รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจค้นจีโนมข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยเพื่อหายีนต้านทานโรคเชื้อราใบไหม้ และปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวที่มียีนต้านทานต่อเชื้อราใบไหม้ สายพันธุ์ต่าง ๆ ในประเทศไทย

Genome scan for rice blast resistance genes in landrace Thai rice and disease spectrum of rice blast resistance genes to *Magnaporthe grisea* strains in Thailand

โดย

ผศ. ดร. สุรีพร เกตุงาม
ผศ. ดร. ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์

คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

กันยายน พ.ศ. 2555

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การตรวจค้นจีโนมข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยเพื่อหายีนต้านทานโรคเชื้อราใบไหม้ และปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวที่มียีนต้านทานต่อเชื้อราใบไหม้ สายพันธุ์ต่าง ๆ ในประเทศไทย

Genome scan for rice blast resistance genes in landrace Thai rice and disease spectrum of rice blast resistance genes to *Magnaporthe grisea* strains in Thailand

คณะผู้วิจัย

ผศ. ดร. สุรีพร เกตุงาม
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ผศ. ดร. ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552 - 2553

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อบ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปผู้บริหาร

โรคใบไหม้ข้าว (Rice blast) จัดเป็นปัญหาสำคัญหนึ่งของการผลิตข้าวทั่วโลก มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Magnaporthe grisea* ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถทำลายต้นข้าวได้ทุกระยะของการเจริญเติบโต ประเทศไทยตั้งอยู่ในบริเวณความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว การได้มาและการเก็บรักษาพันธุ์ข้าวป่าและข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มียีนสำคัญทางเศรษฐกิจโดยเฉพาะยีนต้านทานโรคไหม้ถือได้ว่าเป็นการรักษาแหล่งพันธุกรรมข้าวที่สำคัญ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อ 1) สำรวจและค้นหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรคเชื้อราใบไหม้ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย เพื่อใช้เป็นแหล่งของยีนชนิดใหม่ๆที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของประเทศ 2) ศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองทางโรคพืชของข้าวที่มียีนต้านทานโรค (*Pi9*) กับเชื้อราโรคใบไหม้สายพันธุ์ต่าง ๆ ในประเทศไทย และ 3) ศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองทางโรคพืชของข้าวพื้นเมืองไทยที่มียีนต้านทานโรคไหม้ต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ ต่าง ๆ ในประเทศไทย

จากการตรวจค้นจีโนมข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยเพื่อหายีนต้านทานโรคไหม้จำนวน 10 ยีน ประกอบด้วยยีน *Pi9, Pi-d2, Pi36, Pi-ta, Pib, Pi1(t), Pid3, Pi2(t), Pi54, และ Pigm(t)* ในข้าวพื้นเมืองไทย รวม 201 พันธุ์ ประกอบด้วย พันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 19 พันธุ์ พันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 38 พันธุ์ พันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 144 พันธุ์ (ข้าวนาสวนพื้นเมือง และข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง จำนวน 99 และ 45 พันธุ์ ตามลำดับ) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาตรงตำแหน่งยีน (gene specific markers) จำนวน 8 เครื่องหมาย ได้แก่ pB8-Pi9*(Pi9)*, NBS2-Pi9*(Pi9)*, Pi-d2, Pi-ta, Pibdom *(Pib)*, Pi-d3Cap1 *(Pi-d3)*, Pi-d3Cap2 *(Pi-d3)*, และ Pi54indel (*Pi54*) และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรคไหม้ จำนวน 6 เครื่องหมาย ได้แก่ R36STS *(Pi36)*, RM1233 *[Pi1(t)]*, SSR140 *[Pi2(t)]*, Pi54SSR *(Pi54)*, Pigm(t)C5483, และ Pigm(t)S29742 *[Pigm(t)]* พบว่า

1. ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ใกล้กับบริเวณเซนโตรเมียร์ของโครโมโซมคู่ที่ 6 และได้รับการถ่ายทอดมาจากข้าวป่า (*Oryza minuta*) เป็นยีนที่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์ (broad-spectrum resistance) จากการค้นหายีน *Pi9* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ NBS2-Pi9-195-1 ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตรงตำแหน่งยีน *Pi9* พบตัวอย่างข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* จำนวน 57 พันธุ์ คิดเป็น 28.36 เปอร์เซ็นต์ของข้าวพื้นเมืองที่ศึกษาทั้งหมด พบมากในข้าวพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 47 พันธุ์ และข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 10 พันธุ์ และไม่พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ในข้าวพื้นเมืองภาคใต้ที่ทำการศึกษาครั้งนี้

2. ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* มีตำแหน่งอยู่บน centromere ของโครโมโซมคู่ที่ 6 มีโครงสร้างของโปรตีนเป็นน้ำตาลแมนโนสจับกับแลคตินอยู่ภายนอกเซลล์ (a bulb-type mannose specific binding lectin, B-lectin) และในส่วนภายในเซลล์มีโครงสร้าง serine-threonine kinase domain โดยข้าวที่มีแอล ลีลต้านทานและข้าวที่แอลลีลไม่ต้านทานมีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันเพียงหนึ่งตำแหน่งคือ ตำแหน่ง 441 จากการศึกษาพบว่ามีข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* จำนวน 137 พันธุ์ คิดเป็น 68.16 เปอร์เซ็นต์ ของข้าวพื้นเมืองที่ใช้ศึกษาทั้งหมด โดยพบมากในข้าวพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 96 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 37 พันธุ์ และข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 4 พันธุ์ และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบ (BLAST) กับฐานข้อมูล NCBI ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pi-d2* ซึ่งเป็นส่วนของโปรตีน B-lectin receptor kinase ในฐานข้อมูล

3. ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* เป็นยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง สามารถต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศจีนได้หลายสายพันธุ์ มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 8 อยู่ใกล้ชิดกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS มีโครงสร้างโปรตีนของยีนต้านทานโรคเป็นแบบ nucleotide binding site (NBS) และ leucine rich repeat (LRR) จากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS พบข้าวพื้นเมืองที่มีแอลลีลต้านทาน จำนวน 120 พันธุ์ เป็นแอลลีล A จำนวน 18 พันธุ์ และอัลลีล B จำนวน 102 พันธุ์ คิดเป็น 59.70 เปอร์เซ็นต์ของข้าวที่ศึกษา และพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* ในข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 74 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 28 พันธุ์ และ ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 18 พันธุ์

4. ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 12 ใกล้ชิดกับตำแหน่งเซนโทรเมียร์ มีถิ่นกำเนิดในข้าวอินดิกา มีโครงสร้างโปรตีนของยีนต้านทานโรคแบบ nucleotide binding site (NBS) และ leucine rich repeat (LRR) จากการค้นหายีน *Pi-ta* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตรงตำแหน่งยีน พบแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* ในข้าวที่ใช้ศึกษาจำนวน 57 พันธุ์ คิดเป็น 28.36 เปอร์เซ็นต์ของข้าวพื้นเมืองที่ศึกษาทั้งหมด โดยพบในข้าวพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 38 พันธุ์ และข้าวพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 19 พันธุ์ แต่ไม่พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* ในข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ

5. ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-b* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2 สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในญี่ปุ่นได้หลายสายพันธุ์ และเป็นยีนต้านทานโรคไหม้ยีนแรกที่ได้รับการโคลนยีน ต่อมาได้มีพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pibdom เพื่อใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* โดยพบยีน *Pib* ในข้าวที่ใช้ศึกษาจำนวน 75 พันธุ์ คิดเป็น 37.31 เปอร์เซ็นต์ของข้าวที่ใช้ศึกษาทั้งหมด พบมากในข้าวพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 61 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ 8 พันธุ์ และ ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ 6 พันธุ์

6. ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-1(t)* เป็นยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง (broad spectrum resistance) มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 ใกล้ชิดกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233 จากการศึกษาพบพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* จำนวน 10 พันธุ์ คิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ของข้าวพื้นเมืองที่ศึกษาทั้งหมด พบมากในข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือจำนวน 6 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 2 พันธุ์ และข้าวพื้นเมืองภาคใต้ 2 พันธุ์

7. ยีน *Pid3* เป็นยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง พบมากในข้าวอินดิกา มีโครงสร้างโปรตีนต้านทานโรคเป็นแบบ Nucleotide-binding site – Leucine rich repeat (NBS-LRR) ใกล้ชิดกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-1 และ Pid3-dCAPS-2 จากการค้นหายีน *Pi-d3* โดยใช้ Pid3-dCAPS-1 และ Pid3-dCAPS-2 พบข้าวพื้นเมืองมียีน *Pi-d3* จำนวน 155 พันธุ์ และ 184 พันธุ์ ตามลำดับ คิดเป็น 77.11 เปอร์เซ็นต์ และ 91.54 เปอร์เซ็นต์ ของข้าวพื้นเมืองที่ศึกษาทั้งหมดตามลำดับ โดยพบในข้าวพื้นเมืองอีสานมากที่สุด จำนวน 107 พันธุ์ และ 137 พันธุ์ ตามลำดับ ที่น่าสนใจ คือ ตรวจพบยีน *Pid3* ในข้าวพื้นเมืองภาคใต้ที่ทำการศึกษาครั้งนี้ทุกพันธุ์ จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* บนฐานข้อมูล NCBI ระหว่างข้าวที่มีแอลลีลต้านทานและไม่ต้านทาน พบว่ามีความแตกต่างกัน 1 ตำแหน่ง โดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์ C ในพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* และพบลำดับนิวคลีโอไทด์ T ในพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทาน เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน และเปรียบเทียบกับลำดับกรด อะมิโนของยีน *Pi-d3* บนฐานข้อมูล NCBI (FJ773285 (Pid3-9311)) พบว่า การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์จาก C เป็น T ในข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทาน (*pi-d3*) ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นรหัสหยุดก่อนกำหนด (nonsense mutation) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Shang et al., (2009) และ Chen et al., (2011) ซึ่งรายงานว่า ปกติยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* จะสังเคราะห์กรดอะมิโนทั้งสิ้น 924 ตัว ซึ่งจะพบในข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีน *Pi-d3* แต่ในพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทานจะสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนได้เพียง 737 ตัว เนื่องจากเกิดการกลายพันธุ์เป็นรหัสหยุดก่อนกำหนด อีกทั้งการกลายพันธุ์ดังกล่าวยังเกิดขึ้นที่บริเวณ Leucine-rich repeats ทำให้การสร้าง Leucine-rich repeats โปรตีนไม่สมบูรณ์จึงทำให้ข้าวสูญเสียความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้

8. ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-2(t)* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 เป็นยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง (broad spectrum blast resistance) ขนาบข้าง (flanking markers) ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR140 และ RFLP JSH12 โดยมีตำแหน่งห่างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR140 ประมาณ 0.9 cM เมื่อนำมาค้นหายีน *Pi-2(t)* ในข้าวพื้นเมืองโดยใช้เครื่องหมาย SSR140 พบข้าวพื้นเมืองที่มียีน *Pi-2(t)* จำนวน 131 พันธุ์ คิดเป็น 65.17 เปอร์เซ็นต์ของข้าวพื้นเมืองที่ศึกษาทั้งหมด โดยพบมากในข้าวพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 122 พันธุ์ ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 8 พันธุ์ และ ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 1 พันธุ์

9. ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* (*Pi-k^{h}*) มีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 11 มีโครงสร้างโปรตีนเป็นแบบ Nucleotide–binding site leucine rich repeat (NBS-LRR) สามารถต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุของโรคใบไหม้ได้หลายสายพันธุ์ มีตำแหน่งใกล้ชิดกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM206 และ Pi54-indel (MAS) จากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54-*indel(*MAS) ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาจากยีน *Pi54* โดยตรงตรวจสอบหายีน *Pi54* ในข้าวพื้นเมือง พบพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มียีน *Pi54* จำนวน 10 พันธุ์ ซึ่งเป็นข้าวไร่พื้นเมืองจากภาคเหนือ และไม่พบยีน *Pi54* ในข้าวพื้นเมืองอีสาน และข้าวพื้นเมืองภาคใต้ที่ทำการศึกษาครั้งนี้

10. ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* พบครั้งแรกในข้าวสายพันธุ์ Gumei 4 ของประเทศจีน เป็นยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง อยู่ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 และ C0428 บนโครโมโซม 6 จัดอยู่ในกลุ่มของยีนต้านทานโรคชนิด Nucleotide-binding site – Leucine rich repeat (NBS-LRR) จากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ในข้าวพื้นเมืองโดยใช้เครื่องหมาย C5483 พบแอลลีลต้านทานของยีน *Pigm(t)* ในข้าวจำนวน 198 พันธุ์ คิดเป็น 98.51 เปอร์เซ็นต์ของข้าวพื้นเมืองที่ตรวจสอบทั้งหมด พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* มากในข้าวพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 144 พันธุ์ และเมื่อตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 พบพันธุ์ข้าวมียีน *Pigm(t)* จำนวน 146 พันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 72.64 ของข้าวพื้นเมืองที่ตรวจสอบทั้งหมด พบมากในข้าวพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 100 พันธุ์

เมื่อศึกษาการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองภาคต่างๆ พบว่าข้าวพื้นเมืองที่นำมาตรวจสอบมียีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* มากที่สุด จำนวน 198 พันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 98.51 ของข้าวพื้นเมืองทั้งหมด รองลงมา ได้แก่ ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3, Pi-d2, Pi-2(t), Pi36, Pib, Pi9, Pi-ta, Pi-1(t)* และ *Pi54* ในพันธุ์ข้าวพื้นเมือง จำนวน 155, 137, 131, 120, 75, 57, 57, 36 และ 10 พันธุ์ ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 77.11, 68.16, 65.17, 59.70, 37.31, 28.36, 28.36, 17.91 และ 4.98 ของข้าวพื้นเมืองที่ทำการศึกษาทั้งหมด ตามลำดับ และจะพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t), Pi36, Pi9* และ *Pi54* ในข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 94.74, 84.21, 52.63, และ 52.63 ของข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือที่ทำการศึกษา ตามลำดับ ส่วนข้าวพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t), Pi2* และ *Pib*มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 100, 84.72 และ 42.36 ของข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ทำการศึกษาตามลำดับ และในข้าวพื้นเมืองภาคใต้พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* และ*Pigm(t)* ในทุกพันธุ์ที่ทำการตรวจสอบ และพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* และ *Pita* รองลงมา คิดเป็นร้อยละ 97.37 และ 50.00 ของข้าวพื้นเมืองภาคใต้ที่ทำการศึกษา ตามลำดับ

จากการตรวจค้นยีนต้านทานโรคไหม้ในจีโนมข้าวพื้นเมืองไทยจำนวน 10 ยีน ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ข้าวพื้นเมืองพันธุ์อีปง (Gs.3372) ซึ่งเป็นข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือมียีนต้านทานโรคไหม้มากที่สุด จำนวน 9 ยีน ได้แก่ *Pi1(t), Pi2(t), Pi9, Pi36, Pi-d2, Pi-d3, Pi-ta, Pib และ Pigm(t)* รองลงมาคือ พันธุ์หอมมะลิ (Gs.18419; L97) มียีนต้านทานโรคไหม้ จำนวน 8 ยีน ได้แก่ *Pi1(t), Pi2(t), Pi9, Pi-d2, Pi-d3, Pi-ta, Pib และ Pigm(t)* และ พันธุ์ห้วยแล้ง (U50) พันธุ์ขี้ตมขาว 222-42-5 (Gs.598; L30) พันธุ์พานทอง (Gs.3375; L55) พันธุ์ข้าวหอม (Gs.4829; L81) และพันธุ์กะทิ (Gs.5565; L89) ซึ่งมียีนต้านทานโรคไหม้ จำนวน 7 ยีน แตกต่างกันไป ตามลำดับ

การศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ *Magnaportae grisea* จำนวน 8 ไอโซเลท ที่เก็บรวบรวมมาจากพื้นที่ต่างๆในประเทศไทย ได้แก่ BAG1.4, BAG2.4, BAG3.5, BAG4.4, BAG5.4, BAG7.2, BAG8.5 และ BAG9.2 โดยศึกษาในข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์นิบปอนบาเร พันธุ์นิบปอนบาเรที่มียีน *Pi9* และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่าข้าวพันธุ์นิบปอนบาเรที่มียีน *Pi9* สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้ทั้ง 8 ไอโซเลท ข้าวนิบปอนบาเรที่เป็นข้าวพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่ไม่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* สามารถต้านทานได้ 7 ไอโซเลท ยกเว้นไอโซเลท BA8.5 ส่วนพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคใบไหม้ระดับปานกลางได้ 3 ไอโซเลท คือ BAG2.4, BAG3.5 และ BAG4.4 ที่เหลืออีก 4 ไอโซเลท ไม่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อ *M. grisea* แต่ละไอโซเลทในประเทศไทยมีความจำเพาะเจาะจงในการเข้าทำลายข้าวอินดิกา (พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105) มากกว่าข้าวจาปอนิกา (พันธุ์นิบปอนบาเร) จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทยที่ทำการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถเข้าทำลายข้าวจาปอนิกาพันธุ์นิปปอบบาเรที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ซึ่งเป็นยีนต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้แบบกว้างได้

การศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ จำนวน 28 พันธุ์ โดยใช้เชื้อ *M. grisea* จำนวน 10 ไอโซเลท ที่เก็บรวบรวมจากท้องที่ปลูกข้าวต่างๆในประเทศไทย พบว่าข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้สามารถต้านทานโรคไหม้ในระดับสูง (R) ได้จำนวน 14 พันธุ์ ประกอบด้วยข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และข้าวพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 10 พันธุ์ และ 3 พันธุ์ และ 1 พันธุ์ ตามลำดับ และข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้สามารถต้านทานโรคไหม้ในระดับปานกลาง (MR) ได้จำนวน 5 พันธุ์ ซึ่งเป็นข้าวพื้นเมืองภาคเหนือทั้งหมด และ ไม่ต้านทาน (S) จำนวน 7 พันธุ์ ประกอบด้วยข้าวพื้นเมืองภาคใต้และข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 5 พันธุ์ และ 2 พันธุ์ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นพหุคูณ (multiple regression analysis) ของข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้และปฏิกิริยาการตอบสนองต่อเชื้อ *M. grisea* พบว่า ลักษณะต้านทานโรคไหม้ที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการทำงานเสริมกันของยีนต้านทานโรคไหม้หลายๆยีน โดยยีน *Pi9* และ *Pi54* มีอิทธิพลต่อลักษณะการต้านทานโรคไหม้มากที่สุด

และเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54SSR และ NBS2Pi9 มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคไหม้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 20.86 และ 20.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้โดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของ Dice พบว่าสามารถจัดกลุ่มพันธุกรรมได้ 6 กลุ่ม โดยกลุ่มพันธุ์ข้าวที่ต้านทานโรคไหม้ส่วนใหญ่จะมียีน *Pi9* และ *Pi54*

ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการสืบค้นยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทย ซึ่งผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นถึงคุณค่าของข้าวพื้นเมือง ซึ่งเป็นแหล่งพันธุกรรมที่สำคัญของยีนต้านทานโรคไหม้ ดังนั้นจึงควรมีการเก็บรักษา และอนุรักษ์ข้าวพื้นเมืองเหล่านี้เอาไว้เพื่อไม่ให้สูญหายไปจากประเทศไทย เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ได้อย่างยั่งยืนต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: ยีนต้านทานโรคไหม้ ข้าวพื้นเมือง การตรวจค้นจีโนมข้าว เครื่องหมายดีเอ็นเอ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่ให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดิน ปี 2552 และ 2553 ภายใต้แผนงานสนับสนุนด้านวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี วิจัย และนวัตกรรม งานวิจัยเพื่อสร้างองค์ความรู้ รหัส 14706 ขอขอบคุณศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี กรมการข้าว ที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์ข้าวพื้นเมือง และข้าวพันธุ์ปรับปรุง ส่วนใหญ่ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์จากยีนข้าว ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ ขอขอบคุณ ดร. ธานี ศรีวงศ์ชัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อสาเหตุโรคไหม้ *(Magnaportae grisae)* บางส่วน ขอขอบคุณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้การสนับสนุนสถานที่วิจัย อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย ท้ายสุด ขอขอบคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมช่วยให้งานวิจัยนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจและค้นหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรคไหม้ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย เพื่อศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองทางโรคพืชของข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่าง ๆ ในประเทศไทย และเพื่อเพื่อศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองทางโรคพืชของข้าวพื้นเมืองไทยที่มียีนต้านทานโรคไหม้ต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ ต่าง ๆ ในประเทศไทย ดำเนินการตรวจค้นจีโนมข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยเพื่อหายีนต้านทานโรคไหม้จำนวน 10 ยีน ประกอบด้วยยีน *Pi9, Pi-d2, Pi36, Pi-ta, Pib, Pi1(t), Pid3, Pi2(t), Pi54, และ Pigm(t)* ในข้าวพื้นเมืองไทย รวม 201 พันธุ์ ประกอบด้วย พันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 19 พันธุ์ พันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 38 พันธุ์ พันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 144 พันธุ์ (ข้าวนาสวนพื้นเมือง และข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง จำนวน 99 และ 45 พันธุ์ ตามลำดับ) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาตรงตำแหน่งยีน (gene specific markers) จำนวน 8 เครื่องหมาย ได้แก่ pB8-Pi9 (*Pi9*), NBS2-Pi9 (*Pi9*), Pi-d2, Pi-d3Cap1 (*Pid3*), Pi-d3Cap2 (*Pid3*), Pi-ta (*Pita*), Pibdom (*Pib*) และ Pi54indel (*Pi54*) และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรคไหม้ จำนวน 6 เครื่องหมาย ได้แก่ R36STS *(Pi36)*, RM1233 *[Pi1(t)]*, SSR140 *[Pi2(t)*], Pi54SSR *(Pi54),* Pigm(t)C5483 *[Pigm(t)] และ* Pigm(t)S2974 *[Pigm(t)]* พบว่าข้าวพื้นเมืองไทยส่วนใหญ่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* โดยพบในข้าวพื้นเมืองจำนวน 198 พันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 98.51 ของข้าวพื้นเมืองทั้งหมด รองลงมา ได้แก่ ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3, Pi-d2, Pi-2(t), Pi36, Pib, Pi9, Pi-ta, Pi-1(t)* และ *Pi54* ในพันธุ์ข้าวพื้นเมือง จำนวน 155, 137, 131, 120, 75, 57, 57, 36 และ 10 พันธุ์ ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 77.11, 68.16, 65.17, 59.70, 37.31, 28.36, 28.36, 17.91 และ 4.98 ของข้าวพื้นเมืองที่ทำการศึกษาทั้งหมด ตามลำดับ และจะพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t), Pi36*, *Pi9* และ *Pi54* ในในข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 94.74, 84.21, 52.63 และ 52.63 ของข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือที่ทำการศึกษาตามลำดับ ส่วนข้าวพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t), Pi2(t)* และ *Pib*_มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 100, 84.72 และ 42.36 ของข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ทำการศึกษาตามลำดับ และในข้าวพื้นเมืองภาคใต้พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* และ*Pigm(t)* ในทุกพันธุ์ที่ทำการตรวจสอบ และพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* และ *Pita* รองลงมา คิดเป็นร้อยละ 97.37 และ 50.00 ของข้าวพื้นเมืองภาคใต้ที่ทำการศึกษา ตามลำดับ จากการตรวจค้นจีโนมยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทยจำนวน 10 ยีน ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ข้าวพื้นเมืองพันธุ์อีปง (Gs.3372) ซึ่งเป็นข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือมียีนต้านทานโรคไหม้มากที่สุด จำนวน 9 ยีน ได้แก่ *Pi1(t), Pi2(t), Pi9, Pi36, Pi-d2, Pi-d3, Pi-ta, Pib และ Pigm(t)*

การศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ *Magnaportae grisea* จำนวน 8 ไอโซเลท ที่เก็บรวบรวมมาจากพื้นที่ต่างๆในประเทศไทย ได้แก่ BAG1.4, BAG2.4, BAG3.5, BAG4.4, BAG5.4, BAG7.2, BAG8.5 และ BAG9.2 โดยศึกษาในข้าว 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์นิบปอนบาเร พันธุ์นิบปอนบาเรที่มียีน *Pi9* และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่าข้าวพันธุ์นิบปอนบาเรที่มียีน *Pi9* สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้ทั้ง 8 ไอโซเลท จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทยที่ทำการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถเข้าทำลายข้าวข้าวจาปอนิกา พันธุ์นิปปอบบาเรที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ซึ่งเป็นยีนต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้แบบกว้างได้

การศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ จำนวน 28 พันธุ์ โดยใช้เชื้อ *M. grisea* จำนวน 10 ไอโซเลท ที่เก็บรวบรวมจากท้องที่ปลูกข้าวต่างๆในประเทศไทย พบว่าข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้สามารถต้านทานโรคไหม้ในระดับสูง (R) ได้จำนวน 14 พันธุ์ ประกอบด้วยข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และข้าวพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 10 พันธุ์ และ 3 พันธุ์ และ 1 พันธุ์ ตามลำดับ และข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้สามารถต้านทานโรคไหม้ในระดับปานกลาง (MR) ได้จำนวน 5 พันธุ์ ซึ่งเป็นข้าวพื้นเมืองภาคเหนือทั้งหมด และ ไม่ต้านทาน (S) จำนวน 7 พันธุ์ ประกอบด้วยข้าวพื้นเมืองภาคใต้และข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 5 พันธุ์ และ 2 พันธุ์ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นพหุคูณ (multiple regression analysis) ของข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้และปฏิกิริยาการตอบสนองต่อเชื้อ *M. grisea* พบว่า ลักษณะต้านทานโรคไหม้ที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการทำงานเสริมกันของยีนต้านทานโรคไหม้หลายๆยีน โดยยีน *Pi9* และ *Pi54* มีอิทธิพลต่อลักษณะการต้านทานโรคไหม้มากที่สุด และเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54SSR และ NBS2Pi9 มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคไหม้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า R^2เท่ากับ 20.86 และ 20.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้โดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของ Dice พบว่าสามารถจัดกลุ่มพันธุกรรมได้ 6 กลุ่ม โดยกลุ่มพันธุ์ข้าวที่ต้านทานโรคไหม้ส่วนใหญ่จะมียีน *Pi9* และ *Pi54*

ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ข้าวพื้นเมืองไทยเป็นแหล่งพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้ที่สำคัญ เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ต่อไป ดังนั้นจึงควรอนุรักษ์ข้าวพื้นเมืองเหล่านี้เอาไว้เพื่อไม่ให้สูญหายไปจากประเทศไทย

คำสำคัญ: ยีนต้านทานโรคไหม้ ข้าวพื้นเมือง การตรวจค้นจีโนมข้าว เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Abstract

The objectives of this research were to investigate and to identify rice blast resistant genes in landrace Thai rice varieties as well as to evaluate disease spectrum of rice varieties containing *Pi9* resistant gene to rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*, isolates in Thailand and also to evaluate the disease spectrum of landrace Thai rice varieties containing blast resistant genes to rice blast fungus isolates in Thailand. Ten rice blast resistant genes including *Pi9, Pi-d2, Pi36, Pi-ta, Pib, Pi(t), Pid3, Pi2(t), Pi54, and Pigm(t)* were screened in 201 landrace Thai rice varieties: 19 from the North, 38 from the South and 144 from the Northeast regions of Thailand (consisted 99 rainfed lowland and 45 floating rice varieties) using 8 gene specific markers (pB8-Pi9, NBS2-Pi9, Pi54indel, Pi-d2, Pi-d3Cap1, Pi-d3Cap2, Pi-ta and Pibdom) and 6 linked DNA markers (R36STS *(Pi36)*, RM1233 *[Pi1(t)]*, SSR140 *[Pi2(t)*], Pi54SSR *(Pi54),* Pigm(t)C5483 *[Pigm(t)]* และ Pigm(t)S2974 *[Pigm(t)]).*

The results showed that the majority of landrace Thai rice varieties, 198 from 201 (98.51%), contain rice blast resistant gene, *Pigm(t).* Besides that 155 (77.11%), 137 (68.16%), 131 (65.17%), 120 (59.70%), 75 (37.31%), 57 (28.36%), 57 (28.36%), 36 (17.91%) and 10 (4.98%) varieties contain rice blast resistant gene *Pid3, Pi-d2, Pi-2(t), Pi36, Pib, Pi9, Pi-ta, Pi-1(t)* and *Pi54* respectively. Our results also showed that 94.74%, 84.21%, 52.63%, and 52.63% of landrace Thai rice varieties from the North contain rice blast resistant genes, *Pi1(t), Pi36*, *Pi9*, and *Pi54*, respectively. 100%, 84.72% and 42.36% of landrace Thai rice varieties from the Northeast contain rice blast resistant genes, *Pigm(t)*, *Pi2,* and *Pib*, respectively. *Pid3* and *Pigm(t)* were found in all of landrace rice varieties from the South in this study and *Pi-d2* and *Pita* were found accounted for 97.37% and 50% respectively. Our screening showed that E-pong rice variety (Gs.3372) from the Northeast is the landrace Thai rice variety containing the most rice blast resistant genes (9 genes) including *Pi1(t), Pi2(t), Pi9, Pi36, Pi-d2, Pi-d3, Pi-ta, Pib and Pigm(t)* in this study.

Three rice varieties: Nipponbare, Nipponbare with rice blast resistant gene, *Pi9*, and KDML105 were screened for rice blast disease reaction using 8 blast isolates collected from Thailand (BAG1.4, BAG2.4, BAG3.5, BAG4.4, BAG5.4, BAG7.2, BAG8.5 and

BAG9.2). Nipponbare with *Pi9* gene showed resistant reaction to all 8 blast isolates tested. From the results, it is suggested that rice blast resistant gene, *Pi9*, has a broad spectrum resistant to Thai blast isolates and is appropriated for rice blast resistant breeding program in Thailand.

Twenty-eight landrace Thai rice varieties containing several blast resistant genes (identified from DNA marker screening) were used for blast disease reaction rating with mixed 10 blast isolates collected in Thailand. The results revealed that 14 landrace Thai rice varieties showed resistant reaction (R). Ten, three and one varieties from the total of 14 varieties are from the North, the Northeast and the South respectively. Five landrace Thai rice varieties showed moderate resistant reaction (MR) which all comes from the North and 7 landrace Thai rice varieties showed susceptible reaction (S), 5 varieties from the South and 2 varieties from the Northeast. Multiple regression analysis between the rice blast resistant genes containing and the blast disease reaction revealed that the resistant reaction was the additive effect of several resistant genes which *Pi9* and *Pi54* have the most effect on blast resistant phenotype. DNA markers, Pi54SSR and NBS2Pi9, were statistically significant correlate with the disease reaction with R^2 equal to 20.86 and 20.33 percent respectively. The phylogenetic tree, constructed using genetic similarity calculated by DICE, showed 6 groups of landrace rice varieties which the resistant groups contain blast resistant genes, *Pi9* and *Pi54*.

The results from this study showed that landrace Thai rice varieties are an important source of blast resistant genes and they can be used in blast resistant breeding program. We should protect and preserve these valuable landrace Thai rice varieties for our sustainable rice production in Thailand.

Key words: blast resistant gene; landrace rice; rice genome screening; DNA markers

สารบัญเรื่อง

หน้า

บทสรุปผู้บริหาร ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ช
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฌ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฎ
สารบัญตาราง ..... ฏ
สารบัญภาพ ..... ณ
บทนำ 1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 3
การตรวจเอกสาร 4
วิธีการวิจัย 26
ผลการวิจัยและวิจารณ์ 41
พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา 41
การสกัดดีเอ็นเอ 50
การตรวจสอบยีนต้านทานโรคเชื้อราใบไหม้ในข้าวพื้นเมืองโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ 51
การศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ .. 115
การศึกษาสหสัมพันธ์ระหว่างยีนต้านทานโรคไหม้และปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ 133
การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ 137
สรุป 143
เอกสารอ้างอิง 145
ภาคผนวก 154
การนำเสนอผลงานวิจัย 163

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ยีนต้านทานโรคไหม้ และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการคัดเลือก.....	20
2	พันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้จาก IRRI	21
3	ยีนต้านทานโรคไหม้ที่ได้รับการโคลนยีน และโปรตีนต้านทานโรค.....	23
4	การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้...	26
5	แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคไหม้.....	30
6	การตรวจวัดปริมาณการเกิดโรคเชื้อราใบไหม้ในข้าว.....	38
7	พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการตรวจหายีนต้านทานโรคเชื้อราใบไหม้	41
8	รายชื่อพันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษาและแหล่งที่มา.....	42
9	การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi-d2* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ *Pi-d2* Con2F/Con2R..	52
10	การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi9* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ pB8	55
11	การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi9* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย *NBS2-Pi9-195-1*.....	57
12	การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS	60
13	การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi-ta* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-ta*...	62
14	รายชื่อพันธุ์ข้าวที่นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta*.....	64
15	การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pib* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pib*.....	68
16	การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi1(t)* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233	71
17	การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi-d3* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-d3*..	75

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
18	การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi-d3* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-2.....	76
19	รายชื่อพันธุ์ข้าวที่นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3*.....	78
20	การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi2(t)* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR140.....	81
21	การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi54* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54SSR	83
22	การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi54* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54-indel (Pi54MAS).....	84
23	รายชื่อพันธุ์ข้าวที่นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54*.....	85
24	การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pigm(t)* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ CAP marker-C5483.....	91
25	การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pigm(t)* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Indel S29742.....	94
26	รายชื่อพันธุ์ข้าวที่นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)*.....	92
27	การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9, Pi-d2, Pi36, Pi-ta, Pib, Pi1(t), Pi2(t), Pi-d3, Pi54* และ *Pigm(t)* ที่พบในข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ ภาคอีสาน และภาคใต้.....	94
28	การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta, Pib, Pi1(t), Pi9* และ *Pi2(t)* ที่พบในข้าวป่า.....	106
29	การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta, Pib, Pi1(t), Pi2(t), Pi-d3, Pi54, Pi9* และ *Pigm(t)* ที่พบในข้าวพันธุ์ปรับปรุงต้านทานโรคไหม้....	108

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
30	สรุปการตรวจค้นจีโนมข้าวพื้นเมืองเพื่อหายีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ แสดงจำนวนพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9, Pi-d2, Pi36, Pi-ta, Pib, Pi1(t), Pid3, Pi2(t), Pi54, และ Pigm(t)* แยกตามแหล่งที่มาของข้าวพื้นเมืองจากภาคต่างๆของไทย และ เปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของข้าวพื้นเมืองจากภาคต่างๆที่มียีนดังกล่าว	114
31	แสดงสายพันธุ์ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมจากท้องที่ปลูกข้าวต่างๆในประเทศไทย พ.ศ. 2553 จำนวน 10 ไอโซเลท.....	115
32	รายชื่อเชื้อราโรคใบไหม้ *M .grisea* ที่ได้รับการอนุเคราะห์ จาก ดร.ธานี ศรีวงศ์ชัย ที่เก็บรวบรวมจากแหล่งปลูกข้าวต่างๆในประเทศไทยในปี 2553.....	116
33	ปฏิกิริยาการตอบสนองต่อโรคของข้าวพันธุ์นิบปอนบาเรที่มียีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi9* ต่อเชื้อราโรคใบไหม้ในประเทศไทยจำนวน 8 ไอโซเลท.....	119
34	แสดงจีโนไทป์ของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9, Pi54, Pi-d2, Pi-d3, Pi-ta, Pib, Pigm(t), Pi1(t), Pi2(t)* และ *Pi36* และปฏิกิริยาการตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้รวม 10 ไอโซเลท.....	122
35	แสดงระดับความรุนแรงของโรคไหม้ในใบข้าว จำนวน 29 พันธุ์.....	124
36	แสดงกระจายตัวของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองต้านทานโรคไหม้ในแต่ละภาคของประเทศตามระดับความรุนแรงของการเกิดโรคไหม้จากเชื้อสาเหตุ จำนวน 10 ไอโซเลท.....	132
37	แสดงค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ และ P-value จากการวิเคราะห์การถดถอยอย่างง่าย (single regression analysis) โดยใช้ข้อมูลจีโนไทป์ (เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนต้านทานโรคไหม้ 14 เครื่องหมาย) กับระดับต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมือง.....	134
38	แสดงค่าการ วิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นพหุคูณ (multiple regression analysis) ของยีนต้านทานโรคไหม้แบบต่างๆ สูงสุด 3 อันดับแรก	135

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
1	แสดงพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ จำนวน 29 พันธุ์ และปฏิกิริยาการตอบสนองต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่ศึกษา จำนวน 10 ไอโซเลท	155
2	แสดงจำนวนข้าวพื้นเมืองต้านทานโรคไหม้ในแต่ละภาคของประเทศแยกตามระดับความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ จำนวน 10 ไอโซเลท.....	156
3	แสดงค่าสัมประสิทธ์ของการตัดสินใจ (Coefficient of determination) หรือ R^2 ค่า P value ค่า Correlation coefficient และ สมการที่ได้จากการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้นพหุคูณ (multiple regression analysis) ของยีนต้านทานโรคไหม้ต่อความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมือง	157
4	แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) ของข้าวพื้นเมือง จำนวน 26 พันธุ์ และข้าวพันธุ์ตรวจสอบต้านทานโรคไหม้ (B15; พันธุ์ชัยนาท และ B16; IR64) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนต้านทานโรคไหม้ (10 ยีน) จำนวน 14 เครื่องหมาย	162

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เชื้อสาเหตุ และอาการของโรคไหม้ (a) *Pyricularia grisea* (b) leaf blast (c) node blast.....	7
2	ตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวที่มีการรายงานเมื่อปี 2008.....	19
3	เกณฑ์การวัดระดับความรุนแรงของโรคใช้การแยกลักษณะของแผลเป็น 7 ระดับ.....	37
4	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงจีโนมิกดีเอ็นเอของตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่ศึกษา.....	50
5	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์พื้นเมืองแต่ละสายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *Pi-d2* (*Pi-d2* Con2F/Con2R) หลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Mlu*I M =DNA marker, NIP = Nipponbare , Lane 1-5 เป็นตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีแอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* และ Lane 6-10 เป็นตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2*	52
6	แสดง sequence alignments ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ (R) *Pi-d2* (U55= พันธุ์เหลืองลีซอ, E132= พันธุ์เหนียวบายสี, และ E144= พันธุ์พวงเงิน) กับ พันธุ์นิพปอนบาเรที่ไม่มีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ (S) ของยีน *Pi-d2* แสดง A/G SNP ในตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mlu*I (ลูกศรแสดงตำแหน่งตัดจำกับเพาะของเอ็นไซม์ *Mlu*I ในตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ ของยีน *Pi-d2*	53
7	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ pB8 ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย Lane P = ข้าว Nipponbare ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* (positive control), Lane 2-22 เป็นตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย, M คือ 1Kb DNA ladder. ลูกศร แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส Lane 2, 4, 5, 6, 9 และ20 แสดงตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีแอลลีลของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9*.....	55
8	เจลอิเล็กโทรฟอรีซีสแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ของยีน *Pi9* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ *NBS2-Pi9-195-1*.....	57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
9	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ในข้าวป่า (A) ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน (B) และข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน (C) หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ NBS2-Pi9-195-1.....	58
10	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองโดยใช้ไพรเมอร์ R36STS หลังนำ PCR product มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* [M =DNA marker, NIP = Nipponbare (Negative control), Lane 1-15 เป็นตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย.....	59
11	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* ในข้าวพื้นเมืองภาคใต้ จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-ta* พันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1,042 bp.....	61
12	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* ในข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน (L20-L38) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-ta*.....	62
13	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* ในข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน (A) ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ (B) ข้าวป่า (C) และพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ (D) โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-ta*.....	63
14	แสดงความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของพันธุ์ข้าวที่นำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta*	65
15	แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence alignments) ชุด reverse โดยใช้โปรแกรม clustalW ของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีแอลลีลไม่ต้านทาน *pi-ta* และข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta*, ในกรอบสี่เหลี่ยมคือตำแหน่งที่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่ง คือ G/C polymorphism	66

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของแอลลีลต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* และแอลลีลไม่ต้านทาน (*pi-ta*) A) บริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ C /G ส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยน และเป็นส่วนของ intron	66
17	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีแอลลีลต้านทานต่อโรคไหม้ของยีน *Pib* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *Pib* ทำให้ได้ PCR product ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 365 bp.....	67
18	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* โดยใช้เครื่องหมาย Pibdom ใน (A) พันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ (B) พันธุ์ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ (C) พันธุ์ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน (D) พันธุ์ขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน และ (E) พันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้	69
19	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส แสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* ในพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ และข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233 โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าว C101LAC ที่มีแอลลีลต้านทานของยีน *Pi1(t)* (แอลลีล A) และสายพันธุ์ข้าว C101A51 ที่มีแอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi1(t)* (พันธุ์อ่อนแอ) (แอลลีล B-175 bp).....	71
20	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส แสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* ในพันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233 โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าว C101LAC ที่มีแอลลีลต้านทาน ของยีน *Pi1(t)* (แอลลีล A) และข้าวสายพันธุ์ C101A51 ซึ่งมีแอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi1(t)* (แอลลีล B-175 bp).....	72
21	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส แสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* ในพันธุ์ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233 โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าว C101LAC ที่มีแอลลีลต้านทาน ของยีน *Pi1(t)* (แอลลีล A) และสายพันธุ์ข้าว C101A51 ซึ่งมีแอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi1(t)* (แอลลีล B-175 bp).....	72

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส แสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* ในข้าวป่าด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233 โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าว C101LAC ที่มีแอลลีลต้านทานของยีน *Pi1(t)* (แอลลีล A) และสายพันธุ์ข้าว C101A51 ซึ่งมีแอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi1(t)* (แอลลีล B-175 bp).....	73
23	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส แสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* ในพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233 โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าว C101LAC ที่มีแอลลีลต้านทาน ของยีน *Pi1(t)* (แอลลีล A) และข้าวสายพันธุ์ C101A51 ซึ่งมีแอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* (แอลลีล B-175 bp).....	73
24	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองแต่ละสายพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-1 หลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Xbal*.....	75
25	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองแต่ละสายพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-2 หลังจากตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI.....	77
26	แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีแอลลีลต้านทานและแอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-2.....	78
27	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* (E111= พญาชม, E112=เขียว, L56=อีปี๊ด (Gs.3376), L17=ดอกมะลิ 109-1-119 (Gs.569), และ U38=งอเพือน) และข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทาน (U49=ปิอิ แม่ละ, U45=เหลืองหอม, NPB= Nipponbare, U42=ปือเกษตร และ U39=ดยาหลี่) กับข้อมูลลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล NCBI (Pid3-9311).....	79
28	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* ในข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR140 ที่ใกล้ชิดกับยีน *Pi2(t)* (A) ข้าวนาสวนพื้นเมือง (B) ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง.....	80

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
29	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ในข้าวนาสวนพื้นเมืองอีสานโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM206 ที่ใกล้ชิดกับยีน *Pi54*	83
30	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ Pi54-indel	85
31	แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีแอลลีลต้านทานและแอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ *Pi54* MAS และข้อมูลของยีน *Pi54* จากฐานข้อมูล NCBI	87
32	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ของข้าวโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ CAP marker-C5483 หลังจากตัด PCR product ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI	89
33	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ของข้าวโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Indel marker C29742 ใน (A) ข้าวพื้นเมืองภาคใต้, และ (B) ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	90
34	แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีแอลลีลต้านทาน และแอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Indel marker S29742	92
35	แสดงการกระจายตัวของจำนวนยีนต้านทานโรคไหม้ที่พบในข้าวพื้นเมือง แยกตามแหล่งที่มาของข้าวพื้นเมือง ประกอบด้วยยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9, Pi-d2, Pi36, Pi-ta, Pib, Pi1(t), Pid3, Pi2(t), Pi54,และ Pigm(t)*	113
36	แสดงการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ (เปรียบเทียบเป็นร้อยละจากจำนวนพันธุ์ข้าวพื้นเมืองจากภาคต่างๆ) แยกตามแหล่งที่มาของข้าวพื้นเมือง ประกอบด้วยยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9, Pi-d2, Pi36, Pi-ta, Pib, Pi1(t), Pid3, Pi2(t), Pi54 และ Pigm(t)*	113
37	ตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่ใช้ทดสอบ	116

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
38	ต้นกล้าข้าวที่มีอายุ 3 สัปดาห์ก่อนการปลูกเชื้อ (inoculation).....	117
39	A) ขั้นตอนฉีดสารละลายสปอร์เชื้อราโรคใบไหม้ลงบนต้นกล้าข้าวที่มีอายุ 3 สัปดาห์ B) หลังจากการปลูกเชื้อ (inoculation) โรคใบไหม้ลงบนต้นกล้าข้าว เพื่อทำการเก็บไว้ในห้องมืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายต้นข้าวของสปอร์เชื้อรา.....	117
40	แสดงผลจากการปลูกเชื้อด้วยเชื้อราโรคไหม้จำนวนทั้ง 8 ไอโซเลทของเชื้อรา *M. grisea* โดยพันธุ์ต้านทานคือ Nipponbare-Pi9 และพันธุ์ไม่ต้านทานคือข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) เป็นตัวควบคุม (1= Nipponbare, 2 = Nipponbare-Pi9, 3 = ข้าวขาวดอกมะลิ 105).....	120
41	แสดงการกระจายตัวของข้าวพื้นเมืองต้านทานโรคไหม้ในแต่ละภาคของประเทศแยกตามระดับความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ผสมรวม จำนวน 10 isolate	133
42	การจัดกลุ่มทางพันธุกรรม UPGMA ของข้าวพื้นเมืองและข้าวพันธุ์ตรวจสอบรวมจำนวน 28 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนต้านทานโรคไหม้ (10 ยีน) จำนวน 14 เครื่องหมาย.....	139
43	แสดง Principal coordinate analysis (PCO) ในพันธุ์ข้าวพื้นเมือง 26 พันธุ์ และข้าวพันธุ์ตรวจสอบ 2 พันธุ์ รวมจำนวน 28 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนต้านทานโรคไหม้ (10 ยีน) จำนวน 14 เครื่องหมาย.....	140

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ข้าวมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อคนไทย และประเทศไทย พื้นที่ประมาณ 60 ล้านไร่ หรือครึ่งหนึ่งของพื้นที่ ทำการเกษตรของประเทศเป็นพื้นที่ปลูกข้าว ประชากรไทยจำนวนประมาณ 15 ล้านคน หรือเกือบหนึ่งในสี่ของประเทศมีอาชีพทำนา ข้าวไทยส่งออกไปขายต่างประเทศมากที่สุด เป็นอันดับหนึ่งของโลกติดต่อกันมากกว่า 20 ปี นำเงินตราเข้าประเทศปีละ 100,000 ล้านบาท ยิ่งกว่านั้นข้าวยังมีความสำคัญในด้านสังคม ประเพณี วิถีชีวิตและวัฒนธรรม อย่างยากที่จะมีพืชชนิดใดเสมอเหมือน อย่างไรก็ตาม การผลิตข้าวของไทย ยังมีปัญหาหลายอย่าง โดยเฉพาะปัญหาการระบาดของโรค และแมลงศัตรูข้าวต่างๆเพิ่มสูงขึ้นโดยเฉพาะโรคไหม้

