



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์

พันธุศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การค้นหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย
โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Investigation and Searching of Rice Blast Resistance Genes in Landrace Thai Rice
Using DNA Markers

นามผู้วิจัย นางสาวอิงออน สีแก้ว

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ธานี ศรีวงศ์ชัย, วท.ด.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช, Dr.Agr.Sci)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การค้นหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย
โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Investigation and Searching of Rice Blast Resistance Genes in Landrace Thai Rice
Using DNA Marker

โดย

นางสาวอิงอร สี่แก้ว

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อิงออน สีแก้ว 2554: การค้นหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้
ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ปริญญาวิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์, Ph.D. 135 หน้า

โรคไหม้ของข้าว (Rice blast) มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Magnaporthe grisea* เป็นปัญหา
สำคัญปัญหาหนึ่งของการผลิตข้าวทั่วโลก การใช้พันธุ์ข้าวที่มียืนต้านทานถือเป็นวิธีการป้องกันที่
มีประสิทธิภาพมากที่สุด งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสืบค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ในข้าว
พันธุ์พื้นเมืองไทย จำนวน 203 พันธุ์ ประกอบด้วย ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคเหนือ 19 พันธุ์ ข้าวพันธุ์
พื้นเมืองภาคใต้ 40 พันธุ์ ข้าวขึ้นน้ำพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 45 พันธุ์ และข้าวพันธุ์
พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 99 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ
ยีนต้านทานโรคไหม้ 3 ตำแหน่ง คือ ยีน *Pi9*, *Pi36* และ *Pid2* ผลจากการตรวจสอบพบยีน
ต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 64, 17 และ 143 ตัวอย่าง ตามลำดับ นอกจากนี้ ได้
ทำการศึกษาปฏิบัติการตอบสนองทางโรคใบไหม้ของข้าวนิปปอนบาระ (Nipponbare *Pi9*) ที่มี
ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ที่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง
ต่อเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทย จำนวน 8 ไอโซเลท ผลการศึกษาพบว่า ข้าวนิปปอนบาระที่มียืน
ต้านทานโรคไหม้ *Pi9* สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ BAG 8.5 ได้ ส่วนอีก 7 ไอโซเลท ไม่
สามารถก่อให้เกิดโรคใบไหม้ได้ทั้งในข้าวนิปปอนบาระที่มียืนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* และข้าว
นิปปอนบาระที่ไม่มียืนต้านทาน (susceptible check) จึงสรุปได้ว่าอย่างน้อยข้าวนิปปอนบาระที่มี
ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ *M. grisea* (BAG 8.5) จากประเทศ
ไทยได้หนึ่งไอโซเลท ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกพ่อแม่
แม่พันธุ์ เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของประเทศไทยให้ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้ใน
อนาคต

Eng-orn Srikeaw 2011: Investigation and Searching of Rice Blast Resistance Genes in Landrace Thai Rice Using DNA Markers. Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Mr. Chatchawan Jantasuriyarat, Ph.D. 135 pages.

Rice blast, caused by the pathogen *Magnaporthe grisea*, is one of the most destructive factors in rice production worldwide. The information on rice blast-resistant varieties is the most economical and effective method of controlling this disease and developing rice varieties in breeding. In this study, 203 landrace Thai rice cultivars including 19 cultivars from the North, 45 cultivars of floating rice from the Northeast, 99 cultivars from the Northeast and 40 cultivars from the South were analyzed by PCR using DNA markers specific to rice blast resistance genes: *Pi9*, *Pi36* and *Pid2*. The results showed that 64, 17 and 143 landrace Thai rice cultivars harbor resistance alleles of rice blast resistant genes: *Pi9*, *Pi36* and *Pid2* respectively. These results indicated that landrace Thai rice could be used in resistance breeding program to improve the resistance to rice blast in Thailand in the future. In addition, we study a total of 8 Thai *M. grisea* isolates collected and identified from different areas of Thailand. They were used for the evaluation of leaf blast disease reaction in Nipponbare that carrying the *Pi9* gene by comparison with susceptible check variety (Nipponbare). The results, Nipponbare *Pi9* showed resistance to Thai *M. grisea* isolate BAG 8.5 while the other seven isolates showed avirulent reaction to Nipponbare both with and without *Pi9* gene. The information from this study provides essential information for selecting the parents for rice blast resistant breeding program in Thailand in the future.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(3)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	27
ผลและวิจารณ์	56
สรุปและข้อเสนอแนะ	81
สรุป	81
ข้อเสนอแนะ	82
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	83
ภาคผนวก	94
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการศึกษา	95
ภาคผนวก ข การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าว พันธุ์พื้นเมืองกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนต้านทาน <i>Pi9</i> (DQ285630.1)	99
ภาคผนวก ค การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์ พื้นเมืองกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนต้านทาน <i>Pid2</i> (FJ915121.1)	108
ภาคผนวก ง การศึกษาปฏิบัติการตอบสนองทางโรคใบไหม้ของข้าวพันธุ์ นิปปอนบารุที่มียีนต้านทานโรคไหม้ <i>Pi9</i> ต่อเชื้อราโรคไหม้ใน ประเทศไทย จำนวน 8 ไอโซเลต	118

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก จ	สรุปการกระจายตัวของอัลลิทในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการค้นหา	
	ยีนต้านทานโรค	121
ประวัติการศึกษาและการทำงาน		135



สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ยีนต้านทานโรคไหม้ข้าวที่ได้ทำการโคลนแล้ว	15
2	ตัวอย่างข้าวพื้นเมืองที่ใช้ในการศึกษา	28
3	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาหาพื้นที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย	41
4	องค์ประกอบ และปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของการตรวจสอบหา ยีนต้านทาน <i>Pi9</i> ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย	43
5	องค์ประกอบ และปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของการตรวจสอบหา ยีนต้านทาน <i>Pi36</i> ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย	44
6	องค์ประกอบ และปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของการตรวจสอบหา ยีนต้านทาน <i>Pid2</i> ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย	46
7	รายชื่อเชื้อราโรคไหม้ <i>M. grisea</i> ที่ใช้ศึกษาปฏิกิริยาตอบสนองทางโรค	48
8	การตรวจวัดปริมาณการเกิดโรคเชื้อราใบไหม้ในข้าว	55
9	การกระจายตัวของอัลลีลในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ pB8 สำหรับยีนต้านทานโรคไหม้ <i>Pi9</i>	58
10	การกระจายตัวของอัลลีลในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS สำหรับยีนต้านทาน <i>Pi36</i> หลังตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>HinfI</i>	64
11	การกระจายตัวของอัลลีลในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Con2F/Con2R สำหรับยีนต้านทาน <i>Pid2</i>	68
12	ผลการศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองทางโรคใบไหม้ของข้าวนิปปอนบาเรที่มี ยีนต้านทานโรคไหม้ <i>Pi9</i> ต่อเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทย	
	จำนวน 8 ไอโซเลท	79

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ง1	ผลการให้คะแนนการเกิดโรคใบไหม้ของข้าวนิปอนบาเร่ที่มีอินด้านทานโรค ไหม้ <i>Pi9</i>	119
จ1	สรุปการกระจายตัวของอัลลีลในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการค้นหาอินด้านทาน โรคไหม้	122

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ต้นข้าวนิปปอนบาร (Nipponbare <i>Pi9</i>) ที่มียืนต้นทาน <i>Pi9</i> อายุ 3 สัปดาห์	50
2	ต้นข้าวนิปปอนบาร (Nipponbare <i>Pi9</i>) ที่มียืนต้นทาน <i>Pi9</i> ขณะออกรวง	50
3	ต้นกล้าข้าวที่มีอายุ 3 สัปดาห์ก่อนการปลูกเชื้อ (inoculation)	51
4	แผนผังการปลูกข้าวเพื่อทดสอบความต้านทานต่อโรคใบไหม้ของข้าวนิปปอนบารที่มียืนต้นทานโรคใบไหม้ <i>Pi9</i> กับเชื้อราโรคใบไหม้ในประเทศไทย จำนวน 8 ไอโซเลต	53
5	ขั้นตอนฉีดพ่นสารละลายสปอร์เชื้อราโรคใบไหม้ลงบนต้นกล้าข้าวที่มีอายุ 3 สัปดาห์	54
6	หลังการปลูกเชื้อ (inoculation) โรคใบไหม้ลงบนต้นกล้าข้าว จึงเก็บต้นกล้าข้าวไว้ในห้องมืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายต้นข้าวของสปอร์เชื้อรา	54
7	เกณฑ์การวัดระดับความรุนแรงของโรคใบไหม้ 7 ระดับ	55
8	ผลการตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอ โดย agarose gel electrophoresis 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมือง	56
9	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ pB8 ที่มีความจำเพาะกับยืนต้นทานโรคใบไหม้ <i>Pi9</i> ในตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย	57
10	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองป้อนพอกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยืน <i>Pi9</i> (DQ285630.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank	60
11	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ R36STS มีความจำเพาะกับยืนต้นทานโรคใบไหม้ <i>Pi36</i> ในตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย	62
12	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ R36STS มีความจำเพาะกับยืนต้นทานโรคใบไหม้ <i>Pi36</i> ในตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยหลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>HinfI</i>	62

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์พื้นเมืองแต่ละพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน <i>Pid2</i> (Con2F/Con2R) หลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>Mlu</i> I	67
14	ตัวอย่างการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองนางรองกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน <i>Pid2</i> (FJ915121.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank	69
15	การใช้โปรแกรม ClustalW 2.0.12 multiple sequence alignment เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน <i>Pid2</i> (FJ915121.1 (<i>Oryza sativa</i> Indica Group cultivar Digu B-lectin receptor kinase (<i>Pid2</i>) gene, complete cds))) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank	70
16	ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่ได้จากการทำ sequence alignments ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีอัลลีลของยีนต้านทานโรคไหม้ <i>Pid2</i> กับตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีอัลลีลไม่ต้านทานของยีน <i>Pid2</i> เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน <i>Pid2</i> (FJ915121.1)	74
17	ผลการศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองทางโรคใบไหม้ของข้าวนิปปอนบาระที่มียีนต้านทานโรคไหม้ <i>Pi9</i> ต่อเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทย จำนวน 8 ไอโซเลต	80
ภาพผนวกที่		
ก1	แถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา	98
ข1	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวนิปปอนบาระที่มียีนต้านทาน <i>Pi9</i> (Nipponbare <i>Pi9</i>) ซึ่งเป็น positive control กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนต้านทาน <i>Pi9</i> (DQ285630.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank	100

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ข2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองบือขอพอกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน <i>Pi9</i> (DQ285630.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank	101
ข3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองข้าวแดงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน <i>Pi9</i> (DQ285630.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank	102
ข4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองช่อนิมิตกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน <i>Pi9</i> (DQ285630.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank	103
ข5 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองพวงมาลัย 31-5-6 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน <i>Pi9</i> (DQ285630.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank	104
ข6 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองเขียวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน <i>Pi9</i> (DQ285630.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank	105
ข7 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองดอเหลื่องกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน <i>Pi9</i> (DQ285630.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank	106

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ข8 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองข้าวหอม (GS.4810) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน <i>Pi9</i> (DQ285630.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank	107
ค1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองเก่ารวง 17-2-106 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน <i>Pid2</i> (FJ915121.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank	109
ค2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองดอสามเดือน กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน <i>Pid2</i> (FJ915121.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank	110
ค3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองเหนียวบาลี กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน <i>Pid2</i> (FJ915121.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank	112
ค4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองพวงเงิน กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน <i>Pid2</i> (FJ915121.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank	113
ค5 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองเหลื่องลีซอ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน <i>Pid2</i> (FJ915121.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank	115

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่

หน้า

- ค6 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองนางรอง กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *Pid2* (FJ915121.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank

116

การค้นหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเชื้อโรคใหม่
ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยโดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Investigation and Searching of Rice Blast Resistance Genes
in Landrace Thai Rice Using DNA Markers

คำนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อประเทศไทยมาโดยตลอด เนื่องจากข้าวเป็นอาหารหลักของคนไทย และเป็นอาชีพหลักของเกษตรกรชาวไทย ผลผลิตข้าวกว่าร้อยละ 55 ใช้บริโภคในประเทศ ส่วนที่เหลือประมาณร้อยละ 45 ส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศทั่วโลก ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตข้าวอันดับ 6 ของโลก ในปี 2550/51 มีปริมาณผลผลิตข้าวรวม 19.4 ล้านตัน คิดเป็นร้อยละ 4.41 ของผลผลิตข้าวโลก ประเทศผู้ผลิตรายใหญ่ของโลกที่สำคัญ ได้แก่ จีน (30.72 %) อินเดีย (22.17 %) อินโดนีเซีย (8.24 %) บังกลาเทศ (6.73 %) และเวียดนาม (5.34 %) แต่ส่วนใหญ่ประเทศผู้ผลิตรายสำคัญจะผลิตเพื่อเป็นการบริโภคในประเทศ ปัจจุบันไทยครองส่วนแบ่งการตลาดข้าวโลกเป็นอันดับ 1 ด้วยสัดส่วนร้อยละ 30.48 คิดเป็นมูลค่าส่งออกอยู่ที่ 203,220 ล้านบาท (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2551ก)

องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติคาดการณ์ว่า ความต้องการข้าวเพื่อการบริโภคในอีก 20 ปีข้างหน้าจะเพิ่มสูงขึ้นร้อยละ 20-30 ของความต้องการที่มีอยู่ในปัจจุบัน ซึ่งในสภาพการณ์ดังกล่าวนี้ประเทศผู้ผลิตข้าวจะไม่สามารถขยายพื้นที่เพาะปลูกได้อีก ประเทศผู้ผลิตข้าวจะต้องให้ความสำคัญในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่ให้สูงขึ้น ประเทศไทยแม้จะมีส่วนแบ่งในตลาดข้าวโลกเป็นอันดับหนึ่ง แต่ว่าผลผลิตเฉลี่ยจัดอยู่ในเกณฑ์ต่ำ ผลผลิตข้าวเฉลี่ยของไทยในปี พ.ศ. 2551 อยู่ที่ 433.6 กิโลกรัม/ไร่ ในขณะที่ผลผลิตเฉลี่ยของโลกอยู่ที่ 662.4 กิโลกรัม/ไร่ โดยผลผลิตเฉลี่ยของประเทศคู่แข่งทางการค้าที่สำคัญ เช่น เวียดนามและจีน อยู่ที่ 780.8 และ 1,003.2 กิโลกรัม/ไร่ ตามลำดับ (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2551ข) ดังนั้นประเทศไทยควรเร่งรัดพัฒนางานศึกษาวิจัยพันธุ์ข้าว เพื่อยกระดับผลผลิตและให้ข้าวไทยสามารถต่อสู้ได้อย่างยั่งยืนบนตลาดข้าวโลก (สมาคมเมล็ดพันธุ์แห่งประเทศไทย, 2549)

ปัจจุบันความก้าวหน้าในด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้ดำเนินไปอย่างรวดเร็ว เทคโนโลยีชีวภาพหรืองานวิจัยขั้นพื้นฐานทางพันธุศาสตร์โมเลกุลด้านข้าว จะเป็นเครื่องมือที่สำคัญสำหรับการพัฒนาข้าวไทยอย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคตให้สามารถแข่งขันและเป็นผู้นำในตลาดโลกได้

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพอย่างหนึ่งที่สามารถใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมบางประการที่ต้องการ ซึ่งส่วนใหญ่มักใช้ประโยชน์ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์พืช และพันธุ์สัตว์ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection) และปรับปรุงพันธุ์ข้าวนั้น สามารถที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional breeding) โดยจะใช้ประโยชน์จากข้อมูลการวางตำแหน่งของยีนบนแผนที่จีโนมข้าว ซึ่งเป็นการหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอและลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจโดยใช้หลักการวิเคราะห์ตำแหน่งของยีนควบคุมลักษณะปริมาณ (QTL analysis) ทำให้ทราบถึงจำนวน ตำแหน่ง และผลกระทบของแต่ละยีนบนแผนที่จีโนม จากข้อมูลดังกล่าว เครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางบนตำแหน่งยีนโดยตรง หรือ วางอยู่ใกล้ชิดกับบริเวณที่มียีนที่ต้องการ (tightly linked markers) จะนำมาใช้ประโยชน์ช่วยในการคัดเลือกลักษณะที่มียีนดังกล่าว โดยไม่ต้องรอจนกว่าพืชจะเจริญเติบโตและแสดงลักษณะนั้นออกมา ทั้งนี้เนื่องจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจะเป็นการคัดเลือกโดยตรงที่จีโนมไทป์ ดังนั้นสภาพแวดล้อมจึงไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของเครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถตรวจสอบได้ในทุกระยะเวลาของการเจริญเติบโต ทำให้ลดระยะเวลา ลดค่าใช้จ่าย โดยสามารถทดแทนการทดสอบในสภาพจริงได้

ข้าวพันธุ์พื้นเมือง เป็นพันธุ์ข้าวที่มีการคัดเลือกและเก็บรักษาโดยเกษตรกร สืบทอดกันมาหลายชั่วอายุ โดยพันธุ์ข้าวพื้นเมืองมีแหล่งยีนที่ควบคุมลักษณะที่สำคัญหลายลักษณะ เช่น ความต้านทานต่อโรคและแมลง ความทนทานต่อสภาพแล้ง และน้ำท่วม (Chang, 1976) หรือ สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี เมื่อเกิดโรคระบาด ข้าวพันธุ์พื้นเมืองเหล่านี้จึงสามารถอยู่รอดได้เนื่องจากมีแหล่งยีนต้านทานโรคหลายๆ ชนิดปะปนกันอยู่ (Harlan, 1992) อย่างไรก็ตาม พันธุ์เหล่านี้มักจะให้ผลผลิตต่ำ ดังนั้นพันธุ์ข้าวพื้นเมือง จึงมักถูกแทนที่ด้วยข้าวพันธุ์รับรองใหม่ๆ ที่ได้รับการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเนื่องจากให้ผลผลิตที่สูงกว่า ในปัจจุบันพันธุ์ข้าวพื้นเมืองซึ่งถือเป็นแหล่งพันธุกรรมที่มีค่าอย่างยิ่ง มีจำนวนลดลงอย่างน่าเป็นห่วง ดังนั้นจึงควรอนุรักษ์พันธุ์ข้าวพื้นเมืองเหล่านี้เอาไว้ เพื่อเป็นแหล่งของพันธุกรรมที่สามารถนำมาใช้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไปในอนาคต

โรคไหม้ในข้าว มีสาเหตุจากเชื้อรา *Magnaporthe grisea* เป็นปัญหาสำคัญปัญหาหนึ่งของการผลิตข้าว พบการระบาดของโรคนี้ได้ทั่วไปในพื้นที่ที่มีการปลูกข้าว การระบาดและระดับความรุนแรงของโรคจะแตกต่างกันตามพื้นที่ สภาพแวดล้อม ความเสียหายจากการเข้าทำลายของโรคซึ่งสามารถทำให้ผลผลิตลดลงสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งในปัจจุบันมีการทำนามากกว่า 1 ครั้งต่อปี ทำให้โรคนี้ระบาดตลอดทั้งปี เชื้อรา *M. grisea* เป็นเชื้อที่มีความหลากหลาย และมีความแปรปรวนของประชากรเชื้อสูง ทำให้ข้าวบางพันธุ์ที่แสดงความต้านทานสูงในอดีตกลับแสดงอาการอ่อนแอในเวลาต่อมา เนื่องจากเกิดการปรับตัวของเชื้อขึ้น (Zeigler *et al.*, 1998)

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพของข้าวมากที่สุดประเทศหนึ่งของโลก การได้มาและการเก็บรักษายีนจากแหล่งพันธุกรรมข้าวพันธุ์พื้นเมือง ถือได้ว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการรักษาแหล่งพันธุกรรมข้าวที่สำคัญ ดังนั้น ผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงความสำคัญของการจัดทำข้อมูลทางพันธุกรรมในระดับยีนที่ควบคุมลักษณะโรคไหม้ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย กอปรกับข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเกี่ยวกับจีโนมข้าวของนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก สามารถสืบค้นและทราบตำแหน่งที่แน่นอนของยีนที่ควบคุมลักษณะที่สำคัญบนแผนที่ยีนข้าว (genetic map) จากข้อมูลเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีการพัฒนาและเผยแพร่สาธารณะนั้น สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการสืบค้นหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย องค์ความรู้ที่ได้จากการสืบค้นยีนที่ควบคุมลักษณะนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไทยให้เหมาะสมกับสภาพท้องถิ่นต่อไปได้ในอนาคต ตลอดจนใช้เป็นข้อมูลทางพันธุกรรมในระดับยีนในการอนุรักษ์และเก็บรักษาพันธุ์ข้าวพื้นเมืองเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์แม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไทยให้ต้านทานต่อโรคไหม้ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสำรวจและค้นหา ยีน *Pi9*, *Pi36* และ *Pid2* ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองของไทย เพื่อใช้เป็นแหล่งของยีนที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไปในอนาคต นอกจากนี้เพื่อเป็นข้อมูลทางพันธุกรรมในระดับยีนในการเก็บรักษาและอนุรักษ์พันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มียืนต้านทานโรคไหม้

2. ศึกษาปฏิบัติการตอบสนองทางโรคใบไหม้ของข้าวพันธุ์นิปอนบาเร่ที่มียืนต้านทาน *Pi9* ซึ่งเป็นยืนต้านทานโรคไหม้ที่สามารถต้านทานเชื้อราโรคไหม้ได้อย่างกว้างขวางกับเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆในประเทศไทย

การตรวจเอกสาร

อนุกรมวิธานของข้าว

Scientific name: *Oryza sativa* L.

Common name: rice

Kingdom	Plant
Division	Embryophyta
Class	Angiospermae
Subclass	Monocotyledonae
Order	Graminales (Poales)
Family	Gramineae
Sub-family	Pooideae
Tribe	Oryzeae
Genus	<i>Oryza</i>
Species	<i>Oryza sativa</i> L.

ข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว วงศ์หญ้า (Family: Gramineae หรือ Poaceae) สกุลออริซา (Genus: *Oryza*) เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อนและอบอุ่น และสามารถขึ้นได้ตั้งแต่ระดับน้ำทะเลจนถึงระดับสูงประมาณ 3,000 เมตร นอกจากนี้ยังทนต่อสภาพดินหลากหลาย ตั้งแต่พื้นที่ดินที่น้ำท่วมสูง จนถึงพื้นที่สูงตามไหล่เขา ทนดินที่มีแร่ธาตุเหล็ก อะลูมิเนียม ดินเค็ม เป็นต้น ดังนั้นจึงมีประเทศต่างๆ ทั่วโลกมากกว่า 100 ประเทศในทุกทวีป ยกเว้นทวีปแอนตาร์กติกาที่ปลูกข้าวเพื่อการบริโภคได้ (อรอนงค์, 2547)

พันธุ์ข้าว

วิวัฒนาการและการแพร่กระจายของข้าวนั้น นักวิชาการสันนิษฐานว่า บรรพบุรุษของข้าวทั้งสองชนิด คือ ข้าวป่าและข้าวปลูก น่าจะเกิดจากบรรพบุรุษแรกสุดเดียวกัน ต่อมาจึงเปลี่ยนแปลงจากพืชป่าไปเป็นพืชปลูก สำหรับข้าวเอเชีย คงเกิดจากมนุษย์โบราณชาวเอเชียได้นำข้าวป่ามาปลูก

ในบริเวณที่อาศัยจนกลายเป็นพืชปลูก เมื่อประมาณ 10,000 ปีที่แล้วแถบบริเวณตะวันออกเฉียงใต้ ต่อมาในช่วงไม่เกิน 9,000 ปีที่แล้ว พบบริเวณปลูกข้าวในบริเวณทวีปเอเชียอีกหลายแห่ง ตั้งแต่ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย ภาคเหนือของบังกลาเทศ ภาคเหนือของพื้นที่แผ่นดินใหญ่ด้านตะวันออกเฉียงใต้ของเอเชีย ภาคตะวันตกเฉียงใต้และภาคใต้ของจีน เช่น บริเวณที่ราบแม่น้ำตอนเหนือของอินเดีย ทางตอนล่างด้านตะวันออกของเซเชลส์ทางทิศใต้ ตอนบนของพม่า ภาคเหนือของ ไทย ลาวและเวียดนามเหนือไปจนถึงบริเวณภาคตะวันตกเฉียงใต้ และภาคใต้ของจีน (จรัส, 2534)

เนื่องจากข้าวมีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางจึงพบข้าวชนิด (species) ต่างๆ มากมาย ซึ่งปัจจุบันมีทั้งหมด 23 ชนิด มีข้าวเพียง 2 ชนิด ที่มนุษย์ปลูกเพื่อการบริโภคคือ ข้าวปลูกเอเชีย (*Oryza sativa* Linn.) และข้าวปลูกแอฟริกา (*Oryza glaberrima* Steud.) มีจำนวนโครโมโซมเป็นแบบดิพลอยด์ (Diploid, $n=12$ หรือ $2n=24$) มีจำนวนพันธุ์มากกว่า 120,000 พันธุ์ ที่มีชื่อและลักษณะแตกต่างกัน จากความหลากหลายของชนิดข้าวต่างๆ ที่แพร่กระจายทั่วโลก ส่วนข้าวที่เหลือ 21 ชนิดเป็นข้าวป่า ซึ่งหมายถึง ข้าวที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ กระจายอยู่ตามที่ต่าง ๆ มีเอกลักษณ์เฉพาะคือมีหางข้าวแข็งยาว ส่วนกลีบที่หุ้มเมล็ดส่วนมากจะมีสีดำ เมล็ดเมื่อแก่หลุดร่วงง่าย ข้าวป่าที่เป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูกเอเชีย คือข้าวป่า *O. rufipogon* และข้าวป่า *O. nivara*

ข้าวปลูกเอเชียแบ่งออกเป็น 3 ชนิดย่อย (จรัส, 2534) โดยยึดถือลักษณะภายนอกของต้น และเมล็ดเป็นหลัก ดังนี้

1. ข้าวอินดิกา (*indica*) เป็นข้าวที่ปลูกในประเทศต่าง ๆ ในเขตร้อน เช่น จีนตอนใต้และตอนกลางศรีลังกา อินเดีย อินโดนีเซีย บังกลาเทศ ไทย และฟิลิปปินส์ เป็นต้น มีลักษณะลำต้นสูงและอ่อน แตกกอมาก ใบกว้างสีเขียวอ่อน เมล็ดยาว ค่อนข้างแบนและร่วงง่าย เมล็ดไม่มีหางข้าวแข็งหรือมีหางข้าวแข็งสั้นมาก ข้าวเปลือกมีขนสั้น

2. ข้าวจาปอนิกา (*japonica*) โดยข้าวสายพันธุ์นี้มีลักษณะเมล็ดป้อม กลมรี ทนต่ออากาศหนาว และมีปริมาณอะมิโลสต่ำ มีแหล่งกำเนิดจากทางภาคเหนือแล้วผ่านมาทางลุ่มแม่น้ำโขงในสมัยก่อนพุทธศตวรรษที่ 20 หลังจากนั้นลดจำนวนลงไปแพร่หลายในเขตอบอุ่นที่ญี่ปุ่น เกาหลี รัสเซีย ยุโรป และอเมริกา

3. ข้าวจาวานิกา หรือ ข้าวทรอปิคอลจาปอนิกา (*tropical japonica*) เป็นข้าวลักษณะเมล็ดป้อมใหญ่ ต้นสูง สันนิษฐานว่าเป็นข้าวพันธุ์ผสมระหว่างข้าวอินดิกาและจาปอนิกา นิยมเพาะปลูกใน อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน หมู่เกาะริวกิว และญี่ปุ่น แต่ไม่ค่อยได้รับความนิยมนักเพราะให้ผลผลิตต่ำ ลำต้นสูงและแข็ง ใบกว้างสีเขียวอ่อน แฉกขน้อย ข้าวเปลือกมีขนยาว เมล็ดกว้างและหนา เมล็ดร่วงยากและมีหางข้าวแข็งสั้นมากถึงยาว

ประเภทของข้าว

ข้าวที่ปลูกเพื่อการบริโภคสามารถจำแนกได้เป็นชนิดต่างๆ ดังนี้

1. การจำแนกข้าวตามชนิดของแป้งข้าว

แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ ข้าวเจ้า และ ข้าวเหนียว ซึ่งมีลักษณะเหมือนกันเกือบทุกอย่างแต่ต่างกันตรงที่ปริมาณอะมิโลสหรืออะมิโลแพคตินในเมล็ด

ก. ข้าวเจ้า ลักษณะเมล็ดข้าวสารสีขาวใส เมื่อนึ่งหรือหุงสุกจะมีสีขาวขุ่น ร่วนไม่เกาะติดกัน เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อเมล็ดข้าว เมล็ดข้าวจะมีปริมาณแป้งอะมิโลส (amylose) ประมาณ 10-30 เปอร์เซ็นต์ และอะมิโลแพคติน (amylopectin) 70-90 เปอร์เซ็นต์ ข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ เช่น 7-10 เปอร์เซ็นต์ ข้าวสุกจะนุ่ม มีความเหนียว ข้าวที่มีอะมิโลสมากประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปข้าวสุกจะร่วนและแข็ง

ข. ข้าวเหนียว ลักษณะเมล็ดข้าวสารสีขาวขุ่น เมื่อนึ่งหรือหุงสุกข้าวจะจับตัวกันแน่น เหนียวติดมือ เป็นข้าวที่มีปริมาณแป้งอะมิโลสน้อย แต่ประกอบด้วยแป้งอะมิโลแพคตินเป็นส่วนใหญ่ คือประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ข้าวสุกมีความเหนียว

2. การจำแนกตามฤดูกาลปลูก แบ่งออกเป็น

ก. ข้าวนาปี คือ ข้าวที่ปลูกในฤดูการทำนาปกติตามฤดูฝน ซึ่งจะแตกต่างกันไปในแต่ละภาคและท้องที่ ส่วนมากจะใช้พันธุ์ข้าวที่ไวแสง พันธุ์ข้าวนาปียังแบ่งออกเป็นพันธุ์ข้าวหนัก ข้าวกลางและข้าวเบา ตามอายุการเก็บเกี่ยว

ข. ข้าวนาปรัง (หรือนากรัง) คือ ข้าวที่ปลูกนอกฤดูทำนาปกติได้รับน้ำจากการชลประทานส่วนมากจะใช้พันธุ์ข้าวที่ไม่ไวแสง สามารถจะกำหนดอายุเก็บเกี่ยวของแต่ละพันธุ์ได้ค่อนข้างแน่นอน

3. การจำแนกตามนิเวศของพื้นที่ปลูกข้าวในประเทศไทย แบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท (สุกัญญา, 2536)

ก. ข้าวไร่ (upland rice) หมายถึง ข้าวที่ไม่ต้องการน้ำหล่อเลี้ยงในการเจริญเติบโต ปลูกโดยอาศัยน้ำฝนเพียงอย่างเดียว และมักจะตายถ้ามีน้ำขังอยู่นาน แต่คงต้องการความชุ่มชื้นของดินทำนองเดียวกับพืชไร่ ข้าวไร่จึงมักนิยมปลูกกันบนที่สูง มีปลูกมากทางภาคเหนือ (ตามดอย) และภาคใต้ (ปลูกแซมสวนยางอายุ 1-3 ปี) มีพันธุ์ดีที่ทางราชการแนะนำปลูก เช่น ชิวแม่จัน (ภาคเหนือ) กู๋เมืองหลวง และดอกพยอม (ภาคใต้)

ข. ข้าวนาสวน (lowland rice) หมายถึง ข้าวที่ต้องการน้ำหล่อเลี้ยงในระหว่างการเจริญเติบโต มักปลูกกันเป็นส่วนมาก ทนความลึกของน้ำได้ไม่เกิน 1 เมตร การทำนาก็ทำวิธีดำเป็นส่วนใหญ่ บริเวณทำนาสวนมีประมาณ 84 เปอร์เซ็นต์ ของเนื้อที่นาในประเทศไทย มีพื้นที่ปลูกมากที่สุดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง ส่วนมากจะให้ผลผลิตต่อไร่สูงกว่าข้าวไร่ และข้าวขึ้นน้ำ อยู่ในระหว่าง 30-50 ถึงต่อไร่

ค. ข้าวขึ้นน้ำ หรือข้าวนาเมืองหรือข้าวฟางลอย (floating rice) เป็นข้าวที่ปลูกในพื้นที่ที่มีน้ำท่วมลึกในฤดูน้ำหลาก โดยมีน้ำท่วมลึกเกินกว่า 80 เซนติเมตร บางที่น้ำอาจจะลึกถึง 3-4 เมตรก็ได้ พันธุ์ข้าวชนิดนี้จะสามารถปรับตัวได้ตามระดับน้ำที่สูงขึ้นจึงเรียกว่า ข้าวขึ้นน้ำ ซึ่งพบมากในพื้นที่ราบลุ่มภาคกลาง ส่วนในภาคใต้พบบ้างเป็นบางแห่ง ปลูกในเนื้อที่นาประมาณ 16 เปอร์เซ็นต์ ของเนื้อที่นาในประเทศไทย การปลูกมักจะใช้หว่านข้าวแห้งตอนต้นฤดูฝน พันธุ์ที่ทางราชการแนะนำ เช่น เล็บมือนาง 111 ปิ่นแก้ว 56 ตะเภาแก้ว 161 นางฉลอง กข 17 และกข 19 เป็นต้น ผลผลิตโดยเฉลี่ยประมาณ 200-300 กิโลกรัม/ไร่ เมล็ดข้าวเมื่อนำไปสีมักจะแตกหักเนื่องจากข้าวสารมีท้องไขหรือท้องปลาชิวมาก พ่อค้าจึงนิยมเอาไปทำข้าวเหนียวเพราะเมื่อนำไปสีแล้วได้ข้าวสารที่มีคุณภาพไม่ดี

การอนุรักษ์พันธุกรรมข้าว

ประเทศไทยอยู่ในเขตศูนย์กลางของความผันแปรทางพันธุกรรมของข้าว มีความหลากหลายของพันธุ์ข้าวในแหล่งปลูกข้าวต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศ ทั้งข้าวปลูก พันธุ์พื้นเมือง และข้าวป่า แต่ปัจจุบันเชื้อพันธุ์ข้าวได้สูญหายไปเป็นจำนวนมาก เนื่องจากการพัฒนาประเทศและการที่เกษตรกรนิยมใช้ข้าวพันธุ์ดี ปลูกแทนพันธุ์ข้าวพื้นเมือง จึงน่าเป็นห่วงว่าในอนาคตอันใกล้นี้ อาจจะไม่มียีนพันธุ์ข้าวพื้นเมืองเหลืออยู่อีกต่อไป หมายถึงว่า พันธุ์ดีที่บรรพบุรุษได้คัดเลือกไว้นับเป็นเวลาพันๆ ปี จะสูญพันธุ์ไป โดยไม่สามารถนำกลับคืนมาได้

ข้าวพันธุ์พื้นเมือง

ข้าวพันธุ์พื้นเมือง หรือ ข้าวพื้นบ้าน กำเนิดจากการเพาะพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่แข็งแรง ทนแล้งทนฝน เหมาะสมกับดินในท้องที่โดยการคัดเลือกของชาวนาในท้องถิ่น ปลูกแล้วจึงเก็บเมล็ดพันธุ์ไว้ส่งต่อจากลูกสืบหลาน อีกส่วนหนึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์ของข้าวตามธรรมชาติ เมื่อเพาะปลูกข้าวหลายๆ พันธุ์ในท้องนาเดียวกัน ข้าวสายพันธุ์เดิมก็มีการผสมกันเป็นข้าวพันธุ์ใหม่ แต่เมื่อไม่พ้นสายตาชาวนาผู้เฝ้าสังเกต ข้าวพันธุ์ใหม่ที่เกิดขึ้นจะถูกเก็บรักษาพันธุ์ไว้ หว่านนาในฤดูต่อไป ข้อดีของข้าวพันธุ์พื้นเมือง คือมีความหลากหลายของพันธุ์ค่อนข้างสูง คุณภาพเมล็ดดี มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม มีความต้านทานต่อโรค และแมลงศัตรูพืช เช่น โรคไหม้ ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการสูญเสียผลผลิตข้าวในแต่ละปี เป็นต้น ลักษณะดีเหล่านี้เป็นฐานพันธุกรรมที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ได้พันธุ์ดีในอนาคต ถ้าพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีคุณภาพได้สูญพันธุ์ไป ก็จะไม่สามารถสร้างพันธุ์ข้าวที่มีคุณภาพดีในการปรับปรุงพันธุ์ที่ตรงตามความต้องการของตลาดได้ (ภัทรดา และ กมลพร, 2552)

