลายตำแหน่ง จะมีความสามารถในการต้านทานต่อโรคไหม้ได้ดี เช่น ข้าวเหลืองหอม (U45) มีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ 3 ตำแหน่ง จึงมีความสามารถในการต้านทานต่อโรคไหม้ (ความรุนแรงของโรคระดับ 0) และข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ใช้เป็นพันธุ์ susceptible checking ไม่มีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ จึงพบว่า แต่พบว่าข้าวตัวอย่างส่วนใหญ่ มีระดับความรุนแรงของโรค ไม่สัมพันธ์กันกับจำนวนแอลลีลที่ต้านทานโรค เช่น ข้าวลายซาน (U48) มีจำนวนแอลลีลต้านทานโรคจำนวน 3 ตำแหน่ง แต่ไม่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้ (มีระดับความรุนแรงของโรคระดับ 5) หรือ ข้าวปือก่อ (U41) มีจำนวนแอลลีลต้านทานโรคจำนวน 1 ตำแหน่ง แต่มีความสามารถในการต้านทานต่อโรคไหม้ (ความรุนแรงของโรคระดับ 0) และข้าวมันหมู (U57) มีไม่มีแอลลีลต้านทานโรค แต่มีความสามารถในการต้านทานต่อโรคไหม้ (ความรุนแรงของโรคระดับ 1) อาจเนื่องจากข้าวพันธุ์ดังกล่าวมีแอลลีลอื่นที่ไม่ได้ตรวจสอบและแอลลีลนั้นเป็นแอลลีลที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ที่เฉพาะเจาะจงกับสายพันธุ์ของเชื้อราโรคไหม้ที่ใช้ในการตรวจสอล และจากข้อมูลพบว่าข้าวพันธุ์ส่งเสริม เช่น ชัยนาท 1 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่ได้จากการผสม 3 ทาง ระหว่างสายพันธุ์ IR13146-158-1 และสายพันธุ์ IR15314-43-2-3-3 กับ BKN6995-16-1-1-2 เมื่อปี พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2525 และได้ประกาศเป็นพันธุ์รับรองเมื่อปี พ.ศ. 2536 โดยมีคุณสมบัติเด่น คือ ให้ผลผลิตสูง มีความต้านทานต่อโรคใบหงิกและโรคไหม้ (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2544; มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, 2547) แต่จากผลการทดลองพบว่าข้าวชัยนาท 1 นี้มีความต้านทานต่อโรคได้ระดับปานกลาง (ความรุนแรงของโรคระดับ 4) อาจเกิดเพราะข้าวชัยนาท 1 นี้ ได้รับการประกาศและส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 ส่วนเชื้อราที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ มีสายพันธุ์ที่ระบาดในปีปัจจุบันด้วย จึงอาจเป็นไปได้ว่า เชื้อราได้เกิดวิวัฒนาการและสามารถต้านทานต่อการต้านทานของโรคไหม้ในข้าวนี้ได้ ส่วนข้าว IR 64 เป็นสายพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะความต้านทานแบบกว้าง (broad spectrum resistance) จึงอาจเป็นไปได้ว่าความต้านทานนี้ไม่ได้เฉพาะเจาะจงกับเชื้อราสายพันธุ์ที่ระบาดอยู่ในปัจจุบัน และจากผลการทดลองพบว่า ความสามารถในการต้านทานต่อโรคไหม้จะมากขึ้น ถ้ามีจำนวนแอลลีลที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคเพิ่มขึ้น ดังนั้นเราควรหาข้อมูลแอลลีลต้านทานโรคจากการตรวจหายีนต้านทานโรคไหม้ต่อเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อจะได้นำมาเป็นข้อมูลสำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการต้านทานต่อโรคไหม้ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. จากการค้นหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย จำนวน 203 พันธุ์ ประกอบด้วย ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 19 พันธุ์ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 40 พันธุ์ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 99 พันธุ์ และข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 45 พันธุ์ ข้าวพันธุ์ส่งเสริม จำนวน 21 พันธุ์ และมีข้าวพันธุ์ไม่ต้านทานเปรียบเทียบ 2 พันธุ์ คือข้าวนิปปอนบาร์เล่ย์ และข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อยีนต้านทานโรคไหม้ 3 ตำแหน่งคือ *Pid3*, *Pigm(t)* และ *Pi54* ผลจากการตรวจสอบพบยีนต้านทานโรคไหม้ ได้ผลดังตารางที่ 18

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่18 การกระจายตัวของแอลลีลยีนต้านทานโรคไหม้

พันธุ์ข้าว	จำนวนพันธุ์ที่ตรวจสอบ	Pid3 CAPS2 marker			Pigm(t) C5483 marker			Pigm(t) S29742 marker				Pi54 MAS marker		
		จำนวนพันธุ์ที่ PCR ได้	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลีล R	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลีล S	จำนวนพันธุ์ที่ PCR ได้	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลีล R	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลีล S	จำนวนพันธุ์ที่ PCR ได้	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลีล R	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลิล S	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลิล X	จำนวนพันธุ์ที่PCR ได้	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลิล R	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลิล S
ข้าวไร่ภาคเหนือ	19	19	10	9	19	17	2	19	15	4	0	19	10	9
ข้าวนาสวน														
ภาคใต้	40	40	0	40	40	40	0	40	33	2	5	40	0	40
ข้าวภาคอีสาน	144	144	7	137	144	144	0	144	103	29	12	144	0	144
- ข้าวนาสวน	99	99	5	94	99	99	0	99	66	22	11	99	0	99
- ข้าวขึ้นน้ำ	45	45	2	43	45	45	0	45	37	7	1	45	0	45
ข้าวพันธุ์ส่งเสริม	21	21	6	15	16	14	2	18	9	9	0	21	6	15
พันธุ์เปรียบเทียบ	2	2	1	1	2	0	2	2	0	2	0	2	0	2
- KDML 105	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1
- NPB	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1
รวม	226	226	24	202	226	215	6	223	160	46	17	226	16	210

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พบว่า ข้าวพื้นเมืองของไทยส่วนใหญ่ (จำนวน 159 พันธุ์จาก 203 พันธุ์) มียีนต้านทานโรคไหม้อย่างน้อยหนึ่งตำแหน่ง และมีข้าวพื้นเมืองจำนวน 4 พันธุ์ คือ ข้าวปือเกษตร ข้าวเหลืองหอม ข้าวลายซาน และข้าวเหนียวกล่ำหอมแสงลีซอ มียีนต้านทานโรคไหม้ทั้ง 3 ตำแหน่ง ซึ่งทั้งข้าวทั้ง 4 พันธุ์ดังกล่าวล้วนเป็นข้าวไร่พื้นเมืองของภาคเหนือ ข้อมูลจากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ต่อไปในอนาคต เพราะโดยปกติยีนต้านทานโรคไหม้จะสูญเสียความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อ *M. grisea* เมื่อเวลาผ่านไป เนื่องจากความหลากหลายของเชื้อก่อโรคและวิวัฒนาการ วิธีการหนึ่งที่จะเอาชนะปัญหานี้คือ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มียีนต้านทานหลายยีนในข้าวหนึ่งสายพันธุ์เพื่อให้สามารถต้านทานเชื้อ *M. grisea* ได้หลากหลายไอโซเลท (Bonman *et al.* 1992) ดังนั้นการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ตัวใหม่ๆ ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจึงเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการพิจารณาคัดเลือกพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของไทยให้ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ที่มีความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมสูงและเป็นข้อมูลในการเก็บรักษาพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีลักษณะที่ดีเอาไว้

2. การศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองทางโรคไหม้ของข้าวตัวอย่างจำนวน 30 พันธุ์ พบว่าข้าวพันธุ์ที่จำนวนแอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานเป็นจำนวนมาก จะมีความสามารถในการต้านทานโรคไหม้มากกว่าข้าวที่มีแอลลีลควบคุมลักษณะต้านทานจำนวนน้อย ส่วนข้าวข้าวดอกมะลิ 105 ไม่มีความสามารถในการต้านทานต่อโรค ซึ่งวิธีการที่ดีที่สุดในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อโรคไหม้ คือการทำ pyramid resistance genes โดยการรวมเอายีนต้านทานโรคไหม้จำนวนหลายๆ ยีนเข้ามาอยู่รวมกันในข้าวพันธุ์เดียว จะทำให้ข้าวพันธุ์นั้นสามารถต้านทานเชื้อโรคไหม้แบบ Broad-spectrum disease resistance (Correa-Victoria *et al.*, 2002; Bonman *et al.*, 1992) คือ มีความสามารถในการต้านทานเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์หลักที่ระบาดมาก และมีความสามารถในการต้านทานเชื้อโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์ และเมื่อเวลาผ่านไปความสามารถในการต้านทานต่อโรคจะลดลง เนื่องจากความหลากหลายของเชื้อก่อโรคและวิวัฒนาการ วิธีการหนึ่งที่จะเอาชนะปัญหานี้คือ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มียีนต้านทานหลายยีนในข้าวหนึ่งสายพันธุ์เพื่อให้สามารถต้านทานเชื้อ *M. grisea* ได้หลากหลายไอโซเลท (Bonman *et al.* 1992)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

1. การค้นหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรคเชื้อราไหม้ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยในแต่ละยีนนั้นควรมีข้าวพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่มียีนต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้และไม่มียีนต้านทนโรคไหม้ เพื่อที่จะใช้เป็นตัวเปรียบเทียบรูปแบบแอลลีลกับตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมือง เพื่อผลที่ถูกต้องและแม่นยำขึ้น และควรทำการยืนยันผลขั้นสุดท้ายด้วยการส่งตัวอย่างไปหาลำดับเบส

2. การสำรวจแหล่งพันธุกรรม ของยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองของไทย สามารถใช้เป็นข้อมูลทางพันธุกรรมในระดับยีน ในการอนุรักษ์และเก็บรักษาสายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของไทยไม่ให้สูญหายไปจากท้องถิ่น และเป็นการอนุรักษ์สายพันธุ์ที่เป็นแหล่งยีนสำคัญ เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไทยให้เหมาะสมกับสภาพท้องถิ่นต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมการข้าว. 2552ก. **สรุปรายงานสถานการณ์โรคและแมลงศัตรูข้าวประจำสัปดาห์ 21-27 สิงหาคม 2552.**

กรมการข้าว. 2552ข. **สรุปรายงานสถานการณ์โรคและแมลงศัตรูข้าวประจำสัปดาห์ 9-15 ตุลาคม 2552.**

กรมการข้าว. 2554. **การอนุรักษ์พันธุกรรมข้าว**. แห่งที่มา: http://www.brrd.in.th/rkb/data_002/rice_xx2-02_New_index.html, 20 มกราคม 2554.

ข่าวสด. 2552. กรุงเทพฯ: 23 มกราคม 2552. หน้า 1.

จำรัส โปร่งศิริวัฒนา. 2534. **ความรู้เรื่องข้าว**. สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

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

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

ทัศนีย์ สงวนสัจ. 2540. **บทบาทของพันธุกรรมต้านทานโรคและแมลงกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของไทย**. ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

นิตศรีย์ แสงเดือน. 2551. **พันธุศาสตร์พืช**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เบนิโต เอส เวอการา. 2542. **ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการปลูกข้าว**. ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ.

บ้านเมือง. 2553. กรุงเทพฯ: 24 กันยายน 2553. หน้า 14.

บุญหงษ์ จงคิด. 2549. **ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต**. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ผู้จัดการ ASTV. 2553. กรุงเทพฯ: 24 กันยายน 2553. หน้า 7.

พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์, พยอม โคเบลลี่, อัจฉาพร ณ ลำปาง เนินพลับ, ถนอมจิตร์ ฤทธิ์มนตรี , กุลชนา เกศสุวรรณ, ชนสิริน กลิ่นมณี และสงวน เที่ยงดีฤทธิ์. 2550. การตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทย. **Thai Rice Res. J.** 1: 52-64.

ภัทรดา ฤทธิ์แตง และ กมลพร สิทธิชัย. 2552. **ข้าวพื้นเมือง ข้าวแท้ของไทย**. แหล่งที่มา: http://www.bangkokbiznews.com/home/detail/life-style/lifestyle/20090126/10234/ข้าวพื้นเมือง ข้าวแท้ ของไทย.html, 26 มกราคม 2553.

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 2547. **โครงการข้าวเพื่อความยั่งยืน**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

มูลนิธิข้าวไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์. 2547. **ข้าว ขวัญของแผ่นดิน**. มูลนิธิข้าวไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์, กรุงเทพฯ.

ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี. 2553. โรคไหม้ข้าวระบาดในพันธุ์ข้าว กข15. **ข่าวสถานการณ์ข้าว**. แหล่งที่มา: http://ubn.brrd.in.th/web/index.php/2009-09-23-11-00-21, 20 มกราคม 2554.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 2544. **วิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีกับข้าวไทย**. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

สมคิด ดิสถาพร, อรุณี สุรินทร์, พากเพียร อรัญนารถ, อรพิน ถิระวัฒน์, เจริญ จีนเจียม และพีระ นิยมจันทร์. 2542. **โรคไหม้ของข้าว**. กองป้องกันและกำจัดศัตรูพืช กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. 2551ก. **สถิติการส่งออกข้าวรวม**. **สถิติการนำเข้า และส่งออก**. แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php, 20 ธันวาคม 2551.

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. 2551ข. **ผลผลิตข้าวของโลก**. แหล่งที่มา: http://www.thairiceexporters.or.th/world%20rice%20area_yield_prod.htm, 20 พฤศจิกายน 2551.

สมาคมเมล็ดพันธุ์แห่งประเทศไทย. 2549. พันธุ์ข้าวลูกผสม เพื่อข้าวไทยก้าวทันโลก. **ข่าวสารเมล็ดพันธุ์พืช** 13: 3-12.

สายสนม ประดิษฐ์ดวง. 2551. **ข้าวในมิติของอาหารต้านโรค**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร. 2539. **ความรู้คู่ชาวนา**. มีเดีย เพรส, กรุงเทพฯ.

สำนักการค้าข้าวต่างประเทศ. 2545. **สถานการณ์ข้าว**. กองการค้าธัญพืช กรมการค้าต่างประเทศ. แหล่งที่มา: http://www.dft.moc.go.th/document/grain/eng/Rice_situation.htm, 20 พฤษภาคม 2551.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุกัญญา ภัทราชัย. 2536. **ข้าวกับวิถีชีวิตไทย**. แหล่งที่มา: http://www.culture.go.th/knowledge/story/rice/file01.htm, 25 ตุลาคม 2553.

สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2552. **การปรับปรุงพันธุ์พืช**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. **วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี** 2: 47-59.

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2547. **ข้าว: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อิงออน สีแก้ว, ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ และ สุรีพร เกตุงาม. 2553. การค้นหายีนต้านทานต่อโรคไหม้ในข้าว *(Pi-d2)* ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของ ประเทศไทยด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ. **KKU Res. J.** 15: 123-131.

เอกสงวน ชูวิสิฐกุล. 2544. **เทคโนโลยีการผลิตข้าวพันธุ์ดี**. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

เอี่ยม ทองดี. 2538. **ข้าว : วัฒนธรรมและการเปลี่ยนแปลง**. มติชน, กรุงเทพฯ.

Ahn, S.N., Y.K. Kim, H.C. Hong, S.S. Han, S.J. Kwon, H.C. Choi, , H.P. Moon and S.R. McCouch. 2000. Molecular mapping of a new gene for resistance to rice blast (Pyricularia grisea Sacc.). **Euphytica** 116:17–22.

Amante-Bordeos, A., L.A. Sitch, R. Nelson, R.D. Damacio, N.P. Oliva, H. Aswidinnoor and H. Leung. 1992. Transfer of bacterial blight and blast resistance from the tetraploid wild rice *Oryza minuta* to cultivated rice, *Oryza sativa*. **Theor. Appl. Genet**. 84: 345-354.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Arumuganathan, K. and E.D Earle. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Mol. Biology Rept**. 9: 208-218.

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. **Genet.** 80: 2267–2276.

Bai, J., L.A. Pennill, J. Ning, S.W. Lee and J. Ramalingam. 2002. Diversity in nucleotide binding site-leucine-rich repeat genes in cereals. **Genome Res**. 12: 1871-1884.

Baker, B., P. Zambryski, B. Staskawicz and S.P. Dinesh-Kumar. 1997. Signaling in plant–microbe interactions. **Sci**. 276: 726– 733.

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 insides into partial and complete resistance. **MPMI.** 21: 559-568.

Bent, A.F., B.N. 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. **Sci**. 265: 1856–1860.

Berruyer, R., H. Adreit, J. Milazzo, S. Gaillard, A. Berger, W. Dioh, M.H. Lebrun and D. Tharreau. 2003. Identification and fine mapping of *Pi33*, the rice resistance gene corresponding to the *Magnaporthe grisea* avirulence gene *ACE1*. **Theory Appl. Genet**. 107: 1139–1147.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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.

Bonman, J.M. and D.J. Mackill. 1988. Durable resistance to rice blast. **Oryza** 25:103–110.