โรคเชื้อราใบไหม้ในข้าว (Rice blast) เป็นปัญหาสำคัญปัญหาหนึ่งของการผลิตข้าวทั่วโลก มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pericularia grisea* Sacc. ซึ่งในระยะ perfect stage จะเรียกว่า *Magnaporthe grisea* ในแต่ละปีโรคใบไหม้ในข้าวทำให้ผลผลิตของนาข้าวต้องสูญเสียไปมีมูลค่าหลายพันล้านบาท การระบาดของโรคไหม้ในข้าวที่มักเกิดในพื้นที่ปลูกข้าวในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในปี พ.ศ 2535 มีการรายงานการระบาดของโรคไหม้ในข้าว ทำความเสียหายแก่เกษตรกร โดยทำให้ผลผลิตข้าวลดลงประมาณ 650,000 ตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 3,000 ล้านบาท (Noenplab et al., 2006) วิธีการที่เหมาะสมที่สุดที่จะประสบความสำเร็จคือการลดความเสี่ยงของการระบาดของโรค โดยเร่งรัดการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความสามารถในการต้านทานต่อโรค ในช่วง 3-4 ปีที่ผ่านมานักวิทยาศาสตร์ได้ทำการโคลนยีนต้านทานโรคใบไหม้ในข้าวและนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้สามารถต้านทานต่อโรคใบไหม้ได้ผลเป็นอย่างดี แต่ปัญหาที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งคือยีนต้านทานโรคเหล่านี้เป็นยีนที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อราโรคใบไหม้เพียงไม่กี่สายพันธุ์ (narrow spectrum) จึงทำให้พันธุ์ข้าวที่ได้รับยีนต้านทานโรคนั้นๆ จะสูญเสียความสามารถในการต้านทานต่อโรคใบไหม้ในระยะเวลาเพียงไม่กี่ปีเนื่องจากการปรับตัวของสายพันธุ์เชื้อราโรคใบไหม้ให้สามารถทนทานต่อยีนต้านทานโรคนั้นได้ ดังนั้นการค้นหายีนต้านทานตัวใหม่ๆเพื่อนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวจึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้

ประเทศไทยนับว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพข้าวมากที่สุดประเทศหนึ่งของโลก การได้มาและการเก็บรักษายีนจากแหล่งพันธุกรรมข้าว ข้าวป่าและข้าวพันธุ์พื้นเมือง (landrace rice) ถือได้ว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการรักษาแหล่งพันธุกรรมข้าวที่สำคัญ และถือเป็นการปกป้องและคุ้มครองผลประโยชน์ทางชีวภาพของประเทศด้วย พันธุ์ข้าวพื้นเมืองเป็นพันธุ์ข้าวที่เกษตรกรมีการคัดเลือกและเก็บรักษาสืบทอด

กันมาหลายชั่วอายุ มีลักษณะเด่นคือมีความสามารถในการต้านทานโรคและแมลง และ/หรือสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี (resistance to biotic and abiotic stress) อย่างไรก็ตามพันธุ์เหล่านี้มักจะให้ผลผลิตต่ำ ดังนั้นจึงมักถูกแทนที่ด้วยข้าวพันธุ์รับรองใหม่ๆที่มีการแนะนำส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกกันอย่างแพร่หลายต่อเนื่องมาเป็นระยะเวลานาน นับวันพันธุ์ข้าวพื้นเมืองซึ่งถือเป็นแหล่งพันธุกรรมที่มียีนสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะยีนที่ต้านทานโรค แมลง เหล่านี้จะสูญหายไปอย่างต่อเนื่อง ส่งผลกระทบต่อแหล่งพันธุกรรมข้าวในที่สุด

อย่างไรก็ตามยังไม่มีการจัดทำข้อมูลทางพันธุกรรมในระดับยีนที่ควบคุมลักษณะที่สำคัญดังกล่าวในพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทย ผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงความสำคัญของข้อมูลทางพันธุกรรมในระดับยีน (genotype) ของสายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทย กอรปกับข้อมูลที่ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับจีโนมข้าวของนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกสามารถสืบค้นและทราบตำแหน่งที่แน่นอนของยีนที่ควบคุมลักษณะที่สำคัญบนแผนที่ยีนข้าว (genetic map) ทำให้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ประโยชน์ช่วยในการคัดเลือก ทำให้สามารถปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

จากข้อมูลเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีการพัฒนาและเผยแพร่สาธารณะนั้น สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการสืบค้นหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรคเชื้อราใบไหม้ในพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของไทย องค์ความรู้ที่ได้จากการสืบค้นยีนที่ควบคุมลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจในพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของไทย จะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไทยให้เหมาะสมกับสภาพท้องถิ่นต่อไปได้ในอนาคต ตลอดจนใช้เป็นข้อมูลทางพันธุกรรมในระดับยีนในการอนุรักษ์และเก็บรักษาสายพันธุ์ข้าวพื้นเมือง

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย :

- เพื่อสำรวจและค้นหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรคเชื้อราใบไหม้ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย เพื่อใช้เป็นแหล่งของยีนชนิดใหม่ๆที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของประเทศ
- เพื่อศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองทางโรคพืชของข้าวที่มียีนต้านทานโรค (*Pi9*) กับเชื้อราโรคใบไหม้สายพันธุ์ต่าง ๆ ในประเทศไทย และ
- เพื่อศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองทางโรคพืชของข้าวพื้นเมืองไทยที่มียีนต้านทานโรคไหม้ต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ ต่าง ๆ ในประเทศไทย

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1 ทำให้ทราบแหล่งพันธุกรรมในระดับยีนที่ควบคุมยีนต้านทานต่อโรคใบไหม้ในสายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

2 สามารถนำข้อมูลมาใช้ประโยชน์ในการเลือกสายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่จะใช้เป็นคู่ผสมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไทยให้เหมาะสมกับสภาพท้องถิ่นต่อไป

3 สามารถใช้เป็นข้อมูลทางพันธุกรรมในระดับยีนในการอนุรักษ์และเก็บรักษาสายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทย

4 นำเสนอผลงานวิชาการในระดับประเทศ/ นานาชาติ จำนวน 3 เรื่อง

5 ตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการในระดับประเทศ/นานาชาติ จำนวน 4 เรื่อง

การตรวจเอกสาร

ข้าวเป็นพืชที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจ และการดำรงชีวิตของคนไทยเป็นอย่างมาก เพราะคนไทยบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก อีกทั้งข้าวยังเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญของประเทศ ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวทั่วทั้งประเทศในฤดูนาปีและฤดูนาปรังรวมกันจำนวน 69.35 ล้านไร่ มีชาวนาประมาณ 3.7 ล้านครัวเรือน มีผลผลิตข้าวจำนวน 31.28 ล้านตันข้าวเปลือก หรือประมาณ 19.89 ล้านตันข้าวสาร มีการบริโภคภายในประเทศจำนวน 11.29 ล้านตันข้าวสาร และส่งออก 8.60 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่า 170,000 ล้านบาท อีกทั้งประเทศไทยยังคงเป็นประเทศที่มีการส่งออกข้าวเป็นอันดับหนึ่งของโลก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553)

แหล่งพันธุกรรมข้าว (Rice genetic resources)

ข้าว (*Oryza spp.*) ที่แพร่กระจายไปทั่วโลกนั้น พบว่าอยู่ใน genus *Oryza spp.* ประกอบไปด้วยข้าวป่า (wild species) จำนวน 22 species และข้าวปลูก (cultivated rice) จำนวน 2 species ได้แก่ ข้าวเอเชีย (*Oryza sativa* Linn.) และ ข้าวแอฟริกา (*O. glaberrima* Steud.) ในประเทศไทยพบข้าวป่า 5 ชนิด (species) ได้แก่ *O. rufipogon*, *O. nivara*, *O. officinalis*, *O. granulate* และ *O. ridleyi* (สงกรานต์ และคณะ, 2538) ประเทศไทยนอกจากจะมีความหลากหลายในชนิดของข้าวแล้วยังมีความหลากหลายในพันธุ์ข้าวปลูกอีกด้วย ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบในข้าวปลูกนี้ เป็นผลมาจากการปรับตัวของสายพันธุ์ข้าวให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมของท้องถิ่นนั้นๆ ตลอดจนการคัดเลือกของเกษตรกรซึ่งเป็นผลมาจากความชอบ และขนบธรรมเนียม ประเพณี วัฒนธรรมความเป็นอยู่ของท้องถิ่นนั้นๆ

ข้าวพื้นเมือง (Local varieties)

พันธุ์ข้าวพื้นเมือง (Local varieties or landrace varieties or traditional varieties) หมายถึง พันธุ์ข้าวที่มีการคัดเลือกและเก็บรักษาโดยเกษตรกร สืบทอดกันมาหลายชั่วอายุ พันธุ์ข้าวพื้นเมืองจะมีลักษณะเด่น คือ มีความสามารถในการต้านทานโรคและแมลง และ / หรือ สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี (resistance to biotic and abiotic stress) อย่างไรก็ตาม พันธุ์เหล่านี้มักจะให้ผลผลิตต่ำ ดังนั้นพันธุ์ข้าวพื้นเมือง จึงมักถูกแทนที่ด้วยข้าวพันธุ์รับรองใหม่ๆ ที่มีการแนะนำ และส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกกันอย่างแพร่หลาย ต่อเนื่องมาเป็นระยะเวลานาน นับวันพันธุ์ข้าวพื้นเมืองซึ่งถือเป็นแหล่งพันธุกรรมที่มียีนสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะยีนที่ต้านทานโรค แมลง ตลอดจน ยีนที่ต้านทานต่อ

สภาพเครียดต่างๆ เช่น ยีนที่ต้านทานต่อความแห้งแล้ง (drought stress) และ ยีนที่ต้านทานต่อความเค็ม (salt stress) ยีนเหล่านี้จะสูญหายไปอย่างต่อเนื่อง ทำให้ส่งผลกระทบต่อแหล่งพันธุกรรมข้าวในที่สุด

ข้าวพันธุ์พื้นเมืองนับเป็นแหล่งพันธุกรรมที่ดี มีความหลากหลายโดยเฉพาะพันธุ์ข้าวพื้นเมืองของไทยได้มีการพัฒนามายาวนาน จึงมีการเจริญเติบโตเหมาะสมในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะเหมาะที่จะนำมาใช้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ได้พันธุ์ใหม่ๆ ตามต้องการ

การสูญหายทางพันธุกรรมเกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม ภัยธรรมชาติ และการกระทำของมนุษย์ ในอดีตเราเคยมีพันธุ์ข้าวพื้นเมืองอยู่มากมายในทุกภาคของประเทศ ปัจจุบันพันธุ์ข้าวพื้นเมืองส่วนหนึ่งสูญหายไปเนื่องจากภัยธรรมชาติ เช่น น้ำท่วม ความแห้งแล้ง ฯลฯ แต่ที่สำคัญคือความนิยมของเกษตรกรในการเลือกปลูกข้าวพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูง ทำให้ความหลากหลายของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองลดลงอย่างรวดเร็ว พันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่เกษตรกรเลิกปลูกแล้วนั้นอาจมีลักษณะทางพันธุกรรมหรือคุณสมบัติที่ดีบางประการ เช่น ความต้านทานโรค ต้านทานแมลง คุณค่าทางอาหาร คุณค่าทางเภสัชกรรม เป็นต้น จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องช่วยกันรักษาพันธุกรรมข้าวไว้ให้ได้มากที่สุดเพื่อเป็นแหล่งพันธุกรรมที่สามารถจะนำไปใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต อย่างไรก็ตามยังมีพันธุ์ข้าวจำนวนมากถูกเก็บอนุรักษ์ไว้ในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและยังมีการอนุรักษ์ไว้ในแหล่งต่างๆ ทั้งนี้เนื่องจากนักปรับปรุงพันธุ์ข้าวในสมัยก่อนได้เล็งเห็นถึงความสำคัญของเชื้อพันธุ์ข้าว จึงมีการดำเนินงานสำรวจ รวบรวม และอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ข้าวมาอย่างต่อเนื่อง ปัจจุบันธนาคารเชื้อพันธุ์พืชได้รวบรวมและอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมข้าวไว้ไม่น้อยกว่า 23,903 ตัวอย่างเชื้อพันธุ์ (genetic stock number) แบ่งเป็นข้าวพื้นเมือง 17,093 ตัวอย่าง, ข้าวสายพันธุ์ดี 2,335 ตัวอย่าง, ข้าวสายพันธุ์ต่างประเทศ 3,391 ตัวอย่าง, ข้าวป่า (*Oryza* spp.) 1,065 ตัวอย่าง และข้าวอื่นๆ (*Oryza glaberrima*) 19 ตัวอย่าง โดยสามารถจำแนกชื่อข้าวพื้นเมืองที่ไม่ซ้ำกันได้ประมาณ 5,928 ชื่อพันธุ์ (ฉวีวรรณ, 2543)

การจำแนกประเภทของพันธุ์ข้าว (Classification of rice cultivar)

ข้าวเป็นพืชที่มีการปลูกอย่างแพร่หลาย และปลูกมากในทวีปเอเชีย โดยมีพื้นที่การปลูกข้าวมากกว่าร้อยละ 80 ของพื้นที่ปลูกข้าวทั่วโลก ในการจำแนกประเภทของข้าวตามระบบนิเวศการปลูกข้าว (rice ecosystems) ซึ่งยึดเอาสภาพของน้ำบนผิวดินเป็นเกณฑ์ สามารถจำแนกประเภทของข้าวได้เป็น 4 ประเภท (วิไลลักษณ์, 2544) คือ

1. ข้าวนาชลประทาน (irrigated rice) หมายถึง ข้าวนาสวน หรือข้าวที่ปลูกในสภาพนาที่มีน้ำขังที่มีระดับน้ำลึกไม่เกิน 50 เซนติเมตร มีการทำคันนาเพื่อกักเก็บน้ำ และมีการนำน้ำโดยระบบชลประทานภายใต้สภาพนาชลประทานจะมีการเตรียมดินเมื่อมีน้ำขังนา มีการปรับดินให้เรียบก่อนปลูก

เสมอ วิธีการปลูกส่วนมากใช้วิธีปักดำ หรือหว่านน้ำตม โดยปกตินาชลประทานจะไม่มีปัญหาการควบคุมน้ำ และจะรักษาระดับน้ำไว้ประมาณ 5-15 เซนติเมตร

2. ข้าวนาน้ำฝน (rainfed lowland rice) หมายถึง ข้าวนาสวนซึ่งปลูกในสภาพนาที่มีน้ำขัง มีการทำคันนาเพื่อกักเก็บน้ำ และอาศัยน้ำฝนตามธรรมชาติ โดยคันนาที่สร้างขึ้นมีเป้าหมายเพื่อกักเก็บน้ำฝนให้พอหล่อเลี้ยงต้นข้าวตามความต้องการ ในนาที่อาศัยน้ำฝนจะมีน้ำขังตลอดฤดูกาลปลูก ระดับน้ำโดยทั่วไปไม่เกิน 50 เซนติเมตร แต่บางครั้งน้ำในนาอาจจะแห้ง หรือมีระดับน้ำสูงกว่านั้นทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพการกระจายตัวของน้ำฝน ข้าวนาน้ำฝนจึงไม่มีระบบชลประทานช่วยเมื่อขาดน้ำ แต่นาน้ำฝนอาจอาศัยน้ำจากบ่อเล็กๆในนาได้

3. ข้าวน้ำลึกและข้าวขึ้นน้ำ (deepwater rice and floating rice) หมายถึงข้าวที่ปลูกในพื้นที่ซึ่งภายหลังจะมีระดับน้ำท่วมขังลึก ตั้งแต่ 1 ถึง 5 เมตร ในระหว่างฤดูฝนข้าวน้ำลึกและข้าวขึ้นน้ำส่วนใหญ่จะปลูกโดยวิธีหว่านข้าวแห้งในนา เมื่อได้รับน้ำฝนต้นข้าวจะเจริญเติบโตอยู่ในสภาพน้ำตื้นในระยะ 1- 3 เดือนแรก และหลังจากนั้นระดับน้ำจะเริ่มสูงขึ้นเรื่อยๆตามลำดับ ข้าวน้ำลึก (deepwater rice) หมายถึงข้าวซึ่งปลูกในแหล่งที่มีระดับน้ำลึกไม่เกิน 1 เมตร และน้ำท่วมขังในแปลงนาอย่างน้อย 1 เดือน ลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวชนิดนี้คือ ความสามารถทนน้ำท่วม หรือจมอยู่ใต้น้ำได้อย่างน้อย 7-10 วัน หลังจากน้ำลดแล้วสามารถฟื้นตัวได้ดี พัฒนาการการเจริญเติบโตจนถึงเก็บเกี่ยวเป็นปกติ แต่ถ้าระดับน้ำสูงเกิน 1 เมตร ขังนานอย่างน้อย 1 เดือน ต้นข้าวสามารถยืดตัวได้ดีตามการเพิ่มระดับของน้ำ เรียกว่าข้าวขึ้นน้ำ (floating rice)

4. ข้าวไร่ (upland rice) เป็นข้าวที่ปลูกในสภาพพื้นที่อาศัยน้ำฝนตามธรรมชาติในพื้นที่สภาพไร่หรือที่ดินซึ่งไม่มีการทำคันนาคั่นเพื่อกักเก็บน้ำ พื้นที่ปลูกข้าวไร่จะอยู่ในสภาพที่ไม่มีน้ำขัง ส่วนใหญ่จะปลูกโดยวิธีหยอดหรือโรยเมล็ดข้าวแห้ง

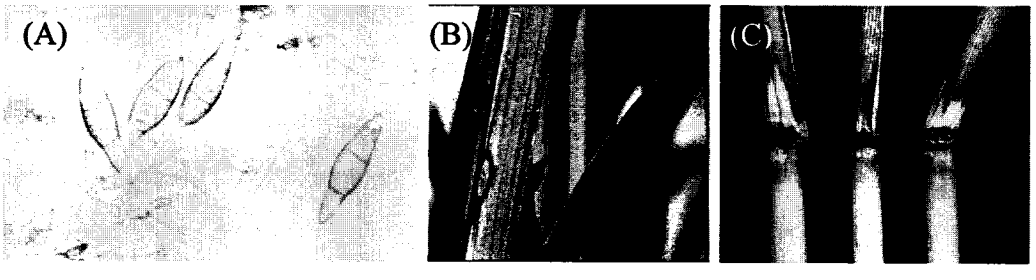
โรคไหม้ (blast disease)

โรคไหม้ (blast disease) จัดเป็นปัญหาสำคัญของการผลิตข้าวทั่วโลก สามารถทำลายต้นข้าวในทุกระยะของการเจริญเติบโต ตั้งแต่ระยะกล้าถึงระยะออกรวง กรณีเกิดการระบาดรุนแรงต้นกล้าจะแห้งและฟุบตาย (ทัศนีย์, 2540; พูนศักดิ์ และคณะ, 2550) มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* Sacc. ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง มีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่ต่างกันได้ดี จึงพบการแพร่ระบาดของโรคอย่างแพร่หลายในหลายประเทศทั่วโลก สร้างความเสียหายต่อผลผลิตข้าวได้ตั้งแต่ 11 เปอร์เซ็นต์ จนสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (Zeigler et al., 1994)

สาเหตุของโรคไหม้

โรคไหม้มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* (ภาพที่ 1A) ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ แต่เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมเชื้อราจะสร้างแอสโคสปอร์ ซึ่งเป็นการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และเรียกเชื้อราชนิดนี้ว่า *Magnaporthe grisea* เชื้อสาเหตุโรคไหม้นี้จัดอยู่ในกลุ่ม ascomycete มีจำนวนโครโมโซม 2n=14 ขนาดจีโนมประมาณ 40 เมกาเบส เป็นเชื้อราที่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่ต่างกันได้ดี มีความหลากหลายทางสายพันธุ์สูง และพบการแพร่กระจายของโรคมากกว่า 85 ประเทศทั่วโลก (ชัชวาล และสุรีพร, 2552, Babujee and Gnanamanickam, 2000)

พูนศักดิ์ และคณะ (2550) ได้รายงานถึงความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทย โดยเก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่พบในประเทศไทยระหว่างปี 2545-2548 พบเชื้อทั้งหมด 2,476 ไอโซเลท สามารถจำแนกเชื้อออกได้ 623 สายพันธุ์ แบ่งออกได้เป็น สายพันธุ์ที่พบประจำ จำนวน 145 สายพันธุ์ และสายพันธุ์หายาก นานๆพบครั้ง จำนวน 340 สายพันธุ์ และเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่พบในครั้งนี้มีความหลากหลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้สูงถึงร้อยละ 83 โดยพบเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมากที่สุด จำนวน 313 สายพันธุ์



ภาพที่ 1 เชื้อสาเหตุ และอาการของโรคไหม้ (A) *Pyricularia grisea* (B) leaf blast (C) node blast

ลักษณะอาการและความเสียหาย

เชื้อ *P. grisea* สามารถเข้าทำลายต้นข้าวได้ในทุกระยะของการเจริญเติบโต โดยเชื้อจะเข้าทำลายต้นข้าวในส่วนที่อยู่เหนือดิน หากเชื้อเข้าทำลายบริเวณใบ จะเรียกว่า "โรคใบไหม้" (leaf blast) (ภาพที่ 1B) เมื่อเชื้อเข้าทำลายที่ใบจะทำให้ใบข้าวเป็นจุดฉ่ำน้ำ ต่อมาแผลจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเป็นรูปคล้ายตาหรือรูปกระสวย ขอบแผลมีสีน้ำตาล ตรงกลางแผลมีสีเทา หากมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม แผลจะขยาย

ใหญ่รวมกันเป็นแผลเดียว กรณีเกิดโรคขึ้นบริเวณรอยต่อระหว่างกาบใบและแผ่นใบ (collar) เรียกว่า "collar blast" จะทำให้แผ่นใบเสียหาย ถ้าเกิดขึ้นที่ข้อ เรียกว่า "node blast" (ภาพที่ 1C) จะทำให้ข้อลำต้นมีสีดำ เปราะ และหักง่าย หากเชื้อเข้าทำลายที่บริเวณคอรวงข้าว เรียกว่า "โรคไหม้คอรวง" (neck blast) ซึ่งจะพบแผลสีน้ำตาลเทารอบๆ คอรวงข้าว หากเชื้อเข้าทำลายรวงข้าวก่อนระยะน้ำนม จะทำให้รวงข้าวเสียหายทั้งหมด แต่ถ้าเกิดหลังระยะน้ำนม จะทำให้เมล็ดข้าวไม่สมบูรณ์ และทำให้คุณภาพข้าวเสียหายได้ (ทัศนีย์, 2540; พูนศักดิ์ และคณะ, 2550; ชัชวาล และสุรีพร, 2552) ในปี 2535 พบการระบาดของโรคไหม้ในระยะข้าวออกรวง บริเวณภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ทำให้พื้นที่ปลูกข้าวได้รับความเสียหายประมาณ 1.2 ล้านไร่ (Noenplab et al., 2006) ต่อมามีการรายงานการระบาดของโรคในปี 2544 มีพื้นที่ได้รับความเสียหายประมาณ 78,778 ไร่ (กรมวิชาการเกษตร, 2546) และในปี 2553 พบการระบาดในจังหวัดมหาสารคาม อุบลราชธานี และบุรีรัมย์ ช่วงเดือนกันยายนถึงเดือนธันวาคม มีพื้นที่ได้รับความเสียหายมากกว่า 793,200 ไร่ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2553; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553)

การป้องกันและกำจัดโรคไหม้ของข้าว

การควบคุมและป้องกันโรคไหม้ เพื่อลดความเสียหายของผลผลิตข้าว สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้สารเคมี การใช้วิธีเขตกรรม และการใช้พันธุ์ต้านทาน เป็นต้น การใช้สารเคมีจะเป็นวิธีที่ง่าย และสามารถควบคุมการระบาดของโรคได้ในระดับหนึ่ง โดยสารเคมีที่ใช้ ได้แก่ สารเคมีพวกบีโนมิล, เบนเลท คลุกเมล็ดก่อนปลูกและฉีดพ่นสารเคมีพวกคาร์เบนดาซิมเมื่อมีการระบาดรุนแรง แต่การใช้สารเคมีทำให้เกิดสารตกค้างในสภาพแวดล้อม และเป็นอันตรายต่อผู้ใช้ อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตให้กับเกษตรกรอีกด้วย นอกจากนี้ยังสร้างแรงกดดันทำให้เชื้อมีการปรับตัวเพื่อการอยู่รอด (selection pressure) และทำให้ต้านทานต่อสารเคมี จนไม่สามารถควบคุมการระบาดของโรคได้ (ชาญณรงค์, 2553)

ส่วนวิธีเขตกรรมเป็นวิธีที่มีความยุ่งยาก เกษตรกรต้องมีประสบการณ์ในการจัดการแปลง เช่น แปลงกล้าต้องเป็นพื้นที่ที่อากาศถ่ายเทได้ดี การใส่ปุ๋ยไนโตรเจนไม่ควรใส่ในอัตราสูงเกินไป เป็นต้น การใช้พันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ เป็นวิธีการที่เหมาะสมในการป้องกันกำจัดโรคไหม้ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกและมีความปลอดภัยต่อเกษตรกรและผู้บริโภค (ทัศนีย์, 2540; Babujee and Gnanamanickam, 2000; พูนศักดิ์ และคณะ, 2550)

ยีนต้านทานโรคพืช

การที่พืชเป็นโรคหรือแสดงอาการผิดปกตินั้น เป็นผลเนื่องมาจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุในเนื้อเยื่อพืชส่วนต่าง ๆ หรือเกิดการชักนำให้เกิดการผันแปรทางสรีระวิทยาของพืชที่ผิดปกติไปจนส่งผลให้เกิดอาการของโรคในลักษณะต่าง ๆ พืชทุกชนิดมีความสามารถในการต้านทานโรคอันเป็นคุณสมบัติที่ถูกควบคุมด้วยกลไกทางพันธุกรรม ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมพืชต้นหนึ่งอาจเป็นโรคเมื่อถูกเชื้อสาเหตุเข้าทำลาย ถ้าพืชดังกล่าวปราศจากกลไกทางพันธุกรรม คือยีนต้านทาน (resistance gene) ต่อเชื้อสาเหตุที่มีความรุนแรง (virulence) ระดับความต้านทานของพืชมีความแตกต่างกันออกไป ในพืชแต่ละต้น แต่ละพันธุ์ แต่ละชนิด ในการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุชนิดหนึ่ง ๆ ตามความสัมพันธ์ ทางพันธุกรรมระหว่างพืชและเชื้อสาเหตุโรคพืช

โครงสร้างของโปรตีนยีนต้านทานโรค

ปัจจุบันมียีนต้านทานจำนวนมากที่ได้รับการโคลนจากพืชชนิดต่าง ๆ ทั้งที่เป็นต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา เชื้อไวรัส และไส้เดือนฝอย ซึ่งพบว่า ยีนเหล่านี้มีโครงสร้างที่คล้ายกัน ในระดับการส่งสัญญาณโดยพบว่าโปรตีนจากยีนต้านทาน สามารถจัดเป็น 5 กลุ่ม โดยมีโครงสร้างที่มีส่วนคล้ายกันในส่วนของ Leucine-rich repeat (LRR) motif หรือ serine-threonine kinase domain ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็น cytoplasmic receptor-like proteins ที่ประกอบด้วย LRR domain และ neucleotide binding site (NBS) ตัวอย่างยีนต้านทานที่เป็น LRR-NBS motif ในกลุ่มนี้คือ *RPS2* และ *RPM1* จาก *Arabidopsis* (ที่ต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* ที่มียีน *avrRpt2* และ *avrRpm1* ตามลำดับ) ยีนต้านทาน *Prf* จากมะเขือเทศ (ที่ต้านทานต่อเชื้อ *P. syringae* pv. *tomato*) ยีนต้านทาน *N* จากมะเขือ (ที่ต้านทานต่อเชื้อราหลายสายพันธุ์ของเชื้อ tobacco mosaic virus) ยีนต้านทาน *L6* และยีนต้านทาน *M* จาก *flax* (ที่ต้านทานต่อเชื้อราหลายสายพันธุ์ของเชื้อ *Melampsoralini*) ยีนต้านทาน *RPP5* จาก *Arabidopsis* (ที่ต้านทานต่อเชื้อ *Fusarium oxysporium* f. sp. *lycopoersicon*) ในขณะที่ LRR และ NBS domain ที่ประกอบด้วยยีน *N L6* และ *RPP5* ที่แปลรหัส NH2-terminal domains ที่มี homology กับ cytroplasmic domains ของ *Drosophila developmental* gene *Toll* และ mammalian immune response gene ที่แปลรหัสเป็น interleukin- 1 receptor (IL-1R) (ที่เป็น TIR: Toll-IL-1R homologous region) โดย *RPS2* *RPM1* และ *Prf* แปลรหัสเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วย putative leucine zipper motif ที่ NH_2-terminus

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยยีน *Pto* ที่ต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *P. syringae* pv. Tomato ที่มียีน *avrPto* โดยยีน *Pto* แปลรหัสได้เป็น serine-threonine kinase ที่มี homology ต่อ mammalian Raf, IRAK และ *Drosophila* Pelle kinases

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *Cf-2* และ *Cf-9* จากมะเขือเทศ และยีน *HSlpro-1* จาก sugar beet โดยยีน *Cf-2* และ *Cf-9* แปลรหัสได้เป็น putative transmembrane receptors ที่ส่วนใหญ่เป็น extracytroplasmic LRR domains และเป็นยีนที่ต้านทานต่อเชื้อ *Cladosporium fulvum* หลายสายพันธุ์ ส่วนยีน *HSlpro-1* แปลรหัสเป็น transmembrane LRR protein ที่ต้านทานต่อ beet cyst nematode *Heterodera schachti.*

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยยีน *Xa21* จากข้าวที่ต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Xantomonas oryzae* pv. Oryzae โดยยีน *Xa21* แปลรหัสได้เป็น putative transmembrane receptor ที่มีส่วน extracellular LRR domain และ intracellular serine-threonine kinase domain โดยโครงสร้างของ *Xa21* แสดงให้เห็นถึงการรวมระหว่าง LRR protein (*Cf*) และ *Pto* kinase

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยยีน *HM1* ที่ต้านทานต่อเชื้อรา *Cochlibolus carbonum* race 1 โดย *HM1* แปลรหัสเป็น reduced from ของ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent reductase ที่เข้าทำปฏิกิริยากับสารพิษที่สร้างขึ้นจากเชื้อ *C. carbonum* race 1 ที่ยีน *HM1* มีความแตกต่างจากกลุ่มยีนต้านทานอื่นเพราะว่า *Avr* component ไม่ได้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำลายพิษโดย *HM1*

การจดจำระหว่างโปรตีนจากยีนต้านทานของพืช กับยีน Avirulence ของเชื้อโรค

การเกิดปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง Pathogen Avr proteins และ plant *R* proteins โดยเชื้อโรคนั้นสมมุติให้ hypothetical pathogen เข้ามาผสมกับเซลล์พืช และได้มีการปล่อยชุดของ Virulence Proteins โดยโปรตีนเหล่านี้จะถูกส่งเข้าสู่เซลล์เป้าหมายของ Host proteins ที่จะทำหน้าที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงหรือดัดแปลงเซลล์พืช อาศัยให้เหมาะต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและควบคุมการต่อต้านการลุกลามของพืช โดยใช้เมตาโบลิซึม (metabolism) หรือ ขบวนการอื่นของพืช ที่มีผลต่อความรุนแรงของเชื้อโรคซึ่งทำให้ Virulence Proteins เหล่านี้ ถูกเป็นเป้าหมายต่อไปของ Extracellular proteins พืชที่ใช้ในการจดจำต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคโดยเซลล์พืชที่ไม่ได้มีการแสดงออกของ R protein ที่จะสามารถจะจำต่อ Virulence Proteins ใดได้จะส่งผลให้พืชไม่สามารถตรวจพบเชื้อโรคและต้านทานการรุกรานได้ ส่วนพืชที่ต้านทานนั้น จะเกิดการจดจำกันได้เกิดขึ้นบนพื้นฐานของ receptor-elicitor hypothesis ที่ R protein มีการจับกันโดยตรงกับ Virulence Proteins ที่เป็นเป้าหมายโดยเหตุการณ์นี้

จะกระตุ้นระบบการส่งสัญญาณที่ซับซ้อน (complex signal transduction network) ที่จะเปิดกลไกการต่อต้านผู้รุกราน นอกจากนี้ รูปแบบการจดจำแบบ Guard hypothesis ที่ R protein (guard) มีการตรวจพบ modified host protein แล้วจึงกระตุ้นระบบการส่งสัญญาณเพื่อเปิดการทำงานของระบบกลไกการต่อต้านเชื้อโรคก็เป็นอีกแนวคิดหนึ่งที่มีการนำเสนอเมื่อไม่นานมานี้

โครงสร้างและหน้าที่ยีนต้านทานโรคไหม้

ยีนต้านทานโรคไหม้ (bast resistance gene)

ลักษณะต้านทานโรคไหม้ถูกควบคุมโดยยีนหลัก (major gene) และยีนรอง (minor gene) ลักษณะต้านทานโรคไหม้ที่ถูกควบคุมด้วยยีนหลัก จะมีความต้านทานที่จำเพาะกับสายพันธุ์ของเชื้อรา *P. grisea* โดยยีนจะไปยับยั้งการแสดงออกของเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ (complete resistance) ทำให้พืชไม่แสดงอาการของโรค ส่วนลักษณะต้านทานโรคไหม้ที่ถูกควบคุมด้วยยีนรอง เป็นลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ หรือลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait loci: QTLs) ทำให้มีความต้านทานต่อเชื้อรา สาเหตุโรคไหม้แบบไม่จำเพาะ เรียกลักษณะความต้านทานแบบนี้ว่า "ลักษณะต้านทานแบบบางส่วน" (partial resistance) ซึ่งเป็นลักษณะต้านทานที่ไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้พืชมีความต้านทานต่อเชื้อในระดับต่ำจนถึงปานกลาง และลักษณะต้านทานโรคไหม้ที่ถูกควบคุมด้วยยีนดังกล่าว จะแปรเปลี่ยนไปตามอิทธิพลของสภาพแวดล้อม (Babujee and Gnanamanickam, 2000; Ballini et al., 2008; Koide et al., 2009)

จากความก้าวหน้าทางอณูพันธุศาสตร์ ทำให้มีการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ไม่ต่ำกว่า 70 ยีน (ตารางที่ 1) และมีการวางตำแหน่ง QTLs ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคไหม้ไม่น้อยกว่า 347 ตำแหน่ง (Koide et al., 2009) ยีนต้านทานโรคไหม้ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นยีนเด่น ยกเว้นยีน *pi21* ที่เป็นยีนด้อย แหล่งพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้ส่วนใหญ่ได้มาจากข้าวพื้นเมือง (landrace rice) มีเพียงยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9*, *Pi33* และ *Pi40(t)* ที่มีแหล่งกำเนิดมาจากข้าวป่า *Oryza minuta*, *O. rufipogon* และ *O. australiensis* ตามลำดับ (ชัชวาล และสุรีพร, 2552; Koide et al., 2009) ยีนต้านทานโรคไหม้ส่วนใหญ่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6, 11 และ 12 (ภาพที่ 2) ปัจจุบันมีรายงานการโคลนยีนต้านทานโรคไหม้สำเร็จแล้ว 17 ยีน ได้แก่ *Pib, Pita, Pi9, Pi2, Pizt, Pi-d2, Pi36, Pi37, Pi-km, Pi-d3, Pi5, pi21, Pit ,Pi54 (Pi-k^{h}), Pigm, Pia* และ *Pi25* (ศรีสวัสดิ์ และคณะ, 2553; Chen et al., 2011)

ความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้จำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือยีนต้านทานโรคไหม้แบบแคบ (narrow spectrum resistance gene) และยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง (broad spectrum

resistance gene) โดยยีนต้านทานโรคไหม้แบบแคบ เป็นยีนที่มีความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้น้อยสายพันธุ์ ตัวอย่างเช่น ยีน *Pif, pi21, Pb1* และ *Pi34* (Ballini et al., 2008) ส่วนยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง เป็นยีนที่มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์ (Ballini et al., 2008) ตัวอย่างเช่น ยีน *Pi2, Pi5(t), Pi-z, Piz-5, Pi-ta, Pib, Pi54* (*Pi-k*^{h}), *Pigm, Pi1(t), Pi6, Pi9* และ *Pi33* (ชัชวาล และสุรีพร, 2552; Deng et al., 2009; Fujita et al., 2009; Joshi et al., 2009; Sharma et al., 2010) Chen et al (1996; 1999) รายงานว่ายีน *Pi2* สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในประเทศฟิลิปปินส์และประเทศจีนได้ 445 และ 792 ไอโซเลท ตามลำดับ ในประเทศไทยมีรายงานว่า ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t), Pi-k, Pi-kp, Pi-kh, Pi5* และ *Pi9* เป็นยีนต้านทานโรคไหม้ที่มีศักยภาพแสดงความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยได้ดี และคู่ของยีน *Pi1(t), Pi9* และ *Pi1(t), Pi-ta*^{2} แสดงความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้ดีที่สุด โดยเชื้อสามารถเข้าทำลายได้เพียง ร้อยละ 0.5 จากเชื้อที่ทดสอบทั้งหมดจำนวน 2,476 ไอโซเลท (พูนศักดิ์ และคณะ, 2550) นอกจากนี้อัจฉราพร และ พูนศักดิ์ (2552) ได้รายงานการประเมินยีนต้านทานโรคไหม้ที่สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์และคงทนในภาคเหนือตอนล่าง โดยใช้เชื้อทั้งหมด 80 ไอโซเลท พบว่า ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-4a(t), Pi-ta*^{2} และ *Pi1(t)* มีประสิทธิภาพในการต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้ดี โดยแสดงความต้านทานต่อเชื้อได้ร้อยละ 33.33, 31.15 และ 29.03 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่ว่ายีนต้านทานโรคไหม้ จะสามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้เป็นจำนวนมาก และหลากหลายในพื้นที่ต่างๆ ได้ยาวนานหรือไม่ (Qu et al., 2006)

การวางตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้

การวางตำแหน่งของยีนเป็นวิธีการหนึ่ง ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอกับลักษณะที่สนใจ ซึ่งสามารถจะบอกถึงจำนวน ตำแหน่ง และ ผลกระทบของแต่ละยีนที่ควบคุมลักษณะนั้นๆ การทราบตำแหน่งของยีนจะเป็นประโยชน์ต่อการโคลนยีน ศึกษาการแสดงออกของยีน และการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยเฉพาะการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection) ซึ่งช่วยให้การคัดเลือกลักษณะที่สนใจมีความแม่นยำยิ่งขึ้น ปัจจุบันมีการวางตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจในข้าวอย่างแพร่หลาย และยีนต้านทานโรคไหม้ก็เป็นยีนหนึ่งที่ได้รับการวางตำแหน่งยีน การสร้างแผนที่ยีนเพื่อค้นหาตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ โดยจะทำในประชากรที่มีการกระจายตัวทางพันธุกรรมสูง (segregating population) เช่น ประชากรของลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2 population) ประชากรของลูกผสมกลับ (backcross population) และประชากร recombinant inbred line (RIL population) เป็นต้น จากนั้นตรวจสอบโดยใช้หลักการวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อจัดวางเครื่องหมายดีเอ็นเอบนแผนที่พันธุกรรมของข้าว โดยนำข้อมูลความต้านทานโรคไหม้ของ

ประชากรแต่ละต้น มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้ มีการจัดวางไว้บนโครโมโซมต่างๆ บนแผนที่พันธุกรรม ตัวอย่างเช่น Prasad et al. (2009) รายงานการวางตำแหน่งยีน *Pi1(t)* ในข้าวอินดิกา (indica) สายพันธุ์ Samba mahsuri โดยใช้ประชากร F_2 ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างข้าวพันธุ์ C101LAC กับ Samba mahsuri และทดสอบความต้านทานโดยใช้เชื้อ *P. grisea* สายพันธุ์ DRR 001 พบว่า ยีน *Pi1(t)* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 และอยู่ใกล้ชิดกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM224

ในประเทศไทย Noenplab et al. (2006) ได้รายงานการศึกษาตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ของข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล โดยใช้ประชากร RIL ของคู่ผสมระหว่างข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวเจ้าหอมนิล และใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ 111 เครื่องหมายในการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอ และลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวเจ้าหอมนิล โดยทดสอบระดับความต้านทานต่อโรคไหม้คอรวงกับเชื้อ *P. grisea* จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ THL191, THL318 และ THL899 ในประชากร RIL จำนวน 587 ตัวอย่าง พบว่า ข้าวเจ้าหอมนิลมี QTLs ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้จำนวน 3 QTLs มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 1, 11 และ 12 โดยมีเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับ QTLs ดังกล่าว 14 เครื่องหมาย ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าว สามารถนำมาใช้เพื่อช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของไทยให้ต้านทานโรคไหม้ได้ต่อไป

ตัวอย่างยีนต้านทานโรคไหม้ที่มีการศึกษาวิจัยในระดับจีโนมิก

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* เป็นยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง (broad spectrum resistance) มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 และมีเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* จำนวน 2 เครื่องหมาย คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233 และ RM224 โดยทั้ง 2 เครื่องหมายมีตำแหน่งห่างจากยีน *Pi1(t)* 0.0 cM (Fuentes et al., 2008) และมีข้าวสายพันธุ์ C101LAC เป็น near isogenic line ที่ใช้ในการตรวจสอบยีน *Pi1(t)*

ในประเทศไทยมีรายงานว่า ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์ จากรายงานของ พูนศักดิ์ และคณะ (2550) ที่รายงานว่า ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* มีศักยภาพแสดงความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยได้ดี โดยเชื้อสาเหตุโรคไหม้สามารถเข้าทำลายข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* ได้เพียงร้อยละ 10 และคู่ของยีน *Pi1(t), Pi9* และ *Pi1(t), Pi-ta*^{2} ยังแสดงความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้ดีที่สุด โดยเชื้อสามารถเข้าทำลายได้เพียง ร้อยละ 0.5 จากเชื้อที่ทดสอบทั้งหมดจำนวน 2,476 ไอโซเลท (พูนศักดิ์ และคณะ, 2550) นอกจากนี้อัจฉราพร และ พูนศักดิ์ (2552) ได้รายงานการประเมินยีนต้านทานโรคไหม้ที่สามารถต้านทาน

ต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์และคงทนในภาคเหนือตอนล่าง โดยใช้เชื้อทั้งหมด 80 ไอโซเลท พบว่า ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* มีประสิทธิภาพในการต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้ดี โดยแสดงความต้านทานต่อเชื้อได้ร้อยละ 29.03 ของเชื้อทั้งหมด

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 เป็นยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง (broad soectrum blast resistance) สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่พบในประเทศฟิลิปปินส์ได้ 455 isolates และต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่พบในประเทศจีนได้ 792 ไอโซเลท (Chen et al., 1996,1999) แอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* มีขนาดประมาณ 118 kb ขนาบข้าง (flanking markers) ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR140 และ RFLP JSH12 โดยห่างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR140 ประมาณ 0.9 cM และห่างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ RFLP JSH12 ประมาณ 0.9 cM โดยข้าวสายพันธุ์ C101A51 (near-isogenic line) จะมียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* (Jiang and Wang, 2002)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* มีตำแหน่งอยู่ที่บริเวณเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมข้าวคู่ที่ 6 (Liu et al., 2002) โดยยีน *Pi9* ถูกถ่ายทอดมาจากข้าวป่า (*Oryza minuta*: 2n=4x=48) (Amante-Bordeos et al., 1992) ยีนต้านทาน *Pi9* นี้ สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆได้อย่างกว้างขวาง (broad-spectrum resistance) ตัวอย่างเช่น ยีนต้านทาน *Pi9* ในข้าวสายพันธุ์127-1-75 ได้รับการทดสอบกับเชื้อราสาเหตุโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ กว่า 100 สายพันธุ์ของประเทศฟิลิปปินส์ที่สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (The International Rice Research Institute, IRRI) โดยไม่พบสายพันธุ์เชื้อราโรคไหม้ที่สามารถก่อโรคได้ นอกจากนี้ Liu et al. (2002) ได้ทำการทดสอบสายพันธุ์เชื้อราโรคไหม้อีก 43 สายพันธุ์ จาก 13 ประเทศ ก็ไม่พบสายพันธุ์เชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ใดที่สามารถก่อโรคกับข้าวสายพันธุ์ 12-1-75 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) ซึ่งโครงสร้างนี้ของยีนนี้มีความคล้ายคลึงกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2, Piz-t*, และ *Piz* มากถึง 96% ในระดับของกรดอะมิโน โดยบริเวณที่มีความแตกต่างกันคือ บริเวณ LRR motif จากการทดลองสลับเปลี่ยน motif ระหว่างยีนต้านทาน *Pi2* และ *Pi9* (*Pi2/Pi 9* chimeras) พบว่าส่วน LRR motif เป็นส่วนสำคัญในการกำหนดความเฉพาะเจาะจงต่อปฏิกิริยาตอบสนองของยีนต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36*

ข้าวอินดิกาสายพันธุ์ Kasalath รหัส Q61 มียีน *Pi36* ซึ่งเป็นยีนต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศจีนได้ดี โดยมีตำแหน่งของยีนต้านทานอยู่บนโครโมโซมข้าวคู่ที่ 8 จากการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมข้าวจาปอนิกาสายพันธุ์ Nipponbare เป็นตัวอ้างอิงในการทำนายยีนต้านทาน *Pi36* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสาม มีโครงสร้าง ที่เป็น NBS และ LRR motif โปรตีนของ ยีน *Pi36* ประกอบไปด้วย 1056 กรดอะมิโน มีเพียงหนึ่งกรดอะมิโนเท่านั้นที่ถูกแทนที่จาก Asp เป็น Ser ที่ตำแหน่ง 590 ซึ่งมีความสัมพันธ์กับลักษณะของฟีโนไทป์ที่ต้านทานโรค *Pi36* เป็น single copy gene ในข้าว และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยีน *Mla1* และ *Mla6* ซึ่งเป็นยีนต้านทานโรคราแป้งในข้าวบาร์เล่ย์ มากกว่ายีน *ต้านทาน Pi-ta, Pib, Pi9 และ Piz-t* ในข้าว (Liu et al., 2007)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54 (Pi-k^h)*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* พบครั้งแรกในข้าวสายพันธุ์ Tetep เดิมชื่อ *Pi-k^h* ต่อมาได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Pi54* (Sharma et al. 2010) มีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 11 เป็น Single Dominant gene ยีน *Pi54* มีโครงสร้างโปรตีนต้านทานโรคชนิด Nucleotide–binding site lecine rich repeat (NBS-LRR) (Sharma et al. 2003, 2005) มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุของโรคใบไหม้ *Magnaporthe grisea* ได้หลายสายพันธุ์ ยีน *Pi54* อยู่ใกล้ชิดกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ TRS26, TRS33, S129, และ RM206 โดยอยู่ห่างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ $S129_{700}$ 4.5cM และห่างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM206 0.7cM (Sharma et al. 2005)