โรคไหม้ในข้าว

โรคไหม้ในข้าว (Rice blast) ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Magnaporthe grisea* หรือ *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. เป็นปัญหาสำคัญปัญหาหนึ่งของการผลิตข้าวทั่วโลก โรคไหม้ในข้าวหรือที่เรียกว่าโรคไหม้คอรวง โรคเน่าคอรวง หรือโรคข้อลำต้นเน่า ทั้งนี้เป็นการเรียกชื่อตามลักษณะอาการของโรคที่เกิดกับต้นข้าวในแต่ละระยะการเจริญเติบโต แม้แต่ในต่างประเทศก็มีการเรียกชื่อโรคหลาย ๆ อย่างเช่นเดียวกัน เช่นในสหรัฐอเมริกาเรียกว่า blast หรือ rotten neck โรคนี้

เป็นที่รู้จักกันมาแต่สมัยโบราณหลายร้อยปีแล้วโดยพบการรายงานครั้งแรกในประเทศจีน ปี ค.ศ. 1637 ลักษณะอาการของโรคนี้ บอกว่าเกิดจากความร้อนแสงอาทิตย์ และเรียกชื่อ ซึ่งแปลว่า rice fever disease ในปี ค.ศ. 1704 พบรายงานในประเทศญี่ปุ่น ต่อมา ในปี 1828 พบรายงานในประเทศอิตาลี โดยเรียกชื่อว่า บลูโซน ในสหรัฐอเมริกา มีการรายงาน ในปี ค.ศ. 1876 และตามด้วยประเทศอินเดีย ในปี ค.ศ. 1913 (Rice knowledge bank, 2009)

เชื้อสาเหตุของโรคไหม้ *Magnaporthe grisea*

เชื้อรา *Magnaporthe grisea* อยู่ในกลุ่มของเชื้อราแอสโคไมซิส มีจีโนมขนาดประมาณ 40 เมกกะเบส มีจำนวนโครโมโซม 7 แท่ง (Dean *et al.*, 2005) ในความเป็นจริงแล้วเชื้อราชนิดนี้สามารถเข้าทำลายพืชตระกูลหญ้าได้มากกว่า 50 สายพันธุ์ การเข้าทำลายของเชื้อรานี้สามารถเกิดได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าว การเกิดและการแพร่ระบาดของโรคจะรุนแรงถ้าสภาพแวดล้อมอย่างเหมาะสม การแพร่กระจายของโรคนี้เชื้อสาเหตุสามารถติดไปกับเมล็ด ใบ ขั้วปล้อง ช่อดอก ต้นข้าว (Sesma and Osbourn, 2004) แพร่กระจายตามดิน น้ำ ลม และเศษฟางข้าว ในข้าวที่ต้านทานต่อโรคนี้บางครั้งพบว่า เชื้อราชนิดนี้สามารถสร้างเชื้อสายใหม่ๆ ที่มีความรุนแรงในการเข้าทำลายและอาจทำลายพันธุ์ต้านทานได้ (Zeigler, 1998)

วงจรชีวิตของเชื้อราโรคไหม้

การเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในระยะแรกจะเกิดขึ้นหลังจากคอนิเดีย (conidia) สัมผัสกับผิวพืชโดยใช้ส่วนที่เรียกว่า “spore tip mucilage” ซึ่งอยู่บริเวณปลายสุดของ conidia โดยมีน้ำที่ให้ความชื้นอย่างเพียงพอกระตุ้นให้เกิดการงอกและพบว่า การงอกของ conidia จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วโดยจะเกิดขึ้นภายในชั่วโมงแรกของการที่เชื้อเข้าสัมผัสกับพืช จากนั้นเชื้อจะสร้าง infection tube โดยใช้ appressorium แทะผ่านเนื้อเยื่อพืชชั้น cuticle และ epidermis cell โดยการเข้าทำลายของเส้นใยเชื้อราเข้าไปในเซลล์พืชโดยผ่านทาง stomata เนื่องจากใบข้าวถูกหุ้มด้วย waxy cuticle เมื่อคอนิเดียสัมผัสบนผิวพืชจะงอก germ tube ภายในเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งมีลักษณะเป็นตะขอตรงปลาย (germ-tube tip hook) และบวมขึ้นสร้างเป็น appressorium (Howard, 1994) ในระหว่างการพัฒนาของ appressorium จะมีการสะสมของเม็ดสี melanin ในบริเวณ appressorium จากนั้นเส้นใยเชื้อราจะสร้างโครงสร้างที่ใช้แทงเข้าผนังเซลล์พืช เรียกว่า penetration peg และใช้แรงดันต่ง (turgor pressure) ขับเคลื่อนให้ penetration peg แทะผ่านเข้าไปในผนังเซลล์พืช

(Howard and Valent, 1996) เส้นใย infection hyphae สืบขึ้นจาก penetration peg สามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วทั่วใบข้าวใช้เวลาประมาณ 72 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ ลักษณะอาการในระยะนี้สามารถเห็นชัดและเริ่มเกิดแผลรูปไข่ขนาดเล็กและมีลักษณะเหลืองซีด (chlorosis) ต่อมาแผลลุกลามเชื่อมต่อกันและเนื้อเยื่อตาย (necrosis) ในที่สุด (Talbot, 2003)

ลักษณะอาการของโรคไหม้

ลักษณะอาการของโรคไหม้จะปรากฏให้เห็นบนส่วนของต้นข้าวที่อยู่เหนือพื้นดิน คือที่ใบ กาบใบ ข้อต่อระหว่างใบ คอรวง และข้อลำต้น ทั้งนี้จะแบ่งอาการของโรคไหม้ตามอายุของต้นข้าวได้เป็น 3 ระยะ (สมคิด และคณะ, 2542) คือ

ก. ระยะกล้า ที่ใบมีแผลจุดสีน้ำตาล ลักษณะคล้ายรูปตา มีสีเทาอยู่ตรงกลางแผลมีขนาดแตกต่างกันไป ความกว้างระหว่าง 2-5 มิลลิเมตร และความยาวประมาณ 15-20 มิลลิเมตร จุดแผลนี้สามารถขยายลุกลามจนแผลรวมกันทั่วบริเวณใบในกรณีที่โรครุนแรง กล้าข้าวจะแห้ง และพุ่มตาย อาการคล้ายถูกไฟไหม้ (blast)

ข. ระยะแตกกอ อาการของโรคพบได้ที่ใบ กาบใบข้อต่อของใบและข้อต่อของลำต้น ขนาดของแผลจะใหญ่กว่าที่พบในระยะกล้าแผลลุกลามติดต่อกันได้ ที่บริเวณข้อต่อใบจะมีลักษณะแผลช้ำสีน้ำตาลดำ และใบมักหลุดจากกาบใบเสมอ

ค. ระยะคอรวง ถ้าข้าวเพิ่งจะเริ่มให้รวง เมื่อถูกเชื้อราเข้าทำลาย เมล็ดจะลีบหมด แต่ถ้าเชื้อราเข้าทำลายตอนรวงข้าวแก่ใกล้เก็บเกี่ยว คอรวงจะปรากฏรอยแผลช้ำ สีน้ำตาล ทำให้เปราะหักพับง่าย รวงข้าวร่วงหล่นเสียหายมาก

ในแหล่งที่มีการทำนามากกว่าปีละครั้งจะพบโรคนี้แพร่ระบาดเป็นประจำ โดยเฉพาะในแหล่งที่ปลูกข้าวหนาแน่น อับลม ใต้อายุสูง และมีสภาพแห้งแล้งในตอนกลางวัน ขึ้นจัดในตอนกลางคืน ถ้าต้นข้าวอยู่ในระยะเจริญเติบโตและสภาพอากาศมีลมพัดแรงและหนาวจัดเป็นเวลาติดต่อกันหลายวัน ทำให้ต้นข้าวชะงักการเจริญเติบโต ใบจะม้วนและเหลือง ต้นแคระแกร็น หากข้าวอยู่ในระยะตั้งท้องจะผสมไม่ติด ทำให้เมล็ดลีบ

ความเสียหาย

ในปัจจุบันพบโรคไหม้เกือบทุกแห่งที่มีการปลูกข้าวทั่วโลกและเป็นสาเหตุให้ผลผลิตข้าวในแต่ละปีต้องสูญเสียไปหลายพันล้านบาท (Zeigler, 1995)

ในช่วงระยะ 30 ปี มาแล้ว มีการระบาดอย่างรุนแรงถึง 3 ช่วง ในประเทศจีน คือ ในปี ค.ศ. 1982-1985, 1992-1994 และ 2001-2005 โดยพื้นที่การระบาด ในปี ค.ศ. 1982-1985 ประมาณ 3.8 ล้านเฮกตาร์ ทำให้สูญเสียผลผลิตหลายล้านตัน และในปี ค.ศ. 1999 เฉพาะภาคใต้ของจีนแหล่งเดียว สูญเสียผลผลิต 1.1 ล้านตัน (Sun *et al.*, 1999)

ประเทศอินเดีย โรคไหม้เป็นปัญหาหลักในพื้นที่การเพาะปลูกข้าวของประเทศ เช่น ภาคตะวันออกมีการระบาดมากที่สุด ตามด้วยภาคเหนือ และภาคใต้ ซึ่งในบางครั้งอาจสูญเสียผลผลิตถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (Widawsky and O'Toole, 2009) ในปี ค.ศ. 2004 ได้รายงานว่าผลผลิตข้าวในรัฐ West Bengal ซึ่งเป็นรัฐที่มีพื้นที่ผลิตข้าวที่ใหญ่ที่สุดในอินเดีย ได้รับความเสียหายจากโรคไหม้อย่างรุนแรง ทำให้ผลผลิตข้าวลดลงเหลือเพียง 168 กิโลกรัม/เฮกตาร์ จากการสำรวจของนักวิจัยโรคข้าวในระหว่างปี ค.ศ. 2001-2005 พบความเสียหายทั้งสิ้นใน 125 เขตพื้นที่ โดยคิดความเสียหายเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ในแต่ละเขตพื้นที่ สำหรับภาคตะวันออกของอินเดียเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดมากที่สุดในช่วงระยะ 12 ปีที่ผ่านมา เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีอากาศเย็น เหมาะแก่การแพร่ระบาดของโรคไหม้ (Variar, 2007)

ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมีภูมิอากาศที่หนาวเย็น จึงเป็นปัจจัยในการเพิ่มการแพร่ระบาดของโรคไหม้ในช่วงการการเพาะปลูกข้าว ถึงแม้ว่าประเทศญี่ปุ่นมีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้ ตั้งแต่ในช่วงต้นศตวรรษจนถึงปัจจุบัน และมีการแนะนำข้าวสายพันธุ์ต้านทานโรคไหม้หลายสายพันธุ์ แต่ก็ยังมีการระบาดอย่างรุนแรงซึ่งสร้างความเสียหายต่อผลผลิต 20-100 เปอร์เซ็นต์ ในบางพื้นที่และในปี ค.ศ. 1993 สร้างความเสียหายต่อผลผลิตทั้งประเทศคิดเป็น 45.2 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ประเทศญี่ปุ่นต้องมีการนำเข้าข้าวจากต่างประเทศ

ประเทศเกาหลีมีภูมิอากาศเหมือนประเทศอื่นที่มีการแพร่ระบาดของโรคไหม้ที่เป็นสาเหตุการสูญเสียผลผลิตข้าวในทุกๆ ปี โดยในช่วงปี ค.ศ. 1984 -1985 เกือบจะ 20 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่เพาะปลูกข้าวทั้งหมดที่มีการระบาดของโรคไหม้อย่างรุนแรง

ประเทศอินโดนีเซีย มีการเพาะปลูกข้าว 1.1 ล้านเฮกตาร์ ต้องเผชิญกับปัญหาโรคไหม้อย่างรุนแรง ข้าวไร่ซึ่งเป็นพันธุ์ด้านทานกลับไม่ต้านทานโรคไหม้หลังจาก 1-2 ปีของช่วงการเพาะปลูก ส่งผลให้บางปีมีการสูญเสียผลผลิตถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในปี ค.ศ. 2004 ในทางภาคตะวันตกของบริเวณเพาะปลูกข้าวไร่หลายร้อยเฮกตาร์ ไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตข้าวเนื่องจากความเสียหายจากโรคไหม้และทำให้สูญเสียผลผลิตถึง 70 เปอร์เซ็นต์ (Sobrizal, 2007)

สำหรับประเทศไทยได้มีรายงานยืนยันว่าพบโรคนี้ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2496 โดยแผนกโรควิทยา กองพืชพันธุ์ กรมกสิกรรม โดยเป็นกับข้าวพันธุ์หอมเสวยรัฐ ที่สถานีทดลองเกษตรกลางบางเขน และบริเวณใกล้สถานีรถไฟมักกะสัน ซึ่งสันนิษฐานว่าโรคนี้อาจคิดมาจากข้าวที่มาจากประเทศญี่ปุ่น ในระหว่างสงครามโลกครั้งที่สอง หรือ โรคนี้อาจมีอยู่แล้วแต่ยังไม่ระบาดรุนแรง ผลกระทบจากการแพร่ระบาดของโรคไหม้ ซึ่งทำความเสียหายอย่างมากต่อการผลิตข้าวมาโดยตลอดช่วงหลายปีมานี้ การระบาดครั้งที่รุนแรงมากที่สุดของโรคไหม้เกิดขึ้นในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย ในปี 2535 ซึ่งร้อยละ 90 ของความเสียหายอยู่ในพื้นที่ภาคเหนือ โดยผลผลิตข้าวของจังหวัดเชียงใหม่ได้รับความเสียหายร้อยละ 16 ของพื้นที่เสียหายในภาคเหนือทั้งหมด คิดเป็นมูลค่าประมาณ 436 ล้านบาท (Smitamana *et al.*, 2000) และในปี 2541 พบว่ามีการแพร่ระบาดของโรคไหม้ถึงร้อยละ 100 ในช่วงที่ข้าวยี่ดปล้องในจังหวัดเชียงใหม่ ต่อมาพบโรคนี้ได้ทั่วไปทุกภาคที่มีการปลูกข้าวในประเทศไทย

จากการสุ่มรายงานสถานการณ์โรคและแมลงศัตรูข้าวประจำสัปดาห์ ของกรมการข้าว ในช่วง ตั้งแต่วันที่ 21-27 สิงหาคม 2552 พบการระบาดของโรคไหม้ในพื้นที่ จังหวัดนครสวรรค์ พื้นที่เสียหายประมาณ 25,000 ไร่ แม่ฮ่องสอนพื้นที่เสียหายประมาณ 3,500 ไร่ (กรมการข้าว, 2552ก) และในช่วงเดือนตุลาคม พบการระบาดของโรคไหม้ จังหวัดเลย ในพื้นที่จำนวน 6 อำเภอ มีพื้นที่เสียหาย 63,605 ไร่ (กรมการข้าว, 2552ข)

ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานีได้ออกสำรวจความเสียหาย พันธุ์ข้าว กข15 ของเกษตรกรในพื้นที่บ้านนาหว้า ตำบลนาหว้า อำเภอปทุมราชวงศา พบการระบาดของโรคไหม้ในระยะคอรวง ความรุนแรง 100 เปอร์เซ็นต์ ความเสียหายมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จากการสำรวจพื้นที่ใกล้เคียง ตำบลพนา ตำบลพระเหลา อำเภอพนา ตำบลลือ อำเภอปทุมราชวงศา ตำบลโคกกลาง อำเภอลืออำนาจ จังหวัดอำนาจเจริญ จากการสุ่มสำรวจพบระดับความรุนแรงโรคไหม้ในระยะคอรวง 50 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ จากการประเมินผลผลิตคาดว่าเสียหายมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์

(ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี, 2553)

กรมส่งเสริมการเกษตรได้ทำการสรุปข่าวเกษตรเผยแพร่ผ่านหนังสือพิมพ์ ประจำวันที่ 24 กันยายน 2553 เกี่ยวกับโรคไหม้ โดยสรุปการแพร่ระบาดของโรคไหม้ในจังหวัดมหาสารคาม พื้นที่เสียหาย 60,000 ไร่ ระบาดหนักที่สุดใน 5 อำเภอ 775 หมู่บ้าน คือที่อำเภอโกสุมพิสัย เขียวยืน กันทรวิชัย วาปีปทุม และอำเภอแกลง (บ้านเมือง, 2553) นอกจากนี้ยังพบการระบาดในจังหวัดบุรีรัมย์ในนาข้าวของ เกษตรกรจำนวน 5 อำเภอ พื้นที่กว่า 33,200 ไร่ สร้างความเดือดร้อนให้กับเกษตรกรเป็นอย่างมาก (ASTV ผู้จัดการ, 2553)

จากข้อมูลสถานการณ์โรคไหม้ในประเทศไทยนับว่าเป็นปัจจัยในการกำหนดปริมาณผลผลิตข้าวเป็นอย่างมากในแต่ละปี จากความเสียหายซึ่งถือว่าเป็นโรคข้าวที่มีความสำคัญที่สุดของประเทศไทย ดังนั้นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการควบคุมการระบาดของโรคไหม้ คือ การลดความเสี่ยงของการระบาดของโรค โดยเร่งรัดการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มียืนที่มีความสามารถในการต้านทานต่อโรค (Ou, 1985) ซึ่งยืนต้านทานโรคไหม้ในข้าวสามารถแบ่งได้เป็น 2 พวก คือ ยืนที่ต้านทานต่อเชื้อราเฉพาะสายพันธุ์ กับยืนที่ต้านทานเชื้อราได้หลากหลายสายพันธุ์ (Ou, 1985 and Parveliet, 1979) ยืนต้านทานโรคไหม้ในข้าวได้ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้สามารถต้านทานต่อโรคไหม้ได้ผลเป็นอย่างดี แต่ปัญหาที่สำคัญคือยืนต้านทานโรคเหล่านี้เป็นยืนที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อราโรคไหม้เพียงไม่กี่สายพันธุ์ จึงทำให้พันธุ์ข้าวที่มียืนต้านทานโรคนั้นๆ จะสูญเสียความสามารถในการต้านทานต่อโรคไหม้ในระยะเวลาเพียงไม่กี่ปี เนื่องจากการปรับตัวของสายพันธุ์เชื้อราโรคไหม้ให้สามารถทนทานต่อยืนต้านทานโรคนั้นได้

การศึกษายืนต้านทานโรคไหม้

พืชมีกลไกระดับโมเลกุลเพื่อต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคต่างๆ กลไกหนึ่งที่ใช้ในการต่อต้านโรคไหม้ในข้าว คือ gene-for-gene system (Flor, 1971) โดยการแสดงออกของ avilurence (AVR) gene ในเชื้อก่อโรคจะไปกระตุ้นการทำงานของกลไกป้องกันที่ขึ้นอยู่กับการต้านทาน (R) gene ในพืช สมมติฐานที่เป็นไปได้ในการอธิบายกลไกนี้ คือ ligand-receptor model ผลผลิตของ R gene อาจเป็น receptor ที่สามารถจดจำ ligand ที่สร้างขึ้นโดย AVR gene แล้วส่งผลให้เกิดการส่งสัญญาณเพื่อตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อก่อโรค โครงสร้างของ R gene ที่ได้มี

การศึกษาส่วนใหญ่ประกอบด้วย leucine-rich repeat (LRR) domain (Hammond-Kosack and Jones, 1996) ซึ่งโปรตีนที่มีส่วน LRR ในสัตว์และเชื้อราส่วนใหญ่ทำหน้าที่จับกับ ligand เป็น protein-protein interaction motif (Braun *et al.*, 1994; Jones and Jones, 1997) R gene ที่ประกอบด้วย LRR domain แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 extra-cytoplasmic และกลุ่มที่ 2 คือ cytoplasmic LRRs ซึ่ง R gene ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 โครงสร้างของ cytoplasmic LRRs พบส่วน nucleotide binding site (NBS) อยู่บริเวณกลางโปรตีนและมีส่วน LRR domain บริเวณใกล้ C-terminus การเข้าใจกลไกการเข้าทำลายพืชของเชื้อก่อโรคจึงเป็นสิ่งจำเป็นต่อการป้องกันพืชไม่ให้เกิดโรคและทำให้ได้ผลผลิตตามที่ต้องการ (Menden *et al.*, 1996)

ยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวที่ถูกโคลนแล้ว

ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมานักวิทยาศาสตร์ได้ทำการโคลนยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวที่เป็นสาเหตุมาจากเชื้อรา *M. grisea* และนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้สามารถต้านทานต่อโรคไหม้ได้ผลเป็นอย่างดี (Boman *et al.*, 1992) ดังนั้นการค้นหายีนต้านทานตัวใหม่ๆ เพื่อนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวจึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ สำหรับยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวมีมากกว่า 50 ยีน ได้มีการจำแนกและสร้างแผนที่ยีนในข้าวหลายสายพันธุ์ แต่ถึงอย่างไรก็ตาม มียีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวเพียง 9 ยีนเท่านั้นที่ได้ทำการโคลนยีนและหาลำดับเบสเสร็จสมบูรณ์แล้ว ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวที่ได้ทำการโคลนแล้ว

ยีน	ลักษณะของยีน	โครโมโซม	เอกสารอ้างอิง
<i>Pib</i>	NBS-LRR	2	Wang <i>et al.</i> , 1999
<i>Pita</i>	NBS-LRR	12	Bryan <i>et al.</i> , 2000
<i>Pik^h</i>	NBS-LRR	11	Sharma <i>et al.</i> , 2005
<i>Pi9</i>	NBS-LRR	6	Qu <i>et al.</i> , 2006
<i>Pid2</i>	B-lectin receptor kinase	6	Chen <i>et al.</i> , 2006
<i>Pi2</i>	NBS-LRR	6	Zhou <i>et al.</i> , 2006
<i>Piz-t</i>	NBS-LRR	6	Zhou <i>et al.</i> , 2006
<i>Pi36</i>	NBS-LRR	8	Liu <i>et al.</i> , 2007

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ยีน	ลักษณะของยีน	โครโมโซม	เอกสารอ้างอิง
<i>Pi37</i>	NBS-LRR	1	Lin <i>et al.</i> , 2007

ที่มา: ชัชวาล และ สุริพร (2552)

ยีนต้านทานเชื้อราโรคไหม้ตัวแรกที่ได้ถูกโคลนสำเร็จ คือ ยีน *Pib* โดย Wang และคณะ ในปี ค.ศ. 2001 ยีน *Pib* นี้ได้ถูกถ่ายถอดมาจากแหล่งกำเนิด 2 แหล่งที่เป็นอิสระต่อกัน คือ จากข้าวอินโดนีเซียและจากข้าวมาเลเซีย ยีน *Pib* มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศญี่ปุ่นได้เป็นอย่างดี โดยยีน *Pib* มีโครงสร้างที่เป็น nuclear binding site, NBS และ leucine rich repeat motif, LRR โมทิฟ และจากการศึกษาการตอบสนองของยีนต้านทาน *Pib* พบว่าสมาชิกในกลุ่มยีนนี้ (*Pib*, *PibH8*, *HPibH8-1* และ *HPibH8-2*) มีการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสัญญาณจากสภาพแวดล้อมต่าง ๆ มากมาย เช่น อุณหภูมิ แสง น้ำ และสารเคมี เช่น jasmonic acid และ salicylic acid, ethylene และ probenazole (Wang *et al.*, 2001)

ยีนต้านทาน *Pita* มีตำแหน่งอยู่ตรงบริเวณเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมข้าวแท่งที่ 12 ยีนต้านทาน *Pita* ถูกโคลนโดย Bryan และคณะ ในปี ค.ศ. 2000 ยีนต้านทาน *Pita* มีรีเซพเตอร์ (receptor) ในส่วนของไซโตพลาสซึมและมี NBS และ LRR โมทิฟ ที่ปลาย C-terminus ของโปรตีนข้าวสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ (*pi-ta* (-)) มีรูปแบบของยีนที่แตกต่างจากยีนต้านทานเพียงหนึ่งกรดอะมิโนเท่านั้น นอกจากยีนต้านทาน *Pita* แล้วยีนความรุนแรง (Avirulence gene) ในเชื้อราโรคไหม้ก็ถูกโคลนขึ้นด้วย ซึ่งปฏิกริยาระหว่างยีนต้านทานโรคไหม้ (*Pita*) และยีนความรุนแรง (*Avr-Pita*) ก่อให้เกิดความต้านทานขึ้นในข้าว โดย Jia และคณะในปี ค.ศ. 2000 ได้แสดงให้เห็นว่าโปรตีน Avr-Pita สามารถจับกันได้โดยเฉพาะเจาะจงกับ LRD โมทิฟของโปรตีนจากยีนต้านทาน *Pita* โดยแสดงให้เห็นทั้งวิธี Yeast two-hybrid และ in vitro binding assay ทำให้คาดว่าโปรตีนทั้งสองสามารถจับกันได้ภายในเซลล์ของข้าวและกระตุ้นระบบต้านทานของยีน *Pita*

ยีนต้านทานโรคไหม้อีก 4 ชนิด คือ ยีน *Pi2*, *Pi9*, *Piz-t* และ *Piz* มีตำแหน่งอยู่ที่บริเวณเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมข้าวแท่งที่ 6 (Liu *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2004) แต่ยีนต้านทานเหล่านี้มีแหล่งกำเนิดที่แตกต่างกัน โดยยีน *Pi2* และ *Piz-t* ได้รับการถ่ายถอดมาจากข้าวพันธุ์อินดิกา

สายพันธุ์ 5173 และ TKM1 ตามลำดับ (Mackill and Bouman, 1992) ยีนต้านทาน *Piz* มีต้นกำเนิดมาจากข้าวของอเมริกาสายพันธุ์ Zewith (Kiyosawa, 1967) และยีนต้านทาน *Pi9* ถูกถ่ายทอดมาจากข้าวป่า (*Oryza minuta*; $2n=4x=48$) (Amante-Bordeos *et al.*, 1992) ยีนต้านทานทั้ง 4 ตัวนี้ สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง (broad-spectrum resistance) (Liu *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2004) ดังตัวอย่างเช่น ยีนต้านทาน *Pi9* ในข้าวสายพันธุ์ 75-1-127 ได้รับการทดสอบกับเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ กว่า 100 สายพันธุ์ ของประเทศฟิลิปปินส์ ที่สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (The International Rice Research Institute, IRRI) โดยไม่พบสายพันธุ์เชื้อราโรคไหม้ที่สามารถก่อโรคได้ นอกจากนี้ Liu และคณะในปี ค.ศ. 2002 ได้ทำการทดสอบสายพันธุ์เชื้อราโรคไหม้อีก 43 สายพันธุ์ จาก 13 ประเทศ ก็ไม่พบสายพันธุ์เชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ใดที่สามารถก่อโรคกับข้าวสายพันธุ์ 75-1-127 ที่มียีนต้านทาน *Pi9* ได้

ยีนต้านทานทั้ง 4 ยีนถูกโคลนในปี ค.ศ. 2006 (Qu *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006) ยีนทั้ง 4 ยีนนี้ มีความคล้ายคลึงกันมากถึง 96% ในระดับของกรดอะมิโน โดยบริเวณที่มีความแตกต่างกันมากที่สุดระหว่างยีนต้านทานทั้ง 4 คือ บริเวณ LRR โมทิฟ จากการทดลองสลับเปลี่ยนโมทิฟระหว่างยีนต้านทาน *Pi2* และ *Pi9* (*Pi2/Pi9* chimeric gene) พบว่าส่วน LRR โมทิฟ เป็นส่วนสำคัญในการกำหนดความเฉพาะเจาะจงต่อปฏิกิริยาตอบสนองของยีนต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ

ข้าวสายพันธุ์ Digu ของประเทศจีน สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ จำนวน 156 สายพันธุ์ จากประเทศจีนและประเทศญี่ปุ่น และถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประเทศจีนอย่างกว้างขวาง (Chen *et al.*, 2004) จากการศึกษาทางพันธุศาสตร์พบว่าข้าวสายพันธุ์ Digu มียีนต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้อยู่ 2 ยีนด้วยกัน คือ ยีนต้านทาน *Pi-d(t)1* และ *Pid2* โดยยีนต้านทาน *Pi-d(t)1* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมข้าวแท่งที่ 2 และยีนต้านทาน *Pi-d2* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมข้าวแท่งที่ 6 (Chen *et al.*, 2004) ซึ่งต่อมายีนต้านทาน *Pid2* ได้ถูกโคลนในปี ค.ศ. 2006 โดย Chen และคณะ ยีนต้านทาน *Pid2* นี้มีโครงสร้างของโปรตีนที่แตกต่างจากยีนต้านทานตัวอื่นๆ คือ มีส่วนของน้ำตาลแมนโนสที่สามารถจับกับเลคตินได้อยู่ภายนอกเซลล์ (a bulb-type mannose specific binding lectin, β -lectin) และในส่วนภายในเซลล์มีโครงสร้าง serine-threonine kinase domain ซึ่งโปรตีนจากยีนต้านทาน *Pid2* นี้จะมีตำแหน่งอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยข้าวที่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้มียีนต้านทาน *Pid2* ที่แตกต่างจากตัวที่ไม่ต้านทานเพียงแค่กรดอะมิโนหนึ่งตัวที่ตำแหน่ง 441 ของโปรตีนยีนต้านทานเท่านั้น

ข้าวอินดิกา สายพันธุ์ Kasalath รหัส Q61 มียีน *Pi36* ซึ่งเป็นยีนต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ สายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศจีนได้ โดยมีตำแหน่งของยีนต้านทานอยู่บนโครโมโซมข้าวแท่งที่ 8 จากการใช้ลำดับเบสของจีโนมข้าวจากปอนิกา สายพันธุ์ นิปอนบารุ เป็นตัวอ้างอิงในการทำนายยีนต้านทาน *Pi36* พบว่าลำดับเบสทั้ง 3 sequences มีโครงสร้างที่เป็น nucleotide-binding site (NBS) และ leucine-rich repeat motif (LRR) หลังจากนั้น 3 sequences ที่คาดว่าจะจะเป็นยีนนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจากจีโนมมิก ดีเอ็นเอโดยใช้ช่วงของปฏิกิริยาถูกลูกโซ่ที่หลากหลายช่วง ผลของ amplicons ที่ได้จากการทำพีซีอาร์ไปใส่ใน เวกเตอร์ pCambia1300 หรือ เวกเตอร์ pYLtac27 เพื่อที่จะคัดเลือกลำดับ sequences ที่มีการต้านทานและมีความสัมพันธ์กับลักษณะของฟีโนไทป์ ใน Constructs จะมียีนที่คาดว่าจะมีความสามารถในการต้านทานต่อโรคไหม้ แล้ว transform เข้าสู่ข้าวสายพันธุ์ Q1063 ที่ไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ จากการทดสอบทั้ง 3 sequences ที่คาดว่าจะจะเป็นยีน พบว่ามีเพียง *Pi36-3* ที่มีความสามารถในการต้านทานต่อโรคไหม้ ส่วนอีก 2 sequences ที่คาดว่าจะจะเป็นยีนต้านทานแต่พบว่ามีส่วนของโครงสร้างเหมือนยีนแต่ไม่ใช่ยีน (Pseudogenes) โพรตีนของยีน *Pi36* ประกอบไปด้วย 1,056 กรดอะมิโน มีเพียงหนึ่งกรดอะมิโนเท่านั้นที่ถูกแทนที่จากกรดแอสปาร์ติก (Aspartic acid) เป็น เซอรีน (Serine) ที่ตำแหน่ง 590 ซึ่งมีความสัมพันธ์กับลักษณะของฟีโนไทป์ที่ต้านทานโรคไหม้ของยีน *Pi36* เป็น single copy gene ในข้าว และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยีน *Mla1* และ *Mla6* ซึ่งเป็นยีนต้านทานโรคราแป้งในข้าวบาเลย์มากกว่ายีนต้านทาน *Pita*, *Pib*, *Pi9* และ *Piz-t* ในข้าว จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR แสดงให้เห็นว่า *Pi36* มีการแสดงออกในข้าวสายพันธุ์ Kasalath

จากการทำ in silico map-based cloning พบว่า ข้าวสายพันธุ์ St. No. 1 มียีนต้านทาน *Pi37* ในข้าวนิปอนบารุ มีตำแหน่งของ nucleotide-binding site- leucine-rich repeat motif 4 ตำแหน่ง ซึ่ง 4 ตำแหน่งนี้ (*Pi37-1*, -2, -3 และ -4) เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยการสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสายพันธุ์ St. No. 1 โดยใช้ช่วงของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่หลากหลายช่วงและโคลนในเวกเตอร์ที่เป็น Binary system ในแต่ละ construct มีลำดับเบสที่คาดว่าจะจะเป็นยีนที่มีความสามารถในการต้านทานต่อโรคไหม้ แล้ว transform เข้าสู่ข้าวสายพันธุ์ Q1063 ที่ไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ พบว่ามีเพียง *Pi37-3* ที่มีความสามารถในการต้านทานต่อโรคไหม้ ในขณะที่ -1, -2 และ -4 เป็นแค่โครงสร้างที่เหมือนยีนแต่ไม่ใช่ยีน (Pseudogenes) ยีน *Pi37* ถอดรหัสได้กรดอะมิโนจำนวน 1,290 กรดอะมิโน ซึ่งมีเพียงสองตำแหน่งในบริเวณของ NBS ที่ถูกแทนที่ (V239A และ I247M) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับลักษณะของฟีโนไทป์ที่ต้านทานโรค จากการวิเคราะห์การแสดงออกในข้าวสาย

พันธุ์ St. No. 1 พบว่า ผลิตภัณฑ์ของยีน *Pi37* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยีน *rp1* ในข้าวโพดมากกว่า ยีนต้านทาน *Pita*, *Pib*, *Pi9*, *Pi2*, *Pi36* และ *Piz-t* ในข้าว (Liu *et al.*, 2007)

จากการทำแผนที่ยีน และการโคลนยีน *Pik^h* ในข้าวสายพันธุ์ Tetep ซึ่งมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ *Magnaporthe grisea* ในแถบบริเวณตะวันตกเฉียงเหนือของ Himalayan ของประเทศอินเดีย ยีน *Pik^h* มีตำแหน่งของยีนอยู่บนโครโมโซมข้าวแท่งที่ 11 มีความยาว 1.5 Kb มีโครงสร้างที่เป็น nucleotide-binding site- leucine-rich repeat ซึ่งเป็นกลุ่มโครงสร้างของยีนต้านทาน จากการวิเคราะห์โครงสร้างและการแสดงออกของยีน *Pik^h* จะพบการแสดงออกของยีนนี้เมื่อมีการถูกกระตุ้นด้วยเชื้อก่อโรค (Sharma *et al.*, 2005)