Braun, E.J. and R.J. Howard. 1994. Adhesion of *Cochliobolus heterostrophus* conidia and germlings to leaves and artificial surfaces. **Exp. Mycol**. 18: 211-220.

Bryan, G.T., K.S. Wu, L. Farrall, Y. Jia, H.P. Hershey, S.A. McAdams, K.N. Faulk, G.K. Domaldson, R. Tarchini and B. Valent. 2000. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. **Plant Cell** 12: 2033-2045.

Chang, T.T. 1976. The origin, evolution, cultivation, dissemination and diversification of Asia and African rice. **Euphytica** 25: 425-441.

Chen, D., R.S. Zeigler, S.W. Ahn and R.J. Nelson. 1996. Phenotypic characterization of the rice blast resistance gene *Pi-2(t)*. **Rice Plant Dis**. 80: 52-56.

Chen, D.H., M. dela Vina, T. Inukai, D.J. Mackill, P.C. Ronald and J. R. Nelson. 1999. Molecular mapping of the blast resistance gene, *Pi44(t)* in a line derived from a durably resistant rice cultivar. **Theor. Appl. Genet**. 98:1046–1053.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Chen, D. H., R.J. Nelson, G.L. Wang, D.J. MacKill and P.C. Ronald. 2000. **Advances in DNA-Based Markers in Plants.** Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Chen, H.L., B.T. Chen, D.P. Zhang, Y.F. Xie and Q.F. Zhang. 2001. Pathotypes of *Pyricularia grisea* in rice fields of central and southern China. **Plant Dis** 85: 843–850.

Chen, H., S. Wang, Y. Xing, C. Xu, P.M. Hayes and Q. Zhang. 2003. Comparative analyses of genomic locations and race specificities of loci for quantitative resistance to Pyricularia grisea in rice and barley. **Proc.Natl. Acad.Sci.USA.** 100: 2544–2549.

Chen, J., Y.F. Shi, W.Z. Liu, R.Y. Chai, Y.P. Fu, J.Y. Zhuang and J.L. Wu. 2011. A *Pid3* Allele from rice cultivar Gumei2 confers resistance to *Magnaporthe Oryzae*. **JGG** 38(5): 209-16.

Chen, S., L. Wang, Z.Q. Que, R. Q. Pan and Q. H. Pan. 2005. Genetic and physical mapping of *Pi37(t)*, a new gene conferring resistance to rice blast in the famous cultivar St. No. 1. **Theor. Appl. Genet.** 111: 1563–1570.

Chen, X.W., J.J. Shang, D.X. Chen, C.L. Lei, Y. Zou, W.X. Zhai, G.Z. Liu, J.C. Xu, Z.Z. Ling, G. Cao, B.T. Ma, Y.P. Wang, X.F. Zhao, S.G Li and L.H. Zhu. 2006. A β-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. **Plant J.** 46: 794-804.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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.

.Collins, N., J. Drake, M. Ayliffe, Q. Sun and J. Ellis. 1999. Molecular characterization of the maize Rp1-D rust resistance haplotype and its mutants. **Plant Cell** 11: 1365–1376.

Conaway-Bormans, C.A., M.A. Marchetti, C.W. Johnson, A.M. McClung and W.D. Park. 2003. Molecular markers linked to the blast resistance gene *Pi-z* in rice for use in marker assisted selection. **Theor. Appl. Genet**. 107: 1014–1020.

Correa-Victoria, F.J., D. Tharreau, C. Martinez, M. Vales, F. Escobar, G. Prado,and, G. Aricada. 2002. Combinacio´n de genes en arrozpara el desarrollo de resistencia durable a *Pyricularia grisea* en Colombia. **Fitopatologı´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 Sci**. 178:523–530.

Dahu, C., S.Z. Robert, L. Hei and J.N. Rebecca. 1995. Population structure of *Pyricularia grisea* at two screening sites in the Philippines. **Phytopathology** 85: 1011-1020.

Dangl, J. L. and D.G. Jones. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. **Nature** 411: 826–833.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dai, L.Y., X. L. Liu, Y. H. Xiao and G.L. Wang. 2007. Recent advances in cloning and characterization of disease resistance genes in rice. **Integr. Plant Biol J.** 49: 112-119.

Dai, Y.T., Y.L.Jia, J.Correll, X.Y. Wang and Y.L. Wan. 2010. Diversification and evolution of the avirulence gene *AVR-Pita1* in field isolates of *Magnaporthe oryzae*. **Fungal Genet. Biol.** 47: 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. Rehmeyer, 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.

Deng, Y., X. Zhu, Y. Shen and Z. He. 2006. Genetic characterization and fine mapping of the blast resistance locus *Pigm(t)* tightly linked to *Pi2* and *Pi9* in a broad-spectrum resistant Chinese variety. **Theor Appl Genet** 113: 705-713.

Dodds, P.N., G.J. Lawrence and J.G. Ellis. 2001. Six amino acid changes confined to the leucine-rich repeat beta-strand/ beta-turn motif determine the difference between the P and P2 rust resistance specificities in flax. **Plant Cell** 13: 163–178.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12: 13-15.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Ebron, L.A., Y. Fukuta, T. Imbe, H. Kato, J.M.T. Yanoria, H. Tsunematsu, G.S. Khush and M. Yokoo. 2004. Estimation of genes in blast resistance in elite indica-type rice (Oryza sativa L.) varieties bred at the international rice research institute. **Breed Sci.** 54:381–387.

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.

Fjellstrom, R., A.M. McClung and A.R. Shank. 2006. SSR markers closely linked to the *Pi-z* locus are useful for selection of blast resistance in a broad array of rice germplasm. **Mol. Breeding** 17: 149–157.

Fjellstrom, R., C.A. Conaway-Bormans, M.A. Marchetti, A.R. Shank and W.D. Park. 2004. Development of DNA markers suitable for marker assisted selection of three *Pi* genes conferring resistance to multiple *Pyricularia grisea* pathotypes. **Crop Sci.** 44:1790–1798.

Flor, H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. **Annu. Rev. Phytopathol**. 9: 275-296.

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.

Grant, M.R., L. Godiard, E. Straube, T. Ashfield, J. Lewald, A. Sattler, R.W Innes and J.L. Dangl. 1995. Structure of the Arabidopsis *RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. **Sci.** 269: 843–846.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Hammond-Kosack, K.E. and J.D.G. Jones. 1997. Plant disease resistance genes. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol**. 48:.573–607.

Han, S.S. 2001. **Rice Blast**. National Institute of Crop Science, Milyang, Korea.

Hayashi, N. 2005. MAFF Microorganism genetic resources manual. Vol 18. **Rice blast fungus**. NI AS.

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.

Hayashi, K., H. Yoshida and I. Ashikawa, 2006. Development of PCR-based allele-specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes. **Theor. Appl.Genet.** 113: 251–260.

Hayasaka, H., A. Miyao, M. Yano, K. Matsunaga and T. Sasaki. 1996. RFLP mapping of a rice blast resistance gene *Pik*. **Breed. Sci**. 46 (2):68.

Hittalmani, S., A. Parco, T.V. Mew, R.S. Ziegler and N. Huang. 2000. Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice. **Theor. Appl. Genet**. 100:1121–1128.

Hulbert, S. H., C. A. Webb, S. M. Smith and Q. Sun. 2001. Resistance gene complexes: evolution and utilization. **Annu. Rev. Phytopathol**. 39: 285–312.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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. **MPMI** 18:570–582.

Imbe, T., S. Ora, M.J.T. Yanoria and H. Tsunematsu. 1997. A new gene for blast resistance in rice cultivar, IR24. **RGN** 14:60–62.

Inukai T., R.J. Nelson, R.S. Zeigler, S. Sarkarung, D.J. Mackill, J.M. Bonman, I. Takamure and T. Kinoshita. 1994. Allelism of blast resistance genes in near isogenic lines of rice. **Phytopathology** 84: 1278–1283.

Inukai, T., R. S. Zeigler, S. Sarkarung, M. Bronson and L. V. Dung. 1996. Development of pre-isogenic lines for rice blast resistance by marker-aided selection from a recombinant inbred population. Theor. **Appl. Genet.** 93: 560–567.

Iwata, N. 1996. Report of the committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups. **RGN** 13:12– 35.

Jeon, J.S., D. Chen, G.H. Yi, G.L. Wang and P.C. Ronald. 2003. Genetic and physical mapping of *Pi5(t)*, a locus associated with broad-spectrum resistance to rice blast. **Mol. Genet. Genomics** 269:280–289.

Jeung, J.U., B.R Kim, Y.C. Cho, S.S. Han, H.P. Moon, Y.T. Lee and K.K Jena. 2007. A novel gene, *Pi40(t),* linked to the DNA markers derived from NBS-LRR motifs confers broad spectrum of blast resistance in rice. **Theor. Appl. Genet.** 115:1163-1177.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Jia, Y. 2003. Marker assisted selection for the control of rice blast disease. **Pestic Outlook** 14:150–152.

Jia, Y.L., S.A. McAdams and G.T. Bryan. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. **EMBO J**. 19:4004–4014.

Jia Y.L., Wang Z.H., G. Robert, K.A. Fjellstrom, K. Moldenhauer, A.A. Md, C. James ,F.N. Lee, Y.W. Xia and J.N. Rutger. 2004. Rice *Pi-ta* gene Confers Resistance to the Major Pathotypes of the Rice Blast Fungus in the United States. **Phytopathology**. 94 (3): 296-301.

Jia, Y., G. T. Bryan, L. Farrall, and B. Valent. 2003. Natural variation at the *Pi-ta* rice blast resistance locus. **Phytopathology** 93:1452-1459.

.

Jia, Y., Z. Wang and P. Singh. 2002. Development of dominant rice blast *Pi-ta* resistance gene markers. **Crop Sci**. 42:2145– 2149.

Jiang, J. and S. Wang. 2002. Identification of a 118-kb DNA fragment containing the locus of blast resistance gene *Pi-2(t)* in rice. **Mol. Genet. Genomics** 268: 249–252.

Jones, D.A. and J.D.G. Jones. 1997. The role of leucine-rich repeat protein in plant defences. **Theor. Appl. Genet**. 103: 406-414.

Kiyosawa, S. 1972. **Genetics of blast resistance**. Rice breeding IRRI, Manila, Philippines.

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Kiyosawa, S. and W.S. Murty . 1969. The inheritance of blast resistance in India rice variety, HR-22. **Jpn. J. Breed.** 19:269–276.

Konieczny, A. and F.M. Ausubel. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. **Plant J.** 4: 403-410.

Lee, E.J., and S.Y. Cho. 1990. **The Focus on Irrigated Rice**. Seoul, Korea.

Lee, F.N. 1994. **Rice blast disease**. C.A.B. International,Wallingford, UK.

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. **Genet.**181: 1627–1638.

Li, L., L. Wang, J. Jing, Z. Li, F. Lin and Q.H. Pan. 2007. The *Pikm* gene, conferring stable resistance to isolates of *Magnaporthe oryzae*, was finely mapped in a crossover-cold region on rice chromosome 11. **Mol. Breed.** 20:179–188.

Li, W., C.L. Lei, Z.J. Cheng, Y.L. Jia, D.V. Huang, J.L. Wang, J.K. Wang, X. Zhang, N. Su, X.P. Guo, H.Q. Zhai and J.M. Wan. 2008. Identification of SSR markers for a broad-spectrum blast resistance gene *Pi20(t)* for marker-assisted breeding. **Mol. Breed.** 22:141–149.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lin, F., S. Chen, Z.Q. Que, L. Wang, X.Q. Liu and Q.H. Pan. 2007. The blast resistance gene *Pi37* encodes an NBS-LRR protein and is a member of a resistance gene cluster on rice chromosome 1. **Genetics** 177: 1871-1880.

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, X., F. Lin, L. Wang and Q. Pan. 2007a. 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: 2541-2549.

Liu, X., Q. Yang, F. Lin, L. Hua, C. Wang, L. Wang and Q. Pan. 2007b. 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.

Lu G., C. Jantasuriyarat, B. Zhou and G.L. Wang. 2004. Isolation and characterization of novel defense response genes involved in compatible and incompatible interactions between rice and *Magnaporthe grisea*. **Theor. Appl. Genet.** 108:525–534.

Iyer, A.S and S.R. McCouch. 2004. The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. **MPMI** 17: 1348-1354.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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.

Mackill ,D.J. and J.M. Bonman. 1992. Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice. **Phytopathology** 82:746–749.

McCouch, S.R., R.J. Nelson, J. Tohme and R.S. Zeigler. 1994. **Rice Blast disease**, CAB. International in association with International Rice Research Institute. 167-186.

Mekwatanakarn, P., W. Kositratana, M. Levy and R.S. Zeigler. 2000. Pathotype and avirulence gene diversity of *Pyricularia grisea* in Thailand as determined by rice lines near-isogenic for major resistance genes. **Plant Dis**. 84:60–70.

Mekwatanakarn, P., W., Kositratana, T. Phromraksa and R.S. Zeigler. 1999. Sexually fertile *Magnaporthe grisea* rice pathogens in Thailand. **Plant Dis**. 83: 939–943.

Meyers, B.C., A. Kozik, A. Griego H.H. Kuang and R.W. Michelmore. 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. **Plant Cell** 15:809–834.

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.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Meyers, B.C., K.A. Shen, P. Rohani,B.S. Gaut and R.W. Michelmore. 1998. Receptor-like genes in the major resistance locus of lettuce are subject to divergent selection. **Plant Cell** 11: 1833–1846.

Mindrinos, 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. Inheri tance of resistance in rice to races IB-49 and IC-17 of *Pyricularia grisea* rice blast. **Crop Sci**. 32:584–588.

Moldenhauer, K.A.K., K.A. Gravois, F.N. Lee, R.J. Norman, J.L. Bernhardt, B.R. Wells, R.H. Dilday, M.M. Blocker, P.C. Rohman, and T.A. McMinn. 1998. Registration of 'Drew' rice. **Crop Sci.** 38:896–897.

Mohan M., S. Nair, A. Bhagwat, T.G. Krishna, M. Yano, C.R. Bhatia and T. Sasaki. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker assisted selection in crop plants. **Euphytica** 3:87–103.

Monna, L., A. Miyao, H.S. Zhong, M. Yano, M. Iwamoto, Y. Ume hara, N. Kurata, H. Haysaka, and T. Sasaki. 1997. Saturation mapping with subclones of YACs: DNA marker production targeting the rice blast disease resistance gene, *Pi-b.* **Theor. Appl. Genet**. 94:170–176.

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 nursary in Colombia. **Phytopathology** 83 : 1427-1433.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Moffat, A.S. 1994. Mapping the sequence of disease resistance. **Sci**. 265: 1804–1805.

Miyamoto, M., I. Ando, K. Rybka, O. Kodama and S. Kawasaki. 1996. High resolution mapping of the indica-derived rice blast resistance genes. 1. Pi-b. **MPMI** 9: 6–13.

Nagato, Y. and A. Yoshimura. 1998. Report of the committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups. **RGN** 15:13–74.

Nagato, Y. and A. Yoshimura. 1999. Report of the committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups. **RGN** 16:8–14.

Nakamura, S., S. Asakawa, N. Ohmido, K. Fukui, N. Shimizu and S. Kawasaki. 1997. Construction of an 800-kb contig in the near-centromeric region of the rice blast resistance gene *Pi-ta*2 using a highly representative rice BAC library. **Mol. Gen. Genet.** 254: 611-620.

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.

Ori, N., Y. Eshed, I. Paran, G. Presting, D. Aviv, S. Tanksley, D. Zamir and R. Fluhr. 1997. The I2C family from the wilt disease resistance locus I2 belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. **Plant Cell**, 9: 521– 532.

Pan, Q.H., L. Wang, H. Ikehashi and T. Tanisaka. 1998. Identification of two new genes conferring resistance to 14 rice blast in the Chinese native cultivar Maowangu. **Plant Breed.** 117: 27-31.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Parker, J. E., M. J. Coleman, V. Szabo, L.N. Frost and R. Schmidt. 1997. The Arabidopsis downy mildew resistance gene *RPP5* shares similarity to the toll and interleukin-1 receptors with N and L6. **Plant Cell** 9: 879–894.

Parveliet, J.E. 1979. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. **Ann. Rev. Phytopath** 1: 203-222.

Peng, S. Q., F.Y. Huang, G.C. Sun, E.M. Liu, Y.J. Sun, R.X. Ai, J.X. Zhao, S.Z. Bai and F.H. Xiao. 1996. Studies on durable resistance to blast disease in diVerent latitude for rice. **Scientia Agr. Sinica** 29: 52–58.

Peng, Y.L. and J. Shishiyama. 1988. Temporal sequence of cytological events in rice leaves infected with *Pyricularia oryzae*. **Can. J. Bot.** 66:730–735.

Ou, S. H. 1985. **Rice Diseases**, Ed. 2. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.

Qu, S.H. 1985. Pathogen variability and host resistance in rice blast disease. **Ann. Rev. Phytopathol** 18: 167-187.

Ou, S.H. 1985. Rice diseases. 2nd ed.Commonw.Mycol. Inst.,Kew,UK. Rybka, K., M. Miyamoto, I. Ando, A. Saito, and S. Kawasaki. 1997. High resolution mapping of the *indica*-derived rice blast resistance genes II. *Pi-ta2* and *Pi-ta* and a consideration of their origin. **MPMI** 10: 517–524.