ต่อมาได้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54 MAS ที่ตรงตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด 144bp insertion / deletion (InDel) เป็น codominant marker ในข้าวที่มีแอลลีลต้านทานจะมีขนาดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 216 bp และข้าวที่มีแอลลีลอ่อนแอจะมีขนาดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 359 bp ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ agarose gel electrophorisis ทำให้ง่ายต่อการตรวจสอบ และมีความถูกต้องแม่นยำกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR (Ramkumar et al. 2011)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 12 ใกล้ๆกับเซนโทรเมียร์ มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์ แสดงความต้านทานต่อเชื้อรา

บท 104471
ข้อมูลท้องถิ่น
สำนักวิทยบริการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สาเหตุโรคไหม้แบบยีนต่อยีน (gene-for-gene) และเป็นยีนที่มีเพียงตำแหน่งเดียวในจีโนมของข้าว (single-copy gene) พันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* มีหลายพันธุ์ เช่น Katy, Drew, Kaybonnet, IR64, C101 PKT และ C105 TTP 4-1-23 เป็นต้น (Fujita et al., 2009, Berruyer et al., 2003, Jia et al., 2002; Hittalmani et al., 2000)

มีรายงานการประสบความสำเร็จในการโคลนยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* เมื่อปี ค.ศ. 2000 โดย Bryan และคณะ (2000) ซึ่งรายงานว่ายีน *Pi-ta* เป็นยีนต้านทานโรคไหม้ในกลุ่ม Nucleotide binding site and leucine-rich repeats (NBS-LRR) สร้างกรดอะมิโนทั้งหมดจำนวน 928 ตัว และพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเพียงกรดอะมิโนเดียว ส่งผลให้เกิดความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีแอลลีลต้านทาน และข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทาน โดยความแตกต่างดังกล่าวเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเพียงกรดอะมิโนเดียวบริเวณตำแหน่งที่ 918 โดยแอลลีลอ่อนแอจะมีกรดอะมิโน serine แทนที่ตำแหน่งของกรดอะมิโน alanine ของแอลลีลต้านทาน (Bryan et al. 2000) ต่อมา ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตรงตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* เพื่องใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (Jia et al., 2002) นอกจากนี้ยังพบว่ายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* มีศักยภาพในการต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ที่พบในประเทศไทยได้หลายสายพันธุ์ (broad spectrum blast resistance) (พูนศักดิ์ และคณะ, 2550)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* มีลักษณะเป็นยีนเด่น (dominant gene) มีตำแหน่งอยู่บริเวณปลายด้านยาวของโครโมโซมคู่ที่ 2 สามารถต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในญี่ปุ่นได้หลายสายพันธุ์ (Wang et al., 1999) ในปี ค.ศ. 1999 Wang และคณะ (1999) ได้ประสบความสำเร็จในการโคลนยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* โดยยีน *Pib* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของยีนต้านทานโรคที่มีโครงสร้างโปรตีนแบบ Nucleotide binding site and leucine-rich repeats (NBS-LRR) สร้างโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 1,251 ตัว และเป็นยีนต้านทานโรคไหม้ยีนแรกที่ได้รับการโคลนยีน

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* มีลักษณะเป็นครอบครัวยีนขนาดเล็ก (small gene family) ปัจจัยจากสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ และความมืด มีผลต่อการแสดงออกของยีน (Wang et al., 1999) ต่อมา Wang และคณะ (2001) ได้รายงานว่า อุณหภูมิ แสง น้ำ และสารเคมี (jasmonic acid, salicylic acid, ethylene และ probenazole) มีผลต่อการแสดงออกของยีนในกลุ่มนี้ (*Pib*, *Pib*H8, H*Pib*H8-1 และ H*Pib*H8-2) ด้วยเช่นกัน

ต่อมา Fjellstrom และคณะ. (2004) ได้ทำการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pibdom ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน *Pib* และเป็น dominant marker เพื่อใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบยีน

ต้านทานโรคไหม้ และใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ นอกจากนี้ยังมีเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM208 ที่มีตำแหน่งใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* โดยมีการวางตำแหน่งห่างจากยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* ประมาณ 0.0 cM (Fjellstrom et al., 2004)

ในประเทศไทย มีรายงานว่ายีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* มีประสิทธิภาพในการต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่พบในภาคเหนือตอนล่างได้ร้อยละ 23.08 จากเชื้อที่ใช้ทดสอบทั้งหมด 80 ไอโซเลท (อัจฉราพร และ พูนศักดิ์, 2552)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2*

ข้าวสายพันธุ์ Digu ของประเทศจีน สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆจำนวน 156 สายพันธุ์ จากประเทศจีนและประเทศญี่ปุ่น และถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประเทศจีนอย่างแพร่หลาย จากการศึกษาทางพันธุศาสตร์พบว่าข้าวสายพันธุ์ Digu มียีนต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้อยู่สองยีนด้วยกัน คือ ยีน *Pi-d(t)1* และ *Pi-d2* โดยยีนต้านทาน *Pi-d(t)1* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2 และยีนต้านทาน *Pi-d2* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมข้าวคู่ที่ 6 (Chen et al., 2006) ซึ่งต่อมายีนต้านทาน *Pi-d2* ได้ถูกโคลนในปี ค.ศ. 2006 โดย Chen และคณะ ยีนต้านทาน *Pi-d2* นี้มีโครงสร้างของโปรตีนที่แตกต่างจากยีนต้านทานตัวอื่นๆ คือ มีส่วนของน้ำตาลแมนโนสที่สามารถจับกับแลคตินได้อยู่ภายนอกเซลล์ (a bulb-type mannose specific binding lectin, B-lectin) และในส่วนภายในเซลล์มีโครงสร้าง serine-threonine kinase domain ซึ่งโปรตีนจากยีนต้านทาน *Pi-d2* นี้จะมีตำแหน่งอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยข้าวที่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้มียีนต้านทาน *Pi-d2* แตกต่างจากข้าวที่ไม่สามารถต้านทานเพียงแค่กรดอะมิโนหนึ่งตัวที่ตำแหน่ง 441 ของโปรตีนยีนต้านทานเท่านั้น

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3*

ยีน *Pi-d3* ได้ถูกค้นพบโดย Shang และคณะ ในปี 2009 ด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ของข้าว ชนิด Nucleotide-binding site – Leucine rich repeat (NBS-LRR) ระหว่างจีโนมของข้าว 2 สายพันธุ์ คือ ข้าวอินดิกา 93-11 และข้าวจาปอนิกา Nipponbare จากนั้นทำการศึกษาการกระจายตัวของยีนในกลุ่มดังกล่าวในประชากรของข้าวที่เกิดจากการผสมระหว่างพ่อแม่พันธุ์ที่มีความแตกต่างกันในด้านความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ โดย Shang และคณะ ค้นพบยีน *Pi-d3* ข้าวสายพันธุ์ Digu จากประเทศจีน โดยแอลลีลของยีน *Pi-d3* ที่ไม่สามารถต้านทานต่อโรคไหม้ได้นั้นเกิดจากการกลายแบบ nonsense mutation ที่ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 2208 จากตำแหน่งเริ่มต้นของการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้สังเคราะห์ได้โปรตีนที่มีขนาดสั้นลง เนื่องจากการกลายดังกล่าวเกิดเป็น

stop codon นั่นเอง โดยการกลายในลักษณะนี้พบได้โดยมากในข้าวอินดิกา (29 สายพันธุ์จากการตรวจสอบ 32 สายพันธุ์ข้าวอินดิกา) แต่มักไม่พบในข้าวจาโปนิกา (จากการตรวจสอบข้าวจาโปนิกา 32 สายพันธุ์) กล่าวคือ ยีน *Pi-d3* เป็นยีนที่มีการแสดงออกอยู่ในทั้งข้าวสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้และในสายพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ แต่จะแสดงออกในรูปของ pseudogene เนื่องจากการกลายพันธุ์ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น ปัจจุบันมีรายงานว่ายีน *Pi25* และยีน *Pid3* เป็นยีนตัวเดียวกัน โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ (Okuyama et al., 2011)

นอกจากนี้ Shang และคณะ (2009) ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด derived cleaved amplified polymorphic sequences (dCAPS) จำนวน 2 เครื่องหมาย สำหรับใช้ในการตรวจสอบแอลลีล ของยีน *Pi-d3* ในข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ดังนี้

- เครื่องหมายดีเอ็นเอ *Pid3*-dCAPS-1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ดังนี้ F-TACTACTCATGGAAGCTAGTTCTC และ R-GCAGCACTTCTTGACTACTGTCTGT โดยจะเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 178 คู่เบส และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *XbaI* แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d3* จะถูกตัดชิ้นดีเอ็นเอออกประมาณ 20 คู่เบส ส่วนแอลลีล ต้านทานของยีน *Pi-d3* จะไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวจึงมีชิ้นดีเอ็นเอขนาดเท่าเดิม

- เครื่องหมายดีเอ็นเอ *Pid3*-dCAPS-2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ดังนี้ F- TACTACTCATGGAAGCTAGTTCTC และ R- AGCACTTCTTGACTACTGTCTGCCT โดยจะเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 178 คู่เบส และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *BamHI* แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d3* จะถูกตัดชิ้นดีเอ็นเอออกประมาณ 20 คู่เบส ส่วนแอลลีล ต้านทานของยีน *Pi-d3* จะไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวจึงมีชิ้นดีเอ็นเอขนาดเท่าเดิม

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)*

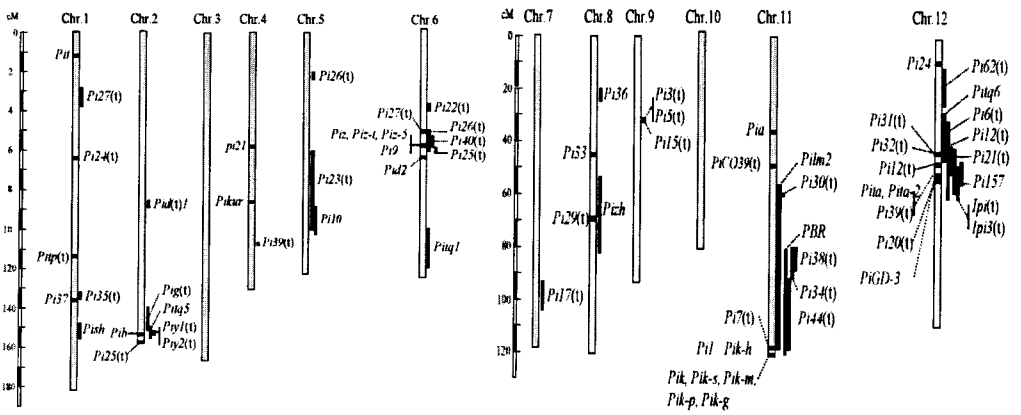
ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* พบในข้าวสายพันธุ์ Gumei 4 ของประเทศจีน เป็นยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง โดยพบว่ายีนดังกล่าวมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้ดีกว่ายีน *Pi1(t)*, *Pi2*, และ *Pi3* มีขนาดประมาณ 70 kb ซึ่งอยู่ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 และ C0428 บนโครโมโซมที่ 6 ซึ่งประกอบด้วยยีนต้านทานโรคไหม้ของข้าว ชนิด Nucleotide-binding site– Leucine rich repeat (NBS-LRR) 5 ชนิด (Deng et al., 2006) ต่อมามีการโคลนยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* สำเร็จและพบว่ายีนดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่มของยีนต้านทานโรคชนิด Nucleotide-binding site– Leucine rich repeat (NBS-LRR) (Deng et al., 2009) มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ดีกว่า

Pi2, Pi9, Piz และ *Pizt* การตรวจสอบแอลลีลของยีน *Pigm(t)* ในข้าวสามารถทำได้โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 และ Indel marker S29742

- เครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS marker โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ดังนี้ F-5' TTAGGCTGCTTGTCTTGG-3' และ R-5'GGGAGGAGGAATGGTAGGAA-3' โดยจะเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 468 คู่เบส และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *EcoRI* แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pigm(t)* จะมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *EcoRI* ทำให้สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอได้ ส่วนแอลลีลต้านทานของยีน *Pigm(t)* ไม่มีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *EcoRI* ไม่สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวทำให้มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดเท่าเดิม

- เครื่องหมายดีเอ็นเอ Indel marker S29742 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่ไพรเมอร์ดังนี้ F- 5'CAGTGAAACGAACGCTATG-3' และ R- 5'AATAGGAAGGGTTGATGTTG-3' โดยแอลลีลต้านทานจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 555 bp ส่วนแอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pigm(t)* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 461 bp

ปัจจุบันมีรายงานการวางตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ในจีโนมข้าวอย่างแพร่หลาย (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 2) และพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ (ตารางที่ 2) และซึ่งข้อมูลตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้นี้เป็นข้อมูลที่ได้จากฐานข้อมูลสาธารณะ (Oryzabase และ Gramene) โดยพบการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้เกือบทุกโครโมโซม ยกเว้นโครโมโซมคู่ที่ 3 และ 10



ภาพที่ 2 ตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวที่มีการรายงานเมื่อปี 2008 (Koide et al., 2009).

ตารางที่ 1 ยีนต้านทานโรคไหม้ และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการคัดเลือก

Target gene	Chromosome	Distance	Marker
Pi27(t)	1	11.9	RM151
		9.7	RM259
Pi35(t)	1	3.5	RM1216
		3.5	RM1003
Pid1	2	14.5	RM262
Pib	2	0	RM208, Pibdom
pi21	4	0	P702D03#79
Pigm (t)	6	2	C26348
		-	*Pigm (t)*-C5483
		-	*Pigm (t)*-S29742
Pi-d2	6	0	*Pi-d2*
Pi9	6	-	pB8*Pi9*
		0	NBS2-Pi9-195-1
Pid3	6	0	*Pid3*-d CAPS-1, *Pid3*-d CAPS-2
Pi5	9	0	76B14f, 40N23r
Pi38	11	4	RM206
		16	RM21
Pik	11	0	k8823, K8824
Pik-s	11	0	RM224, RM1233
Pi54 (Pi-k^{h})	11	0.7	Pi54 SSR
	11	0	Pi54 MAS
Pi1(t)	11	0	RM1233
	11	-	RM224
Pi2(t)	11	0.9	SSR140
Pi-ta	12	0	Pi-ta 440, Pi-ta 1042, Pi-ta 403
Pi20(t)	12	0	RM1337
		-	RM5364
Pi39(t)	12	0	39M6

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Koide et al., 2009

ตารางที่ 2 พันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้จาก IRRI

ลำดับ	พันธุ์ข้าว	ยีนต้านทาน	อ้างอิง
1	CT9933	No information	
2	C101 LAC	*Pi1(t)*	Ram et al., 2007
3	C101TTP	*Pi4a*	พูนศักดิ์ และคณะ, 2550
4	C104 LAC	*Pi1(t)*	Berruyer *et al.*, 2003
5	C104 PKT	*Pi3,*	Ram et al., 2007
6	C105 TTP 4-1-23	*Pi4b, Pi-ta*	Ram et al., 2007; Berruyer *et al.*, 2003
7	C101 PKT	*Pi4a, Pi-ta,*	Ram et al., 2007; Hittalmani et al., 2000
8	IR64	*Pi-ta, Pib, Pi20*	Fujita et al., 2009; Sridhar et al., 1999
9	CO39*	*Pia,*	Ram et al., 2007
10	C102PKT	*Pi4a,*	Ram et al., 2007
11	AZUCENA	*Piz, Piz-t, Pik-m, Pik-p, Pit*	Kim et al., 2010
12	C103TTP	*Pi1(t)*	Berruyer et al., 2003
13	C101A51	*Pi2, Piz-5*	Ram et al. 2005; Hittalmani et al., 2000

หมายเหตุ * CO39 เป็นพันธุ์ข้าวที่แสดงลักษณะอ่อนแอต่อโรคไหม้ อย่างไรก็ตาม มีการรายงานว่า CO39 มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pia* (Telebanco-Yanoria et al., 2010)

ด้วยความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในปัจจุบัน ส่งผลให้มีการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคไหม้สำเร็จแล้วจำนวน 18 ยีน ได้แก่ *Pib, Pi-ta, Pi54 (Pi-kh), Pi9, Pi2, Pizt, Pi-d2, Pi36, Pi37, Pi-km, Pi-d3, Pi5, pi21, Pit, Pigm(t), Pb1, Pi25* และ *Pia* (ตารางที่ 3) โดยยีนต้านทานโรคไหม้จำนวน 16 ยีนที่มีโปรตีนต้านทานอยู่ในกลุ่มที่ 1 คือ Nucleotide binding site -Leucine-rich repeats (NBS-LRR) ได้แก่ ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* เป็นยีนต้านทานโรคไหม้ตัวแรกที่ได้รับการโคลนยีน (Wang et al., 1999) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* ซึ่งข้าวที่มียีนต้านทาน *Pi-ta* สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้

ตารางที่ 3 ยีนต้านทานโรคไหม้ที่ได้รับการโคลนยีน และโปรตีนต้านทานโรค

ยีน	โครโมโซม	โปรตีน	อ้างอิง
Pib	2	NBS-LRR	Wang et al., 1999
Pi-ta	12	NBS-LRR	Bryan et al., 2000
Pi54 (Pi-kh)	11	NBS-LRR	Sharma et al., 2005
Pi9	6	NBS-LRR	Qu et al., 2006
Pi2	6	NBS-LRR	Zhou et al., 2006
Pizt	6	NBS-LRR	Zhou et al., 2006
Pi-d2	6	B-lectin	Chen et al., 2006
Pi36	8	CC-NBS-LRR	Liu et al.,2007
Pi37	1	NBS–LRR	Lin et al., 2007
Pi-km	11	NBS-LRR	Ashikawa et al. 2008
Pi-d3	6	NBS-LRR	Shang et al., 2009
Pi5	9	CC-NBS-LRR	Lee et al., 2009
pi21	4	Proline-rich protein	Fukuoka et al., 2009
Pit	1	NBS-LRR	Hayashi and Yoshida, 2009
Pigm(t)	6	NBS-LRR	Deng et al., 2009
Pb1	11	CC–NBS–LRR	Hayashi et al., 2010
Pi25	6	NBS-LRR	Chen et al., 2011
Pia	11	NBS-LRR	Okuyama et al., 2011

(*Magnaporthe grisea*) ที่มียีน *AVR-Pi-ta* ตามความสัมพันธ์ยีน-ต่อ–ยีน (Gene for gene concept) โดย *Pi-ta* จัดเป็นโปรตีนยีนต้านทานในกลุ่มที่ 1 ที่แปลรหัสได้เป็น Putative cytoplasmic receptor ที่มีส่วนกลางเป็น nucletide-binding site และ leucine rich domain (LRD) ที่บริเวณ C-terminus การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนเพียงตัวเดียวใน *Pi-ta* บริเวณ LRD จะทำให้เกิดการสูญเสียความต้านทานของข้าว โดยจะทำให้เกิดปฏิกิริยาสัมพันธ์กับโปรตีนจาก *AVR – Pi-ta* เสียไป (Bryan et al., 2000) ยีน *Pi-kh* สร้างโปรตีนต้านทานชนิด NBS-LRR (Sharma et al., 2005) ต่อมาเปลี่ยนชื่อเป็นยีน *Pi54* (Sharma et al., 2010) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2, Pi9* และ *Pizt* เป็นยีนต้านทานโรคไหม้ที่มีลักษณะคล้ายกันมาก และ

มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 เช่นเดียวกันกับยีน *Pigm(t)* ซึ่งมีโปรตีนต้านทานโรคเป็นแบบ NBS-LRR เหมือนกัน (Qu et al., 2006; Zhou et al., 2006; Deng et al., 2009) ต่อมามีการโคลนยีนต้านทานโรคไหม้เพิ่มเติมอีก คือ *Pi37, Pi-km, Pid3* และ *Pit* ซึ่งมีโปรตีนของยีนต้านทานโรคเป็นแบบ NBS-LRR (Lin et al., 2007; Ashikawa et al. 2008; Hayashi and Yoshida, 2009; Shang et al., 2009)

ส่วนยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36, Pi5* และ *Pb1* มีโปรตีนของยีนต้านทานโรคไหม้ เป็นแบบ CC-NBS-LRR ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของยีนต้านทานชนิด NBS-LRR (Liu et al.,2007; Lee et al., 2009; Hayashi et al., 2010) ล่าสุดมีการโคลนยีนต้านทานโรคไหม้สำเร็จเพิ่มเติมอีก 2 ยีน คือ ยีน *Pia* และ *Pi25* ซึ่งยีนดังกล่าวสร้างโปรตีนต้านทานโรคชนิด NBS-LRR (Chen et al., 2011; Okuyama et al., 2011)

นอกจากโปรตีนต้านทานโรคชนิด NBS-LRR แล้ว ยังพบว่ายีนต้านทานโรคไหม้มีโปรตีนต้านทานโรคแบบอื่นอีก เช่น ยีน *Pi-d2* ซึ่งเป็นยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 มีโครงสร้างของโปรตีนที่แตกต่างจากยีนต้านทานตัวอื่นๆ คือ มีส่วนของน้ำตาลแมนโนสที่สามารถจับกับแลคตินได้อยู่ภายนอกเซลล์ (a bulb-type mannose specific binding lectin, B-lectin) และในส่วนภายในเซลล์มีโครงสร้าง serine-threonine kinase domain ซึ่งโปรตีนจากยีนต้านทาน *Pi-d2* นี้จะมีตำแหน่งอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Chen et al., 2006) ยีนต้านทานโรคไหม้ที่กล่าวมาทั้งหมดนี้มีลักษณะเป็นยีนเด่นและมีความจำเพาะกับเชื้อสาเหตุโรคไหม้ แต่ยังมียีนต้านทานโรคไหม้อีกยีนหนึ่ง ที่ได้รับการโคลนยีนและมีลักษณะเป็นยีนด้อย คือ ยีนต้านทานโรคไหม้ *pi21* ซึ่งเป็นยีนที่ไม่มีความจำเพาะกับเชื้อ สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์ โดยยีนดังกล่าวมีเพียงตำแหน่งเดียว (single copy gene) มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4 สร้างโปรตีนต้านทานโรคชนิด Proline-rich protein (Fukuoka et al., 2009)

ยีนต้านทานโรคไหม้เหล่านี้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการควบคุมการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ และลดความเสียหายของผลผลิตข้าวอันเป็นผลมาจากการระบาดของโรคไหม้ การใช้พันธุ์ต้านทานนับเป็นวิธีควบคุมโรคไหม้ที่มีประสิทธิภาพที่สุด โดยลดความเสียหายจากการระบาดของโรคได้เป็นอย่างดี แต่การใช้ยีนต้านทานโรคไหม้แบบแคบที่จำเพาะกับเชื้อเพียงไม่กี่สายพันธุ์ จะส่งผลให้พันธุ์ข้าวสูญเสียความต้านทานต่อโรคได้ในระยะเวลาเพียงไม่กี่ปี เนื่องจากเชื้อมีการปรับตัวและมีวิวัฒนาการให้สามารถเข้าทำลายข้าวได้ (ชาญณรงค์, 2553; Sreewongchai et al., 2010) ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้โดยใช้ยีนต้านทานแบบกว้าง หรือ การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ โดยการรวมยีนต้านทานโรคไหม้หลายๆ ยีน (gene pyramiding) จึงเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ให้ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้อย่างยั่งยืน

ยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวป่า และข้าวพื้นเมือง

ยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ส่วนใหญ่พบในข้าวพื้นเมือง และข้าวป่า เช่น ยีน *Pi1(t)* จากข้าวสายพันธุ์ LAC23, *Pi2(t)* จากข้าวสายพันธุ์ 5173, *Pi-3(t)* และ *Pi-4^{a}(t)* จากข้าวสายพันธุ์ Pai-kan-tao และยีน *Pi-4^{b}(t)* จากข้าวสายพันธุ์ Tetep เป็นต้น พันธุ์ข้าวเหล่านี้เป็นข้าวพื้นเมืองที่ได้รับการเก็บรวมรวมไว้ที่สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI) (Mackill and Bonman, 1992) ต่อมามีการใช้ประโยชน์จากยีนต้านทานโรคไหม้ที่พบในข้าวป่าและข้าวพื้นเมืองอย่างกว้างขวาง เพื่อนำมาปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ เช่น การพัฒนาข้าวสายพันธุ์คล้าย CO39 (near-isogenic lines) ที่มีลักษณะต้านทานโรคไหม้จากยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t), Pi2(t), Pi-3(t), Pi-4^{a}(t)* และยีน *Pi-4^{b}(t)* โดยมีข้าวสายพันธุ์ LAC23, 5173, Pai-kan-tao และ Tetep เป็นสายพันธุ์ให้ยีนต้านทานโรคไหม้ ตามลำดับ และมีข้าวสายพันธุ์ CO39 ซึ่งอ่อนแอต่อโรคไหม้เป็นสายพันธุ์รับ ทำการผสมกลับจนถึงประชากร BC_6F_3 จนได้ข้าวสายพันธุ์คล้าย CO39 ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ ได้แก่ C101LAC (*Pi1(t)*), C101A51 (*Pi2(t)*), C104PKT (*Pi-3(t)*), C101PKT (*Pi-4^{a}(t)*) และ C105TTP (*Pi-4^{b}(t)*) (Mackill and Bonman, 1992) ต่อมาข้าวสายพันธุ์คล้าย CO39 เหล่านี้ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้อย่างแพร่หลาย เช่น Hittamani et al. (2000) เป็นต้น (ตารางที่ 4)

ข้าวพันธุ์ Digu ของประเทศจีน เป็นแหล่งพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้างจำนวน 3 ยีนได้แก่ *Pi-d(t)1, Pi-d2,* และ *Pi-d3* ได้รับการปรับปรุงพันธุ์มาจากข้าวพื้นเมืองอินดิกาสายพันธุ์ Gunong 13 และใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ในประเทศจีน (Chen et al., 2004a; Chen et al., 2009) เช่น การปรับปรุงพันธุ์ข้าวพันธุ์ G46B ให้ต้านทานโรคไหม้ โดยการรวมยีนต้านทานโรคไหม้จำนวน 3 ยีน ได้แก่ ยีน *Pi-d(t)1, Pib,* และ *Pi-ta2* โดยมีข้าวพันธุ์ Digu, BL-1, และ *Pi-4* เป็นแหล่งพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้ ตามลำดับ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (Chen et al., 2004b)

ข้าวพันธุ์ Tetep เป็นข้าวพื้นเมืองของประเทศเวียดนาม มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้อย่างกว้างขวาง และเป็นแหล่งพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* ในข้าวพันธุ์ปรับปรุง Katy, Madison, Kaybonnet, และ Drew นอกจากนี้ ข้าวพื้นเมืองพันธุ์ Tetep ยังเป็นแหล่งพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* และถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว Basmati ให้ต้านทานโรคไหม้ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM206 ช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวแบบผสมกลับ และได้มีการผนวกยีนต้านทานโรคไหม้อื่นๆ ได้แก่ *Pi1(t), Pi-ta Pi-z5, Pib, Pi5* และ *Pi9* เข้าไปในประชากรชั่วที่ BC_4F_1 ต่อไป (Sing et al., 2011)

ตารางที่ 4 การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้

Gene	Donor	Ch.	Markers	Crosses	References
Pi1(t)	C101LAC	11	Npb181, RZ536	C101LAC / C101A51 // C101LAC / C101PKT	Hittalmari et al., 2000
Piz-5	C101A51	6	RZ64, RZ612, RG456, RG64-SAP		
Pi-ta	C101PKT	12	RG869, RZ397, RG241		
Pi54	Tetep	11	RM206	Tetep /Basmati	Sing et al., 2011
Pi-d(t)1	Digu,	2	-	Digu/ G46B// BL-1/ G46B/// Pi-4/ G46B	Chen et al., 2004b
Pib	BL-1,	2	-		
Pi-ta2	Pi-4	12	-		
Pish	IRBLsh-S[CO]	1	RM7419, RM1268, RM6648, RM5811	IRBLsh-S[CO] / IRBLb-W[CO]	Koide et al., 2010
Pib	IRBLb-W[CO]	2	RM208, Pibdom		
QTLs	IR64	2	RM208	IR64 / Jao Hom Nin	Sreewongchai et al., 2010
		12	RM179		
QTLs	Jao Hom Nin	1	RM212, RM319		
		11	RM144, RM139		
QTLs	Jao Hom Nin	1	RM319, RM212	RD6/Jao Hom Nin	Wongsaprom et al., 2010
		11	RM224, RM114		
QTLs	RD6 / P0489	2	RM48, RM207	RD6 / P0489 // RD6/ Jao Hom Nin	Suwannual et al., 2009
		12	RM313, RM277		
QTLs	RD6/ Jao Hom Nin	1	RM319, RM212		
		11	RM224, RM114		

ที่มา: ดัดแปลงจาก ศรีสวัสดิ์ และคณะ, 2553

นอกจากข้าวพื้นเมืองแล้ว ข้าวป่าก็ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ด้วย เช่นกัน Ram et al, 2005 ได้ทำการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้แบบกว้างด้วยวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐาน โดยผสมระหว่างข้าวพันธุ์ปลูก B 32-sel-4 ที่ให้ผลผลิตสูงแต่ไม่ต้านทานโรคไหม้กับข้าวป่าสายพันธุ์ *O. rufipogon* ของประเทศอินเดีย แล้วนำต้น F_1 ที่ได้มาผสมกับข้าวพันธุ์ B29-6 ซึ่งเป็นข้าวทนเค็ม จากนั้นทำการคัดเลือกต่อโดยใช้วิธีการปรับปรุงพันธุแบบสืบประวัติ (pedigree selection) จนถึงประชากรชั่วที่ 5 (F_5) และทดสอบความต้านทานโรคไหม้ จนได้ข้าวสายพันธุ์ปรับปรุง B 90-15 (IET 15420) ที่ให้ผลผลิตสูงและต้านทานโรคไหม้

วิธีการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมพันธุ์ข้าว

1. รวบรวมพันธุ์ข้าวพื้นเมืองจากแปลงปลูกของเกษตรกรในจังหวัดอุบลราชธานี จากแหล่งปลูกข้าวในภาคเหนือ ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี หน่วยค้นหาและใช้ประโยชน์จากยีนข้าว และธนาคารเชื้อพันธุ์พืช ประกอบด้วย พันธุ์ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ หรือภาคอีสาน (ข้าวขึ้นน้ำ และ ข้าวนาสวน) และ ภาคใต้ ข้าวป่า และข้าวพันธุ์ปรับปรุงต้านทานโรคไหม้

2. เก็บรวบรวมสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรค *Pi9* โดยดำเนินการขอสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* จาก ดร. Guo-liang Wang มหาวิทยาลัยแห่งรัฐโอไฮโอ เพื่อทำการเพิ่มปริมาณข้าวที่มียีนต้านทานโรคเชื้อราใบไหม้ (*Pi9*) ณ. เรือนเพาะทดลองของภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากข้าว โดยประยุกต์จาก CTAB extraction procedure ของ Doyle and Doyle (1990) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

นำตัวอย่างใบข้าวสดอายุ 4-5 สัปดาห์ จำนวน 1-2 กรัม มาบดให้ละเอียดในโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำส่วนผงใบที่บดละเอียดใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 2 ml เติม warm 2% 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 2 % B – mercaptoethanol] ปริมาตร 700 µl ผสมให้เข้ากันอย่างดี จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำหลอดทดลองมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม Chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) 840 µl ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 30 นาที จากนั้นไปเปตเอาสารละลายส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ เติม isopropanol เย็นจัด ปริมาตร 1 volume ของสารละลายที่ไปเปตได้ ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C ประมาณ 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที แล้วเทสารละลายส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol เย็นจัด 2 ครั้ง ตากตะกอน ดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer และ กำจัดอาร์เอ็นเอด้วย Rnase A (10 mg / ml) บ่มที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24 :1 ; pH 8.0) ปริมาตร 1 volume ผสมและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm นาน 15 นาที ไปเปต supernatant ใส่หลอดใหม่แล้วเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24 : 1) 1 volume

นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ไปเปตส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม 3M Sodium acetate ปริมาตร 1/10 volume ผสมเบาๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 30 นาที แล้วเทสารส่วนใสด้านบนทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 75 % ethanol 2 ครั้ง ตากตะกอนให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาณ 65 µl เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเออย่างคร่าวๆ โดยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ agarose ความเข้มข้น 1% ในสารละลาย TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 วัตต์ นานประมาณ 45 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต เพื่อประมาณความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเออย่างคร่าวๆ เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

3. สืบค้นไพรเมอร์ของยีนที่ควบคุมลักษณะการต้านทานโรคเชื้อราใบไหม้

สืบค้นและตรวจสอบข้อมูลของ primer sequences ของเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ เน้นการใช้ gene specific markers และ microsatellite markers เพราะมีความจำเพาะเจาะจงกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่ศึกษา จากการสืบค้นและรวบรวมข้อมูลของ primer sequences ที่ควบคุมลักษณะการต้านทานโรคไหม้ในข้าว สามารถสืบค้นเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนต้านทานโรคไหม้ ได้จำนวน 10 ยีน แบ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตรงตำแหน่งยีน (gene specific markers) จำนวน 6 ยีนได้แก่ *Pi9, Pi54, Pi-d2, Pi-d3, Pi-ta* และ *Pib* และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรคไหม้จำนวน 4 ยีน ได้แก่ ยีน *Pigm(t)* , *Pi1(t), Pi2* และ *Pi36* ดังแสดงในตารางที่ 5

4. การตรวจสอบยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมือง โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

4.1 การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ Pi-d2

นำดีเอ็นเอของตัวอย่างข้าวพื้นเมืองมาตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* (*Pi-d2*Con2F/Con2R) (Chen et al., 2006) โดย PCR reaction ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม, 1X PCR buffer (Dream *Taq* buffer), $MgCl_2$ 1.25 มิลลิโมลาร์, dNTPs 0.1 มิลลิโมลาร์, primer 0.25 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต ปรับปริมาตรด้วย dH_2O ให้ได้ 20 ไมโครลิตร ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามด้วย 30 รอบ ของ denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียสนาน 40 วินาที และ extension ที่

อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

หลังจากนั้นนำ PCR product มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* เพื่อดูความแตกต่างระหว่างตัวอย่างข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีน *Pi-d2* และพันธุ์ข้าวที่ไม่มีแอลลีลไม่ต้านของยีน *Pi-d2* โดยพันธุ์ข้าวที่มียีน *Pi-d2* นั้นจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกับ recognition site ของ *MluI* ทำให้ถูกตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวได้ ทำให้ได้ขนาดดีเอ็นเอ 400 และ 700 bp ทำการแยกขนาดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี 2% agarose gel electrophorasis ทำการทดลองซ้ำสองครั้ง

4.2 การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ Pi9

การตรวจสอบยีน Pi9 โดยใช้ไพรเมอร์ pB8

ตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ในข้าวพื้นเมืองไทยด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับยีนต้านทาน *Pi9* (pB*8*) F-5'CCCAATCTCCAATGACCCATAAC -3' และ R-5' CCGGACTAAGTA CTGGCTTCGATA-3' (Liu et al., 2002) โดย PCR reaction มีองค์ประกอบ ดังนี้ ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม, 1X PCR buffer (Dream *Taq* buffer), $MgCl_2$ 1.25 มิลลิโมลาร์, dNTPs 0.1 มิลลิโมลาร์, primer 0.25 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต ปรับปริมาตรด้วย dH_2O จนได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามด้วย 30 รอบ ของ Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสนาน 45 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำ PCR product มาทำการแยกขนาดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophorasis ทำการทดลองซ้ำสองครั้ง

การตรวจสอบยีน Pi9 โดยใช้ไพรเมอร์ NBS2-Pi9-195-1

การตรวจสอบยีน *Pi9* ในข้าวพื้นเมืองไทยด้วยไพรเมอร์ NBS2-*Pi9-195-1* โดย PCR reaction ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม, 1X PCR buffer (Dream *Taq* buffer), $MgCl_2$ 1.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์, primer 0.2 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต โดยมี PCR profile ดังนี้ Pre-denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที 1 รอบ อุณหภูมิ denature 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ annealing 57 อาศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 35 รอบ และอุณหภูมิ long extension 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ นำ PCR product มาตรวจสอบผลโดยนำมาแยก

ขนาดใน 1% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง แล้วบันทึกภาพภายใต้แสง UV โดยพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีล ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 2,000 bp

4.3 การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ Pi36

ตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* ซึ่งมีองค์ประกอบของ PCR ดังนี้ คือ ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม, 1X PCR buffer (Dream *Taq* buffer), $MgCl_2$ 1.25 มิลลิโมลาร์, dNTPs 0.1 มิลลิโมลาร์, R36STS primer 0.25 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต ปรับปริมาตรด้วย dH_2O จนได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ Pre-denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามด้วย 30 รอบ ของ Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที annealing ที่ อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียสนาน 45 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

หลังจากนั้นนำ PCR product มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hinfl* เพื่อดูความแตกต่างระหว่างตัวอย่างข้าวที่มีแอลลีลของยีน *Pi36* ที่ต้านทานต่อโรคไหม้และพันธุ์ข้าวที่ไม่มีแอลลีลของยีน *Pi36* ที่ไม่ต้านทานโรคไหม้นี้ ทำการแยกขนาดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี 2% agarose gel electrophorasis ทำการทดลองซ้ำสองครั้งเพื่อยืนยันผล

4.4 การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ Pi-ta

ตรวจสอบยีน *Pi-ta* ในข้าวพื้นเมืองไทยโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* โดย PCR reaction ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม, 1X PCR buffer (Dream *Taq* buffer), 0.2 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$, dNTPs 0.1 มิลลิโมลาร์, *Pi-ta* primer 0.2 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต โดยมี PCR profile ดังนี้ Pre-denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที 1 รอบ อุณหภูมิ denature 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ annealing *Pi-ta* 57 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 1.30 นาที จำนวน 35 รอบ และอุณหภูมิ long extension 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ นำ PCR product มาตรวจสอบผลโดยนำมาแยกขนาดใน 1% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลานาน 80 นาที บันทึกภาพโดยใช้เครื่องถ่ายภาพ Gel document (Gel Documentation System, Wealtec Dolpin) ทำการทดลองสองซ้ำ เพื่อยืนยันผล

ตารางที่ 5 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาหายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคไหม้

Gene	Ch.	Marker	Primer sequence (5' >>>>> 3')	References.
1. *Pigm (t)*	6	*Pigm (t)*-C5483	F-TTAGGCTGCTTGTCTTGGG	Deng et al.,
			R-GGGAGGAGGAATGGTAGGAA	2006
		Pigm (t)-S29742	F- CAGTGAAACGAACGCTATG	
			R-AATAGGAAGGGTTGATGTTG	
2. *Pi54*	11	Pi54 SSR	F- GGAGAGCCAATCTGATAAGCA	Sharma et al.,
(Pi-k^h)			R-CAACAAGAGAGGCAAATTCTCA	2005
	11	Pi54 indel	F- CAATCTCCAAAGTTTTCAGG	Ramkumar et
			R- GCTTCAATCACTGCTAGACC	al. 2011
3. *Pi1(t)*	11	RM1233	F-GTGTAAATCATGGGCACGTG	Fuentes et
			R-ATTGGCTCCTGAAGAAGG	al., 2008
4. *Pi2(t)*	11	SSR140	F-AAGGTGTGAAACAAGCTAGCAA	Jiang and
			R-TTCTAGGGGAGGGGTGTAGAA	Wang, 2002
5. *Pi36(t)*	8	R36STS	F- CAGAGACCACAGAGCATTTCC	Liu et al.,
			R-GCTCCAATGAAACAACAGGGC	2005
6. *Pi-d2*	6	*Pi-d2*	F-TTGGCTATCATAGGCGTCC	Chen et al.,
			R-ATTTGAAGGCGTTTGCGTAGA	2006
7. Pi9	6	pB8*Pi9*	F-CCCAATCTCCAATGACCCATAAC	Liu et al.,
			R- CCGGACTAAGTACTGGCTTCGATA	2002
	6	NBS2-Pi9-195-1	F-ATACAGACCAGAGAAAGAAAA	Qu et al.,
			R-ATGGTCCTTTATCTTTATTG	2006
8. *Pid3*	6	*Pid3*-d CAPS-1	F- TACTACTCATGGAAGCTAGTTCTC	Shang et al.,
			R- GCAGCACTTCTTGACTACTGTCTGT	2009
		Pid3-d CAPS-2	F- TACTACTCATGGAAGCTAGTTCTC	
			R- AGCACTTCTTGACTACTGTCTGCCT	
9. *Pi-ta*	12	*Pi-ta*	F-AGCAGGTTATAAGCTAGGCC	Jia et al. 2002
			R- CTACCAACAAGTTCATCAAA	
10. *Pib*	2	*Pibdom*	F-GAACAATGCCCAAACTTGAGA	Fjellstrom et
			R-GGGTCCACATGTCAGTGAGC	al., 2004

4.5 การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ Pib

ตรวจสอบยีน *Pib* ในข้าวพื้นเมืองไทยโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* โดย PCR reaction ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม, 1X PCR buffer (Dream *Taq* buffer), $MgCl_2$ 0.2 มิลลิโมลาร์, dNTPs 0.1 มิลลิโมลาร์, Pibdom primer 0.2 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต โดยมี PCR profile ดังนี้ Pre-denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที 1 รอบ อุณหภูมิ denature 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ annealing 62 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 1.30 นาที จำนวน 35 รอบ และอุณหภูมิ long extension 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ นำ PCR product มาตรวจสอบผลโดยนำมาแยกขนาดใน 1% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลานาน 80 นาที บันทึกภาพโดยใช้เครื่องถ่ายภาพ Gel document (Gel Documentation System, Wealtec Dolpin)

4.6 การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ Pi1(t)

ตรวจสอบยีน *Pi1(t)* ในข้าวพื้นเมืองไทยโดยใช้ไพรเมอร์ RM1233 โดย PCR reaction ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 20-50 นาโนกรัม, 1X PCR buffer (Dream *Taq* buffer), $MgCl_2$ 0.2 มิลลิโมลาร์, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์, RM1233 primer 0.5 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต โดยมี PCR profile ดังนี้ Pre-denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 1 รอบ อุณหภูมิ denature 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ annealing 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ และอุณหภูมิ long extension 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที 1 รอบ นำ PCR product มาตรวจสอบผลโดยนำมาแยกขนาดใน 3% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลานาน 1ชั่วโมง 20 นาที บันทึกภาพภายใต้แสง UV ทำการทดลองสองซ้ำ เพื่อยืนยันผล

4.7 การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ Pi-d3

การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ Pi-d3 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-1

ตรวจสอบยีน *Pi-d3* ในข้าวพื้นเมืองไทย โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับยีนต้านทาน *Pi-d3* (Pid3-dCAPS-1) (Shang et al., 2009) ซึ่งมีองค์ประกอบของพีซีอาร์ ดังนี้ คือ ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม, 1X PCR buffer (Dream *Taq* buffer), dNTPs 0.1 มิลลิโมลาร์, primer 0.25 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต ปรับปริมาตรด้วย dH_2O จนได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใช้อุณหภูมิในการทำ

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 30 รอบ ของ Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียสนาน 40 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

หลังจากนั้นนำ PCR product มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I เพื่อดูความแตกต่างระหว่างตัวอย่างข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีน *Pi-d3* และพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d3* โดยพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* นั้น จะไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่าเดิม คือ 178 คู่เบส ส่วนพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d3* จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I ได้ ทำให้ได้ขนาดดีเอ็นเอ 158 และ 20 คู่เบส ตามลำดับ ทำการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยใช้ 3% agarose gel electrophorasis และทำการทดลองซ้ำอย่างน้อยสองครั้ง

การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ Pi-d3 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-2

ตรวจสอบยีน *Pi-d3* ในข้าวพื้นเมืองไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับยีนต้านทาน *Pi-d3* (Pid3-dCAPS-2) (Shang et al., 2009) ซึ่งมีองค์ประกอบของพีซีอาร์ ดังนี้ คือ ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม, 1X PCR buffer (Dream *Taq* buffer), dNTPs 0.1 มิลลิโมลาร์, primer 0.25 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต ปรับปริมาตรด้วย dH_2O จนได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามด้วย 30 รอบ ของ Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียสนาน 40 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

หลังจากนั้นนำ PCR product มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI เพื่อดูความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* และพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทาน โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังนี้ 10X buffer 1.5 ไมโครลิตร, PCR product 10 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI 0.5 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย dH_2O จนได้ปริมาตรสุดท้าย 15 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาบ่มในอุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 คืน แล้วนำมาหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ (inactivate) ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอใน 2% agarose gel electrophorasis โดยพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* จะไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 178 bp ส่วนพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทานจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI ทำให้ได้ดีเอ็นเอขนาด 153 bp ตามลำดับ

4.8 การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)*

ตรวจสอบยีน *Pi2(t)* ในข้าวพื้นเมืองไทยโดยใช้ไพรเมอร์ SSR140 โดย PCR reaction ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 20-50 นาโนกรัม, 1X PCR buffer (Dream *Taq* buffer), $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์, primer 0.5 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต โดยมี PCR profile ดังนี้ Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที 1 รอบ อุณหภูมิ denature 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ annealing 55 อาศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ และอุณหภูมิ long extension 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที 1 รอบ

นำ PCR product มาตรวจสอบผลโดยนำมาแยกขนาดใน 3% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลานาน 80 นาที บันทึกภาพภายใต้แสง UV โดยพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในข้าวสายพันธุ์ต้านทาน near isogenic line C101A51 กำหนดให้เป็น แอลลีล A ส่วนพันธุ์ข้าวที่ไม่มีแอลลีลต้านทานจะปรากฏแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 115 bp เปรียบเทียบกับขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในสายพันธุ์อ่อนแอ CO39 กำหนดให้เป็นแอลลีล B

4.9 การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54 (Pi-k^h)*

<u>การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ Pi54 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54 SSR (RM206)</u>

ตรวจสอบยีน *Pi54* ในข้าวพื้นเมืองไทยโดยใช้ไพรเมอร์ RM206 โดย PCR reaction ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 60 นาโนกรัม, 1X PCR buffer, dNTPs 1 มิลลิโมลาร์, primer 0.25 ไมโครโมลาร์ และ *i-Taq* DNA polymerase 1.5 ยูนิต โดยมี PCR profile ดังนี้ Pre-denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ อุณหภูมิ denature 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ annealing 56 อาศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ และอุณหภูมิ long extension 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที 1 รอบ นำ PCR product มาตรวจสอบผลโดยนำมาแยกขนาดใน 1.5% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ บันทึกภาพภายใต้แสง UV โดยพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 bp กำหนดให้เป็นแอลลีล R ส่วนพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทานจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 bp กำหนดให้เป็นแอลลีล S (Sharma et al. 2005)

การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ Pi54 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54 indel (Pi54 MAS)

ตรวจสอบยีน *Pi54* ในข้าวพื้นเมืองไทยด้วยไพรเมอร์ *Pi54*-indel ซึ่งมีองค์ประกอบของ PCR ดังนี้ คือ ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม, 1X PCR buffer (Dream *Taq* buffer), dNTPs 0.1 มิลลิโมลาร์, primer 0.25 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต ปรับปริมาตรด้วย dH_2O จนได้ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยมี PCR profile ดังนี้ Pre-denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จำนวน 1 รอบ อุณหภูมิ denature 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ annealing 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และอุณหภูมิ long extension 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที 1 รอบ นำ PCR product มาตรวจสอบผลโดยนำมาแยกขนาดใน 1% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer แล้วบันทึกภาพภายใต้แสง UV โดยพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 216 bp และพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทานจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 359 bp

4.10 การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm (t)*

การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ Pigm(t) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483

ตรวจสอบยีน *Pigm(t)* ในข้าวพื้นเมืองไทยด้วยเครื่องหมาย C5483 ซึ่งเป็น CAPS marker โดย PCR reaction ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 60 นาโนกรัม, 1X PCR buffer, dNTPs 1 มิลลิโมลาร์, primer 0.25 ไมโครโมลาร์ และ *i-Taq* DNA polymerase 1.5 ยูนิต โดยใช้ PCR profile ดังนี้ Pre-denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที 1 รอบ อุณหภูมิ denature 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที อุณหภูมิ annealing 56 อาศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และอุณหภูมิ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และอุณหภูมิ long extension 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที 1 รอบ จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 468 bp

นำ PCR product ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* แล้วตรวจสอบผลโดยนำมาแยกขนาดใน 2% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer และบันทึกภาพภายใต้แสง UV โดยมีข้าวพันธุ์ Nipponbare เป็น negative control และมีข้าวพันธุ์ TP 309 เป็น positive control พันธุ์ข้าวที่มีแอลลีล ต้านทานจะไม่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 468 bp ส่วนพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pigm(t)* จะถูกตัดเอนไซม์ *EcoRI*

การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ Pigm(t) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742

ตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* โดยใช้ *Indel* marker S29742 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ PCR reaction ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 60 นาโนกรัม, 1X PCR buffer, dNTPs 1 มิลลิโมลาร์, primer 0.25 ไมโครโมลาร์ และ *i-Taq* DNA polymerase 1.5 ยูนิต และใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 35 รอบ ของ Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที annealing ที่ อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบผลโดยนำมาแยกขนาดใน 2% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer แล้วบันทึกภาพภายใต้แสง UV พันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 555 bp ตรงกับข้าวพันธุ์ TP 309 ที่เป็น positive control ส่วนพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทานจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 461 bp ตรงกับข้าวพันธุ์ Nipponbare ที่เป็น negative control

5. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ (DNA Sequencing)

ยืนยันผลการสืบค้นยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองโดยการสุ่มตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ และแอลลีลไม่ต้านทานมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ของยีน *Pi-d2, Pi-d3, Pi-ta, Pi-gm(t),* และ *Pi54* โดยมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. นำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ (purification) โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Inc, Valencia, CA) แล้วส่งไปค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดย บริษัท Pacific Science

2. นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาค้นหาจุดเชื่อมต่อกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม CAP3

3. นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโทด์ของยีนที่ศึกษา (BLAST) ในฐานข้อมูล NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อยืนยันผลการทดลอง

4. วิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ระหว่างแอลลีลต้านทานและแอลลีลไม่ต้านทานโดยใช้โปรแกรม clustal W (http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web_clustalw2/toolform.ebi? tool=clustalw2)

6 ศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองยีนต้านทานโรคไหม้และเชื้อสาเหตุโรคไหม้ *Pi9*

6.1. รวบรวมสายพันธุ์เชื้อราโรคใบไหม้สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่พบในประเทศไทย

ทำการรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้จากสถานที่ต่างๆ ในประเทศไทยเพื่อนำมาแยกสายพันธุ์และเก็บตัวอย่างแบบแห้งไว้ใช้ในการศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของโรคต่อไป โดยเชื้อราโรคไหม้ที่จะใช้ในการศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองทางโรคนี้ เป็นสายพันธุ์ตัวแทนจากภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทยที่มีความรุนแรงและก่อให้เกิดโรคใบไหม้ในข้าวในประเทศไทยอย่างกว้างขวาง

6.2. ศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวที่มียีนต้านทานโรคเชื้อราใบไหม้ Pi9

การศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ต่อเชื้อราโรคใบไหม้สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่พบในประเทศไทย โดยการ inoculation ต้นกล้าข้าวระยะ 3 สัปดาห์ด้วยสปอร์ของเชื้อราใบไหม้ และ เก็บข้อมูลการเกิดโรคโดยใช้ standard scale 0-6 (6 คือ เกิดโรคอย่างรุนแรง และ 0 คือ สามารถต้านทานต่อโรค)

การเตรียมสปอร์ของเชื้อราโรคใบไหม้เพื่อการ inoculation

นำตัวอย่างเชื้อราโรคใบไหม้ที่ได้มาในรูปของกระดาษกรองมาวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำจากข้าวโอ้ต และเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 7 วันเพื่อให้เชื้อราเริ่มสร้างเส้นใย หลังจากนั้นย้ายจานอาหารจากที่มืดมาเลี้ยงในที่มีแสงสว่างเพื่อชักนำให้เกิดการสร้างสปอร์เป็นเวลา 7 วัน เมื่อพร้อมที่จะทำการ inoculation เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อประมาณ 5 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อราแต่ละจานแล้วใช้ช้อนปลายแบนปลอดเชื้อขูดที่ผิวหน้าของจานอาหารเลี้ยงเชื้อราเบา ๆ เพื่อเก็บเกี่ยวสปอร์ของเชื้อรามาใช้ในการทดลอง จากนั้นนำสารละลายสปอร์ของเชื้อราที่เก็บได้มาผ่านผ้ากรองเพื่อกำจัดเศษอาหารวุ้นและเศษเส้นใยของเชื้อราที่ไม่ต้องการออก ปริมาณสปอร์ของเชื้อราจะถูกนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วย heamacytometer และปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตรก่อนการใช้งาน

การเตรียมต้นข้าวเพื่อการศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองทางโรค

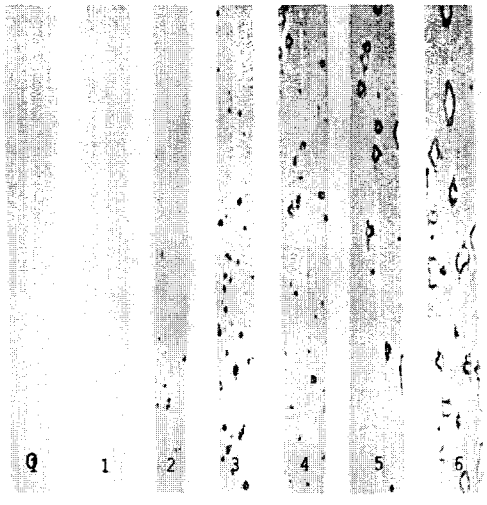
เมล็ดพันธุ์ข้าวสายพันธุ์ที่มียีนต้านทานโรคต่าง ๆ จะถูกนำมาล้างฆ่าเชื้อที่ผิวของเมล็ดพันธุ์ภายใต้สภาพปลอดเชื้อด้วยสารละลาย 40% ไฮโปครอไรด์ เป็นเวลา 30 นาที เขย่าเป็นครั้งคราว แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 3 ครั้ง จากนั้นวางเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อบนกระดาษกรองและปล่อยให้แห้งหมาด ๆ ประมาณ 2-3 นาที ย้ายเมล็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาใส่ในจานเพาะเชื้อที่มีน้ำกลั่นบริสุทธิ์อยู่ จากนั้นเก็บในชั้นเพาะเมล็ดที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-4 วัน จนเมล็ดงอก ย้ายเมล็ดที่งอกที่มีขนาดเท่าๆ กันมาใส่ลงดินในกระถางพลาสติก (โดยทั่วไปใช้ต้นกล้า 10 ต้นต่อเชื้อราโรคใบไหม้ 1 สายพันธุ์) จนต้นกล้ามีอายุครบ 3 สัปดาห์จึงพร้อมสำหรับการ inoculation ด้วยสปอร์ของเชื้อราโรคใบไหม้ที่เตรียมมาจากขั้นตอนข้างต้น

การศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองทางโรคของข้าวต่อเชื้อราโรคใบไหม้

นำสารละลายสปอร์ของเชื้อราโรคใบไหม้ที่เตรียมได้ข้างต้นมาบรรจุลงในขวดแก้วฉีดพ้นที่ติดอยู่กับเครื่อง Vacuum pump แล้วฉีดลงบนต้นกล้าข้าวที่มีอายุ 3 สัปดาห์ให้ทั่ว โดยฉีดสารละลายสปอร์จำนวน 25 มิลลิลิตรต่อต้นกล้าข้าว 1 กระถาง หลังจากนั้นนำกระถางต้นกล้าที่ผ่านการฉีดด้วยสปอร์ของเชื้อราแล้วมาเก็บไว้ในถุงพลาสติกที่บรรจุน้ำไว้ภายใน ทำการมัดปากถุงแล้วเก็บไว้ในกล่องพลาสติกมืดเพื่อให้มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายต้นข้าวของสปอร์เชื้อรา (โดยทั่วไปเชื้อราโรคใบไหม้ในข้าวต้องการความชื้นสัมผัสเป็น 100% เพื่อการเข้าโจมตีเนื้อเยื่อของต้นข้าว) หลังจากเก็บไว้ในกล่องพลาสติกมืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้ายเอาต้นกล้าออกจากถุงพลาสติกมาเลี้ยงที่โรงเพาะพันธุ์ต่อไป

การตรวจวัดปริมาณการเกิดโรคราใบไหม้ในข้าว

การวัดความรุนแรงของโรคราใบไหม้ในข้าวจะทำการวัด 7 วันหลังจากผ่านการฉีดด้วยสปอร์ของเชื้อรา เกณฑ์การวัดระดับความรุนแรงของโรค ใช้การแยกลักษณะของแผลเป็น 7 ระดับ ตามที่ได้อธิบายไว้โดย Roumen และคณะในปี ค.ศ. 1997 ที่ระดับความรุนแรงเท่ากับ 0-2 แสดงว่าข้าวมีความต้านทานต่อโรคได้ดี ที่ระดับความรุนแรงเท่ากับ 3-4 แสดงว่าข้าวมีความต้านทานต่อโรคระดับปานกลาง และที่ระดับความรุนแรงเท่ากับ 5-6 แสดงว่าข้าวไม่มีความต้านทานต่อโรค ดังภาพที่ 3 และ ตารางที่ 6



ภาพที่ 3 เกณฑ์การวัดระดับความรุนแรงของโรคใช้การแยกลักษณะของแผลเป็น 7 ระดับ

ตารางที่ 6 การตรวจวัดปริมาณการเกิดโรคเชื้อราใบไหม้ในข้าว

ระดับความรุนแรงของโรคราใบไหม้	ลักษณะของแผลบนใบข้าว	การประเมินความรุนแรง
0	ไม่มีการเข้าทำลายด้วยเชื้อราโรคใบไหม้	R
1	จุดสีน้ำตาลขนาดเล็กกว่า 0.5 มม.ไม่มีการสร้างสปอร์	
2	จุดสีน้ำตาลขนาด 0.5 – 1.0 มม. ไม่มีการสร้างสปอร์	
3	แผลรูปร่างกลมถึงเรียวยาวขนาด 1-3 มม. มีสีเทาตรงกลาง และมีสีน้ำตาลตามขอบ ไม่มีการสร้างสปอร์	MR
4	มีแผลเป็นรูปกระสวยที่สามารถสร้างสปอร์ได้ ขนาดตั้งแต่ 3 มม. ขึ้นไป แผลมีสีเทาตรงกลางและสีน้ำตาลแดงโดยรอบ	
5	มีแผลเหมือนระดับ 4 แต่ใบข้าวเริ่มมีการแห้งเหี่ยว	S
6	ใบข้าวแห้งเหี่ยวและมีละอองสปอร์ของเชื้อรามากมาย	

หมายเหตุ R = ข้าวมีความต้านทานต่อโรคใบไหม้ได้ดี
MR = ข้าวมีความต้านทานต่อโรคใบไหม้ระดับปานกลาง
S = ข้าวไม่มีความต้านทานต่อโรคใบไหม้

7. การศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้

ศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวพื้นเมืองที่ตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอว่ามียีนต้านทานโรคไหม้ต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการคัดเลือกยีนต้านทานโรคไหม้ในพันธุ์ข้าวพื้นเมือง (DNA marker validation) โดยคัดเลือกข้าวพื้นเมืองที่มีการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้ชิด หรือ พัฒนามาจากยีนต้านทานโรคไหม้ ได้แก่ ยีน *Pi1(t), Pi2, Pi9, Pi36, Pi54, Pi-d2, Pi-d3, Pi-ta, Pib,* และ *Pigm(t)* ประมาณ 40 พันธุ์ จากนั้นเตรียมเมล็ดข้าวและเชื้อตามขั้นตอนที่ 7.2 โดยใช้เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมมาจากสถานที่ต่างๆในประเทศไทย รวม 10 isolate

8. วิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลของยีนต้านทานโรคไหม้โดยการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมือง ด้วยการจัดกลุ่มทางพันธุกรรม และการหาความสัมพันธ์ระหว่างยีนต้านทานโรคไหม้และปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้

8.1. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NYSYS-pc version 2.2 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) (Rohlf, 2004) โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของ Dice (Dice's Similarity coefficient) อาศัยข้อมูลจีโนไทป์ของข้าวพื้นเมือง (จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนต้านทานโรคไหม้) จากนั้นนำข้อมูลค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมมาจัดกลุ่ม (Cluster analysis) ด้วยวิธี Unweighted pair group method based on arithmetic average (UPGMA) เพื่อสร้าง Dendrogram และวิเคราะห์ Principle coordinate analysis: PCO)

8.2. การวิเคราะห์ปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

วิเคราะห์รีเกรสชันของยีนต้านทานโรคไหม้ (genotype) และลักษณะการเกิดโรคไหม้ของข้าวพื้นเมือง (phynotype) โดยใช้โปรแกรม STATGRAPHICS plus 3.0 โดยใช้ single regression และ multiple regression ดังสมการ

$$Y= C+bX$$

เมื่อ Y คือ ลักษณะการเกิดโรคไหม้ในข้าวพื้นเมือง โดยกำหนดให้ Resistance (R) = 3, Moderate resistance (MR) =2 และ Susceptible (S) =1

C คือ ค่าคงที่

b คือ สัมประสิทธ์ของเส้นตรง

X คือ ยีนต้านทานโรคไหม้ โดยกำหนดให้ R=3, H=2, และ S=1

9. ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

เดือนตุลาคม 2551 ถึง เดือนกันยายน 2553

10. สถานที่ทำการวิจัย:

- ดำเนินการปลูกข้าวพันธุ์ข้าวพื้นเมืองเพื่อศึกษาวิจัยที่โรงเรือนทดลอง สำนักงานไร่ฝึกทดลอง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
- ดำเนินการค้นหายีนโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และที่ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวที่มียีนต้านทานโรคกับเชื้อราก่อโรคไหม้ในข้าวที่ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา

สายพันธุ์ข้าวพื้นเมือง ข้าวป่า และพันธุ์ข้าวปรับปรุงที่มีลักษณะต้านทานโรคไหม้ ที่ใช้ในการสืบค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ มีจำนวนทั้งสิ้น 241 พันธุ์ ประกอบด้วย พันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 19 พันธุ์, พันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 38 พันธุ์, พันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (อีสาน) จำนวน 144 พันธุ์ แบ่งเป็น ข้าวนาสวนพื้นเมือง และข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง จำนวน 99 และ 45 พันธุ์ ตามลำดับ, ข้าวป่า จำนวน 16 พันธุ์ แบ่งเป็น *O. nivara* และ *O. rufipogon* จำนวน 12 และ 4 สายพันธุ์ ตามลำดับ และข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 24 พันธุ์ แบ่งเป็น พันธุ์ข้าวปรับปรุงที่มีลักษณะต้านทานโรคไหม้ของกรมการข้าว จำนวน 10 พันธุ์ และข้าวสายพันธุ์ปรับปรุงต้านทานโรคไหม้จาก IRRI จำนวน 12 พันธุ์ (ตารางที่ 7 และ 8)

ตารางที่ 7 พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการตรวจหายีนต้านทานโรคเชื้อราใบไหม้

	ประเภทของข้าว	จำนวน (พันธุ์)	แหล่งที่มา
1	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	99	ธนาคารเชื้อพันธุ์พืช*
2	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	45	ธนาคารเชื้อพันธุ์พืช*
3	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	38	ธนาคารเชื้อพันธุ์พืช*
4	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	19	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
5	ข้าวป่า	16	ศูนย์วิจัยข้าวสกลนคร
6	ข้าวพันธุ์ปรับปรุง	24	หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์จากยีนข้าว/ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
	รวม	241	

หมายเหตุ * ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี

ตารางที่ 8 รายชื่อพันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษาและแหล่งที่มา

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	ประเภทข้าว	แหล่งที่มา
1	หมานหนัก	S71	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
2	นางมา	S72	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
3	เหนียวนาคราช	S73	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
4	แมะแยง	S75	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
5	ดอกพวง	S76	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
6	ขีนดิน	S77	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
7	ดอกพิกุล	S78	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
8	ค้ำฉาง	S79	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
9	สายบัว	S80	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
10	ช่อนิมิต	S81	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
11	ไร้ไทร	S82	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
12	เบาชะมวง	S83	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
13	ลูกขอ	S84	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
14	ซุกิกูลอง	S85	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
15	หลายอด	S86	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
16	ลาเก๊ะงอ	S87	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
17	นางทอง	S88	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
18	ลูกหวาย (จุด)	S89	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
19	ลูกดำ	S90	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
20	เชียงใหม่	S91	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
21	ลูกแดง	S92	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
22	เล็บนกเบา	S93	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
23	ช่อ	S94	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
24	ช่อแดง	S95	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
25	กูนิง	S96	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
26	ดอกไม้ไทร	S97	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
27	รวงทอง	S98	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
28	ลูกปลา	S99	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
29	นางกลายแดง	S100	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
30	ลากอ	S101	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	ประเภทข้าว	แหล่งที่มา
31	กูนิง	S102	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
32	มือจระเข้	S103	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
33	ตุลาถั่ว	S104	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
34	หอม	S105	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
35	กือแซะดำ	S106	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
36	ลือบูมาซาะ	S107	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
37	นางรอง	S108	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
38	อีกู้ 3	S109	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง
39	งอเพือน	U38	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
40	ดยาหลี	U39	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
41	ปือก่อ	U41	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
42	ปือเกษตร	U42	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
43	เหนียวแสงมูเวอ	U43	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
44	กะเหรี่ยงขาว	U44	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
45	เหลืองหอม	U45	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
46	จะนอไหน	U46	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
47	ลายชาน	U48	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
48	ปิอิ แม่ละ	U49	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
49	ห้วยแล้ง	U50	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
50	ปิอิ ซูแม่ฟาง	U51	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
51	ข้าวก่อแผ่	U52	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
52	บือขอพอ	U53	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
53	เหลืองลีซอ	U55	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
54	ข้าวแดง (TRI)	U56	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
55	ข้าวมันหมู	U57	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
56	งอเชระ	U60	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
57	เหนียวกล่ำหอมแสง	U61	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี
58	พวงทอง	E100	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
59	พวงมาลัย 31-5-6	E101	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
60	พวงมาลัย 35-10-8	E102	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
61	โพฉลอง 31-34-20	E103	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
62	จำปาจีน 84-8-16	E104	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	ประเภทข้าว	แหล่งที่มา
63	จำปาจีน 84-8-22	E105	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
64	สว่างอารมณ์ 84-4-118	E106	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
65	ข้าวเบาที่หนึ่ง 95-1-80	E107	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
66	ไข่แมงดา 59-2-73	E108	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
67	ลอยใหญ่ 62-40-140	E109	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
68	เม็ดแล็กหนัก	E110	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
69	พญาชม	E111	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
70	เขียว	E112	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
71	ขาวปราจีน	E113	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
72	เจ๊กกระโดด	E114	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
73	รวงเดียว	E115	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
74	เจ้าลอย	E116	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
75	เหลืองกล้วย	E117	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
76	คุณแม่	E118	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
77	ขาวยาวคลี่	E119	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
78	ขาวเสมอ	E120	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
79	เหลืองพวงหอง	E121	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
80	เหลืองอนันต์	E122	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
81	ขาวลี้	E123	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
82	ขาวตาหยัด	E124	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
83	นางเขียว	E125	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
84	ลอยสายบัว	E126	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
85	นางเขียว	E127	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
86	นางเขียว	E128	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
87	เกวียนหัก	E129	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
88	ขาวโพธิ์	E130	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
89	สามพราน	E131	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
90	เหนียวบายสี	E132	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
91	เหลืองบังใบ	E133	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
92	ขาวนครไชยศรี	E134	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
93	เจ้าลอย	E135	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
94	ข้าวลอย	E136	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	ประเภทข้าว	แหล่งที่มา
95	ทานตะวัน	E137	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
96	ขาวเศรษฐี	E138	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
97	สามรวง	E139	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
98	หอมทุ่ง	E140	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
99	หอมทุ่ง	E141	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
100	ไอ้โหม่ง	E142	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
101	พวงหนัก	E143	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
102	พวงเงิน	E144	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
103	เก้ารวง 17-2-106	L1	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
104	กู้เมือง	L2	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
105	ขาวดอกมะลิ 41-1-173	L3	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
106	ขาวตาแห้ง 55-5-55	L4	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
107	ขาวใหญ่ 33-22-61	L5	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
108	ขาวปากหม้อ 74	L6	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
109	หลุดหนี้ 75-3-2	L7	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
110	เม็ดใหญ่ 94-4-87	L8	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
111	ขาวพวง74-3-38	L9	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
112	เจ้าหางหมูใหญ่ 32-7	L10	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
113	เจ้าหางหมูใหญ่ 32-7	L11	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
114	เจ้าหอม 32-18-69	L12	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
115	ใบลด 36-10-90	L13	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
116	เจ้าเหลือง 27-3-19	L14	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
117	เจ้าเหลือง 27-3-91	L15	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
118	เจ้าแฝ 31-28-1	L16	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
119	ดอกมะลิ 109-1-119	L17	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
120	ใบลด 36-10-40	L18	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
121	ใบลด 36-27-29	L19	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
122	รวงเดียว68-10-85	L20	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
123	เหลืองใหญ่	L21	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
124	เหลืองเล็ก 30-1-57	L22	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
125	เหลืองนน 6-4-102	L23	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
126	บีเค 289	L24	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	ประเภทข้าว	แหล่งที่มา
127	บีเค 563	L25	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
128	ดี้ 569	L26	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
129	ขี้ตม 222-24-72	L27	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
130	ขี้ตมใหญ่ 35-16-45	L28	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
131	ขี้ตมขาว 222-42-3	L29	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
132	ขี้ตมขาว 222-42-5	L30	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
133	งันดง 34-3-95	L31	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
134	ดอดอกพร้าว 48-3-123	L32	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
135	ขี้ตมหอม	L33	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
136	เหนียวดำ	L34	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
137	ดอป้องแอ้ว	L35	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
138	ดอกดู่	L36	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
139	ทอง	L37	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
140	มันเป็ด	L38	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
141	ขาว	L39	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
142	นางนวล	L40	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
143	ขาวกรุง	L41	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
144	เหนียวแดง	L42	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
145	ขาว	L43	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
146	ดอขาว	L44	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
147	เหลืองบุญมา	L45	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
148	หมากแข็ง	L46	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
149	RD6 (dummy)	L47	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
150	เหนียวนางนวล	L48	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
151	ดออ่าง	L49	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
152	ข้าวก่ำ	L50	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
153	ป้องแอ้ว	L51	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
154	อีปง	L52	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
155	นางนวล	L53	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
156	แม่ห้าง	L54	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
157	พานทอง	L55	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
158	อีปิ๊ด	L56	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	ประเภทข้าว	แหล่งที่มา
159	ดอสามเดือน	L57	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
160	ข้าวปน	L58	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
161	อีโดม	L59	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
162	นางนวล	L60	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
163	ดวงจันทร์	L61	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
164	ปลาแข็ง	L62	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
165	เป็ดน้ำ	L63	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
166	พันธุ์หลัก	L64	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
167	ข้าวหาง	L65	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
168	สามเดือน	L66	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
169	ป้องแอ้ว 1	L67	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
170	ป้องแอ้ว 2	L68	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
171	ป้องแอ้ว	L69	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
172	มะปราง	L70	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
173	นางคำผาย	L71	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
174	ขาวใหญ่	L72	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
175	โอล่อน	L73	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
176	ข้าวหอม (Gs. 4809)	L74	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
177	ข้าวหอม (Gs. 4810)	L75	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
178	ข้าวหอม (Gs. 4814)	L76	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
179	ข้าวหอม (Gs. 4815)	L77	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
180	ข้าวหอม (Gs. 4816)	L78	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
181	ข้าวหอม (Gs. 4817)	L79	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
182	ข้าวหอม (Gs. 4818)	L80	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
183	ข้าวหอม (Gs. 4829)	L81	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
184	ข้าวหอม (Gs. 4831)	L82	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
185	ข้าวหอม (Gs. 4832)	L83	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
186	ข้าวหอม (Gs. 4833)	L84	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
187	ข้าวหอม (Gs. 4834)	L85	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
188	ข้าวหอม (Gs. 4835)	L86	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
189	ข้าวหอม (Gs. 4869)	L87	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
190	ข้าวหอม (Gs. 4870)	L88	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว

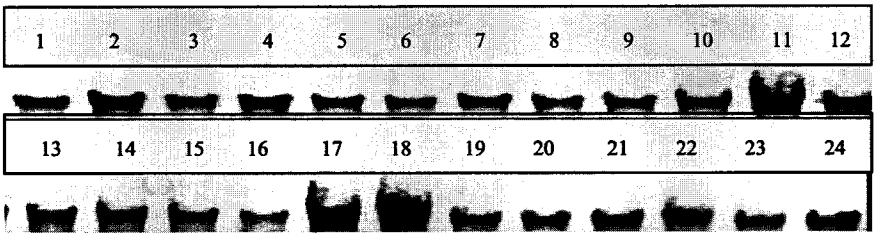
ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	ประเภทข้าว	แหล่งที่มา
191	กะทิ	L89	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
192	ข้าวดอ	L90	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
193	ดอเหลือง	L91	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
194	เจ้าขาว	L92	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
195	ขาวใหญ่	L93	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
196	เหลือง	L94	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
197	กระดูกเสือ	L95	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
198	หอมมะลิ (GS. 18418)	L96	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
199	หอมมะลิ (GS. 18419)	L97	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
200	หอมมะลิ (GS. 18420)	L98	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
201	หอมมะลิ (GS. 18498)	L99	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ธนาคารเชื้อพันธุ์ข้าว
202	*O. nivara (No.2)*	W2	ข้าวป่า	บ.นาโพธิ์ อ.กุสุมาลย์ จ.สกลนคร
203	*O. nivara (No.3)*	W3	ข้าวป่า	บ.โนนชมภู ต.กุรุคุ อ.เมือง จ.สกลนคร
204	*O. nivara (No.4)*	W4	ข้าวป่า	บ.โพนทา ต.กุดตาไก้ อ.ปลาปากจ.นครพนม
205	*O. nivara (No.5)*	W5	ข้าวป่า	บ.นาขาม ต.ปลาปาก อ.ปลาปาก จ.นครพนม
206	*O. nivara (No.6)*	W6	ข้าวป่า	บ.หนองฮี ต.หนองฮี อ.ปลาปาก จ.นครพนม
207	*O. nivara (No.7)*	W7	ข้าวป่า	บ.ทุ่งตะวัน ต.นาเลียง อ.นาแก จ.นครพนม
208	*O. nivara (No.8)*	W8	ข้าวป่า	บ.นาเหนือ ต.พระซอง อ.นาแก จ.นครพนม
209	*O. nivara (No.9)*	W9	ข้าวป่า	บ.หนองบ่อ ต.หนองบ่อ อ.นาแก จ.นครพนม
210	*O. nivara (No.10)*	W10	ข้าวป่า	บ.นาอ้อย ต.งิ้วด่อน อ.เมือง จ.สกลนคร
211	*O. rufipogon (No.11)*	W11	ข้าวป่า	บ.ป่าหว้า ต.เชียงเครือ อ.เมือง จ.สกลนคร

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	ประเภทข้าว	แหล่งที่มา
212	*O. rufipogon (No.12)*	W13	ข้าวป่า	บ.หนองเบ็น ต.ไฮหย่อง อ.พังโคน จ.สกลนคร
213	*O. rufipogon (No.14)*	W14	ข้าวป่า	บ.แร่ ต.แร่ อ.พังโคน จ.สกลนคร
214	*O. nivara (No.15)*	W15	ข้าวป่า	บ.ปลาไหล อ.วาริชภูมิ จ.สกลนคร
215	*O. nivara (No.16)*	W16	ข้าวป่า	บ.หนองพุกาม ต.คำบ่อ อ.วาริชภูมิ จ.สกลนคร
216	*O. nivara (No.17)*	W17	ข้าวป่า	บ.หนองบัว ต.ธาตุเชิงชม อ.เมือง จ.สกลนคร
217	*O. rufipogon (No.18)*	W18	ข้าวป่า	แปลงอนุรักษ์ศูนย์วิจัยข้าวสกลนคร
218	สันป่าตอง 1	B1	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	Rice Gene Discovery Unit
219	สุพรรณบุรี 60	B2	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	Rice Gene Discovery Unit
220	เหนียวอุบล 2	B3	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	Rice Gene Discovery Unit
221	กข 10	B4	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	Rice Gene Discovery Unit
222	สุพรรณบุรี 1	B5	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	Rice Gene Discovery Unit
223	ชัยนาท 1	B6	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	Rice Gene Discovery Unit
224	ปราจีน 2	B7	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	Rice Gene Discovery Unit
225	ปทุมธานี 1	B8	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	Rice Gene Discovery Unit
226	กข 33	B9	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	Rice Gene Discovery Unit
227	JHN	B10	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	Rice Gene Discovery Unit
228	HY 71	B11	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	ศูนย์วิจัยข้าวชุมแพ
229	CT9933	B12	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	IRRI ประเทศฟิลิปปินส์
230	C101 LAC	B13	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	IRRI ประเทศฟิลิปปินส์
231	C101TTP	B14	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	IRRI ประเทศฟิลิปปินส์
232	C104 LAC	B15	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	IRRI ประเทศฟิลิปปินส์
233	C104 PKT	B16	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	IRRI ประเทศฟิลิปปินส์
234	C105 TTP 4-1-23	B17	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	IRRI ประเทศฟิลิปปินส์
235	C101 PKT	B18	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	IRRI ประเทศฟิลิปปินส์
236	IR64	B19	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	IRRI ประเทศฟิลิปปินส์
237	CO39*	B20	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	IRRI ประเทศฟิลิปปินส์

ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	รหัส	ประเภทข้าว	แหล่งที่มา
238	C102PKT	B21	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	IRRI ประเทศฟิลิปปินส์
239	AZUCENA	B22	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	IRRI ประเทศฟิลิปปินส์
240	C103TTP	B23	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	IRRI ประเทศฟิลิปปินส์
241	C101A51	B24	พันธุ์ต้านทานโรคไหม้	IRRI ประเทศฟิลิปปินส์

2. การสกัดดีเอ็นเอ

เมื่อข้าวอายุได้ประมาณ 4 สัปดาห์ เก็บใบอ่อนข้าว นำมาสกัดดีเอ็นเอ (total genomic DNA) โดยใช้วิธี CTAB extraction procedure (Doyle and Doyle,1990) ตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตราฐาน (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงจีโนมิกดีเอ็นเอของตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่นำมาศึกษา 1= งอเพือน 2 = ดยาหลี่ 3= จะชิ 4=ปือก่อ 5= ปือเกษตร 6= เหนียวแสงมูเวอ 7= กะเหรี่ยงขาว 8= เหลืองหอม 9= จะนอไหน 10= เหลืองหอมแดง 11= ลายซาน 12 = ปิอิ แม่ละ 13 = ห้วยแล้ง 14= ปิอิซูแม่ฟาง 15= ข้าวกอแผ่ 16= บือขอพอ 17= ปิอิ พะโด่ 18= เหลืองลีซอ 19= ข้าวแดง (TRI 8409149) 20= ข้าวมันหมู 21= ป่าเบาะ 22= ตอซีจ่า 23= งอเซระ 24= เหนียวกล่ำหอมแสงลีซอ

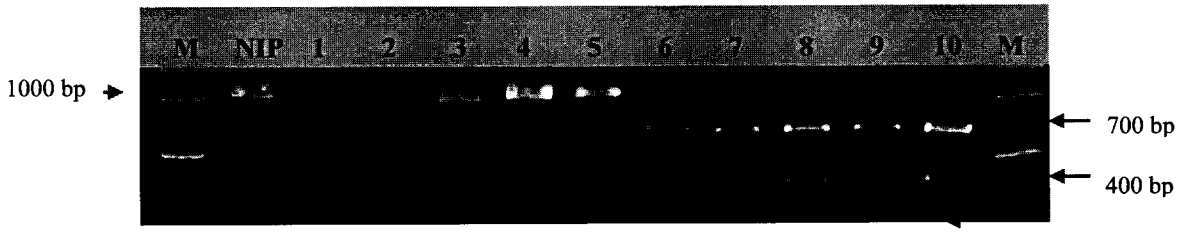
3. การตรวจสอบยีนต้านทานโรคเชื้อราใบไหม้ในข้าวพื้นเมืองโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

3.1 *การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ Pi-d2*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* มีตำแหน่งอยู่ centromere บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ถูกค้นพบในข้าวสายพันธุ์ Digu ของประเทศจีน ซึ่งต่อมาได้มีรายงานการโคลนยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* สำเร็จในปี ค.ศ. 2006 โดย Chen และคณะ ยีนต้านทาน *Pi-d2* นี้มีโครงสร้างของโปรตีนที่แตกต่างจากยีนต้านทานตัวอื่นๆ คือ มีส่วนของน้ำตาลแมนโนสที่สามารถจับกับแลคตินได้อยู่ภายนอกเซลล์ (a bulb-type mannose specific binding lectin, B-lectin) และในส่วนภายในเซลล์มีโครงสร้าง serine-threonine kinase domain ซึ่งโปรตีนจากยีนต้านทาน *Pi-d2* นี้จะมีตำแหน่งอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยข้าวที่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้มียีนต้านทาน *Pi-d2* แตกต่างจากข้าวที่ไม่สามารถต้านทานเพียงแค่กรดอะมิโนหนึ่งตัวที่ตำแหน่ง 441 ของโปรตีนยีนต้านทานเท่านั้น

จากการตรวจหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 201 ตัวอย่างโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จำนวน 190 พันธุ์ แบ่งเป็น เป็นข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ 15 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ 38 พันธุ์ และข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 137 พันธุ์ (ประกอบด้วยข้าวขึ้นน้ำ 45 พันธุ์ และข้าวนาสวน 92 พันธุ์) โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้นี้มีขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส หลังจากนั้นเมื่อทำการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* สามารถจำแนกรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นได้ 2 รูปแบบหรือ 2 แอลลีล คือ แอลลีล S (Susceptible) ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส และแอลลีล R (Resistance) มีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 700 และ 400 คู่เบส (ภาพที่ 5) โดยพบว่ามีข้าวพื้นเมืองจำนวน 137 พันธุ์ ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* ประกอบด้วย ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ 4 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ 37 พันธุ์ และข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 98 พันธุ์ (ประกอบด้วยข้าวขึ้นน้ำ 32 พันธุ์ และข้าวนาสวน 64 พันธุ์) (ตารางที่ 9 และ 27)

ข้าวสายพันธุ์ต้านทานที่มียีน *Pi-d2* นั้นจะเป็นแอลลีล R ที่มีแถบดีเอ็นเอหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* จำนวน 2 แถบ แสดงว่าแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้นั้น สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* ยืนยันผลการทดลอง โดยส่ง PCR product ของพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีล R (ที่มียีนต้านทาน *Pi-d2*) และพันธุ์นิพปอนบาเรที่แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d2* ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปทำการ เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* ในฐานข้อมูล NCBI (Sequence alignment) (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์พื้นเมืองแต่ละสายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *Pi-d2* (*Pi-d2* Con2F/Con2R) หลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Mlu*I M =DNA marker, NIP = Nipponbare , Lane 1-5 เป็นตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีแอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* และ Lane 6-10 เป็นตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2*

ตารางที่ 9 การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi-d2* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi-d2 Con2F/Con2R

ข้าวพื้นเมือง	จำนวนพันธุ์ที่ตรวจสอบ	จำนวนพันธุ์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลีล S*	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลีล R**
ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	19	15	10	4
ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	38	38	1	37
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	144	137	41	96
- ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	45	45	13	32
- ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	99	92	28	64
รวม	**201**	**190**	**52**	**137**

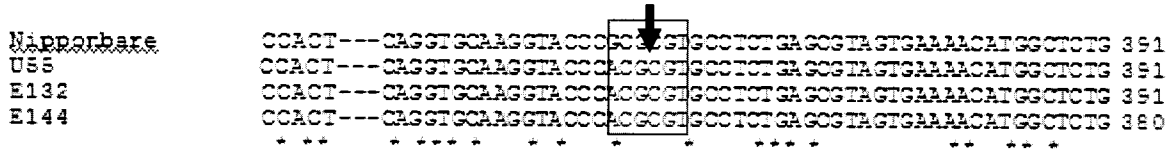
หมายเหตุ

S* หมายถึงแอลลีล S ของยีน *Pi-d2* ที่ไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ MluI ไม่สามารถตัดลำดับนิวคลีโทด์ของ PCR product ของตัวอย่างพันธุ์ข้าว ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-d2* ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,100 bp

R** หมายถึงแอลลีล R ของยีน *Pi-d2* ที่ต้านทานต่อโรคไหม้ ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ MluI สามารถตัดลำดับนิวคลีโทด์ของ PCR product ของตัวอย่างพันธุ์ข้าวได้ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-d2* ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 700 และ 400 bp

ผลจากการทำ sequence alignment เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pi-d2* ซึ่งเป็นส่วนของโปรตีน B-lectin receptor kinase ในฐานข้อมูล โดยยีน *Pi-d2* นี้มีโครงสร้างของโปรตีนที่แตกต่างกันระหว่างข้าวที่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ที่มียีนต้านทาน *Pi-d2* กับ ข้าวที่ไม่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ โดยข้าวที่ต้านทานโรคไหม้จะมีบริเวณที่เป็น substitution site ของกรดอะมิโน Isoleucine ที่ตำแหน่ง 441 ของโปรตีนยีนต้านทาน *Pi-d2* (Chen et al., 2006) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณนี้จะพบ A/G single nucleotide polymorphism (SNP) ในส่วน recognition site ของ *Mlu*I โดยพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มียีน *Pi-d2* ต้านทานโรคไหม้จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ – A'CGCGT- ดังนั้นเมื่อนำ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อยีนต้านทาน *Pi-d2* (*Pi-d2* Con2F/Con2R) มาตัดด้วยเอนไซม์ *Mlu*I ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 700 และ 400 bp ส่วนในข้าวพันธุ์นิพปอนบาเรซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่ไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'– G'CGCGT-3' ซึ่งทำให้เอนไซม์ *Mlu*I ไม่สามารถตัดได้ ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1,100 bp ข้อมูลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถยืนยันประสิทธิภาพของการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi-d2Con2F/ Con 2R ในการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* ในข้าวพื้นเมืองไทย

การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในตำแหน่งที่ 441 จาก Isoleucine เป็น methionine ส่งผลให้ข้าวสูญเสียความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ เนื่องจากกรดอะมิโนที่เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นส่วน lle-rich motif ของ transmembrane (TM) domain ซึ่งเป็นส่วนที่จำเป็นต่อการกำหนดตำแหน่ง TM (TM region) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลให้ข้าวไม่มีตำแหน่งของ lle-rich motif หากไม่มีตำแหน่ง lle-rich motif ก็จะทำให้การกำหนดตำแหน่ง TM ขาดประสิทธิภาพส่งผลต่อการทำงานของยีน *Pi-d2* จึงทำให้ข้าวสูญเสียความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ (Chen et al., 2006)



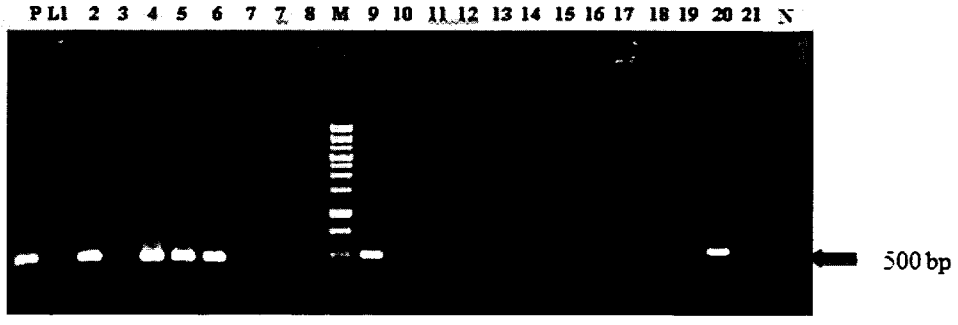
ภาพที่ 6 แสดง sequence alignments ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ (R) *Pi-d2* (U55= พันธุ์เหลืองลีซอ, E132= พันธุ์เหนียวบายสี, และ E144= พันธุ์พวงเงิน) กับ พันธุ์นิพปอนบาเรที่ไม่มีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ (S) ของยีน *Pi-d2* แสดง A/G SNP ในตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mlu*I (ลูกศรแสดงตำแหน่งตัดจำกับเพาะของเอ็นไซม์ *Mlu*I ในตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ ของยีน *Pi-d2*

3.2 การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* มีตำแหน่งอยู่ใกล้กับบริเวณเซนโตรเมียร์ของโครโมโซมข้าวคู่ที่ 6 (Liu et al., 2002) โดยยีน *Pi9* ถูกถ่ายทอดมาจากข้าวป่า (*Oryza minuta*: 2n=4x=48) (Amante-Bordeos et al., 1992) ยีนต้านทาน *Pi9* นี้ สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆได้อย่างกว้างขวาง (broad-spectrum resistance) ตัวอย่างเช่น ยีนต้านทาน *Pi9* ในข้าวสายพันธุ์ 127-1-75 ได้รับการทดสอบกับเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ กว่า 100 สายพันธุ์ของประเทศฟิลิปปินส์ ที่สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (The International Rice Research Institute, IRRI) โดยไม่พบสายพันธุ์เชื้อราโรคไหม้ที่สามารถก่อโรคได้ นอกจากนี้ Liu et al. (2002) ได้ทำการทดสอบ สายพันธุ์เชื้อราโรคไหม้อีก 43 สายพันธุ์ จาก 13 ประเทศ ก็ไม่พบสายพันธุ์เชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ใดที่สามารถก่อโรคกับข้าวสายพันธุ์ 12-1-75 ที่มียีนต้านทาน *Pi9* ได้ ยีน *Pi9* นี้ถูกโคลนปี ค.ศ 2006 (Qu et al., 2006; Zhou et al., 2006) มีโครงสร้าง ที่เป็น nucleotide binding site (NBS) และ leucine rich repeat motif (LRR) ซึ่งโครงสร้างของยีนนี้มีความคล้ายคลึงกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2, Piz-t,* และ *Piz* มากถึง 96% ในระดับของกรดอะมิโน โดยบริเวณที่มีความแตกต่างกันคือ บริเวณ LRR motif จากการทดลองสลับเปลี่ยน motif ระหว่างยีนต้านทาน *Pi2* และ *Pi9* (*Pi2/Pi 9* chimeras) พบว่าส่วน LRR motif เป็นส่วนสำคัญในการกำหนดความเฉพาะเจาะจงต่อปฏิกิริยาตอบสนองของยีนต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ

3.2.1 การตรวจสอบยีน Pi9 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ pB8

จากการตรวจสอบยีน *Pi9* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ pB8 ในข้าวพื้นเมืองทั้งหมด 201 ตัวอย่าง พบว่ามีพันธุ์ข้าวพื้นเมืองจำนวน 64 พันธุ์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 bp เท่ากับ positive control (Nippon bare) ที่มียีนต้านทานโรคโรคใบไหม้ *Pi9* ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 500 bp (ภาพที่ 7 และ ตารางที่ 10) โดยเป็นข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ 16 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ 1 พันธุ์ และข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 47 พันธุ์ (ประกอบด้วยข้าวขึ้นน้ำ 14 พันธุ์ และข้าวนาสวน 33 พันธุ์) จากผลการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* โดยใช้ไพรเมอร์ pB8 แสดงให้เห็นว่าข้าวพื้นเมืองในภาคเหนือและภาคอีสานส่วนใหญ่ มียีนที่ต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ในขณะที่ข้าวพื้นเมืองจากภาคใต้ พบพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* เพียง 1 พันธุ์ จากพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่ตรวจสอบทั้งหมด จำนวน 38 พันธุ์



ภาพที่ 7 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ pB8 ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย Lane P = ข้าว Nipponbare ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* (positive control), Lane 2-22 เป็นตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย, M คือ 1Kb DNA ladder. ลูกศร แสดงแถบ ดีเอ็นเอ ขนาด 500 คู่เบส Lane 2, 4, 5, 6, 9 และ20 แสดงตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีแอลลีลของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9*

ตารางที่ 10 การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi9* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ pB8

ข้าวพื้นเมือง	จำนวนพันธุ์ที่ตรวจสอบ	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลีล R *	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลีล S**
ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	19	16	3
ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	38	1	37
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	144	47	97
- ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	45	14	31
- ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	99	33	66
รวม	**201**	**64**	**137**

หมายเหตุ * หมายถึงแอลลีล R (reistance) ของยีน *Pi9* ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้ ของพันธุ์ข้าวพื้นเมือง ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ pB8 ที่จำเพาะกับยีน *Pi9* ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 500 bp

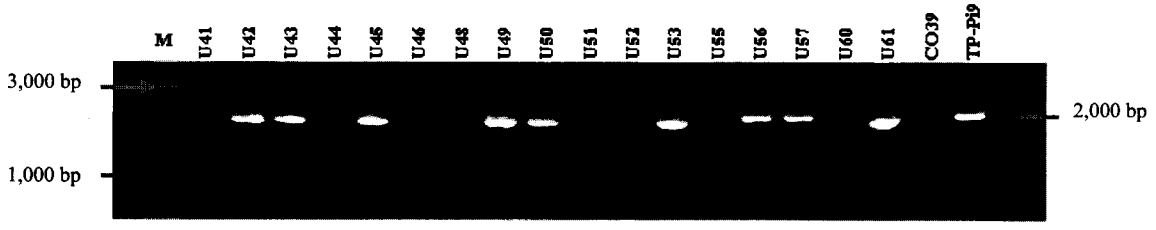
** หมายถึง แอลลีล S (susceptible) ของพันธุ์ข้าวพื้นเมือง ที่ไม่มียีนต้านทาน *Pi9* ต่อโรคไหม้