ยีน *Pi9* ในข้าวอินดิกาสายพันธุ์ 75-1-127 มีต้นกำเนิดมาจากข้าวป่า *Oryza minuta* (Liu *et al.*, 2002) ซึ่งยีน *Pi9* นี้ มีความแตกต่างจากยีนต้านทานตัวอื่น เช่น ยีน *Pib* และ *Pita* โดยสามารถต้านทานเชื้อราโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์ ตัวอย่างเช่น ข้าวอินดิกาสายพันธุ์ 75-1-127 ที่มี ยีนต้านทาน *Pi9* ได้รับการทดสอบเชื้อราโรคไหม้กว่า 100 สายพันธุ์ ที่สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติในประเทศฟิลิปปินส์ นอกจากนี้ยังต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ อีก 43 สายพันธุ์ ที่เก็บรวบรวมมาจาก 13 ประเทศ จากการศึกษาของ Liu และ คณะในปี 2002 พบว่ายีน *Pi9* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมข้าวแท่งที่ 6 (Liu *et al.*, 2002) ยีน *Pi9* อยู่ในกลุ่ม NBS-LRR (nucleotide-binding site (NBS) and leucine-rich repeat) ของยีนต้านทาน ซึ่งที่จริงแล้วยีน NBS-LRR จะพบในพืชใบเลี้ยงคู่ ยีน NBS-LRR ในธัญพืชมักจะมีอินทรอนตรงบริเวณ NBS (Bai *et al.*, 2002) ตัวอย่าง เช่น ยีน *Pib* (Wang *et al.*, 1999) มีอินทรอน 2 ตำแหน่ง ในบริเวณถอดรหัสยีน (1,340 และ 308 คู่เบส) ในขณะที่ยีน *Pita* มีอินทรอนขนาด 1,463 คู่เบสในบริเวณถอดรหัสยีน (Bryan *et al.*, 2000) สำหรับยีน *Pi9* ก็มีอินทรอน 2 ตำแหน่ง ในบริเวณถอดรหัสยีน แต่อินทรอนในยีน *Pi9* หนึ่งในอินทรอนมีขนาดใหญ่ (5,362 คู่เบส) กว่าอินทรอนในยีน *Pib* การจัดจำแนกยีนและศึกษาลักษณะของยีนต้านทานจะช่วยทำให้เข้าใจปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อก่อโรคได้ดียิ่งขึ้น

การต้านทานโรคไหม้โดยการใช้ความรู้ทางด้านพันธุกรรม

ในการควบคุมโรคไหม้ส่วนมากมักใช้พันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ Zeigler และคณะใน ปี ค.ศ.1995 ได้ศึกษาถึงการพัฒนาพันธุ์ข้าวต้านทานโรคเพื่อช่วยในการจัดการโรค และพยายามศึกษาให้เข้าใจอย่างชัดเจนเกี่ยวกับยีนต้านทานโรคไหม้ เพราะข้าวบางพันธุ์แสดง

ความต้านทานที่สูงในอดีต แต่ในระยะไม่กี่ปีต่อมาเมื่อนำมาปลูกกลับแสดงอาการที่ค่อนข้างอ่อนแอ จากการศึกษาถึงความไม่คงตัวของความต้านทานพบว่าเกิดจากสาเหตุสำคัญสองประการ คือ (1) การแสดงออกของความต้านทานที่ไม่เพียงพอ เมื่อทำการปรับปรุงพันธุ์ต่อความหลากหลายของเชื้อ และ (2) ความแปรปรวนของประชากรเชื้อ

การสร้างข้าวพันธุ์ต้านทานต่อโรคไหม้ นับว่ามีความสำคัญมากต่อแนวทางการปรับปรุงพันธุ์ข้าว การศึกษาพันธุกรรมของความต้านทานของข้าวทำให้พบความแปรปรวนของเชื้อและความขาดแคลนยีนที่ต้านทานต่อโรค (Mackill and Bonman, 1992) การศึกษายีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวอินดิกา พันธุ์ Kasalath ซึ่งเกิดจากการผสมข้าวจาปอนิกา 9 สายพันธุ์ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ที่ทราบตำแหน่ง 7 ตำแหน่ง จากการทดสอบพบว่าข้าวพันธุ์ที่มียีนต้านทานเป็นยีนเด่นอยู่สองชนิด โดยอยู่คนละตำแหน่งกัน ยีนสองชนิดนี้อยู่ต่างตำแหน่งจากยีนที่ทราบตำแหน่งแล้ว คือ *Pia*, *Pil*, *Pik*, *Pita*, *Pib* และ *Pit* และยีนอีกชนิดหนึ่งที่อยู่ในตำแหน่ง *Piz* การทดสอบยีนที่ตำแหน่งนี้ใช้เชื้อสายพันธุ์ 433.5 ซึ่งแสดงความรุนแรงต่อ *Piz'* แต่ไม่แสดงความรุนแรงต่อ *Piz* ผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าพันธุ์ Kasalath มียีน *Piz'* (Pan et al., 1998)

ระดับความต้านทานต่อโรคไหม้ของยีน *Pi2(t)* ในข้าว พบว่า ข้าว near isogenic lines (NIL) C101A51 มียีน *Pi2(t)* ในพื้นฐานทางพันธุกรรมของข้าวอินดิกา พันธุ์ CO39 ต้านทานต่อเชื้อโรคไหม้ในประเทศฟิลิปปินส์ถึง 455 สายพันธุ์จาก 18 lineages (Chen et al., 1996) การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ Aichi Asahi และข้าวจาปอนิกาพันธุ์อื่นๆ เพื่อสร้างข้าวที่มีระดับความต้านทานต่อโรคไหม้ที่สูงขึ้นโดยใช้เชื้อโรคไหม้สายพันธุ์รุนแรงจากประเทศจีน คือ CHNOS58-3-1 พบว่าข้าวทุกพันธุ์ต้านทานต่อเชื้อชนิดนี้ ยกเว้นข้าวที่มียีน *Pi4* ที่แสดงความต้านทานระดับปานกลางเท่านั้น จึงศึกษาข้าวในรุ่น F2 ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่าง Reiho (อ่อนแอ) กับ Aichi Asahi (ต้านทาน) พบว่ายีนนี้เป็นยีนเด่น นอกจากนี้ยังศึกษาเกี่ยวกับยีนอื่นๆ ในข้าวจาปอนิกาพันธุ์อื่นๆ เพิ่มเติม เช่น AK lines (Aichi Asahi × K59) ซึ่งพันธุ์ข้าวที่ใช้หนึ่งพันธุ์ไม่ทราบว่ามียีนใดอยู่บ้าง และใช้เป็นพันธุ์ทดสอบ ยีนใหม่ที่ได้เป็นยีนเด่นอีกยีนหนึ่ง ที่พบจากข้าวจำนวน 14 พันธุ์ ที่ไม่ใช่ยีน *Pi4* โดยให้ชื่อเป็นยีน *Pil9(t)* ซึ่งยีนนี้อยู่ใกล้กับยีน *Pita*² บนโครโมโซมคู่ที่ 12 ยีนนี้กระจายตัวอยู่ในข้าวพันธุ์จาปอนิกาและข้าวพันธุ์พื้นเมือง (Hayashi et al., 1994)

Morris และคณะ (1993) และ Dahu และคณะ (1995) รายงานว่าประชากรของเชื้อโรคไหม้มีความแตกต่างตามลักษณะทางธรรมชาติ โดยส่วนมากมักแตกต่างตามลักษณะพืชอาศัย จาก

การศึกษาพบว่า การเข้าทำลายตามธรรมชาติสะท้อนให้เห็นความเข้ากันได้ของพืชกับประชากรย่อยของเชื้อที่ทำการปลูกเชื้อกลับสู่พืชอาศัยเดิม เชื้อโรคใหม่หลายสายพันธุ์ไม่สามารถเข้าทำลายพืชอาศัยเดิมได้ โดยเฉพาะพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มใหญ่ เพราะจากการทดสอบต้นกล้าอ่อนที่ได้ให้ผลขนาดเล็ก ผลสรุปที่ได้ทำให้ทราบถึงลักษณะประชากรของเชื้อโรคใหม่และการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้เป็นอย่างดี รวมทั้งการประเมินความแปรปรวนของเชื้อโรคใหม่ซึ่งจำเป็นต่อการศึกษาระบาดวิทยาของโรคใหม่ โดยมีส่วนในการเลือกแหล่งพันธุ์กรรมเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ด้านทานโรคใหม่ได้เช่นกัน

เครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic Markers)

เครื่องหมายชีวภาพ คือ ตัวบ่งชี้ที่มีความจำเพาะเจาะจงในด้านต่างๆ ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ได้นำเอาเครื่องหมายที่เป็นเครื่องหมายลักษณะทางด้านการเกษตรต่างๆ มาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปฏิบัติให้สูงขึ้น ซึ่งเครื่องหมายที่ใช้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ

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

เครื่องหมายชีวเคมี (Biochemical marker) เป็นตัวระบุถึงความแตกต่างในตัวอย่างที่ทำการศึกษา เช่น การใช้ ไอโซเอ็นไซม์ หรือ โปรตีนในการศึกษาตัวอย่างต่างชนิดกัน หรือต่างพันธุ์กัน

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) คือ การใช้ดีเอ็นเอมาเป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบถึงความแตกต่างในระดับของยีนหรือดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ทำการศึกษา ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำ และมีความจำเพาะมากกว่าเครื่องหมายชนิดอื่น

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Markers) หมายถึง ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาจมีตำแหน่งบนโครโมโซม ในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือในออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA หรือ chloroplast DNA) และสามารถ

ถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ ความแตกต่างหรือโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนี้เอง ที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ (สุริพร, 2546)

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection) และปรับปรุงพันธุ์ข้าวนั้น สามารถที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional breeding) โดยจะใช้ประโยชน์จากข้อมูลการวางตำแหน่งของยีนบนแผนที่จีโนมข้าว ซึ่งเป็นการหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอและลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจโดยใช้หลักการวิเคราะห์ตำแหน่งของยีนควบคุมลักษณะปริมาณ (QTL analysis) ทำให้ทราบถึงจำนวน ตำแหน่ง และผลกระทบของแต่ละยีนบนแผนที่จีโนม จากข้อมูลดังกล่าว เครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางบนตำแหน่งยีนโดยตรง หรือ วางอยู่ใกล้ชิดกับบริเวณที่มียีนที่ต้องการ (tightly linked markers) จะนำมาใช้ประโยชน์ช่วยในการคัดเลือกต้นพืชที่มียีนดังกล่าว โดยไม่ต้องรอจนกว่าพืชจะเจริญเติบโตและแสดงลักษณะนั้นออกมา

จากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจะเป็นการคัดเลือกโดยตรงที่จีโนมไทป์ ดังนั้นสภาพแวดล้อมจึงไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออก เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถตรวจสอบได้ในทุกระยะเวลาของการเจริญเติบโต ทำให้ลดระยะเวลา ลดค่าใช้จ่าย โดยสามารถทดแทนการทดสอบในสภาพจริงซึ่งกระทำได้ยากในบางลักษณะ สำหรับข้อมูลเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละชนิดไม่ว่าจะเป็น Restriction fragment length polymorphism (RFLP), Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Amplified fragment length polymorphism (AFLP), simple sequence repeat (SSR) และ Sequence-Tagged Sites (STS) มีการรายงานในฐานข้อมูล Gramene จากความสำเร็จของการทำแผนที่จีโนมของข้าวและข้อมูลลำดับเบสของจีโนม ทำให้ทราบถึงยีนที่มีลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจที่สำคัญ (Dai *et al.*, 2007) เช่น ยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง (bacterial blight resistance genes) ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) คือ ยีน *Xa1*, *xa5*, *xa13*, *Xa21*, *Xa26*, และ *Xa27* (Chu *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2005; Iyer and McCouch, 2004; Song *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 2004; Yoshimura *et al.*, 1998) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib*, *Pita*, *Pi2*, *Pizt*, *Pi9*, *Pid2*, *Pi36*, และ *Pi37* (Bryan *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2006) และยีนทนทานน้ำท่วมขัง เช่น *Sub1A* (Xu *et al.*, 2006) เป็นต้น

Sequence-Tagged Sites (STS)

เครื่องหมาย STS เกิดขึ้นในปี 1989 โดย Olson และคณะ เนื่องจากการเข้ามามีบทบาทสำคัญของเทคนิค พีซีอาร์ในงานวิจัยโครงการจีโนมมนุษย์ พวกเขาได้เสนอว่าลำดับเบสของ single-copy genomic DNA สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายในการทำ genetic และ physical map ได้ นอกจากนี้ยังเสนอว่า ข้อมูลลำดับเบสบางส่วน (partial sequence) ของ genomic clones สามารถนำมาใช้ค้นหาตำแหน่งของเครื่องหมายนั้นบนโครโมโซมได้โดยวิธีพีซีอาร์ แทนที่จะต้องเก็บตัวอย่าง biological material ของโคลนต่างๆ ก็เปลี่ยนมาเก็บเป็นฐานข้อมูลของโคลนเหล่านั้นแทน ซึ่งง่ายและมีประโยชน์มากกว่า (Olson *et al.*, 1989)

STS เป็นเครื่องหมายที่มีความจำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งที่สนใจศึกษา โดยใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของตำแหน่งเฉพาะบนจีโนมมาออกแบบไพรเมอร์ จากนั้นใช้หลักการของปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นๆ ผลผลิตจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นจะนำไปแยกโดยใช้ agarose gel electrophoresis ซึ่งความแตกต่างของแต่ละประชากรที่ศึกษานั้นเกิดจากเพิ่มเข้ามาของตำแหน่งลำดับเบส (addition) และการขาดหายไปของลำดับเบส (deletion) บริเวณจำเพาะนั้นหรือเกิดการกลาย (mutation) ในตำแหน่งของไพรเมอร์ คุณสมบัติที่สำคัญของเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้คือ ความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอบนจีโนมและส่วนใหญ่เป็นเครื่องหมายชนิด co-dominant คือสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง heterozygotes ออกจาก homozygotes ของพ่อ-แม่ได้ สำหรับข้อจำกัดของเครื่องหมายชนิดนี้ก็คือจะต้องมีข้อมูลลำดับเบสสำหรับออกแบบไพรเมอร์ (อภิชาติ, ม.ป.ป.)

นอกจากนี้ เครื่องหมาย STS ยังรวมถึงเครื่องหมายที่เป็น Microsatellites หรือ Simple Sequence Repeats (SSRs), Sequence-Tagged Microsatellites Sites (STMS) หรือ Simple Sequence Repeat Polymorphisms (SSRPs), Sequence Characterized Amplified Regions (SCARs), Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) และ Intersimple sequence repeat (ISSR) (Olson *et al.*, 1989)

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ Microsatellites

ไมโครแซทเทลไลต์ เป็นกลุ่มดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำกัน (repetitive DNA) พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ความผันแปรของจำนวนเบสซ้ำในจีโนมของสิ่งมีชีวิต สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดี โดยที่โพลิมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นนั้น เป็นผลเนื่องมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของไมโครแซทเทลไลต์ในตำแหน่งหนึ่งๆ โดยทั่วไปไมโครแซทเทลไลต์ จะประกอบด้วยเบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeat) มีตั้งแต่ 1-6 เบส โดยเบสซ้ำหนึ่งเบส เรียกว่า mono-nucleotide repeat เช่น (A)_n ซ้ำสองเบส เรียกว่า di-nucleotide repeat เช่น (CA)_n ซ้ำสามเบส เรียกว่า tri-nucleotide repeat เช่น (TAA)_n และ ซ้ำสี่เบส เรียกว่า tetra-nucleotide repeat) เช่น (GATA)_n โดยที่ n เป็นจำนวนซ้ำ เบสซ้ำเหล่านี้พบกระจายอยู่บริเวณต่างๆ ของจีโนมประมาณ 10^4 - 10^5 โกลัส จากลักษณะเฉพาะนี้ สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถเข้าคู่กับเบสจำเพาะ (unique sequences) เหล่านี้ ซึ่งเรียกว่า “ไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์ หรือ เอสเอสอาร์-ไพรเมอร์” ไพรเมอร์เหล่านี้ จะใช้เป็นจุดเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของส่วนที่เป็นเบสซ้ำต่อเนื่องที่อยู่ระหว่าง unique sequences ความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ซึ่งเป็นผลมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำที่ไม่เท่ากันนี้ ใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้

เอกลักษณ์และคุณสมบัติเด่น เฉพาะตัวที่ทำให้ไมโครแซทเทลไลต์กลายเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ดีที่สุดตัวหนึ่งในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คือ

1. ลักษณะที่มีหลายอัลลีลในโกลัส (multi-allelic nature) ทำให้ตรวจสอบความแตกต่างได้มากกว่า (high informative content)
2. มีการถ่ายทอดลักษณะที่เป็นแบบข่มไม่สมบูรณ์ (co-dominant transmission)
3. สามารถตรวจสอบได้ง่ายโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ และต้องการดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (small amount of starting DNA)
4. พบได้มากมายและครอบคลุมทั้งจีโนม (highly abundant with uniform genome coverage) โดยจะพบภายในยีน หรือ ระหว่างยีน
5. ไพรเมอร์ที่สร้างขึ้นมาสำหรับพีซีอาร์ นั้น มีความจำเพาะเจาะจงและสามารถแลกเปลี่ยนข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ระหว่างห้องปฏิบัติการที่ร่วมวิจัยได้สะดวก

จากการประเมินความหลากหลายทาง พันธุกรรมพบว่า ไมโครแซทเทลไลต์สามารถแยกความแตกต่าง (polymorphisms) ของสิ่งมีชีวิตได้ดีกว่าการใช้เทคนิคอื่นๆ ทั้งนี้ เนื่องมาจากจำนวนและความถี่ของอัลลีลที่ตรวจพบในตำแหน่ง (locus) หนึ่งๆ นั้นเอง ถึงแม้ไมโครแซทเทลไลต์จะเป็นเครื่องหมาย ดีเอ็นเอที่ให้ข้อมูลทางพันธุกรรมได้มากมายแต่พบว่ามีข้อจำกัดที่สำคัญคือ การพัฒนาหรือสร้างไมโครแซทเทลไลต์ไพรเมอร์นั้น มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงมาก ซึ่งจะเป็นอุปสรรคสำหรับพืชที่ไม่เคยมีข้อมูลลำดับเบสใน Genbank (สุริพร, 2546)

Sequence Characterized Amplified Regions (SCARs)

เครื่องหมายชนิด SCARs เป็นการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยใช้ข้อมูลลำดับเบสที่ clone ได้จากการใช้เครื่องหมาย RAPD เพื่อพัฒนาเครื่องหมายให้มีความจำเพาะกับตำแหน่ง/ ลักษณะที่สนใจโดยการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความยาวหรือมีความจำเพาะมากกว่าการใช้เครื่องหมาย RAPD ซึ่งไพรเมอร์จะมีความยาวอยู่ในช่วง 15-30 เบส เครื่องหมายชนิดนี้สามารถหาความแตกต่างได้โดยตรงและรวดเร็ว เป็นเครื่องหมาย dominant ข้อดีของเครื่องหมายชนิดนี้คือ การทดลองซ้ำยังคงให้ผลเหมือนเดิมซึ่งต่างจากเครื่องหมาย RAPD เมื่อทดลองซ้ำ บางครั้งได้ผลที่ต่างจากเดิม (Olson *et al.*, 1989)

Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS)

เครื่องหมาย CAPS เป็นการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งผลผลิตจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นจะถูกนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยที่โพลีเมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นนั้น เป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างของตำแหน่งภายในลำดับเบสที่เกิด Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) หรือ จากการเพิ่มของตำแหน่งลำดับเบส (addition) และการขาดหายไปของลำดับเบส (deletion) และเป็นบริเวณที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งเมื่อนำไปแยกโดยใช้ agarose gel electrophoresis หรือ polyacrylamide gel electrophoresis ก็จะได้ขนาดหรือรูปแบบของชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ข้อดีของเครื่องหมายชนิดนี้คือ ส่วนใหญ่เป็นเครื่องหมายชนิด co-dominant มีความจำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งที่สนใจศึกษา ง่ายต่อการบันทึกผลและทำซ้ำ ยังคงให้ผลเหมือนเดิม สำหรับข้อจำกัดคือจะต้องมีข้อมูลลำดับเบสสำหรับหาตำแหน่งตัดของเอนไซม์จึงจะสามารถแยกโพลีเมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นจากแต่ละประชากรที่ศึกษาได้ (Konieczny and Ausubel, 1993)

เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการค้นหาถิ่นกำเนิดของโรคใหม่ ๆ ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางและได้นำเอาเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่ต้านทานโรคนี้ (Fjellstrom *et al.*, 2004) การพึ่งพาข้าวพันธุ์ต้านทานที่มีถิ่นกำเนิดเพียงหนึ่งถึงสองยีน เป็นปัจจัยที่ค่อนข้างเสี่ยงเนื่องจากเชื้อสาเหตุนี้สามารถสร้างเชื้อสายใหม่ๆ ที่มีความรุนแรงในการเข้าทำลายและทำลายพันธุ์ต้านทานได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นการค้นหาถิ่นกำเนิดตัวใหม่ๆ แล้วนำมาปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีถิ่นกำเนิดหลายๆ ยีนในข้าวหนึ่งสายพันธุ์ให้สามารถต้านทานต่อเชื้อได้หลายสายพันธุ์ จากข้อมูลของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับตำแหน่งของยีนต้านทานโรคใหม่ ได้มีการพัฒนาและมีการเผยแพร่ต่อสาธารณะจึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการค้นหาถิ่นที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรคไหม้ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย เนื่องจากในข้าวพันธุ์พื้นเมืองน่าจะมีถิ่นกำเนิดอยู่มาก การนำข้าวพันธุ์พื้นเมืองมาใช้เพื่อคัดเลือกพันธุ์ต้านทาน นับว่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการคัดเลือกแหล่งพันธุกรรมที่มีคุณสมบัติต้านทานเชื้อโรคไหม้ เพื่อประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวและควบคุมโรคไหม้ต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

ส่วนที่หนึ่ง การค้นหาพื้นที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยโดยใช้ดีเอ็นเอเทคโนโลยี

อุปกรณ์

ตัวอย่างข้าว

ตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 203 พันธุ์/ สายพันธุ์ ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุริพร เกตุงาม หัวหน้าโครงการ การค้นหาพื้นที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเชื้อราไหม้ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยโดยการใช้ดีเอ็นเอเทคโนโลยี ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี โดยสามารถแบ่งออกเป็น (ตารางที่ 2)

1. ข้าวไร่ ภาคเหนือ จำนวน 19 ตัวอย่าง
2. ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 40 ตัวอย่าง
3. ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 45 ตัวอย่าง
4. ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 99 ตัวอย่าง
5. ข้าวพันธุ์ Nipponbare (*Pi9*) ใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่มียืนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* (resistant check variety)
6. ข้าว Nipponbare ใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่ไม่มียืนต้านทานโรคไหม้ (susceptible check variety)

ตารางที่ 2 ตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ใช้ในการศึกษา

หมายเลข	ชื่อพันธุ์ข้าว	label	แหล่งที่มา
1	งอเพื่อน	U 38	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ
2	คยาหืดคยาหืด	U 39	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ
3	ปื๋อก่อ	U 41	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ
4	ปื๋อเกษตร	U 42	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ
5	เหนียวแสงมูเวอ	U 43	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ
6	กะเหรี่ยงขาว	U 44	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ
7	เหลืองหอม	U 45	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ
8	จะนอไหน	U 46	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ
9	ลายซาน	U 48	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ
10	ปื๋อ แม่ละ	U 49	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ
11	ห้วยแล้ง	U 50	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ
12	ปื๋อ ชูแม่ฟาง	U 51	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ
13	ข้าวกอแป๊ะ	U 52	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ
14	ปื๋อขอพอ	U 53	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ
15	เหลืองลิซอ	U 55	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ
16	ข้าวแดง (TRI 8409149)	U 56	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ
17	ข้าวมันหมู	U 57	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ
18	งอเซระ	U 60	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ
19	เหนียวกล้าหอม แสงลิซอ	U 61	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ
20	หมานหนัก	S 71	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
21	นางมา	S 72	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
22	เหนียวนาคราช	S 73	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
23	เหนียวหอม	S 74	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
24	มะเยง	S 75	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
25	ดอกพวง	S 76	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
26	ขึ้นดิน	S 77	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
27	ดอกพิกุล	S 78	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้

ตารางที่ 2 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อพันธุ์ข้าว	label	แหล่งที่มา
28	คำนาง	S 79	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
29	สายบัว	S 80	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
30	ช่อนิมิต	S 81	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
31	ไร่ไทร	S 82	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
32	เบาะมะม่วง	S 83	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
33	ลูกขอ	S 84	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
34	ซุกกุลอง	S 85	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
35	หลายอด	S 86	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
36	ลาเก้งงอ	S 87	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
37	นางทอง	S 88	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
38	ลูกหวาย (จุด)	S 89	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
39	ลูกดำ	S 90	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
40	เขียงใหม่	S 91	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
41	ลูกแดง	S 92	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
42	เล็บนกเบา	S 93	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
43	ช่อ	S 94	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
44	ช่อแดง	S 95	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
45	กุนิง	S 96	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
46	ดอกไม้ไทร	S 97	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
47	รวงทอง	S 98	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
48	ลูกปลา	S 99	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
49	นางกลายแดง	S 100	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
50	ลากอ	S 101	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
51	กุนิง	S 102	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
52	มือจระเข้	S 103	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
53	ตุลาถั่ว	S 104	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
54	หอม	S 105	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้

ตารางที่ 2 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อพันธุ์ข้าว	label	แหล่งที่มา
55	กือแซะดำ	S 106	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
56	ลือนูมาเซาะ	S 107	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
57	นางรอง	S 108	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
58	อีกู้ 3	S 109	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
59	อามะ	S 110	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้
60	เก๋ารวง 17-2-106	L 1	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
61	กุ่มเมือง	L 2	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
62	ขาวดอกมะลิ 41-1-173	L 3	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
63	ขาวตาแห้ง 55-5-55	L 4	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
64	ขาวใหญ่ 33-22-61	L 5	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
65	ขาวปากหม้อ 74	L 6	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
66	หลุดหนี 75-3-2	L 7	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
67	เม็ดใหญ่ 94-4-87	L 8	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
68	ขาวพวง 74-3-38	L 9	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
69	เจ้าหางหมูใหญ่ 32-27	L 10	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
70	เจ้าหางหมูใหญ่ 32-27	L 11	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
71	เจ้าหอม 32-18-69	L 12	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
72	ไบลด 36-10-90	L 13	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
73	เจ้าเหลือง 27-3-19	L 14	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
74	เจ้าเหลือง 27-3-91	L 15	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
75	เจ้าแฟ 31-28-1	L 16	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
76	ดอกมะลิ 109-1-119	L 17	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
77	ไบลด 36-19-40	L 18	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
78	ไบลด 36-27-29	L 19	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
79	รวงเดียว 68-10-85	L 20	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
80	เหลืองใหญ่	L 21	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
81	เหลืองเล็ก 30-1-57	L 22	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อพันธุ์ข้าว	label	แหล่งที่มา
82	เหลืองนวล 6-4-102	L 23	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
83	บีเค 289	L 24	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
84	บีเค 563	L 25	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
85	ดี 569	L 26	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
86	จีตม 222-24-72	L 27	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
87	จีตมใหญ่ 35-16-45	L 28	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
88	จีตมขาว 222-42-3	L 29	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
89	จีตมขาว 222-42-5	L 30	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
90	จันดง 34-3-95	L 31	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
91	คอดอกพร้าว 48-3-123	L 32	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
92	จีตมหอม	L 33	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
93	เหนียวดำ	L 34	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
94	คอป้องแอ้ว	L 35	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
95	ดอกตู	L 36	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
96	ทอง	L 37	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
97	มันเป็ด	L 38	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
98	ขาว	L 39	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
99	นางนวล	L 40	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
100	ขาวกรุง	L 41	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
101	เหนียวแดง	L 42	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
102	ขาว	L 43	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
103	คอขาว	L 44	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
104	เหลืองบุญมา	L 45	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
105	หมากแข้ง	L 46	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
106	RD6 (dummy)	L 47	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
107	เหนียวนางนวล	L 48	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
108	ค่ออ่าง	L 49	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อพันธุ์ข้าว	label	แหล่งที่มา
109	ข้าวกำ	L 50	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
110	ป่องแก้ว	L 51	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
111	อีปง	L 52	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
112	นางนวล	L 53	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
113	แม่ห้าง	L 54	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
114	พานทอง	L 55	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
115	อีปัด	L 56	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
116	คอสามเดือน	L 57	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
117	ข้าวปน	L 58	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
118	อีโคโน	L 59	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
119	นางนวล	L 60	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
120	ดวงจันทร์	L 61	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
121	ปลาแข็ง	L 62	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
122	เป็ดน้ำ	L 63	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
123	พันธุ์หลัก	L 64	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
124	ข้าวหาง	L 65	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
125	สามเดือน	L 66	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
126	ป่องแก้ว 1	L 67	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
127	ป่องแก้ว 2	L 68	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
128	ป่องแก้ว	L 69	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
129	มะปราง	L 70	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
130	นางคำพาย	L 71	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
131	ขาวใหญ่	L 72	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
132	โกล้อน	L 73	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
133	ข้าวหอม (GS. 4809)	L 74	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
134	ข้าวหอม (GS. 4810)	L 75	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
135	ข้าวหอม (GS. 4814)	L 76	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อพันธุ์ข้าว	label	แหล่งที่มา
136	ข้าวหอม (GS. 4815)	L 77	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
137	ข้าวหอม (GS. 4816)	L 78	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
138	ข้าวหอม (GS. 4817)	L 79	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
139	ข้าวหอม (GS. 4818)	L 80	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
140	ข้าวหอม (GS. 4829)	L 81	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
141	ข้าวหอม (GS. 4831)	L 82	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
142	ข้าวหอม (GS. 4832)	L 83	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
143	ข้าวหอม (GS. 4833)	L 84	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
144	ข้าวหอม (GS. 4834)	L 85	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
145	ข้าวหอม (GS. 4835)	L 86	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
146	ข้าวหอม (GS. 4869)	L 87	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
147	ข้าวหอม (GS. 4870)	L 88	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
148	กะทิ	L 89	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
149	ข้าวคอก	L 90	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
150	คอเหลียง	L 91	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
151	เจ้าขาว	L 92	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
152	ขาวใหญ่	L 93	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
153	เหลียง	L 94	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
154	กระดุกเลื้อ	L 95	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
155	หอมมะลิ (GS. 18418)	L 96	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
156	หอมมะลิ (GS. 18419)	L 97	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
157	หอมมะลิ (GS. 18420)	L 98	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
158	หอมมะลิ (GS. 19398)	L 99	ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
159	พวงทอง	E 100	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
160	พวงมลัย 31-5-6	E 101	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
161	พวงมลัย 35-10-8	E 102	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
162	โพลอง 31-34-20	E 103	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อพันธุ์ข้าว	label	แหล่งที่มา
163	จำปาจีน 84-8-16	E 104	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
164	จำปาจีน 84-8-22	E 105	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
165	สว่างอารมณ์ 84-4-118	E 106	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
166	ข้าวเบาะที่หนึ่ง 95-1-80	E 107	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
167	ไข่มวงดา 59-2-73	E 108	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
168	ลอยใหญ่ 62-40-140	E 109	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
169	เม็ดเล็กหนัก	E 110	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
170	พญาชม	E 111	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
171	เขียว	E 112	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
172	ขาวปราจีน	E 113	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
173	แจ็กกระโดด	E 114	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
174	รวงเดี่ยว	E 115	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
175	เจ้าลอย	E 116	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
176	เหลืองกล้วย	E 117	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
177	คุณแม่	E 118	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
178	ขาวยาคี	E 119	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
179	ขาวเสมอ	E 120	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
180	เหลืองพวงทอง	E 121	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
181	เหลืองอนันต์	E 122	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
182	ขาวลิ	E 123	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
183	ขาวตาหยด	E 124	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
184	นางเขียว	E 125	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
185	ลอยสายบัว	E 126	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
186	นางเขียว	E 127	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
187	นางเขียว	E 128	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
188	เกวียนหัก	E 129	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
189	ขาวโพธิ์	E 130	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อพันธุ์ข้าว	label	แหล่งที่มา
190	สามพราน	E 131	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
191	เหนียวบายลี	E 132	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
192	เหลืองบังใบ	E 133	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
193	ขาวนครไชยศรี	E 134	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
194	เจ้าลอย	E 135	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
195	ข้าวลอย	E 136	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
196	ทานตะวัน	E 137	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
197	ขาวเศรษฐี	E 138	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
198	สามรวง	E 139	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
199	หอมทุ่ง	E 140	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
200	หอมทุ่ง	E 141	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
201	ไอ้โหม่ง	E 142	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
202	พวงหนัก	E 143	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
203	พวงเงิน	E 144	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. โกร่งบดตัวอย่าง
2. เครื่องแก้ว เช่น กระบอกตวง และบีกเกอร์ขนาดต่างๆ เป็นต้น
3. หลอดพลาสติก (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และหลอดใส่สารขนาด 15 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตร
4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น ScoutPro บริษัท Ohaus, USA
5. ไมโครปิเปตต์ชนิดปรับปริมาตรได้ บริษัท Biohit, Finland พร้อม Tip ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร นึ่งฆ่าเชื้อ
6. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) บริษัท Gibthai
7. ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิได้ (hotbox oven) บริษัท ไทยโพลีเมติก จำกัด
8. เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น ZHYW บริษัท Lio lab International

9. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (refrigerated centrifuge) รุ่น 3K20 บริษัท Sigma
10. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (microcentrifuge) รุ่น SX5204-532

บริษัท Daihan Scientific, Korea

11. หลอดสำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR tube) ขนาด 200 ไมโครลิตร
12. เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR) รุ่น GenePro บริษัท Bioer, China
13. ชุดเครื่องมือ agarose gel electrophoresis รุ่น EP-150 บริษัท Gibthai
14. เครื่องฉายแสง ultraviolet และเครื่องถ่ายภาพ (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 Hybridncooling system บริษัท Sharp
20. ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส รุ่น SCM-320SAD บริษัท Sandenintercool, Thailand
21. ตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส รุ่น 8558 S/N 86939-206 Bio-freezer บริษัท Forma , USA
22. เครื่องคอมพิวเตอร์ Dell ที่เชื่อมต่อกับอินเทอร์เน็ต และเครื่องปริ้นเอกสาร Brother
23. อุปกรณ์อื่นๆ เช่น กระดาษชำระ กระดาษติดป้าย ช้อนตักสาร ปากกาเคมี

ปากกิบ ดึงมือ ดึงพลาสติกใส แผ่นพลาสติกใส แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ ถาดพลาสติก หนัวยาง เป็นต้น

สารเคมี และเอนไซม์

สารเคมี และเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

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)
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™ 1 Kb DNA บริษัท Fermentas, USA
6. แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ DNA ladder mix บริษัท Fermentas, USA

สารเคมี และเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์

1. 10XPCR buffer
2. 10XMgCl₂
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. *Mlu*I บริษัท Fermentas, USA
2. FastDigest™ *Hin*fl บริษัท Fermentas, USA

วิธีการ

การสกัดดีเอ็นเอ

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ข้าวพันธุ์พื้นเมือง ทั้งหมด 203 พันธุ์ ที่ได้จากพื้นที่ต่างๆ ในบริเวณภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ของประเทศไทย โดยสามารถแบ่งออกเป็น ข้าวไร่จากภาคเหนือ จำนวน 19 พันธุ์ ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 45 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 99 พันธุ์ และข้าวพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 40 พันธุ์ พันธุ์ข้าวทดสอบโรคไหม้ (resistant check variety) คือ Nipponbare (*Pi9*) ที่มียืนต้านทาน *Pi9* และพันธุ์ Nipponbare เป็นพันธุ์เปรียบเทียบกับมาตรฐานที่ไม่มียืนต้านทานต่อโรคไหม้ (susceptible check variety) นำมาสกัดดีเอ็นเอ (total genomic DNA) 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 และผสมให้เข้ากันอย่างดี บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาเบาๆ
3. นำหลอดทดลองมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม เติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24 : 1) ปริมาตร 840 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
5. ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดทดลองใหม่ เติม สารละลายเย็น iso-propanol 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 นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง
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 กำจัดอาร์เอ็นเอออกโดยการเติม RNase A (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบคุณภาพ ของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

1. ตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยละลายผงวุ้น agarose ที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE
2. นำไปหลอมในเตาไมโครเวฟจนวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (ประมาณ 2 นาที)
3. รอให้วุ้นเย็นลงประมาณอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทลงในถาดที่วางซี่หวี (comb) เพื่อทำให้เกิดช่องสำหรับเติมตัวอย่าง รอจนวุ้นแข็งตัว (ประมาณ 30 นาที)
4. ดึงซี่หวีออก วางถาดลงในแท็งก์ที่มีบัฟเฟอร์ 0.5X TBE อยู่เต็ม
5. เตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร สี loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบนแผ่นพาราฟิล์ม
6. คูดตัวอย่างทั้งหมด แล้วหยดลงในช่องที่เตรียมไว้ ปิดฝาแท็งก์แล้วต่อสายไฟ โดยให้ด้านของตัวอย่างอยู่ด้านซ้ายลบ เนื่องจากดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก
7. เสร็จแล้วเอาแผ่นเจลไปข้อมในสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ (0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ประมาณ 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ 10 นาที
8. นำแผ่นเจลไปดูผลใต้แสงอุลตราไวโอเลต จะเห็นแถบดีเอ็นเอ เรืองแสงอุลตราไวโอเลต
9. บันทึกภาพ อ่านค่าความเข้มข้นโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน เพื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ การแตกหักของดีเอ็นเอ การปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ โปรตีนและสารอื่นๆ และคาดประมาณดีเอ็นเอคร่าวๆ