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. **Genet.** 172:1901–1914.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Ramkumar, G. , K. Srinivasarao, K.M. Mohan, I. Sudarshan , A.K.P. Sivaranjani, K. Gopalakrishna, C.N. Neeraja , S.M. Balachandran, R.M. Sundaram, M.S. Prasad, N. Shobha Rani, A.M. Rama Prasad, B.C. Viraktamath and M.S. Adhav. 2011. Development and validation of functional marker targeting an InDel in the major rice blast disease resistance gene *Pi54* (*Pikh*). **Mol. Breed.** 27:129–135.

Rice knowledge bank. 2009. **Introduction to Rice Blast**. Fungal diseases of rice. Available source: http://www.knowledgebank.irri.org/ipm/index.php/rice-blast, September 20, 2009.

Rybka, K., M. Miyamoto, I. Ando, A. Saito, and S. Kawasaki. 1997. High resolution mapping of the indica-derived rice blast resistance genes. II. *Pi-ta2* and *Pi-ta* and a consideration of their origin. **MPMI** 10: 517–524.

Sallaud, C., M. Lorieux, E. Roumen, D. Tharreau, R. Berruyer, P. Svestasrani, O. Garsmeur, A. Ghesquiere and J.L. Notteghem. 2003. Identification of five new blast resistance genes in the highly blast resistant rice variety IR64 using a QTL mapping strategy. **Theoret. Appl. Genet.** 106:794–803.

Sesma, A. and A.E. Osbourn. 2004. The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. **Nature** 431: 582–586.

Saxena, K.M.S., and A.L. Hooker. 1974. A study on the structure of gene *Rp3* for rust resistance in Zea Mays. ***Can.J.Genet.Cytol.*** 16:(4) 857-860.

Sesma, A. and A.E. Osbourn. 2004. The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. **Nature** 431: 582-586.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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, I. 2009. Identification of a new rice blast resistance gene, *Pid3*, by genomewide comparison of paired Nucleotide-Binding Site–Leucine-Rich Repeat genes and their pseudogene alleles between the two sequenced rice genomes. **Genet**. 182: 1303–1311.

Sharma, T.R., R.S. Chauhan, B.M. Singh, R. Paul, V. Sagar and R. Rathore. 2002. RAPD and pathotype analysis of Magnaporthe grisea population from North-Western Himalayan region of India. **J. Phytopathol**. 150: 649–656.

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.

Sharma, T.R., A.K. Rai, G.K. Gupta and N.K. Singh. 2010. Broad spectrum blast resistance gene *Pikh* cloned from the rice line tetep designated as *Pi54*. **J. Plant Biochem. Biotechnol**. 19:1

Shen, M. G. and J.Y. Lin. 1994. **Rice Blast Disease**. CAB International/IRRI, Wallingford, U.K.

Shen, Y., H. Adreit, X.D. Zhu, J. Milazzo, H.Q. Chen and D. Tharreau. 2004. Resistance evaluation of some hybrid rice, conventional early *indica* and late *japonica* rice to *Magnaporthe grisea* in China. **Scientia Agr.Sinica** 37: 362–369.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Shinoda, H., K. Toriyama, T. Yunoki, A. Ezuka and Y. Sakurai. 1971. Studies in the varietal resistance of rice to blast. 6. Linkage relationship of blast resistance genes (in Japanese with English summary) **Bull. Chugoku Agric. Exp. Stn. Ser. A.** 20: 1-25.

Silue, D., J.L. Notteghem and D. Tharreau. 1992. Evidence for a genefor- gene relationship in the *Oryza sativa-Magnaporthe grisea* pathosystem. **Phytopathology** 82:577–580.

Sirithunya, P., T. Sreewongchai, S. Sriprakhon, T. Toojinda, S. Pimpisithavorn, C. Kosawang and P. Smitamana. 2008. Assessment of Genetic Diversity in Thai Isolates of *Pyricularia grisea* by Random Amplification of Polymorphic DNA. **J. Phytopathology** 156 (4): 196-204.

Smitamana, P., P. Gypmantasiri, W. Phumsathit, S. Panyafu, G. Boonchitsirikul and A. Na Lampang. 2000. **Exploiting biodiversity for sustainable rice pest management, biodiversity and its relation to rice blast epidemics: Chiang Mai Valley Site, Thailand.** Chiang Mai University and Phitsanulok Rice Research Center, Chiang Mai.

Sobrizal, S. 2007. Rice blast disease in Indonesia. In Japan International Researcher Center for agricultural sciences (JIRCAS), Tsukuba, **Japan Working Report**. 53: 71-79.

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, encodes an LRR receptor kinase-like protein. **Plant J.** 37:517–527.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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.

Talbot, N.J. 2003. On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. **Annu. Rev. Microbiol.** 57: 177-202.

Traut, T. W., 1994 The function and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide binding sites. **Eur. J. Biochem**. 229: 9–19.

Tsunematsu, H., M.J.T. Yanoria, L.A. Ebron, N. Hayashi, I. Ando, H. Kato, T. Imbe and G.S. Khush. 2000. Development of monogenic lines of rice for rice blast resistance. **Breed. Sci.** 50: 229–234.

Valent, B. 1990. Rice blast as a model system for plant pathology. **Phytopathology** 80: 33–36.

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.

Wang, C., M. Tan, X. Xu, G. Wen, D. Zhang and X. Lin. 2003. Localizing the bacterial blight resistance gene, *Xa22(t)*, to a 100-kilobase bacterial artificial chromosome. **Phytopathology** 93:1258–1262.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Wang, G.L., D. J. Mackill, J.M. Bonman, S.R. McCouch, M.C. Champoux and R.J. Nelson, 1994. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. **Genet.** 136: 1421–1434.

Wang, Z., G. Taramino, D. Yang, G. Liu, S.V. Tingey, G.H. Miao and G.L. Wang. 2001. Rice ESTs with disease-resistance gene or defense-response gene like sequences mapped to regions containing major resistance genes or QTLs. **Mol. Genet. Genomics** 265: 302-310.

Wang, Z.X., U. Yamanouchi, Y. Katayose, T. Sasaki, and M. Yano. 2001. Expression of the *Pib* rice-blast-resistance gene family is up-regulated by environmental conditions favouring infection and by chemical signals that trigger secondary plant defenses. **Plant Mol. Biol**. 47: 653-661.

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

Wei, F.S., 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.

Widawsky, D.A. and J.C. O'Toole. 1990. **Prioritizing the Rice Biotechnology Research Agenda for Eastern India**. The Rockefeller Foundation, New York.

Witcombe J.R. and C.T. Hash. 2000. Resistance gene deployment strategies in cereal hybrids using markers-assisted selection: gene pyramiding, three-way hybrids, and synthetic parent populations. **Euphytica** 112:175–186.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Wu J., J. Jiang, H. Chen and S. Wang. 2002. Fine mapping of rice blast resistance gene Pi-2(t). **Acta Agromomica Sinica** 28:505–509.

Xiang Y., Y.L. Cao, C.G. Xu, X.H. Li and S.P. Wang. 2006. *Xa3*, conferring resistance for rice bacterial blight and encoding a receptor kinase-like protein, is the same as *Xa26*. **Theor. Appl. Genet.** 113:1347–1135.

Xu, X., N. Hayashi, C.T. Wang, H. Kato, T. Fujimura and S. Kawasaki. 2008. Efficient authentic fine mapping of the rice blast resistance gene *Pik-h* in the *Pik* cluster, using new Pik-h differentiating isolates. **Mol. Breeding** 22:289–299.

Xia, J.Q., J.C. Correll, F.N. Lee, M.A. Marchetti, and D.D. Rhoads. 1993. DNA fingerprinting to examine microgeographic variation in the *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia grisea*) population in two rice fields in Arkansas. **Phytopathology** 83:1029–1035.

Yahiaoui, 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.

Yamaguchi, I. 2004. **Overview on the chemical control of rice blast disease**. Pages 1-13 in: Rice blast: Interaction with Rice and Control. S. Kawasaki, ed. Kluwer Academic Press, Dordrecht.

Yu Z., D.J. Mackill, J.M. Bonman, S. McCouch, E. Guiderdoni, J.L. Notteghem and S.D. Tanksley. 1996. Molecular mapping of genes for resistance to rice blast (*Pyricularia grisea* Sacc.) **Theor. Appl. Genet**. 93:859–863.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Yu, Z.H., D.J. Mackill, J.M. Bonman and S.D. Tanksley (1991) Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers.Theor Appl Genet 81:471–476

Zeigler, R.S., S.A. Leong and P.S. Teng. 1994. **Rice blast disease**. CAB International, Wallingford, UK.

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*. **MPMI** 19: 1216–1228.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. Extraction buffer

ประกอบด้วย

1M Tris-HCl pH 8.0

0.5M EDTA pH 8.0

5M NaCl

CTAB

β-mercaptoethanol

ขั้นตอนการเตรียม

ตวงสารต่างๆให้ได้ปริมาณดังต่อไปนี้

1 M Tris-HCL pH 8.0	ปริมาตร	10	มิลลิลิตร
0.5M EDTA pH 8.0	ปริมาตร	4	มิลลิลิตร
5 M NaCl	ปริมาตร	28	มิลลิลิตร
CTAB	2 กรัม		
β-mercaptoethanol	ปริมาตร	2	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำ sterile

2. สารละลาย 1 M Tris base

เตรียมโดย ชั่งสาร Tris base ปริมาณ 12.114 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 100มิลลิลิตร นำสารละลายที่เตรียมได้ทำการฆ่าเชื้อโดยการ autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. สารละลาย 0.1 N HCl

สารตั้งต้นมีความเข้มข้นเท่ากับ 12.08 N

จาก $C_1V_1 = C_2V_2$

(12.08 N) V_1 = (0.1N)(100 มิลลิลิตร)

V_1 = 8.278 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตวง HCl 8.278 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติมลงในน้ำกลั่น sterile 91.722 มิลิลิตร

4. สารละลาย 1M Tris-HCl pH 8.0

ตวง Tris base ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.1N NaCl ปริมาตร 9.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ sterile และทำการปรับ pH ให้ได้ 8.0

5. สารละลาย 0.5 M EDTA pH 8.0

ชั่งสาร EDTA 18.164 กรัม ละลายด้วยน้ำ sterile ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และทำการปรับ pH ให้ได้ 8.0

6. สารละลาย 5M NaCl

ชั่งสาร NaCl 29.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่เตรียมได้ทำการฆ่าเชื้อโดยการ autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

7. 10X TBE buffer (1 ลิตร)

ชั่งสาร Tris base 108 กรัม และ Boric acid 55 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติม sterile 40 มิลลิลิตร ของ 500 mM EDTA pH 8.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น sterile 0.5X buffer (1 ลิตร) ตวง 10X TBE buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมด้วยน้ำกลั่น sterile ปริมาตร 950 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

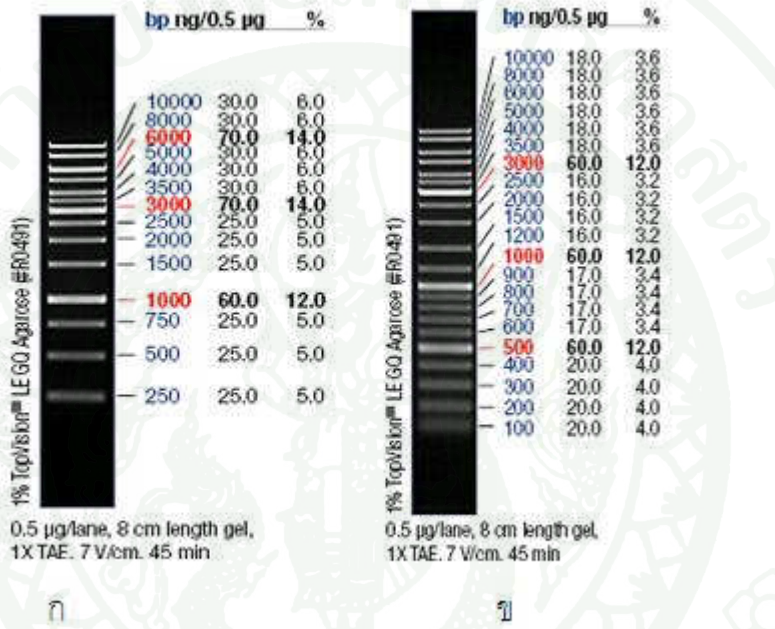
8. 6X Gel-loading buffer (10 มิลลิลิตร)

Bromphenol blue sucrose solution (0.25% (W/V) Bromphenol blue, 80% (W/V) Sucrose in H_2O) ละลาย Bromphenol blue 25 มิลลิกรัม Sucrose 8 กรัม ลงในน้ำกลั่น sterile ปริมาตร 8 มิลลิลิตร หลังละลายแล้ว ทำการปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9. Ethidium bromide (10 mg/ml) 100 **มิลลิลิตร**

ละลาย Ethidium bromide 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดกล่องหรือภาชนะที่มี Aluminum foil หุ้ม ที่อุณหภูมิห้อง



ภาพผนวกที่ ก1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา

ก คือ Fermentas GeneRuler™ 1 Kb ladder

ข คือ Fermentas GeneRuler™ DNA ladder mix

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

การสกัดดีเอ็นเอ และข้อควรระวัง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างใบอ่อนข้าวอายุประมาณ 3-4 สัปดาห์ มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี CTAB method ของ Lodhi และคณะ (1994)

1.1 นำตัวอย่างใบข้าวสดมา 0.3 - 0.5 กรัม บดให้ละเอียดในโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลว

1.2 ตักตัวอย่างข้าวใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 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 % B- mercaptoethanol] ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันอย่างดี บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาเบาๆทุก 10 นาที

1.3 นำหลอดทดลองมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24 : 1) ปริมาตร 840 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน

1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

1.5 ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดทดลองใหม่เติมสารละลายเย็น iso- propanol ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายที่ดูดได้ ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

1.6 นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และ เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้

1.7 ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยเอธิลแอลกอฮอล์เย็น 95% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง

1.8 ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ครั้งที่สอง ด้วย เอธิลแอลกอฮอล์เย็น 70 % ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และตากดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

1.9 ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เมื่อดีเอ็นเอละลายหมดแล้ว กำจัดอาร์เอ็นเอออกโดยการเติม RNase A (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การเก็บรักษาเนื้อเยื่อและการเตรียมดีเอ็นเอ

การศึกษาเทคนิคทางโมเลกุลไม่ว่าจะเป็นการแยกยีน โคลนยีน การถ่ายยีน หรือการตรวจสอบดีเอ็นเอ เพื่อการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่างๆจำเป็นต้องมีตัวอย่างดีเอ็นเอก่อน เพื่อการทดลองในขั้นตอนต่อไป จึงควรรู้จักวิธีการเก็บรักษาเนื้อเยื่อและการเตรียมดีเอ็นเอที่เหมาะสม

2.1 การเก็บรวบรวมและรักษาเนื้อเยื่อ

การสกัดดีเอ็นเอให้ได้คุณภาพดีและปริมาณมากนั้นขึ้นอยู่กับคุณภาพของเนื้อเยื่อที่ใช้ จึงควรสกัดจากเนื้อเยื่อสดทันที หรือ ควรเก็บรักษาเนื้อเยื่อให้สดก่อนนำมาสกัดดีเอ็นเอ ส่วนต่างๆ ของพืชที่นิยมนำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ คือ ใบอ่อน การเก็บรักษาเนื้อเยื่อควรเก็บในที่เย็น ถ้าต้องการเก็บไว้เป็นเวลานานควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และในการเก็บตัวอย่างควรทำให้เนื้อเยื่อแห้งทันทีด้วย silica gel

2.2 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอสามารถทำได้ 2 วิธี คือวัดค่าดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้ Spectrophotometer หรือวัดการเรืองแสงของดีเอ็นเอที่จับตัวกับเอธิเดียมโบรไมด์หลังจากแยกขนาดดีเอ็นเอโดยใช้อิเล็กโทรโฟรีซิส

2.3 วิธีการวัดการดูดกลืนแสง

โมเลกุลของกรดนิวคลีอิกสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร ส่วนโปรตีนจะดูดแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 280 นาโนเมตร การหาปริมาณของกรดนิวคลีอิค โดยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถดูดแสงได้ค่า Absorbance ที่ 260 นาโนเมตร (A260 หรือ OD260) เท่ากับ 1 ส่วนสารละลายอาร์เอ็นเอ หรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ดูดแสงได้ OD260 = 1 มีความเข้มข้น 40 และ 33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ การวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีนี้จะใช้ได้ดีในกรณีที่สารละลายดีเอ็นเอค่อนข้างบริสุทธิ์ ไม่มีอาร์เอ็นเอและโอลิโกนิวคลีโอไทด์เจือปน และต้องมีปริมาณมากพอที่จะอ่านค่า OD ได้ ซึ่งอยู่ในระดับไมโครกรัม ปริมาณที่วัดได้โดยวิธีนี้จะแน่นอน และยังสามารถตรวจสอบคุณภาพ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ได้ โดยเปรียบเทียบค่า OD260 และ OD280 สารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะมีค่าอัตราส่วนระหว่าง OD260/OD280 ประมาณ 1.7-1.8 ถ้าได้ค่ามากแสดงว่าอาจมีอาร์เอ็นเอปน และถ้าค่าต่ำแสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือฟีนอล

2.4 วิธีการเรืองแสงร่วมกับเอธิเดียมโบรไมด์

วิธีวัดการเรืองแสง ทำโดยนำดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปแทรกอยู่ในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และเมื่อนำไปส่องแสงอัลตราไวโอเลตจะเกิดการเรืองแสง โดยความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้ว จะสามารถบอกปริมาณของดีเอ็นเอตัวอย่างโดยประมาณได้ โดยปริมาณที่ตรวจสอบได้เป็นระดับนาโนกรัม

2.5 การแตกหักของโมเลกุลดีเอ็นเอ

อาจเกิดเนื่องจากกระบวนการในการสกัดดีเอ็นเอจากพลังงานกล เช่น การปั่นเหวี่ยงการเขย่า หรือ อาจเกิดจากเอ็นไซม์ แสงอัลตราไวโอเลต ดังนั้นในการทดลองควรหลีกเลี่ยงสาเหตุที่ทำให้เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ

2.6 การปนเปื้อนของสารเคมีในสารละลายดีเอ็นเอ

สารเคมีที่อาจปนเปื้อนอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอ ได้แก่ สารโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีน พอลิแซ็กคาไรด์ ดีเอ็นเอจากตัวอย่างอื่น และอาร์เอ็นเอ เป็นต้น นอกจากนี้อาจมีการปนเปื้อนของแอลกอฮอล์ ฟีนอล เกลือ หรือจุลินทรีย์ที่ติดมากับเนื้อเยื่อ ซึ่งสารปนเปื้อนเหล่านี้จะรบกวนการปฏิกิริยาของดีเอ็นเอเอง เช่น การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เป็นต้น วิธีการป้องกันการปนเปื้อนคือ ใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสม รักษาความสะอาดของพื้นที่ หรือแยกพื้นที่ปฏิบัติงานที่จำเพาะในงาน

2.7 การเก็บรักษาดีเอ็นเอ

สารละลายดีเอ็นเอควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หรือควรเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ถ้าต้องการเก็บไว้เป็นเวลานาน ส่วนสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการหยิบใช้บ่อยครั้งควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และควรหลีกเลี่ยงการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพราะจะทำให้สารละลายดีเอ็นเอเกิดการเสียสภาพได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ข้อควรระวังในการใช้สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางดีเอ็นเอหลายชนิดต้องใช้ด้วยความระมัดระวังเพราะอาจเป็นอันตรายต่อผู้ใช้ได้

3.1 ethidium Bromide

เอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ มีอันตรายปานกลาง ดังนั้นจึงควรสวมถุงมือขณะทำงานเกี่ยวกับสารนี้

3.2 liquid Nitrogen

ไนโตรเจนเหลวมีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสจึงต้องระมัดระวังไม่ให้สัมผัสกับผิวหนังและควรจับต้องภาชนะที่บรรจุไนโตรเจนเหลวด้วยความระมัดระวัง

3.3 β-mercaptoethanol

β-mercaptoethanol อาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ถ้าสูดดมหรือดูดซึมผ่านผิวหนัง และเป็นอันตรายถ้ากลืนเข้าไป ในสภาพที่ความเข้มข้นสูงๆ จะทำลายเยื่อบุทางเดินหายใจส่วนบน ผิวหนังและดวงตา ดังนั้นขณะใช้จึงควรสวมถุงมือและแว่นตา และทำในตู้ดูดควัน

3.4 phenol

ฟีนอลมีฤทธิ์กัดกร่อนมาก ทำให้ผิวหนังไหม้อย่างรุนแรง ดังนั้นขณะใช้งานจึงควรสวมถุงมือและทำในตู้ดูดควัน ถ้าสัมผัสถูกฟีนอลให้รีบล้างมือด้วยน้ำปริมาณมากๆ และล้างด้วยสบู่

3.5 UV radiation

แสงอัลตราไวโอเลตเป็นอันตรายมากโดยเฉพาะต่อสายตา และเป็นสารก่อกลายพันธุ์และก่อมะเร็งด้วย ดังนั้นจึงควรสวมแว่นหรือหน้ากากกันแสง UV ขณะใช้งาน ห้ามมอง UV ด้วยตาเปล่าเพราะอาจทำให้ตาบอดได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข1 ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอของข้าวพื้นเมือง

No.	พันธุ์ข้าว	รหัส	A260	A280	อัตราส่วน	ความเข้มข้น
1	งอเพือน	U 38	0.530	0.289	1.8318	26.4909
2	ดยาหลี่	U 39	0.546	0.296	1.8450	27.2991
3	ปือก่อ	U 41	0.588	0.350	1.6788	29.4136
4	ปือเกษตร	U 42	0.355	0.206	1.7242	17.7537
5	เหนียวแสงมูเวอ	U 43	0.542	0.320	1.6944	27.0922
6	กะเหรี่ยงขาว	U 44	0.472	0.282	1.6740	23.6028
7	เหลืองหอม	U 45	0.482	0.260	1.8542	24.0762
8	จะนอไหน	U 46	0.295	0.155	1.9020	14.7364
9	ลายซาน	U 48	0.359	0.159	2.2657	17.9573
10	ปิอิ แม่ละ	U 49	0.452	0.248	1.8249	22.6054
11	ห้วยแล้ง	U 50	0.442	0.240	1.8455	22.1217
12	ปิอิ ซูแม่ฟาง	U 51	0.496	0.304	1.6330	24.8138
13	ข้าวกอแผ่	U 52	0.384	0.242	1.5835	19.1803
14	บือขอพอ	U 53	0.302	0.159	1.8921	15.0861
15	เหลืองลีซอ	U 55	0.826	0.450	1.8350	41.2906
16	ข้าวแดง	U 56	0.257	0.144	1.7858	12.8595
17	ข้าวมันหมู	U 57	0.335	0.185	1.8095	16.7608
18	งอเซระ	U 60	0.208	0.083	2.4987	10.3933
19	เหนียวกล่ำหอมแสงลีซอ	U 61	0.355	0.192	1.8461	17.7284
20	หมานหนัก	S 71	0.228	0.146	1.5606	11.3813
21	นางมา	S 72	0.172	0.088	2.538	8.5968
22	เหนียวนาคราช	S 73	0.326	0.182	1.7978	16.3205

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข1 (ต่อ)

No.	พันธุ์ข้าว	รหัส	A260	A280	อัตราส่วน	ความเข้มข้น
23	เหนียวหอม	S 74	0.323	0.142	2.2809	16.1744
24	แมะแยง	S 75	0.344	0.186	1.8428	17.1757
25	ดอกพวง	S 76	0.183	0.074	2.4696	9.1474
26	ขืนดิน	S 77	0.452	0.214	2.115	22.6024
27	ดอกพิกุล	S 78	0.353	0.157	2.246	17.6663
28	ค้ำฉาง	S 79	0.225	0.112	1.9991	11.235
29	สายบัว	S 80	0.362	0.186	1.9504	18.1185
30	ช่อนิมิต	S 81	0.297	0.141	2.1087	14.8529
31	ไร้ไทร	S 82	0.441	0.215	2.0493	22.0469
32	เบาชะมวง	S 83	0.269	0.113	2.3711	13.4267
33	ลูกขอ	S 84	0.246	0.114	2.163	12.2793
34	ซุกิกูลอง	S 85	0.33	0.183	1.8024	16.4798
35	หลายอด	S 86	0.331	0.156	2.1312	16.573
36	ลาเก๊ะงอ	S 87	0.328	0.143	2.2863	16.4024
37	นางทอง	S 88	0.608	0.365	1.665	30.4167
38	ลูกหวาย(จุด)	S 89	0.367	0.199	1.8462	18.347
39	ลูกดำ	S 90	0.46	0.288	1.5997	23.012
40	เชียงใหม่	S 91	0.467	0.311	1.5044	23.3745
41	ลูกแดง	S 92	0.334	0.181	1.846	16.721
42	เล็บนกเบา	S 93	0.303	0.156	1.9445	15.1581
43	ช่อ	S 94	0.397	0.246	1.6149	19.8316
44	ช่อแดง	S 95	0.429	0.28	1.5347	21.4719
45	กูนิง	S 96	0.175	0.093	1.884	8.7593

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข1 (ต่อ)

No.	พันธุ์ข้าว	รหัส	A260	A280	อัตราส่วน	ความเข้มข้น
46	ดอกไม้ไทร	S 97	0.204	0.111	1.8389	10.2231
47	รวงทอง	S 98	0.305	0.215	1.4209	15.2638
48	ลูกปลา	S 99	0.288	0.194	1.4884	14.4195
49	นางกลายแดง	S 100	0.38	0.232	1.6338	18.9882
50	ลากอ	S 101	0.182	0.071	2.5553	9.0893
51	กูนิง	S 102	0.257	0.124	2.0773	12.8413
52	มือจระเข้	S 103	0.159	0.06	2.6476	7.9547
53	ตุลาถัว	S 104	0.166	0.061	2.7245	8.2906
54	หอม	S 105	0.264	0.145	1.8173	13.207
55	กือแซะดำ	S 106	0.22	0.126	1.7425	10.9863
56	ลือบูมาเซาะ	S 107	0.111	0.025	4.4164	5.5251
57	นางรอง	S 108	0.216	0.115	1.8742	10.8204
58	อีกู้ 3	S 109	0.107	0.023	4.5829	5.361
59	อามะ	S 110	0.307	0.172	1.7895	15.3454
60	เก้ารวง 17-2-106	L 1	0.302	0.166	1.8194	15.0733
61	กู้เมือง	L 2	0.337	0.191	1.7599	16.8437
62	ขาวดอกมะลิ 41-1-173	L 3	0.355	0.239	1.4837	17.7588
63	ขาวตาแห้ง 55-5-55	L 4	0.401	0.256	1.5661	20.0402
64	ขาวใหญ่ 33-22-61	L 5	0.245	0.146	1.6729	12.2315
65	ขาวปากหม้อ 74	L 6	0.338	0.201	1.6822	16.9078
66	หลุดหนี้ 75-3-2	L 7	0.255	0.154	1.6514	12.7471
67	เม็ดใหญ่ 94-4-87	L 8	0.272	0.137	1.9814	13.5811
68	ขาวพวง 74-3-38	L 9	0.449	0.27	1.665	22.467

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข1 (ต่อ)

No.	พันธุ์ข้าว	รหัส	A260	A280	อัตราส่วน	ความเข้มข้น
69	เจ้าหางหมูใหญ่	L 10	0.479	0.277	1.7323	23.9619
70	เจ้าหางหมูใหญ่	L 11	0.508	0.299	1.6971	25.3756
71	เจ้าหอม 32-18-69	L 12	0.313	0.154	2.0291	15.6436
72	ใบลด 36-10-90	L 13	0.509	0.311	1.6398	25.4627
73	เจ้าเหลือง 27-3-19	L 14	0.376	0.198	1.9025	18.8054
74	เจ้าเหลือง 27-3-91	L 15	0.515	0.296	1.7434	25.7741
75	เจ้าแฝ 31-28-1	L 16	0.437	0.263	1.6619	21.8709
76	ดอกมะลิ 109-1-119	L 17	0.631	0.364	1.7331	31.5742
77	ใบลด 36-19-40	L 18	0.46	0.285	1.6136	23.0207
78	ใบลด 36-27-29	L 19	0.42	0.244	1.7201	20.9952
79	รวงเดียว 68-10-85	L 20	0.376	0.233	1.6104	18.1918
80	เหลืองใหญ่	L 21	0.38	0.226	1.683	19.0133
81	เหลืองเล็ก 30-1-57	L 22	0.258	0.126	2.0548	12.9179
82	เหลืองนน 6-4-102	L 23	0.313	0.182	1.7214	15.6719
83	บีเค 289	L 24	0.272	0.162	1.6788	13.59
84	บีเค 563	L 25	0.409	0.248	1.6514	20.445
85	ดี้ 569	L 26	0.362	0.187	1.9336	18.0929
86	ขี้ตม 222-24-72	L 27	0.365	0.19	1.9222	18.2436
87	ขี้ตมใหญ่ 35-16-45	L 28	0.359	0.194	1.855	17.9747
88	ขี้ตมขาว 222-42-3	L 29	0.455	0.237	1.9242	22.7672
89	ขี้ตมขาว 222-42-5	L 30	0.369	0.201	1.8344	18.4677
90	งันดง 34-3-95	L 31	0.343	0.223	1.5382	17.1645

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข1 (ต่อ)

No.	พันธุ์ข้าว	รหัส	A260	A280	อัตราส่วน	ความเข้มข้น
91	ดอดอกพร้าว	L 32	0.453	0.265	1.7105	22.6554
92	ขี้ตมหอม	L 33	0.286	0.153	1.8612	14.2836
93	เหนียวดำ	L 34	0.22	0.102	2.157	10.9896
94	ดอป้องแอ้ว	L 35	0.162	0.074	2.1877	8.1114
95	ดอกดู่	L 36	0.288	0.138	2.0921	14.4166
96	ทอง	L 37	0.12	0.052	2.2961	6.0115
97	มันเป็ด	L 38	0.199	0.096	2.0794	9.96
98	ขาว	L 39	0.369	0.218	1.6921	18.4516
99	นางนวล	L 40	0.503	0.269	1.8652	25.1322
100	ขาวกรุง	L 41	0.299	0.166	1.8023	14.9282
101	เหนียวแดง	L 42	0.473	0.274	1.7269	23.646
102	ขาว	L 43	0.389	0.209	1.8606	19.4465
103	ดอขาว	L 44	0.202	0.094	2.1594	10.1168
104	เหลืองบุญมา	L 45	0.136	0.057	2.379	6.7803
105	หมากแข็ง	L 46	0.218	0.11	1.9857	10.883
106	RD6(dummy)	L 47	0.185	0.083	2.227	9.2559
107	เหนียวนางนวล	L 48	0.247	0.12	2.0652	12.3721
108	ดออ่าง	L 49	0.068	0.004	16.4791	3.386
109	ข้าวก่ำ	L 50	0.217	0.103	2.1042	10.8264
110	ป้องแอ้ว	L 51	0.198	0.093	2.1353	9.899
111	อีปง	L 52	0.153	0.082	1.8568	7.6463
112	นางนวล	L 53	0.155	0.063	2.4499	7.732
113	แม่ห้าง	L 54	0.141	0.063	2.2382	7.048

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข1 (ต่อ)

No.	พันธุ์ข้าว	รหัส	A260	A280	อัตราส่วน	ความเข้มข้น
114	พานทอง	L 55	0.228	0.131	1.7379	11.3141
115	อีปี๊ด	L 56	0.298	0.143	2.0848	14.923
116	ดอสามเดือน	L 57	0.193	0.088	2.1797	9.6392
117	ข้าวปน	L 58	0.147	0.076	1.9392	7.3505
118	อีโดน	L 59	0.309	0.204	1.5117	15.4568
119	นางนวล	L 60	0.347	0.226	1.5385	17.3726
120	ดวงจันทร์	L 61	0.29	0.152	1.9023	14.4912
121	ปลาแข็ง	L 62	0.227	0.117	1.9412	11.3671
122	เป็ดน้ำ	L 63	0.182	0.108	1.6833	9.1058
123	พันธุ์หลัก	L 64	0.325	0.191	1.7044	16.2409
124	ข้าวหาง	L 65	0.18	0.087	2.0605	8.9785
125	สามเดือน	L 66	0.266	0.157	1.6886	13.2831
126	ป้องแอ้ว 1	L 67	0.181	0.078	2.3274	9.0341
127	ป้องแอ้ว 2	L 68	0.258	0.152	1.6977	12.8876
128	ป้องแอ้ว	L 69	0.331	0.191	1.7299	16.5592
129	มะปราง	L 70	0.168	0.081	2.0751	8.3912
130	นางคำผาย	L 71	0.307	0.186	1.648	15.3448
131	ขาวใหญ่	L 72	0.276	0.162	1.701	13.8195
132	โอล่อน	L 73	0.28	0.17	1.6485	13.9838
133	ข้าวหอม	L 74	0.261	0.137	1.9039	13.0306
134	ข้าวหอม	L 75	0.167	0.088	1.8959	8.3295
135	ข้าวหอม	L 76	0.302	0.161	1.871	15.0988
136	ข้าวหอม	L 77	0.308	0.188	1.6333	15.3847

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข1 (ต่อ)