3.2.2 การตรวจสอบยีน Pi9 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ NBS2-Pi9-195-1

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 มีความสามารถต้านทานต่อเชื้อหาเหตุโรคไหม้ได้หลายสายพันธุ์ ต่อมา Qu et al. (2006) ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอจากตำแหน่งของ NBS-LRR จำนวน 6 เครื่องหมาย เพื่อใช้ในการตรวจสอบยีน *Pi9* ในต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* และพบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ *NBS2-Pi9*-195-1 คือตำแหน่งของยีน *Pi9* (*NBS2-Pi9* is the *Pi9* gene) เครื่องหมายดีเอ็นเอ *NBS2-Pi9*-195-1 มีลักษณะเป็น dominance marker และมีขนาด 2,000 bp

จากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ในข้าวพื้นเมืองจำนวน 201 พันธุ์ ข้าวป่าจำนวน 16 พันธุ์ และข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 24 พันธุ์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในข้าวพื้นเมือง ข้าวป่า และข้าวต้านทานโรคไหม้ได้จำนวน 57, 4 และ 3 พันธุ์ ตามลำดับ พบว่าพันธุ์ข้าวที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ดังกล่าวปรากฏแถบดีเอ็นเอตรงกับข้าวพันธุ์ต้านทาน TP-Pi9 ที่เป็น positive control แสดงว่าพันธุ์ข้าวเหล่านี้มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* พันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ประกอบด้วยข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือจำนวน 10 พันธุ์ และข้าวพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 47 พันธุ์ (ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง 14 พันธุ์ และข้าวนาสวนพื้นเมือง 33 พันธุ์) แต่ไม่พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ในข้าวพื้นเมืองภาคใต้ และพบข้าวป่าที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* จำนวน 4 สายพันธุ์ และข้าวต้านทานโรคไหม้ 3 พันธุ์ (ภาพที่ 8 และ 9 และ ตารางที่ 11)

เนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ *NBS2-Pi9-195-1* เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด dominance marker จึงทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทานได้ อย่างไรก็ตามมีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอ *NBS2-Pi9-195-1* มาใช้ในการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ในเชื้อพันธุกรรมข้าวสายพันธุ์ดีจากประเทศเกาหลี จำนวน 98 พันธุ์ พบว่ามีข้าวจำนวน 1 พันธุ์ที่มีแอลลีลต้านทานของยีน *Pi9* (Cho et al., 2007) แต่จากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ในครั้งนี้ พบว่าข้าวพื้นเมืองไทยมีแอลลีลต้านทานของยีน *Pi9* มากกว่าเชื้อพันธุกรรมข้าวสายพันธุ์ดีจากประเทศเกาหลี ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตที่มีความหลากหลายของพันธุ์ข้าวและมีความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้สูง จึงทำให้พบแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ในข้าวพื้นเมืองไทยเป็นจำนวนมาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองของไทยเป็นแหล่งพันธุกรรมที่สำคัญของยีนต้านทานโรคไหม้ ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต และพันธุ์ข้าวพื้นเมืองเหล่านี้ควรมีการอนุรักษ์ไม่ให้สูญหายไป

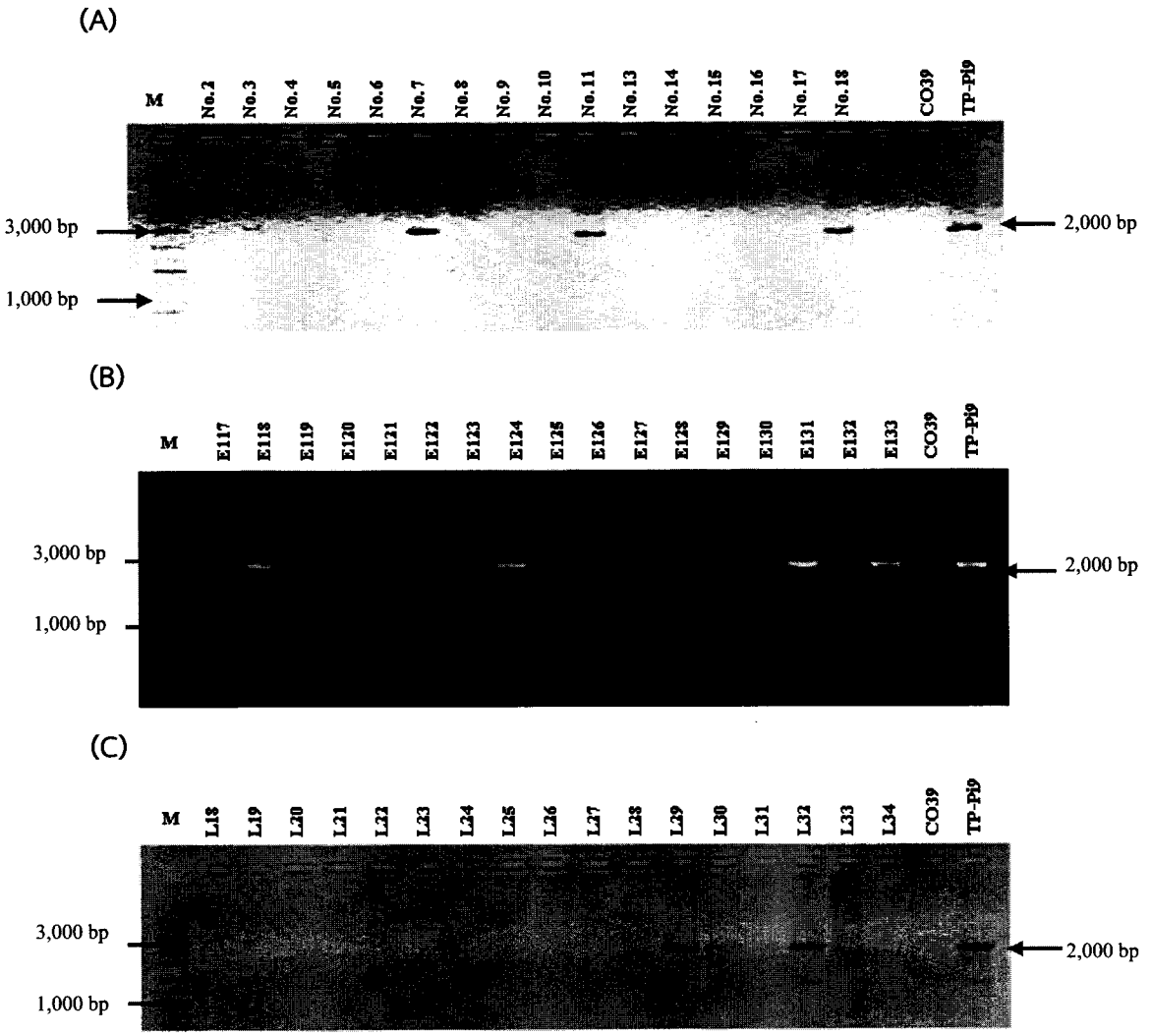


ภาพที่ 8 เจลอิเล็กโทรฟอรีซีสแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ของยีน *Pi9* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ NBS2-Pi9-195-1

ตารางที่ 11 การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi9* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย *NBS2-Pi9-195-1*

พันธุ์ข้าว	จำนวน	ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9*	
		Resistance (R)	Susceptible (S)
ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	38	0	38
ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	19	10	9
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	144	47	97
- ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	45	14	31
- ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	99	33	66
ข้าวป่า	16	4	12
ข้าวต้านทานโรคไหม้	24	3	21
รวม	**241**	**64**	**177**

หมายเหตุ R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ในข้าว หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย *NBS2-Pi9-195-1* ที่จำเพาะกับยีน *Pi9* ทำให้ได้ PCR product ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 2,000 bp
S หมายถึง แอลลีลอ่อนแอต่อโรคไหม้ของยีน *Pi9* โดยไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 2,000 bp

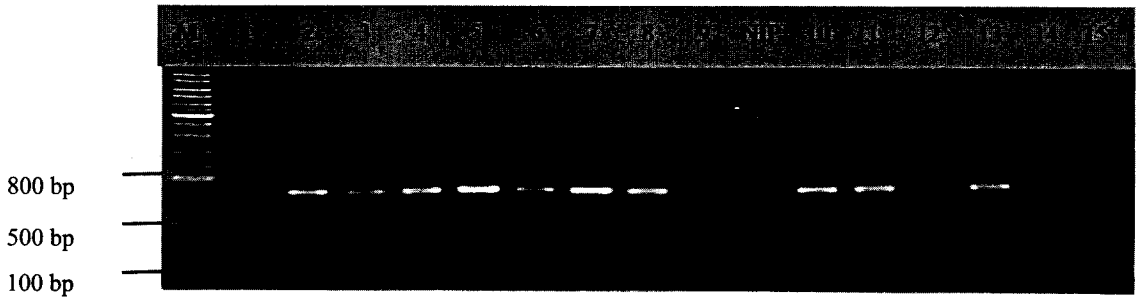


ภาพที่ 9 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ใน (A) ข้าวป่า (B) ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน และ(C) ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ NBS2-Pi9-195-1

3.3 การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ Pi36

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* เป็นยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง สามารถต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ ในประเทศจีนได้หลายสายพันธุ์ มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 8 ใกล้ชิดกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS มีโครงสร้างโปรตีนของยีนต้านทานโรคเป็นแบบ nucleotide binding site (NBS) และ leucine rich repeat (LRR) ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 1056 ตัว เป็น single copy gene การแทนที่ของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 590 จาก Asp เป็น Ser ส่งผลให้ข้าวแสดงความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ (Liu et al., 2007)

จากการตรวจสอบยีน *Pi36* โดยใช้ไพรเมอร์ R36STS ในข้าวพื้นเมืองทั้งหมด 201 ตัวอย่าง พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จำนวน 178 พันธุ์ เมื่อทำการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* จะให้แถบดีเอ็นเอที่ขนาดแตกต่างกันสามรูปแบบ คือ แอลลีลที่หนึ่ง (A) จะมีขนาดแถบดีเอ็นเอ 100, 400 และ 500 คู่เบส จำนวน 18 พันธุ์ แอลลีลที่สอง (B) จะมีขนาดแถบดีเอ็นเอ 100, 200 และ 800 คู่เบส จำนวน 102 พันธุ์ และ แอลลีลที่สาม (C) หรือ S allele จะมีขนาดแถบดีเอ็นเอ 100 และ 800 คู่เบส จำนวน 58 พันธุ์ โดยเปรียบเทียบกับ negative control (Nipponbare) ที่ไม่มีแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi36* ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 100 และ 800 คู่เบส (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองโดยใช้ไพรเมอร์ R36STS หลังนำ PCR product มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* [M =DNA marker, NIP = Nipponbare (Negative control), Lane 1-15 เป็นตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย

ตารางที่ 12 การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองจากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS

ข้าวพื้นเมือง	จำนวนพันธุ์ที่ตรวจสอบ	จำนวนพันธุ์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลีล A[†]	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลีล B[††]	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลีล C[‡]
ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	19	18	-	18	-
ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	38	33	13	15	5
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	144	127	5	69	53
-ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองอีสาน	45	42	1	23	18
-ข้าวนาสวนพื้นเมืองอีสาน	99	85	4	46	35
รวม	201	178	18	102	58

หมายเหตุ:

Pi36 A[†] หมายถึง แอลลีล A ของยีน *Pi36* ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS สำหรับยีนต้านทาน *Pi36* แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 100 400 และ 800 bp

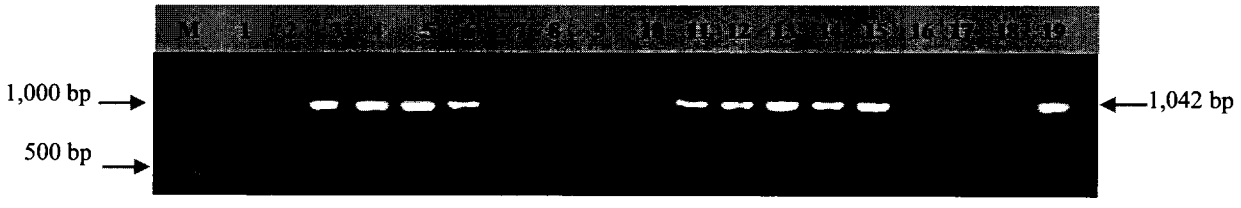
B[††] หมายถึง แอลลีล B ของยีน *Pi36* ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS สำหรับยีนต้านทาน *Pi36* แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 100 200 และ 800 bp

C[‡] หมายถึง แอลลีล S (susceptible) ของยีน *Pi36* ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS สำหรับยีนต้านทาน *Pi36* แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 100 และ 800 bp

ในข้าวพื้นเมืองจำนวน 201 พันธุ์ พบแอลลีล A ในข้าวพื้นเมือง จำนวน 18 พันธุ์ ประกอบด้วย ข้าวพื้นเมืองจากภาคใต้จำนวน 13 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองจากภาคอีสานจำนวน 5 พันธุ์ แบ่งเป็นข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 1 พันธุ์ และข้าวพื้นเมืองนาสวนภาคอีสานจำนวน 4 พันธุ์ แต่ไม่พบในข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ ส่วนแอลลีล B พบในข้าวพื้นเมืองจำนวน 102 พันธุ์ ประกอบด้วยข้าวพื้นเมืองจากภาคใต้จำนวน 15 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 69 พันธุ์ แบ่งเป็นข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 23 พันธุ์ และข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 46 พันธุ์ และข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือจำนวน 18 พันธุ์ (ตารางที่ 12 และ 27)

3.4 การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 12 ใกล้ๆกับตำแหน่งเซนโทรเมียร์ ยีนนี้มีถิ่นกำเนิดในข้าวอินดิกา เป็นยีนที่มีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้ Jia et al. (2002) ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* และเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Dominant marker จากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* ในข้าวตัวอย่างจำนวน 241 พันธุ์ ประกอบด้วย ข้าวพื้นเมืองจำนวน 201 พันธุ์, ข้าวต้านทานโรคไหม้ จำนวน 24 พันธุ์ และข้าวป่า จำนวน 16 สายพันธุ์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* ได้จำนวน 69 พันธุ์ ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,042 bp (ภาพที่ 11) แสดงว่ามีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ของยีน *Pi-ta* โดยพบแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* ในข้าวพื้นเมือง จำนวน 57 พันธุ์ (ตารางที่ 13 และ 27) ประกอบด้วยข้าวพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 19 พันธุ์ และ ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 38 พันธุ์ (แบ่งเป็น ข้าวนาสวนพื้นเมือง จำนวน 29 พันธุ์ และข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง จำนวน 9 พันธุ์) ข้าวป่า 1 สายพันธุ์ (ตารางที่ 28) และพันธุ์ข้าวปรับปรุงต้านทานโรคไหม้อีก จำนวน 11 พันธุ์ (ตารางที่ 29) แต่ไม่พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* ในข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ (ภาพที่ 11-13)



ภาพที่ 11 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* ในข้าวพื้นเมืองภาคใต้ จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-ta* พันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1,042 bp

M= 100 bp marker (Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, Fermentas)

1 = ลูกดำ	6 = ช่อแดง	11 = นางกลายแดง	16 = ตุลาถั่ว
2 = เชียงใหม่	7 = กูนิง	12 = ลากอ	17 = หอม
3 = ลูกแดง	8 = ดอกไม้ไทร	13 = กูนิง	18 = กือแซะดำ
4 = เล็บนกเบา	9 = รวงทอง	14 = มือจระเข้	19 = ชัยนาท1
5 = ช่อ	10 = ลูกปลา	15 = นางรอง	

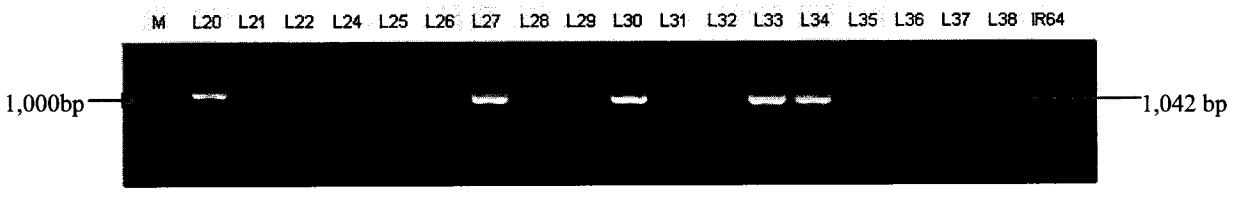
ตารางที่ 13 การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi-ta* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-ta*

พันธุ์ข้าว	จำนวนพันธุ์	ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta*	
		Resistance (R)	Susceptible (S)
ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	38	19	19
ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	19	0	19
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	144	38	106
- ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองอีสาน	45	9	36
- ข้าวนาสวนพื้นเมืองอีสาน	99	29	70
ข้าวป่า	16	1	15
ข้าวต้านทานโรคไหม้	24	11	13
รวม	**241**	**69**	**173**

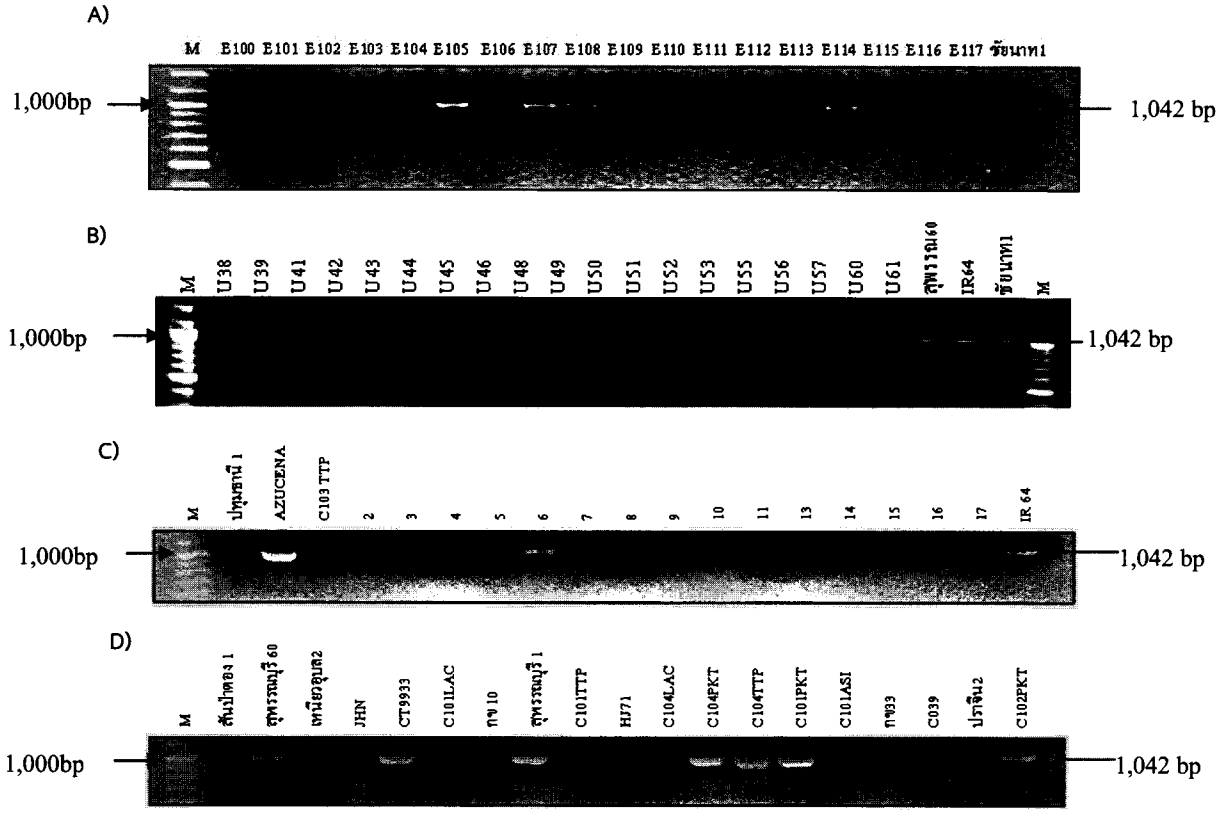
หมายเหตุ

R หมายถึง แอลลีลต้านทาน (resistance allele) ของยีน *Pi-ta* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-ta* ทำให้ได้ PCR product ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 1,042 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทาน (susceptible allele) ของยีน *Pi-ta* โดยไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1,042 bp



ภาพที่ 12 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* ในข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน (L20-L38) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-ta*



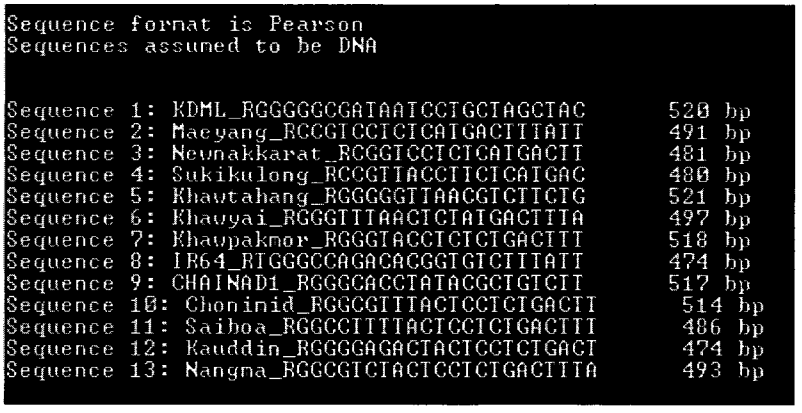
ภาพที่ 13 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* ในข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองอีสาน (A) ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ (B) ข้าวป่า (C) และพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ (D) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-ta*

ผลจากการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* ในข้าวพื้นเมืองนี้ สอดคล้องกับการศึกษาของเมทินี และคณะ (2009) ที่รายงานการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทย โดยพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* จะมีแถบดีเอ็นเอขนาด 1,042 bp นอกจากนี้ Fujita et al. (2009) ได้รายงานถึงการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์หายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* ในพันธุ์ข้าวจาก IRRI (IRRI-bred rice) จำนวน 42 พันธุ์ ด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* จำนวน 3 ไพรเมอร์ คือ $Pi\text{-}ta_{403}$, $Pi\text{-}ta_{440}$ และ $Pi\text{-}ta_{1042}$ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* ในข้าวจำนวน 27, 28 และ 28 พันธุ์ตามลำดับ และมีข้าวจำนวน 14,15 และ 15 พันธุ์ตามลำดับ ที่ไม่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta*

ยืนยันผลการตรวจสอบพันธุ์ข้าวที่มียีน *Pi-ta* โดยนำ PCR product ของของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* จำนวน 6 พันธุ์ และพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทาน จำนวน 7 พันธุ์ (ตารางที่ 14) ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ทั้ง forward และ reverse รวมทั้งสิ้น 26 sequences เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ มา assembly เพื่อค้นหาจุดเชื่อมต่อกันของลำดับ นิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม CAP3 พบว่า ทั้ง 26 sequences ไม่มีจุดที่เชื่อมต่อกัน จากนั้นทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม clustalW โดยแยกลำดับนิวคลีโอไทด์ออกเป็น 2 ชุด คือ ชุด forword จำนวน 13 sequences และชุด reverse จำนวน 13 sequences (ภาพที่ 14)

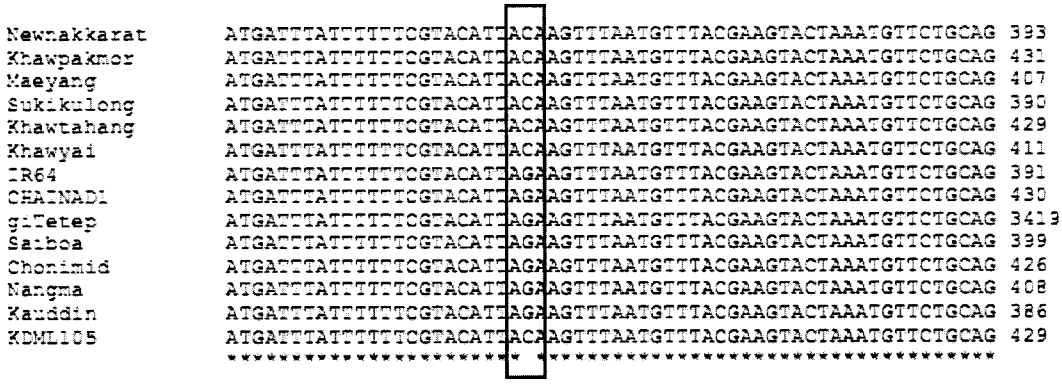
ตารางที่ 14 รายชื่อพันธุ์ข้าวที่นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta*

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	แอลลีล
1	S72	นางมา (GS.no 7414)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ต้านทาน
2	S77	ขืนดิน (GS.no 4290)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ต้านทาน
3	S80	สายบัว (GS.no 10346)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ต้านทาน
4	S81	ช่อนิมิต (GS.no 10354)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ต้านทาน
5	B6	ชัยนาท1	ข้าวต้านทานโรคไหม้	ต้านทาน
6	B19	IR64	ข้าวต้านทานโรคไหม้	ต้านทาน
7	S73	เหนียวนาคราช (GS.no 9982)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ไม่ต้านทาน
8	S75	แมะแยง (GS.no 10060)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ไม่ต้านทาน
9	S85	ชุกิกูลอง (GS.no 12704)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ไม่ต้านทาน
10	L4	ขาวตาแห้ง 55-5-55(Gs.546)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองอีสาน	ไม่ต้านทาน
11	L5	ขาวใหญ่ 33-22-61 (Gs.547)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองอีสาน	ไม่ต้านทาน
12	L6	ขาวปากหม้อ 74 (Gs.548)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองอีสาน	ไม่ต้านทาน
13		ขาวดอกมะลิ 105	ข้าวสายพันธุ์ตรวจสอบ	ไม่ต้านทาน

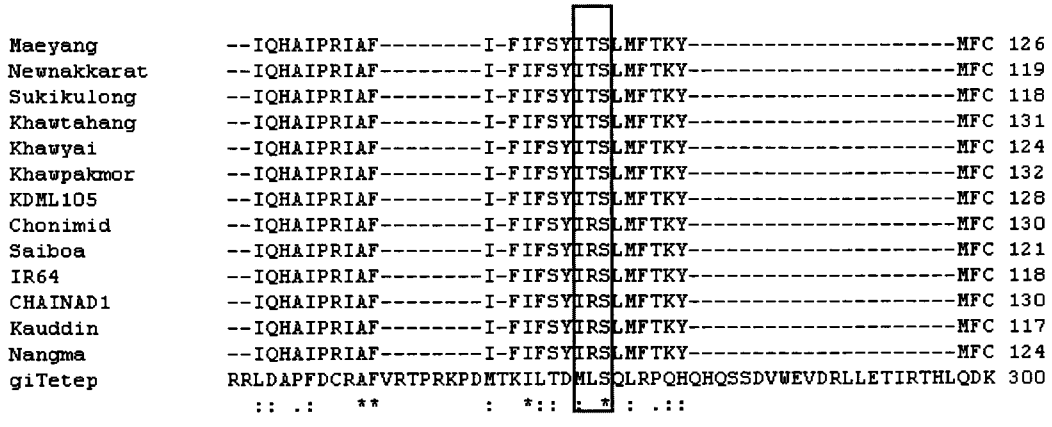


ภาพที่ 14 แสดงความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของพันธุ์ข้าวที่นำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta*

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้โดยใช้โปรแกรม clustal W พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุด forword ไม่มีความแตกต่าง แต่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในชุด reverse (ภาพที่ 15) โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันหนึ่งตำแหน่งระหว่างพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ *(Pi-ta)* และข้าวพื้นเมืองที่มีแอลลีลไม่ต้านทาน *(pi-ta)* ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส C และ G โดยพบลำดับเบส G ในข้าวที่มีแอลลีลต้านทาน และพบลำดับเบส C ในข้าวพันธุ์ที่มีแอลลีลไม่ต้านทาน (ภาพที่ 16) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน (translation) เพื่อตรวจสอบกรดอะมิโนบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์จาก C และ G ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงนั้นเป็นส่วนของ intron ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างกรดอะมิโนแต่อย่างใด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jai et al., 2004



ภาพที่ 15 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence alignments) ชุด reverse โดยใช้โปรแกรม clustal W ของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีแอลลีลไม่ต้านทาน *Pi-ta* (KDML = ขาวดอกมะลิ 105, Sukikulong = ซุกิกู ลอง (GS.no 12704), Maeyang = แมะแยง (GS.no 10060), Newnakkarat = เหนียวนาคราช (GS.no 9982), Khawtahang = ขาวตาแห้ง 55-5-55(Gs.546), Khawyai = ขาวใหญ่ 33-22-61 (Gs.547) และ Khawpakmor = ขาวปากหม้อ 74 (Gs.548)) และข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีแอลลีล ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* (IR64, Chainad1= ชัยนาท1, Saiboa= สายบัว (GS.no 10346), Kauddin= ขืนดิน (GS.no 4290), Nangma = นางมา (GS.no 7414), และ Chornimid = ช่อนิมิต (GS.no 10354), ในกรอบสี่เหลี่ยม คือตำแหน่งที่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์หนึ่งตำแหน่ง คือ G/C polymorphism

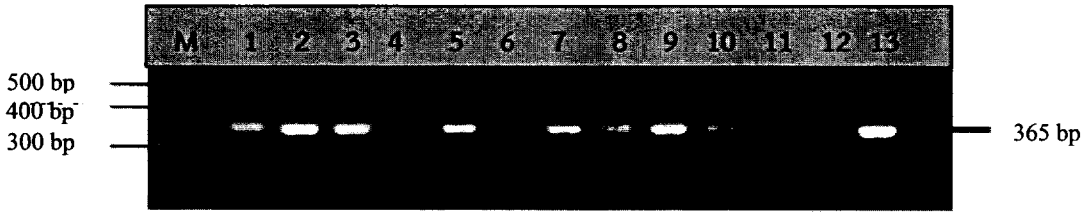


ภาพที่ 16 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของแอลลีลต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* และแอลลีลไม่ต้านทาน (*pi-ta*) A) บริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ C /G ส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยน และเป็นส่วนของ intron

3.5 การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ Pib

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2 บริเวณปลายของโครโมโซม (end of the long arm of chromosome 2) เป็น dominant gene สามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในญี่ปุ่นได้หลายสายพันธุ์ อีกทั้งยังเป็นยีนต้านทานโรคไหม้ยีนแรกที่ได้รับการโคลนยีน ต่อมาได้มีพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pibdom ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* เพื่อใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ และเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ (Wang et al., 1999; Fjellstrom et al., 2004) เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pibdom เป็น Dominant marker เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 365 bp จำเพาะกับแอลลีล ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* (Fjellstrom et al., 2004)

จากการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอ *Pib*dom ซึ่งจำเพาะกับยีน *Pib* ในข้าวป่าและข้าวพื้นเมืองจำนวน 241 พันธุ์ แบ่งออกเป็นข้าวพื้นเมือง 201 พันธุ์ ข้าวป่าจำนวน 16 พันธุ์ และข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 24 พันธุ์ พบว่ามีข้าวที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้จำนวน 81 พันธุ์ โดยให้แถบดีเอ็นเอขนาด 365 bp (ภาพที่ 17 และ 18) ซึ่งตรงกับแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib*



ภาพที่ 17 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีแอลลีลต้านทานต่อโรคไหม้ของยีน *Pib* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *Pib* ทำให้ได้ PCR product ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 365 bp (M = 100 bp marker (Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, Fermentas) 1= นางเขียว 2 = เกวียนหัก 3 = ขาวโพธิ์ 4 =สามพราน 5 = เหนียวบายสี 6 = เหลืองบังใบ 7 = ขาวนครไชยศรี 8 = เจ้าลอย 9 = ข้าวลอย 10 = ทานตะวัน 11 = ขาวเศรษฐี 12 = สามรวง 13 = ชัยนาท1

พันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* จำนวน 81 พันธุ์ ประกอบด้วย ข้าวพื้นเมืองจำนวน 75 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวพื้นเมืองภาคใต้จำนวน 8 พันธุ์ ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือจำนวน 6 พันธุ์ และข้าวพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 61 พันธุ์ (แบ่งเป็น ข้าวนาสวนพื้นเมือง จำนวน 42 พันธุ์ และข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง จำนวน 19 พันธุ์) (ตารางที่ 15 และ 27 , ภาพที่ 18) และข้าวต้านทานโรคไหม้ จำนวน 6 พันธุ์ แต่ไม่พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* ในข้าวป่า (ตารางที่ 15, 28 และ 29)

ผลจากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองนี้ สอดคล้องกับรายงานของ เมทินี และคณะ (2009) ที่รายงานถึงการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทยโดยพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 365 bp อีกทั้งยังสอดคล้องกับรายงานของ Fujita et al. (2009) ที่ได้รายงานถึงการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์หายีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* ในพันธุ์ข้าวจาก IRRI จำนวน 42 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* พบว่ามีข้าวจำนวน 40 พันธุ์ ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ และมีข้าวจำนวน 2 พันธุ์ที่ไม่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pib*

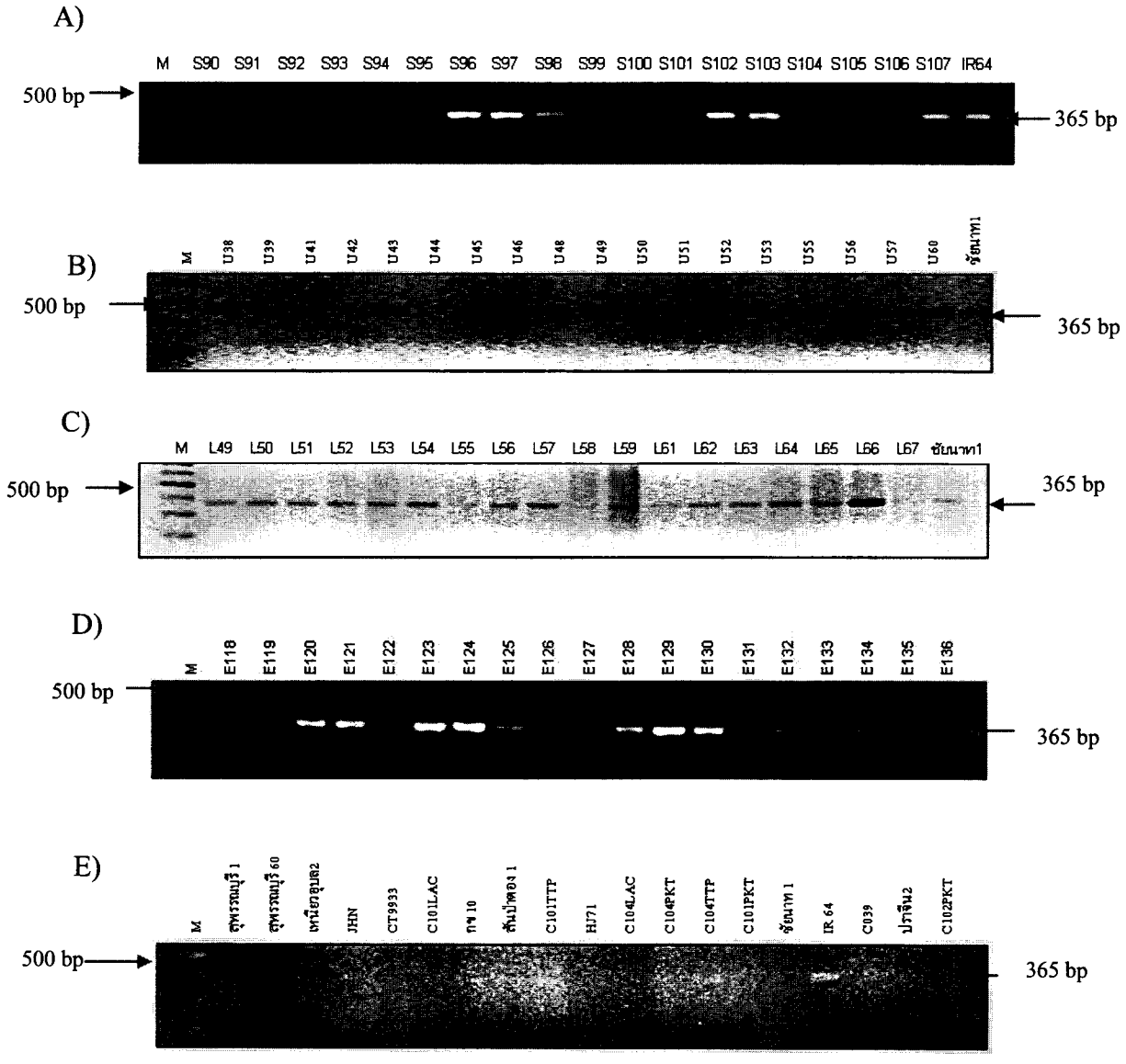
ตารางที่ 15 การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pib* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pib*

พันธุ์ข้าว	จำนวน	ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib*	
		Resistance (R)	Susceptible (S)
ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	38	8	30
ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	19	6	13
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	144	61	83
- ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองอีสาน	45	19	26
- ข้าวนาสวนพื้นเมืองอีสาน	99	42	57
ข้าวป่า	16	0	16
ข้าวต้านทานโรคไหม้	24	6	16
รวม	**241**	**81**	**159**

หมายเหตุ

R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pib* ที่ต้านทานต่อโรคไหม้ในข้าว หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pibdom ที่จำเพาะกับยีน *Pib* ทำให้ได้ PCR product ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 365 bp

S หมายถึง แอลลีลอ่อนแอต่อโรคไหม้ของยีน *Pib* โดยไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 365 bp



ภาพที่ 18 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* โดยใช้เครื่องหมาย Pibdom ใน (A) พันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ (B) พันธุ์ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ (C) พันธุ์ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน (D) พันธุ์ขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน และ (E) พันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้

3.6 การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* เป็นยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง (broad spectrum resistance) มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 ใกล้ชิดกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233 และ RM224 (Fuentes et *al.* 2008)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233 เป็น codominant marker มีตำแหน่งบนโครโมโซมคู่ที่11 ตำแหน่งเดียวกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* (0.0 cM) โดยแอลลีลต้านทานของยีน *Pi1(t)* จะมีขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในข้าวสายพันธุ์ต้านทาน near isogenic line C101LAC ส่วนแอลลีลอ่อนแอจะมีขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในข้าวพันธุ์ Nipponbare ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อโรคใบไหม้ โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 175 bp (www.gramene.org) เท่ากับขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในข้าวสายพันธุ์อ่อนแอ C101A51

จากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* ในข้าวป่าและข้าวพื้นเมืองจำนวน 241 พันธุ์ แบ่งออกเป็นข้าวพื้นเมือง 201 พันธุ์ ข้าวป่าจำนวน 16 พันธุ์ และข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 24 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวน 236 พันธุ์ พบพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทาน (ในที่นี้กำหนดเป็นแอลลีล A) จำนวน 15 พันธุ์ โดยเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์ต้านทาน C101LAC (positive control) ซึ่งได้รับรายงานว่ามีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* (Fuentes et al. 2008) (ตารางที่ 16) โดยพบในข้าวพื้นเมืองภาคใต้จำนวน 2 พันธุ์ ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือจำนวน 6 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 2 พันธุ์ และข้าวพันธุ์ปรับปรุงต้านทานโรคไหม้จำนวน 5 พันธุ์ แต่ไม่พบแอลลีล ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* ในข้าวป่าที่นำมาศึกษาครั้งนี้ (ภาพที่ 19 -23 และตารางที่ 27, 28 และ 29) ส่วนแอลลีล B ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอตรงกับข้าวสายพันธุ์อ่อนแอ C101A51 นั้นจะพบในข้าว จำนวน 183 พันธุ์

ตารางที่ 16 การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi1(t)* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233

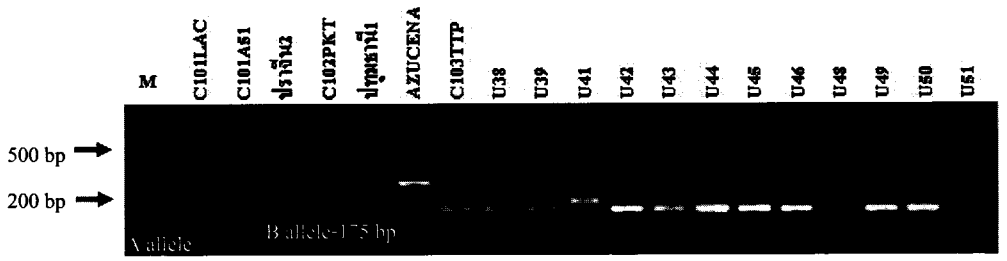
พันธุ์ข้าว	จำนวน	เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้	ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)*		
			Resistance allele (A)	Susceptible allele (B)	Heterozygous (H)
ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	38	38	2	27	9
ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	19	19	6	3	10
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	144	142	2	133	7
- ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง	45	45	1	43	1
- ข้าวนาสวนพื้นเมือง	99	97	1	90	6
ข้าวป่า	16	15	0	12	3
ข้าวต้านทานโรคไหม้	24	22	5	8	9
รวม	**241**	**236**	**15**	**183**	**38**

หมายเหตุ A หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pi1(t)* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย RM1233 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในข้าวสายพันธุ์ต้านทาน near isogenic line C101LAC

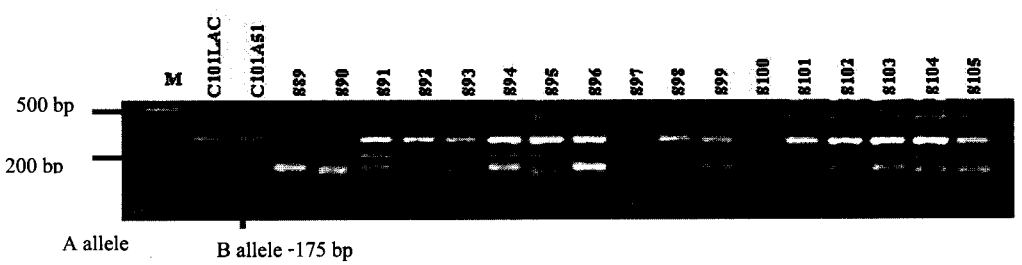
B หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi1(t)* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย RM1233 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในข้าวสายพันธุ์อ่อนแอ C101A51 (175 bp)

H หมายถึง heterozygous alleles ของยีน *Pi1(t)* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย RM1233 ได้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแอลลีล A และ B

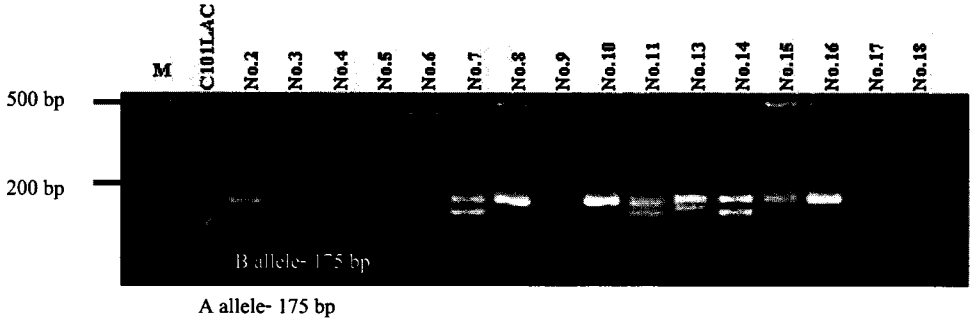
ภาพที่ 19 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส แสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* ในพันธุ์ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233 โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าว C101LAC ที่มีแอลลีลต้านทานของยีน *Pi1(t)* (แอลลีล A) และสายพันธุ์ข้าว C101A51 ซึ่งมีแอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi1(t)* (แอลลีล B-175 bp)



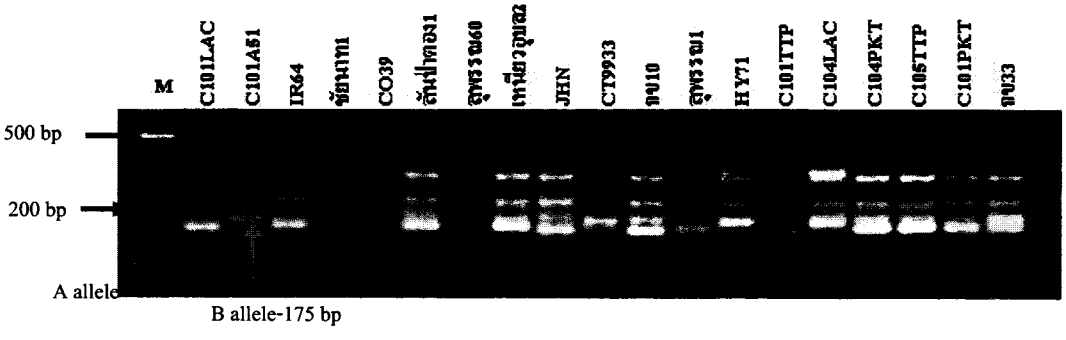
ภาพที่ 20 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส แสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* ในพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ และข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233 โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าว C101LAC ที่มีแอลลีลต้านทานของยีน *Pi1(t)* (แอลลีล A) และสายพันธุ์ข้าว C101A51 ที่มีแอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi1(t)* (พันธุ์อ่อนแอ) (แอลลีล B-175 bp) (M= 100 bp marker (Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, Fermentas) U38 = งอเพือน U39 = ดยาหลี U41 = ปือก่อ U42 = ปือเกษตร U43 = เหนียวแสงมูเวอ U44 = กะเหรี่ยงขาว U45 = เหลืองหอม U46 = จะนอไหน U48 = ลายชาน U49 = ปิอิ แม่ละ U50 = ห้วยแล้ง และ U51 = ปิอิ ชูแม่ฟาง)



ภาพที่ 21 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส แสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* ในพันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233 โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าว C101LAC ที่มีแอลลีลต้านทานของยีน *Pi1(t)* (แอลลีล A) และข้าวสายพันธุ์ C101A51 ซึ่งมีแอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi1(t)* (แอลลีล B-175 bp)



ภาพที่ 22 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส แสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* ในพันธุ์ข้าวป่าด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233 โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าว C101LAC ที่มีแอลลีลต้านทานของยีน *Pi1(t)* (แอลลีล A)



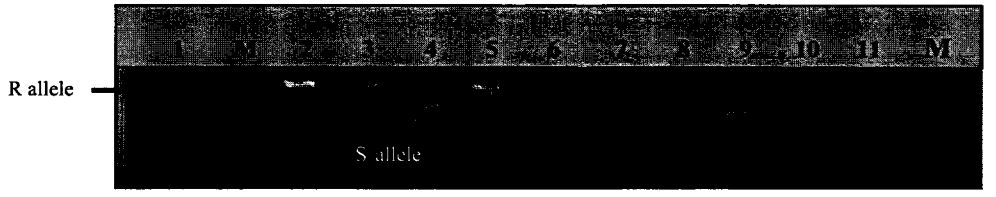
ภาพที่ 23 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส แสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* ในพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233 โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าว C101LAC ที่มีแอลลีลต้านทาน ของยีน *Pi1(t)* (แอลลีล A) และข้าวสายพันธุ์ C101A51 ซึ่งมีแอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* (แอลลีล B-175 bp)