การตรวจสอบดีเอ็นเอเชิงปริมาณและคุณภาพโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

1. เมื่อสกัดดีเอ็นเอได้แล้วก็จะนำมาตรวจสอบเชิงปริมาณและคุณภาพโดยใช้เครื่อง

สเปกโทรโฟโตมิเตอร์

2. นำสารละลายดีเอ็นเอ 6 ไมโครลิตร มาเจือจางในน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 294 ไมโครลิตรและใช้น้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นมาตรฐาน (blank)

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

4. นำผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ จากสูตร ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

$$= A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$$

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

สืบค้นและตรวจสอบข้อมูลของไพรเมอร์ที่ควบคุมลักษณะการต้านทานโรคไหม้

สืบค้นและตรวจสอบข้อมูลของไพรเมอร์ที่ควบคุมลักษณะการต้านทานเชื้อราโรคไหม้ในข้าว โดยเฉพาะในกรณีมีการเผยแพร่ข้อมูลของ DNA markers ที่เกี่ยวข้องกับยีนที่กำลังศึกษาในช่วงเวลาดังกล่าว เน้นการใช้ gene specific markers เพราะมีความจำเพาะเจาะจงกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่ศึกษา (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาหาพื้นที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ในของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย

Gene	Chr.	Marker	Marker type	Primer sequence (5' >>>>> 3')	Restriction Enzyme	เอกสารอ้างอิง
<i>Pi9</i>	6	pB8	SCARS	F-CCCAATCTCCAATGACCCATAAC R- CCGGACTAAGTACTGGCTTCGATA	-	Liu <i>et al.</i> , 2002
<i>Pi36</i>	8	R36STS	CAPS	F- CAGAGACCACAGAGCATTTCC R-GCTCCAATGAAACAACAGGGC	<i>Hinf</i> I	Liu <i>et al.</i> , 2005
<i>Pid2</i>	6	Con2F/Con2R	CAPS	F-TTGGCTATCATAGGCGTCC R-ATTTGAAGGCGTTTGCGTAGA	<i>Mlu</i> I	Chen <i>et al.</i> , 2006

การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* มีตำแหน่งอยู่ที่บริเวณเซนโตรเมียร์ของโครโมโซมข้าวคู่ที่ 6 (Liu *et al.*, 2002) โดยยีน *Pi9* ถูกถ่ายทอดมาจากข้าวป่า (*Oryza minuta*: $2n=4x=48$) (Amante-Bordeos *et al.*, 1992) ยีนต้านทาน *Pi9* นี้ สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง (broad-spectrum resistance) ตัวอย่างเช่น ยีนต้านทาน *Pi9* ในข้าวสายพันธุ์ 127-1-75 ได้รับการทดสอบกับเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ กว่า 100 สายพันธุ์ของประเทศฟิลิปปินส์ ที่สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (The International Rice Research Institute, IRRI) โดยไม่พบสายพันธุ์เชื้อราโรคไหม้ที่สามารถก่อโรคได้ นอกจากนี้ Liu และคณะ (2002) ได้ทำการทดสอบสายพันธุ์เชื้อราโรคไหม้อีก 43 สายพันธุ์ จาก 13 ประเทศที่ไม่พบสายพันธุ์เชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ใดที่สามารถก่อโรคกับข้าวสายพันธุ์ 127-1-75 ที่มียีนต้านทาน *Pi9* ได้ ยีน *Pi9* นี้ถูกโคลนปี ค.ศ. 2006 (Qu *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006) มีโครงสร้างที่เป็น nuclear binding site (NBS) และ leucine rich repeat motif (LRR) ซึ่งโครงสร้างของยีนนี้มีความคล้ายคลึงกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2*, *Piz-t* และ *Piz* มากถึง 96% ในระดับของกรดอะมิโน โดยบริเวณที่มีความแตกต่างกันคือบริเวณ LRR motif จากการทดลองสลับเปลี่ยน motif ระหว่างยีนต้านทาน *Pi2* และ *Pi9* พบว่าส่วน LRR motif เป็นส่วนสำคัญในการกำหนดความเฉพาะเจาะจงต่อปฏิกิริยาตอบสนองของยีนต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ

ดีเอ็นเอที่สกัดได้ถูกนำมาตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ เพื่อตรวจหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนต้านทาน *Pi9* (pB8) (Liu *et al.*, 2002) ตารางที่ 3 ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้องค์ประกอบของสารต่างๆ ดังตารางที่ 4 ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามด้วย 35 รอบ ของ denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที annealing ที่ 55 อุณหภูมิองศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำ PCR product ทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis 1.5 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลองซ้ำสองครั้งเพื่อความแม่นยำ

ตารางที่ 4 องค์ประกอบและปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับตรวจสอบหายีนต้านทาน *Pi9* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง

สารที่ใช้	ปริมาตร(μ L)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Ultra pure water	12.8	-
10X PCR buffer	2.0	1X
dNTPs (2.0mM)	1.0	0.1 mM
MgCl ₂ (25mM)	1.0	1.25mM
Forward primer (5 μ M)	1.0	0.25 μ M
Reverse primer (5 μ M)	1.0	0.25 μ M
<i>Taq</i> DNA polymerase(5U/ μ L)	0.2	1 unite
DNA (100 ng/ μ L)	1.0	100 ng/20 μ L
รวม	20	

การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์มาตรวจสอบปริมาณและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 45 นาที แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด เป็นเวลา 5 นาที ดูผลภายใต้แสง UV และบันทึกผลที่ได้

การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย

ข้าวอินดิกาสายพันธุ์ Kasalath รหัส Q61 มียีน *Pi36* ซึ่งเป็นยีนต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศจีนได้ โดยมีตำแหน่งของยีนต้านทานอยู่บนโครโมโซมข้าวคู่ที่ 8 จากการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมข้าวจากปอนิกา สายพันธุ์นโปอนบาร เป็นตัวอ้างอิงในการทำยีนต้านทาน *Pi36* พบว่าลำดับเบสทั้งสาม มีโครงสร้าง ที่เป็น NBS และ LRR motif โปรตีนยีน *Pi36* ประกอบไปด้วย 1,056 กรดอะมิโน มีเพียงหนึ่งกรดอะมิโนเท่านั้นที่ถูกแทนที่จาก Aspartic acid (Asp) เป็น Serine (Ser) ที่ตำแหน่ง 590 ซึ่งมีความสัมพันธ์กับลักษณะของฟิโนไทป์ที่

ด้านทานโรค ยีน *Pi36* เป็น single copy gene ในข้าว และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยีน *Mla1* และ *Mla6* ซึ่งเป็นยีนด้านทานโรคราแป้งในข้าวบาร์เลย์มากกว่ายีนด้านทาน *Pita*, *Pib*, *Pi9* และ *Piz-t* ในข้าว (Liu *et al.*, 2007)

ดีเอ็นเอที่สกัดได้ถูกนำมาตรวจสอบหา ยีนด้านทานโรคใหม่ *Pi36* ด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ เพื่อตรวจหา ยีนด้านทานโรคใหม่ *Pi36* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS ที่เฉพาะกับยีนด้านทาน *Pi36* (Liu *et al.*, 2005) ตารางที่ 3 ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้องค์ประกอบของสารต่าง ๆ ดังตารางที่ 5 ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามด้วย 30 รอบ ของ denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที annealing ที่ 64 อุณหภูมิ องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำ PCR product มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* เพื่อดูความแตกต่างระหว่างตัวอย่างข้าวที่มีอัลลีลด้านทานของยีน *Pi36* ที่ด้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้และพันธุ์ข้าวที่มีอัลลีลไม่ด้านทานของยีน *Pi36* ที่ไม่ด้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ จากนั้นแยกชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis 2 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 2 ทำการทดลองซ้ำสองครั้งเพื่อความแม่นยำ

การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์มาตรวจสอบปริมาณและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 45 นาที แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด เป็นเวลา 5 นาที ดูผลภายใต้แสง UV บันทึกผลที่ได้

ตารางที่ 5 องค์ประกอบและปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับตรวจสอบหา ยีนด้านทาน *Pi36* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย

สารที่ใช้	ปริมาตร(μL)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Ultra pure water	12.8	-
10X PCR buffer	2.0	1X

ตารางที่ 5 (ต่อ)

สารที่ใช้	ปริมาตร(μL)	ความเข้มข้นสุดท้าย
dNTPs (2.0mM)	1.0	0.1 mM
MgCl ₂ (25mM)	1.0	1.25mM
Forward primer (5μM)	1.0	0.25 μM
Reverse primer	1.0	0.25 μM
Taq DNA polymerase	0.2	1 unite
DNA (100 ng/μL)	1.0	100 ng/20μL
รวม	20	

การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย

ข้าวสายพันธุ์ Digu ของประเทศจีน สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ จำนวน 156 สายพันธุ์ จากประเทศจีนและประเทศญี่ปุ่น และถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประเทศจีนอย่างกว้างขวาง จากการศึกษาทางพันธุศาสตร์พบว่าข้าวสายพันธุ์ Digu มียีนต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้อยู่สองยีนด้วยกัน คือ ยีนต้านทาน *Pi-d(t)1* และ *Pid2* โดยยีนต้านทาน *Pi-d(t)1* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมข้าวคู่ที่ 2 และยีนต้านทาน *Pid2* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมข้าวคู่ที่ 6 (Chen *et al.*, 2006) ซึ่งต่อมา ยีนต้านทาน *Pid2* ได้ถูกโคลนในปี ค.ศ. 2006 โดย Chen และคณะ ยีนต้านทาน *Pid2* นี้มีโครงสร้างของโปรตีนที่แตกต่างจากยีนต้านทานตัวอื่นๆ คือ มีส่วนของน้ำตาลแมนโนสที่สามารถจับกับแลคตินได้อยู่ภายนอกเซลล์ (a bulb-type mannose specific binding lectin, β -lectin) และในส่วนภายในเซลล์มีโครงสร้าง serine-threonine kinase domain ซึ่งโปรตีนจากยีนต้านทาน *Pid2* นี้จะมีตำแหน่งอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยข้าวที่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้มียีนต้านทาน *Pid2* ที่แตกต่างจากที่ไม่สามารถต้านทานเพียงแค่กรดอะมิโนหนึ่งตัวที่ตำแหน่ง 441 ของโปรตีนยีนต้านทานเท่านั้น การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* ด้วยไพรเมอร์ Con2F/Con2R (Chen *et al.*, 2006)

ดีเอ็นเอที่สกัดได้ถูกนำมาตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* ด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ เพื่อตรวจหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับยีนต้านทาน *Pid2* (Chen *et al.*, 2006) ดังตารางที่ 3 ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้

องค์ประกอบของสารต่าง ๆ ดังตารางที่ 6 และใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามด้วย 30 รอบ ของ denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที annealing ที่ 58 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้น นำ PCR product มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* เพื่อดูความแตกต่างระหว่างตัวอย่างข้าวที่มีอัลลีลของยีน *Pid2* ที่ต้านทานต่อโรคไหม้และพันธุ์ข้าวที่ไม่มีอัลลีลของยีน *Pid2* ที่ไม่ต้านทานโรคไหม้ ทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis 2.0 เปอร์เซนต์ ทำการทดลองซ้ำสองครั้งเพื่อความแม่นยำ

ตารางที่ 6 องค์ประกอบและปริมาตรที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับตรวจสอบหายีนต้านทาน *Pid2* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง

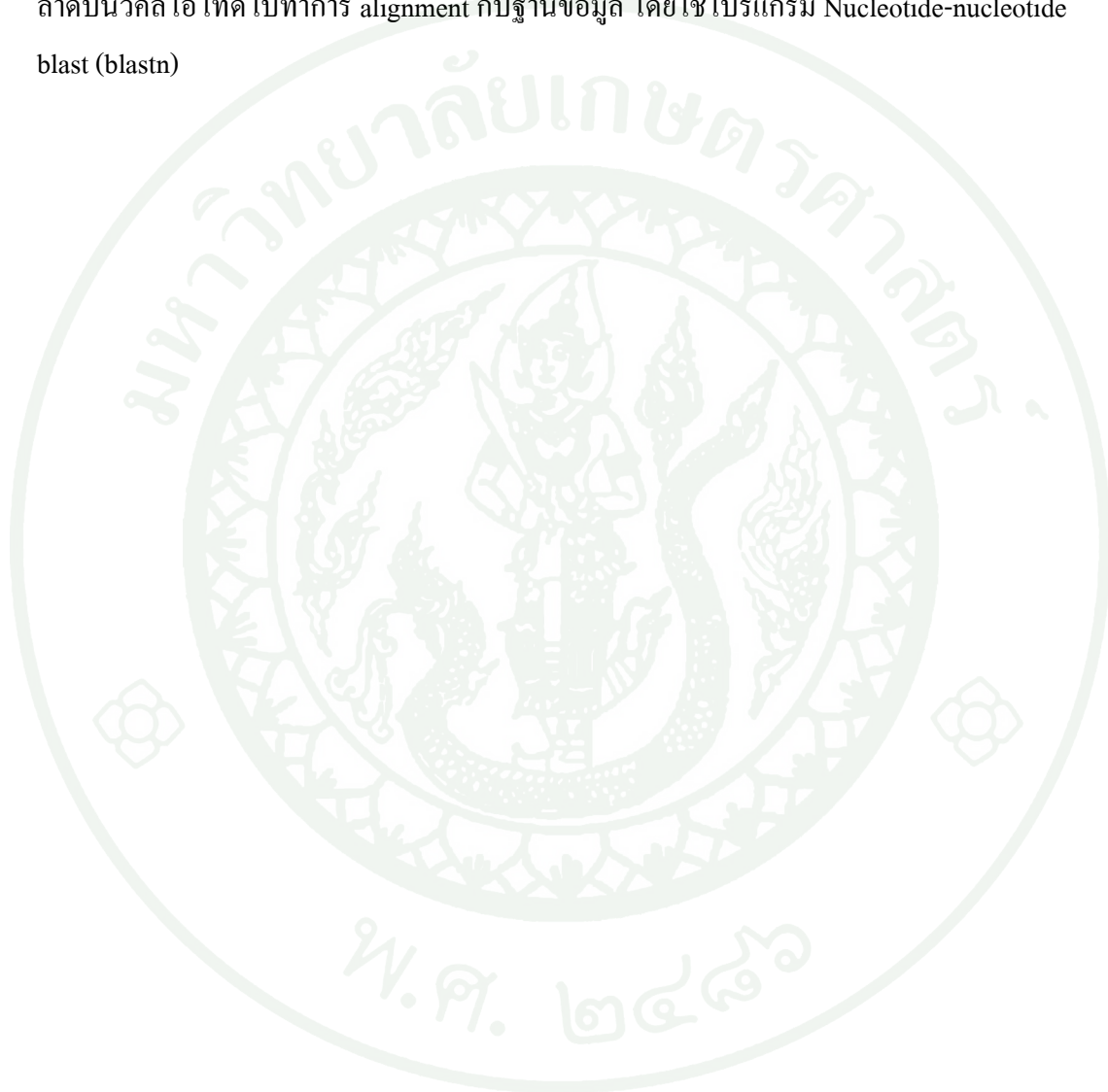
สารที่ใช้	ปริมาตร(μL)	ความเข้มข้นสุดท้าย
Ultra pure water	12.8	-
10X PCR buffer	2.0	1X
dNTPs (2.0mM)	1.0	0.1 mM
MgCl ₂ (25mM)	1.0	1.25mM
Forward primer(5μM)	1.0	0.25 μM
Reverse primer	1.0	0.25 μM
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.2	1 unite
DNA (100 ng/μL)	1.0	100 ng/20μL
รวม	20	

การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์มาตรวจสอบปริมาณและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซนต์ ใน 0.5X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 45 นาที แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาด เป็นเวลา 5 นาที ดูผลภายใต้แสง UV บันทึกผลที่ได้

การวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ

ทำการยืนยันผลโดยส่งตัวอย่างผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากยีน *Pi9*, *Pi36* และ *Pid2* เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี โดยใช้ไพรเมอร์ในตารางที่ 3 แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปทำการ alignment กับฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม Nucleotide-nucleotide blast (blastn)



ส่วนที่สอง การศึกษาปฏิบัติการตอบสนองทางโรคใบไหม้ของข้าวพันธุ์นิปปอนบารุ
(Nipponbare *Pi9*) ที่มียืนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi9* ต่อเชื้อราโรคใบไหม้ในประเทศไทย
จำนวน 8 ไอโซเลต

อุปกรณ์

ตัวอย่างข้าว

ข้าวนิปปอนบารุ (Nipponbare *Pi9*) เป็นพันธุ์ข้าวที่มียืนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi9* (resistant check variety) โดยได้รับตัวอย่างมาจาก ดร. Guo-liang Wang มหาวิทยาลัยแห่งรัฐโอไฮโอ ประเทศสหรัฐอเมริกา

ข้าวพันธุ์เปรียบเทียบกับมาตรฐานที่ไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคใบไหม้ (susceptible check variety) คือ ข้าวนิปปอนบารุ และข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML105)

ตัวอย่างเชื้อราโรคใบไหม้ *Magnaporthe grisea*

ตัวอย่างเชื้อราโรคใบไหม้ *M. grisea* โดยได้รับการอนุเคราะห์เชื้อราโรคใบไหม้ จำนวน 8 ไอโซเลต (ตารางที่ 7) จาก ดร.ธานี ศรีวงศ์ชัย ภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน เป็นไอโซเลตที่มีความรุนแรงและก่อให้เกิดโรคใบไหม้ในข้าวในประเทศไทยในปี 2552 โดยใช้ในการศึกษาปฏิบัติการตอบสนองทางโรคของข้าวนิปปอนบารุ (Nipponbare *Pi9*) ที่มียืนต้านทาน *Pi9* กับเป็นเชื้อราโรคใบไหม้ที่มีความรุนแรงและก่อให้เกิดโรคใบไหม้ในข้าวประเทศไทย

ตารางที่ 7 รายชื่อเชื้อราโรคใบไหม้ *M. grisea* ในปี 2552 ที่ใช้ศึกษาปฏิบัติการตอบสนองทางโรคใบไหม้

หมายเลข	ชื่อสายพันธุ์เชื้อรา	สถานที่เก็บ
1	BAG 1.4	จังหวัดพิษณุโลก
2	BAG 2.4	จังหวัดอุบลราชธานี
3	BAG 3.5	จังหวัดพิษณุโลก

ตารางที่ 7 (ต่อ)

หมายเลข	ชื่อสายพันธุ์เชื้อรา	สถานที่เก็บ
4	BAG 4.4	บ้านน้ำคำ จังหวัดพิษณุโลก
5	BAG 5.4	อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น
6	BAG 7.2	บ้านน้ำคำ จังหวัดพิษณุโลก
7	BAG 8.5	จังหวัดอุบลราชธานี
8	BAG 9.2	จังหวัดเชียงราย

วิธีการ

เพิ่มปริมาณเมล็ดข้าวที่มีอินด้านทานโรคไหม้ *Pi9*

ผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดข้าวที่มีอินด้านทานโรคไหม้ *Pi9* จำนวน 10 เมล็ด จาก Prof. Dr. Guo-Liang Wang จากมหาวิทยาลัยแห่งรัฐโอไฮโอ ประเทศสหรัฐอเมริกา จากนั้นได้ทำการเพาะเมล็ดข้าวดังกล่าวทั้ง 10 เมล็ดที่เรือนเพาะทดลองชั้น 6 ของภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หลังจากการเพาะเมล็ดพบว่าเมล็ดข้าวหลายเมล็ดไม่สามารถงอกได้ ทำให้เหลือต้นข้าวที่เจริญเติบโตได้เพียง 5 ต้น และเมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน ต้นข้าวทั้งหมดก็ออกรวง แต่รวงส่วนมากไม่ติดเมล็ดมีเพียงบางเมล็ดเท่านั้นที่สามารถพัฒนาจนเป็นเมล็ดที่สมบูรณ์ได้ เมื่อทำการเก็บเกี่ยวปรากฏว่าได้เมล็ดข้าวที่มีอินด้านทานทั้งสิ้น 20 เมล็ด ซึ่งยังไม่เพียงพอต่อการทดสอบความต้านทานของยีนกับเชื้อราโรคไหม้ (อย่างน้อย 10 เมล็ดต่อการทดสอบเชื้อราโรคไหม้ 1 สายพันธุ์) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเพิ่มปริมาณเมล็ดข้าวที่มีอินด้านทานอีกครั้ง จนได้เมล็ดข้าวที่มีอินด้านทาน *Pi9* เพียงพอต่อการทดสอบปฏิกิริยากับเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทย ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ต้นข้าวนิปปอนบารุ ที่มีอินด้านทาน *Pi9* (Nipponbare *Pi9*) อายุ 3 สัปดาห์



ภาพที่ 2 ต้นข้าวนิปปอนบารุ ที่มีอินด้านทาน *Pi9* (Nipponbare *Pi9*) ขณะออกรวง

การเตรียมตัวอย่างข้าว

สายพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวนิปปอนบารุ (Nipponbare *Pi9*) เป็นสายพันธุ์ข้าวที่มีอินด้านทานโรคไหม้ *Pi9* (resistant check variety) ข้าวนิปปอนบารุและข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบกับมาตรฐานที่ไม่

ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ (susceptible check variety) ปลูกลทดสอบความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ *M. grisea* จำนวน 8 ไอโซเลต ซึ่งเชื้อราทั้ง 8 ไอโซเลต มีความรุนแรงในการก่อโรคไหม้ในแต่ละบริเวณของการเพาะปลูกข้าวในประเทศไทย ทำการปลูกที่โรงเรือนเพาะปลูก ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน เตรียมถาดหลุมสี่เหลี่ยมขนาด 5×5 เซนติเมตร ใส่ดินให้เต็มหลุม นำต้นกล้าข้าวที่เพาะบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีอายุ 7 วัน มาปลูกลงในถาดหลุมสี่เหลี่ยมที่เตรียมไว้ โดย 1 หลุม มีต้นข้าวหนึ่งสายพันธุ์ปลูกเรียงกัน 4 ต้น ดังภาพที่ 4 ใส่ปุ๋ยเมื่อข้าวมีอายุ 2 สัปดาห์ รดน้ำวันละ 2 ครั้ง เพื่อให้มีความชื้นเพียงพอในการเกิดโรค ทำการปลูก 3 ซ้ำ ต่อการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ จำนวน 1 ไอโซเลต



ภาพที่ 3 ต้นกล้าข้าวที่มีอายุ 3 สัปดาห์ก่อนการปลูกเชื้อ (inoculation)

การเตรียมตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ (Inoculums) และตรวจนับจำนวนสปอร์เพื่อการเพาะเชื้อ

นำตัวอย่างเชื้อราโรคไหม้ ดังตารางที่ 7 ที่ได้มาในรูปของกระดวยกรองวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำจากแป้งข้าว (Rice Flour Agar (RFA), 2.0% of rice flour, 2.0% of agar and 0.2% of yeast extract) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อให้เชื้อราเริ่มสร้างเส้นใย จากนั้นเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสปอร์โดยการถูผิวหน้าอาหาร (scraping) ด้วยแท่งแก้วเบาๆ ให้เส้นใยของเชื้อราขาด แล้วเก็บไว้ที่ อุณหภูมิห้อง โดยให้แสงฟลูออเรสเซนซ์เป็นเวลา 2 วัน เมื่อพร้อมที่จะทำการปลูกเชื้อ (inoculation) เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อราแต่ละจาน แล้วใช้ spreader ขูดที่ผิวหน้าของจาน

อาหารเลี้ยงเชื้อราเบาๆ เพื่อเก็บเกี่ยวสปอร์ของเชื้อรามาใช้ในการทดลอง จากนั้นนำสารละลายสปอร์ของเชื้อราที่เก็บได้มาผ่านผ้ากรองเพื่อกำจัดเศษอาหารวุ้นและเศษเส้นใยของเชื้อราที่ไม่ต้องการออก ปริมาณสปอร์ของเชื้อราจะถูกนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วย hemacytometer และปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 5×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นผสมเจลาติน 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปทดสอบต่อไป (Roumen *et al.*, 1997)

การปลูกเชื้อราโดยวิธี Spraying method

นำสารละลายสปอร์ของเชื้อราโรคไหม้ปริมาณ 25 มิลลิลิตร 1 ไอโซเลตต่อหนึ่งการทดลองที่เตรียมได้ข้างต้น บรรจุลงในขวดแก้วที่ติดอยู่กับเครื่องปั๊มลม (Air brush pressure) แล้วฉีดพ่นให้ทั่วต้นกล้าข้าวที่มีอายุ 21 วัน ซึ่งบรรจุอยู่ในถุงพลาสติกขนาดใหญ่ที่บรรจุน้ำไว้ภายใน หลังจากนั้นทำการม้วนปากถุงอย่างหลวมๆ แล้วเก็บไว้ในห้องมืด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมงหรือข้ามคืน เพื่อให้มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายต้นข้าวของสปอร์เชื้อรา (โดยทั่วไปเชื้อราโรคไหม้ในข้าวต้องการความชื้นสัมพัทธ์เป็น 90% เพื่อการเข้าโจมตีเนื้อเยื่อของต้นข้าว) หลังจากนั้นทำการย้ายเอาต้นกล้าข้าวออกจากถุงพลาสติกมาเก็บที่โรงเรือนที่ทำการติดตั้งเวลาการรดน้ำทุกๆ 3 ชั่วโมง เพื่อปรับสภาพที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อราโรคไหม้ เพื่อให้ผลที่แน่นอนจึงได้ทำการทดลอง 3 ซ้ำไปในคราวเดียวกัน

การตรวจวัดปริมาณการเกิดโรคใบไหม้ในข้าว

การวัดความรุนแรงของโรคใบไหม้ในข้าวจะทำการประเมินผล 7 วัน (ภาพที่ 7) หลังจากผ่านการฉีดด้วยสปอร์ของเชื้อรา เกณฑ์การวัดระดับความรุนแรงของโรคใช้การแยกลักษณะของแผลเป็น 7 ระดับตามที่ได้อธิบายไว้โดย Roumen และคณะ (1997) ที่ระดับความรุนแรง 0-2 แสดงว่าข้าวมีความต้านทานต่อโรคได้ดี (resistance) ที่ระดับความรุนแรงเท่ากับ 3-4 แสดงว่าข้าวมีความต้านทานต่อโรคระดับปานกลาง (moderate resistance) และที่ระดับความรุนแรงเท่ากับ 5-6 แสดงว่าข้าวไม่มีความต้านทานต่อโรค (susceptible) ดังตารางที่ 8

BAG 1.4	
Nipponbare	Nipponbare
Nipponbare	Nipponbare
Nipponbare <i>Pi9</i>	Nipponbare <i>Pi9</i>
Nipponbare <i>Pi9</i>	Nipponbare <i>Pi9</i>
KDML105	KDML105
KDML105	KDML105

BAG 2.4	
Nipponbare	Nipponbare
Nipponbare	Nipponbare
Nipponbare <i>Pi9</i>	Nipponbare <i>Pi9</i>
Nipponbare <i>Pi9</i>	Nipponbare <i>Pi9</i>
KDML105	KDML105
KDML105	KDML105

BAG 3.5	
Nipponbare	Nipponbare
Nipponbare	Nipponbare
Nipponbare <i>Pi9</i>	Nipponbare <i>Pi9</i>
Nipponbare <i>Pi9</i>	Nipponbare <i>Pi9</i>
KDML105	KDML105
KDML105	KDML105

BAG 4.4	
Nipponbare	Nipponbare
Nipponbare	Nipponbare
Nipponbare <i>Pi9</i>	Nipponbare <i>Pi9</i>
Nipponbare <i>Pi9</i>	Nipponbare <i>Pi9</i>
KDML105	KDML105
KDML105	KDML105

BAG 5.4	
Nipponbare	Nipponbare
Nipponbare	Nipponbare
Nipponbare <i>Pi9</i>	Nipponbare <i>Pi9</i>
Nipponbare <i>Pi9</i>	Nipponbare <i>Pi9</i>
KDML105	KDML105
KDML105	KDML105

BAG 7.2	
Nipponbare	Nipponbare
Nipponbare	Nipponbare
Nipponbare <i>Pi9</i>	Nipponbare <i>Pi9</i>
Nipponbare <i>Pi9</i>	Nipponbare <i>Pi9</i>
KDML105	KDML105
KDML105	KDML105

BAG 8.5	
Nipponbare	Nipponbare
Nipponbare	Nipponbare
Nipponbare <i>Pi9</i>	Nipponbare <i>Pi9</i>
Nipponbare <i>Pi9</i>	Nipponbare <i>Pi9</i>
KDML105	KDML105
KDML105	KDML105

BAG 9.2	
Nipponbare	Nipponbare
Nipponbare	Nipponbare
Nipponbare <i>Pi9</i>	Nipponbare <i>Pi9</i>
Nipponbare <i>Pi9</i>	Nipponbare <i>Pi9</i>
KDML105	KDML105
KDML105	KDML105

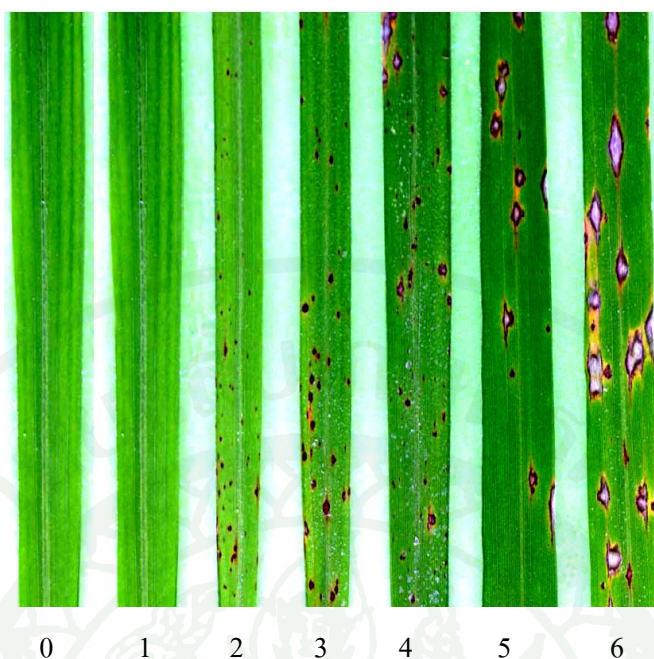
ภาพที่ 4 แผนผังการปลูกข้าวเพื่อทดสอบความต้านทานโรคใบไหม้ของข้าวนิปปอนบารที่มียืน
ต้านทานโรคไหม้ *Pi9* กับเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทย จำนวน 8 ไอล็อต



ภาพที่ 5 ขั้นตอนฉีดสารละลายสปอร์เชื้อราโรคไหม้ลงบนต้นกล้าข้าวที่มีอายุ 3 สัปดาห์



ภาพที่ 6 หลังการปลูกเชื้อ (inoculation) โรคไหม้ลงบนต้นกล้าข้าว จึงเก็บต้นกล้าข้าวไว้ในห้องมืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายต้นข้าวของสปอร์เชื้อรา



ภาพที่ 7 เกณฑ์การวัดระดับความรุนแรงของโรคใบไหม้ 7 ระดับ

ตารางที่ 8 การตรวจวัดระดับความรุนแรงของการเกิดโรคใบไหม้ในข้าว

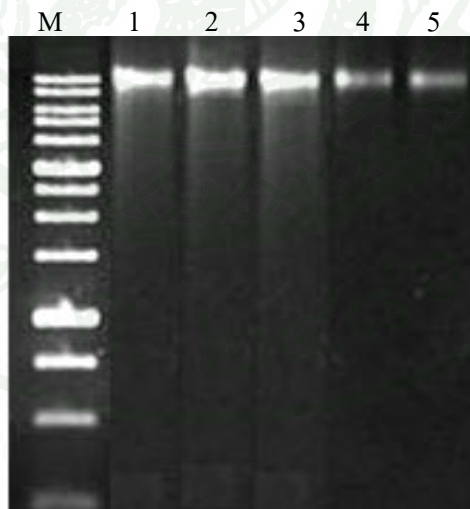
ระดับความรุนแรง ของโรคไหม้	ลักษณะของแผลบนใบข้าว	การประเมิน ความรุนแรง
0	ไม่มีการเข้าทำลายด้วยเชื้อราโรคใบไหม้	
1	จุดสีน้ำตาลขนาดเล็กกว่า 0.5 มิลลิเมตร ไม่มีการสร้างสปอร์	ต้านทานต่อโรค
2	จุดสีน้ำตาลขนาด 0.5 – 1.0 มิลลิเมตร ไม่มีการสร้างสปอร์	
3	แผลรูปร่างกลมถึงรียาวขนาด 1.0-3.0 มิลลิเมตร มีสีเทาตรงกลาง และมีสีน้ำตาลตามขอบ ไม่มีการสร้างสปอร์	
4	มีแผลเป็นรูปกระสวยที่สามารถสร้างสปอร์ได้ ขนาดตั้งแต่ 3.0 มิลลิเมตร ขึ้นไป แผลมีสีเทาตรงกลางและสีน้ำตาลแดงโดยรอบ	ระดับปานกลาง
5	มีแผลเหมือนระดับ 4 แต่ใบข้าวเริ่มมีการแห้งเหี่ยว	ไม่ต้านทาน
6	ใบข้าวแห้งเหี่ยวและมีละอองสปอร์ของเชื้อรามากมาย	

ผลและวิจารณ์

ส่วนที่หนึ่ง การค้นหาพื้นที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรคเชื้อราไหม้ ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยโดยใช้ดีเอ็นเอเทคโนโลยี

การสกัดดีเอ็นเอ

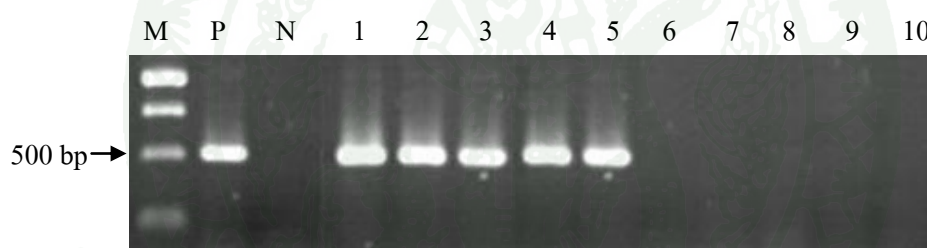
ผลจากการสกัด DNA จากใบข้าวโดยใช้ใบข้าวตัวอย่างละ 1-2 กรัม โดยวิธี CTAB extraction procedure ตามวิธีของ Lodhi และคณะ (1994) แล้วตรวจสอบคุณภาพจีโนมิกดีเอ็นเอ โดยใช้ agarose gel electrophoresis 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่า DNA ที่สกัดได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ มีคุณภาพดี ไม่มีการรบกวนของ DNA ดังภาพที่ 8 แล้วนำจีโนมิกดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และที่ 280 นาโนเมตร พบว่าปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณสูง อัตราส่วนระหว่าง ค่า OD ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อที่ 280 นาโนเมตร บ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของจีโนมิกดีเอ็นเอ ซึ่งอัตราส่วนของค่า A_{260}/A_{280} มีค่าประมาณ 1.6 -1.9



ภาพที่ 8 ผลการตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอ โดย agarose gel electrophoresis 1.0 เปอร์เซ็นต์ ในตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมือง M คือ GeneRuler™ 1 Kb DNA และ 1-5 คือ ตัวอย่าง ข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย

ผลตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย

จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับตัวอย่างดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์พื้นเมืองทั้ง 203 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ pB8 (Liu *et al.*, 2002) (ตารางที่ 3) ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* จากนั้นตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยวิธี agarose gel electrophoresis 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองทั้งหมด จำนวน 64 (31.53%) ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคเหนือ 16 ตัวอย่าง ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ 1 ตัวอย่าง ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 14 ตัวอย่าง และข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 33 ตัวอย่าง ที่สามารถเพิ่มปริมาณให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวนิปปอนบารุที่ยีนต้านทาน *Pi9* ซึ่งเป็น positive control ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส และข้าวนิปปอนบารุที่เป็น negative control ซึ่งไม่มีอัลลีลยีนต้านทาน *Pi9* ไม่ให้แถบดีเอ็นเอ ตารางที่ 9



ภาพที่ 9 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ pB8 ที่มีความจำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ในตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย M คือ GeneRuler™ 1 Kb DNA P คือ ข้าวนิปปอนบารุ ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* เป็น positive control N คือ ข้าวนิปปอนบารุ ที่ไม่มีอัลลีลยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* เป็น Negative control 1-5 คือ ตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีอัลลีลยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* 6-10 คือ ตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่ไม่มีอัลลีลยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ลูกศร แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส ซึ่งเป็นตำแหน่งของอัลลีลของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9*

ตารางที่ 9 การกระจายตัวของอัลลีลในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการค้นหาฮีนด้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ pB8 สำหรับฮีนด้านทานโรคไหม้ *Pi9*

ตัวอย่างพันธุ์ข้าว	จำนวนพันธุ์ ที่ตรวจสอบ	จำนวนพันธุ์ที่มี อัลลีล R* (500 bp)	จำนวนพันธุ์ที่ มีอัลลีล s**
ข้าวนิปอนนาเร <i>Pi9</i> (Positive control)	1	✓	
ข้าวนิปอนนาเร (Negative control)	1		✓
ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคเหนือ	19	16	3
ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้	40	1	39
ข้าวขึ้นน้ำพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	45	14	31
ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	99	33	66
รวม	203	64 (31.53%)	139 (68.47%)

หมายเหตุ R* หมายถึง อัลลีลด้านทานของฮีน *Pi9* ที่ด้านทานต่อโรคไหม้ของตัวอย่างพันธุ์ข้าวได้ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับฮีน *Pi9* ให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส
s** หมายถึง อัลลีลไม่ด้านทานของตัวอย่างข้าวที่ไม่มีฮีนด้านทาน *Pi9* ต่อโรคไหม้

ผลจากการตรวจสอบหาฮีนด้านทานโรคไหม้ *Pi9* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ pB8 ที่จำเพาะกับฮีนด้านทานโรคไหม้ *Pi9* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย 203 ตัวอย่าง ที่ประกอบไปด้วยข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ 19 ตัวอย่าง ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ 40 ตัวอย่าง ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 45 ตัวอย่าง และข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 99 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ 16 ตัวอย่าง จาก 19 ตัวอย่าง ที่สามารถเพิ่มปริมาณให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวนิปอนนาเรที่ฮีนด้านทาน *Pi9* ซึ่งเป็น positive control ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส ตามด้วย ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 33 ตัวอย่าง จาก 99 ตัวอย่าง ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 14 ตัวอย่าง และข้าวพื้นเมืองภาคใต้ 1 ตัวอย่าง จาก 40 ตัวอย่าง

จากข้อมูลโรคไหม้ในประเทศไทยเป็นที่ทราบกันดีว่า มักพบมีการระบาดของโรคอยู่เป็นประจำทางภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีภูมิอากาศเย็นเหมาะสมต่อการแพร่ระบาดของโรคไหม้ นอกจากนี้พื้นที่การเพาะปลูกข้าว 53 เปอร์เซ็นต์ เป็นพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 22 เปอร์เซ็นต์เป็นภาคเหนือ และ 6 เปอร์เซ็นต์เป็นภาคใต้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง ที่ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และข้าวพื้นพันธุ์เมืองภาคเหนือมียืนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* มากกว่า ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ การที่มีพื้นที่การเพาะปลูกมากก็เป็นปัจจัยในการปรับตัวของพันธุ์ข้าวเพื่อให้ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ที่ความหลากหลายอยู่สูง ในขณะที่ภาคใต้มีพื้นที่การเพาะปลูกเพียง 6 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยืนต้านทานโรคไหม้ *Pi9*

จากการส่งตัวอย่างพันธุ์ข้าวพื้นเมือง จำนวน 7 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วย บือขอพอ ข้าวแดง ช่อนิมิต พวงมาลัย 31-5-6 เขียว คอเหลือง และข้าวหอม (GS.4810) ที่ตรวจพบยืนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับข้าวนิปปอนบารที่มียืนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* (positive control) (Macrogen Inc, Korea) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยืน *Pi9* ในฐานข้อมูล (ภาพที่ 10) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองทั้ง 7 ตัวอย่าง มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยืนต้านทาน *Pi9* ที่มีรายงานไว้ใน GenBank: DQ285630.1 (*Oryza sativa* (indica cultivar-group) putative nitrate-induced NOI protein (75-1-127BAC12.1), putative NBS-LRR disease resistance protein (Nbs1-Pi9), putative NBS-LRR disease resistance protein (Nbs3-Pi9), and NBS-LRR disease resistance protein (Pi9) genes) (ภาคผนวก ข)

จากผลที่ได้นี้ จึงสามารถยืนยันได้ว่าจากการส่งตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมือง 7 ตัวอย่างที่มียืนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* กับข้าวพันธุ์นิปปอนบารโดยใช้ไพรเมอร์ pB9 ซึ่งเป็น dominant marker สามารถใช้บ่งบอกข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีและไม่มีอัลลีลของยืนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ได้ โดยการยืนยันผลจากการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม Nucleotide-nucleotide blast (blastn)

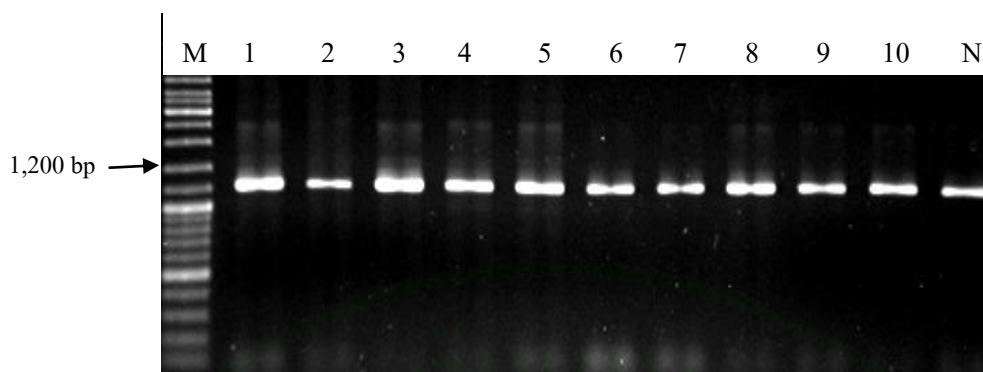
บ๊อชพอ	ATACACTCTAATCAAGCAAGTTTAAACCaaaaaaaTACAATTAAGAGAGGATGCTGGTG	60
DQ285630.1	 ATACACTCTAATCAAGCAAGTTTAAACCAAAAAAATACAATTAAGAGAGGATGCTGGTG	22514
บ๊อชพอ	ATGGCGTTGTTTTGAGTTTGGAGAGGGTCATTATGGAGGATGCCATCAGGAAGCCCAACA	120
DQ285630.1	 ATGGCGTTGTTTTGAGTTTGGAGAGGGTCATTATGGAGGATGCCATCAGGAAGCCCAACA	22574
บ๊อชพอ	CCGACGGTGTGAGTAACCTTTGGGTTTAGTGGAAATCCGGCAAAATCTTGCAAGGTGATT	180
DQ285630.1	 CCGACGGTGTGAGTAACCTTTGGGTTTAGTGGAAATCCGGCAAAATCTTGCAAGGTGATT	22634
บ๊อชพอ	AGTGAGTGAAGCCATTTTCAGTTGGTGCTTTTCTTTGATTATCTGATTTTAAACAGATTT	240
DQ285630.1	 AGTGAGTGAAGCCATTTTCAGTTGGTGCTTTTCTTTGATTATCTGATTTTAAACAGATTT	22694
บ๊อชพอ	TCTTTTGTTTTCAGCATAAGATAGCAGATGACATGAACTGTTGGTATGGGTCATGGGGGAAA	300
DQ285630.1	 TCTTTTGTTTTCAGCATAAGATAGCAGATGACATGAACTGTTGGTATGGGTCATGGGGGAAA	22754
บ๊อชพอ	CAGTGCTCAGCATTGCGTCGTCCTCAACTGCCACAAATGACATGAGCTTGCTGCTGGGAGTG	360
DQ285630.1	 CAGTGCTCAGCATTGCGTCGTCCTCAACTGCCACAAATGACATGAGCTTGCTGCTGGGAGTG	22814
บ๊อชพอ	CAGGAGACATGGTAAGCATCTAGCTCCACATAATAAG	398
DQ285630.1	 CAGGAGACATGGTAAGCATCTAGCTCCACATAATAAG	22852

ภาพที่ 10 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองบ๊อชพอกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *Pi36* (DQ285630.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank

ผลตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย

ข้าวอินดิกาสายพันธุ์ Kasalath รหัส Q61 มียีน *Pi36* ซึ่งเป็นยีนต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศจีนได้ โดยมีตำแหน่งของยีนต้านทานอยู่บนโครโมโซมข้าวคู่ที่ 8 จากการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมข้าวจาปอนิกา สายพันธุ์นิปปอนบาระ เป็นตัวอ้างอิงในการทำยีนต้านทาน *Pi36* พบว่าลำดับเบสของยีนต้านทาน *Pi36* มีโครงสร้าง ที่เป็น NBS และ LRR motif โปรตีนของยีน *Pi36* ประกอบไปด้วย กรดอะมิโนจำนวน 1,056 กรดอะมิโน มีเพียงหนึ่งกรดอะมิโนเท่านั้นที่ถูกแทนที่จาก Aspartic acid (Asp) เป็น Serine (Ser) ที่ตำแหน่ง 590 ซึ่งมีความสัมพันธ์กับลักษณะของฟีนไทป์ที่ต้านทานโรคไหม้ และยีน *Pi36* เป็น single copy gene ในข้าว (Liu *et al.*, 2007)

จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับตัวอย่างดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์พื้นเมืองทั้ง 203 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS (Liu *et al.*, 2005) (ตารางที่ 3) ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* (ภาพที่ 11) หลังจากนั้นนำ PCR products คัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ที่มีตำแหน่งตัด 5'... G↓ANTC...3' เพื่อดูความแตกต่างระหว่างตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีอัลลีลของยีน *Pi36* ที่ต้านทานต่อโรคไหม้และตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีอัลลีลไม่ต้านทานโรคไหม้ของยีน *Pi36* แล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis 1.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 12) พบว่ามีตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองทั้งหมด 180 ตัวอย่าง (88.67%) จากจำนวนข้าวพันธุ์พื้นเมืองทั้งหมด 203 ตัวอย่าง ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอคาดหวังประมาณ 1,200 คู่เบส โดยแบ่งเป็น ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคเหนือ 18 ตัวอย่าง ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ 35 ตัวอย่าง ข้าวขึ้นน้ำพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 42 ตัวอย่าง และข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 85 ตัวอย่าง หลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* มีรูปแบบอัลลีลที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบ คือ อัลลีลที่หนึ่ง มีขนาดแถบดีเอ็นเอ 100 และ 800 คู่เบส อัลลีลที่สอง มีขนาดแถบดีเอ็นเอ 100 400 และ 500 คู่เบส และ อัลลีลที่สาม มีขนาดแถบดีเอ็นเอ 100 200 และ 800 คู่เบส ซึ่งไม่พบในรายงานมาก่อน เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวนิปปอนบารุ ซึ่งเป็น negative control ที่ไม่มีอัลลีลของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 100 และ 800 คู่เบส พบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 59 ตัวอย่าง ที่มีอัลลีลแบบที่หนึ่ง ซึ่งมีขนาดแถบดีเอ็นเอ 100 และ 800 คู่เบส โดยแบ่งเป็น ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 6 ตัวอย่าง ข้าวขึ้นน้ำพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 18 ตัวอย่าง ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 35 ตัวอย่าง และไม่พบอัลลีลแบบที่หนึ่งในข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคเหนือเลย อัลลีลที่สอง ซึ่งมีขนาดแถบดีเอ็นเอ 100 400 และ 500 คู่เบส พบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 17 ตัวอย่าง ที่มีอัลลีลแบบที่สอง โดยแบ่งเป็น ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 13 ตัวอย่าง ข้าวขึ้นน้ำพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 1 ตัวอย่าง ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3 ตัวอย่าง และไม่พบอัลลีลที่สองในข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคเหนือเลย นอกจากนี้พบข้าวพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 104 ตัวอย่าง ที่มีอัลลีลแบบที่สาม ซึ่งมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 100 200 และ 800 คู่เบส โดยแบ่งเป็น ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 18 ตัวอย่าง ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ 16 ตัวอย่าง ข้าวขึ้นน้ำพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 23 ตัวอย่าง ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 47 ตัวอย่าง (ตารางที่ 10)



ภาพที่ 11 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ R36STS มีความจำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* ในตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย

M คือ GeneRuler™ DNA ladder mix 1-10 คือ ตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย

N คือ ข้าวนิปปอนบารุ ซึ่งเป็น negative control

ลูกศร แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 1,200 คู่เบส



ภาพที่ 12 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ R36STS มีความจำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* ในตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยหลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* M คือ GeneRuler™ DNA ladder mix, 1-5 คือ ตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยหลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ที่มีขนาด อัลลิล 100 และ 800 คู่เบส, 6-10 คือ ตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยหลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ที่มีขนาด 100 400 และ 500 คู่เบส N คือ ข้าวนิปปอนบารุ ที่ไม่มีอัลลิลยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* เป็น negative control

จากการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* โดยการส่งตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 5 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบอัลลีลยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับข้าวนิปปอนบาร์ที่มีอัลลีลไม่ต้านทานโรคไหม้ *Pi36* (MacroGen Inc, Korea) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองมีอัลลีลยีนต้านทาน *Pi36* กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *Pi36* ในฐานข้อมูล พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองทั้ง 5 ตัวอย่าง มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทาน *Pi36* ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank: DQ900896.1 *Oryza sativa* (indica cultivar-group) CC-NBS-LRR Pi36 (*Pi36*) gene, พบว่าคุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างพันธุ์ข้าวพื้นเมือง จำนวน 5 ตัวอย่าง และข้าวนิปปอนบาร์ที่ได้รับไม่มีคุณภาพ แต่เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 5 ตัวอย่าง และข้าวนิปปอนบาร์ไปแปลรหัสเป็น โปรตีน (blastp) พบว่ามีความเหมือนยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* ในฐานข้อมูลถึง 76 เปอร์เซ็นต์ (data not shown)

เนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะกับยีนต้านทาน *Pi36* อยู่ห่างจากยีนเป็นระยะทาง 0.4 เซ็นติเมอร์แกน (cM) ดังนั้นอาจมีความผิดพลาดในการตรวจสอบเนื่องจากเกิดการ recombination ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอและยีนที่ต้องการตรวจสอบได้โดยมีโอกาที่จะเกิดความผิดพลาด 0.4 เปอร์เซ็นต์ ต้องมีการยืนยันผลการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอว่าข้าวมียีนต้านทาน *Pi36* จริง โดยการปลูกเชื้อลงบนต้นข้าว แล้วตรวจดูการเกิดโรคเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทาน *Pi36* ประกอบกับได้มีรายงานการศึกษาลำดับเบสของยีน *Pi36* ในข้าวที่มีอัลลีลต้านทานและอ่อนแอต่อโรค (Liu *et al.*, 2005) จึงน่าจะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างของลำดับเบสของยีนบริเวณต่าง ๆ กับความต้านทาน เพื่อนำมาพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi36*

ตารางที่ 10 การกระจายตัวของอัลลีลในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการค้นหาถิ่นต้านทานโรคไหม้ในข้าวด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS สำหรับยีนต้านทาน

Pi36 หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI*

ตัวอย่างพันธุ์ข้าว	จำนวนพันธุ์ที่ ตรวจสอบ	จำนวนพันธุ์ที่สามารถ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	จำนวนพันธุ์ที่มีอัลลีล 100 และ 800 คู่เบส ^A	จำนวนพันธุ์ที่มีอัลลีล 100 400 และ 500 คู่เบส ^B	จำนวนพันธุ์ที่มีอัลลีล 100, 200 และ 800 คู่เบส ^C
ข้าวนิปปอนบาร (negative control)	1	1	/	-	-
ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคเหนือ	19	18	-	-	18
ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้	40	35	6	13	16
ข้าวขึ้นน้ำพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	45	42	18	1	23
ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	99	85	35	3	47
รวม	203	180 (88.67%)	59	17	104

หมายเหตุ A หรือ S หมายถึง อัลลีลไม่ต้านทาน (susceptible) ของยีน *Pi36* ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS สำหรับยีนต้านทาน *Pi36* แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 100 และ 800 คู่เบส

B หรือ R หมายถึง อัลลีลต้านทาน (resistance) ของยีน *Pi36* ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS สำหรับยีนต้านทาน *Pi36* แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 100 400 และ 500 คู่เบส

C หมายถึง อัลลีล C ของยีน *Pi36* ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS สำหรับยีนต้านทาน *Pi36* แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 100 200 และ 800 คู่เบส

การตรวจสอบหายีนด้านทานโรคไหม้ *Pid2* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย

ข้าวสายพันธุ์ Digu ของประเทศจีน สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 156 สายพันธุ์ จากประเทศจีนและประเทศญี่ปุ่น และถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประเทศจีนอย่างกว้างขวาง จากการศึกษาทางพันธุศาสตร์พบว่าข้าวสายพันธุ์ Digu มียีนด้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้อยู่สองยีนด้วยกัน คือ ยีนด้านทาน *Pid(t)1* และ *Pid2* โดยยีนด้านทาน *Pid(t)1* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมข้าวคู่ที่ 2 และยีนด้านทาน *Pid2* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมข้าวคู่ที่ 6 (Chen *et al.*, 2006) ซึ่งต่อมา ยีนด้านทาน *Pid2* ได้ถูกโคลนในปี ค.ศ. 2006 โดย Chen และคณะ ยีนด้านทาน *Pid2* นี้มีโครงสร้างของโปรตีนที่แตกต่างจากยีนด้านทานตัวอื่นๆ คือ มีส่วนของน้ำตาลแมนโนสที่สามารถจับกับแลคตินได้อ้อยู่ภายนอกเซลล์ (a bulb-type mannose specific binding lectin, β -lectin) และในส่วนภายในเซลล์มีโครงสร้าง serine-threonine kinase domain ซึ่งโปรตีนจากยีนด้านทาน *Pid2* นี้จะมีตำแหน่งอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยข้าวที่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้มียีนด้านทาน *Pid2* ที่แตกต่างจากที่ไม่สามารถต้านทานเพียงกรดอะมิโนหนึ่งตัวที่ตำแหน่ง 441 ของโปรตีนยีนด้านทานเท่านั้น

จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับตัวอย่างดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์พื้นเมืองทั้ง 203 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Con2F/Con2R (Chen *et al.*, 2006) (ตารางที่ 3) ที่จำเพาะกับยีนด้านทานโรคไหม้ *Pid2* หลังจากนั้นนำ PCR products ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* เพื่อดูความแตกต่างระหว่างตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีอัลลีลของยีน *Pid2* ที่ต้านทานต่อโรคไหม้และพันธุ์ข้าวที่มีอัลลีลที่ไม่ต้านทานของยีน *Pid2* จากนั้นแยกชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis 2.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองทั้งหมด 192 ตัวอย่าง (94.58%) จากจำนวนข้าวพันธุ์พื้นเมืองทั้งหมด 203 ตัวอย่าง ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยแบ่งเป็น ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ 15 ตัวอย่าง ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ 40 ตัวอย่าง ข้าวขึ้นน้ำพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 45 ตัวอย่าง และข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 92 ตัวอย่าง โดยชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* สามารถจำแนกรูปแบบของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นได้ 2 รูปแบบหรือ 2 อัลลีล คือ อัลลีล S ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส เนื่องจากไม่มีตำแหน่งของ recognition site สำหรับเอนไซม์ *MluI* และอัลลีล R มีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 700 และ 400 คู่เบส หลังตัดด้วยเอนไซม์ *MluI* (ภาพที่ 13) เนื่องจากมีตำแหน่งของการตัดด้วยเอนไซม์ *MluI* อยู่ภายใน

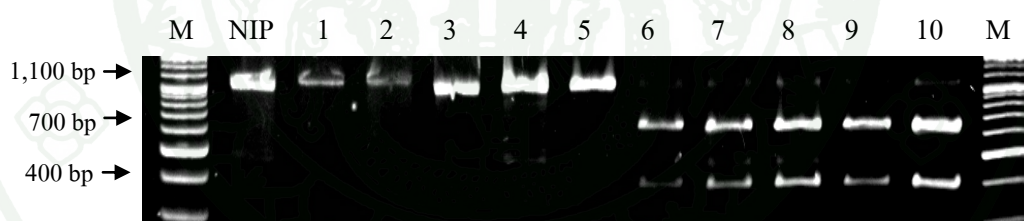
ผลจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* มีข้าวพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 49 ตัวอย่างจาก ตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองทั้งหมด 192 ตัวอย่าง ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ที่มีอัลลิล S ซึ่งมี แอปติเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส เนื่องจากไม่มีตำแหน่งของ recognition site สำหรับเอนไซม์ *MluI* โดยแบ่งเป็น ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคเหนือ 10 ตัวอย่าง ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ 1 ตัวอย่าง ข้าวขึ้นน้ำ พันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 13 ตัวอย่าง และข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 25 ตัวอย่าง และมีข้าวพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 143 ตัวอย่าง จากตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองทั้งหมด 192 ตัวอย่างที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ที่มีอัลลิล R คือมีแอปติเอ็นเอ 2 แอป ขนาด 700 และ 400 คู่เบส หลังตัดด้วยเอนไซม์ *MluI* (ตารางที่ 11) เนื่องจากมีตำแหน่งของการตัดด้วยเอนไซม์ *MluI* อยู่ใน โดยแบ่งเป็น ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคเหนือ 5 ตัวอย่าง ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ 39 ตัวอย่าง ข้าวขึ้นน้ำพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 32 ตัวอย่าง และข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 67 ตัวอย่าง

หลังจากนั้นทำการส่งตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ เก้ารวง 17-2-106 คอสามเดือน พวงเงิน เหลืองลิซอ เหนียวบายสี และนางรอง ที่ตรวจพบอัลลิลยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* และตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 4 ตัวอย่าง ที่มีอัลลิลไม่ต้านทาน *Pid2* ได้แก่ ข้าวแดง (TRI 8409149) พญาชม ข้าวมันหมู จนอโหนดและ ข้าวนิปปอนบาร (negative control) ไปหา ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Macrogen Inc, Korea) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำการเปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลของ NCBI โดยใช้โปรแกรม Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีอัลลิลของยีนต้าน *Pid2* กับลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน *Pid2* ในฐานข้อมูล (ภาพที่ 14) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์ พื้นเมืองทั้ง 6 ตัวอย่าง ที่มีอัลลิลของยีนต้านทาน *Pid2* มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ต้านทาน *Pid2* ซึ่งเป็นส่วนของโปรตีน β -lectin receptor kinase ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank: FJ915121.1 (*Oryza sativa* Indica Group cultivar Digu B-lectin receptor kinase (*Pid2*) gene, complete cds) (ภาคผนวก ค)

จากโครงสร้างของโปรตีนที่แตกต่างกันระหว่างข้าวที่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ที่มี อัลลิลยีนต้านทาน *Pid2* กับข้าวที่มีอัลลิลไม่ต้านทานของยีน *Pid2* ซึ่งข้าวที่ต้านทานโรคไหม้มี บริเวณที่เป็น substitution site ของกรดอะมิโนไอโซลิวซีน (isoleucine) ที่ตำแหน่ง 441ของโปรตีน ยีนต้านทาน *Pid2* (Chen *et al.*, 2006) ดังนั้นจึงได้ทำการ download ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ ของของยีน *Pid2* เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมือง 6 ตัวอย่าง ที่

มีอัลลีลของยีนด้านทานดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น และลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 4 ตัวอย่าง ที่มีอัลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pid2* และลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวนิปปอนบารซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่มีอัลลีลไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ ด้วยโปรแกรม ClustalW (ClustalW 2.0.12 multiple sequence alignment)

ผลจากการทำ multiple sequence alignment พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน recognition site ของ *MluI* จำนวน 1 นิวคลีโอไทด์ โดยข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีอัลลีลของยีนด้านทานโรคไหม้ *Pid2* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 5'... A↓CGCGT...3' ดังนั้นเมื่อนำ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อยีนด้านทาน *Pid2* มาตัดด้วยเอนไซม์ *MluI* ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 700 และ 400 คู่เบส ส่วนในข้าวที่ไม่มีอัลลีลของยีนด้านทาน *Pid2* และข้าวพันธุ์นิปปอนบารซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่ไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 5'... G↓CGCGT...3' ซึ่งทำให้เอนไซม์ *MluI* ไม่สามารถตัดได้ ยังคงได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส ข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีอัลลีลของยีนด้านทาน *Pid2* ที่ควบคุมลักษณะด้านทานโรคไหม้นี้ ดังภาพที่ 16



ภาพที่ 13 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์พื้นเมืองแต่ละพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *Pid2* (Con2F/Con2R) หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MluI*
M = GeneRuler™ DNA Ladder Mix, NIP = Nipponbare, 1-5 เป็นตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่ไม่มีอัลลีลด้านทานของยีน *Pid2* และ 6-10 เป็นตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีอัลลีลด้านทานของยีน *Pid2*

ตารางที่ 11 การกระจายตัวของอัลลีลในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ *Pid2* Con2F/Con2R สำหรับยีนต้านทาน *Pid2*

ข้าวพันธุ์พื้นเมือง	จำนวนพันธุ์ที่ตรวจสอบ	จำนวนพันธุ์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	จำนวนพันธุ์ที่มีอัลลีล S* (1,100 คู่เบส)	จำนวนพันธุ์ที่มีอัลลีล R** (400 และ 700 คู่เบส)
ข้าวนิปปอนบาเร (negative control)	1	1	/	
ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคเหนือ	19	15	10	5
ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้	40	40	1	39
ข้าวขึ้นน้ำพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	45	45	13	32
ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	99	92	25	67
รวม	203	192	49	143

หมายเหตุ * หมายถึง อัลลีล S ของยีน *Pid2* ที่ไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* ไม่สามารถตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ของตัวอย่างพันธุ์ข้าว ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pid2* ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส

****** หมายถึง อัลลีล R ของยีน *Pid2* ที่ต้านทานต่อโรคไหม้ ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* สามารถตัด ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ของตัวอย่างพันธุ์ข้าวได้ ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pid2* ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 700 และ 400 คู่เบส

นางรอง	CATCACAAGACGGACGCTGGTTCATCGGAAGATGATGGATTCTGCAACAATATCCGGA	60
FJ915121.1	CATCACAAGACG-ACGCTGGTTCATCGGAAGATGATGGATTCTGCAACAATATCCGGA	4813
นางรอง	GCACCAGTGCGGTTCACTTACAGGGAGCTCCAGGATGCGACAAGCAACTTCTGTAACAAG	120
FJ915121.1	GCACCAGTGCGGTTCACTTACAGGGAGCTCCAGGATGCGACAAGCAACTTCTGTAACAAG	4873
นางรอง	CTTGGTCAGGGAGGGTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACTCCAGACGGCAGTCGTATT	180
FJ915121.1	CTTGGTCAGGGAGGGTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACTCCAGACGGCAGTCGTATT	4933
นางรอง	GCTGTGAAGAAGCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGAGTTCCGCTCTGAGGTAACG	240
FJ915121.1	GCTGTGAAGAAGCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGAGTTCCGCTCTGAGGTAACG	4993
นางรอง	ATCATTGGTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCGAGGCTTTTGTACTGAGGGA	300
FJ915121.1	ATCATTGGTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCGAGGCTTTTGTACTGAGGGA	5053
นางรอง	CCACACAGGCTTCTTGCTACGAGTACATGGCGAAAGGGTCGCTGGATAAGTGGAATTTTC	360
FJ915121.1	CCACACAGGCTTCTTGCTACGAGTACATGGCGAATGGGTCGCTGGATAAGTGGAATTTTC	5113
นางรอง	CATTCTAAAGAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAGGTTTAAACATTGCGCTTGGA	420
FJ915121.1	CATTCTAAAGAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAGGTTTAAACATTGCGCTTGGA	5173
นางรอง	ACGGCAAAGGGATTGGCATACTCCATCAGGACTGCGATTGGAAGATTGTACTGTGAC	480
FJ915121.1	ACGGCAAAGGGATTGGCATACTCCATCAGGACTGCGATTGGAAGATTGTACTGTGAC	5233
นางรอง	ATTAAGCCTGAGAATGTTCTACTTGACGACAACCTTCATCGCAAAGGTATCTGATTTTGGC	540
FJ915121.1	ATTAAGCCTGAGAATGTTCTACTTGACGACAACCTTCATCGCAAAGGTATCTGATTTTGGC	5293
นางรอง	CTTGCCAAGTTGATGACCAGGGAGCAGGCCATGTTTTCACCTACGCTCAGAGGCACGCGC	600
FJ915121.1	CTTGCCAAGTTGATGACCAGGGAGCAGGCCATGTTTTCACCTACGCTCAGAGGCACGCGC	5353
นางรอง	GGGTACCTTGACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTCAGAGAAGAGTGATGTGTAC	660
FJ915121.1	GGGTACCTTGACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTCAGAGAAGAGTGATGTGTAC	5413

ภาพที่ 14 ตัวอย่างการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastN)

เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองนางรอง

กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *Pid2* (FJ915121.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล

Genbank

นางรอง	AGCTACGGCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAAGAGCTACGATCCCTCGGAG	720
FJ915121.1	 AGCTACGGCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAAGAGCTACGATCCCTCGGAG	5473
นางรอง	ATCTCCGAGAAGGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAAGCTGGAGGAAGGCGATCTT	780
FJ915121.1	 ATCTCCGAGAAGGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAAGCTGGAGGAAGGTGATCTT	5533
นางรอง	CAGGACATCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGATGGGCGGGTCGAGACCGCG	840
FJ915121.1	 CAGGACATCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGATGGGCGGGTCGAGACCGCG	5593
นางรอง	ATCAAGGTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACCAGAGACCATCCATGTCAAAG	900
FJ915121.1	 ATCAAGGTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACCAGAGACCATCCATGTCAAAG	5653
นางรอง	GTTGTGCAGATGCTCGAAGGCGTCTGCGAGGTGCT	935
FJ915121.1	 GTTGTGCAGATGCTCGAAGGCGTCTGCGAGGTGCT	5688

ภาพที่ 14 (ต่อ)

L1	TGCAAAACAATATCCGGAGCACCAGTGCGG-TTCACTTACAGGGAGCT-CCAGGATGCGAC	114
L58	TGCAAAACAATATCCGGAGCACCAGTGCGG-TTCACTTACAGGGAGCT-CCAGGATGCGAC	115
E144	TGCAAAACAATATCCGGAGCACCAGTGCGG-TTCACTTACAGGGAGCT-CCAGGATGCGAC	112
Nip	TGCAAAACAATATCCGGAGCACCAGTGCGG-TTCACTTACAGGGAGCT-CCAGGATGCGAC	112
U55	TGCAAAACAATATCCGGAGCACCAGTGCGG-TTCACTTACAGGGAGCT-CCAGGATGCGAC	118
E132	TGCAAAACAATATCCGGAGCACCAGTGCGG-TTCACTTACAGGGAGCT-CCAGGATGCGAC	120
Pid2	TGCAAAACAATATCCGGAGCACCAGTGCGG-TTCACTTACAGGGAGCT-CCAGGATGCGAC	1496
U56	TGCAAAACAATATCCGGAGCACCAGTGCGG-TTCACTTACAGGGAGCT-CCAGGATGCGAC	119
S108	TGCAAAACAATATCCGGAGCACCAGTGCGG-TTCACTTACAGGGAGCT-CCAGGATGCGAC	117
E111	TGCAA-CAATATCCG-AGCACCAGTGCGG-T-CACT-ACAGGGAGCT-CCAGGATGCGAC	102
U57	TGCAAAACAATATCCCGAGCACCAGTGCGG-TTCACTTACAGGGAGCT-CCAGGATGCGAC	117
U46	TGCAAAACAATATCCGGAGCACCAGTGCGGGTTCACTTACAGGGAGCTGCCAGGATGCGAC	128

ภาพที่ 15 การใช้โปรแกรม ClustalW 2.0.12 multiple sequence alignment เปรียบเทียบลำดับ
 นิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่เหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์
 ของยีน *Pid2* (FJ915121.1 (*Oryza sativa* Indica Group cultivar Digu B-lectin receptor
 kinase (*Pid2*) gene, complete cds))) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank
 โดย L1= แก้วรวง 17-2-106, L58 = คอสามเดือน, E144 = พวงเงิน,
 Nip = ข้าวนิปปอนบาร, U55 = เหลืองลีซอ, E132 = เหนียวบายสี, U56 = ข้าวแดง
 (TRI 8409149), S108 = นางรอง, E111= พญาชม, U57 = ข้าวมันหมู,
 U46 = จะนอไห

L1	AAGCAACTTCTGTAAACAAGCTTGGTCAGGGAGGGTTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACT	174
L58	AAGCAACTTCTGTAAACAAGCTTGGTCAGGGAGGGTTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACT	175
E144	AAGCAACTTCTGTAAACAAGCTTGGTCAGGGAGGGTTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACT	172
Nip	AAGCAACTTCTGTAAACAAGCTTGGTCAGGGAGGGTTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACT	172
U55	AAGCAACTTCTGTAAACAAGCTTGGTCAGGGAGGGTTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACT	178
E132	AAGCAACTTCTGTAAACAAGCTTGGTCAGGGAGGGTTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACT	180
Pid2	AAGCAACTTCTGTAAACAAGCTTGGTCAGGGAGGGTTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACT	1556
U56	AAGCAACTTCTGTAAACAAGCTTGGTCAGGGAGGGTTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACT	179
S108	AAGCAACTTCTGTAAACAAGCTTGGTCAGGGAGGGTTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACT	177
E111	AAGCA-CTTCTGTAAACAAGCTTGGTCAGGGAGGGTTTGGATCTGTGTATCTCG-TACACT	160
U57	AAGCAACTTCTGTAAACAAGCTTGGTCAGGGAGGGATTGGATCTGTGTATCTCGGTACACT	177
U46	AAGCAACTTCTGTAAACAAGCTTGGTCAGGGAGGGTTTGTATCTGTGTATCTTGGTACACT	188

L1	CCCAGACGGCAGTCGTATTGCTGTGAAGAAGCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGA	234
L58	CCCAGACGGCAGTCGTATTGCTGTGAAGAAGCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGA	235
E144	CCCAGACGGCAGTCGTATTGCTGTGAAGAAGCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGA	232
Nip	CCCAGACGGCAGTCGTATTGCTGTGAAGAAGCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGA	232
U55	CCCAGACGGCAGTCGTATTGCTGTGAAGAAGCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGA	238
E132	CCCAGACGGCAGTCGTATTGCTGTGAAGAAGCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGA	240
Pid2	CCCAGACGGCAGTCGTATTGCTGTGAAGAAGCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGA	1616
U56	CCCAGACGGCAGTCGTATTGCTGTGAAGAAGCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGA	239
S108	CCCAGACGGCAGTCGTATTGCTGTGAAGAAGCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGA	237
E111	CCCAGACGGCAGTCGTATTGCTGTGAAGAAGCTGGAGGGCATAGCTCAAGGAAAGAAAGA	220
U57	CCCAGACGGCAGTCATATTGCTGTGAAGAAGCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGA	237
U46	CCCAGACTGCAGTCGTATTGCTGTGAAGAAGCTGGAGGGCATAGGTCAAGGAAAGAAAGA	248