No.	พันธุ์ข้าว	รหัส	A260	A280	อัตราส่วน	ความเข้มข้น
137	ข้าวหอม	L 78	0.332	0.208	1.5949	16.5846
138	ข้าวหอม	L 79	0.294	0.185	1.5853	14.6923
139	ข้าวหอม	L 80	0.297	0.179	1.6545	14.8478
140	ข้าวหอม	L 81	0.337	0.183	1.8445	16.8581
141	ข้าวหอม	L 82	0.292	0.157	1.8683	14.6224
142	ข้าวหอม	L 83	0.24	0.147	1.6342	11.989
143	ข้าวหอม	L 84	0.38	0.223	1.7059	19.0106
144	ข้าวหอม	L 85	0.457	0.294	1.5581	22.8717
145	ข้าวหอม	L 86	0.425	0.248	1.7124	21.2607
146	ข้าวหอม	L 87	0.26	0.138	1.8902	13.0069
147	ข้าวหอม	L 88	0.301	0.205	1.4693	15.0362
148	กะทิ	L 89	0.318	0.184	1.7337	15.9185
149	ข้าวดอ	L 90	0.511	0.31	1.6502	25.5432
150	ดอเหลือง	L 91	0.409	0.261	1.5683	20.4713
151	เจ้าขาว	L 92	0.32	0.187	1.7161	16.0229
152	ขาวใหญ่	L 93	0.394	0.246	1.603	19.6983
153	เหลือง	L 94	0.368	0.251	1.4673	18.4233
154	กระดูกเสือ	L 95	0.4	0.248	1.6128	20.0068
155	หอมมะลิ	L 96	0.245	0.138	1.7791	12.2749
156	หอมมะลิ	L 97	0.383	0.236	1.6241	19.1405
157	หอมมะลิ	L 98	0.451	0.23	1.9621	22.5476
158	หอมมะลิ	L 99	0.254	0.128	1.9772	12.686
159	พวงทอง	E 100	0.401	0.22	1.824	20

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข1 (ต่อ)

No.	พันธุ์ข้าว	รหัส	A260	A280	อัตราส่วน	ความเข้มข้น
160	พวงมาลัย 31-5-6	E 101	0.039	0.015	2.623	3.47
161	พวงมาลัย 35-10-8	E 102	0.19	0.069	2.75	9.5
162	โพฉลอง 31-34-20	E 103	0.092	0.05	1.83	8.45,
163	จำปาจีน 84-8-16	E 104	0.409	0.232	1.7668	20.4548
164	จำปาจีน 84-8-22	E 105	0.158	0.097	1.6329	7.8804
165	สว่างอารมณ์	E 106	0.127	0.084	1.5146	6.3636
166	ข้าวเบาที่หนึ่ง	E 107	0.205	0.093	2.2146	10.2615
167	ไข่แมงดา	E 108	0.136	0.068	1.9944	6.8053
168	ลอยใหญ่	E 109	0.229	0.132	1.7322	11.4749
169	เม็ดเล็กหนัก	E 110	0.212	0.118	1.7993	10.5905
170	พญาชม	E 111	0.264	0.156	1.695	13.2093
171	เขียว	E 112	0.192	0.101	1.9056	9.6178
172	ขาวปราจีน	E 113	0.237	0.134	1.7643	11.8493
173	เจ๊กกระโดด	E 114	0.391	0.21	1.8601	19.5564
174	รวงเดียว	E 115	0.072	0.01	7.4665	3.6151
175	เจ้าลอย	E 116	0.133	0.051	2.5976	6.6648
176	เหลืองกล้วย	E 117	0.248	0.12	2.0623	12.4196
177	คุณแม่	E 118	0.166	0.087	1.9112	8.2999
178	ขาวยายคลี่	E 119	0.368	0.202	1.8173	18.3947
179	ขาวเสมอ	E 120	0.151	0.091	1.6656	7.548
180	เหลืองพวงทอง	E 121	0.268	0.143	1.8825	13.4146
181	เหลืองอนันต์	E 122	0.178	0.068	2.6151	8.8832
182	ขาวลี้	E 123	0.18	0.081	2.2322	8.9948

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข1 (ต่อ)

No.	พันธุ์ข้าว	รหัส	A260	A280	อัตราส่วน	ความเข้มข้น
183	ขาวตาหยัด	E 124	0.16	0.135	1.1852	7.9974
184	นางเขียว	E 125	0.22	0.11	1.9919	1.9919
185	ลอยสายบัว	E 126	0.196	0.102	1.9196	9.7923
186	นางเขียว	E 127	0.122	0.07	1.7366	6.0894
187	นางเขียว	E 128	0.151	0.081	1.8679	7.5393
188	เกวียนหัก	E 129	0.273	0.157	1.738	13.3651
189	ขาวโพธิ์	E 130	0.249	0.132	1.8795	12.4264
190	สามพราน	E 131	0.112	0.032	3.4376	5.5839
191	เหนียวบายสี	E 132	0.252	0.147	1.713	12.5985
192	เหลืองบังใบ	E 133	0.024	0.02	1.2495	1.2217
193	ขาวนครไชยศรี	E 134	0.121	0.045	2.7293	6.0737
194	เจ้าลอย	E 135	0.177	0.066	2.6713	8.8253
195	ข้าวลอย	E 136	0.292	0.146	2.0043	14.6103
196	ทานตะวัน	E 137	0.213	0.091	2.3472	10.6714
197	ขาวเศรษฐี	E 138	0.091	0.031	2.9419	4.5301
198	สามรวง	E 139	0.203	0.096	2.1147	10.1316
199	หอมทุ่ง	E 140	0.165	0.066	2.5144	8.2455
200	หอมทุ่ง	E 141	0.191	0.075	2.5257	9.5279
201	ไอ้โหม่ง	E 142	0.299	0.157	1.9065	14.9449
202	พวงหนัก	E 143	0.313	0.182	1.7207	15.6604
203	พวงเงิน	E 144	0.223	0.13	1.7104	11.1508

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

การกระจายตัวของแอลลีลในข้าวพันธุ์พื้นเมือง
จากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3 Pigm(t)* และ *Pi54*
ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483
เครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 และเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54 MAS

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 การกระจายตัวของแอลลีลในข้าวพันธุ์พื้นเมือง

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	*Pid3*	*Pigm(t)*C5 483	*Pigm(t)* S29742	*Pi54*
1	U 38	งอเพื่อน	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	S	R	R	R
2	U 39	ดยาหลี่	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	R	S
3	U 41	ปือก่อ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	S	R	R	S
4	U 42	ปือเกษตร	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	R	R
5	U 43	เหนียวแสงมูเวอ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	R	S
6	U 44	กะเหรี่ยงขาว	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	S	R	R	S
7	U 45	เหลืองหอม	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	R	R
8	U 46	จะนอไหน	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	S	S	R
9	U 48	ลายซาน	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	R	R
10	U 49	ปิอิ แม่ละ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	R	S
11	U 50	ห้วยแล้ง	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	S	R	R	R
12	U 51	ปิอิ ซูแม่ฟาง	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	S	S	R
13	U 52	ข้าวกอแผ่	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	S	R	R	R

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	*Pid3*	*Pigm(t)*C5 483	*Pigm(t)* S29742	*Pi54*
14	U 53	บือขอพอ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	R	S
15	U 55	เหลืองลีซอ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	S	R	R	S
16	U 56	ข้าวแดง (TRI 8409149)	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	S	R	S	S
17	U 57	ข้าวมันหมู	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	S	R	S	S
18	U 60	งอเซระ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	S	R	R	R
19	U 61	เหนียวกล่ำหอม แสงลีซอ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	R	R
20	S 71	หนานหนัก (Gs.no 10284)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
21	S 72	นางมา (Gs.no 7414)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
22	S 73	เหนียวนาคราช (Gs.no 9982)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
23	S 74	เหนียวหอม	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
24	S 75	แมะแยง (Gs.no 10060)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
25	S 76	ดอกพวง (Gs.no 10062)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
26	S 77	ขืนดิน (Gs.no 4290)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	*Pid3*	*Pigm(t)*C5 483	*Pigm(t)* S29742	*Pi54*
27	S 78	ดอกพิกุล (Gs.no 9754)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
28	S 79	ค้ำฉาง (Gs.no 10243)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
29	S 80	สายบัว (Gs.no 10346)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	S	S
30	S 81	ช่อนิมิต (Gs.no 10354)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	S	S
31	S 82	ไร่ไทร (Gs.no 11185)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
32	S 83	เบาชะมวง (Gs.no 11211)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
33	S 84	ลูกขอ (Gs.no 11148)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
34	S 85	ซุกิกูลอง (Gs.no 12704)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
35	S 86	หลายอด (Gs.no 12716)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
36	S 87	ลาเก๊ะงอ (Gs.no 12717)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
37	S 88	นางทอง (Gs.no 12731)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	X	S
38	S 89	ลูกหวาย (จุด) (Gs.no 12736)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	X	S
39	S 90	ลูกดำ (Gs.no 12737)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	*Pid3*	*Pigm(t)*C5 483	*Pigm(t)* S29742	*Pi54*
40	S 91	เชียงใหม่ (Gs.no 12739)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
41	S 92	ลูกแดง (Gs.no 12740)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
42	S 93	เล็บนกเบา (Gs.no 12743)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
43	S 94	ช่อ (Gs.no 12749)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
44	S 95	ช่อแดง (Gs.no 12751)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
45	S 96	กูนิง (Gs.no 12766)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
46	S 97	ดอกไม้ไทร (Gs.no 12777)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
47	S 98	รวงทอง (Gs.no 12779)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
48	S 99	ลูกปลา (Gs.no 12788)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
49	S 100	นางกลายแดง (Gs.no 12789)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
50	S 101	ลากอ (Gs.no 12790)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
51	S 102	กูนิง (Gs.no 12794)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
52	S 103	มือจระเข้ (Gs.no 12800)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	*Pid3*	*Pigm(t)*C5 483	*Pigm(t)* S29742	*Pi54*
53	S 104	ตุลาถัว (Gs.no 12802)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	X	S
54	S 105	หอม (Gs.no 12817)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	X	S
55	S 106	กือแซะดำ (Gs.no 12821)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
56	S 107	ลือบูมาเซาะ (Gs.no 12826)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
57	S 108	นางรอง (Gs.no 12836)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
58	S 109	อีกู้ 3 (Gs.no 12845)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	X	S
59	S 110	อามะ	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	S	R	R	S
60	L 1	เก้ารวง 17-2-106 (Gs.no 536)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
61	L 2	กู้เมือง (Gs.no 539)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
62	L 3	ขาวดอกมะลิ 41-1-173	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
63	L 4	ขาวตาแห้ง 55-5-55 (Gs.no 546)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
64	L 5	ขาวใหญ่ 33-22-61 (Gs.no 547)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
65	L 6	ขาวปากหม้อ 74 (Gs.no 548)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	*Pid3*	*Pigm(t)*C5 483	*Pigm(t)* S29742	*Pi54*
66	L 7	หลุดหนี้ 75-3-2 (Gs.no 549)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	X	S
67	L 8	เม็ดใหญ่ 94-4-87 (Gs.no 550)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	X	S
68	L 9	ขาวพวง 74-3-38 (Gs.no 551)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
69	L 10	เจ้าหางหมูใหญ่ 32-27 (Gs.no 554)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
70	L 11	เจ้าหางหมูใหญ่ 32-27 (Gs.no 555)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
71	L 12	เจ้าหอม 32-18-69 (Gs.no 556)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
72	L 13	ใบลด 36-10-90 (Gs.no 559)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
73	L 14	เจ้าเหลือง 27-3-19 (Gs.no 563)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
74	L 15	เจ้าเหลือง 27-3-91 (Gs.no 564)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
75	L 16	เจ้าแผ่ 31-28-1 (Gs.no 566)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
76	L 17	ดอกมะลิ 109-1-119 (Gs.no 569)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
77	L 18	ใบลด 36-19-40 (Gs.no 572)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
78	L 19	ใบลด 36-27-29 (Gs.no 573)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	*Pid3*	*Pigm(t)*C5 483	*Pigm(t)* S29742	*Pi54*
79	L 20	รวงเดียว 68-10-85 (Gs.no 582)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
80	L 21	เหลืองใหญ่ (Gs.no 584)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	X	S
81	L 22	เหลืองเล็ก 30-1-57 (Gs.no 586)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	X	S
82	L 23	เหลืองนูน 6-4-102 (Gs.no 589)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
83	L 24	บีเค 289 (Gs.no 591)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
84	L 25	บีเค 563 (Gs.no 592)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
85	L 26	ตี้ 569 (Gs.no 593)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	X	S
86	L 27	ขี้ตม 222-24-72 (Gs.no 595)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	X	S
87	L 28	ขี้ตมใหญ่ 35-16-45 (Gs.no 596)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
88	L 29	ขี้ตมขาว 222-42-3 (Gs.no 597)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	S
89	L 30	ขี้ตมขาว 222-42-5 (Gs.no 598)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
90	L 31	งันดง 34-3-95 (Gs.no 599)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
91	L 32	ดอดอกพร้าว 48-3-123 (Gs.no 601)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	S

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	*Pid3*	*Pigm(t)*C5 483	*Pigm(t)* S29742	*Pi54*
92	L 33	ขี้ตมหอม (Gs.no 2720)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	S
93	L 34	เหนียวดำ (Gs.no 2723)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
94	L 35	ดอป้องแอ้ว (Gs.no 2725)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
95	L 36	ดอกดู่ (Gs.no 2872)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	R	S
96	L 37	ทอง (Gs.no 2942)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
97	L 38	มันเป็ด (Gs.no 2943)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
98	L 39	ขาว (Gs.no 3356)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
99	L 40	นางนวล (Gs.no 3357)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
100	L 41	ขาวกรุง (Gs.no 3358)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
101	L 42	เหนียวแดง (Gs.no 3360)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
102	L 43	ขาว (Gs.no 3361)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
103	L 44	ดอขาว (Gs.no 3363)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
104	L 45	เหลืองบุญมา (Gs.no 3364)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	*Pid3*	*Pigm(t)*C5 483	*Pigm(t)* S29742	*Pi54*
105	L 46	หมากแข็ง (Gs.no 3365)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
106	L 47	ขาวเศรษฐี	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
107	L 48	เหนียวนางนวล (Gs.no 3367)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
108	L 49	ดออ่าง (Gs.no 3368)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
109	L 50	ข้าวก่ำ (Gs.no 3369)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
110	L 51	ป้องแอ้ว (Gs.no 3370)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
111	L 52	อีปง (Gs.no 3372)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
112	L 53	นางนวล (Gs.no 3373)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
113	L 54	แม่ห้าง (Gs.no 3374)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
114	L 55	พานทอง (Gs.no 3375)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
115	L 56	อีปี๊ด (Gs.no 3376)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
116	L 57	ดอสามเดือน (Gs.no 3377)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
117	L 58	ข้าวปน (Gs.no 3378)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	*Pid3*	*Pigm(t)*C5 483	*Pigm(t)* S29742	*Pi54*
118	L 59	อีโตน (Gs.no 3379)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
119	L 60	นางนวล (Gs.no 3380)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
120	L 61	ดวงจันทร์ (Gs.no 3382)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
121	L 62	ปลาแข็ง (Gs.no 3384)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
122	L 63	เป็ดน้ำ (Gs.no 3385)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
123	L 64	พันธุ์หลัก (Gs.no 3386)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
124	L 65	ข้าวหาง (Gs.no 3387)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
125	L 66	สามเดือน (Gs.no 3892)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
126	L 67	ป้องแอ้ว 1(Gs.no 3893)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
127	L 68	ป้องแอ้ว 2 (Gs.no 3894)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	X	S
128	L 69	ป้องแอ้ว (Gs.no 3895)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
129	L 70	มะปราง (Gs.no 3897)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
130	L 71	นางคำผาย (Gs.no 4373)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	*Pid3*	*Pigm(t)*C5 483	*Pigm(t)* S29742	*Pi54*
131	L 72	ขาวใหญ่ (Gs.no 4375)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
132	L 73	โอล่อน (Gs.no 4377)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
133	L 74	ข้าวหอม (Gs.no 4809)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
134	L 75	ข้าวหอม (Gs.no 4810)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	X	S
135	L 76	ข้าวหอม (Gs.no 4814)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
136	L 77	ข้าวหอม (Gs.no 4815)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	X	S
137	L 78	ข้าวหอม (Gs.no 4816)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	X	S
138	L 79	ข้าวหอม (Gs.no 4817)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	X	S
139	L 80	ข้าวหอม (Gs.no 4818)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
140	L 81	ข้าวหอม (Gs.no 4829)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
141	L 82	ข้าวหอม (Gs.no 4831)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
142	L 83	ข้าวหอม (Gs.no 4832)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
143	L 84	ข้าวหอม (Gs.no 4833)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	*Pid3*	*Pigm(t)*C5 483	*Pigm(t)* S29742	*Pi54*
144	L 85	ข้าวหอม (Gs.no 4834)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	R	S
145	L 86	ข้าวหอม (Gs.no 4835)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
146	L 87	ข้าวหอม (Gs.no 4869)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
147	L 88	ข้าวหอม (Gs.no 4870)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
148	L 89	กะทิ (Gs.no 5565)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
149	L 90	ข้าวดอ (Gs.no 5566)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
150	L 91	ดอเหลือง (GS.no 5567)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
151	L 92	เจ้าขาว (Gs.no 5572)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
152	L 93	ขาวใหญ่ (Gs.no 5573)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
153	L 94	เหลือง (Gs.no 13232)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
154	L 95	กระดูกเสือ (Gs.no 13233)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
155	L 96	หอมมะลิ (Gs.no 18418)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
156	L 97	หอมมะลิ (Gs.no 18419)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	*Pid3*	*Pigm(t)*C5 483	*Pigm(t)* S29742	*Pi54*
157	L 98	หอมมะลิ (Gs.no 18420)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
158	L 99	หอมมะลิ (Gs.no 19398)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
159	E 100	พวงทอง	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
161	E 102	พวงมาลัย 35-10-8	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
162	E 103	โพธิฉลอง 31-34-20	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
163	E 104	จำปาจีน 84-8-16	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
164	E 105	จำปาจีน 84-8-22	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
165	E 106	สว่างอารมณ์ 84-4-118	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
166	E 107	ข้าวเบาที่หนึ่ง 95-1-180	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
167	E 108	ไข่แมงดา 59-2-73	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
168	E 109	ลอยใหญ่ 62-40-140	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
169	E 110	เม็ดเล็กหนัก	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
170	E 111	พญาชม	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	*Pid3*	*Pigm(t)*C5 483	*Pigm(t)* S29742	*Pi54*
171	E 112	เขียว	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
172	E 113	ขาวปราจีน	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
173	E 114	เจ๊กกระโดด	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	X	S
174	E 115	รวงเดียว	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
175	E 116	เจ้าลอย	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
176	E 117	เหลืองกล้วย	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
177	E 118	คุณแม่	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
178	E 119	ขาวยายคลี่	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
179	E 120	ขาวเสมอ	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
180	E 121	เหลืองพวงทอง	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
181	E 122	เหลืองอนันต์	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
182	E 123	ขาวลี้	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
183	E 124	ขาวตาหยัด	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	*Pid3*	*Pigm(t)*C5 483	*Pigm(t)* S29742	*Pi54*
184	E 125	นางเขียว	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
185	E 126	ลอยสายบัว	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
186	E 127	นางเขียว	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
187	E 128	นางเขียว	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
188	E 129	เกวียนหัก	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
189	E 130	ขาวโพธิ์	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
190	E 131	สามพราน	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
191	E 132	เหนียวบายสี	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
192	E 133	เหลืองบังใบ	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
193	E 134	ขาวนครไชยศรี	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
194	E 135	เจ้าลอย	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
195	E 136	ข้าวลอย	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
196	E 137	ทานตะวัน	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	*Pid3*	*Pigm(t)*C5 483	*Pigm(t)* S29742	*Pi54*
197	E 138	ขาวเศรษฐี	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
198	E 139	สามรวง	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	S
199	E 140	หอมทุ่ง	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
200	E 141	หอมทุ่ง	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
201	E 142	ไอ้โหม่ง	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	S
202	E 143	พวงหนัก	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	R	S
203	E 144	พวงเงิน	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	S
204	R 1	สุพรรณบุรี 60	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม กรมการข้าว	R	NA	S	S
205	R 2	ชัยนาท 1	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม กรมการข้าว	S	R	S	S
206	R 3	สุพรรณบุรี 1	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม กรมการข้าว	S	NA	S	S
207	R 4	สันป่าตอง 1	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม กรมการข้าว	S	NA	S	S
208	R 5	ปทุมธานี 1	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม กรมการข้าว	S	NA	R	S
209	R 6	เหนียวอุบล 2	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม กรมการข้าว	S	NA	R	S