3.7 การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3*

ยีน *Pi-d3* ถูกค้นพบโดย Shang และคณะ ในปี ค.ศ. 2009 ด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ของข้าว ชนิด Nucleotide-binding site – Leucine rich repeat (NBS-LRR) ระหว่างจีโนมของข้าว 2 สายพันธุ์ คือ ข้าวอินดิกา 93-11 และข้าวจาโปนิกา Nipponbare จากนั้นทำการศึกษาการกระจายตัวของยีนในกลุ่มดังกล่าวในประชากรของข้าวที่เกิดจากการผสมระหว่างพ่อแม่พันธุ์ที่มีความแตกต่างกันในด้านความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ โดย Shang และคณะ ค้นพบยีน *Pi-d3* ข้าวสายพันธุ์ Digu จากประเทศจีน โดยแอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d3* เกิดจากการกลายแบบ nonsense mutation ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่ 2208 จากตำแหน่งเริ่มต้นของการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้โปรตีนที่สังเคราะห์ได้มีขนาดสั้นลง เนื่องจากการกลายพันธุ์บริเวณดังกล่าวส่งผลให้เกิดเป็น stop codon

การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ Pi-d3 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-1

จากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-1 ในข้าวจำนวน 225 พันธุ์ แบ่งเป็นข้าวพื้นเมืองจำนวน 201 พันธุ์ และข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 24 พันธุ์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในข้าวได้จำนวน 197 พันธุ์ ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 178 bp เมื่อนำ PCR product มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Xbal* เพื่อดูความแตกต่าง พบว่ามีข้าวจำนวน 166 พันธุ์ ที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 178 bp โดยพบในข้าวพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 38 พันธุ์ ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 10 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 107 พันธุ์ (ตารางที่ 17 และ 27) และข้าวพันธุ์ปรับปรุงต้านทานโรคไหม้ จำนวน 11 พันธุ์ (ตารางที่ 17 และ 29) และมีพันธุ์ข้าวจำนวน 31 พันธุ์ ที่มีแอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d3* โดยจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Xbal* ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 158 และ 20 bp (ภาพที่ 24) สอดคล้องกับรายงานของ Shang et al. (2009) ที่รายงานเกี่ยวกับการโคลนยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* และพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-1 เพื่อใช้ในการตรวจสอบยีน *Pi-d3* โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าว สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 178 คู่เบส และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Xbal* แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d3* จะถูกตัดชิ้นดีเอ็นเอออกประมาณ 20 คู่เบส ส่วนแอลลีลต้านทานของยีน *Pi-d3* จะไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวจึงมีชิ้นดีเอ็นเอขนาดเท่าเดิม



ภาพที่ 24 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองแต่ละสายพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-1 หลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Xbal* (M =DNA marker, 1 = ดีเอ็นเอก่อนตัดด้วยเอนไซม์, Lane 2, 3, 5 และ 7 เป็นตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* และ Lane 4, 6, 8, 9, 10 และ 11 เป็นตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีแอลลีลไม่ต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3*)

ตารางที่ 17 การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi-d3* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-d3*

พันธุ์ข้าว	จำนวน	เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้	ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3*	
			Resistance allele (R)	Susceptible allele (S)
ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	38	38	38	0
ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	19	19	10	9
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	144	120	107	13
- ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง	45	26	21	5
- ข้าวนาสวนพื้นเมือง	99	94	86	8
ข้าวต้านทานโรคไหม้	24	20	11	9
รวม	**225**	**197**	**166**	**31**

หมายเหตุ R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pi-d3* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-d3* และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xbal* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 178 bp
S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d3* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-d3* และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xbal* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 158 และ 20 bp

การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ Pi-d3 โดยใช้เครื่องหมาย Pid3-dCAPS-2

จากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* ในข้าวจำนวน 225 พันธุ์ แบ่งเป็นข้าวพื้นเมืองจำนวน 201 พันธุ์ และข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 24 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-2 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในข้าวได้จำนวน 225 พันธุ์ แบ่งเป็นข้าวพื้นเมืองจำนวน 201 พันธุ์ และข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 24 พันธุ์ ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 178 bp เมื่อนำ PCR product มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI เพื่อดูความแตกต่าง พบว่ามีข้าวจำนวน 199 พันธุ์ แบ่งเป็นข้าวพื้นเมืองจำนวน 184 พันธุ์ และข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 15 พันธุ์ ที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 178 bp (ตารางที่ 18, 27 และ 29, ภาพที่ 25)

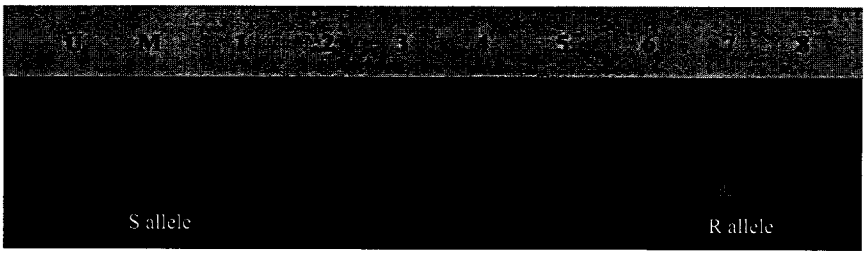
จากข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* จำนวน 184 พันธุ์ สามารถแยกออกได้เป็น ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 38 พันธุ์, ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 9 พันธุ์ และข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 137 พันธุ์ (ข้าวนาสวนพื้นเมืองจำนวน 94 พันธุ์ และข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองจำนวน 43 พันธุ์) ดังแสดงในตารางที่ 18 และ 27 สอดคล้องกับรายงานของ Shang et al. (2009) ซึ่งรายงานว่า ยีน *Pi-d3* พบมากในข้าวอินดิกา

ตารางที่ 18 การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi-d3* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-2

พันธุ์ข้าว	จำนวน	เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้	ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3*	
			Resistance allele (R)	Susceptible allele (S)
ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	38	38	38	0
ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	19	19	9	10
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	144	144	137	7
- ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง	45	45	43	2
- ข้าวนาสวนพื้นเมือง	99	99	94	5
ข้าวต้านทานโรคไหม้	24	24	15	6
รวม	**225**	**225**	**199**	**23**

หมายเหตุ R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pi-d3* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ *Pid3*-dCAPS-2 และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 178 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d3* ภายหลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ *Pid3*-dCAPS-2 และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 153 bp



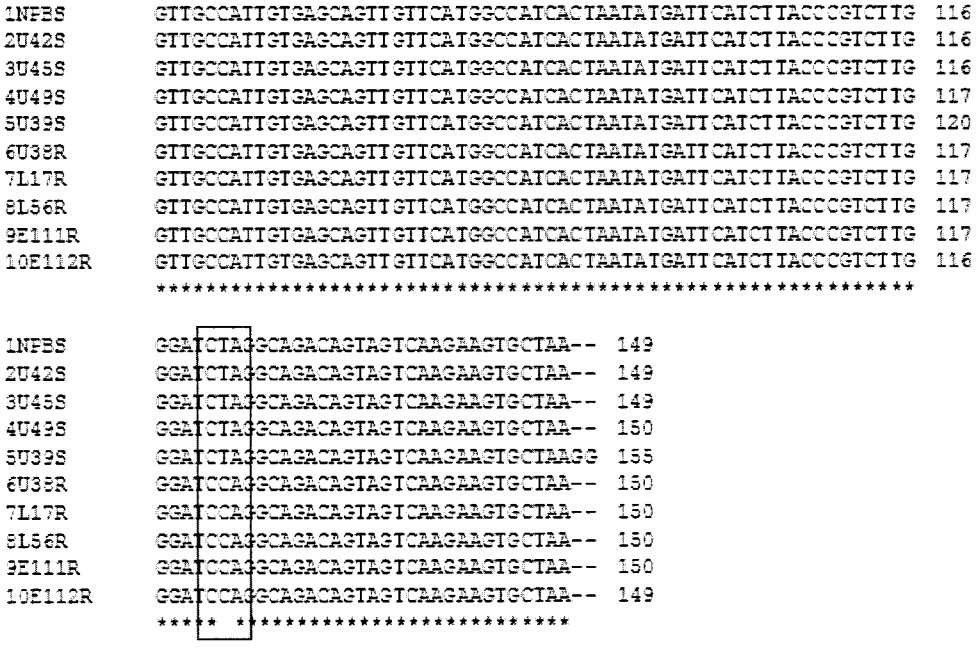
ภาพที่ 25 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-2 หลังจากตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

เพื่อเป็นการยืนยันผลการตรวจสอบข้าวพื้นเมืองที่มียีน *Pi-d3* โดยนำ PCR product ของของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* จำนวน 5 พันธุ์ และพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทาน จำนวน 5 พันธุ์ รวมทั้งสิ้น จำนวน 10 พันธุ์ (ตารางที่ 19) ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบ (BLAST) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* ในฐานข้อมูล NCBI และเปรียบเทียบระหว่างข้าวที่มีแอลลีลต้านทานและไม่ต้านทานโดยใช้โปรแกรม clustal W

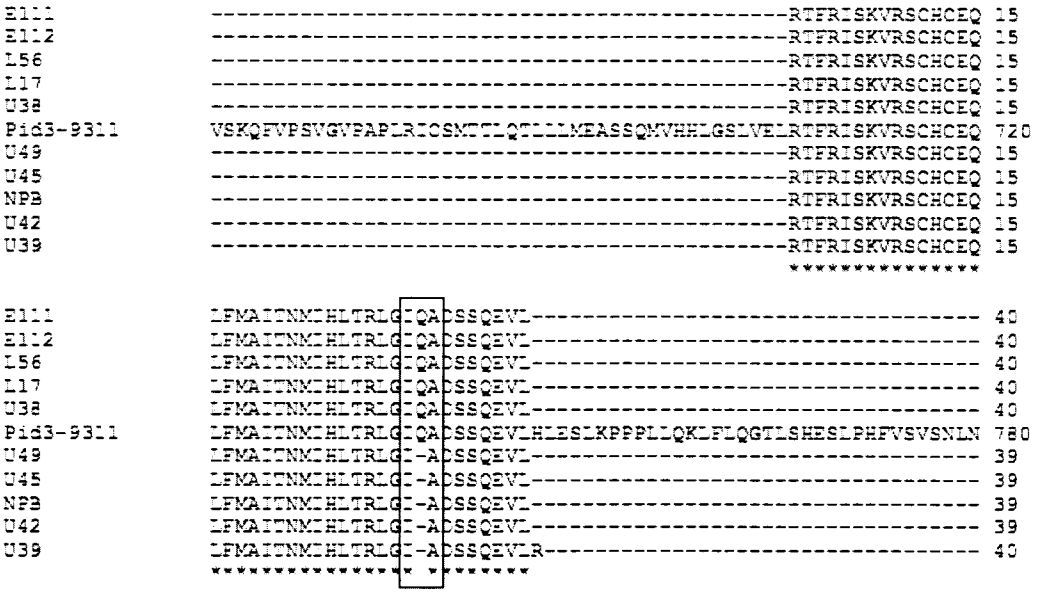
จากการเปรียบเทียบบนฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pi-d3* และเมื่อเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม clustal W พบว่าพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีแอลลีลต้านทานและไม่ต้านทานของยีน *Pi-d3* มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน 1 ตำแหน่ง โดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์ C ในพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* และพบลำดับนิวคลีโอไทด์ T ในพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทาน (ภาพที่ 26) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน และเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *Pi-d3* บนฐานข้อมูล NCBI (FJ773285 (Pid3-9311)) พบว่า การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์จาก C เป็น T ในข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทาน (*pi-d3*) ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นรหัสหยุดก่อนกำหนด (nonsense mutation) (ภาพที่ 27) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Shang et al., (2009) และ Chen et al., (2011) ซึ่งรายงานว่า ปกติยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* จะสังเคราะห์กรดอะมิโนทั้งสิ้น 924 ตัว ซึ่งจะพบในข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีน *Pi-d3* แต่ในพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทานจะสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนได้เพียง 737 ตัว เนื่องจากเกิดการกลายพันธุ์เป็นรหัสหยุดก่อนกำหนด อีกทั้งการกลายพันธุ์ดังกล่าวยังเกิดขึ้นที่บริเวณ Leucine-rich repeats ทำให้การสร้าง Leucine-rich repeats โปรตีนไม่สมบูรณ์จึงทำให้ข้าวสูญเสียความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้

ตารางที่ 19 รายชื่อพันธุ์ข้าวที่นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3*

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	แอลลีล
1	NPB	Nipponbare	สายพันธุ์ตรวจสอบ	ไม่ต้านทาน
2	U42	ปือเกษตร	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	ไม่ต้านทาน
3	U45	เหลืองหอม	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	ไม่ต้านทาน
4	U49	ปิอิ แม่ละ	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	ไม่ต้านทาน
5	U39	ดยาหลี่	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	ไม่ต้านทาน
6	U38	งอเพือน	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	ต้านทาน
7	L17	ดอกมะลิ 109-1-119 (Gs.569)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ต้านทาน
8	L56	อีปี๊ด (Gs.3376)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ต้านทาน
9	E111	พญาชม	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ต้านทาน
10	E112	เขียว	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ต้านทาน



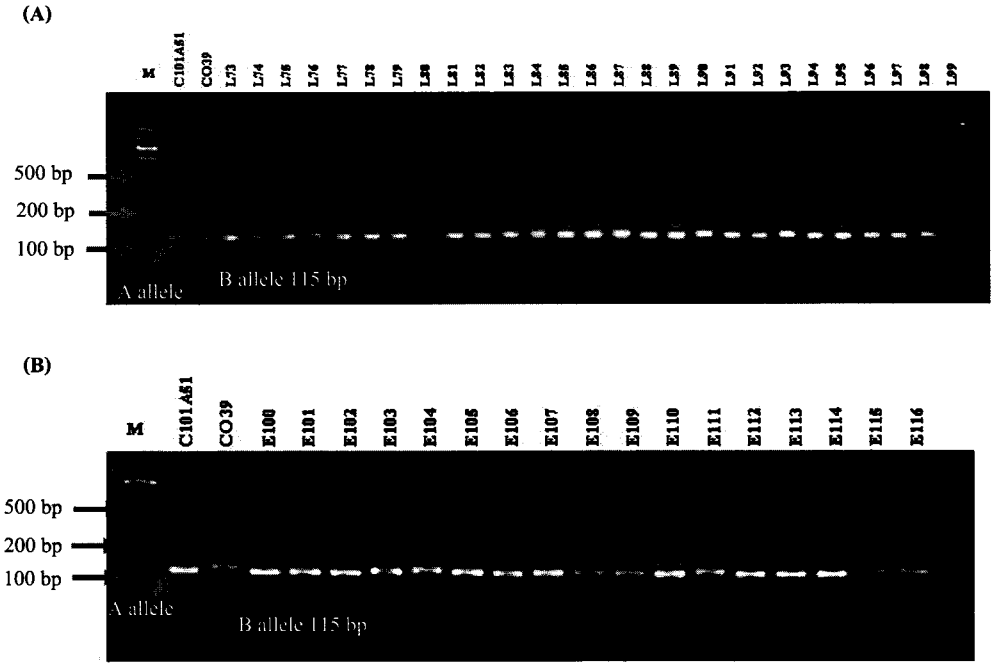
ภาพที่ 26 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีแอลลีลต้านทานและแอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-2



ภาพที่ 27 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d3* (E111= พญาชม, E112=เขียว, L56=อีปึ๊ด (Gs.3376), L17=ดอกมะลิ 109-1-119 (Gs.569), และ U38= งอเพือน) และข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทาน (U49=ปิอิ แม่ละ, U45=เหลืองหอม, NPB= Nipponbare, U42=ปือเกษตร และ U39=ดยาหลี่) กับข้อมูลลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูล NCBI (Pid3-9311)

3.8 การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ Pi2(t)

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 เป็นยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง (broad soectrum blast resistance) ขนาบข้าง (flanking markers) ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR140 และ RFLP JSH12 โดยห่างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR140 ประมาณ 0.9 cM และห่างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ RFLP JSH12 ประมาณ 0.9 cM มีรายงานว่าข้าวสายพันธุ์ C101A51 (near-isogenic line) มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* (Jiang and Wang, 2002) เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR140 พันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในข้าวสายพันธุ์ต้านทาน near isogenic line C101A51 กำหนดให้เป็น แอลลีล A ส่วนพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทานจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 115 bp (www.gramene.org) เท่ากับขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในสายพันธุ์อ่อนแอ CO39 กำหนดให้เป็นแอลลีล B (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 28 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* ในข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR140 ที่ใกล้ชิดกับยีน *Pi2(t)* (A) ข้าวนาสวนพื้นเมือง (B) ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง

จากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* ในข้าวจำนวน 241 สายพันธุ์ แบ่งเป็น ข้าวพื้นเมืองจำนวน 201 พันธุ์ ข้าวต้านทานโรคไหม้ จำนวน 24 พันธุ์ และข้าวป่า จำนวน 16 สายพันธุ์ สามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอได้จำนวน 193, 24 และ15 สายพันธุ์ตามลำดับ รวมเป็น 232 สายพันธุ์ พบว่ามีข้าวจำนวน 153 สายพันธุ์ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอตรงกับข้าวพันธุ์ต้านทาน C101A51 ที่เป็น positive control (แอลลีล A) แบ่งเป็นข้าวพื้นเมืองและข้าวต้านทานโรคไหม้ จำนวน 131 และ 12 พันธุ์ตามลำดับ, และพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* ในข้าวป่า จำนวน 10 สายพันธุ์ และมีข้าวจำนวน 78 พันธุ์ปรากฏแถบดีเอ็นเอตรงกับข้าวพันธุ์อ่อนแอ CO39 ที่เป็น negative control ซึ่งมีแอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* (แอลลีล B) (ตารางที่ 20, 27, 28 และ 29, ภาพที่ 28) และมีข้าวจำนวน 2 สายพันธุ์ ที่เป็น heterozygous ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอของแอลลีล A และ B แบ่งเป็นข้าวพื้นเมือง 1 พันธุ์ และข้าวป่า 1 สายพันธุ์

ตารางที่ 20 การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi2(t)* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR140

พันธุ์ข้าว	จำนวน	เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้	ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)*		
			Resistance allele (A)	Susceptible allele (B)	Heterozygous (H)
ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	38	38	1	37	-
ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	19	18	8	10	-
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	144	137	122	15	-
- ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง	45	45	41	4	-
- ข้าวนาสวนพื้นเมือง	99	92	81	11	-
ข้าวป่า	16	15	10	4	1
ข้าวต้านทานโรคไหม้	24	24	12	12	-
รวม	**241**	**232**	**153**	**78**	**1**

หมายเหตุ

A หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pi2(t)* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR140 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในข้าวสายพันธุ์ต้านทาน near isogenic line C101A51

B หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi2(t)* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR140 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับ 115 bp เท่ากับขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในข้าวสายพันธุ์อ่อนแอ CO39

H หมายถึง heterozygous allele ของยีน *Pi2(t)* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR140 ได้แถบดีเอ็นอที่ปรากฏแอลลีล A และ B

พันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* ประกอบด้วย ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือจำนวน 8 พันธุ์, ข้าวพื้นเมืองภาคใต้จำนวน 1 พันธุ์, ข้าวพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 122 พันธุ์ (ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง 41 พันธุ์ และข้าวนาสวนพื้นเมือง 81 พันธุ์)

3.9 การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54 (Pi-k^h)*

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* พบครั้งแรกในข้าวสายพันธุ์ Tetep เดิมชื่อ *Pi-k^h* ต่อมาได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Pi54* (Sharma et al. 2010) มีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 11 เป็น Single Dominant gene ยีน *Pi54* เป็นยีนต้านทานโรคที่สร้างโปรตีนต้านทานชนิด Nucleotide–binding site lecine rich repeat (NBS-LRR) (Sharma et al. 2003, 2005) มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุของโรคใบไหม้ *Magnaporthe grisea* ได้หลายสายพันธุ์ ยีน *Pi54* อยู่ใกล้ชิดกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ TRS26, TRS33, S129, และ RM206 โดยอยู่ห่างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ $S129_{700}$ 4.5cM และห่างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM206 ประมาณ 0.7cM (Sharma et al. 2005)

ต่อมาได้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54MAS ที่ตรงตำแหน่งของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด 144bp insertion / deletion (InDel) เป็น codominant marker ในข้าวที่มีแอลลีลต้านทานจะมีขนาดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 216 bp และข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทานจะมีขนาดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 359 bp ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ agarose gel electrophorisis ทำให้ง่ายต่อการตรวจสอบ และมีความถูกต้องแม่นยำกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR (Ramkumar et al. 2011)

<u>การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ Pi54 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54 SSR</u>

เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54SSR (RM206) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* และอยู่ห่างจากยีนดังกล่าวประมาณ 0.7 cM จากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54SSR (RM206) ในข้าวจำนวน 225 พันธุ์ แบ่งเป็นข้าวพื้นเมืองและข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 201 และ 24 พันธุ์ตามลำดับ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวน 114 พันธุ์ แบ่งเป็นข้าวพื้นเมืองจำนวน 109 พันธุ์ และข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 5 พันธุ์ พบว่ามีข้าวพื้นเมืองและข้าวต้านทานโรคไหม้ ที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 bp จำนวน 68 และ 4 พันธุ์ตามลำดับ (ภาพที่ 29) และพบแอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* จำนวน 42 พันธุ์ ซึ่งจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 400 bp แบ่งเป็นข้าวพื้นเมือง 41 พันธุ์ และข้าวต้านทานโรคไหม้ 1 พันธุ์ (ตารางที่ 21 และ 27)

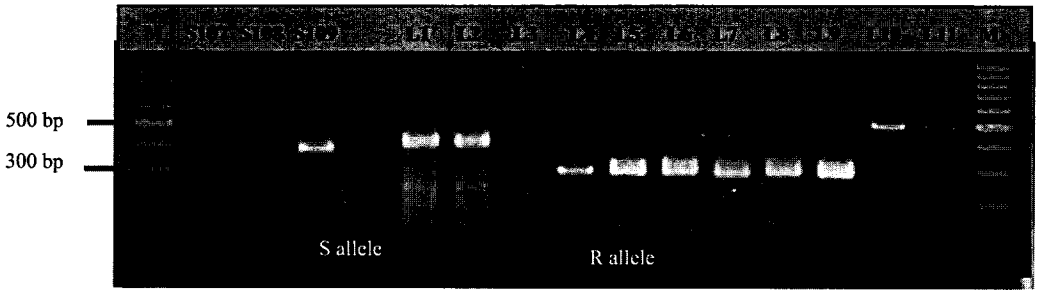
พันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทาน *Pi54* ประกอบด้วย ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 14 พันธุ์, ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 54 พันธุ์ แบ่งเป็น ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง จำนวน 6 พันธุ์ และข้าวนาสวนพื้นเมือง จำนวน 48 พันธุ์ แต่ไม่พบแอลลีลต้านทานในข้าวพื้นเมืองภาคใต้

ตารางที่ 21 การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi54* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54SSR

พันธุ์ข้าว	จำนวน	เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้	ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54*	
			แอลลีลต้านทาน (R)	แอลลีลไม่ต้านทาน(S)
ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	38	18	0	18
ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	19	17	14	3
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	144	74	54	20
- ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง	45	10	6	4
- ข้าวนาสวนพื้นเมือง	99	64	48	16
ข้าวต้านทานโรคไหม้	24	5	4	1
รวม	**225**	**144**	**72**	**42**

หมายเหตุ R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM206 แล้วจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 300 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM206 และจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 400 bp



ภาพที่ 29 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ในข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสานโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RM206 ที่ใกล้ชิดกับยีน *Pi54*

การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54 indel

จากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54 indel (Pi54MAS) ในข้าวจำนวน 225 พันธุ์ แบ่งเป็นข้าวพื้นเมือง และข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 201 และ 24 พันธุ์ตามลำดับ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 222 พันธุ์ แบ่งเป็นข้าวพื้นเมืองจำนวน 201 พันธุ์และข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 21 พันธุ์ พบว่ามีข้าวพื้นเมืองที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* จำนวน 10 พันธุ์ และข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 6 พันธุ์ ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 216 bp (ภาพที่ 30)

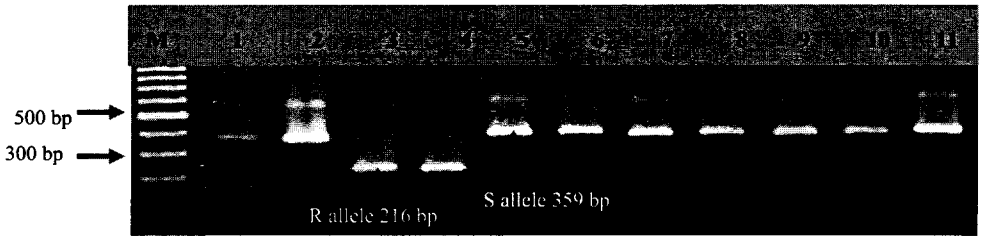
พันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ประกอบด้วยข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ 10 พันธุ์ แต่ไม่พบแอลลีลต้านทานในข้าวพื้นเมืองภาคใต้ และข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน (ตารางที่ 22 และ 27)

ตารางที่ 22 การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi54* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54-indel (Pi54MAS)

พันธุ์ข้าว	จำนวน	สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้	ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54*	
			Resistance (R)	Susceptible (S)
ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	38	38	0	38
ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	19	19	10	9
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	144	144	0	144
- ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองอีสาน	45	45	0	45
- ข้าวนาสวนพื้นเมืองอีสาน	99	99	0	99
ข้าวต้านทานโรคไหม้	24	21	6	15
รวม	**225**	**222**	**16**	**206**

หมายเหตุ R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pi54* ที่ต้านทานต่อโรคไหม้ในข้าว หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ *Pi54 indel* ที่จำเพาะกับยีน *Pi54* ทำให้ได้ PCR product ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 216 bp

S หมายถึง แอลลีลอ่อนแอต่อโรคไหม้ของยีน *Pi54* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ *Pi54 indel* ที่จำเพาะกับยีน *Pi54* ทำให้ได้ PCR product ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 359 bp



ภาพที่ 30 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ Pi54-indel (M=marker, 1=สุพรรณบุรี 1, 2= C101TTP, 3= C105 TTP 4-1-23, 4= C101 PKT, 5=ชัยนาท 1, 6= IR64, 7=ปทุมธานี 1, 8= AZUCENA, 9= C103TTP, 10= C101A51 และ 11=กข 33)

ยืนยันผลการตรวจสอบพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* โดยการ นำ PCR product ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานและแอลลีลไม่ต้านของยีนทานโรคไหม้ *Pi54* ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54 indel จำนวน 10 พันธุ์ ประกอบด้วยพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ *Pi54* จำนวน 5 พันธุ์ และพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทาน จำนวน 5 พันธุ์ (ตารางที่ 23) มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ในฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม clustal W

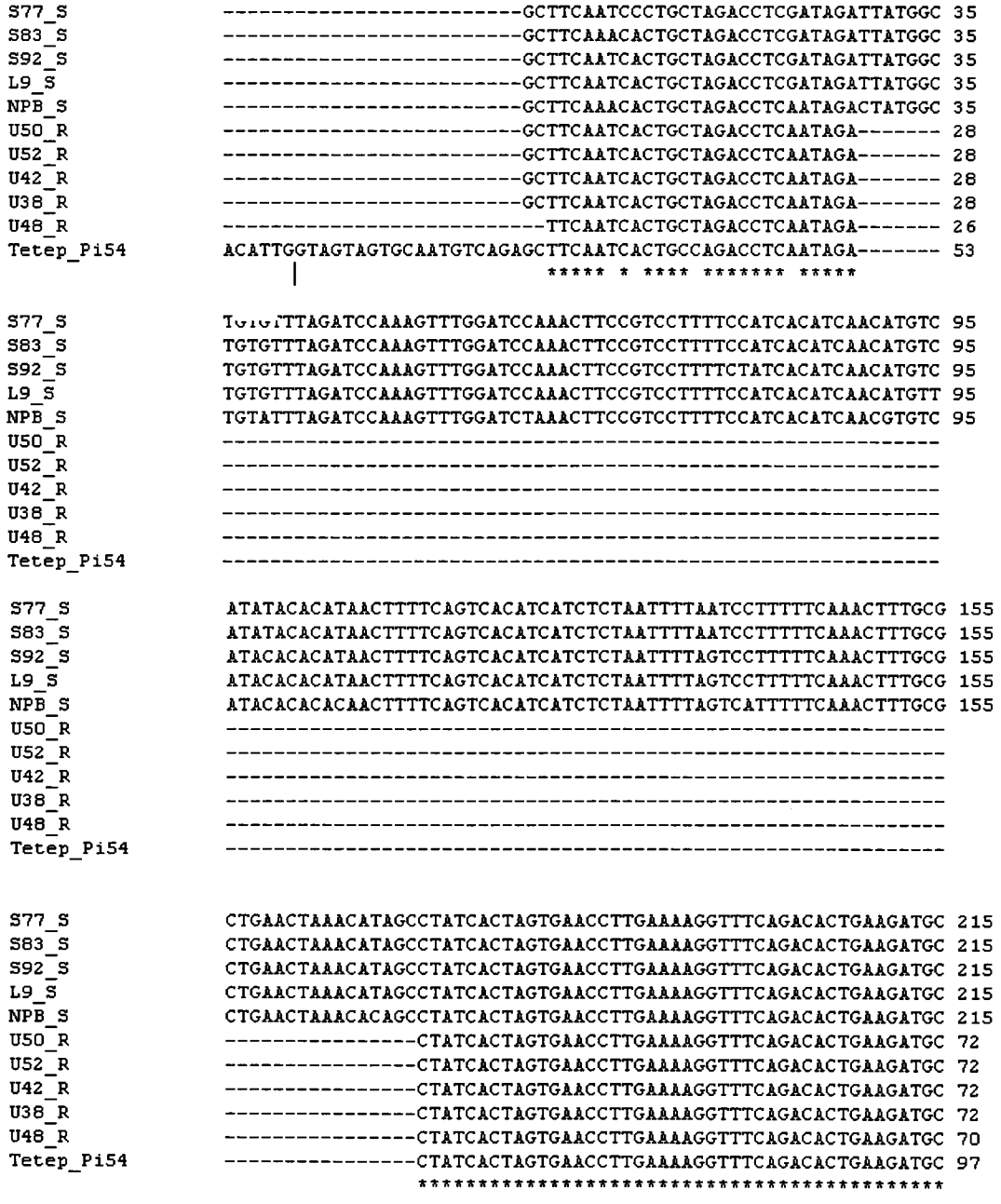
ตารางที่ 23 รายชื่อพันธุ์ข้าวที่นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54*

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	แอลลีล
1	U38	งอเพือน	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	ต้านทาน
2	U42	ปือเกษตร	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	ต้านทาน
3	U46	จะนอไหน	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	ต้านทาน
4	U48	ลายซาน	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	ต้านทาน
5	U52	ข้าวกอแผ่	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	ต้านทาน
6	E144	เจ๊กกระโดด	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	ไม่ต้านทาน
7	S72	นางมา(GS.no 7414)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ไม่ต้านทาน
8	S78	ดอกพิกุล (GS.no9754)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ไม่ต้านทาน
9	S87	ลาเก๊ะงอ (GS.no 12717)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ไม่ต้านทาน
10	NPB	Nipponbare	ข้าวพันธุ์ตรวจสอบ	ไม่ต้านทาน

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ *Pi54* กับพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทานกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ในฐานข้อมูล NCBI (gi 63103205 gb AY914077.1 *Oryza sativa* (indica cultivar-group) cultivar Tetep NBS-LRR (Pik^h) gene, partial cds) พบว่า ในพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานมีการขาดหายของลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 143 bp ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ramkumar et al. (2011) ที่ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอจากตำแหน่งที่มีการขาดหายของลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 144 bp ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากเครื่องหมายดีเอ็นเอ *Pi54* ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pi54* จากฐานข้อมูล NCBI แสดงในภาพที่ 31

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปลี่ยนเป็นลำดับของกรดอะมิโน (translation) พบว่าในพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทานมีการเพิ่มเข้ามาของลำดับเบส (insertion) จำนวน 144 bp แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทาน

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54 MAS ที่ใช้ในการตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ($Pi\text{-}k^h$) โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการค้นหายีน *Pi54* มากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54SSR (RM206) เนื่องจากมีความจำเพาะกับยีน *Pi54* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ramkumar et al. (2011) ที่รายงานว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54MAS มีความจำเพาะกับยีน *Pi54* มากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54SSR ซึ่งจะเห็นได้ว่าในข้าวพันธุ์ IR64 เมื่อตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54SSR จะปรากฏแถบดีเอ็นเอของแอลลีลต้านทาน แต่ตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54MAS จะปรากฏแถบดีเอ็นของแอลลีลไม่ต้านทาน โดยข้าวพันธุ์ IR64 จะมียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* และ *Pib* แต่ไม่มียีน *Pi54* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ramkumar et al. (2011)



ภาพที่ 31 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีแอลลีลต้านทานและแอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54MAS และข้อมูลของ ยีน *Pi54* จากฐานข้อมูล NCBI

3.10 การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ Pigm (t)

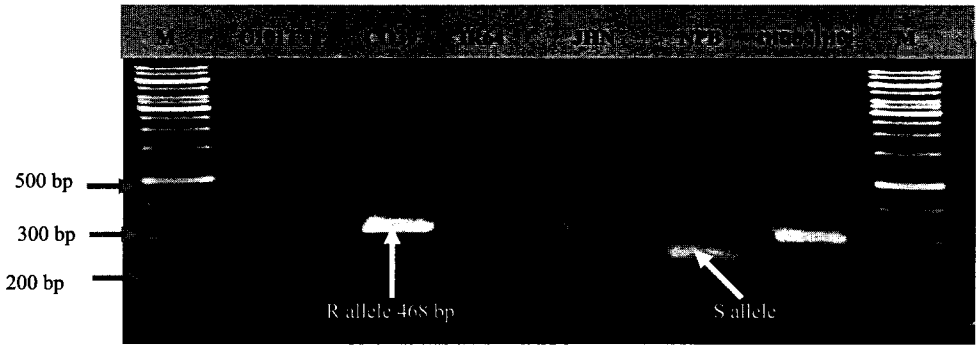
ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* พบในข้าวสายพันธุ์ Gumei 4 ของประเทศจีน เป็นยีนต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง โดยพบว่ายีนดังกล่าวมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้ดีกว่ายีน *Pi1(t), Pi2,* และ *Pi3* มีขนาดประมาณ 70 kb ซึ่งอยู่ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 และ C0428 บนโครโมโซมที่ 6 ซึ่งประกอบด้วยยีนต้านทานโรคไหม้ของข้าว ชนิด Nucleotide-binding site – Leucine rich repeat (NBS-LRR) 5 ยีน (Deng et al., 2006) ต่อมามีการโคลนยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* สำเร็จ และพบว่ายีนดังกล่าว จัดอยู่ในกลุ่มของยีนต้านทานโรคชนิด Nucleotide-binding site – Leucine rich repeat (NBS-LRR) (Deng et al., 2009) มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ดีกว่า *Pi2, Pi9, Piz* และ *Pizt* การตรวจสอบแอลลีลของยีน *Pigm(t)* ในข้าวสามารถทำได้โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 และ Indel marker S29742

<u>การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ Pigm(t) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483</u>

เครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด CAPS marker จะต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ในการแยกความแตกต่าง โดยจะเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 468 คู่เบส และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *EcoRI* แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pigm(t)* จะมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *EcoRI* ทำให้สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ ส่วนแอลลีลต้านทานของยีน *Pigm(t)* ไม่มีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *EcoRI* จึงไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าว ทำให้มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเท่าเดิม

จากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ในข้าวจำนวน 225 พันธุ์ ประกอบด้วยข้าวพื้นเมืองจำนวน 201 พันธุ์ และ ข้าวต้านทานโรคไหม้ จำนวน 24 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวน 216 พันธุ์ แบ่งเป็นข้าวพื้นเมือง 200 พันธุ์ และข้าวต้านทานโรคไหม้ 16 พันธุ์ ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 468 bp เมื่อนำ PCR product ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* พบว่ามีข้าวจำนวน 213 พันธุ์ ที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* โดยจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 468 bp ซึ่งตรงกับข้าวพันธุ์ TP 309 (positive control) แบ่งเป็นข้าวพื้นเมือง จำนวน 198 พันธุ์ และข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 15 พันธุ์ และมีข้าวจำนวน 3 พันธุ์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 และ 200 bp ซึ่งตรงกับข้าวพันธุ์ Nipponbare ที่เป็น negative control (ภาพที่ 32)

พันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* จำนวน 198 พันธุ์ ประกอบด้วย ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 16 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคใต้จำนวน 38 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 144 พันธุ์ (แบ่งเป็นข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง จำนวน 45 พันธุ์ และข้าวนาสวนพื้นเมือง จำนวน 99 พันธุ์) (ตารางที่ 24 และ 27)



ภาพที่ 32 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ของข้าวโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ CAP marker-C5483 หลังจากตัด PCR product ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI (M =DNA marker, พันธุ์ข้าว C101TTP, CO39, IR64, JHN และ เหลืองใหญ่ เป็นตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* และ NPB (Nipponbare) เป็นตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทานโรคไหม้ *Pigm (t)*)

ตารางที่ 24 การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pigm(t)* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ CAP marker-C5483

พันธุ์ข้าว	จำนวน	เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้	ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm*(t)-C5483	
			Resistance allele (R)	Susceptible allele (S)
ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	38	38	38	0
ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	19	18	16	2
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	144	144	144	0
- ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง	45	45	45	0
- ข้าวนาสวนพื้นเมือง	99	99	99	0
ข้าวต้านทานโรคไหม้	24	16	15	1
รวม	**225**	**216**	**213**	**3**

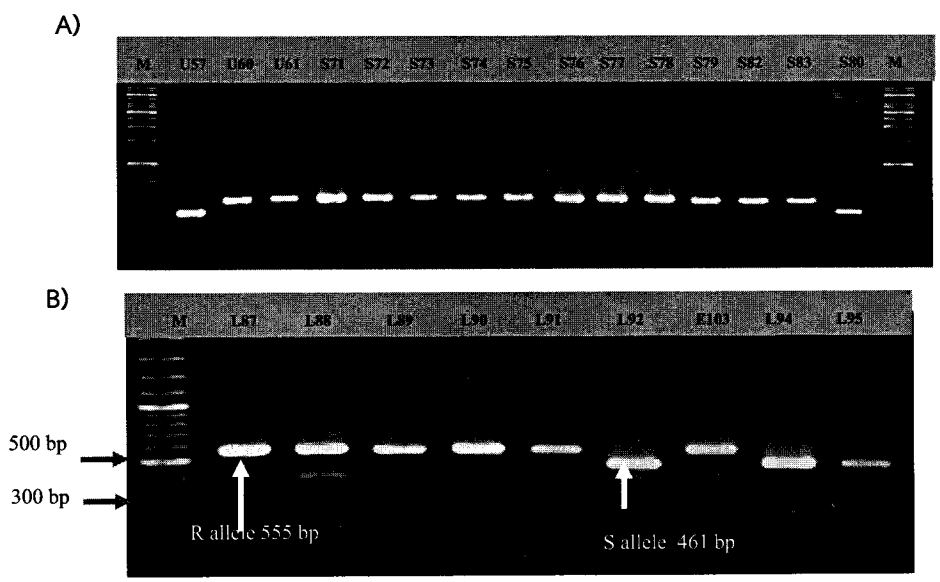
หมายเหตุ R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ภายหลังจากการนำ PCR product มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดเท่าเดิม คือ ประมาณ 468 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ภายหลังจากการนำ PCR product มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 และ 100 bp

การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ Pigm(t) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742

เครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* และเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด Indel marker โดยจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 555 bp ตรงกับข้าวพันธุ์ TP 309 (positive control) ส่วนพันธุ์ข้าวที่ไม่มีแอลลีลต้านทานจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 461 bp ตรงกับข้าวพันธุ์ Nipponbare (negative control) (ภาพที่ 33)

จากการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 ในตัวอย่างข้าวจำนวน 225 พันธุ์ แบ่งเป็นข้าวพื้นเมืองจำนวน 201 พันธุ์ และข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 24 พันธุ์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวน 198 พันธุ์ แบ่งเป็นข้าวพื้นเมืองและข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 180 และ 18 พันธุ์ตามลำดับ เมื่อนำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบผลใน 2% agarose gel electrophoresis พบว่ามีข้าวพื้นเมืองจำนวน 146 พันธุ์ ที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* แบ่งเป็น ข้าวพื้นเมืองภาคใต้จำนวน 31 พันธุ์ ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือจำนวน 15 พันธุ์ และข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 100 พันธุ์ (ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองจำนวน 36 พันธุ์ และข้าวนาสวนพื้นเมืองจำนวน 64 พันธุ์) (ตารางที่ 25 และ 27) และข้าวต้านทานโรคไหม้จำนวน 9 พันธุ์



ภาพที่ 33 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแสดงผลการค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ของข้าวโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Indel marker C29742 ใน (A) ข้าวพื้นเมืองภาคใต้, และ (B) ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน

ตารางที่ 25 การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pigm(t)* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Indel S29742

พันธุ์ข้าว	จำนวน	เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้	ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)*–Indel S29742	
			Resistance (R)	Susceptible (S)
ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	38	33	31	2
ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	19	19	15	4
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	144	128	100	28
- ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง	45	43	36	7
- ข้าวนาสวนพื้นเมือง	99	85	64	21
ข้าวต้านทานโรคไหม้	24	18	9	9
รวม	**225**	**198**	**155**	**43**

หมายเหตุ R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ภายหลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดย Indel marker S29742 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 555 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ภายหลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ Indel marker S29742 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 461 bp

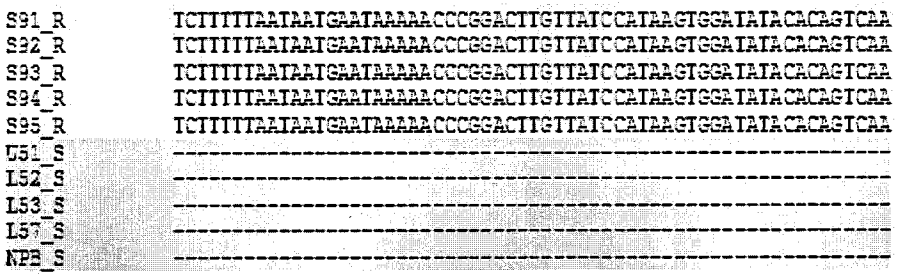
จากค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ในข้าวพื้นเมือง และข้าวต้านทานโรคไหม้พบว่าข้าวพื้นเมืองส่วนใหญ่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* แต่ผลลัพท์ที่ได้จากเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งสองนั้นแตกต่างกันมาก อย่างไรก็ตามเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งสองเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* เท่านั้น ไม่ใช่เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนามาจากตรงตำแหน่งยีน จึงทำให้ผลที่ได้มีความแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก เครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งสองเครื่องหมายมีระยะห่างจากยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* แตกต่างกันจากรายงานของ Dang et al., (2006)

จากนั้นยืนยันผลการตรวจสอบข้าวพื้นเมืองที่มียีน *Pigm(t)* โดยนำ PCR product ของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* จำนวน 5 พันธุ์ และพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* จำนวน 5 พันธุ์ รวมทั้งสิ้น จำนวน 10 พันธุ์ (ตารางที่ 26) มาค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลบนฐานข้อมูล NCBI และเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานและไม่ต้านทานของยีน *Pigm(t)* โดยใช้โปรแกรม clustalW

ตารางที่ 26 รายชื่อพันธุ์ข้าวที่นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm (t)*

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	แอลลีล
1	S91	เชียงใหม่ (GS.no 12739)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ต้านทาน
2	S92	ลูกแดง (GS.no 12740)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ต้านทาน
3	S93	เล็บนกเบา (GS.no 12743)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ต้านทาน
4	S94	ช่อ (GS.no 12749)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ต้านทาน
5	S95	ช่อแดง(GS.no 12751)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	ต้านทาน
6	U51	ปิอิ ซูแม่ฟาง	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	ไม่ต้านทาน
7	L52	อีปง (Gs.3372)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ไม่ต้านทาน
8	L53	นางนวล (Gs.3373)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ไม่ต้านทาน
9	L57	ดอสามเดือน (Gs.3377)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	ไม่ต้านทาน
10	NPB	Nipponbare	ข้าวสายพันธุ์ตรวจสอบ	ไม่ต้านทาน

จากการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการสืบค้นยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm (t)* ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 เปรียบเทียบกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm (t)* ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PAC AP005659 ซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากโครโมโซมที่ 6 ของข้าวที่ได้รับการโคลนยีน สอดคล้องกับ Deng et al., (2010) ที่รายงานว่ายีน *Pigm(t)* มีตำแหน่งอยู่บน PAC AP005659 ใกล้ชิดกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ S29742 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานและข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pigm(t)* มาเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม clustal W พบว่าข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทานมีการขาดหายของลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 101 เบส (ภาพที่ 34)



ภาพที่ 34 แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีแอลลีลต้านทาน และแอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Indel marker S29742

ฐานข้อมูลทางพันธุกรรมเบื้องต้นของยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมือง

จากการสืบค้นยีนต้านทานโรคไหม้ จำนวน 10 ยีน (ได้แก่ *Pi9, Pi-d2, Pi36, Pi-ta* , *Pib*, *Pi1(t), Pi2(t), Pi-d3*, *Pi54* และ *Pigm(t)*) ในข้าวพื้นเมืองไทย จำนวน 201 พันธุ์ (accessions) ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถจัดทำ Genotypic profile ของยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองของไทย ข้าวป่า และพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ ดังแสดงในตารางที่ 27 28 และ 29 ตามลำดับ ข้อมูลดังกล่าวเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมข้าวพื้นเมือง และเป็นแหล่งพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 27 การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9, Pi-d2, Pi36, Pi-ta , Pib, Pi1(t), Pi2(t), Pi-d3, Pi54* และ *Pigm(t)* ที่พบในข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ ภาคอีสาน และภาคใต้