L1	GTTCCGCTCTGAGGTAAACGATCATTGGTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCG	294
L58	GTTCCGCTCTGAGGTAAACGATCATTGGTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCG	295
E144	GTTCCGCTCTGAGGTAAACGATCATTGGTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCG	292
Nip	GTTCCGCTCTGAGGTAAACGATCATTGGTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCG	292
U55	GTTCCGCTCTGAGGTAAACGATCATTGGTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCG	298
E132	GTTCCGCTCTGAGGTAAACGATCATTGGTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCG	300
Pid2	GTTCCGCTCTGAGGTAAACGATCATTGGTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCG	1676
U56	GTTCCGCTCTGAGGTAAACGATCATTGGTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCG	299
S108	GTTCCGCTCTGAGGTAAACGATCATTGGTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCG	297
E111	GTTCCGCTCTGAGGTAAACGATCATTGGTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCG	280
U57	GTTCCGCTCTGAGGTAAACGATCATTGGTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCG	297
U46	GTTCCGCTCTGAGGTAAACGATCATTGGTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCG	308

L1	AGGCTTTTGTACTGAGGGACCACACAGGCTTCTTGCCCTACGAGTACATGGCGAATGGGTC	354
L58	AGGCTTTTGTACTGAGGGACCACACAGGCTTCTTGCCCTACGAGTACATGGCGAATGGGTC	355
E144	AGGCTTTTGTACTGAGGGACCACACAGGCTTCTTGCCCTACGAGTACATGGCGAATGGGTC	352
Nip	AGGCTTTTGTACTGAGGGACCACACAGGCTTCTTGCCCTACGAGTACATGGCGAATGGGTC	352
U55	AGGCTTTTGTACTGAGGGACCACACAGGCTTCTTGCCCTACGAGTACATGGCGAATGGGTC	358
E132	AGGCTTTTGTACTGAGGGACCACACAGGCTTCTTGCCCTACGAGTACATGGCGAATGGGTC	360
Pid2	AGGCTTTTGTACTGAGGGACCACACAGGCTTCTTGCCCTACGAGTACATGGCGAATGGGTC	1736
U56	AGGCTTTTGTACTGAGGGACCACACAGGCTTCTTGCCCTACGAGTACATGGCGAATGGGTC	359
S108	AGGCTTTTGTACTGAGGGACCACACAGGCTTCTTGCCCTACGAGTACATGGCGAATGGGTC	357
E111	AGGCTTTTGTACTGAGGGACCACACAGGCTTCTTGCCCTACGAGTACATGGCGAATGGGTC	340
U57	AGGCTTTTGTACTGAGGGACCACACAGGCTTCTTGCCCTACGAGTACATGGCGAATGGGTC	357
U46	AGGCTTTTGTACTGAGGGACCACACAGGCTTCTTGCCCTACGAGTACATGGCGAATGGGTC	368

ภาพที่ 15 (ต่อ)

L1	GCTGGATAAGTGGATTTTCCATTCTAAAGAAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAG	414
L58	GCTGGATAAGTGGATTTTCCATTCTAAAGAAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAG	415
E144	GCTGGATAAGTGGATTTTCCATTCTAAAGAAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAG	412
Nip	GCTGGATAAGTGGATTTTCCATTCTAAAGAAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAG	412
U55	GCTGGATAAGTGGATTTTCCATTCTAAAGAAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAG	418
E132	GCTGGATAAGTGGATTTTCCATTCTAAAGAAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAG	420
Pid2	GCTGGATAAGTGGATTTTCCATTCTAAAGAAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAG	1796
U56	GCTGGATAAGTGGATTTTCCATTCTAAAGAAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAG	419
S108	GCTGGATAAGTGGATTTTCCATTCTAAAGAAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAG	417
E111	GCTGGATAAGTGGATTTTCCATTCTAAAGAAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAG	400
U57	GCTGGATAAGTGGATTTTCCATTCTAAAGAAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAG	417
U46	GCTGGATAAGTGGATTTTCCATTCTAAAGAAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAG	428

L1	GTTTAAACATTGCGCTTGGAAACGGCAAAGGGATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTTC	474
L58	GTTTAAACATTGCGCTTGGAAACGGCAAAGGGATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTTC	475
E144	GTTTAAACATTGCGCTTGGAAACGGCAAAGGGATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTTC	472
Nip	GTTTAAACATTGCGCTTGGAAACGGCAAAGGGATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTTC	472
U55	GTTTAAACATTGCGCTTGGAAACGGCAAAGGGATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTTC	478
E132	GTTTAAACATTGCGCTTGGAAACGGCAAAGGGATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTTC	480
Pid2	GTTTAAACATTGCGCTTGGAAACGGCAAAGGGATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTTC	1856
U56	GTTTAAACATTGCGCTTGGAAACGGCAAAGGGATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTTC	479
S108	GTTTAAACATTGCGCTTGGAAACGGCAAAGGGATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTTC	477
E111	GTTTAAACATTGCGCTTGGAAACGGCAAAGGGATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTTC	460
U57	GTTTAAACATTGCGCTTGGAAACGGCAAAGGGATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTTC	477
U46	GTTTAAACATTGCGCTTGGAAACGGCAAAGGGATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTTC	488

L1	GAAGATTGTACACTGTGACATTAAAGCCTGAGAATGTTCTACTTGACGACAACTTCATCGC	534
L58	GAAGATTGTACACTGTGACATTAAAGCCTGAGAATGTTCTACTTGACGACAACTTCATCGC	535
E144	GAAGATTGTACACTGTGACATTAAAGCCTGAGAATGTTCTACTTGACGACAACTTCATCGC	532
Nip	GAAGATTGTACACTGTGACATTAAAGCCTGAGAATGTTCTACTTGACGACAACTTCATCGC	532
U55	GAAGATTGTACACTGTGACATTAAAGCCTGAGAATGTTCTACTTGACGACAACTTCATCGC	538
E132	GAAGATTGTACACTGTGACATTAAAGCCTGAGAATGTTCTACTTGACGACAACTTCATCGC	540
Pid2	GAAGATTGTACACTGTGACATTAAAGCCTGAGAATGTTCTACTTGACGACAACTTCATCGC	1916
U56	GAAGATTGTACACTGTGACATTAAAGCCTGAGAATGTTCTACTTGACGACAACTTCATCGC	539
S108	GAAGATTGTACACTGTGACATTAAAGCCTGAGAATGTTCTACTTGACGACAACTTCATCGC	537
E111	GAAGATTGTACACTGTGACATTAAAGCCTGAGAATGTTCTACTTGACGACAACTTCATCGC	520
U57	GAAGATTGTACACTGTGACATTAAAGCCTGAGAATGTTCTACTTGACGACAACTTCATCGC	537
U46	GAAGATTGTACACTGTGACATTAAAGCCTGAGAATGTTCTACTTGACGACAACTTCATCGC	548

L1	AAAGGTATCTGATTTTGGCCTTGCCAAAGTTGATGACCAAGGAGCAGAGCCATGTTTTTCAC	594
L58	AAAGGTATCTGATTTTGGCCTTGCCAAAGTTGATGACCAAGGAGCAGAGCCATGTTTTTCAC	595
E144	AAAGGTATCTGATTTTGGCCTTGCCAAAGTTGATGACCAAGGAGCAGAGCCATGTTTTTCAC	592
Nip	AAAGGTATCTGATTTTGGCCTTGCCAAAGTTGATGACCAAGGAGCAGAGCCATGTTTTTCAC	592
U55	AAAGGTATCTGATTTTGGCCTTGCCAAAGTTGATGACCAAGGAGCAGAGCCATGTTTTTCAC	598
E132	AAAGGTATCTGATTTTGGCCTTGCCAAAGTTGATGACCAAGGAGCAGAGCCATGTTTTTCAC	600
Pid2	AAAGGTATCTGATTTTGGCCTTGCCAAAGTTGATGACCAAGGAGCAGAGCCATGTTTTTCAC	1976
U56	AAAGGTATCTGATTTTGGCCTTGCCAAAGTTGATGACCAAGGAGCAGAGCCATGTTTTTCAC	599
S108	AAAGGTATCTGATTTTGGCCTTGCCAAAGTTGATGACCAAGGAGCAGAGCCATGTTTTTCAC	597
E111	AAAGGTATCTGATTTTGGCCTTGCCAAAGTTGATGACCAAGGAGCAGAGCCATGTTTTTCAC	580
U57	AAAGGTATCTGATTTTGGCCTTGCCAAAGTTGATGACCAAGGAGCAGAGCCATGTTTTTCAC	597
U46	AAAGGTATCTGATTTTGGCCTTGCCAAAGTTGATGACCAAGGAGCAGAGCCATGTTTTTCAC	608

ภาพที่ 15 (ต่อ)

L1	TACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC	654
L58	TACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC	655
E144	TACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC	652
Nip	TACGCTCAGAGGCACGCGCGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC	652
U55	TACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC	658
E132	TACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC	660
Pid2	TACGCTCAGAGGCACGCGCGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC	2036
U56	TACGCTCAGAGGCACGCGCGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC	659
S108	TACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC	657
E111	TACGCTCAGAGGCACGCGCGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC	640
U57	TACGCTCAGAGGCACGCGCGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC	657
U46	TACGCTCAGAGGCACGCGCGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC	668

L1	AGAGAAGAGTGATGTGTACAGCTACGGCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAA	714
L58	AGAGAAGAGTGATGTGTACAGCTACGGCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAA	715
E144	AGAGAAGAGTGATGTGTACAGCTACGGCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAA	712
Nip	AGAGAAGAGTGATGTGTACAGCTACGGCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAA	712
U55	AGAGAAGAGTGATGTGTACAGCTACGGCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAA	718
E132	AGAGAAGAGTGATGTGTACAGCTACGGCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAA	720
Pid2	AGAGAAGAGTGATGTGTACAGCTACGGCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAA	2096
U56	AGAGAAGAGTGATGTGTACAGCTACGGCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAA	719
S108	AGAGAAGAGTGATGTGTACAGCTACGGCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAA	717
E111	AGAGAAGAGTGATGTGTACAGCTACGGCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAA	700
U57	AGAGAAGAGTGATGTGTACAGCTACGGCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAA	717
U46	AGAGAAGAGTGATGTGTACAGCTACGGCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAA	728

L1	GAGCTACGATCCCTCGGAGATCTCCGAGAAGGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAA	774
L58	GAGCTACGATCCCTCGGAGATCTCCGAGAAGGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAA	775
E144	GAGCTACGATCCCTCGGAGATCTCCGAGAAGGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAA	772
Nip	GAGCTACGATCCCTCGGAGATCTCCGAGAAGGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAA	772
U55	GAGCTACGATCCCTCGGAGATCTCCGAGAAGGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAA	778
E132	GAGCTACGATCCCTCGGAGATCTCCGAGAAGGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAA	780
Pid2	GAGCTACGATCCCTCGGAGATCTCCGAGAAGGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAA	2156
U56	GAGCTACGATCCCTCGGAGATCTCCGAGAAGGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAA	779
S108	GAGCTACGATCCCTCGGAGATCTCCGAGAAGGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAA	777
E111	GAGCTACGATCCCTCGGAGATCTCCGAGAAGGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAA	760
U57	GAGCTACGATCCCTCGGAGATCTCCGAGAAGGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAA	777
U46	GAGCTACGATCCCTCGGAGATCTCCGAGAAGGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAA	788

L1	GCTGGAGGAAGGTGATCTTCAGGACATCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGA	834
L58	GCTGGAGGAAGGTGATCTTCAGGACATCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGA	835
E144	GCTGGAGGAAGGTGATCTTCAGGACATCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGA	832
Nip	GCTGGAGGAAGGCGATCTTCAGGACATCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGA	832
U55	GCTGGAGGAAGGTGATCTTCAGGACATCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGA	838
E132	GCTGGAGGAAGGTGATCTTCAGGACATCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGA	840
Pid2	GCTGGAGGAAGGCGATCTTCAGGACATCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGA	2216
U56	GCTGGAGGAAGGCGATCTTCAGGACATCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGA	839
S108	GCTGGAGGAAGGTGATCTTCAGGACATCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGA	837
E111	GCTGGAGGAAGGCGATCTTCAGGACATCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGA	820
U57	GCTGGAGGAAGGCGATCTTCAGGACATCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGA	837
U46	GCTGGAGGAAGGCGATCTTCAGGACATCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGA	848

ภาพที่ 15 (ต่อ)

```

L1      TGGG-CGGGTGAGACCGCGATCAAGGTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTCCC 893
L58     TGGGGCGGGTCGAGACCGCGATCAAGGTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACC 895
E144    TGGG-CGGGTGAGACCGCGATCAAGGTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACC 891
Nip     TGGG-CGGGTGAGACCGCGATCAAGGTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACC 891
U55     TGGG-CGGGTGAGACCGCGATCAAGGTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACC 897
E132    TGGG-CGGGTGAGACCGCGATCAAGGTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACC 899
Pid2    TGGG-CGGGTGAGACCGCGATCAAGGTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACC 2275
U56     TGGG-CGGGTGAGACCGCGATCAAGGTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACC 897
S108    TGGG-CGGGTGAGACCGCGATCAAGGTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACC 896
E111    TGGG-CGGGTGAGACCGCGATCAAGGTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACC 879
U57     TGGG-CGGGTGAGACCGCGATCAAGGTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACC 896
U46     TGGG-CGGGTGAGACCGCGATCAAGGTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACC 907
      ***

```

ภาพที่ 15 (ต่อ)

```

Pid2    TACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC 2036
L1      TACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC 654
L58     TACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC 655
E144    TACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC 652
U55     TACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC 658
E132    TACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC 660
S108    TACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC 657
U56     TACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC 659
E111    TACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC 640
U57     TACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC 657
U46     TACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC 668
Nip     TACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTC 652
      *****

```

ภาพที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่ได้จากการทำ sequence alignments ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีอัลลีลของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* กับตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีอัลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pid2* เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ *Pid2* ที่มีรายงานกรอบสีเขียวแสดง A/G SNP site ในตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* พันธุ์ข้าวที่มีอัลลีลของยีนต้านทาน *Pid2*; L1 = เก้ารวง 17-2-106, L58 = คอสามเดือน, E132 = เหนียวบายสี, E144 = พวงเงิน, U55 = เหลืองลิซอ, S108 = นางรอง พันธุ์ข้าวที่มีอัลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทาน *Pid2*; Nip = นิปปอนบาร, U46 = จะนอไหนด, U56 = ข้าวแดง (TRI 8409149), U57 = ข้าวมันหนู, E111 = พญาชม

ผลจากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9*, *Pi36* และ *Pid2* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 203 ตัวอย่าง จะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไปในอนาคตเนื่องจากเราได้ทราบแล้วว่า ข้าวพันธุ์พื้นเมืองพันธุ์ใดบ้างที่มียีนต้านทานโรคไหม้ และเป็นพันธุ์พื้นเมืองมาจากภาคใดของประเทศ ดังนั้นเราจึงสามารถนำเอาข้าวพันธุ์พื้นเมืองเหล่านี้ ที่มียีนต้านทานโรคไหม้มาเป็นพ่อแม่พันธุ์แม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของไทยให้ต้านทานโรคไหม้ และเพื่อความสะดวกหรือเพื่อเพิ่มความมั่นใจมากยิ่งขึ้นในการนำพันธุกรรมดังกล่าวไปใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้ เราจำเป็นต้องทำการตรวจสอบความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ของข้าวพื้นเมืองดังกล่าวกับเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทยที่มีความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมต่อไปในอนาคต



**ส่วนที่สอง การศึกษาปฏิบัติการตอบสนองทางโรคลาใบไหม้ของข้าวพันธุ์นิปปอนบาระ ที่มียีน
ต้านทานโรคลาใบไหม้ *Pi9* (Nipponbare *Pi9*) ต่อเชื้อราโรคลาใบไหม้ในประเทศไทย
จำนวน 8 ไอโซเลต**

สำหรับยีนต้านทานโรคลาใบไหม้ *Pi9* มีตำแหน่งอยู่ที่บริเวณเซนโตรเมียร์ของโครโมโซมข้าว
คู่ที่ 6 (Liu *et al.*, 2002) โดยยีน *Pi9* ถูกถ่ายทอดมาจากข้าวป่า (*Oryza minuta*: $2n=4x=48$)
(Amante-Bordeos *et al.*, 1992) ยีนต้านทาน *Pi9* นี้ สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคลาใบไหม้สายพันธุ์
ต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวาง (broad-spectrum resistance) ตัวอย่างเช่น ยีนต้านทาน *Pi9* ในข้าวสาย
พันธุ์ 127-1-75 ได้รับการทดสอบกับเชื้อราโรคลาใบไหม้ 121 ไอโซเลต จาก 9 ประเทศ โดยไม่พบสาย
พันธุ์เชื้อราโรคลาใบไหม้ที่สามารถก่อโรคได้ นอกจากนี้ ได้ทำการทดสอบเชื้อราโรคลาใบไหม้ 100 ไอโซเลต
ของประเทศฟิลิปปินส์ ที่สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (The International Rice Research Institute,
IRRI) ก็ไม่พบสายพันธุ์เชื้อราโรคลาใบไหม้ที่สามารถก่อโรคได้ Liu และคณะ (2002) ได้ทำการทดสอบ
สายพันธุ์เชื้อราโรคลาใบไหม้อีก 43 สายพันธุ์ จาก 13 ประเทศ ก็ไม่พบสายพันธุ์เชื้อราโรคลาใบไหม้สายพันธุ์
ใดที่สามารถก่อโรคกับข้าวสายพันธุ์ 127-1-75 ที่มียีนต้านทาน *Pi9* ได้

จากการศึกษาปฏิบัติการตอบสนองทางโรคลาใบไหม้ของข้าวพันธุ์นิปปอนบาระ ที่มียีน
ต้านทานโรคลาใบไหม้ *Pi9* (Nipponbare *Pi9*) ข้าวนิปปอนบาระ และข้าวขาวดอกมะลิ 105 ต่อเชื้อราโรคลา
ใบไหม้ในประเทศไทยจำนวน 8 ไอโซเลต ที่เก็บตัวอย่างมาจากพื้นที่ในประเทศไทย พบว่าข้าว
นิปปอนบาระที่มียีนต้านทานโรคลาใบไหม้ *Pi9* สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคลาใบไหม้ ไอโซเลต BAG 8.5
เมื่อเปรียบเทียบการเกิดโรคกับข้าวนิปปอนบาระที่เป็นข้าวพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่ไม่ต้านทาน
ต่อเชื้อราโรคลาใบไหม้ (susceptible check variety) อีก 7 ไอโซเลต ที่เหลือ พบว่าไม่สามารถก่อให้เกิด
โรคลาใบไหม้ได้ทั้งข้าวนิปปอนบาระ ที่มียีนต้านทานโรคลาใบไหม้ *Pi9* และข้าวนิปปอนบาระที่เป็นข้าว
พันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่ไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคลาใบไหม้ (susceptible check variety) จึงเป็นที่
น่าสนใจว่าเชื้อราโรคลาใบไหม้ *M. grisea* 7 ไอโซเลต ที่เหลือไม่สามารถก่อให้เกิดโรคลาใบไหม้ในข้าว
นิปปอนบาระที่เป็นข้าวพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่ไม่มียีนต้านทานต่อเชื้อราโรคลาใบไหม้ได้ ซึ่งเป็นที่
ทราบกันว่าข้าวนิปปอนบาระเป็นข้าวพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่ไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคลาใบไหม้และ
มักใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่ไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคลาใบไหม้ (universal susceptible check
variety) ในห้องปฏิบัติการในต่างประเทศ

จากการศึกษาที่ผ่านมามักจะใช้ข้าวนิปปอนบาเรเป็นตัวเปรียบเทียบการศึกษาปฏิกิริยาการตอบทางโรคไหม้และให้ผลไม่ด้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ นอกจากนี้เพื่อการยืนยันผลการศึกษาว่าเชื้อราโรคไหม้ทั้ง 8 ไอโซเลท สามารถก่อโรคได้จริงหรือไม่ จึงได้ทดสอบเชื้อราโรคไหม้กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ไปในคราวเดียวกัน เป็นที่ทราบกันดีว่าข้าวขาวดอกมะลิ 105 ของไทยนั้นไม่ด้านทานโรคไหม้ (กรมวิชาการเกษตร, 2535) โดยใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบต่อการไม่ด้านทานโรคไหม้และเชื้อราโรคไหม้ทั้ง 8 ไอโซเลทได้เก็บตัวอย่างที่ก่อโรคมจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ทั้งหมด จึงยืนยันได้ว่าขั้นตอนการศึกษาทุกขั้นตอนไม่เกิดการผิดพลาด

จากการทดสอบการเกิดโรคใบไหม้พบว่า ข้าวขาวดอกมะลิ 105 สามารถด้านทานต่อเชื้อราโรคใบไหม้ระดับปานกลาง ได้ 3 ไอโซเลท คือ BAG 2.4, BAG 3.5 และ BAG 4.4 อีก 4 ไอโซเลทไม่สามารถด้านทานได้ต่อเชื้อราโรคใบไหม้ดังตารางที่ 12 และ ภาพที่ 17 การทดลอง มีวัตถุประสงค์ต้องการที่จะทราบว่า ยีนด้านทานโรคไหม้ *Pi9* ที่สามารถด้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้อย่างกว้างขวางอย่างที่ได้อศึกษาก่อนหน้านี้ในต่างประเทศนั้นสามารถที่จะด้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทยได้หรือไม่ แต่เป็นที่น่าเสียดายเนื่องจากผลการทดลองที่ได้พบว่าเชื้อราโรคไหม้จากประเทศไทย จำนวน 7 ไอโซเลท ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคใบไหม้ในข้าวนิปปอนบาเรที่ใช้เป็นพันธุ์ข้าวเปรียบเทียบมาตรฐานที่ไม่ด้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ (susceptible check variety) มีเพียง 1 ไอโซเลท (BAG 8.5) เท่านั้นที่สามารถก่อให้เกิดโรคใบไหม้ในข้าวพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานได้ จากผลการศึกษาจึงยังสรุปไม่ได้ว่าข้าวที่มียีนด้านทาน *Pi9* สามารถด้านทานเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทยได้แบบกว้างขวาง (broad-spectrum resistance) หรือไม่เนื่องจากข้าวนิปปอนบาเรที่เป็นตัวอ้างอิงกลับไม่สามารถก่อให้เกิดโรคใบไหม้ได้เช่นกัน แต่จากผลการศึกษาที่ได้ก็ทำให้ทราบว่า เชื้อราโรคไหม้ 1 ไอโซเลท จากประเทศไทยก็ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคไหม้ในข้าวที่มียีนด้านทาน *Pi9* ได้ คือ ไอโซเลท BAG 8.5 เนื่องจากเชื้อราโรคไหม้อไอโซเลทนี้สามารถก่อให้เกิดโรคใบไหม้อย่างรุนแรงในข้าวพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานได้แต่กลับไม่ก่อให้เกิดโรคใบไหม้ในข้าวที่มียีนด้านทาน *Pi9*

จากการศึกษาของ Ribot และคณะ (2007) ข้าวนิปปอนบาเรซึ่งเป็นข้าว Japonica นั้นไม่ด้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ ไอโซเลท FR13 และข้าวสายพันธุ์ IR64 ซึ่งเป็นข้าว Indica จะไม่ด้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้อไอโซเลท HP14 สำหรับ *M. grisea* ไอโซเลท CL26 สามารถก่อโรคไหม้ได้ทั้งข้าวนิปปอนบาเรและข้าวสายพันธุ์ IR64 จากการศึกษาก่อนหน้านี้ทำให้ทราบว่า เชื้อ *M. grisea* แต่ละไอโซเลทมีความจำเพาะเจาะจงในการเข้าทำลายข้าว ซึ่งอาจจะเป็น ข้าว Indica

หรือ ข้าวจําปอนิกา เชื้อบางไอโซเลท สามารถเข้าทำลายได้ทั้งข้าวอินดิกาและข้าวจําปอนิกา แต่การศึกษาในครั้งนี้เชื้อก่อโรคใหม่ทั้ง 8 ไอโซเลทเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคไหม้ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวอินดิกา อาจจะต้องมีการทดสอบปฏิกิริยาการเกิดโรคใบไหม้กับเชื้อก่อโรคใหม่ที่ สามารถก่อโรคไหม้ได้ทั้งข้าวอินดิกาและจําปอนิกาเช่น *M. grisea* ไอโซเลท CL26



ตารางที่ 12 ผลการศึกษาปฏิบัติการตอบสนองทางโรคใบไหม้ของข้าวนิปอนบาเร่ที่มียืนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ต่อเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทย
จำนวน 8 ไอโซเลต

ตัวอย่างข้าว	ไอโซเลตเชื้อราโรคไหม้ (<i>M.grisea</i>)							
	BAG 1.4	BAG 2.4	BAG 3.5	BAG 4.4	BAG 5.4	BAG 7.2	BAG 8.5	BAG 9.2
ข้าวนิปอนบาเร่	R	R	R	R	R	R	S	R
ข้าวนิปอนบาเร่(<i>Pi9</i>)	R	R	R	R	R	R	R	R
ข้าวขาวดอกมะลิ 105	S	MR	MR	MR	S	S	S	S

หมายเหตุ R คือ ข้าวมีความต้านทานต่อโรคได้ดี, MR คือ ข้าวมีความต้านทานต่อโรกระดับปานกลาง, S คือ ข้าวไม่มีความต้านทานต่อโรค



ภาพที่ 17 ผลการศึกษาปฏิบัติการตอบสนองทางโรคใบไหม้ของข้าวนิปอนบาเร่ที่มียืน
ต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ต่อเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทย จำนวน 8 ไอโซเลต
1 คือ ข้าวนิปอนบาเร่ 2 คือ ข้าวนิปอนบาเร่ที่มียืนต้านทาน *Pi9*
3 คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML105)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. จากการค้นหาอินที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรคเชื้อราไหม้ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย จำนวน 203 พันธุ์ ประกอบด้วย ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 19 พันธุ์ ข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 40 พันธุ์ ข้าวขึ้นน้ำพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 45 พันธุ์ และข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 99 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อยีนต้านทานโรคไหม้ 3 ตำแหน่งคือ *Pi9*, *Pi36* และ *Pid2* ผลจากการตรวจสอบพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ในข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ 16 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ 1 พันธุ์ ข้าวขึ้นน้ำพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 14 พันธุ์ และข้าวพื้นเมืองนาสวนภาคอีสาน 33 พันธุ์ ตรวจสอบพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* ในข้าวพื้นเมืองภาคใต้ 13 พันธุ์ ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองอีสาน 1 พันธุ์ และข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3 พันธุ์ และ ตรวจสอบพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* ในข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ 5 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ 39 พันธุ์ ข้าวขึ้นน้ำพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 32 พันธุ์ และข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 67 พันธุ์ โดยปกติยีนต้านทานโรคไหม้จะสูญเสียความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อ *M. grisea* เมื่อเวลาผ่านไป เนื่องจากความหลากหลายของเชื้อก่อโรคและวิวัฒนาการ วิธีการหนึ่งที่จะเอาชนะปัญหานี้คือ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มียีนต้านทานหลายยีนในข้าวหนึ่งสายพันธุ์เพื่อให้สามารถต้านทานเชื้อ *M. grisea* ได้หลากหลายไอโซเลต (Bonman *et al.* 1992) ดังนั้นการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ตัวใหม่ๆ ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจึงเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการพิจารณาคัดเลือกพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของไทยให้ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ที่มีความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมสูงและเป็นข้อมูลในการเก็บรักษาพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีลักษณะที่ดีเอาไว้

2. การศึกษาปฏิบัติการตอบสนองทางโรคใบไหม้ของข้าวนิปปอนบาร (Nipponbare) ที่มีต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ต่อเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทย จำนวน 8 ไอโซเลต พบว่าข้าวนิปปอนบาร (Nipponbare *Pi9*) ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ BAG 8.5 ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวนิปปอนบารที่ไม่มียีนต้านทานโรคไหม้ (susceptible check) ส่วนอีก 7 ไอโซเลตที่เหลือ ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคใบไหม้ได้ทั้งในข้าวนิปปอนบารที่มีต้านทานโรคไหม้ *Pi9* และข้าวนิปปอนบารที่ไม่มียีนต้านทานโรคไหม้ จึงสรุปได้ว่าอย่างน้อยข้าวนิปปอน

บารุ (Nipponbare) ที่มียืนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ BAG 8.5 จากประเทศไทยได้ แต่ผลการศึกษายังสรุปไม่ได้ว่าข้าวที่มียืนต้านทาน *Pi9* สามารถต้านทานเชื้อราโรคไหม้ในประเทศได้แบบกว้างขวาง (broad-spectrum resistance)

ข้อเสนอแนะ

1. การค้นหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรคเชื้อราไหม้ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยในแต่ละยีนนั้นควรมีข้าวพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่มียืนต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ (resistance check variety) เพื่อที่จะใช้เป็นตัวแทนเปรียบเทียบรูปแบบอัลลีลกับตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมือง เนื่องจากศึกษาครั้งนี้ยังขาดข้าวพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่มียืนต้านทาน ดังนั้นจึงทำการยืนยันผลโดยการเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่ไม่มียืนต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ (susceptible check variety) อ้างอิงเอกสารที่มีการเผยแพร่ในฐานข้อมูลต่าง และทำการยืนยันผลขั้นสุดท้ายด้วยการส่งสุ่มตัวอย่างไปหาลำดับเบส

2. การศึกษาปฏิบัติการตอบสนองทางโรคไหม้ของข้าวพันธุ์นิปปอนบารุ (Nipponbare) ที่มีต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ต่อเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทยจำนวน 8 ไอโซเลทพบว่าข้าวพันธุ์นิปปอนบารุ (Nipponbare) ที่มียืนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้ทั้ง 8 ไอโซเลท และข้าวพันธุ์นิปปอนบารุที่เป็นข้าวพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่ไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ (susceptible check variety) พบว่าสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้ 7 ไอโซเลท เหมือนกัน ซึ่งผลที่คาดว่าจะเป็นคือข้าวพันธุ์นิปปอนบารุที่เป็นข้าวพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่ไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้นั้นจะต้องไม่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้ แต่การศึกษาในครั้งนี้เชื้อก่อโรคไหม้ทั้ง 8 ไอโซเลทเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคไหม้ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวอินดิกา สำหรับการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคตนั้น อาจจะต้องมีการทดสอบปฏิบัติการเกิดโรคไหม้กับเชื้อก่อโรคไหม้ที่สามารถก่อโรคไหม้ได้ทั้งข้าวอินดิกาและจำปอนิกา เช่น *M. grisea* ไอโซเลท CL26 และในการทดลองครั้งต่อไปหากสามารถเพิ่มจำนวนไอโซเลทของเชื้อรา *M. grisea* จะเป็นการยืนยันผลได้อย่างแม่นยำว่าข้าวที่มีต้านทานโรคไหม้ *Pi9* นั้น สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้อย่างกว้างขวาง (broad-spectrum resistance) ดังการศึกษาที่ผ่านมา

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

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

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

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

ชัชวาล จันทราสุริยรัตน์ และ สุริพร เกตุงาม. 2552. โรคไหม้ในข้าวและสถานการณ์ปัจจุบัน
ของงานวิจัยด้านยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าว. วารสารแก่นเกษตร. 37: 69-78.

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

ผู้จัดการASTV. 2553. กรุงเทพฯ: 24 กันยายน 2553. หน้า 7.

ภัทรดา ฤทธิ์แดง และ กมลพร สิทธิชัย. 2552. ข้าวพื้นเมือง ข้าวแท้ ของไทย. แหล่งที่มา:
[http://www.bangkokbiznews.com/home/detail/life-style/lifestyle/20090126/10234/ข้าว
พื้นเมือง-ข้าวแท้-ของไทย.html](http://www.bangkokbiznews.com/home/detail/life-style/lifestyle/20090126/10234/ข้าวพื้นเมือง-ข้าวแท้-ของไทย.html), 26 มกราคม 2553.

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

ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว. 2549. **Rice Science Center**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต
กำแพงแสน, นครปฐม

สมคิด ดิสถาพร, อรุณี สุรินทร์, พากเพียร อรัญนารถ, อรพิน ถิระวัฒน์, เจริญ จินเจียม และ
 พิระ นิยมจันทร์. 2542. โรคไหม้ของข้าว. กองป้องกันและกำจัดศัตรูพืช กรมส่งเสริม
 การเกษตร, กรุงเทพฯ.

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

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

สมาคมเมล็ดพันธุ์แห่งประเทศไทย. 2549. พันธุ์ข้าวลูกผสม เพื่อข้าวไทยก้าวทันโลก. ข้าวสาร
 เมล็ดพันธุ์พืช. 13: 3-12.

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

สุกัญญา ภัทราชัย. 2536. แม่โพสพ เทวีแห่งข้าว, น.129-131. ใน สำนักงานคณะกรรมการ
 วัฒนธรรมแห่งชาติ. ข้าวกับวิถีชีวิตไทย. แหล่งที่มา:
<http://www.culture.go.th/knowledge/story/rice/file01.htm>, 25 ตุลาคม 2553.

สุริพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัย
 อุบลราชธานี. 2: 47-59.

อภิชาติ วรรณวิจิตร. ม.ป.ป. ชีวโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์พืช. ม.ป.ท.

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

- Amante-Bordeos, A., L.A. Sitch, R. Nelson, R.D. Damacio and N.P. Oliva. 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.
- Arumuganathan, K. and E.D. Earle. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molec. Biol. Rptr.** 9: 208-218.
- 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.
- Boman, J.M., G.S. Khush and R. Nelson. 1992. Breeding rice for resistance to pests. **Annu. Rev. Phytopathol.** 30: 507-528.
- Braun, E.J. and R.J. Howard. 1994. Adhesion of *Cochliobolus heterostrophus* conidia and germings to leaves and artificial surfaces. **Exp. Mycol.** 18: 211-220.
- Bryan, G.T., K. Wu, L. Farrall, Y. Jia, H.P. Hershey, S.A. McAdams, K.N. Faulk, G.K. Donaldson, R. Tarchini and Valent, B. 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 , S., L. Wang, Z. Que, R. Pan and Q. 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: 1563-70.
- 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 B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. **Plant J.** 46: 794-804.
- Chen, X.W., S.G. Li and J.C. Xu. 2004. Identification of two blast resistance genes in a rice variety, Digu. **Phytopathol J.** 152: 77-85.
- Chu, Z., M. Yuan, J. Yao, X. Ge, B. Yuan, C. Xu, X. Li, B. Fu, Z. Li, Z.L. Bennetzen, Q. Zhang and S. Wang. 2006. Promoter mutation of an essential gene for pollen development results in disease resistance in rice. **Genes Dev.** 20: 1250-1255.
- 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.
- 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.
- Dean, R.A., N.J. Talbot, D.J. Ebbol, 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.

- Fjellstrom, R., C.A. Conaway-Bormans, A.M. McClung, 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.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. **Phytopathology** 9: 275-296.
- Grodzicker, T., Williams, P. Sharp and J. Sambrook. 1975. Physical mapping of temperature sensitive mutants of adenovirus. **Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.** 39: 439-446.
- Gu, K., B. Yang, D. Tian, L. Wu, D. Wang, C. Sreekala, F. Yang, Z. Chu, G. Wang, F.F. White and Z. Yin. 2005. R gene expression induced by a type-II effector triggers disease resistance in rice. **Nature** 435: 1122-1125.
- Hammond-Kosack, K.E. and J.D.G.Jones. 1997. Plant disease resistance genes. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.** 48: 575-607
- Harlan, J.R. 1992. **Crop & Man.** 2nd ed. Madison. Wisconsin, USA.
- Hayashi, K., N. Hashimoto, M. Daigen and I. Ashikawa. 2004. Development of PCR based SNP markers for rice blast. **Theor. Appl. Genet.** 108: 1212-1220.
- Hwang, M.S., R.L. Morgan, P.W. Wang and D.S. Guttman. 2005. Phylogenetic characterization of virulence and resistance phenotypes of *Pseudomonas syringae*. **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 5182-5191.
- Jia, Y.L., S.A. McAdams, G.T. Bryan. 2000. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. **EMBO J.** 19: 4004-4014.