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	*Pid3*	*Pigm(t)*C5 483	*Pigm(t)* S29742	*Pi54*
210	R 7	กข 10	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม กรมการข้าว	S	R	R	R
211	R 8	กข 33	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม กรมการข้าว	S	R	R	S
212	R 9	ปราจีนบุรี 2	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม กรมการข้าว	S	R	R	R
213	R 10	C101A51	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์	S	R	R	S
214	R 12	C101PKT	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์	S	R	S	R
215	R 13	C102PKT	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์	S	R	S	R
216	R 14	C104PKT	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์	S	R	S	S
217	R 15	C101TTP	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์	S	R	R	S
218	R 16	C101TTP	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์	S	R	R	S
219	R 17	C105TTP 4-1-23	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์	R	R	S	R
220	R 18	CO39	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์	R	R	S	R
221	R 19	AZUCENA	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์	R	S	NA	S
222	R 20	IR64	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์	S	R	R	S

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ค1 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	*Pid3*	*Pigm(t)*C5 483	*Pigm(t)* S29742	*Pi54*
223	R 21	CT9933	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม IRRI ฟิลิปปินส์	R	S	NA	S
224	R 22	JHN	ข้าวพันธุ์ส่งเสริม RGDU ไทย	R	R	NA	S
225	C 1	KDML 105	กรมการข้าว	S	S	S	S
226	C 2	NPB	ญี่ปุ่น	R	S	S	S

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ง

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์
เพื่อหาความเหมือนของข้าวพื้นเมืองพันธุ์ต่างๆ
ในตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3 Pigm(t)* และ *Pi54*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
1NPBR       --CAGTTTCAC-TAGGCTCTC-TTGTGGAGTTAGAACCTTTCGTATCAGCAAGGTGCGAA 56
2U42R       --CGGGTTCAC-TACGCTCTC-TTGTGGAGTTAGAACCTTTCGTATCAGCAAGGTGCGAA 56
3U45R       --TGGTATCAC-TACGCTCTC-TTGTGGAGTTAGAACCTTTCGTATCAGCAAGGTGCGAA 56
4U49R       --TGGTTTCACGTAGGCTCTC-TTGTGGAGTTAGAACCTTTCGTATCAGCAAGGTGCGAA 57
5U39R       AAGGGGCCCCCCACAGCACTCGCTATGGAGTTAGAACCTTTCGTATCAGCAAGGTGCGAA 60
6U38S       --GAGGTTCACGTAGGCTCTC-TTGTGGAGTTAGAACCTTTCGTATCAGCAAGGTGCGAA 57
7L17S       --TGGCTCCCCCTAGGCTCTC-TTGTGGAGTTAGAACCTTTCGTATCAGCAAGGTGCGAA 57
8L56S       --CGGGTTCCCGTAGGCTCTC-TTGTGGAGTTAGAACCTTTCGTATCAGCAAGGTGCGAA 57
9E111S      --TGGTTATACCTAGGCTCTC-TTGTGGAGTTAGAACCTTTCGTATCAGCAAGGTGCGAA 57
10E112S     --CGGTTTCAC-TAGGCTCTC-TTGTGGAGTTAGAACCTTTCGTATCAGCAAGGTGCGAA 56
                .*    .* :: **:***  *.************************************

1NPBR       GTTGCCATTGTGAGCAGTTGTTCATGGCCATCACTAATATGATTCATCTTACCCGTCTTG 116
2U42R       GTTGCCATTGTGAGCAGTTGTTCATGGCCATCACTAATATGATTCATCTTACCCGTCTTG 116
3U45R       GTTGCCATTGTGAGCAGTTGTTCATGGCCATCACTAATATGATTCATCTTACCCGTCTTG 116
4U49        GTTGCCATTGTGAGCAGTTGTTCATGGCCATCACTAATATGATTCATCTTACCCGTCTTG 117
5U39        GTTGCCATTGTGAGCAGTTGTTCATGGCCATCACTAATATGATTCATCTTACCCGTCTTG 120
6U38        GTTGCCATTGTGAGCAGTTGTTCATGGCCATCACTAATATGATTCATCTTACCCGTCTTG 117
7L17S       GTTGCCATTGTGAGCAGTTGTTCATGGCCATCACTAATATGATTCATCTTACCCGTCTTG 117
8L56S       GTTGCCATTGTGAGCAGTTGTTCATGGCCATCACTAATATGATTCATCTTACCCGTCTTG 117
9E111S      GTTGCCATTGTGAGCAGTTGTTCATGGCCATCACTAATATGATTCATCTTACCCGTCTTG 117
10E112S     GTTGCCATTGTGAGCAGTTGTTCATGGCCATCACTAATATGATTCATCTTACCCGTCTTG 116
            ************************************************************

1NPBR       GGATCTAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGCTAA-- 149
2U42R       GGATCTAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGCTAA-- 149
3U45R       GGATCTAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGCTAA-- 149
4U49R       GGATCTAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGCTAA-- 150
5U39R       GGATCTAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGCTAAGG 155
6U38S       GGATCCAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGCTAA-- 150
7L17S       GGATCCAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGCTAA-- 150
8L56S       GGATCCAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGCTAA-- 150
9E111S      GGATCCAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGCTAA-- 150
10E112S     GGATCCAGGCAGACAGTAGTCAAGAAGTGCTAA-- 149
            ***** *************************
```

ภาพผนวกที่ ง1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาความเหมือนของข้าวพื้นเมืองพันธุ์ต่างๆ ใน ตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
1S91R      --GGGTAATGCT-TATTCTCTCTCTGCTCAGACTGTTCAGTGCAAAAGCTACCAACGAG- 56
2S92R      -----GAAAGCTAATTGCTCTCTCTGCTCAGACTGTTCAGTGCAAAAGCTACCAACGAG- 54
3S93R      -----CAAAGCT--ATTCTCTCTCTGCTCAGACTGTTCAGTGCAAAAGCTACCAACGAG- 52
4S94R      ----CAAAAGCT-ATTCCTCTCTCTGCTCAGACTGTTCAGTGCAAAAGCTACCAACGAG- 54
5S95R      -------GAGCTAATTCCTCTCTCTGCTCAGACTGTTCAGTGCAAAAGCTACCAACGAG- 52
6U51S      ----GAAAACCTTATTCCTCTCTCTGCTCAGACTGTTCAGTGCAAAAGCTACCAACGAG- 55
7L52S      CCGAAAAAAACCTATT--CTCTCTCTGCTCAGACTGTTCAGGGCAAAAACTACCAACGAGA 58
8L53S      GCGGGTAAATCTTATTCATCTCTCTGCTCAGACTGTTCAGGGCAAAAACTACCAACGAGA 60
9L57S      GGGGTATAAACTATTTACTCTCTCTGCTCAGACTGTTCAGGGCAAAAACTACCAACGAGA 60
10NPBS     ---GGGGAAAACCTATTCTCTCTCTGCTCAGACTGTTCAGTGCAAAAGCTACCAACGAGA 57
11L7X      -----GTAAGCCTTATTCTCTCTCTGCTCAGACTGTTCAGTGCAAAAGCTACCAACGAG- 54
12L8X      ---GGAAAAAACTTATTCTCTCTCTGCTCAGACTGTTCAGTGCAAAAGCTACCAACGAG- 56
                 .: .   :  .********************** ******.***********

1S91R      -CTTGTCTCCTTGTGCGGTCGTGAGCTTGCTTGTGCTAAGCTTGAAGGGAGAGTCGAACG 115
2S92R      -CTTGTCTCCTTGTGCGGTCGTGAGCTTGCTTGTGCTAAGCTTGAAGGGAGAGTCGAACG 113
3S93R      -CTTGTCTCCTTGTGCGGTCGTGAGCTTGCTTGTGCTAAGCTTGAAGGGAGAGTCGAACG 111
4S94R      -CTTGTCTCCTTGTGCGGTCGTGAGCTTGCTTGTGCTAAGCTTGAAGGGAGAGTCGAACG 113
5S95R      -CTTGTCTCCTTGTGCGGTCGTGAGCTTGCTTGTGCTAAGCTTGAAGGGAGAGTCGAACG 111
6U51S      -CTTGTCTCCTTGTGCGGTCGTGAGCTTGCTTGTGCTAAGCTTGAAGGGAGAGTCGAACG 114
7L52S      GCTTGTCTCCTTGTGCGGTCGTGAGCTTGCTTGTGCTAAGCTTGAAGGGAGAGTCGAACG 118
8L53S      GCTTGTCTCCTTGTGCGGTCGTGAGCTTGCTTGTGCTAAGCTTGAAGGGAGAGTCGAACG 120
9L57S      GCTTGTCTCCTTGTGCGGTCGTGAGCTTGCTTGTGCTAAGCTTGAAGGGAGAGTCGAACG 120
10NPBS     TCGTGTCCCCGTGTGGGGTCGAGCTTGTGTGTGCGCTACTCGTGAGGGGAGACTCAAACA 117
11L7X      -CTTGTCTCCTTGTGCGGTCGTGAGCTTGCTTGTGCTAAGCTTGAAGGGAGAGTCGAACG 113
12L8X      -CTTGTCTCCTTGTGCGGTCGTGAGCTTGCTTGTGCTAAGCTTGAAGGGAGAGTCGAACG 115
            * **** ** **** *****:*.   **  ** ****. * ***.****** **.***.

1S91R      AATCCATGGCGGAGACGGTGCTGAGCATGGCGAGGTCGCTGGTGGGCAGTGCCATCAGCA 175
2S92R      AATCCATGGCGGAGACGGTGCTGAGCATGGCGAGGTCGCTGGTGGGCAGTGCCATCAGCA 173
3S93R      AATCCATGGCGGAGACGGTGCTGAGCATGGCGAGGTCGCTGGTGGGCAGTGCCATCAGCA 171
4S94R      AATCCATGGCGGAGACGGTGCTGAGCATGGCGAGGTCGCTGGTGGGCAGTGCCATCAGCA 173
5S95R      AATCCATGGCGGAGACGGTGCTGAGCATGGCGAGGTCGCTGGTGGGCAGTGCCATCAGCA 171
6U51S      AATCCATGGCGGAGACGGTGCTGAGCATGGCGAGGTCGCTGGTGGGCAGTGCCATCAGCA 174
7L52S      AATCCATGGCGGAGACGGTGCTGAGCATGGCGAGGTCGCTGGTGGGCAGTGCCATCAGCA 178
8L53S      AATCCATGGCGGAGACGGTGCTGAGCATGGCGAGGTCGCTGGTGGGCAGTGCCATCAGCA 180
9L57S      AATCCATGGCGGAGACGGTGCTGAGCATGGCGAGGTCGCTGGTGGGCAGTGCCATCAGCA 180
10NPBS     TATCCGTGGGAGACACTGCTCTGAATGTGGAGAGCTCTGGGGGGGGCAGTGCCCTCCACA 177
11L7X      AATCCATGGCGGAGACGGTGCTGAGCATGGCGAGGTCGCTGGTGGGCAGTGCCATCAGCA 173
12L8X      AATCCATGGCGGAGACGGTGCTGAGCATGGCGAGGTCGCTGGTGGGCAGTGCCATCAGCA 175
           :****.*** .** ** *  ****. .***.*** **   ** **********.**..**

1S91R      AGGCCGCCTCTGCCGCTGCCAATGAGACGAGCCTCCTGCTCGGCGTCGAGAAGGACATCT 235
2S92R      AGGCCGCCTCTGCCGCTGCCAATGAGACGAGCCTCCTGCTCGGCGTCGAGAAGGACATCT 233
3S93R      AGGCCGCCTCTGCCGCTGCCAATGAGACGAGCCTCCTGCTCGGCGTCGAGAAGGACATCT 231
4S94R      AGGCCGCCTCTGCCGCTGCCAATGAGACGAGCCTCCTGCTCGGCGTCGAGAAGGACATCT 233
5S95R      AGGCCGCCTCTGCCGCTGCCAATGAGACGAGCCTCCTGCTCGGCGTCGAGAAGGACATCT 231
6U51S      AGGCCGCCTCTGCCGCTGCCAATGAGACGAGCCTCCTGCTCGGCGTCGAGAAGGACATCT 234
7L52S      AGGCCGCCTCTGCCGCTGCCAATGAGACGAGCCTCCTGCTCGGCGTCGAGAAGGACATCT 238
8L53S      AGGCCGCCTCTGCCGCTGCCAATGAGACGAGCCTCCTGCTCGGCGTCGAGAAGGACATCT 240
9L57S      AGGCCGCCTCTGCCGCTGCCAATGAGACGAGCCTCCTGCTCGGCGTCGAGAAGGACATCT 240
10NPBS     GGGCCCCCTCCGCCTCCCCCTATGACAAGACCCCCGTGCTC--CGCCTAGAAAGAGACCT 235
11L7X      AGGCCGCCTCTGCCGCTGCCAATGAGACGAGCCTCCTGCTCGGCGTCGAGAAGGACATCT 233
12L8X      AGGCCGCCTCTGCCGCTGCCAATGAGACGAGCCTCCTGCTCGGCGTCGAGAAGGACATCT 235
           .**** **** *** *  **:**** *.** ** * *****  ** * ****.** * **
```

ภาพผนวกที่ ง2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาความเหมือนของข้าวพื้นเมืองพันธุ์ต่างๆ ใน ตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
1S91R      GGTACGTACTGCACTGCGCTCTCGTTTATCCTAGCTCGGTTGTATCGACTTCCAGCTTAA 295
2S92R      GGTACGTACTGCACTGCGCTCTCGTTTATCCTAGCTCGGTTGTATCGACTTCCAGCTTAA 293
3S93R      GGTACGTACTGCACTGCGCTCTCGTTTATCCTAGCTCGGTTGTATCGACTTCCAGCTTAA 291
4S94R      GGTACGTACTGCACTGCGCTCTCGTTTATCCTAGCTCGGTTGTATCGACTTCCAGCTTAA 293
5S95R      GGTACGTACTGCACTGCGCTCTCGTTTATCCTAGCTCGGTTGTATCGACTTCCAGCTTAA 291
6U51S      GGTACGTACTGCACT--GCTCTCGTTTATCCTAG------------------------- 266
7L52S      GGTACGTACTGCACT--GCTCTCGTTTATCCTAG------------------------- 270
8L53S      GGTACGTACTGCACT--GCTCTCGTTTATCCTAG------------------------- 272
9L57S      GGTACGTACTGCACT--GCTCTCGTTTATCCTAG------------------------- 272
10NPBS     GGGGCACATTGTGCTGTGCTCTCTTTTATCCTAA------------------------- 269
11L7X      GGTACGTACTGCACTGCGCTCTCGTTTATCCTAGCTCGGTTGTATCGACTTCCAGCTTAA 293
12L8X      GGTACGTACTGCACTGCGCTCTCGTTTATCCTAGCTCGGTTGTATCGACTTCCAGCTTAA 295
           ** .*. * ** .**  ****** *********.