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว	*pB8-Pi9*†	*NBS2-Pi9*‡	*Pi-d2*§	*Pi36*¶	*Pi-ta* ††	*Pib* ‡‡	*Pi1(t)* §§	*Pi2(t)* ¶¶	*Pi-d3 Cap1* †††	*Pi-d3 Cap2* ‡‡‡	*Pi54 indell* §§§	*Pi54 SSR*¶¶¶	*Pigm(t) C5483* ††††	*Pigm(t) S29742* ‡‡‡‡
1	S71	หนานหนัก (GS.no 10284)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	C	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R
2	S72	นางมา(GS.no 7414)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	C	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R
3	S73	เหนียวนาคราช (GS.no 9982)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	A	S	S	H	R	R	R	S	ns	R	R
4	S75	แมะแยง (GS.no 10060)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	ns	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R
5	S76	ดอกพวง (GS.no10062)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	A	S	S	H	S	R	R	S	S	R	R
6	S77	ขืนดิน(GS.no 4290)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	C	R	S	S	S	R	R	S	ns	R	R
7	S78	ดอกพิกุล (GS.no9754)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	B	S	S	S	S	R	R	S	ns	R	R
8	S79	ค้ำฉาง (GS.no 10243)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	B	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R
9	S80	สายบัว (GS.no 10346)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	A	R	S	S	S	R	R	S	S	R	S
10	S81	ช่อนิมิต (GS.no 10354)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	R	S	S	C	R	S	S	S	R	R	S	S	R	S
11	S82	ไร่ไทร (GS.no 11185)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	A	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R
12	S83	เบาชะมวง (GS.no 11211)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	B	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R
13	S84	ลูกขอ(GS.no 11148)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	ns	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R
14	S85	ซุกิกูลอง (GS.no 12704)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	ns	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R
15	S86	หลายอด (GS.no 12716)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	B	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R
16	S87	ลาเก๊ะงอ (GS.no 12717)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	C	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R
17	S88	นางทอง (GS.no 12731)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	A	S	S	R	S	R	R	S	ns	R	ns
18	S89	ลูกหวาย(จุด)(GS.no12736)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	A	R	S	S	S	R	R	S	S	R	ns
19	S90	ลูกดำ (GS.no 12737)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	A	S	S	R	S	R	R	S	S	R	R

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว	*pB8-Pi9*[†]	*NBS2-Pi9*[‡]	*Pi-d2*[§]	*Pi36*[¶]	*Pi-ta* ††	*Pib* ‡‡	*Pi1(t)* §§	*Pi2(t)* ¶¶	*Pi-d3 Cap1* †††	*Pi-d3 Cap2* ‡‡‡	*Pi54 indell* §§§	*Pi54 SSR*[¶¶¶]	*Pigm(t) C5483* ††††	*Pigm(t) S29742* ‡‡‡‡
20	S91	เชียงใหม่ (GS.no 12739)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	B	S	S	S	S	R	R	S	ns	R	R
21	S92	ลูกแดง (GS.no 12740)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	B	R	S	H	S	R	R	S	ns	R	R
22	S93	เล็บนกเบา (GS.no 12743)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	A	R	S	H	S	R	R	S	ns	R	R
23	S94	ช่อ (GS.no 12749)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	B	R	S	S	S	R	R	S	ns	R	R
24	S95	ช่อแดง(GS.no 12751)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	B	R	S	H	S	R	R	S	ns	R	R
25	S96	กูนิง (GS.no 12766)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	B	S	R	S	S	R	R	S	ns	R	R
26	S97	ดอกไม้ไทร (GS.no 12777)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	B	S	R	H	S	R	R	S	ns	R	R
27	S98	รวงทอง (GS.no 12779)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	A	R	S	H	S	R	R	S	ns	R	R
28	S99	ลูกปลา (GS.no 12788)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	B	S	S	S	S	R	R	S	ns	R	R
29	S100	นางกลายแดง (GS.no 12789)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	B	R	S	H	S	R	R	S	ns	R	R
30	S101	ลากอ (GS.no 12790)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	B	R	S	H	S	R	R	S	ns	R	R
31	S102	กูนิง (GS.no 12794)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	B	R	R	S	S	R	R	S	ns	R	R
32	S103	มือจระเข้(GS.no 12800)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	ns	R	R	S	S	R	R	S	ns	R	R
33	S104	ตุลาถัว (GS.no 12802)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	A	S	S	S	S	R	R	S	ns	R	ns
34	S105	หอม (GS.no 12817)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	A	S	S	S	S	R	R	S	ns	R	ns
35	S106	กือแซะดำ(GS.no 12821)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	B	S	S	S	S	R	R	S	ns	R	R
36	S107	ลือบูมาเซาะ (GS.no 12826)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	A	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R
37	S108	นางรอง (GS.no 12836)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	A	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R
38	S109	อีกู้ 3 (GS.no 12845)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	ns	R	S	S	S	R	R	S	S	R	ns
39	U38	งอเพือน	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	S	S	ns	S	R	H	R	R	R	R	ns	R	R
40	U39	ดยาหลี่	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	S	S	S	B	S	R	H	R	S	S	S	R	R	R
41	U41	ปือก่อ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	S	R	ns	B	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว	*pB8-Pi9*[†]	*NBS2-Pi9*[‡]	*Pi-d2*[§]	*Pi36*[¶]	*Pi-ta* ††	*Pib* ‡‡	*Pi1(t)* §§	*Pi2(t)* ¶¶	*Pi-d3 Cap1* †††	*Pi-d3 Cap2* ‡‡‡	*Pi54 indell* §§§	*Pi54 SSR*[¶¶¶]	*Pigm(t) C5483* ††††	*Pigm(t) S29742* ‡‡‡‡
42	U42	ปือเกษตร	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	ns	B	S	S	H	R	S	S	R	R	R	R
43	U43	เหนียวแสงมูเวอ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	ns	B	S	S	H	S	R	S	S	R	R	R
44	U44	กะเหรี่ยงขาว	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	S	R	B	S	S	H	R	R	R	S	R	R	R
45	U45	เหลืองหอม	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	S	B	S	S	H	S	S	S	R	R	ns	R
46	U46	จะนอไหน	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	S	S	B	S	R	H	S	S	S	R	R	S	S
47	U48	ลายชาน	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	S	S	B	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R
48	U49	ปิอิ แม่ละ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	S	B	S	R	H	S	S	S	S	S	R	R
49	U50	ห้วยแล้ง	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	R	B	S	S	H	S	R	R	R	S	R	R
50	U51	ปิอิ ซูแม่ฟาง	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	S	S	B	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S
51	U52	ข้าวกอแผ่	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	S	R	B	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R
52	U53	บือขอพอ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	ns	B	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R
53	U55	เหลืองลีซอ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	S	R	B	S	S	H	S	R	R	S	R	R	R
54	U56	ข้าวแดง(TRI 8409149)	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	S	B	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S
55	U57	ข้าวมันหมู	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	S	B	S	S	S	R	R	R	S	ns	R	S
56	U60	งอเชระ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	S	S	R	B	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R
57	U61	เหนียวกล่ำหอม แสงลีซอ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	S	B	S	S	R	ns	S	S	R	R	R	R
58	E100	พวงทอง	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	B	S	S	S	R	R	R	S	ns	R	R
59	E101	พวงมาลัย 31-5-6	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	R	B	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R
60	E102	พวงมาลัย 35-10-8	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	R	C	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R
61	E103	โพฉลอง 31-34-20	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R
62	E104	จำปาจีน 84-8-16	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	B	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R
63	E105	จำปาจีน 84-8-22	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	S	B	R	S	S	R	R	R	S	ns	R	ns

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว	*pB8-Pi9*[†]	*NBS2-Pi9*[‡]	*Pi-d2*[§]	*Pi36*[¶]	*Pi-ta* ††	*Pib* ‡‡	*Pi1(t)* §§	*Pi2(t)* ¶¶	*Pi-d3 Cap1* †††	*Pi-d3 Cap2* ‡‡‡	*Pi54 indell* §§§	*Pi54 SSR*[¶¶¶]	*Pigm(t) C5483* ††††	*Pigm(t) S29742* ‡‡‡‡
64	E106	สว่างอารมณ์ 84-4-118	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	B	S	S	S	R	ns	R	S	ns	R	S
65	E107	ข้าวเบาที่หนึ่ง 95-1-80	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	R	S	S	R	ns	R	S	R	R	R
66	E108	ไข่แมงดา 59-2-73	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	R	S	H	R	R	R	S	S	R	R
67	E109	ลอยใหญ่ 62-40-140	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	S	S	S	R	ns	R	S	ns	R	R
68	E110	เม็ดเล็กหนัก	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R
69	E111	พญาชม	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	B	S	S	S	R	ns	R	S	R	R	R
70	E112	เขียว	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	S	B	R	S	S	R	ns	R	S	ns	R	R
71	E113	ขาวปราจีน	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	S	C	S	S	S	R	ns	R	S	R	R	R
72	E114	เจ๊กกระโดด	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	R	S	S	R	ns	R	S	ns	R	ns
73	E115	รวงเดียว	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	S	S	S	R	ns	R	S	R	R	R
74	E116	เจ้าลอย	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	S	R	S	R	ns	R	S	ns	R	R
75	E117	เหลืองกล้วย	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	S	R	S	R	ns	R	S	ns	R	R
76	E118	คุณแม่	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	R	B	S	S	S	S	ns	R	S	ns	R	S
77	E119	ขาวยายคลี่	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	R	B	S	S	R	R	ns	R	S	ns	R	R
78	E120	ขาวเสมอ	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	S	R	S	R	ns	R	S	ns	R	R
79	E121	เหลืองพวงทอง	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	S	R	S	R	ns	R	S	ns	R	R
80	E122	เหลืองอนันต์	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	S	R	S	R	ns	R	S	ns	R	R
81	E123	ขาวลี้	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	S	R	S	R	ns	R	S	ns	R	R
82	E124	ขาวตาหยัด	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	C	S	R	S	R	ns	R	S	ns	R	R
83	E125	นางเขียว	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	S	R	S	R	ns	R	S	ns	R	R
84	E126	ลอยสายบัว	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	S	R	S	R	ns	R	S	ns	R	R
85	E127	นางเขียว	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	S	R	S	R	R	R	S	ns	R	R

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว	*pB8-Pi9*[†]	*NBS2-Pi9*[‡]	*Pi-d2*[§]	*Pi36*[¶]	*Pi-ta* ††	*Pib* ‡‡	*Pi1(t)* §§	*Pi2(t)* ¶¶	*Pi-d3 Cap1* †††	*Pi-d3 Cap2* ‡‡‡	*Pi54 indell* §§§	*Pi54 SSR*[¶¶¶]	*Pigm(t) C5483* ††††	*Pigm(t) S29742* ‡‡‡‡
86	E128	นางเขียว	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	S	R	S	R	R	R	S	ns	R	R
87	E129	เกวียนหัก	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	S	R	S	R	R	R	S	ns	R	R
88	E130	ขาวโพธิ์	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	S	R	S	R	R	R	S	ns	R	R
89	E131	สามพราน	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	B	S	S	S	R	R	R	S	ns	R	S
90	E132	เหนียวบายสี	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	S	R	S	S	R	R	S	ns	R	R
91	E133	เหลืองบังใบ	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	B	S	S	S	R	R	R	S	ns	R	S
92	E134	ขาวนครไชยศรี	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	S	R	S	R	R	R	S	ns	R	R
93	E135	เจ้าลอย	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	S	R	S	R	R	R	S	ns	R	R
94	E136	ข้าวลอย	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	S	R	S	R	R	R	S	ns	R	R
95	E137	ทานตะวัน	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	S	R	S	R	R	R	S	ns	R	R
96	E138	ขาวเศรษฐี	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	ns	S	S	S	S	R	R	S	ns	R	S
97	E139	สามรวง	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	S	ns	S	S	S	R	S	R	S	ns	R	S
98	E140	หอมทุ่ง	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	ns	R	R	S	S	S	R	S	ns	R	R
99	E141	หอมทุ่ง	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	S	B	S	S	S	R	S	R	S	ns	R	R
100	E142	ไอ้โหม่ง	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	B	S	S	S	R	R	R	S	ns	R	R
101	E143	พวงหนัก	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	B	R	S	S	R	S	S	S	ns	R	R
102	E144	พวงเงิน	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	A	S	S	S	R	S	S	S	ns	R	S
103	L1	เก้ารวง 17-2-106 (Gs.536)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R
104	L2	กู้เมือง (Gs.539)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	S	B	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R
105	L3	ขาวดอกมะลิ 41-1-173 (Gs.542)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	A	R	S	S	R	R	R	S	ns	R	S
106	L4	ขาวตาแห้ง 55-5-55 (Gs.546)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	B	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว	*pB8-Pi9*[†]	*NBS2-Pi9*[‡]	*Pi-d2*[§]	*Pi36*[¶]	*Pi-ta* ††	*Pib* ‡‡	*Pi1(t)* §§	*Pi2(t)* ¶¶	*Pi-d3 Cap1* †††	*Pi-d3 Cap2* ‡‡‡	*Pi54 indell* §§§	*Pi54 SSR*[¶¶¶]	*Pigm(t) C5483* ††††	*Pigm(t) S29742* ‡‡‡‡
107	L5	ขาวใหญ่ 33-22-61 (Gs.547)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	S	B	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R
108	L6	ขาวปากหม้อ 74 (Gs.548)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	B	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S
109	L7	หลุดหนี้ 75-3-2 (Gs.549)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	S	R	S	R	R	R	S	R	R	ns
110	L8	เม็ดใหญ่ 94-4-87 (Gs.550)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	R	S	S	R	R	R	S	R	R	ns
111	L9	ขาวพวง 74-3-38 (Gs.551)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	B	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S
112	L10	เจ้าหางหมูใหญ่ 32-27 (Gs.554)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	S	S	S	R	R	R	S	ns	R	R
113	L11	เจ้าหางหมูใหญ่ 32-27 (Gs.555)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	C	S	S	S	R	R	R	S	ns	R	ns
114	L12	เจ้าหอม 32-18-69 (Gs.556)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	C	S	R	S	R	R	R	S	ns	R	R
115	L13	ใบลด 36-10-90 (Gs.559)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	C	S	R	S	S	R	R	S	ns	R	R
116	L14	เจ้าเหลือง 27-3-19 (Gs.563)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	C	S	R	S	S	R	R	S	ns	R	R
117	L15	เจ้าเหลือง 27-3-91 (Gs.564)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R
118	L16	เจ้าแผ่ 31-28-1 (Gs.566)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	ns	S	S	S	S	R	R	S	ns	R	R
119	L17	ดอกมะลิ 109-1-119 (Gs.569)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	ns	S	S	S	S	R	R	S	ns	R	R
120	L18	ใบลด 36-19-40 (Gs.572)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R
121	L19	ใบลด 36-27-29 (Gs.573)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R
122	L20	รวงเดียว 68-10-85 (Gs.582)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	S	ns	R	R	S	R	R	R	S	ns	R	R
123	L21	เหลืองใหญ่ (Gs.584)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	S	S	S	R	R	R	S	ns	R	ns
124	L22	เหลืองเล็ก 30-1-57 (Gs.586)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	S	ns	S	S	S	R	R	R	S	ns	R	ns
125	L23	เหลืองนุน 6-4-102 (Gs.589)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	ns	B	S	S	S	ns	R	R	S	R	R	R
126	L24	บีเค 289 (Gs.591)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	B	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R
127	L25	บีเค 563 (Gs.592)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	R	C	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R
128	L26	ตี๋ 569 (Gs.593)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	R	S	S	R	R	R	S	R	R	ns

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว	*pB8-Pi9*[†]	*NBS2-Pi9*[‡]	*Pi-d2*[§]	*Pi36*[¶]	*Pi-ta* ††	*Pib* ‡‡	*Pi1(t)* §§	*Pi2(t)* ¶¶	*Pi-d3 Cap1* †††	*Pi-d3 Cap2* ‡‡‡	*Pi54 indell* §§§	*Pi54 SSR*[¶¶¶]	*Pigm(t) C5483* ††††	*Pigm(t) S29742* ‡‡‡‡
129	L27	ขี้ตม 222-24-72 (Gs.595)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	R	S	S	R	R	R	S	R	R	ns
130	L28	ขี้ตมใหญ่ 35-16-45 (Gs.596)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R
131	L29	ขี้ตมขาว 222-42-3 (Gs.597)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	C	S	S	S	R	S	S	S	ns	R	S
132	L30	ขี้ตมขาว 222-42-5 (Gs.598)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	B	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R
133	L31	งันดง 34-3-95 (Gs.599)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	S	S	S	ns	ns	R	S	ns	R	R
134	L32	ดอดอกพร้าว 48-3-123 (Gs.601)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	C	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S
135	L33	ขี้ตมหอม (Gs.2720)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	R	C	R	S	S	ns	S	S	S	S	R	S
136	L34	เหนียวดำ (Gs.2723)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	A	R	S	S	ns	ns	R	S	ns	R	R
137	L35	ดอป้องแอ้ว (Gs.2725)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R
138	L36	ดอกดู่ (Gs.2872)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	ns	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R
139	L37	ทอง (Gs.2942)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R
140	L38	มันเป็ด (Gs.2943)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	B	S	R	S	R	R	R	S	ns	R	R
141	L39	ขาว (Gs.3356)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	S	ns	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R
142	L40	นางนวล (Gs.3357)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	R	ns	R	S	H	R	R	R	S	ns	R	S
143	L41	ขาวกรุง (Gs.3358)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	ns	C	R	S	H	S	R	R	S	R	R	R
144	L42	เหนียวแดง (Gs.3360)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	ns	S	S	S	R	R	R	S	ns	R	R
145	L43	ขาว (Gs.3361)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R
146	L44	ดอขาว (Gs.3363)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	R	ns	S	S	S	R	R	R	S	S	R	S
147	L45	เหลืองบุญมา (Gs.3364)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	A	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R
148	L46	หมากแข็ง (Gs.3365)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	R	B	S	S	S	ns	R	R	S	R	R	R
149	L47	ขาวเศรษฐี	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	C	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R
150	L48	เหนียวนางนวล (Gs.3367)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	R	S	S	R	S	R	S	ns	R	R

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว	*pB8-Pi9*[†]	*NBS2-Pi9*[‡]	*Pi-d2*[§]	*Pi36*[¶]	*Pi-ta* ††	*Pib* ‡‡	*Pi1(t)* §§	*Pi2(t)* ¶¶	*Pi-d3 Cap1* †††	*Pi-d3 Cap2* ‡‡‡	*Pi54 indell* §§§	*Pi54 SSR*[¶¶¶]	*Pigm(t) C5483* ††††	*Pigm(t) S29742* ‡‡‡‡
151	L49	ดออ่าง (Gs.3368)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	ns	S	R	S	R	S	R	S	ns	R	R
152	L50	ข้าวก่ำ (Gs.3369)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	R	C	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S
153	L51	ป้องแอ้ว (Gs.3370)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	B	S	R	S	R	R	R	S	ns	R	R
154	L52	อีปง (Gs.3372)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	R	B	R	R	H	R	R	R	S	ns	R	S
155	L53	นางนวล (Gs.3373)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	R	ns	R	R	S	R	ns	R	S	ns	R	S
156	L54	แม่ห้าง (Gs.3374)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	R	R	S	R	R	R	S	ns	R	R
157	L55	พานทอง (Gs.3375)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	R	R	S	R	R	R	S	ns	R	R
158	L56	อีปี๊ด (Gs.3376)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	C	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R
159	L57	ดอสามเดือน (Gs.3377)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	B	S	R	S	R	R	R	S	ns	R	S
160	L58	ข้าวปน (Gs.3378)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	B	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S
161	L59	อีโตน (Gs.3379)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R
162	L60	นางนวล (Gs.3380)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	ns	R	B	S	S	ns	ns	R	R	S	ns	R	R
163	L61	ดวงจันทร์ (Gs.3382)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	S	R	S	S	R	R	S	ns	R	R
164	L62	ปลาแข็ง (Gs.3384)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R
165	L63	เป็ดน้ำ (Gs.3385)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R
166	L64	พันธุ์หลัก (Gs.3386)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	S	S	S	R	R	R	S	ns	R	R
167	L65	ข้าวหาง (Gs.3387)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	S	R	R	R	ns	R	S	ns	R	R
168	L66	สามเดือน (Gs.3892)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	S	ns	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R
169	L67	ป้องแอ้ว 1(Gs.3893)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	S	C	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R
170	L68	ป้องแอ้ว 2 (Gs.3894)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	R	B	S	R	S	R	R	R	S	S	R	ns
171	L69	ป้องแอ้ว (Gs.3895)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	A	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S
172	L70	มะปราง (Gs.3897)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	S	C	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว	*pB8-Pi9*[†]	*NBS2-Pi9*[‡]	*Pi-d2*[§]	*Pi36*[¶]	*Pi-ta* ††	*Pib* ‡‡	*Pi1(t)* §§	*Pi2(t)* ¶¶	*Pi-d3 Cap1* †††	*Pi-d3 Cap2* ‡‡‡	*Pi54 indell* §§§	*Pi54 SSR*[¶¶¶]	*Pigm(t) C5483* ††††	*Pigm(t) S29742* ‡‡‡‡
173	L71	นางคำผาย (Gs.4373)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	S	R	S	R	R	R	S	ns	R	R
174	L72	ขาวใหญ่ (Gs.4375)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	S	B	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R
175	L73	โอล่อน (Gs.4377)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	B	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S
176	L74	ข้าวหอม (Gs.4809)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	R	R	S	R	ns	R	S	S	R	R
177	L75	ข้าวหอม (Gs.4810)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	S	R	S	R	R	R	S	R	R	ns
178	L76	ข้าวหอม (Gs.4814)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	ns	B	S	R	S	S	R	R	S	R	R	R
179	L77	ข้าวหอม (Gs.4815)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	S	R	S	R	R	R	S	R	R	ns
180	L78	ข้าวหอม (Gs.4816)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	R	R	S	R	R	R	S	R	R	ns
181	L79	ข้าวหอม (Gs.4817)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	ns	C	R	R	S	R	R	R	S	R	R	ns
182	L80	ข้าวหอม (Gs.4818)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	S	C	S	R	S	ns	R	R	S	S	R	R
183	L81	ข้าวหอม (Gs.4829)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	B	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R
184	L82	ข้าวหอม (Gs.4831)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	B	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S
185	L83	ข้าวหอม (Gs.4832)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	ns	C	S	R	S	R	R	R	S	S	R	R
186	L84	ข้าวหอม (Gs.4833)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	ns	C	R	S	H	S	R	R	S	ns	R	R
187	L85	ข้าวหอม (Gs.4834)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	S	B	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R
188	L86	ข้าวหอม (Gs.4835)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	C	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R
189	L87	ข้าวหอม (Gs.4869)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	ns	S	S	S	R	S	R	S	ns	R	R
190	L88	ข้าวหอม (Gs.4870)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	S	C	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R
191	L89	กะทิ (Gs.5565)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	B	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R
192	L90	ข้าวดอ (Gs.5566)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	ns	B	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R
193	L91	ดอเหลือง (GS.5567)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	R	B	S	R	S	R	R	R	S	ns	R	R

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว	*pB8-Pi9*[†]	*NBS2-Pi9*[‡]	*Pi-d2*[§]	*Pi36*[¶]	*Pi-ta* ††	*Pib* ‡‡	*Pi1(t)* §§	*Pi2(t)* ¶¶	*Pi-d3 Cap1* †††	*Pi-d3 Cap2* ‡‡‡	*Pi54 indell* §§§	*Pi54 SSR*[¶¶¶]	*Pigm(t) C5483* ††††	*Pigm(t) S29742* ‡‡‡‡
194	L92	เจ้าขาว (Gs.5572)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	S	B	S	S	S	R	R	R	S	ns	R	S
195	L93	ขาวใหญ่ (Gs.5573)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	R	ns	S	S	ns	R	R	R	S	S	R	R
196	L94	เหลือง (Gs.13232)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	B	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S
197	L95	กระดูกเสือ (Gs.13233)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	S	B	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S
198	L96	หอมมะลิ (Gs.18418)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	R	C	R	S	H	R	R	R	S	S	R	ns
199	L97	หอมมะลิ (Gs.18419)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	S	R	R	C	R	R	H	R	R	R	S	S	R	ns
200	L98	หอมมะลิ (Gs.18420)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	R	C	S	R	S	R	R	R	S	ns	R	R
201	L99	หอมมะลิ (Gs.19398)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	R	C	S	R	S	S	R	R	S	R	R	S

หมายเหตุ

Pi9[†] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pi9* ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้ หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ pB8 ที่จำเพาะกับยีน *Pi9* ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 500 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi9*

NBS2-Pi9[‡] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย NBS2-Pi9-195-1 ที่จำเพาะกับยีน *Pi9* ทำให้ได้ PCR product ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 2,000 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* โดยไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 2,000 bp

Pi-d2[§] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* สามารถตัดลำดับนิวคลีโทด์ของ PCR product ของตัวอย่างพันธุ์ข้าวได้ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-d2* ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 700 และ 400 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* ไม่สามารถตัดลำดับนิวคลีโทด์ของ PCR product ของตัวอย่างพันธุ์ข้าว ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-d2* ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1100 bp

Pi36[¶] A หมายถึง แอลลีล A ของยีน *Pi36* ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS สำหรับยีนต้านทาน *Pi36* แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 100 400 และ 800 bp

B หมายถึง แอลลีล B ของยีน *Pi36* ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS สำหรับยีนต้านทาน *Pi36* แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 100 200 และ 800 bp

C หมายถึง แอลลีล S (susceptible) ของยีน *Pi36* ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS สำหรับยีนต้านทาน *Pi36* แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinfl* ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 100 และ 800 bp

Pi-ta[††] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pi-ta* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-ta* ทำให้ได้ PCR product ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 1,042 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-ta* โดยไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1,042 bp

Pib[‡‡] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pib* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pib* ทำให้ได้ PCR product ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 365 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pib* โดยไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 365 bp

Pi1(t)[§§] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pi1(t)* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในข้าวสายพันธุ์ต้านทาน C101LAC

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi1(t)* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในข้าวสายพันธุ์อ่อนแอ C101A51 (175 bp)

H หมายถึง แอลลีล heterozygous ของยีน *Pi1(t)* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอRM1233 ได้แถบดีเอ็นอที่ปรากฏแอลลีล A และ B

ns หมายถึง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

Pi2(t)[¶¶] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR140 แล้วจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในข้าวสายพันธุ์ต้านทาน near isogenic line C101A51

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR140 และจะปรากฏแถบดีเอ็นเอตรงกับข้าวพันธุ์อ่อนแอ CO39 ซึ่งมีขนาดประมาณ 115 bp

H หมายถึง แอลลีล heterozygous ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR140 ได้ PCR product ที่เป็นแอลลีล A และ B

ns หมายถึง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

Pi-d3 Cap1[†††] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pi-d3* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-d3* และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xbal* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 178 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d3* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-d3* และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xbal* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 158 และ 20 bp

ns หมายถึง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

Pi-d3Cap2[‡‡‡] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pi-d3* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-2 และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 178 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d3* ภายหลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pid3-dCAPS-2 และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 153 bp

Pi54 indel [§§§] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* หลังจากการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54MAS ที่จำเพาะกับยีน *Pi54* ทำให้ได้ PCR product ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 216 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi54* โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 359 bp

Pi54 SSR[¶¶¶] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM206 แล้วจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 300 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM206 และจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด ประมาณ 500 bp

H หมายถึง แอลลีลที่เป็น heterozygous ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM206 ได้ PCR product ที่เป็นแอลลีล A และ B

ns หมายถึง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

Pigm(t) C5483[††††] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pigm(t)* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ CAP marker C5483 แล้วนำ PCR product มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 468 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pigm(t)* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ CAP marker C5483 แล้วนำ PCR product มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 และ100 bp

ns หมายถึง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

Pigm(t) S29742[‡‡‡‡] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ภายหลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ Indel marker S29742 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 555 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ภายหลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ Indel marker S29742 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 461 bp

ns หมายถึง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

ตารางที่ 28 การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* , *Pib*, *Pi1(t)*, *Pi9* และ *Pi2*(t) ที่พบในข้าวป่า

ลำดับ	พันธุ์ข้าว	แหล่งที่มา	*Pi-ta*[¶]	*Pib*[††]	*Pi1(t)*[‡‡]	*Pi2*(t)[§§]	*NBS2-Pi9*[¶]
1	*O. nivara (No.2)*	บ.นาโพธิ์ อ.กุสุมาลย์ จ.สกลนคร	S	S	S	S	S
2	*O. nivara (No.3)*	บ.โนนซมภู ต.กุรุคุ อ.เมือง จ.สกลนคร	S	S	S	R	S
3	*O. nivara (No.4)*	บ.โพนทา ต.กุดตาไก้ อ.ปลาปาก จ.นครพนม	S	S	S	R	S
4	*O. nivara (No.5)*	บ.นาขาม ต.ปลาปาก อ.ปลาปาก จ.นครพนม	S	S	S	R	S
5	*O. nivara (No.6)*	บ.หนองฮี ต.หนองฮี 6อ.ปลาปาก จ.นครพนม	R	S	S	R	S
6	*O. nivara (No.7)*	บ.ทุ่งตะวัน ต.นาเลียง อ.นาแก จ.นครพนม	S	S	H	R	R
7	*O. nivara (No.8)*	บ.นาเหนือ ต.พระซอง อ.นาแก จ.นครพนม	S	S	S	R	S
8	*O. nivara (No.9)*	บ.หนองบ่อ ต.หนองบ่อ อ.นาแก จ.นครพนม	S	S	S	H	S
9	*O. nivara (No.10)*	บ.นาอ้อย ต.งิ้วด่อน อ.เมือง จ.สกลนคร	S	S	S	R	S
10	*O. rufipogon (No.11)*	บ.ป่าหว้า ต.เชียงเครือ อ.เมือง จ.สกลนคร	S	S	H	R	R
11	*O. rufipogon (No.12)*	บ.หนองเบ็น ต.ไฮหย่อง อ.พังโคน จ.สกลนคร	S	S	S	S	S
12	*O. rufipogon (No.14)*	บ.แร่ ต.แร่ อ.พังโคน จ.สกลนคร	S	S	H	S	R
13	*O. nivara (No.15)*	บ.ปลาไหล อ.วาริชภูมิ จ.สกลนคร	S	S	S	R	S
14	*O. nivara (No.16)*	บ.หนองพุกาม ต.คำบ่อ อ.วาริชภูมิ จ.สกลนคร	S	S	S	S	S
15	*O. nivara (No.17)*	บ.หนองบัว ต.ธาตุเชิงชม อ.เมือง จ.สกลนคร	S	S	ns	ns	S
16	*O. rufipogon (No.18)*	แปลงอนุรักษ์ศูนย์วิจัยข้าวสกลนคร	S	S	S	R	R

หมายเหตุ

Pi-ta[¶] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pi-ta* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-ta* ทำให้ได้ PCR product ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 1,042 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-ta* โดยไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1,042 bp

Pib[††] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pib* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pib* ทำให้ได้ PCR product ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 365 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pib* โดยไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 365 bp

Pi1(t)[‡‡] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pi1(t)* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในข้าวสายพันธุ์ต้านทาน C101LAC

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi1(t)* ภายหลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM1233 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในข้าวสายพันธุ์อ่อนแอ C101A51 (175 bp)

H หมายถึง แอลลีล heterozygous ของยีน *Pi1(t)* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่RM1233 ได้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแอลลีล A และ B

ns หมายถึง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

Pi2(t)[§§] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2*(t) ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR140 แล้วจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในข้าวสายพันธุ์ต้านทาน near isogenic line C101A51

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR140 และจะปรากฏแถบดีเอ็นเอตรงกับข้าวพันธุ์อ่อนแอ CO39 ซึ่งมีขนาดประมาณ 115 bp

H หมายถึง แอลลีล heterozygous ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR140 ได้ PCR product ที่เป็นแอลลีล A และ B

ns หมายถึง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

NBS2-Pi9[¶¶] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ NBS2-Pi9-195-1 ที่จำเพาะกับยีน *Pi9* ทำให้ได้ PCR product ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 2,000 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi9* โดยไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 2,000 bp

ตารางที่ 29 การกระจายตัวของแอลลีลของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* , *Pib*, *Pi1(t)*, *Pi2*, *Pi-d3*, *Pi54*, *Pi9* และ *Pigm(t)* ที่พบในข้าวพันธุ์ปรับปรุงต้านทานโรคไหม้

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	*Pi-ta*[†]	*Pib*[‡]	*Pi1(t)*[§]	*Pi2(t)*[¶]	*Pi-d3 Cap1*[††]	*Pi-d3 Cap2*[‡‡]	*Pi54 indel*[§§]	*Pi54 SSR*[¶¶]	*Pigm(t) C5483*[†††]	*Pigm(t) S29742*[‡‡‡]	*NBS2-Pi9*[§§§]
1	B1	สันป่าตอง 1	S	R	H	R	R	R	S	ns	ns	S	S
2	B2	สุพรรณบุรี 60	R	S	ns	R	S	S	S	ns	ns	S	S
3	B3	เหนียวอุบล 2	S	R	ns	R	R	R	S	ns	ns	R	R
4	B4	JHN	S	S	H	R	S	S	S	R	R	ns	S
5	B5	CT9933	R	S	S	S	S	S	S	ns	S	ns	S
6	B6	C101 LAC	S	S	R	S	ns	ns	ns	ns	ns	ns	S
7	B7	กข 10	S	R	H	R	R	R	R	ns	R	R	S
8	B8	สุพรรณบุรี 1	R	S	H	R	S	R	S	ns	ns	S	S
9	B9	C101TTP	S	S	R	S	R	R	S	ns	R	R	S
10	B10	HY 71	S	S	S	R	ns	ns	ns	ns	ns	ns	S
11	B11	C104 LAC	S	S	S	S	ns	ns	ns	ns	ns	ns	R
12	B12	C104 PKT	R	S	S	S	R	R	S	ns	R	S	S
13	B13	C105 TTP	R	R	S	S	S	S	R	ns	R	S	S
14	B14	C101 PKT	R	S	S	S	R	R	R	ns	R	S	S
15	B15	ชัยนาท 1	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R
16	B16	IR64	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	S
17	B17	C039	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์ข้าว	*Pi-ta*[†]	*Pib*[‡]	*Pi1(t)*[§]	*Pi2(t)*[¶]	*Pi-d3 Cap1*[††]	*Pi-d3 Cap2*[‡‡]	*Pi54 indel*[§§]	*Pi54 SSR*[¶¶]	*Pigm(t) C5483*[†††]	*Pigm(t) S29742*[‡‡‡]	*NBS2-Pi9*[§§§]
18	B18	ปราจีนบุรี 2	S	S	H	R	R	R	R	ns	R	R	S
19	B19	C102PKT	R	S	H	S	R	R	R	ns	R	S	S
20	B20	ปทุมธานี 1	S	S	S	R	R	R	S	ns	ns	R	S
21	B21	AZUCENA	R	S	H	S	S	S	S	ns	R	ns	S
22	B22	C103TTP	S	S	H	S	ns	R	S	R	R	R	S
23	B23	C101ASI	S	S	S	R	R	R	S	ns	R	R	S
24	B24	กข 33	R	S	H	R	R	R	S	ns	R	R	S

หมายเหตุ

Pi-ta[†] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pi-ta* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-ta* ทำให้ได้ PCR product ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 1,042 bp
S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-ta* โดยไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1,042 bp

Pib[‡] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pib* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pib* ทำให้ได้ PCR product ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 365 bp
S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ของยีน *Pib* โดยไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 365 bp

Pi1(t)[§] A หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pi1(t)* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย RM1233 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในข้าวสายพันธุ์ต้านทาน C101LAC
B หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi1(t)* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย RM1233 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในข้าวสายพันธุ์อ่อนแอ C101A51 (175 bp)
H หมายถึง แสดง heterozygous allele ของยีน *Pi1(t)* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย RM1233 ได้แถบดีเอ็นอที่ปรากฏแอลลีล A และ B
ns หมายถึง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

Pi2(t)[¶] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย SSR140 แล้วจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในข้าวสายพันธุ์ต้านทาน near isogenic line C101A51
S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย SSR140 และจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 115 bp ตรงกับข้าวพันธุ์อ่อนแอ CO39

H หมายถึง แอลลีล heterozygous ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย SSR140 ได้ PCR product ที่เป็นแอลลีล A และ B

ns หมายถึง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

Pi-d3 Cap1[††] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pi-d3* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-d3* และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 178 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d3* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-d3* และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 158 และ 20 bp

ns หมายถึง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

Pi-d3 Cap2[‡‡] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pi-d3* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย Pid3-dCAPS-2 และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 178 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d3* ภายหลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย Pid3-dCAPS-2 และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 153 bp

Pi54 indel[§§] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย Pi54MAS ทำให้ได้ PCR product ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 216 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi54* โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 359 bp

Pi54 SSR[¶¶] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย RM206 แล้วจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 300 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย RM206 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด ประมาณ 500 bp

ns หมายถึง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

Pigm(t) C5483[†††] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีน *Pigm*(t) ภายหลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ CAP marker C5483 แล้วนำ PCR product มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 468 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pigm(t)* หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ CAP marker C5483 แล้วนำ PCR product มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 300 และ100 bp

ns หมายถึง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

Pigm(t) S29742[‡‡‡] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* ภายหลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ Indel marker S29742 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 555 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm*(t) ภายหลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ Indel marker S29742 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 461 bp

ns หมายถึง ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

NBS2-Pi9[§§§] R หมายถึง แอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย NBS2-Pi9-195-1 ที่จำเพาะกับยีน *Pi9* ทำให้ได้ PCR product ที่มีแถบดีเอ็นเอขนาด 2,000 bp

S หมายถึง แอลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi9* โดยไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 2,000 bp

จากการตรวจค้นจีโนมข้าวพื้นเมืองไทย 201 พันธุ์ เพื่อค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ จำนวน 10 ยีน ประกอบด้วยยีน *Pi9, Pi-d2, Pi36, Pi-ta, Pib, Pi1(t), Pid3, Pi2(t), Pi54, และ Pigm(t)* ในพันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 38 พันธุ์ ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 19 พันธุ์ และ พันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 144 พันธุ์ พบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทยจำนวนมาก (ตารางที่ 30 และ ภาพที่ 35 และ 36) จากการศึกษา พบว่า ข้าวพื้นเมืองส่วนใหญ่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* มากที่สุด จำนวน 198 พันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 98.51 ของข้าวพื้นเมืองทั้งหมด รองลงมาคือยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3, Pi-d2, Pi2(t), Pi36, Pib, Pi9, Pi-ta, Pi1(t)* และ *Pi54* จำนวน 155, 137, 131, 120, 75, 57, 57, 36 และ 10 พันธุ์ ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 77.11, 68.16, 65.17, 59.70, 37.31, 28.36, 28.36, 17.91 และ 4.98 ของข้าวพื้นเมืองที่ทำการศึกษาทั้งหมด ตามลำดับ

เมื่อศึกษาการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองภาคต่างๆเปรียบเทียบเป็นร้อยละกับจำนวนพันธุ์ข้าวพื้นเมืองจากแต่ละภาคของประเทศที่นำมาตรวจสอบ พบว่า ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือมียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t), Pi36, Pi9,* และ *Pi54* มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 94.74, 84.21, 52.63, และ 52.63 ของข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือที่ทำการศึกษา ตามลำดับ ส่วนข้าวพื้นเมืองภาคอีสานพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t), Pi2Pib,* และ มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 100.00, 84.72, และ 42.36 ของข้าวพื้นเมืองภาคอีสานที่ทำการศึกษาตามลำดับ และ ข้าวพื้นเมืองภาคใต้พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3,* และ *Pigm(t)* ในทุกพันธุ์ที่ทำการตรวจสอบ และพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* และ *Pita* รองลงมา คิดเป็นร้อยละ 97.37 และ 50.00 ของข้าวพื้นเมืองภาคใต้ที่ทำการศึกษา ตามลำดับ

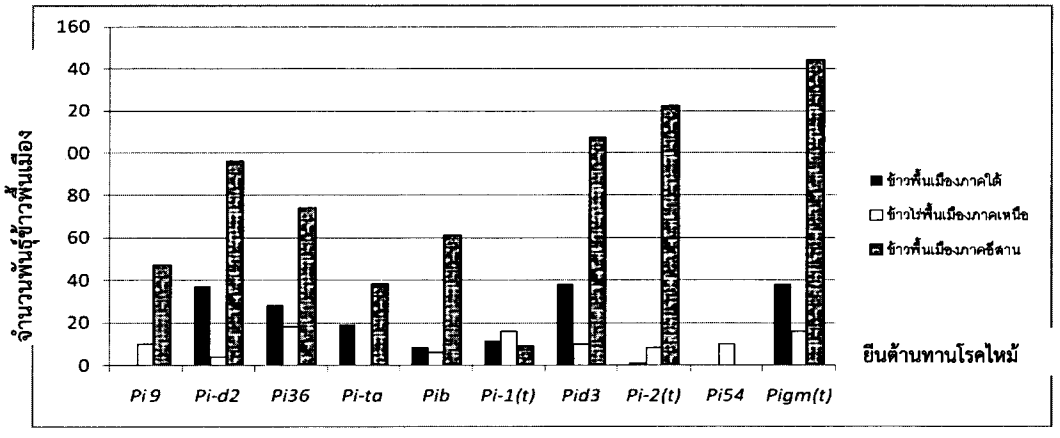
เมื่อพิจารณาแต่ละยีน เช่น การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ในข้าวพื้นเมือง 201 พันธุ์ พบว่าข้าวพื้นเมืองมียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* จำนวน 57 พันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 28.36 ของข้าวพื้นเมืองที่ทดสอบทั้งหมด 201 พันธุ์ (ตารางที่ 30) โดยพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* มากในข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 47 พันธุ์ รองลงมาคือข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 10 พันธุ์ แต่ไม่พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ในข้าวพื้นเมืองภาคใต้ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่นำมาตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้จากแต่ละภาคของประเทศมีจำนวนไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงพิจารณาเปรียบเทียบยีนต้านทานโรคไหม้ที่พบในภาคต่างๆ เป็นร้อยละของยีนต้านทานโรคไหม้ที่ตรวจพบจากจำนวนข้าวพื้นเมืองที่ทำการตรวจสอบจากภาคนั้นๆ พบว่า ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* พบมากที่สุดในข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ คิดเป็นร้อยละ 52.63 (จากการตรวจสอบข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ 19 พันธุ์ พบว่า ข้าวไร่ 10 พันธุ์ มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9*) รองลงมาคือข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน คิดเป็นร้อยละ 32.64 (ข้าวพื้นเมืองอีสาน 144 พันธุ์ พบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมือง จำนวน 47 พันธุ์) จากการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบยีน *Pi9* ในข้าวพื้นเมืองภาคใต้ (ตารางที่ 30)

ในภาพรวมของผลการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ 10 ยีน ในข้าวพื้นเมืองครั้งนี้ พบว่า ข้าวพื้นเมืองอีสาน พันธุ์อีปง (Gs.3372) เป็นพันธุ์ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ที่ทำการตรวจค้นมากที่สุด โดยพบยีนต้านทานโรคไหม้จำนวน 9 ยีน ได้แก่ *Pi1(t), Pi2, Pi9, Pi36, Pi-d2, Pi-d3, Pi-ta, Pib* และ*Pigm(t)* รองลงมาได้แก่พันธุ์ หอมมะลิ (Gs.18419; L97) มียีนต้านทานโรคไหม้ จำนวน 8 ยีน ได้แก่ *Pi9, Pi-d2, Pi-ta, Pib, Pi1(t), Pi2(t), Pi-d3* และ *Pigm(t)* และมีพันธุ์ข้าวพื้นเมืองอีกหลายพันธุ์ที่พบยีนต้านทานโรคไหม้ที่ตรวจสอบครั้งนี้ถึง 7 ยีน ได้แก่ พันธุ์ห้วยแล้ง (U50) [ยีน *Pi1(t), Pi9, Pi36, Pi-d2, Pi-d3, Pi54* และ *Pigm(t)*] พันธุ์ขี้ตมขาว 222-42-5 (Gs.598; L30) *[*ยีน *Pi9, Pi-d2, Pi36, Pi-ta, Pi2(t), Pi-d3* และ *Pigm(t)*] , พันธุ์พานทอง (Gs.3375; L55) [ยีน *Pi-d2, Pi36, Pi-ta, Pib, Pi2(t),Pi-d3* และ *Pigm(t)*] , พันธุ์ข้าวหอม (Gs.4829; L81) [ยีน *Pi9, Pi-d2, Pi36, Pib, Pi2(t), Pi-d3* และ *Pigm(t)*] และพันธุ์กะทิ (Gs.5565; L89) [ยีน *Pi9, Pi36, Pi-ta, Pib, Pi2(t), Pi-d3* และ *Pigm(t)*] เป็นต้น ซึ่งพันธุ์พื้นเมืองดังกล่าวเป็นข้าวพื้นเมืองจากภาคอีสาน

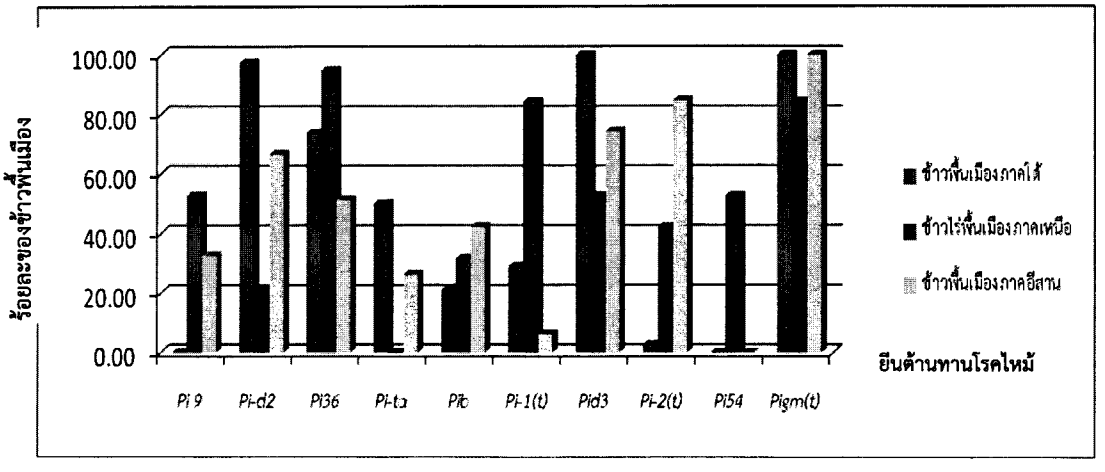
อย่างไรก็ตาม จากการตรวจสอบจีโนมข้าวพื้นเมืองครั้งนี้ ไม่พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* และ ยีน *Pi54* ในข้าวพื้นเมืองภาคใต้ ส่วนในข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือที่นำมาตรวจสอบนั้นไม่พบยีน *Pita* และ ไม่พบยีน *Pi54* ในข้าวพื้นเมืองภาคอีสานที่นำมาตรวจสอบ

ผลจากการตรวจค้นจีโนมข้าวพื้นเมือง 201 พันธุ์ พบยีนต้านทานโรคไหม้แต่ละยีนในข้าวพื้นเมืองมากที่สุด ดังนี้

- ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* พบมากที่สุดในข้าวพื้นเมืองอีสาน (47 พันธุ์)
- ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2* พบมากที่สุดในข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน (96 พันธุ์)
- ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pita* พบมากที่สุดในข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน (38 พันธุ์)
- ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pib* พบมากที่สุดในข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน (61 พันธุ์)
- ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* พบมากที่สุดในข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน (107 พันธุ์)
- ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* พบมากที่สุดในข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ (10 พันธุ์)
- ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* พบมากที่สุดในข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน (144 พันธุ์)
- ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36* พบมากที่สุดในข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน (74 พันธุ์)
- ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t)* พบมากที่สุดในข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ (16 พันธุ์)
- ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2(t)* พบมากที่สุดในข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน (122 พันธุ์)