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.

Kim, S.A. and Y.H. Lee. 2002. Analysis of genes expressed during rice-*Magnaporthe grisea* interaction. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 14: 1340-1346.

Kiyosawa, S. 1967. Studies on inheritance of resistance of rice varieties to blast, 3. Inheritance of resistance of rice variety Pi No. I to the blast fungus. **Jpn. J. Breed.** 16: 243-250.

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

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.

Leister, R.T. and F. Katagiri. 2000. A resistance gene product of the nucleotide binding site leucine rich repeats class can form a complex with bacterial avirulence proteins in vivo. **Plant J.** 22: 345-354.

Lin, F., S. Chen, Z. Que., L. Wang., X. Liu and Q. Pan. 2007. The blast resistance gene *Pi37* encodes a nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a resistance gene cluster on rice chromosome 1. **Genetics** 177: 1871-1880.

Liu, G., G. Lu, L. Zen and G.L. Wang. 2002. Two broad-spectrum blast resistance genes, *Pi9(t)* and *Pi2(t)*, are physically linked on rice chromosome 6. **Mol. Genet. Genomics** 267: 472-480.

Liu, X., L. Wang, S. Chen, F. Lin and Q. Pan. 2005. Genetic and physical mapping of *Pi36(t)*, a novel rice blast resistance gene located on rice chromosome 8. **Mol. Genet. Genomics** 274: 394-401.

- Liu, X., F. Lin, L. Wang and Pan, Q. 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.
- Iyer, A.S and S.R. McCouch. 2004. The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. **Mol. Plant Microbe Interact.** 17: 1348-1354.
- 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.
- Menden, K., M. Hahn and H. Deising. 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. **Annu. Rev. Phytopathol.** 34: 367-386.
- Morris, L., J.C. Fernando, S.Z. Robert, X. Shizong, and E.H. John. 1993. Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. **Phytopathology** 83 : 1427-1433.
- Olson, M., L. Hood, C. Cantor and D. Botstein. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. **Science** 245: 1434-1435.

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 Breeding 117: 27-31.

Parveliet, J.E. 1979. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development.

Ann. Rev. Phytopath. 1: 203-222.

Qu, S.H. 1985. Pathogen variability and host resistance in rice blast disease.

Ann. Rev. Phytopathol. 18: 167-187.

Qu, S., G. Liu, B. Zhou, M. Bellizzi, L. Zeng, L. Dai, B. Han and G.L. Wang. 2006. The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice. **Genetics** 172: 1901-1914.

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.

Roumen, E., M. Levy and J.L. Nottogham. 1997. Characterization of the European pathogen population of *Magnaporthe grisea* by DNA fingerprinting and pathotype analysis.

European J. Pl. Path. 103: 363-371.

Roy, A., N. Frascaria, J. Mackay and J. Bousquet. 1992. Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*.

TAG Theoretical and applied Genetics 103: 363-371.

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

- Sharma ,T.M., B. Madhav, P. Singh, T. Shanker, V. Jana, A. Dalal, A. Pandit, K. Singh, H. Gaik and N. Singh. 2005. High-resolution mapping, cloning and molecular characterization of the *Pi-kh* gene of rice, which confer resistance to *Magnaporthe grisea*. **Molecular Genetics and Genomics** 274: 569-578.
- 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: Chiang Mai University and Phitsanulok Rice Research Center.
- Sobrizal, S. 2007. Rice blast disease in Indonesia. *In* **Japan International Researcher Center for agricultural sciences (JIRCAS), Tsukuba, Japan Working Report**. 53: 71-79.
- Song, S.Y., G.L. Wang, L.L. Chen, H.S. Kim, L.Y. Pi, T. Holsten, J. Gardner, B. Wang, W.X. Zhai, L.H. Zhu, C. Fauquet and P.C. Ronald. 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. **Science** 270: 1804-1806.
- Sun, G., R. Cai, X. Du, R. Tao and S. Sun. 1999. The directional selection and stabilizing selection from the interaction between rice variety and blast fungus *M. grisea*. **Acta Phtopathologica Sin.** 45: 45-49.
- 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.
- Talbot, N.J. 2003. On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. **Annu. Rev. Microbiol.** 57: 177-202.

- Variar, M. 2007. Pathogenic variation in *Magnaporthe grisea* and breeding for blast resistance in India. *In Japan International Researcher Center for agricultural sciences (JIRCAS), Tsukuba, Japan Working Report.* 58: 87-95.
- 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., 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 the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. **Plant J.** 19: 55-64.
- Widawsky, D.A. and J.C. O'Toole. 1990. **Prioritizing the Rice Biotechnology Research Agenda for Eastern India.** The Rockefeller Foundation, New York.
- Xu, K., X. Xia, T. Fukao, P. Canlas, R. Maghirang-Rodriguez, S. Heuer, A.I. Ismail, J. Bailey-Serres, P.C. Ronald and D.J. Mackill. 2006. *Sub1A* is an ethylene response factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. **Nature** 442: 705-708.
- Yoshimura, S., U. Yamanouchi, Y. Katayose, S. Toki, Z. Wang, I. Kono, N. Kurata, M. Yano, N. Iwata and T. Sasaki. 1998. Expression of *Xa1*, a bacterial blight resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 95: 1663-1668.
- Zeigler, R.S. 1998. Recombination in *Magnaporthe grisea*. **Ann. Rev. Phytopath.** 36: 249-276.

- Zeigler, R.S., R.S., L.X. Cuoc, R.P. Scott, M.A. Bernardo, D.H. Chen, B. Valent. and R.J. Nelson. 1995. The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. **Phytopathology** 5: 443-451.
- Zhou, B., S. Qu, G. Liu, M. Dolan, H. Sakai, G. Lu, M. Bellizzi and G.L. Wang. 2006. The eight amino acid differences within three leucine-rich repeats between *Pi2* and *Piz-t* resistance proteins determine the resistance specificity *Magnaporthe grisea*. **Mol. Plant Microbe Interact.** 19: 1216–1228.





1. Extraction buffer

ประกอบด้วย

1M Tris-HCl pH 8.0

0.5M EDTA pH 8.0

5M NaCl

CTAB

β -mercaptoethanol

ขั้นตอนการเตรียม

ตวงสารต่างๆให้ได้ปริมาณดังต่อไปนี้

1M Tris-HCL pH 8.0	ปริมาตร 10	มิลลิลิตร
--------------------	------------	-----------

0.5M EDTA pH 8.0	ปริมาตร 4	มิลลิลิตร
------------------	-----------	-----------

5m NaCl	ปริมาตร 28	มิลลิลิตร
---------	------------	-----------

CTAB	2 กรัม	
------	--------	--

β -mercaptoethanol	ปริมาตร 2	มิลลิลิตร
--------------------------	-----------	-----------

ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ น้ำ sterile

2. สารละลาย 1 M Tris base

ขั้นตอนการเตรียม

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

3. สารละลาย 0.1 N HCl

สารตั้งต้นมีความเข้มข้นเท่ากับ 12.08 N

จาก $C_1 V_1 = C_2 V_2$

$(12.08 \text{ N}) V_1 = (0.1 \text{ N})(100 \text{ มิลลิลิตร})$

$$V_1 = 8.278 \text{ มิลลิลิตร}$$

ตวง HCl 8.278 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติมลงในน้ำกลั่น sterile 91.722 มิลลิลิตร

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 ละลายในน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 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

8. 0.5X buffer (1 ลิตร)

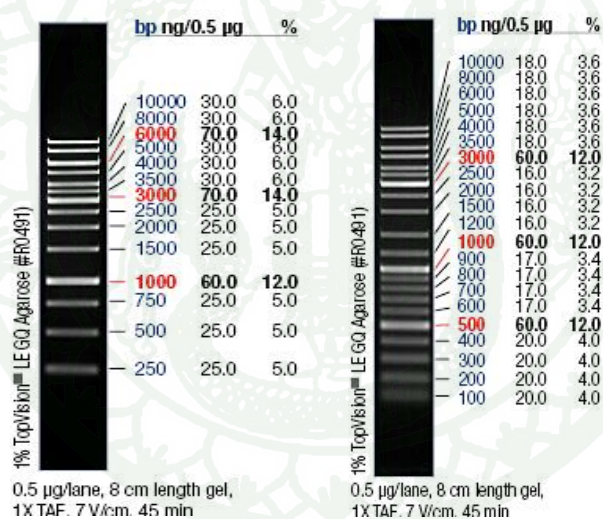
ตวง 10X TBE buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมด้วยน้ำกลั่น sterile ปริมาตร 950 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

9. 6X Gel-loading buffer (10 มิลลิลิตร)

Bromphenol blue sucrose solution (0.25% (W/V) Bromphenol blue, 80% (W/V) Sucrose in H₂O) ละลาย Bromphenol blue 25 มิลลิกรัม Sucrose 8 กรัม ลงในน้ำกลั่น sterile ปริมาตร 8 มิลลิลิตร หลังละลายแล้ว ทำการปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร

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

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



ก

ข

ภาพผนวกที่ ก1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา

ก คือ Fermentas GeneRuler™ 1 Kb ladder

ข คือ Fermentas GeneRuler™ DNA ladder mix

ภาคผนวก ข

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือน
ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์
ของยีนต้านทาน *Pi9* (DQ285630.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank

Nipponbare (<i>Pi9</i>)	GACTAAGTACTGGCTTCGATACACTCTAATCAAGCAAGTTTAAACCaaaaaaaTACAAT	570
DQ285630.1	GACTAAGTACTGGCTTCGATACACTCTAATCAAGCAAGTTTAAACCAAAAAAATACAAT	22496
Nipponbare (<i>Pi9</i>)	TAAGAGAGGATGCTGGTGATGGCGTTGTTTTGAGTTTGGAGAGGGTCATTATGGAGGATG	630
DQ285630.1	TAAGAGAGGATGCTGGTGATGGCGTTGTTTTGAGTTTGGAGAGGGTCATTATGGAGGATG	22556
Nipponbare (<i>Pi9</i>)	CCATCAGGAAGCCCAACACCGACGGTGTGAGTAACCTTTGGGTTTAGTGGAATCCGGCA	690
DQ285630.1	CCATCAGGAAGCCCAACACCGACGGTGTGAGTAACCTTTGGGTTTAGTGGAATCCGGCA	22616
Nipponbare (<i>Pi9</i>)	AAATCTTGCAAGGTGATTAGTGAGTGAAGCCATTTTCAGTTGGTGCTTTCTTTGATTAT	750
DQ285630.1	AAATCTTGCAAGGTGATTAGTGAGTGAAGCCATTTTCAGTTGGTGCTTTCTTTGATTAT	22676
Nipponbare (<i>Pi9</i>)	CTGATTTTAAACAGATTTTCTTTGTTCAGCATAAGATAGCAGATGACATGAAGTGTGG	810
DQ285630.1	CTGATTTTAAACAGATTTTCTTTGTTCAGCATAAGATAGCAGATGACATGAAGTGTGG	22736
Nipponbare (<i>Pi9</i>)	TATGGGTCATGGGGAAACAGTGCTCAGCATTGCGTCGTCCAAGTCCACAAATGACATG	870
DQ285630.1	TATGGGTCATGGGGAAACAGTGCTCAGCATTGCGTCGTCCAAGTCCACAAATGACATG	22796
Nipponbare (<i>Pi9</i>)	AGCTTGCTGCTGGGAGTGCAGGAGACATGGTAAGCATCTAGCTCCACATAATAAGATTT	930
DQ285630.1	AGCTTGCTGCTGGGAGTGCAGGAGACATGGTAAGCATCTAGCTCCACATAATAAGATTT	22856

ภาพผนวกที่ ข1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวนิปปอนบาระที่มี ยีนต้านทาน *Pi9* (Nipponbare *Pi9*) ซึ่งเป็น positive control กับลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนต้านทาน *Pi9* (DQ285630.1) ที่มีรายงานไว้ใน ฐานข้อมูล Genbank

บ๊อชอพ	ATACACTCTAATCAAGCAAGTTTAAACCaaaaaaaTACAATTAAGAGAGGATGCTGGTG	60
DQ285630.1	 ATACACTCTAATCAAGCAAGTTTAAACCAAAAAAATACAATTAAGAGAGGATGCTGGTG	22514
บ๊อชอพ	ATGGCGTTGTTTTGAGTTTGGAGAGGGTCATTATGGAGGATGCCATCAGGAAGCCCAACA	120
DQ285630.1	 ATGGCGTTGTTTTGAGTTTGGAGAGGGTCATTATGGAGGATGCCATCAGGAAGCCCAACA	22574
บ๊อชอพ	CCGACGGTGTGAGTAACCTTTGGGTTTAGTGGAAATCCGGCAAAATCTTGCAAGGTGATT	180
DQ285630.1	 CCGACGGTGTGAGTAACCTTTGGGTTTAGTGGAAATCCGGCAAAATCTTGCAAGGTGATT	22634
บ๊อชอพ	AGTGAGTGAAGCCATTTTCAGTTGGTGCTTTTCTTTGATTATCTGATTTTTAACAGATTT	240
DQ285630.1	 AGTGAGTGAAGCCATTTTCAGTTGGTGCTTTTCTTTGATTATCTGATTTTTAACAGATTT	22694
บ๊อชอพ	TCTTTTGTTTCAGCATAAGATAGCAGATGACATGAACTGTTGGTATGGGTCATGGGGGAAA	300
DQ285630.1	 TCTTTTGTTTCAGCATAAGATAGCAGATGACATGAACTGTTGGTATGGGTCATGGGGGAAA	22754
บ๊อชอพ	CAGTGCTCAGCATTGCGTCGTCCTCAACTGCCACAAATGACATGAGCTTGCTGCTGGGAGTG	360
DQ285630.1	 CAGTGCTCAGCATTGCGTCGTCCTCAACTGCCACAAATGACATGAGCTTGCTGCTGGGAGTG	22814
บ๊อชอพ	CAGGAGACATGGTAAGCATCTAGCTCCACATAATAAG	398
DQ285630.1	 CAGGAGACATGGTAAGCATCTAGCTCCACATAATAAG	22852

ภาพผนวกที่ ข2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองบ๊อชอพ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *Pi9* (DQ285630.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank

ข้าวแดง	ACTGGCTTCGATACACTCTAATCAAGCAAGTTTAAACCaaaaaaaTACAGTTAAGAGAG	541
DQ285630.1	ACTGGCTTCGATACACTCTAATCAAGCAAGTTTAAACCaaaaaaaTACAATTAAGAGAG	22504
ข้าวแดง	GATGCTGGTGATGGCGTTGTTTTGAGTTTGGAGAGGGTCATTATGGAGGATGCCATCAGG	601
DQ285630.1	GATGCTGGTGATGGCGTTGTTTTGAGTTTGGAGAGGGTCATTATGGAGGATGCCATCAGG	22564
ข้าวแดง	AAGCCCAACACCGACGGTGTGAGTAACCTTTGGGTTTAGTGGAAATCCGGCAAAATCTTG	661
DQ285630.1	AAGCCCAACACCGACGGTGTGAGTAACCTTTGGGTTTAGTGGAAATCCGGCAAAATCTTG	22624
ข้าวแดง	CAAGGTGATTAGTGAGTGAAGCCATTTTCAGTTGGTGCTTTTCTTTGATTATCTGATTTT	721
DQ285630.1	CAAGGTGATTAGTGAGTGAAGCCATTTTCAGTTGGTGCTTTTCTTTGATTATCTGATTTT	22684
ข้าวแดง	TAACAGATTTTCTTTTGTTCAGCATAAGATAGCAGATGACATGAACTGTTGGTATGGGTC	781
DQ285630.1	TAACAGATTTTCTTTTGTTCAGCATAAGATAGCAGATGACATGAACTGTTGGTATGGGTC	22744
ข้าวแดง	ATGGGGGAAACAGTGCTCAGCATTGCGTCGTCCTCAACTGCCACAAATGACATGAGCTTGCT	841
DQ285630.1	ATGGGGGAAACAGTGCTCAGCATTGCGTCGTCCTCAACTGCCACAAATGACATGAGCTTGCT	22804
ข้าวแดง	GCTGGGAGTGCAGGAGACATGGTAAGCATCTAGCTCCACATAATAAGATTTTCCTTTT	900
DQ285630.1	GCTGGGAGTGCAGGAGACATGGTAAGCATCTAGCTCCACATAATAAGATTTTCCTTTT	22863

ภาพผนวกที่ ข3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองข้าวแดง กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *Pi9* (DQ285630.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank

ช่อนิมิต	CTGGCTTCGATACACTCTAATCAAGCAAGTTTAAACcaaaaaaaTACAGTTAAGAGAGG	346
DQ285630.1	CTGGCTTCGATACACTCTAATCAAGCAAGTTTAAACCAAAAAAATACAATTAAGAGAGG	22505
ช่อนิมิต	ATGCTGGTGATGGCGTTGTTTGGAGAGGGTCATTATGGAGGATGCCATCAGGA	406
DQ285630.1	ATGCTGGTGATGGCGTTGTTTGGAGAGGGTCATTATGGAGGATGCCATCAGGA	22565
ช่อนิมิต	AGCCCAACACCGACGGTGTGAGTAACCTTTGGGTTTAGTGGAAATCCGGCAAAATCTTGC	466
DQ285630.1	AGCCCAACACCGACGGTGTGAGTAACCTTTGGGTTTAGTGGAAATCCGGCAAAATCTTGC	22625
ช่อนิมิต	AAGGTGATTAGTGAGTGAAGCCATTTTCAGTTGGTGCTTTTCTTTGATTATCTGATTTT	526
DQ285630.1	AAGGTGATTAGTGAGTGAAGCCATTTTCAGTTGGTGCTTTTCTTTGATTATCTGATTTT	22685
ช่อนิมิต	AACAGATTTTCTTTTGTTCAGCATAAGATAGCAGATGACATGAACGTGGTATGGGTCA	586
DQ285630.1	AACAGATTTTCTTTTGTTCAGCATAAGATAGCAGATGACATGAACGTGGTATGGGTCA	22745
ช่อนิมิต	TGGGGGAAACAGTGCTCAGCATTGCGTCGTCCAACGCCACAAATGACATGAGCTTGCTG	646
DQ285630.1	TGGGGGAAACAGTGCTCAGCATTGCGTCGTCCAACGCCACAAATGACATGAGCTTGCTG	22805
ช่อนิมิต	CTGGGAGTGCAGGAGACATGGTAAGCATCTAGCTCCACATAATAAGATTTT	698
DQ285630.1	CTGGGAGTGCAGGAGACATGGTAAGCATCTAGCTCCACATAATAAGATTTT	22857

ภาพผนวกที่ ข4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองช่อนิมิต กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *Pi9* (DQ285630.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank

พวงมาลัย 31-5-6	ACTGGCTTCGATACACTCTAATCAAGCAAGTTTAAACCaaaaaaaTACAATTAAGAGAG	390
DQ285630.1	ACTGGCTTCGATACACTCTAATCAAGCAAGTTTAAACCaaaaaaaTACAATTAAGAGAG	22504
พวงมาลัย 31-5-6	GATGCTGGTGATGGCGTTGTTTTGAGTTTGGAGAGGGTCATTATGGAGGATGCCATCAGG	450
DQ285630.1	GATGCTGGTGATGGCGTTGTTTTGAGTTTGGAGAGGGTCATTATGGAGGATGCCATCAGG	22564
พวงมาลัย 31-5-6	AAGCCCAACACCGACGGTGTGAGTAACCTTTGGGTTTAGTGAAATCCGGCAAAATCTTG	510
DQ285630.1	AAGCCCAACACCGACGGTGTGAGTAACCTTTGGGTTTAGTGAAATCCGGCAAAATCTTG	22624
พวงมาลัย 31-5-6	CAAGGTGATTAGTGAGTGAAGCCATTTTCAGTTGGTGCTTTTCTTTGATTATCTGATTTT	570
DQ285630.1	CAAGGTGATTAGTGAGTGAAGCCATTTTCAGTTGGTGCTTTTCTTTGATTATCTGATTTT	22684
พวงมาลัย 31-5-6	TAACAGATTTTCTTTTGTTCAGCATAAGATAGCAGATGACATGAACTGTTGGTATGGGTC	630
DQ285630.1	TAACAGATTTTCTTTTGTTCAGCATAAGATAGCAGATGACATGAACTGTTGGTATGGGTC	22744
พวงมาลัย 31-5-6	ATGGGGGAAACAGTGCTCAGCATTGCGTCGTCCTCAACTGCCACAAATGACATGAGCTTGCT	690
DQ285630.1	ATGGGGGAAACAGTGCTCAGCATTGCGTCGTCCTCAACTGCCACAAATGACATGAGCTTGCT	22804
พวงมาลัย 31-5-6	GCTGGGAGTGCAGGAGACATGGTAAGCATCTAGCTC	726
DQ285630.1	GCTGGGAGTGCAGGAGACATGGTAAGCATCTAGCTC	22840

ภาพผนวกที่ ข5 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองพวงมาลัย 31-5-6 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *Pi9* (DQ285630.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank

เจียว	GACTAAGTACTGGCTTCGATACACTCTAATCAAGCAAGTTTAAACCaaaaaaaTACAAT	569
DQ285630.1	 GACTAAGTACTGGCTTCGATACACTCTAATCAAGCAAGTTTAAACCAAAAAAATACAAT	22496
เจียว	TAAGAGAGGATGCTGGTGATGGCGTTGTTTTGAGTTTGGAGAGGGTCATTATGGAGGATG	629
DQ285630.1	 TAAGAGAGGATGCTGGTGATGGCGTTGTTTTGAGTTTGGAGAGGGTCATTATGGAGGATG	22556
เจียว	CCATCAGGAAGCCCAACACCGACGGTGTGAGTAACCTTTGGGTTTAGTGGAATCCGGCA	689
DQ285630.1	 CCATCAGGAAGCCCAACACCGACGGTGTGAGTAACCTTTGGGTTTAGTGGAATCCGGCA	22616
เจียว	AAATCTTGCAAGGTGATTAGTGAGTGAAGCCATTTTCAGTTGGTGCTTTTCTTTGATTAT	749
DQ285630.1	 AAATCTTGCAAGGTGATTAGTGAGTGAAGCCATTTTCAGTTGGTGCTTTTCTTTGATTAT	22676
เจียว	CTGATTTTAAACAGATTTTCTTTTGTTCAGCATAAGATAGCAGATGACATGAACGTGTGG	809
DQ285630.1	 CTGATTTTAAACAGATTTTCTTTTGTTCAGCATAAGATAGCAGATGACATGAACGTGTGG	22736
เจียว	TATGGGTCATGGGGGAAACAGTGCTCAGCATTGCGTCGTCCAAGTCCACAAATGACATG	869
DQ285630.1	 TATGGGTCATGGGGGAAACAGTGCTCAGCATTGCGTCGTCCAAGTCCACAAATGACATG	22796
เจียว	AGCTTGCTGCTGGGAGTGACAGGAGACATGGTAAGCATCTAGCTCCACATAATAAGATTT	929
DQ285630.1	 AGCTTGCTGCTGGGAGTGACAGGAGACATGGTAAGCATCTAGCTCCACATAATAAGATTT	22856

ภาพผนวกที่ ข6 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองเจียว กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *Pi9* (DQ285630.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank

คอเหลือ้ง	GACTAAGTACTGGCTTCGATACACTCTAATCAAGCAAGTTTAAACCaaaaaaaTACAAT	570
DQ285630.1	 GACTAAGTACTGGCTTCGATACACTCTAATCAAGCAAGTTTAAACCAAAAAAATACAAT	22496
คอเหลือ้ง	TAAGAGAGGATGCTGGTGATGGCGTTGTTTTGAGTTTGGAGAGGGTCATTATGGAGGATG	630
DQ285630.1	 TAAGAGAGGATGCTGGTGATGGCGTTGTTTTGAGTTTGGAGAGGGTCATTATGGAGGATG	22556
คอเหลือ้ง	CCATCAGGAAGCCCAACACCGACGGTGTGAGTAACCTTTGGGTTTAGTGGAATCCGGCA	690
DQ285630.1	 CCATCAGGAAGCCCAACACCGACGGTGTGAGTAACCTTTGGGTTTAGTGGAATCCGGCA	22616
คอเหลือ้ง	AAATCTTGCAAGGTGATTAGTGAGTGAAGCCATTTTCAGTTGGTGCTTTTCTTTGATTAT	750
DQ285630.1	 AAATCTTGCAAGGTGATTAGTGAGTGAAGCCATTTTCAGTTGGTGCTTTTCTTTGATTAT	22676
คอเหลือ้ง	CTGATTTTAAACAGATTTTCTTTTGTTCAGCATAAGATAGCAGATGACATGAAGTGTGG	810
DQ285630.1	 CTGATTTTAAACAGATTTTCTTTTGTTCAGCATAAGATAGCAGATGACATGAAGTGTGG	22736
คอเหลือ้ง	TATGGGTCATGGGGGAAACAGTGCTCAGCATTGCGTCGTCCAACTGCCACAAATGACATG	870
DQ285630.1	 TATGGGTCATGGGGGAAACAGTGCTCAGCATTGCGTCGTCCAACTGCCACAAATGACATG	22796
คอเหลือ้ง	AGCTTGCTGCTGGGAGTGACAGGAGACATGGTAAGCATCTAGCTCCACATAATAAGATTT	930
DQ285630.1	 AGCTTGCTGCTGGGAGTGACAGGAGACATGGTAAGCATCTAGCTCCACATAATAAGATTT	22856

ภาพผนวกที่ ข7 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองคอเหลือ้ง กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *Pi9* (DQ285630.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank

ข้าวหอม (GS.4810)	GACTAAGTACTGGCTTCGATACACTCTAATCAAGCAAGTTTAAACCaAAAAaTACAGT	567
DQ285630.1	 GACTAAGTACTGGCTTCGATACACTCTAATCAAGCAAGTTTAAACCaAAAAaTACAAAT	22496
ข้าวหอม (GS.4810)	TAAGAGAGGATGCTGGTGATGGCGTTGTTTTGAGTTTGGAGAGGGTCATTATGGAGGATG	627
DQ285630.1	 TAAGAGAGGATGCTGGTGATGGCGTTGTTTTGAGTTTGGAGAGGGTCATTATGGAGGATG	22556
ข้าวหอม (GS.4810)	CCATCAGGAAGCCCAACACCGACGGTGTGAGTAACCTTTGGGTTTAGTGGAATCCGGCA	687
DQ285630.1	 CCATCAGGAAGCCCAACACCGACGGTGTGAGTAACCTTTGGGTTTAGTGGAATCCGGCA	22616
ข้าวหอม (GS.4810)	AAATCTTGCAAGGTGATTAGTGAGTGAAGCCATTTTCAGTTGGTGCTTTCTTTGATTAT	747
DQ285630.1	 AAATCTTGCAAGGTGATTAGTGAGTGAAGCCATTTTCAGTTGGTGCTTTCTTTGATTAT	22676
ข้าวหอม (GS.4810)	CTGATTTTAAACAGATTTTCTTTGTTTCAGCATAAGATAGCAGATGACATGAAGTGTGG	807
DQ285630.1	 CTGATTTTAAACAGATTTTCTTTGTTTCAGCATAAGATAGCAGATGACATGAAGTGTGG	22736
ข้าวหอม (GS.4810)	TATGGGTCATGGGGGAAACAGTGCTCAGCATTGCGTCGTCCAACTGCCACAAATGACATG	867
DQ285630.1	 TATGGGTCATGGGGGAAACAGTGCTCAGCATTGCGTCGTCCAACTGCCACAAATGACATG	22796
ข้าวหอม (GS.4810)	AGCTTGCTGCTGGGAGTGACAGGAGACATGGTAAGCATCTAGCTCCACATAATAAGATTN	927
DQ285630.1	 AGCTTGCTGCTGGGAGTGACAGGAGACATGGTAAGCATCTAGCTCCACATAATAAGATTN	22856
ข้าวหอม (GS.4810)	TC 929	
DQ285630.1	TC 22858	

ภาพผนวกที่ ข8 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองข้าวหอม (GS.4810) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *Pi9* (DQ285630.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank

ภาคผนวก ค

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือน
ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์
ของยีนต้านทาน *Pid2* (FJ915121.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank

เก๋ารวง 17-2-106	CACAAGACGACGCTGGTTCATCGGAAGATCGATGGATTTCTGCAAACAATATCCGGAGCA	65
FJ915121.1	 CACAAGACGACGCTGGTTCATCGGAAGAT-GATGGATTTCTGCAAACAATATCCGGAGCA	4816
เก๋ารวง 17-2-106	CCAGTGC GGTTCACTTACAGGGAGCTCCAGGATGCGACAAGCAACTTCTGTAACAAGCTT	125
FJ915121.1	 CCAGTGC GGTTCACTTACAGGGAGCTCCAGGATGCGACAAGCAACTTCTGTAACAAGCTT	4876
เก๋ารวง 17-2-106	GGTCAGGGAGGGTTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACTCCCAGACGGCAGTCGTATTGCT	185
FJ915121.1	 GGTCAGGGAGGGTTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACTCCCAGACGGCAGTCGTATTGCT	4936
เก๋ารวง 17-2-106	GTGAAGAAGCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGAGTTCCGCTCTGAGGTAACGATC	245
FJ915121.1	 GTGAAGAAGCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGAGTTCCGCTCTGAGGTAACGATC	4996
เก๋ารวง 17-2-106	ATTGGTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCGAGGCTTTTGTACTGAGGGACCA	305
FJ915121.1	 ATTGGTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCGAGGCTTTTGTACTGAGGGACCA	5056
เก๋ารวง 17-2-106	CACAGGCTTCTTGCCTACGAGTACATGGCGAAAGGGTCGCTGGATAAGTGGATTTTCCAT	365
FJ915121.1	 CACAGGCTTCTTGCCTACGAGTACATGGCGAATGGGTCGCTGGATAAGTGGATTTTCCAT	5116
เก๋ารวง 17-2-106	TCTAAAGAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAGGTTTAACATTGCGCTTGGAACG	425
FJ915121.1	 TCTAAAGAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAGGTTTAACATTGCGCTTGGAACG	5176
เก๋ารวง 17-2-106	GCAAAGGGATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTGCAAGATTGTACACTGTGACATT	485
FJ915121.1	 GCAAAGGGATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTGCAAGATTGTACACTGTGACATT	5236
เก๋ารวง 17-2-106	AAGCCTGAGAATGTTCTACTTGACGACAACCTTCATCGCAAAGGTATCTGATTTTGGCCTT	545
FJ915121.1	 AAGCCTGAGAATGTTCTACTTGACGACAACCTTCATCGCAAAGGTATCTGATTTTGGCCTT	5296
เก๋ารวง 17-2-106	GCCAAGTTGATGACCAGGGAGCAGAGCCATGTTTTCACTACGCTCAGAGGCACGCGTGGG	605
FJ915121.1	 GCCAAGTTGATGACCAGGGAGCAGAGCCATGTTTTCACTACGCTCAGAGGCACGCGTGGG	5356
เก๋ารวง 17-2-106	TACCTTGCACCTGAGTGGCTACCAACTATGCCATCTCAGAGAAGAGTGATGTGTACAGC	665
FJ915121.1	 TACCTTGCACCTGAGTGGCTACCAACTATGCCATCTCAGAGAAGAGTGATGTGTACAGC	5416

ภาพผนวกที่ ค1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn)

เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองเก๋ารวง 17-2-106 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของของยีนต้านทาน *Pid2* (FJ915121.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank

เก้ารวง 17-2-106	TACGGCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAAGAGCTACGATCCCTCGGAGATC	725
FJ915121.1	 TACGGCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAAGAGCTACGATCCCTCGGAGATC	5476
เก้ารวง 17-2-106	TCCGAGAAGGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAAGCTGGAGGAAGGTGATCTTCAG	785
FJ915121.1	 TCCGAGAAGGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAAGCTGGAGGAAGGTGATCTTCAG	5536
เก้ารวง 17-2-106	GACATCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGATGGGCGGGTCGAGACCGCGATC	845
FJ915121.1	 GACATCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGATGGGCGGGTCGAGACCGCGATC	5596
เก้ารวง 17-2-106	AAGGTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTCTACCAGAGACCATCCATGTCAAAGGTT	905
FJ915121.1	 AAGGTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTCTACCAGAGACCATCCATGTCAAAGGTT	5656
เก้ารวง 17-2-106	GTGCAGATGCTCGAAGGCGTCTGCGAGGTGCTCC	939
FJ915121.1	 GTGCAGATGCTCGAAGGCGTCTGCGAGGTGCTCC	5690

ภาพผนวกที่ ค1 (ต่อ)

คอสามเดือน	AAGACGACGCTGGTTCATCGGAAGATGATGGATTTCTGCAACAATATCCGGAGCACCAG	60
FJ915121.1	 AAGACGACGCTGGTTCATCGGAAGATGATGGATTTCTGCAACAATATCCGGAGCACCAG	4820
คอสามเดือน	TGCGGTCACTTACAGGGAGCTCCAGGATGCGACAAGCAACTTCTGTAACAAGCTTGGTC	120
FJ915121.1	 TGCGGTCACTTACAGGGAGCTCCAGGATGCGACAAGCAACTTCTGTAACAAGCTTGGTC	4880
คอสามเดือน	AGGGAGGGTTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACTCCCAGACGGCAGTCGTATTGCTGTGA	180
FJ915121.1	 AGGGAGGGTTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACTCCCAGACGGCAGTCGTATTGCTGTGA	4940
คอสามเดือน	AGAAGCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGAGTTCCGCTCTGAGGTAACGATCATTG	240
FJ915121.1	 AGAAGCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGAGTTCCGCTCTGAGGTAACGATCATTG	5000
คอสามเดือน	GTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCGAGGCTTTTGTACTGAGGGACCACACA	300
FJ915121.1	 GTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCGAGGCTTTTGTACTGAGGGACCACACA	5060

ภาพผนวกที่ ค2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองคอสามเดือน กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนต้านทาน *Pid2* (FJ915121.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank

คอสามเดือน	GGCTTCTTGCCTACGAGTACATGGCGAATGGGTCGCTGGATAAGTGGATTTTCCATTCTA	360
FJ915121.1	 GGCTTCTTGCCTACGAGTACATGGCGAATGGGTCGCTGGATAAGTGGATTTTCCATTCTA	5120
คอสามเดือน	AAGAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAGGTTTAACATTGCGCTTGGAACGGCAA	420
FJ915121.1	 AAGAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAGGTTTAACATTGCGCTTGGAACGGCAA	5180
คอสามเดือน	AGGGATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTCTGAAGATTGTACACTGTGACATTAAGC	480
FJ915121.1	 AGGGATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTCTGAAGATTGTACACTGTGACATTAAGC	5240
คอสามเดือน	CTGAGAATGTTCTACTTGACGACAACTTCATCGCAAAGGTATCTGATTTTGGCCTTGCCA	540
FJ915121.1	 CTGAGAATGTTCTACTTGACGACAACTTCATCGCAAAGGTATCTGATTTTGGCCTTGCCA	5300
คอสามเดือน	AGTTGATGACCAGGGAGCAGAGCCATGTTTTTCACTACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACC	600
FJ915121.1	 AGTTGATGACCAGGGAGCAGAGCCATGTTTTTCACTACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACC	5360
คอสามเดือน	TTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTCAGAGAAGAGTGATGTGTACAGCTACG	660
FJ915121.1	 TTGCACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTCAGAGAAGAGTGATGTGTACAGCTACG	5420
คอสามเดือน	GCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAAGAGCTACGATCCCTCGGAGATCTCCG	720
FJ915121.1	 GCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAAGAGCTACGATCCCTCGGAGATCTCCG	5480
คอสามเดือน	AGAAGGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAAGCTGGAGGAAGGTGATCTTCAGGACA	780
FJ915121.1	 AGAAGGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAAGCTGGAGGAAGGTGATCTTCAGGACA	5540
คอสามเดือน	TCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGATGGGCGGGTCGAGACCGCGATCAAG	840
FJ915121.1	 TCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGAT-GGGCGGGTCGAGACCGCGATCAAG	5599
คอสามเดือน	GTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACCAGAGACCATCCATGTCAAAGGTTGTG	900
FJ915121.1	 GTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACCAGAGACCATCCATGTCAAAGGTTGTG	5659
คอสามเดือน	CAGATGCTCGAAGGCGTCTGCGAGGTGC	928
FJ915121.1	 CAGATGCTCGAAGGCGTCTGCGAGGTGC	5687