1S91R      TCTTTTTAATAATGAATAAAAACCCGGACTTGTTATCCATAAG----------------- 338
2S92R      TCTTTTTAATAATGAATAAAAACCCGGACTTGTTATCCATAAG----------------- 336
3S93R      TCTTTTTAATAATGAATAAAAACCCGGACTTGTTATCCATAAG----------------- 334
4S94R      TCTTTTTAATAATGAATAAAAACCCGGACTTGTTATCCATAAG----------------- 336
5S95R      TCTTTTTAATAATGAATAAAAACCCGGACTTGTTATCCATAAG----------------- 334
6U51S      ------------------------------------------------------------
7L52S      ------------------------------------------------------------
8L53S      ------------------------------------------------------------
9L57S      ------------------------------------------------------------
10NPBS     ------------------------------------------------------------
11L7X      TCTTTTTAATAATGAATAAAAACCCGGACTTGTTATCCATAAGGGCACCCACAATGGTTA 353
12L8X      TCTTTTTAATAATGAATAAAAACCCGGACTTGTTATCCATAAGGGCACCCACAATGGTTA 355

1S91R      ------------------------------------------------------------
2S92R      ------------------------------------------------------------
3S93R      ------------------------------------------------------------
4S94R      ------------------------------------------------------------
5S95R      ------------------------------------------------------------
6U51S      ------------------------------------------------------------
7L52S      ------------------------------------------------------------
8L53S      ------------------------------------------------------------
9L57S      ------------------------------------------------------------
10NPBS     ------------------------------------------------------------
11L7X      TCTATAGGCTCTCTATAAGAGATCTATGTCAGCATATTTTCCTACTTGGAAGGTATTAAA 413
12L8X      TCTATAGGCTCTCTATAAGAGATCTATGTCAGCATATTTTCCTACTTGGAAGGTATTAAA 415

1S91R      ------------------------------------------------------------
2S92R      ------------------------------------------------------------
3S93R      ------------------------------------------------------------
4S94R      ------------------------------------------------------------
5S95R      ------------------------------------------------------------
6U51S      ------------------------------------------------------------
7L52S      ------------------------------------------------------------
8L53S      ------------------------------------------------------------
9L57S      ------------------------------------------------------------
10NPBS     ------------------------------------------------------------
11L7X      TGAAGAGAGAGAGCAAAGCTATCTACTAACTTAGAGATAGTCTATAGAGAAAAACGAGGC 473
12L8X      TGAAGAGAGAGAGCAAAGCTATCTACTAACTTAGAGATAGTCTATAGAGAAAAACGAGGC 475
```

ภาพผนวกที่ ง2 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
1S91R      ------------------------------------------------------------
2S92R      ------------------------------------------------------------
3S93R      ------------------------------------------------------------
4S94R      ------------------------------------------------------------
5S95R      ------------------------------------------------------------
6U51S      ------------------------------------------------------------
7L52S      ------------------------------------------------------------
8L53S      ------------------------------------------------------------
9L57S      ------------------------------------------------------------
10NPBS     ------------------------------------------------------------
11L7X      AATGCATGAGAGAGTTATAGATACCAATGTAGACATACTATTAAGGTGGTTTACTATTAA 533
12L8X      AATGCATGAGAGAGTTATAGATACCAATGTAGACATACTATTAAGGTGGTTTACTATTAA 535


1S91R      ------------------------------------------------------------
2S92R      ------------------------------------------------------------
3S93R      ------------------------------------------------------------
4S94R      ------------------------------------------------------------
5S95R      ------------------------------------------------------------
6U51S      ------------------------------------------------------------
7L52S      ------------------------------------------------------------
8L53S      ------------------------------------------------------------
9L57S      ------------------------------------------------------------
10NPBS     ------------------------------------------------------------
11L7X      TCGAGTCTATTGCTGAGATGTACATGTTTTATAGATAGCACCTTACTTTACCATTGCGGG 593
12L8X      TCGAGTCTATTGCTGAGATGTACATGTTTTATAGATAGCACCTTACTTTACCATTGCGGG 595


1S91R      ---------TGGATATACACAGTCAAAACACGCGACAAGTTCTTAGGCTCTTAATTAATC 389
2S92R      ---------TGGATATACACAGTCAAAACACGCGACAAGTTCTTAGGCTCTTAATTAATC 387
3S93R      ---------TGGATATACACAGTCAAAACACGCGACAAGTTCTTAGGCTCTTAATTAATC 385
4S94R      ---------TGGATATACACAGTCAAAACACGCGACAAGTTCTTAGGCTCTTAATTAATC 387
5S95R      ---------TGGATATACACAGTCAAAACACGCGACAAGTTCTTAGGCTCTTAATTAATC 385
6U51S      ----------------------------------CAAGTTCTTAGGCTCTTAAT----C 287
7L52S      ----------------------------------CAAGTTCTTAGGCTCTTAAT----C 291
8L53S      ----------------------------------CAAGTTCTTAGGCTCTTAAT----C 293
9L57S      ----------------------------------CAAGTTCTTAGGCTCTTAAT----C 293
10NPBS     ----------------------------------CGTGTTCTTGCGCTCTTTCT----C 290
11L7X      TGCTCTAAGTGGATATACACAGTCAAAACACGCGACAAGTTCTTAGGCTCTTAATTAATC 653
12L8X      TGCTCTAAGTGGATATACACAGTCAAAACACGCGACAAGTTCTTAGGCTCTTAATTAATC 655
                                           *.:******. ******:.*    *


1S91R      TCGAAATTGAGGAACACCATGAAACACTAAAAGAGAGCTCGAAGACTAGGAAAGAAAACT 449
2S92R      TCGAAATTGAGGAACACCATGAAACACTAAAAGAGAGCTCGAAGACTAGGAAAGAAAACT 447
3S93R      TCGAAATTGAGGAACACCATGAAACACTAAAAGAGAGCTCGAAGACTAGGAAAGAAAACT 445
4S94R      TCGAAATTGAGGAACACCATGAAACACTAAAAGAGAGCTCGAAGACTAGGAAAGAAAACT 447
5S95R      TCGAAATTGAGGAACACCATGAAACACTAAAAGAGAGCTCGAAGACTAGGAAAGAAAACT 445
6U51S      TCGAAATTGAGGAACACCATGAAACACTAAAAGAGAGCTCGAAGACTAGGAAAGAAAACT 347
7L52S      TCGAAATTGAGGAACACCATGAAACACTAAAAGAGAGCTCGAAGACTAGGAAAGAAAACT 351
8L53S      TCGAAATTGAGGAACACCATGAAACACTAAAAGAGAGCTCGAAGACTAGGAAAGAAAACT 353
9L57S      TCGAAATTGAGGAACACCATGAAACACTAAAAGAGAGCTCGAAGACTAGGAAAGAAAACT 353
10NPBS     TCAATTTTGAAGAACCCCGTAAAACTCTAAAAGAGATCTCAAACACTAAAAAAAAAAACT 350
11L7X      TCGAAATTGAGGAACACCATGAAACACTAAAAGAGAGCTCGAAGACTAGGAAAGAAAACT 713
12L8X      TCGAAATTGAGGAACACCATGAAACACTAAAAGAGAGCTCGAAGACTAGGAAAGAAAACT 715
           **.*::****.****.**.*.****:********** ***.** ****..***.******
```

ภาพผนวกที่ ง2 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
1S91R      AGAAGACTAAGCTTTGAAAGTCTTCTAAATCCAAGCATCTCGACATTGATCATCCTTGTG 509
2S92R      AGAAGACTAAGCTTTGAAAGTCTTCTAAATCCAAGCATCTCGACATTGATCATCCTTGTG 507
3S93R      AGAAGACTAAGCTTTGAAAGTCTTCTAAATCCAAGCATCTCGACATTGATCATCCTTGTG 505
4S94R      AGAAGACTAAGCTTTGAAAGTCTTCTAAATCCAAGCATCTCGACATTGATCATCCTTGTG 507
5S95R      AGAAGACTAAGCTTTGAAAGTCTTCTAAATCCAAGCATCTCGACATTGATCATCCTTGTG 505
6U51S      AGAAGACTAAGCTTTGAAAGTCTTCTAAATCCAAGCATCTCGACATTGATCATCCTTGTG 407
7L52S      AGAAGACTAAGCTTTGAAAGTCTTCTAAATCCAAGCATCTCGACATTGATCATCCTTGTG 411
8L53S      AGAAGACTAAGCTTTGAAAGTCTTCTAAATCCAAGCATCTCGACATTGATCATCCTTGTG 413
9L57S      AGAAGACTAAGCTTTGAAAGTCTTCTAAATCCAAGCATCTCGACATTGATCATCCTTGTG 413
10NPBS     AAAACAATAATCTTTAAAACTTCTCTATATCCACATCTCTCCACTTTTATTATC--TGTG 408
11L7X      AGAAGACTAAGCTTTGAAAGTCTTCTAAATCCAAGCATCTCGACATTGATCATCCTTGTG 773
12L8X      AGAAGACTAAGCTTTGAAAGTCTTCTAAATCCAAGCATCTCGACATTGATCATCCTTGTG 775
           *.** *.*** ****.*** *  ****:*****.. .**** **:** ** ***  ****

1S91R      CAACATCAACCTTT--CCTATTAA-- 531
2S92R      CAACATCAACCTTTT-CCTATTAA-- 530
3S93R      CAACATCAACCTTT--CCTATTAAAA 529
4S94R      CAACATCAACCCTTT-CCTATTAA-- 530
5S95R      CAACATCAACCTTT--CCTATTAA-- 527
6U51S      CAACATCAACCCTTTTCCTATTAA—431
7L52S      CAACATCAACCTTTT-CCTATTAA-- 434
8L53S      CAACATCAACCCTTT-CCTATTA--- 435
9L57S      CAACATCAACCCTTT-CCTATTAA-- 436
10NPBS     CGCCACCTCCCTTCCTCCTTATAA-- 432
11L7X      CAACATCAACCTTTT-CCTATTTA-- 796
12L8X      CAACATCACCCTTT---CTATATA-- 796
           *..** *:.** *    **::::
```

ภาพผนวกที่ ง2 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
1U38R      -GCCCG----TGAAGCTCAGTACTTCATGATCTATTCTAC-TGGCATTTCCAGCATCCAT 54
2U42R      CGGCGGT--ATGACGATCAGTACTTCATGATCTATTCTAC-TGGCATTTCCAGCATCCAT 57
3U48R      --CCCGAGCCGCTAGAGTAGTATT--ATACTATATTCTAC-TGGCATTTCCAGCATCCAT 55
4U50R      ---AGGT--ATGAC-CTCAGTACTTCATGATCTATTCTAC-TGGCATTTCCAGCATCCAT 53
5U52R      --ACGGT--CTGACGTTCAGTACTTCATGATCTATTCTAC-TGGCATTTCCAGCATCCAT 55
6S77S      --CCGGG-TTTGGAGTCCAGTACTTCATGATCTATTCTAC-TGGCATTTCCAGCATCCAT 56
7S83S      -ACCGAG-TGAG----TCAGTACTTCATGATCTATTCTAC-TGGCATTTCCAGCATCCAT 53
8S92S      --CCCGGTTAGAGCTTAACATAGATTATGATCTATTCTACTAGGCATTTCCAGCATCCAT 58
9L9S       GGCCGGGGTGAGAGCTGCCGTACTTCGAGATCTATTCTACGTGGCATTTCCAGCATCCAT 60
10NPBS     -GCGGGG--TGAGAGCTCAGTACTTCATGATCTATTCTAC-TGGCATTTCCAGCATCCAT 56
                .           ..** :  .:..*.******** :******************

1U38R      ATTCCACCTCAACATCAATGTCTCGAGCTTTTCTTTCTCTTGAAGTTTTGCCATTCTTGC 114
2U42R      ATTCCACCTCAACATCAATGTCTCGAGCTTTTCTTTCTCTTGAAGTTTTGCCATTCTTGC 117
3U48R      ATTCCACCTCAACATCAATGTCTCGAGCTTTTCTTTCTCTTGAAGTTTTGCCATTCTTGC 115
4U50R      ATTCCACCTCAACATCAATGTCTCGAGCTTTTCTTTCTCTTGAAGTTTTGCCATTCTTGC 113
5U52R      ATTCCACCTCAACATCAATGTCTCGAGCTTTTCTTTCTCTTGAAGTTTTGCCATTCTTGC 115
6S77S      ATTCCACCTCAACATCAATGTCTCGAGCTTTTCTTTCTCTTGAAGTTTTGCCATTCTTGC 116
7S83S      ATTCCACCTCAACATCAATGTCTCGAGCTTTTCTTTCTCTTGAAGTTTTGCCATTCTTGC 113
8S92S      ATTCCACCTCAACATCAATGTCTCGAGTTTTTCTTTCTCTTGAAGTTTTGCCATTCTTGC 118
9L9S       ATTCCACCTCAACATCAATGTCTCGAGCTTTTCTTTCTCTTGAAGTTTTGCCATTCTTGC 120
10NPBS     ATTCCACCTCAACATCAATGTCTCGAGCTTTTCTTTCTCTTGAAGTTTTGCCATTCTTGC 116
           ************************** ********************************

1U38R      ATCTTCAGTGTCTGAAACCTTTTCAAGGTTCACTAGTGATAG------------------ 156
2U42R      ATCTTCAGTGTCTGAAACCTTTTCAAGGTTCACTAGTGATAG------------------ 159
3U48R      ATCTTCAGTGTCTGAAACCTTTTCAAGGTTCACTAGTGATAG------------------ 157
4U50R      ATCTTCAGTGTCTGAAACCTTTTCAAGGTTCACTAGTGATAG------------------- 155
5U52R      ATCTTCAGTGTCTGAAACCTTTTCAAGGTTCACTAGTGATAG------------------- 157
6S77S      ATCTTCAGTGTCTGAAACCTTTTCAAGGTTCACTAGTGATAGGCTATGTTTAGTTCAGCG 176
7S83S      ATCTTCAGTGTCTGAAACCTTTTCAAGGTTCACTAGTGATAGGCTATGTTTAGTTCAGCG 173
8S92S      ATCTTCAGTGTCTGAAACCTTTTCAAGGTTCACTAGTGATAGGCTATGTTTAGTTCAGCG 178
9L9S       ATCTTCAGTGTCTGAAACCTTTTCAAGGTTCACTAGTGATAGGCTATGTTTAGTTCAGCG 180
10NPBS     ATCTTCAGTGTCTGAAACCTTTTCAAGGTTCACTAGTGATAGGCTGTGTTTAGTTCAGCG 176
           ****************************************

1U38R      ------------------------------------------------------------
2U42R      ------------------------------------------------------------
3U48R      ------------------------------------------------------------
4U50R      ------------------------------------------------------------
5U52R      ------------------------------------------------------------
6S77S      CAAAGTTTGAAAAAGGATTAAAATTAGAGATGATGTGACTGAAAAGTTATGTGTATATGA 236
7S83S      CAAAGTTTGAAAAAGGATTAAAATTAGAGATGATGTGACTGAAAAGTTATGTGTATATGA 233
8S92S      CAAAGTTTGAAAAAGGACTAAAATTAGAGATGATGTGACTGAAAAGTTATGTGTGTATGA 238
9L9S       CAAAGTTTGAAAAAGGACTAAAATTAGAGATGATGTGACTGAAAAGTTATGTGTGTATAA 240
10NPBS     CAAAGTTTGAAAAATGACTAAAATTAGAGATGATGTGACTGAAAAGTTGTGTGTGTATGA 236


1U38R      ------------------------------------------------------------
2U42R      ------------------------------------------------------------
3U48R      ------------------------------------------------------------
4U50R      ------------------------------------------------------------
5U52R      ------------------------------------------------------------
6S77S      CATGTTGATGTGATGGAAAAGGACGGAAGTTTGGATCCAAACTTTGGATCTAAACACAGC 296
7S83S      CATGTTGATGTGATGGAAAAGGACGGAAGTTTGGATCCAAACTTTGGATCTAAACACAGC 293
8S92S      CATGTTGATGTGATAGAAAAGGACGGAAGTTTGGATCCAAACTTTGGATCTAAACACAGC 298
9L9S       CATGTTGATGTGATGGAAAAGGACGGAAGTTTGGATCCAAACTTTGGATCTAAACACAGC 300
10NPBS     CACGTTGATGTGATGGAAAAGGACGGAAGTTTAGATCCAAACTTTGGATCTAAATACAGC 296
```

ภาพผนวกที่ ง3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาความเหมือนของข้าวพื้นเมืองพันธุ์ต่างๆ ในตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid54*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
1U38R       -----TCTATTGAGGTCTAGCAGTGATTGAAGCAAGG 188
2U42R       ------TCTATTGAGGTCTAGCAGTGATTGAAGCAA— 189
3U48R       -----TCTATTGAGGTCTAGCAGTGATTGAAGAAA-- 187
4U50R       -----TCTATTGAGGTCTAGCAGTGATTGAAGCA--- 184
5U52R       -----TCTATTGAGGTCTAGCAGTGATTGAAGCA--- 186
6S77S       CATAATCTATCGAGGTCTAGCAGGGATTGAAGCA--- 330
7S83S       CATAATCTATCGAGGTCTAGCAGTGTTTGAAGCAA-- 328
8S92S       CATAATCTATCGAGGTCTAGCAGTGATTGAAGCAGCC 335
9L9S        CATAATCTATCGAGGTCTAGCAGTGATTGAAGCA--- 334
10NPBS      CATAGTCTATTGAGGTCTAGCAGTGTTTGAAGCAA-- 331
                 ***** ************ *:******.*
```

ภาพผนวกที่ ง3 (ต่อ)

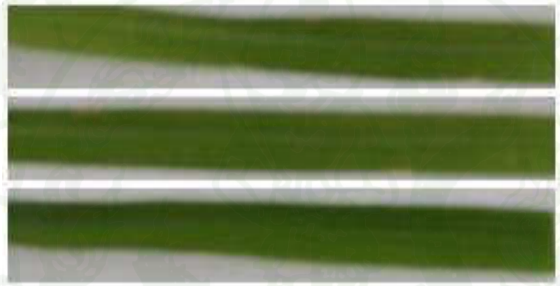
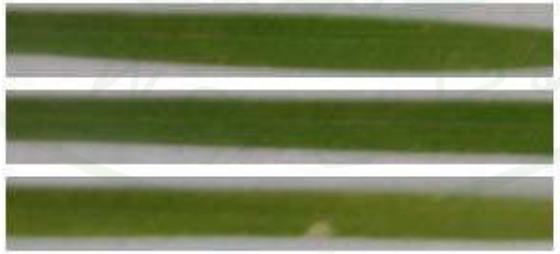
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก จ

การศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองทางโรคไหม้
ต่อเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทย จำนวน 20 ไอโซเลท

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ1 แสดงระดับความรุนแรงในการก่อโรคในข้าว

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	รูปภาพความรุนแรงในการติดเชื้อ	จำนวนแอลลีลต้านทาน	ระดับความรุนแรง
1	งอเพื่อน	U 38		2	0
2	ปือก่อ	U 41		1	0
3	ปือเกษตร	U 42		3	2

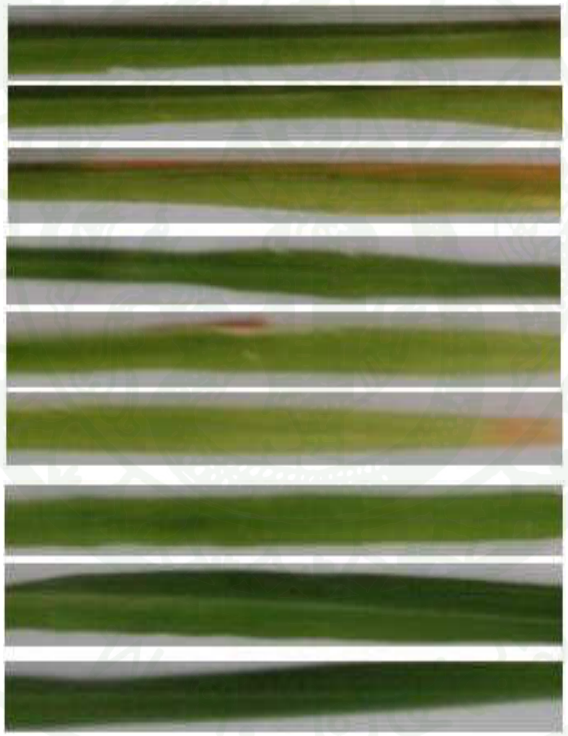
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ1 (ต่อ)

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	รูปภาพความรุนแรงในการติดเชื้อ	จำนวนแอลลีลต้านทาน	ระดับความรุนแรง
4	เหนียวแสงมูเวอ	U43		2	0
5	กะเหรี่ยงขาว	U44		1	0
6	เหลืองหอม	U 45		3	0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ1 (ต่อ)

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	รูปภาพความรุนแรงในการติดเชื้อ	จำนวนแอลลีลต้านทาน	ระดับความรุนแรง
7	จะนอไหน	U 46		2	5
8	ลายซาน	U 48		3	5
9	ห้วยแล้ง	U 50		2	2

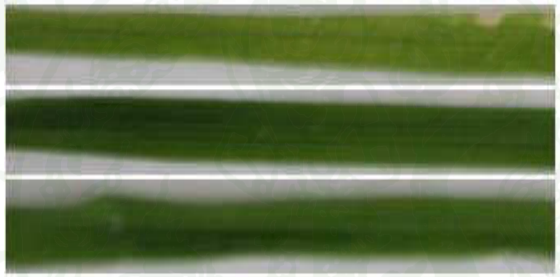
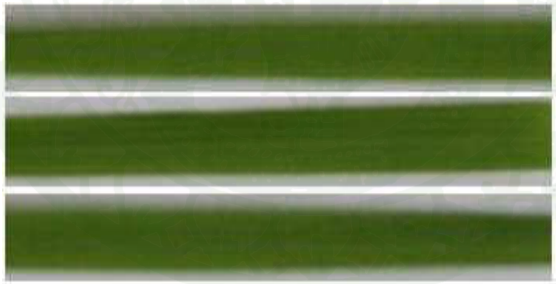
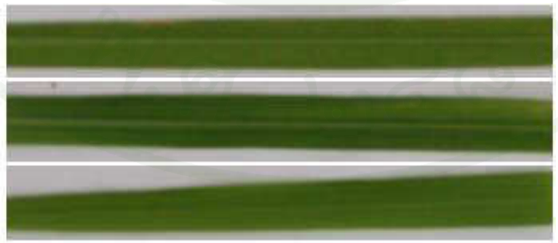
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ1 (ต่อ)

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	รูปภาพความรุนแรงในการติดเชื้อ	จำนวนแอลลีลต้านทาน	ระดับความรุนแรง
10	ปิอิ ซูแม่ฟาง	U 51		2	3
11	ข้าวกอแผ่	U 52		2	2
12	เหลืองลีซอ	U 55		1	5

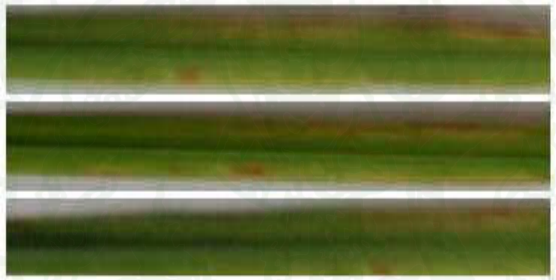
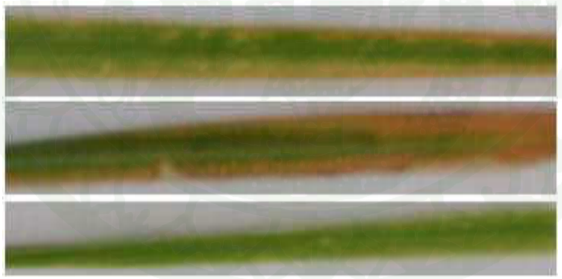
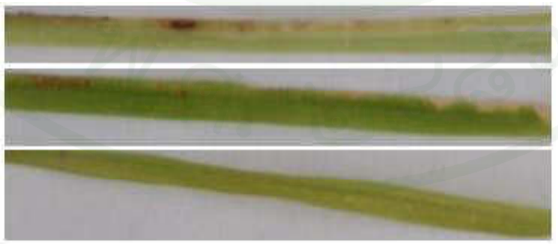
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ1 (ต่อ)

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	รูปภาพความรุนแรงในการติดเชื้อ	จำนวนแอลลีลต้านทาน	ระดับความรุนแรง
13	ข้าวแดง (TRI 8409149)	U 56		0	3
14	ข้าวมันหมู	U57		0	1
15	งอเซระ	U 60		2	0

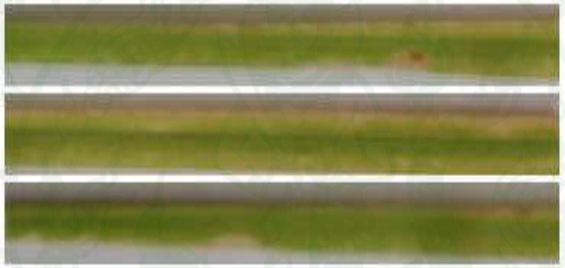
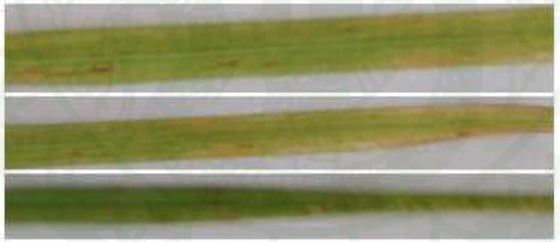
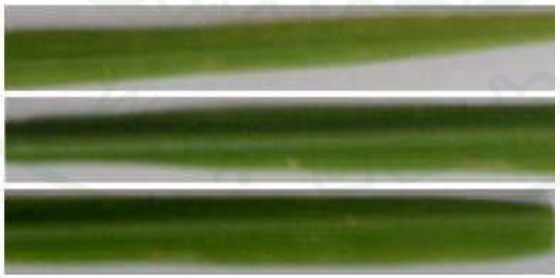
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ1 (ต่อ)

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	รูปภาพความรุนแรงในการติดเชื้อ	จำนวนแอลลีลต้านทาน	ระดับความรุนแรง
16	หมานหนัก	S 71		1	6
17	นางมา	S 72		1	6
18	เหนียวนาคราช	S 73		1	6

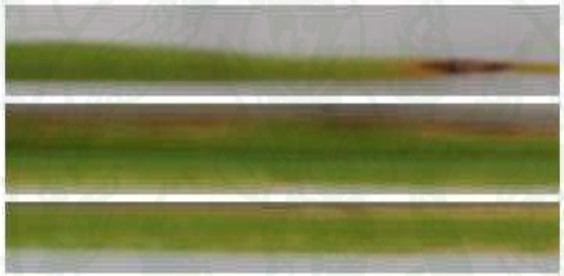
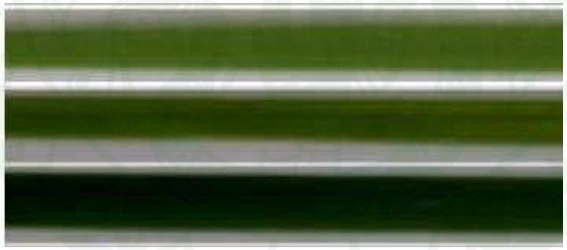
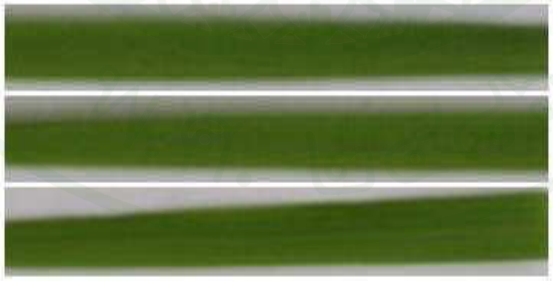
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ1 (ต่อ)

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	รูปภาพความรุนแรงในการติดเชื้อ	จำนวนแอลลีลต้านทาน	ระดับความรุนแรง
19	เหนียวหอม	S 74		1	6
20	แมะแยง	S 75		1	5
21	ดอกพวง	S 76		1	2

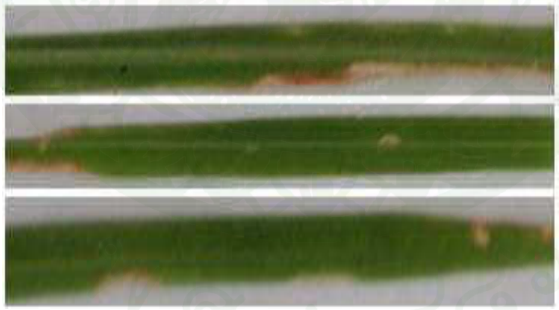
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ1 (ต่อ)

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	รูปภาพความรุนแรงในการติดเชื้อ	จำนวนแอลลีลต้านทาน	ระดับความรุนแรง
22	ขืนดิน	S 77		1	5
23	แม่ห้าง	L54		1	0
24	พานทอง	L 55		1	1

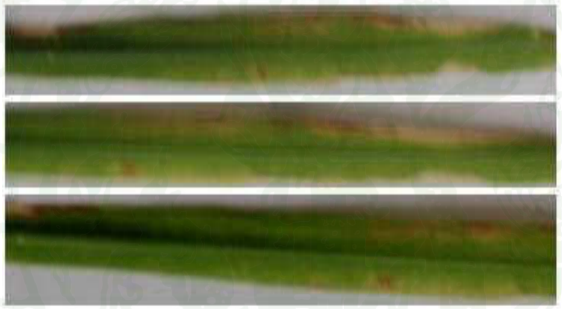
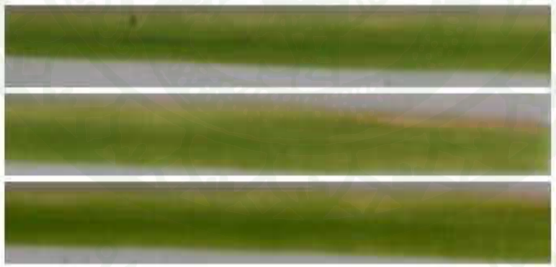
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ1 (ต่อ)

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	รูปภาพความรุนแรงในการติดเชื้อ	จำนวนแอลลีลต้านทาน	ระดับความรุนแรง
25	อีปี๊ด	L 56		1	0
26	ป้องแอ้ว 2	L 68		0	5

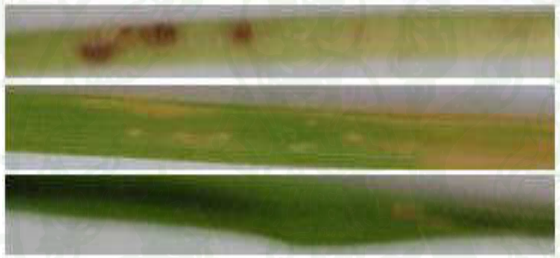
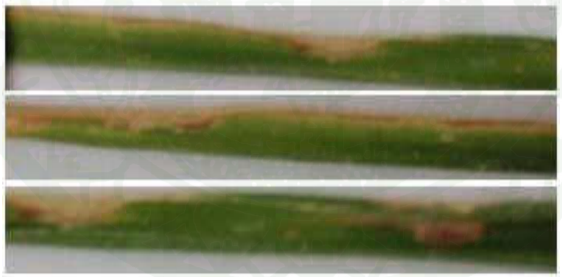
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ1 (ต่อ)

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	รูปภาพความรุนแรงในการติดเชื้อ	จำนวนแอลลีลต้านทาน	ระดับความรุนแรง
27	หอมทุ่ง 20990	E 141		1	5
28	ชัยนาท 1	R 2		0	4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ1 (ต่อ)

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	รูปภาพความรุนแรงในการติดเชื้อ	จำนวนแอลลีลต้านทาน	ระดับความรุนแรง
29	IR64	R 20		1	5
30	KDML 105	C1		0	6

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ จ1 (ต่อ)

หมายเหตุ 0 ไม่มีการเข้าทำลายด้วยเชื้อราโรค

1 จุดสีน้ำตาลขนาดเล็กกว่า 0.5 มิลลิเมตรไม่มีการสร้างสปอร์

2 จุดสีน้ำตาลขนาด 0.5-1.0 มิลลิเมตร ไม่มีการสร้างสปอร์

3 แผลรูปร่างกลมถึงเรียวยาวขนาด 1.0-3.0 มิลลิเมตร มีสีเทาตรงกลาง และมีสีน้ำตาลตามขอบ ไม่มีการสร้างสปอร์

4 มีแผลเป็นรูปกระสวยที่สามารถสร้างสปอร์ได้ ขนาดตั้งแต่ 3.0 มิลลิเมตร ขึ้นไป แผลมีสีเทาตรงกลางและสีน้ำตาลแดงโดยรอบ

5 มีแผลเหมือนระดับ 4 แต่มีขนาดของแผลกว้างขึ้น

6 ขนาดของแผลแต่ละแผลลุกลามติดต่อถึงกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นายกฤตกิตติศักดิ์ ไพตรีจิตต์

วันที่เกิด 25 ตุลาคม พ.ศ. 2517

สถานที่เกิด อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช

ประวัติการศึกษา วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ตำแหน่งปัจจุบัน -

สถานที่ทำงานปัจจุบัน -

ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ -

ทุนการศึกษาที่ได้รับ -

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์