ภาพผนวกที่ ค2 (ต่อ)

เหินขวายลี	GCGACGACACCGGTGGCTG-AGCAC-TCGCAGACGC-TTCGAGCATCTGCACAAC-TTTG	56
FJ915121.1	 GCGACGACACCGGTGGCTGGAGCACCTCGCAGACGCCTTCGAGCATCTGCACAACCTTTG	5649
เหินขวายลี	ACATGGATGGTCTCTGGTAGAAATCATCCTGGATGCACCAGAGCGCGACCTTGATCGCGG	116
FJ915121.1	 ACATGGATGGTCTCTGGTAGAAATCATCCTGGATGCACCAGAGCGCGACCTTGATCGCGG	5589
เหินขวายลี	TCTCGACCCGCCCATCCTTGTCATTGTACTTCAGCTTGGCGTCGAAGATGTCCTGAAGAT	176
FJ915121.1	 TCTCGACCCGCCCATCCTTGTCATTGTACTTCAGCTTGGCGTCGAAGATGTCCTGAAGAT	5529
เหินขวายลี	CACCTTCCTCCAGCTTCTTGAATGCAAAGGAAGGAAGTGAGCCTTCTCGGAGATCTCCG	236
FJ915121.1	 CACCTTCCTCCAGCTTCTTGAATGCAAAGGAAGGAAGTGAGCCTTCTCGGAGATCTCCG	5469
เหินขวายลี	AGGGATCGTAGCTCTTCTCCACCGATTATCTCAAGCAAAACCATGCCGTAGCTGTACA	296
FJ915121.1	 AGGGATCGTAGCTCTTCTCCACCGATTATCTCAAGCAAAACCATGCCGTAGCTGTACA	5409
เหินขวายลี	CATCACTCTTCTCTGAGATGGCATAGTTGGTGAGCCACTCAGGTGCAAGGTACCCACGCG	356
FJ915121.1	 CATCACTCTTCTCTGAGATGGCATAGTTGGTGAGCCACTCAGGTGCAAGGTACCCATGCG	5349
เหินขวายลี	TGCCTCTGAGCGTAGTGAAAACATGGCTCTGCTCCCTGGTCATCAACTTGGCAAGGCCAA	416
FJ915121.1	 TGCCTCTGAGCGTAGTGAAAACATGGCTCTGCTCCCTGGTCATCAACTTGGCAAGGCCAA	5289
เหินขวายลี	AATCAGATACCTTTGCGATGAAGTTGTCGTCAAGTAGAACATTCTCAGGCTTAATGTCAC	476
FJ915121.1	 AATCAGATACCTTTGCGATGAAGTTGTCGTCAAGTAGAACATTCTCAGGCTTAATGTCAC	5229
เหินขวายลี	AGTGTAATCTTCGAATCGCAGTCTGATGGAGGTATGCCAATCCCTTTGCCGTTCCAA	536
FJ915121.1	 AGTGTAATCTTCGAATCGCAGTCTGATGGAGGTATGCCAATCCCTTTGCCGTTCCAA	5169
เหินขวายลี	GCGCAATGTTAAACCTTGATATCCAGTCGAGCAGGTGATCATCTTCTTTAGAAATGGAAAA	596
FJ915121.1	 GCGCAATGTTAAACCTTGATATCCAGTCGAGCAGGTGATCATCTTCTTTAGAAATGGAAAA	5109
เหินขวายลี	TCCACTTATCCAGCGACCCATTCGCCATGTACTCGTAGGCAAGAAGCCTGTGTGGTCCCT	656
FJ915121.1	 TCCACTTATCCAGCGACCCATTCGCCATGTACTCGTAGGCAAGAAGCCTGTGTGGTCCCT	5049
เหินขวายลี	CAGTACAAAAGCCTCGGAGTTTGACAAGATGGATGTGGTGGATACTACCAATGATCGTTA	716
FJ915121.1	 CAGTACAAAAGCCTCGGAGTTTGACAAGATGGATGTGGTGGATACTACCAATGATCGTTA	4989

ภาพผนวกที่ ค3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองเหินขวายลี กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของของยีนต้านทาน *Pid2* (FJ915121.1)

เหินขาวขยลี	CCTCAGAGCGGAACCTCTTTCTTCTTGGCCTATGCCCTCCAGCTTCTTCACAGCAATAC	776
FJ915121.1	 CCTCAGAGCGGAACCTCTTTCTTCTTGGCCTATGCCCTCCAGCTTCTTCACAGCAATAC	4929
เหินขาวขยลี	GACTGCCGTCTGGGAGTGATACCAAGATACACAGATCCAAACCTCCCTGACCAAGCTTGT	836
FJ915121.1	 GACTGCCGTCTGGGAGTGATACCAAGATACACAGATCCAAACCTCCCTGACCAAGCTTGT	4869
เหินขาวขยลี	TACAGAAGTTGCTTGTGCGCATCCTGGAGCTCCCTGTAAGTGAACCGCACTGGTGCTCCGG	896
FJ915121.1	 TACAGAAGTTGCTTGTGCGCATCCTGGAGCTCCCTGTAAGTGAACCGCACTGGTGCTCCGG	4809
เหินขาวขยลี	ATATTGTTTGCAGAAATCCATCATCTTCCGATG-ACCAGCGTCGTCTTGTGATGGT-GNG	954
FJ915121.1	 ATATTGTTTGCAGAAATCCATCATCTTCCGATGAACCAGCGTCGTCTTGTGATGGTGGAG	4749

ภาพผนวกที่ ค3 (ต่อ)

พวงเงิน	GGAAGAGGCATCCTCCACCATCACAAGACGACGCTGGTTCATCGGAAGATGATGGATTTC	62
FJ915121.1	 GGAAGAGGCATCCTCCACCATCACAAGACGACGCTGGTTCATCGGAAGATGATGGATTTC	4796
พวงเงิน	TGCAACAATATCCGGAGCACCAGTGCGGTTCACTTACAGGGAGCTCCAGGATGCGACAA	122
FJ915121.1	 TGCAACAATATCCGGAGCACCAGTGCGGTTCACTTACAGGGAGCTCCAGGATGCGACAA	4856
พวงเงิน	GCAACTTCTGTAACAAGCTTGGTCAGGGAGGGTTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACTCC	182
FJ915121.1	 GCAACTTCTGTAACAAGCTTGGTCAGGGAGGGTTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACTCC	4916
พวงเงิน	CAGACGGCAGTCGTATTGCTGTGAAGAAGCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGAGT	242
FJ915121.1	 CAGACGGCAGTCGTATTGCTGTGAAGAAGCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGAGT	4976
พวงเงิน	TCCGCTCTGAGGTAACGATCATTTGGTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCGAG	302
FJ915121.1	 TCCGCTCTGAGGTAACGATCATTTGGTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCGAG	5036
พวงเงิน	GCTTTTGTACTGAGGGACCACACAGGCTTCTTGCTTACGAGTACATGGCGAATGGGTGCGC	362
FJ915121.1	 GCTTTTGTACTGAGGGACCACACAGGCTTCTTGCTTACGAGTACATGGCGAATGGGTGCGC	5096

ภาพผนวกที่ ค4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn)

เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองพวงเงิน
กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนต้านทาน *Pid2* (FJ915121.1)
ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank

พวงเงิน	TGGATAAGTGGATTTTCCATTCTAAAGAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAGGT	422
FJ915121.1	 TGGATAAGTGGATTTTCCATTCTAAAGAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAGGT	5156
พวงเงิน	TTAACATTGCGCTTGGAAACGGCAAAGGGATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTCTGA	482
FJ915121.1	 TTAACATTGCGCTTGGAAACGGCAAAGGGATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTCTGA	5216
พวงเงิน	AGATTGTACACTGTGACATTAAGCCTGAGAAATGTTCTACTTGACGACAACCTCATCGCAA	542
FJ915121.1	 AGATTGTACACTGTGACATTAAGCCTGAGAAATGTTCTACTTGACGACAACCTCATCGCAA	5276
พวงเงิน	AGGTATCTGATTTTGGCCTTGCCAAGTTGATGACCAGGGAGCAGAGCCATGTTTTCACTA	602
FJ915121.1	 AGGTATCTGATTTTGGCCTTGCCAAGTTGATGACCAGGGAGCAGAGCCATGTTTTCACTA	5336
พวงเงิน	CGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTCAG	662
FJ915121.1	 CGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTCAG	5396
พวงเงิน	AGAAGAGTGATGTGTACAGCTACGGCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAAGA	722
FJ915121.1	 AGAAGAGTGATGTGTACAGCTACGGCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAAGA	5456
พวงเงิน	CTACGATCCCTCGGAGATCTCCGAGAAGGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAAGC	782
FJ915121.1	 GCTACGATCCCTCGGAGATCTCCGAGAAGGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAAGC	5516
พวงเงิน	TGGAGGAAGGTGATCTTCAGGACATCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGATG	842
FJ915121.1	 TGGAGGAAGGTGATCTTCAGGACATCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGATG	5576
พวงเงิน	GGCGGGTCGAGACCGCGATCAAGGTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACCAGA	902
FJ915121.1	 GGCGGGTCGAGACCGCGATCAAGGTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACCAGA	5636
พวงเงิน	GACCATCCATGTCAAAGGTTGTGCAGATGCTCGAAGGCGTCTGCGAGGTGCTCCAGCC	960
FJ915121.1	 GACCATCCATGTCAAAGGTTGTGCAGATGCTCGAAGGCGTCTGCGAGGTGCTCCAGCC	5694

ภาพผนวกที่ ๓4 (ต่อ)

เหลืองลิซอ	CGACGCTGGTTCATCGGAAGATGATGGATTCTGCAAACAATATCCGGAGCACCAGTGCG	75
FJ915121.1	 CGACGCTGGTTCATCGGAAGATGATGGATTCTGCAAACAATATCCGGAGCACCAGTGCG	4824
เหลืองลิซอ	GTTCACTTACAGGGAGCTCCAGGATGCGACAAGCAACTTCTGTAACAAGCTTGGTCAGGG	135
FJ915121.1	 GTTCACTTACAGGGAGCTCCAGGATGCGACAAGCAACTTCTGTAACAAGCTTGGTCAGGG	4884
เหลืองลิซอ	AGGGTTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACTCCCAGACGGCAGTCGTATTGCTGTGAAGAA	195
FJ915121.1	 AGGGTTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACTCCCAGACGGCAGTCGTATTGCTGTGAAGAA	4944
เหลืองลิซอ	GCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGAGTTCCGCTCTGAGGTAACGATCATTGGTAG	255
FJ915121.1	 GCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGAGTTCCGCTCTGAGGTAACGATCATTGGTAG	5004
เหลืองลิซอ	TATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCCGAGGCTTTTGTACTGAGGGACCACACAGGCT	315
FJ915121.1	 TATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCCGAGGCTTTTGTACTGAGGGACCACACAGGCT	5064
เหลืองลิซอ	TCTTGCCCTACGAGTACATGGCGAATGGGTCGCTGGATAAGTGGATTTTCCATTCTAAAGA	375
FJ915121.1	 TCTTGCCCTACGAGTACATGGCGAATGGGTCGCTGGATAAGTGGATTTTCCATTCTAAAGA	5124
เหลืองลิซอ	AGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAGGTTTAAACATTGCGCTTGAACGGCAAAGGG	435
FJ915121.1	 AGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAGGTTTAAACATTGCGCTTGAACGGCAAAGGG	5184
เหลืองลิซอ	ATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTTCGAAGATTGTACACTGTGACATTAAGCCTGA	495
FJ915121.1	 ATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTTCGAAGATTGTACACTGTGACATTAAGCCTGA	5244
เหลืองลิซอ	GAATGTTCTACTTGACGACAACCTTCATCGCAAAGGTATCTGATTTTGGCCTTGCCAAGTT	555
FJ915121.1	 GAATGTTCTACTTGACGACAACCTTCATCGCAAAGGTATCTGATTTTGGCCTTGCCAAGTT	5304
เหลืองลิซอ	GATGACCAGGGAGCAGAGCCATGTTTCACTACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGC	615
FJ915121.1	 GATGACCAGGGAGCAGAGCCATGTTTCACTACGCTCAGAGGCACGCGTGGGTACCTTGC	5364
เหลืองลิซอ	ACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTCAGAGAAGAGTGATGTGTACAGCTACGGCAT	675
FJ915121.1	 ACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTCAGAGAAGAGTGATGTGTACAGCTACGGCAT	5424

ภาพผนวกที่ ค5 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn) เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองเหลืองลิซอ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนต้านทาน *Pid2* (FJ915121.1) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank

हेलींगลิश	GGTTTGTCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAAGAGCTACGATCCCTCGGAGATCTCCGAGAA	735
FJ915121.1	 GGTTTGTCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAAGAGCTACGATCCCTCGGAGATCTCCGAGAA	5484
हेलींगलिश	GGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAAGCTGGAGGAAGGTGATCTTCAGGACATCTT	795
FJ915121.1	 GGCTCACTTCCCTTCCTTTGCATTCAAGAAGCTGGAGGAAGGTGATCTTCAGGACATCTT	5544
हेलींगलिश	CGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGATGGGCGGGTCGAGACCGCGATCAAGGTGCG	855
FJ915121.1	 CGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGATGGGCGGGTCGAGACCGCGATCAAGGTGCG	5604
हेलींगलिश	GCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACCAGAGACCATCCATGTCAAAGGTTGTGCAGAT	915
FJ915121.1	 GCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACCAGAGACCATCCATGTCAAAGGTTGTGCAGAT	5664
हेलींगलिश	GCTCGAAGGCGTCTGCGAGGTG	937
FJ915121.1	 GCTCGAAGGCGTCTGCGAGGTG	5686

ภาพผนวกที่ ค5 (ต่อ)

นางรอง	CATCACAAGACGGACGCTGGTTCATCGGAAGATGATGGATTTCTGCAAACAATATCCGGA	60
FJ915121.1	 CATCACAAGACG-ACGCTGGTTCATCGGAAGATGATGGATTTCTGCAAACAATATCCGGA	4813
นางรอง	GCACCAGTGCGGTTCACTTACAGGGAGCTCCAGGATGCGACAAGCAACTTCTGTAACAAG	120
FJ915121.1	 GCACCAGTGCGGTTCACTTACAGGGAGCTCCAGGATGCGACAAGCAACTTCTGTAACAAG	4873
นางรอง	CTTGGTCAGGGAGGGTTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACTCCAGACGGCAGTCGTATT	180
FJ915121.1	 CTTGGTCAGGGAGGGTTTGGATCTGTGTATCTTGGTACACTCCAGACGGCAGTCGTATT	4933
นางรอง	GCTGTGAAGAAGCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGAGTTCCGCTCTGAGGTAACG	240
FJ915121.1	 GCTGTGAAGAAGCTGGAGGGCATAGGCCAAGGAAAGAAAGAGTTCCGCTCTGAGGTAACG	4993
นางรอง	ATCATTTGGTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCGAGGCTTTTGTACTGAGGGA	300
FJ915121.1	 ATCATTTGGTAGTATCCACCACATCCATCTTGTCAAACCTCCGAGGCTTTTGTACTGAGGGA	5053

ภาพผนวกที่ ค6 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Nucleotide-nucleotide blast (blastn)

เพื่อหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองนางรอง
กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนต้านทาน *Pid2* (FJ915121.1)
ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Genbank

นางรอง	CCACACAGGCTTCTTGCCCTACGAGTACATGGCGAAAGGGTCGCTGGATAAGTGGATTTTC	360
FJ915121.1	 CCACACAGGCTTCTTGCCCTACGAGTACATGGCGAATGGGTCTGCTGGATAAGTGGATTTTC	5113
นางรอง	CATTCTAAAGAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAGGTTTAAACATTGCGCTTGGGA	420
FJ915121.1	 CATTCTAAAGAAGATGATCACCTGCTCGACTGGGATACAAGGTTTAAACATTGCGCTTGGGA	5173
นางรอง	ACGGCAAAGGGATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTCTGAAGATTGTACACTGTGAC	480
FJ915121.1	 ACGGCAAAGGGATTGGCATACCTCCATCAGGACTGCGATTCTGAAGATTGTACACTGTGAC	5233
นางรอง	ATTAAGCCTGAGAATGTTCTACTTGACGACAACCTTCATCGCAAAGGTATCTGATTTTGGC	540
FJ915121.1	 ATTAAGCCTGAGAATGTTCTACTTGACGACAACCTTCATCGCAAAGGTATCTGATTTTGGC	5293
นางรอง	CTTGCCAAGTTGATGACCAGGGAGCAGAGCCATGTTTTCTACTACGCTCAGAGGCACGCGC	600
FJ915121.1	 CTTGCCAAGTTGATGACCAGGGAGCAGAGCCATGTTTTCTACTACGCTCAGAGGCACGCT	5353
นางรอง	GGGTACCTTGACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTCAGAGAAGAGTGATGTGTAC	660
FJ915121.1	 GGGTACCTTGACCTGAGTGGCTCACCAACTATGCCATCTCAGAGAAGAGTGATGTGTAC	5413
นางรอง	AGCTACGGCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAAGAGCTACGATCCCTCGGAG	720
FJ915121.1	 AGCTACGGCATGGTTTTGCTTGAGATAATCGGTGGGAGGAAGAGCTACGATCCCTCGGAG	5473
นางรอง	ATCTCCGAGAAGGCTCACTTCCTTCCTTTGCATTCAAGAAGCTGGAGGAAGGCGATCTT	780
FJ915121.1	 ATCTCCGAGAAGGCTCACTTCCTTCCTTTGCATTCAAGAAGCTGGAGGAAGGTGATCTT	5533
นางรอง	CAGGACATCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGATGGGCGGGTCGAGACCGCG	840
FJ915121.1	 CAGGACATCTTCGACGCCAAGCTGAAGTACAATGACAAGGATGGGCGGGTCGAGACCGCG	5593
นางรอง	ATCAAGGTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACCAGAGACCATCCATGTCAAAG	900
FJ915121.1	 ATCAAGGTCGCGCTCTGGTGCATCCAGGATGATTTCTACCAGAGACCATCCATGTCAAAG	5653
นางรอง	GTTGTGCAGATGCTCGAAGGCGTCTGCGAGGTGCT	935
FJ915121.1	 GTTGTGCAGATGCTCGAAGGCGTCTGCGAGGTGCT	5688

ภาพผนวกที่ ๑๖ (ต่อ)

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ง

การศึกษาปฏิบัติการตอบสนองทางโรคไขว้ของข้าวพันธุ์นิปอนบาเร่ที่มี
ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ต่อเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทย จำนวน 8 ไอโซเลต

พ.ศ. ๒๕๕๖

ตารางผนวกที่ ง1 ผลการให้คะแนนการเกิดโรคใบไหม้ของข้าวนิปปอนbare ที่มีถิ่นกำเนิด
โรคไหม้ *Pi9*

<i>M. grisea</i>	ตัวอย่างข้าว	ผลการศึกษาปฏิบัติการตอบสนองทางโรคใบไหม้		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
1. BAG 1.4	Nipponbare	0	0	0
	Nipponbare (<i>Pi9</i>)	0	0	0
	KDML105	6	6	4
2. BAG 2.4	Nipponbare	0	0	0
	Nipponbare (<i>Pi9</i>)	0	0	0
	KDML105	4	3	4
3. BAG 3.5	Nipponbare	0	0	0
	Nipponbare (<i>Pi9</i>)	0	0	0
	KDML105	3	4	3
4. BAG 4.4	Nipponbare	0	0	0
	Nipponbare (<i>Pi9</i>)	0	0	0
	KDML105	3	3	4
5. BAG 5.4	Nipponbare	0	0	0
	Nipponbare (<i>Pi9</i>)	0	0	0
	KDML105	6	5	4
6. BAG 7.2	Nipponbare	0	0	0
	Nipponbare (<i>Pi9</i>)	0	0	0
	KDML105	6	6	6
7. BAG 8.5	Nipponbare	5	4	6
	Nipponbare (<i>Pi9</i>)	0	0	1
	KDML105	6	6	6
8. BAG 9.2	Nipponbare	0	0	0
	Nipponbare (<i>Pi9</i>)	0	0	0
	KDML105	6	6	6

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

- หมายเหตุ 0 ไม่มีการเข้าทำลายด้วยเชื้อราโรคใบไหม้
- 1 จุดสีน้ำตาลขนาดเล็กกว่า 0.5 มิลลิเมตร ไม่มีการสร้างสปอร์
 - 2 จุดสีน้ำตาลขนาด 0.5-1.0 มิลลิเมตร ไม่มีการสร้างสปอร์
 - 3 แผลรูปร่างกลมถึงรียาวขนาด 1.0-3.0 มิลลิเมตร มีสีเทาตรงกลาง และมีสีน้ำตาลตามขอบ ไม่มีการสร้างสปอร์
 - 4 มีแผลเป็นรูปกระสวยที่สามารถสร้างสปอร์ได้ ขนาดตั้งแต่ 3.0 มิลลิเมตร ขึ้นไป แผลมีสีเทาตรงกลางและสีน้ำตาลแดงโดยรอบ
 - 5 มีแผลเหมือนระดับ 4 แต่ใบข้าวเริ่มมีการแห้งเหี่ยว
 - 6 ใบข้าวแห้งเหี่ยวและมีละอองสปอร์ของเชื้อรามากมาย



ภาคผนวก จ

สรุปการกระจายตัวของอัลลีลในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้

ตารางผนวกที่ ๑1 สรุปการกระจายตัวของอัลลีลในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ pB8 สำหรับยีน *Pi9*, R36STS สำหรับยีนต้านทาน *Pi36* และ Con2F/Con2R สำหรับยีนต้านทาน *Pid2*

No.	label	<i>Pi9</i> *		<i>Pi-d2</i> **			<i>Pi36</i> ***		
		R	S	400,700 bp	1,100 bp	NA	100,200,800 bp	100,400,500 bp	100,800 bp
1	U 38	R			1,100				NA
2	U 39		S		1,100		100,200,800		
3	U 41		S			NA	100,200,800		
4	U 42	R				NA	100,200,800		
5	U 43	R				NA	100,200,800		
6	U 44	R		400,700			100,200,800		
7	U 45	R			1,100		100,200,800		
8	U 46	R			1,100		100,200,800		
9	U 48	R			1,100		100,200,800		
10	U 49	R			1,100		100,200,800		
11	U 50	R		400,700			100,200,800		
12	U 51	R			1,100		100,200,800		
13	U 52	R		400, 700			100,200,800		
14	U 53	R				NA	100,200,800		
15	U 55	R		400, 700			100,200,800		
16	U 56	R			1,100		100,200,800		

ตารางผนวกที่ ๑1 (ต่อ)

No.	label	<i>Pi9*</i>		<i>Pi-d2**</i>			<i>Pi36***</i>			
		R	S	400,700 bp	1,100 bp	NA	100,200,800 bp	100,400,500 bp	100,800 bp	NA
17	U 57	R			1,100		100,200,800			
18	U 60		S	400, 700			100,200,800			
19	U 61	R			1,100		100,200,800			
20	S 71		S	400, 700					100,800	
21	S 72		S	400, 700					100,800	
22	S 73		S	400, 700				100,400,500		
23	S 74		S	400, 700					100,800	
24	S 75		S	400, 700						NA
25	S 76		S	400, 700				100,400,500		
26	S 77		S	400, 700					100,800	
27	S 78		S	400, 700			100,200,800			
28	S 79		S	400, 700			100,200,800			
29	S 80		S	400, 700				100,400,500		
30	S 81	R			1,100				100,800	
31	S 82		S	400, 700				100,400,500		
32	S 83		S	400, 700			100,200,800			
33	S 84		S	400, 700						NA

ตารางผนวกที่ จ1 (ต่อ)

No.	label	<i>Pi9*</i>		<i>Pi-d2**</i>			<i>Pi36***</i>			
		R	S	400,700 bp	1,100 bp	NA	100,200,800 bp	100,400,500 bp	100,800 bp	NA
34	S 85		S	400, 700						NA
35	S 86		S	400, 700			100,200,800			
36	S 87		S	400, 700					100,800	
37	S 88		S	400, 700				100,400,500		
38	S 89		S	400, 700				100,400,500		
39	S 90		S	400, 700			100,200,800			
40	S 91		S	400, 700				100,400,500		
41	S 92		S	400, 700			100,200,800			
42	S 93		S	400, 700			100,200,800			
43	S 94		S	400, 700				100,400,500		
44	S 95		S	400, 700			100,200,800			
45	S 96		S	400, 700			100,200,800			
46	S 97		S	400, 700			100,200,800			
47	S 98		S	400, 700			100,200,800			
48	S 99		S	400, 700				100,400,500		
49	S 100		S	400, 700			100,200,800			
50	S 101		S	400, 700			100,200,800			

ตารางผนวกที่ ๑1 (ต่อ)

No.	label	<i>Pi9*</i>		<i>Pi-d2**</i>			<i>Pi36***</i>			
		R	S	400,700 bp	1,100 bp	NA	100,200,800 bp	100,400,500 bp	100,800 bp	NA
51	S 102		S	400, 700			100,200,800			
52	S 103		S	400, 700			100,200,800			
53	S 104		S	400, 700						NA
54	S 105		S	400, 700				100,400,500		
55	S 106		S	400, 700				100,400,500		
56	S 107		S	400, 700			100,200,800			
57	S 108		S	400, 700				100,400,500		
58	S 109		S	400, 700				100,400,500		
59	S 110		S	400, 700						NA
60	L 1		S	400,700			100,200,800			
61	L 2	R			1,100		100,200,800			
62	L 3		S	400,700				100,400,500		
63	L 4	R			1,100		100,200,800			
64	L 5	R			1,100		100,200,800			
65	L 6	R			1,100		100,200,800			
66	L 7		S	400,700					100,800	
67	L 8		S	400,700			100,200,800			

ตารางผนวกที่ ๑1 (ต่อ)

No.	label	<i>Pi9*</i>		<i>Pi-d2**</i>			<i>Pi36***</i>			
		R	S	400,700 bp	1,100 bp	NA	100,200,800 bp	100,400,500 bp	100,800 bp	NA
68	L 9	R			1,100		100,200,800			
69	L 10		S	400,700					100,800	
70	L 11		S	400,700					100,800	
71	L 12		S	400,700					100,800	
72	L 13		S	400,700					100,800	
73	L 14		S	400,700					100,800	
74	L 15		S	400,700			100,200,800			
75	L 16		S	400,700						NA
76	L 17		S	400,700						NA
77	L 18		S	400,700					100,800	
78	L 19		S	400,700					100,800	
79	L 20	R			1,100					NA
80	L 21		S	400,700					100,800	
81	L 22		S		1,100					NA
82	L 23		S			NA	100,200,800			
83	L 24		S	400,700			100,200,800			
84	L 25	R		400,700					100,800	

ตารางผนวกที่ ๑1 (ต่อ)

		<i>Pi9*</i>		<i>Pi-d2**</i>			<i>Pi36***</i>		
label		R	S	400,700 bp	1,100 bp	NA	100,200,800 bp	100,400,500 bp	100,800 bp NA
85	L 26		S	400,700			100,200,800		
86	L 27		S	400,700			100,200,800		
87	L 28		S	400,700			100,200,800		
88	L 29		S	400,700					100,800
89	L 30		S	400,700			100,200,800		
90	L 31		S	400,700			100,200,800		
91	L 32		S	400,700					100,800
92	L 33	R		400,700					100,800
93	L 34		S	400,700				100,400,500	
94	L 35		S	400,700			100,200,800		
95	L 36		S	400,700					NA
96	L 37		S	400,700					100,800
97	L 38	R			1,100		100,200,800		
98	L 39	R			1,100				NA
99	L 40	R		400,700					NA
100	L 41		S			NA			100,800
101	L 42		S	400,700					NA

ตารางผนวกที่ ๑1 (ต่อ)

No.	label	<i>Pi9*</i>		<i>Pi-d2**</i>			<i>Pi36***</i>			
		R	S	400,700 bp	1,100 bp	NA	100,200,800 bp	100,400,500 bp	100,800 bp	NA
102	L 43		S	400,700			100,200,800			
103	L 44	R		400,700						NA
104	L 45		S	400,700			100,400,500			
105	L 46	R		400,700			100,200,800			
106	L 47		S	400,700					100,800	
107	L 48		S	400,700					100,800	
108	L 49		S	400,700						NA
109	L 50	R		400,700					100,800	
110	L 51	R			1,100		100,200,800			
111	L 52	R		400,700			100,200,800			
112	L 53	R		400,700						NA
113	L 54		S	400,700					100,800	
114	L 55		S	400,700			100,200,800			
115	L 56		S		1,100				100,800	
116	L 57		S	400,700			100,200,800			
117	L 58		S	400,700			100,200,800			
118	L 59		S	400,700			100,200,800			

ตารางผนวกที่ ๑1 (ต่อ)

No.	label	<i>Pi9*</i>		<i>Pi-d2**</i>			<i>Pi36***</i>			
		R	S	400,700 bp	1,100 bp	NA	100,200,800 bp	100,400,500 bp	100,800 bp	NA
119	L 60		S	400,700			100,200,800			
120	L 61		S	400,700			100,200,800			
121	L 62		S	400,700			100,200,800			
122	L 63		S	400,700			100,200,800			
123	L 64		S	400,700			100,200,800			
124	L 65		S	400,700					100,800	
125	L 66	R			1,100					NA
126	L 67	R			1,100				100,800	
127	L 68	R		400,700			100,200,800			
128	L 69	R			1,100			100,400,500		
129	L 70		S		1,100				100,800	
130	L 71		S	400,700					100,800	
131	L 72		S		1,100		100,200,800			
132	L 73	R			1,100		100,200,800			
133	L 74		S	400,700			100,200,800			
134	L 75		S	400,700			100,200,800			
135	L 76	R				NA	100,200,800			

ตารางผนวกที่ ๑1 (ต่อ)

No.	label	<i>Pi9*</i>		<i>Pi-d2**</i>			<i>Pi36***</i>			
		R	S	400,700 bp	1,100 bp	NA	100,200,800 bp	100,400,500 bp	100,800 bp	NA
136	L 77		S	400,700			100,200,800			
137	L 78		S	400,700					100,800	
138	L 79		S			NA			100,800	
139	L 80		S		1,100				100,800	
140	L 81		S	400,700			100,200,800			
141	L 82	R			1,100		100,200,800			
142	L 83		S			NA			100,800	
143	L 84		S			NA			100,800	
144	L 85		S		1,100		100,200,800			
145	L 86		S	400,700					100,800	
146	L 87		S	400,700						NA
147	L 88	R			1,100				100,800	
148	L 89	R			1,100		100,200,800			
149	L 90		S			NA	100,200,800			
150	L 91	R		400,700			100,200,800			
151	L 92	R			1,100		100,200,800			
152	L 93	R		400,700						NA

ตารางผนวกที่ ๑1 (ต่อ)

No.	label	<i>Pi9*</i>		<i>Pi-d2**</i>		<i>Pi36***</i>				
		R	S	400,700 bp	1,100 bp	NA	100,200,800 bp	100,400,500 bp	100,800 bp	NA
153	L 94	R			1,100		100,200,800			
154	L 95		S		1,100		100,200,800			
155	L 96	R		400,700					100,800	
156	L 97		S	400,700					100,800	
157	L 98	R		400,700					100,800	
158	L 99	R		400,700					100,800	
159	E 100		S	400,700			100,200,800			
160	E 101	R		400,700			100,200,800			
161	E 102	R		400,700					100,800	
162	E 103		S	400,700			100,200,800			
163	E 104	R			1,100		100,200,800			
164	E 105	R			1,100		100,200,800			
165	E 106	R			1,100		100,200,800			
166	E 107		S	400,700			100,200,800			
167	E 108		S	400,700					100,800	
168	E 109		S	400,700			100,200,800			
169	E 110		S	400,700					100,800	

ตารางผนวกที่ จ1 (ต่อ)

No.	label	<i>Pi9*</i>		<i>Pi-d2**</i>			<i>Pi36***</i>			
		R	S	400,700 bp	1,100 bp	NA	100,200,800 bp	100,400,500 bp	100,800 bp	NA
170	E 111	R			1,100		100,200,800			
171	E 112	R			1,100		100,200,800			
172	E 113		S		1,100				100,800	
173	E 114		S	400,700					100,800	
174	E 115		S	400,700					100,800	
175	E 116		S	400,700			100,200,800			
176	E 117		S	400,700					100,800	
177	E 118	R		400,700			100,200,800			
178	E 119	R		400,700			100,200,800			
179	E 120		S	400,700			100,200,800			
180	E 121		S	400,700					100,800	
181	E 122		S	400,700					100,800	
182	E 123		S	400,700					100,800	
183	E 124		S	400,700					100,800	
184	E 125		S	400,700					100,800	
185	E 126		S	400,700					100,800	
186	E 127		S	400,700					100,800	

ตารางผนวกที่ ๑1 (ต่อ)

No.	label	<i>Pi9*</i>		<i>Pi-d2**</i>			<i>Pi36***</i>			
		R	S	400,700 bp	1,100 bp	NA	100,200,800 bp	100,400,500 bp	100,800 bp	NA
187	E 128		S	400,700					100,800	
188	E 129		S	400,700					100,800	
189	E 130		S	400,700					100,800	
190	E 131	R			1,100		100,200,800			
191	E 132		S	400,700			100,200,800			
192	E 133	R			1,100		100,200,800			
193	E 134		S	400,700			100,200,800			
194	E 135		S	400,700			100,200,800			
195	E 136		S	400,700					100,800	
196	E 137		S	400,700			100,200,800			
197	E 138	R			1,100					NA
198	E 139		S		1,100					NA
199	E 140	R			1,100					NA
200	E 141		S		1,100		100,200,800			
201	E 142		S	400,700			100,200,800			
202	E 143		S		1,100		100,200,800			
203	E 144	R		400,700	1,100			100,400,500		

ตารางผนวกที่ จ1 (ต่อ)

หมายเหตุ $Pi9^*$ = R หมายถึง อัลลีล resistance ของยีน $Pi9$ ที่ต้านทานต่อโรคไหม้ ของพันธุ์ข้าวพื้นเมือง ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย เครื่องหมายดีเอ็นเอ pB8 ที่จำเพาะกับยีน $Pi9$ ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส

S หมายถึง อัลลีล susceptible ของยีน $Pi9$ ของพันธุ์ข้าวพื้นเมือง ที่ไม่ต้านทานต่อโรคไหม้

$Pi-d2^{**}$ = R หมายถึง อัลลีล resistance ของยีน $Pid2$ ที่ต้านทานต่อโรคไหม้ ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ $MluI$ สามารถตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ของตัวอย่างพันธุ์ข้าวได้ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน $Pid2$ ทำให้ได้ ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 400 และ 700 คู่เบส

S หมายถึง อัลลีล susceptible ของยีน $Pid2$ ที่ไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ $MluI$ ไม่สามารถตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ของตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมือง ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน $Pid2$ ทำให้ได้ ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส

$Pi36^{***}$ = A หรือ S หมายถึง อัลลีล susceptible ของยีน $Pi36$ ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

R36STS สำหรับยีนต้านทาน $Pi36$ แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ $HinfI$ ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 100 และ 800 คู่เบส

B หมายถึง อัลลีล B ของยีน $Pi36$ ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS สำหรับยีนต้านทาน $Pi36$ แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ $HinfI$ ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 100 400 และ 800 คู่เบส

C หมายถึง อัลลีล C ของยีน $Pi36$ ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS สำหรับยีน ต้านทาน $Pi36$ แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ $HinfI$ ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 100 200 และ 800 คู่เบส

NA = ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นางสาวอิงออน สีแก้ว
วันที่เกิด 20 กันยายน พ.ศ. 2527
สถานที่เกิด อำเภอเมือง จังหวัดกระบี่
ประวัติการศึกษา วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
ตำแหน่งปัจจุบัน -
สถานที่ทำงานปัจจุบัน -
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ -
ทุนการศึกษาที่ได้รับ โครงการทุนวิจัยมหบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พ.ศ. 2551)