ภาพที่ 35 แสดงการกระจายตัวของจำนวนยีนต้านทานโรคไหม้ที่พบในข้าวพื้นเมือง แยกตามแหล่งที่มาของข้าวพื้นเมือง ประกอบด้วยยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9, Pi-d2, Pi36, Pi-ta, Pib, Pi1(t), Pid3, Pi2(t), Pi54,และ Pigm(t)*



ภาพที่ 36 แสดงการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ (เปรียบเทียบเป็นร้อยละจากจำนวนพันธุ์ข้าวพื้นเมืองจากภาคต่างๆ) แยกตามแหล่งที่มาของข้าวพื้นเมือง ประกอบด้วยยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9,Pi-d2, Pi36, Pi-ta, Pib, Pi1(t), Pid3, Pi2(t), Pi54 และ Pigm(t)*

ตารางที่ 30 สรุปการตรวจค้นจีโนมข้าวพื้นเมืองเพื่อหายีนต้านทานโรคไหม้ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ แสดงจำนวนพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9, Pi-d2, Pi36, Pi-ta, Pib, Pi1(t), Pid3, Pi2(t), Pi54 และ Pigm(t)* แยกตามแหล่งที่มาของข้าวพื้นเมืองจากภาคต่างๆของไทย และ เปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของข้าวพื้นเมืองจากภาคต่างๆที่มียีนดังกล่าว (ตัวเลขในวงเล็บ)

ประเภท	จำนวน	*Pi 9*	*Pi-d2*	*Pi36*	*Pi-ta*	*Pibdom*	*Pi1(t)*	*Pid3*	*Pi2(t)*	*Pi54*	*Pigm(t)*
		NBS2-Pi9	Pi-d2	R36STS	Pi-ta	Pib	RM1233	id3-dCAPS-1	SSR140	Pi54 indel	C5483
ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	38	0 (0.00%)	37 (97.37%)	28 (73.68%)	19 (50.00%)	8 (21.05%)	11 (28.95%)	38 (100.00%)	1 (2.63%)	0 (0.00%)	38 (100%)
ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	19	10 (52.63%)	4 (21.05%)	18 (94.74%)	0 (0.00%)	6 (31.58%)	16 (84.21%)	10 (52.63%)	8 (42.11%)	10 (52.63%)	16 (84.21%)
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	144	47 (32.64%)	96 (66.67%)	74 (51.39%)	38 (26.39%)	61 (42.36%)	9 (6.25%)	107 (74.31%)	122 (84.72%)	0 (0.00%)	144 (100%)
รวม	201	57 (28.36%)	137 (68.16%)	120 (59.70%)	57 (28.36%)	75 (37.31%)	36 (17.91%)	155 (77.11%)	131 (65.17%)	10 (4.98%)	198 (98.51%)

4. การศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

4.1. รวบรวมสายพันธุ์เชื้อราโรคใบไหม้สายพันธุ์ต่างๆ ที่พบในประเทศไทย

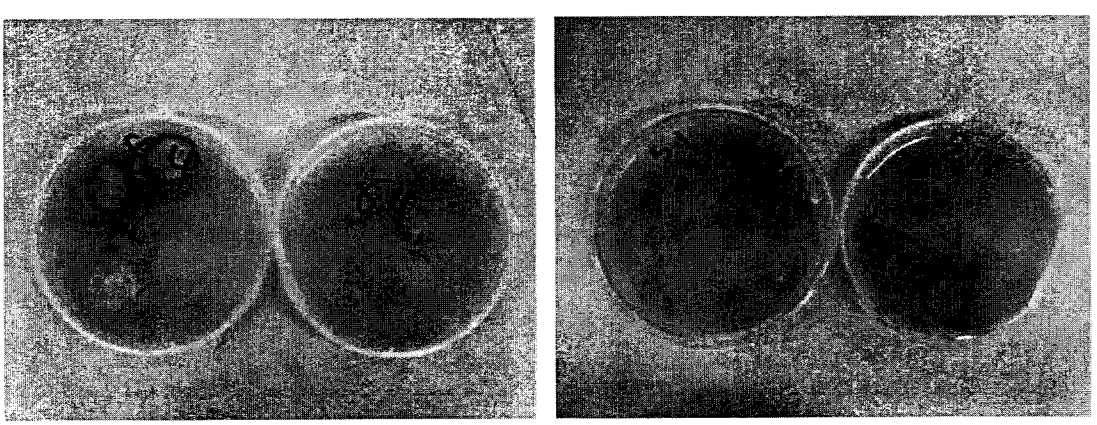
รวบรวมตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ *M. grisea* จากท้องที่ปลูกข้าวบริเวณต่างๆในประเทศไทย ได้ จำนวน 10 ไอโซเลท (ตารางที่ 31) และได้รับการอนุเคราะห์เชื้อราโรคไหม้ จาก ดร.ธานี ศรีวงศ์ชัย ภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาเกษตรศาสตร์ เป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงและก่อให้เกิดโรคไหม้ในข้าวในประเทศไทย จำนวน 8 ไอโซเลท (ตารางที่ 32)

ตารางที่ 31 แสดงสายพันธุ์ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมจากท้องที่ปลูกข้าวต่างๆในประเทศไทย พ.ศ. 2553 จำนวน 10 ไอโซเลท

ลำดับที่	รหัส	แหล่งที่มา
1	3.2	จ.พิษณุโลก
2	5.1	จ.ขอนแก่น
3	8.4	จ.อุบลราชธานี
4	9.4	จ.เชียงราย
5	12.5	จ.หนองคาย
6	14.3	จ.หนองคาย
7	16.2	จ.อุดรธานี
8	22.1	จ.อุดรธานี
9	17.2	จ.ชัยภูมิ
10	29.2	จ.อุดรธานี

ตารางที่ 32 รายชื่อเชื้อราโรคใบไหม้ *M .grisea* ที่ได้รับการอนุเคราะห์ จาก ดร.ธานี ศรีวงศ์ชัย ที่เก็บรวบรวมจากแหล่งปลูกข้าวต่างๆในประเทศไทยในปี 2553

ลำดับที่	ชื่อสายพันธุ์เชื้อรา	สถานที่เก็บ
1	BAG1.4	จ.พิษณุโลก
2	BAG2.4	จ.อุบลราชธานี
3	BAG3.5	จ.พิษณุโลก
4	BAG4.4	บ.น้ำดำ จ.พิษณุโลก
5	BAG5.4	อ.เมือง จ.ขอนแก่น
6	BAG7.2	บ.น้ำดำ จ.พิษณุโลก
7	BAG8.5	จ.อุบลราชธานี
8	BAG9.2	จ.เชียงราย



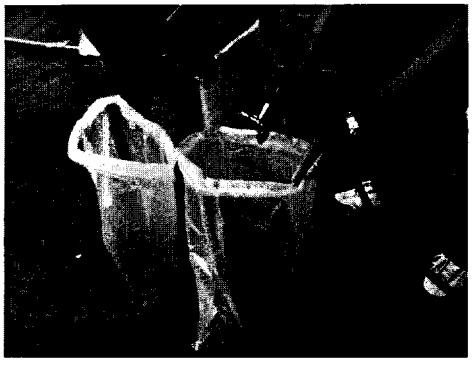
ภาพที่ 37 ตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่ใช้ทดสอบ

4.2. ศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวที่มียีนต้านทานโรคเชื้อราใบไหม้ Pi9

ทำการศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ โดยมีพันธุ์ข้าวที่ใช้ทดสอบจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ ข้าวนิบปอนบาเร (Nipponbare) ที่มีพันธุกรรมของยีน *Pi9,* ข้าวนิบปอนบาเร และข้าวขาวดอกมะลิ 105 มาทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ โดยใช้เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ *M. grisea* จำนวน 8 ไอโซเลท (ตารางที่ 32) ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคไหม้ในแต่ละบริเวณของการเพาะปลูกข้าวในประเทศไทย

ภาพที่ 38 ต้นกล้าข้าวที่มีอายุ 3 สัปดาห์ก่อนการปลูกเชื้อ (inoculation)

A)



B)

ภาพที่ 39 A) ขั้นตอนฉีดสารละลายสปอร์เชื้อราโรคใบไหม้ลงบนกะบะต้นกล้าข้าวที่มีอายุ 3 สัปดาห์ B) หลังจากการปลูกเชื้อ (inoculation) โรคใบไหม้ลงบนต้นกล้าข้าวเพื่อทำการเก็บไว้ในห้องมืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายต้นข้าวของสปอร์เชื้อรา

จากการศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองทางโรคใบไหม้ของข้าวพันธุ์นิบปอนบาเรที่มียีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi9* ข้าวนิปปอนบาเร และข้าวขาวดอกมะลิ 105 ต่อเชื้อราใบโรคไหม้ในประเทศไทยจำนวน 8 ไอโซเลทที่เก็บตัวอย่างมาจากแต่ละพื้นที่ในประเทศไทย พบว่าข้าวพันธุ์นิบปอนบาเรที่มียีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi9* สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้ทั้ง 8 ไอโซเลท ข้าวนิบปอนบาเรที่เป็นข้าวพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่ไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ (susceptible check variety) พบว่าสามารถต้านทานได้ 7 ไอโซเลท ยกเว้นไอโซเลท BA8.5 ที่ไม่ต้านทาน เป็นที่น่าสนใจว่าข้าวนิบปอนบาเรที่เป็นข้าวพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่ไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทยได้ถึง 7 ไอโซเลท จาก 8 ไอโซเลท ซึ่งจากการที่ศึกษาที่ผ่านมามักจะใช้ข้าวนิบปอนบาเรเป็นตัวเปรียบเทียบการศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองทางโรคใบไหม้และให้ผลไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคใบไหม้ นอกจากนี้เพื่อการยืนยันผลการศึกษาว่าเชื้อราโรคใบไหม้ทั้ง 8 ไอโซเลท สามารถก่อโรคได้จริงหรือไม่ จึงได้ทดสอบเชื้อราโรคใบไหม้กับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ไปในคราวเดียวกัน เป็นที่ทราบกันดีว่าข้าวขาวดอกมะลิ 105 ของไทยนั้นไม่ต้านทานโรคใบไหม้ (กรมวิชาการเกษตร, 2535) โดยใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบต่อการไม่ต้านทานโรคใบไหม้และเชื้อราโรคใบไหม้ทั้ง 8 ไอโซเลทได้เก็บตัวอย่างที่ก่อโรคมาจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ทั้งหมด จึงยืนยันได้ว่าขั้นตอนการศึกษาทุกขั้นตอนไม่มีการผิดพลาด

โดยผลจากการทดสอบการเกิดโรคใบไหม้พบว่า ข้าวขาวดอกมะลิ 105 สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคใบไหม้ระดับปานกลาง ได้ 3 ไอโซเลท คือ BAG2.4, BAG3.5 และ BAG4.4 ที่เหลืออีก 4 ไอโซเลท ไม่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้ ดังแสดงในตารางที่ 33 และ ภาพที่ 40

การทดลองนี้ มีวัตถุประสงค์ต้องการที่จะทราบว่า ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* ที่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้อย่างกว้างขวางอย่างที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้ในต่างประเทศนั้นสามารถที่จะต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ในประเทศไทยได้หรือไม่ ซึ่งผลก็สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา คือข้าวนิบปอนบาเร ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้ทั้ง 8 ไอโซเลท แต่ข้าวนิบปอนบาเรที่เป็นข้าวพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่ไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ พบว่าสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้ 7 ไอโซเลทเหมือนกัน ซึ่งผลที่คาดว่าน่าจะเป็นคือข้าวนิบปอนบาเรที่เป็นข้าวพันธุ์เปรียบเทียบมาตรฐานที่ไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้นั้นจะต้องไม่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้ จากการศึกษาของ Ribot และคณะ (2007) ข้าวนิบปอนบาเรซึ่งเป็นข้าวจาปอนิกานั้นไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ ไอโซเลท FR13 และข้าวสายพันธุ์ IR64 ซึ่งเป็นข้าวอินดิกาจะไม่ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ไอโซเลท HP14 สำหรับ *M. grisea* ไอโซเลท CL26 สามารถก่อโรคไหม้ได้ทั้งข้าวนิบปอนบาเรและข้าวสายพันธุ์ IR64 จากการศึกษาก่อนหน้านี้ทำให้ทราบว่า เชื้อ *M. grisea* แต่ละไอโซเลทมีความจำเพาะเจาะจงในการเข้าทำลายข้าว ซึ่งอาจจะเป็น ข้าวอินดิกา หรือ ข้าวจาปอนิกา บางไอโซเลท สามารถเข้าทำลายได้ทั้งข้าวอินดิกาและข้าวจา

ปอนิกา แต่การศึกษาในครั้งนี้เชื้อก่อโรคไหม้ทั้ง 8 ไอโซเลทเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคใบไหม้ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวอินดิกา อาจจะต้องมีการทดสอบปฏิกิริยาการเกิดโรคไหม้กับเชื้อก่อโรคไหม้ที่สามารถก่อโรคไหม้ได้ทั้งข้าวอินดิกาและจาปอนิกา เช่น *M. grisea* ไอโซเลท CL26 ต่อไป เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนมากขึ้น

ตารางที่ 33 ปฏิกิริยาการตอบสนองต่อโรคของข้าวพันธุ์นิบปอนบาเรที่มียีนต้านทานโรคใบไหม้ *Pi9* ต่อเชื้อราโรคใบไหม้ในประเทศไทยจำนวน 8 ไอโซเลท

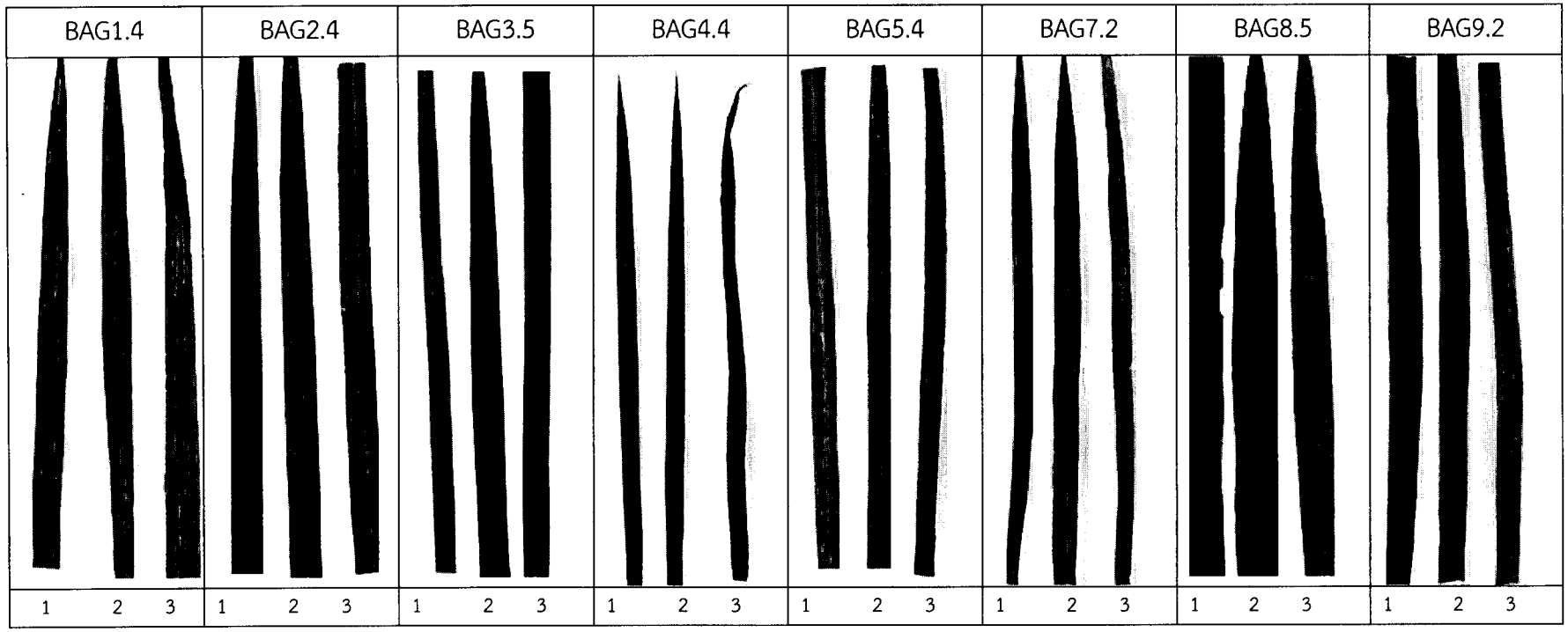
พันธุ์ข้าว	ไอโซเลทเชื้อราโรคใบไหม้ (*M.grisea*)							
	BAG1.4	BAG2.4	BAG3.5	BAG4.4	BAG5.4	BAG7.2	BA8.5	BAG9.2
นิบปอนบาเร	R	R	R	R	R	R	S	R
นิบปอนบาเร-*Pi9*	R	R	R	R	R	R	R	R
ข้าวขาวดอกมะลิ	S	MR	MR	MR	S	S	S	S

หมายเหตุ

R = ข้าวมีความต้านทานต่อโรคได้ดี

MR = ข้าวมีความต้านทานต่อโรคระดับปานกลาง

S = ข้าวไม่มีความต้านทานต่อโรค



ภาพที่ 40 แสดงผลจากการปลูกเชื้อด้วยเชื้อราโรคไหม้จำนวนทั้ง 8 ไอโซเลทของเชื้อรา *Magnaporthe grisea* โดยพันธุ์ต้านทานคือ Nipponbare-*Pi9* และพันธุ์ไม่ต้านทานคือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) เป็นตัวควบคุม (1= Nipponbare, 2 = Nipponbare-*Pi9*, 3 = ข้าวขาวดอกมะลิ 105)

4.3. การศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

ทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบจีโนมข้าวพื้นเมืองว่ามียีนต้านทานโรคไหม้แบบต่างๆ แล้วนำพันธุ์ข้าวพื้นเมืองดังกล่าวมาศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ หรือ ทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคไหม้โดยใช้เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมมาจากสถานที่ต่างๆในประเทศไทยจำนวน 10 ไอโซเลท (ตารางที่ 31)

จากการคัดเลือกข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านโรคไหม้แบบต่างๆ สามารถคัดเลือกพันธุ์ข้าวพื้นเมืองได้จำนวน จำนวน 41พันธุ์ โดยพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกเหล่านี้จะมีการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในแบบต่างๆ ดังตารางที่ 34 จากนั้นนำเมล็ดของข้าวที่ผ่านการคัดเลือกมาเพาะในเพลทแก้วที่รองด้วยกระดาษเพาะเป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ หลังจากนั้นค่อยย้ายลงในกระถาง พบว่าสามารถเพาะกล้าได้ทั้งสิ้น 26 พันธุ์ (ตารางที่ 33) แบ่งเป็นข้าวพื้นเมืองภาคเหนือจำนวน 15 พันธุ์ ได้แก่ งอเพือน, ปือก่อ, ปือเกษตร, เหนียวแสงมูเวอ, กะเหรี่ยงขาว, เหลืองหอม, จะนอไหน, ลายซาน, ห้วยแล้ง, ปิอิ ซูแม่ฟาง, ข้าวกอแผ่, เหลืองลีซอ, ข้าวแดง (TRI 8409149), ข้าวมันหมู, และงอเซระ, ข้าวพื้นเมืองภาคใต้จำนวน 6 พันธุ์ ได้แก่ หนานหนัก (GS.no 10284), นางมา (GS. 7414), เหนียวนาคราช (GS. 9982), แมะแยง (GS. 10060), ดอกพวง (GS.10062), ขืนดิน(GS.no 4290) และข้าวพื้นเมืองภาคอีสานจำนวน 5 พันธุ์ ได้แก่ หอมทุ่ง (Gs.20990), แม่ห้าง (Gs.3374), พานทอง (Gs.3375), อีปื๊ด (Gs.3376) และ ป้องแอ้ว 2 Gs.3894) และ ใช้พันธุ์ ชัยนาท 1 และ IR64 เป็นพันธุ์ตรวจสอบต้านทานโรคไหม้ และพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) เป็นพันธุ์ตรวจสอบไม่ต้านทานโรคไหม้ โดยพันธุ์ที่เพาะไม่งอกส่วนใหญ่จะมีลักษณะของเมล็ดไม่สมบูรณ์

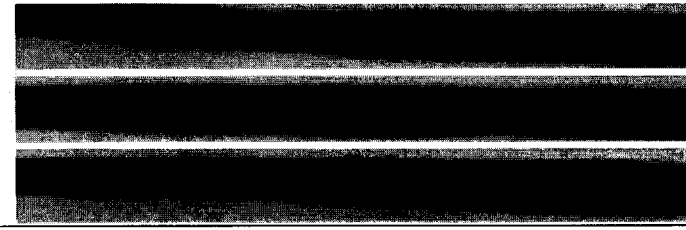
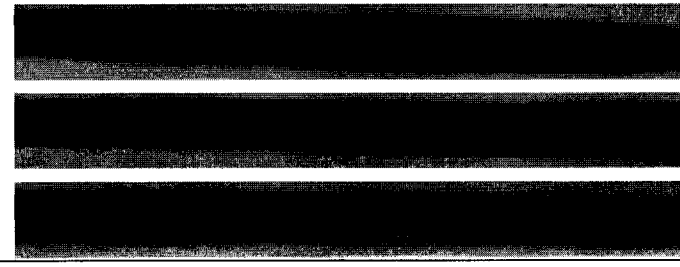
การตรวจวัดปริมาณการเกิดโรคไหม้ในข้าวใช้เกณฑ์การวัดระดับความรุนแรงของโรค ตามวิธีการของ Roumen et al. (1997) ซึ่งแบ่งเป็น 7 ระดับ (ตารางที่ 6) คือที่ระดับความรุนแรงเท่ากับ 0-2 แสดงว่าข้าวมีความต้านทานต่อโรคได้ดี (R) ที่ระดับความรุนแรงเท่ากับ 3-4 แสดงว่าข้าวมีความต้านทานต่อโรคระดับปานกลาง (MR) และที่ระดับความรุนแรงเท่ากับ 5-6 แสดงว่าข้าวไม่มีความต้านทานต่อโรค (S) จากการศึกษา พบว่า มีข้าวพื้นเมืองจำนวน 14 พันธุ์ ที่มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้ดี (มีระดับความรุนแรงเท่ากับ 0-2) ได้แก่ งอเพื่อน, ปือก่อ, เหนียวแสงมูเวอ, กะเหรี่ยงขาว, เหลืองหอม, งอเซระ, แม่ห้าง, อีปื๊ด ข้าวมันหมู, พานทอง, ปือเกษตร, ห้วยแล้ง, ข้าวกอแผ่, ดอกพวง และ อีปื๊ด มีข้าวจำนวน 6 พันธุ์ ที่มีความต้านทานต่อโรคไหม้ในระดับปานกลาง (ระดับความรุนแรงเท่ากับ 3-4) ได้แก่ ปิอิ ซูแม่ฟาง, ข้าวแดง (TRI 8409149), จะนอไหน, ลายซาน, เหลืองลีซอ และชัยนาท 1 และมีข้าวจำนวน 10 พันธุ์ ที่ไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ (มีระดับความรุนแรงเท่ากับ 5-6) ได้แก่ หมานหนัก, เหนียวนาคราช, แมะแยง, ขืนดิน, ป้องแอ้ว 2, หอมทุ่ง 20990, IR64, นางมา และ KDML105 ซึ่งใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ (ตารางที่ 34และ 35)

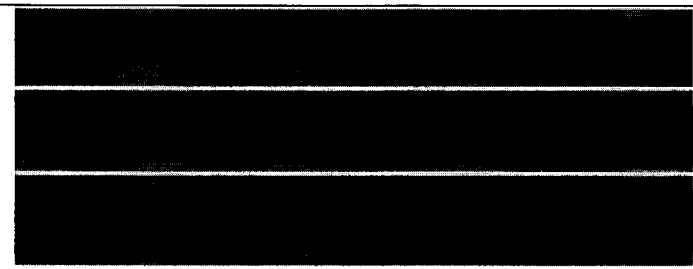
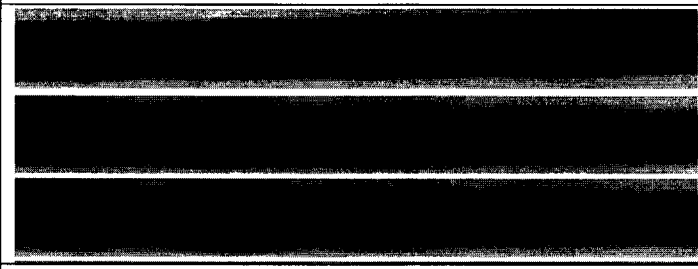
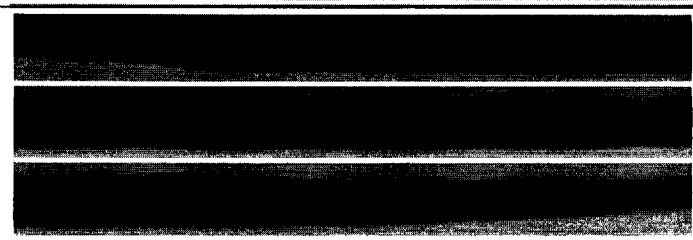
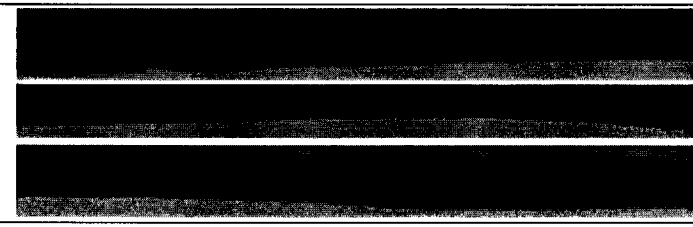
ตารางที่ 34 แสดงจีโนไทป์ของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9, Pi54, Pi-d2, Pi-d3, Pi-ta, Pib, Pigm(t) , Pi1(t), Pi2(t)* และ *Pi36* และปฏิกิริยาการตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้รวม 10 ไอโซเลท

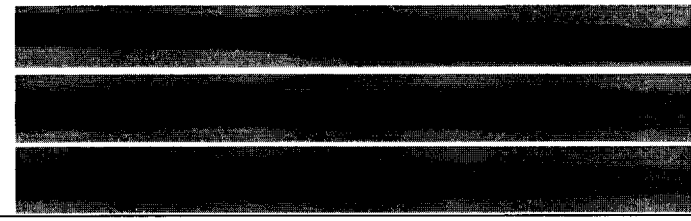
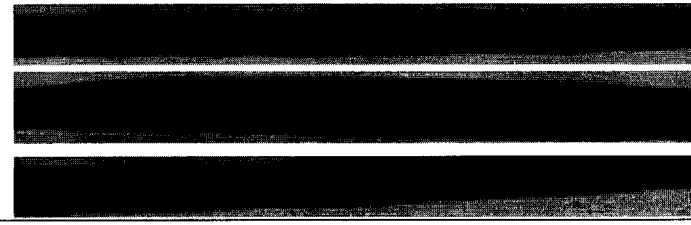
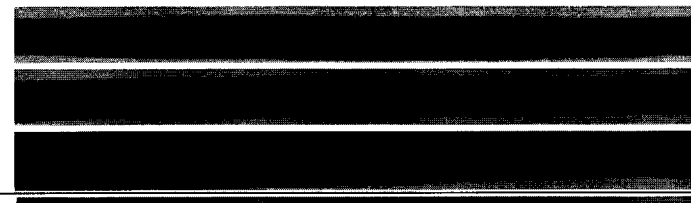
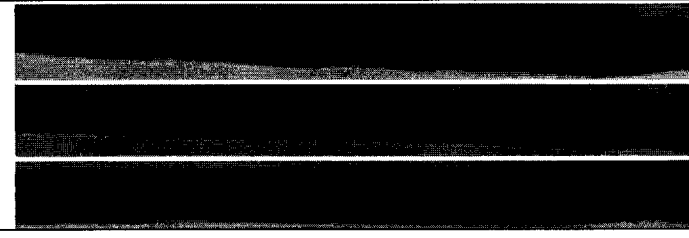
ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว	*pB8-Pi9*	*NBS2-Pi9*	*Pi-d2*	*Pi36*	*Pi-ta*	*Pib*	*Pi1(t)*	*Pi2(t)*	*Pi-d3 Cap1*	*Pi-d3 Cap2*	*Pi54 indel*	*Pi54 SSR*	*Pigm(t) C5483*	*Pigm(t) S2974*
1	งอเพือน	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	R	S	S	**	S	R	H	R	R	R	R	**	R	R
2	ดยาหลี่	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	S	S	S	B	S	R	H	R	S	S	S	R	R	R
3	ปีอก่อ	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	S	R	**	B	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R
4	ปีอเกษตร	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	**	B	S	S	H	R	S	S	R	R	R	R
5	เหนียวแสงมูเวอ	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	**	B	S	S	H	S	R	S	S	R	R	R
6	กะเหรี่ยงขาว	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	R	S	R	B	S	S	H	R	R	R	S	R	R	R
7	เหลืองหอม	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	S	B	S	S	H	S	S	S	R	R	**	R
8	จะนอไหน	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	R	S	S	B	S	R	H	S	S	S	R	R	S	S
9	ลายชาน	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	R	S	S	B	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R
10	ปีอิ แม่ละ	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	S	B	S	R	H	S	S	S	S	S	R	R
11	ห้วยแล้ง	ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	R	B	S	S	H	S	R	R	R	S	R	R
12	ปีอิ ชูแม่ฟาง	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	R	S	S	B	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S
13	ข้าวกอแผ่	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	R	S	R	B	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R
14	บือขอพอ	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	**	B	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R
15	เหลืองลีซอ	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	R	S	R	B	S	S	H	S	R	R	S	R	R	R
16	ข้าวแดง(TRI 8409149)	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	S	B	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S
17	ข้าวมันหมู	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	R	R	S	B	S	S	S	R	R	R	S	**	R	S
18	งอเชระ	ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	S	S	R	B	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R
19	หอมทุ่ง (Gs.20988)	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองอีสาน	R	R	S	**	R	R	S	S	S	R	S	**	R	R
20	หอมทุ่ง (Gs.20990)	ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองอีสาน	S	S	S	B	S	S	S	R	S	R	S	**	R	R
21	ขาว (Gs.3361)	ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	B	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R
22	ข้าวก่ำ (Gs.3369)	ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S

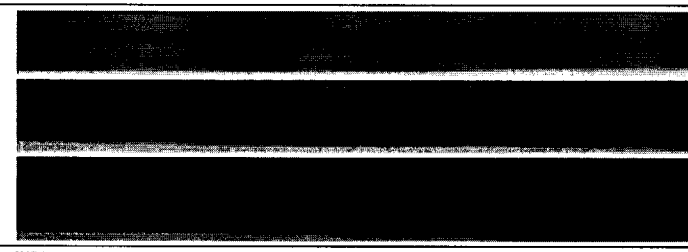
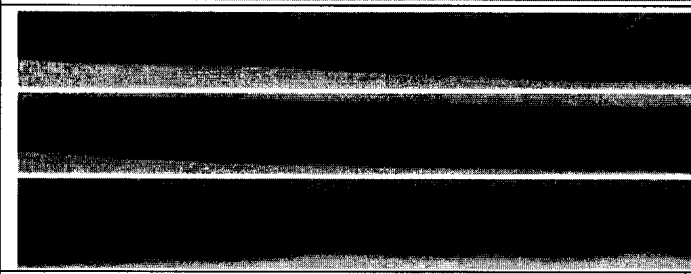
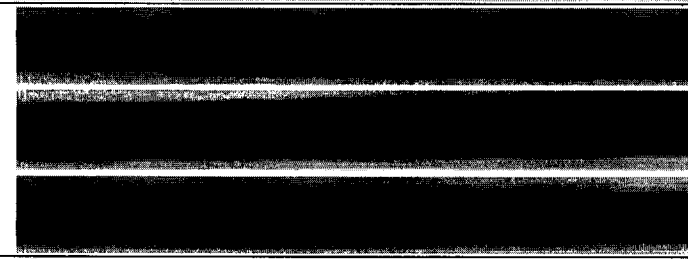
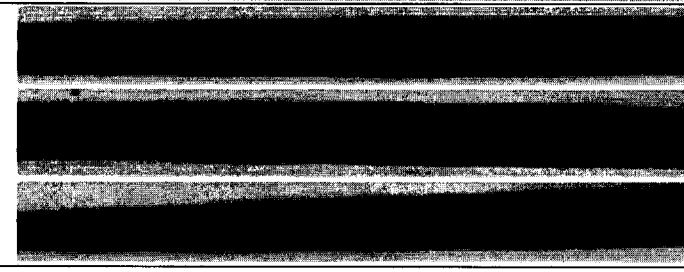
ลำดับที่	พันธุ์ข้าว	ประเภทข้าว	*pB8-Pi9*	*NBS2-Pi9*	*Pi-d2*	*Pi36*	*Pi-ta*	*Pib*	*Pi1(t)*	*Pi2(t)*	*Pi-d3 Cap1*	*Pi-d3 Cap2*	*Pi54 indel*	*Pi54 SSR*	*Pigm(t) C5483*	*Pigm(t) S2974*
23	อีปง (Gs.3372)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองอีสาน	R	R	R	B	R	R	H	R	R	R	S	**	R	S
24	นางนวล (Gs.3373)	ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	R	**	R	R	S	R	**	R	S	**	R	S
25	แม่ห้าง (Gs.3374)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองอีสาน	S	S	R	C	R	R	S	R	R	R	S	**	R	R
26	พานทอง (Gs.3375)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองอีสาน	S	S	R	B	R	R	S	R	S	S	S	**	R	R
27	อีปี๊ด (Gs.3376)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองอีสาน	S	R	S	C	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R
28	ป้องแอ้ว 2 Gs.3894)	ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	R	B	S	R	S	R	S	S	S	S	R	**
29	นางคำผาย Gs.4373)	ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	S	S	R	S	S	R	S	R	R	S	S	**	R	R
30	ข้าวหอม (Gs.4809)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองอีสาน	S	S	R	B	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R
31	ข้าวหอม (Gs.4816)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองอีสาน	S	S	R	C	R	R	S	R	S	S	S	R	R	**
32	กะทิ (Gs.5565)	ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	R	R	S	B	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R
33	ดอเหลือง (GS.5567)	ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	R	S	R	B	S	R	S	R	S	S	S	**	R	R
34	หอมมะลิ (Gs.18418)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองอีสาน	R	R	R	C	R	S	H	R	S	S	S	S	R	**
35	หอมมะลิ (Gs.18419)	ข้าวนาสวนพื้นเมืองอีสาน	S	R	R	C	R	R	H	R	R	R	S	S	R	**
36	หนานหนัก (GS.no 10284)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	C	R	S	S	S	**	R	S	S	R	R
37	นางมา (GS. 7414)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	C	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R
38	เหนียวนาคราช (GS. 9982)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	A	S	S	H	R	S	S	S	**	R	R
39	แมะแยง (GS. 10060)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	**	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R
40	ดอกพวง (GS.10062)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	A	S	S	H	S	R	R	S	S	R	R
41	ขืนดิน(GS.no 4290)	ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	S	S	R	C	R	S	S	S	R	R	S	**	R	R
42	ชัยนาท 1	พันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้	**	R	**	**	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S
43	IR64	พันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้	**	S	**	**	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R
44	ขาวดอกมะลิ 105	พันธุ์ข้าวพันธุ์ตรวจสอบ	**	S	**	**	S	S	**	**	**	**	**	**	**	**

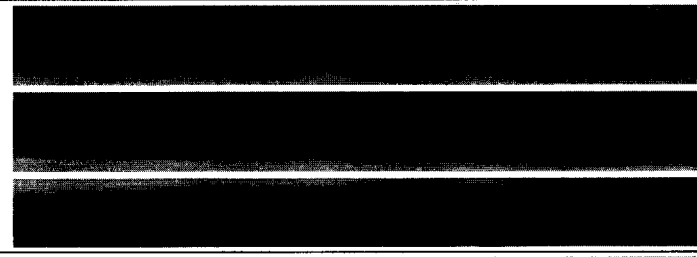
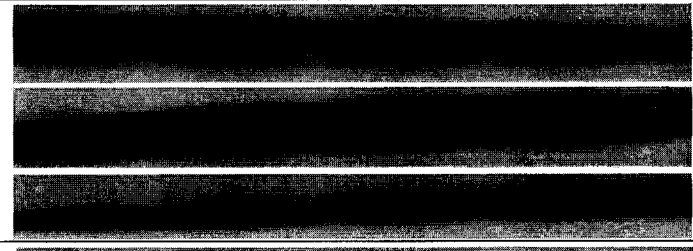
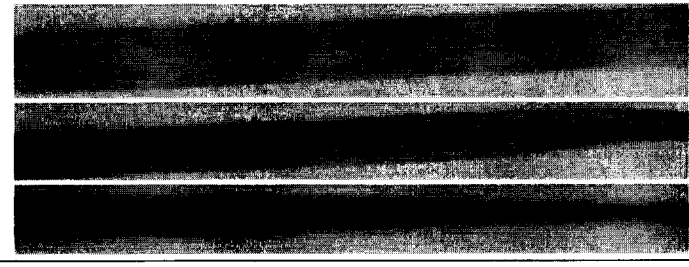
ตารางที่ 35 แสดงระดับความรุนแรงของโรคไหม้ในใบข้าว จำนวน 29 พันธุ์

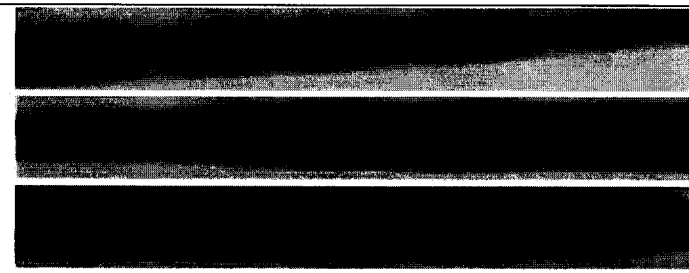
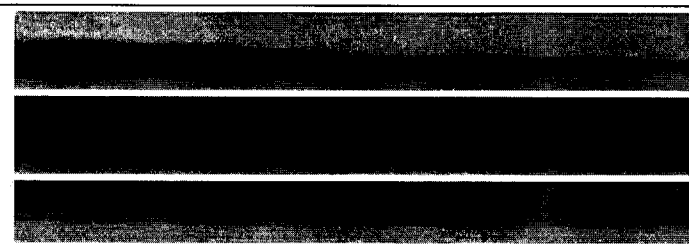
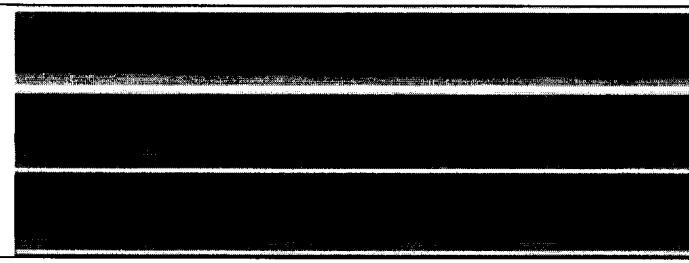
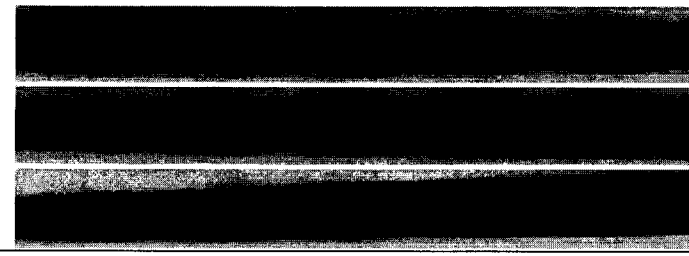
ลำดับที่	พันธุ์	รหัส	ลักษณะใบข้าวที่เกิดโรคไหม้	ระดับความรุนแรง	ยีนต้านทานโรคไหม้	ความต้านทาน
1	งอเพื่อน	U38 (ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ)		0	*Pib, Pi1(t),Pi 2, Pi-d3, Pi54, Pigm(t)*	R
2	ปือก่อ	U41 (ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ)		0	*Pi9, Pi36, Pi2, Pi-d3, Pigm(t)*	R
3	ปือเกษตร	U42 (ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ)		2	*Pi9, Pi36, Pi1(t), Pi54, Pigm(t)*	R

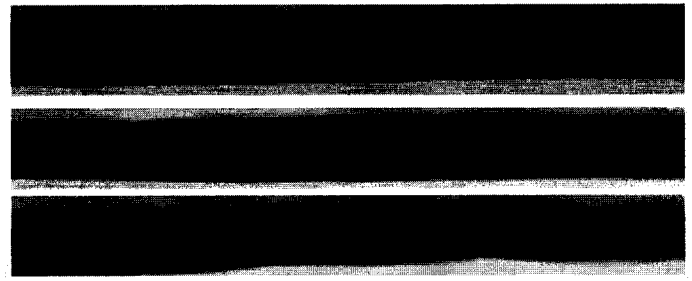
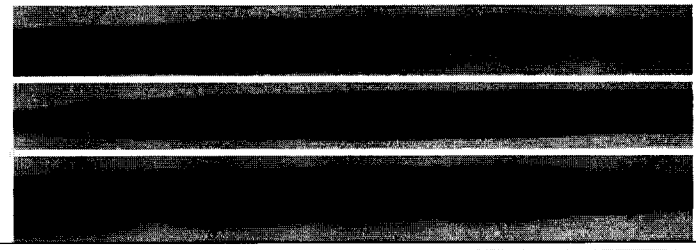
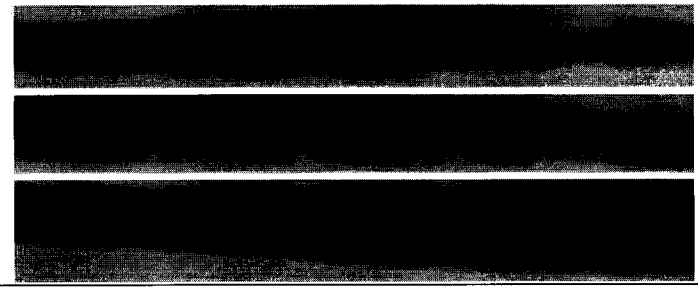
ลำดับที่	พันธุ์	รหัส	ลักษณะใบข้าวที่เกิดโรคไหม้	ระดับความรุนแรง	ยีนต้านทานโรคไหม้	ความต้านทาน
4	เหนียวแสงมูเวอ	U43 (ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ)		0	*Pi9, Pi36, Pi1(t), Pi-d3, Pigm(t)*	R
5	กะเหรี่ยงขาว	U44 (ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ)		0	*Pid2, Pi36, Pi1(t), Pi2, Pi-d3, Pigm(t)*	R
6	เหลืองหอม	U45 (ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ)		0	*Pi9, Pi36, Pi1(t), Pi54, Pigm(t)*	R
7	จะนอไหน	U46 (ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ)		4	*Pi36, Pib, Pi1(t), Pi54*	MR

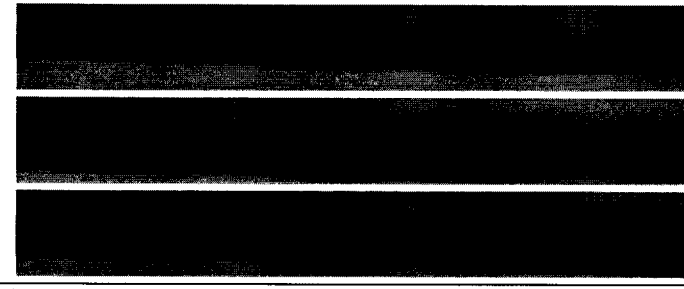
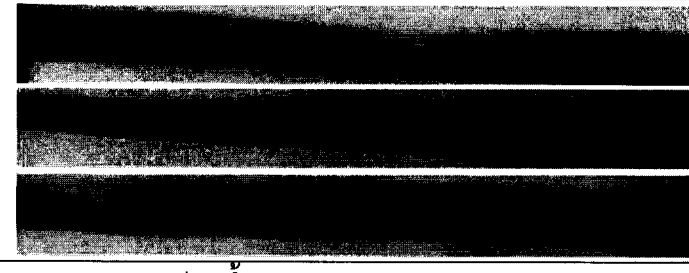
ลำดับที่	พันธุ์	รหัส	ลักษณะใบข้าวที่เกิดโรคไหม้	ระดับความรุนแรง	ยีนต้านทานโรคไหม้	ความต้านทาน
8	ลายซาน	U48 (ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ)		4	*Pi36, Pib, Pi1(t), Pi54, Pigm(t)*	MR
9	ห้วยแล้ง	U50 (ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ)		2	*Pi9, Pi-d2, Pi36, Pi1(t), Pi-d3, Pigm(t)*	R
10	ปิอิ ซูแม่ฟาง	U51 (ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ)		3	*Pi36, Pi1(t), Pi54*	MR
11	ข้าวกอแผ่	U 52 (ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ)		2	*Pid2, Pi36, Pi1(t), Pi-d3, Pi54, Pigm(t)*	R

ลำดับที่	พันธุ์	รหัส	ลักษณะใบข้าวที่เกิดโรคไหม้	ระดับความรุนแรง	ยีนต้านทานโรคไหม้	ความต้านทาน
12	เหลืองลีซอ	U55 (ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ)		4	*Pid2, Pi36, Pi1(t), Pi-d3, Pigm(t)*	R
13	ข้าวแดง (TRI 8409149)	U56 (ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ)		3	*Pi9, Pi36, Pi2, Pi-d3*	MR
14	ข้าวมันหมู	U57 (ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ)		1	*Pi9, Pi36, Pi2, Pi-d3*	R
15	งอเชระ	U60 (ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ)		0	*Pid2, Pi36, Pi1(t), Pi-d3, Pi54, Pigm(t)*	R

ลำดับที่	พันธุ์	รหัส	ลักษณะใบข้าวที่เกิดโรคไหม้	ระดับความรุนแรง	ยีนต้านทานโรคไหม้	ความต้านทาน
16	หมานหนัก	S71 (ข้าวพื้นเมืองภาคใต้)		5	*Pid2, Pita, Pigm(t)*	S
17	นางมา	S72 (ข้าวพื้นเมืองภาคใต้)		6	*Pid2, Pita, Pib, Pi-d3, Pigm(t)*	S
18	เหนียวนาคราช	S73 (ข้าวพื้นเมืองภาคใต้)		5	*Pid2, Pi36, Pi1(t), Pi2, Pigm(t)* .	S
19	แมะแยง	S75 (ข้าวพื้นเมืองภาคใต้)		5	*Pid2, Pi-d3, Pigm(t)*	S

ลำดับที่	พันธุ์	รหัส	ลักษณะใบข้าวที่เกิดโรคไหม้	ระดับความรุนแรง	ยีนต้านทานโรคไหม้	ความต้านทาน
20	ดอกพวง	S76 (ข้าวพื้นเมืองภาคใต้)		2	*Pid2, Pi36, Pi1(t), Pi-d3, Pigm(t)*	R
21	ขีนดิน	S77 (ข้าวพื้นเมืองภาคใต้)		5	*Pid2, Pita, Pi-d3, Pigm(t)*	S
22	แม่ห้าง	L54 (ข้าวนาสวนพื้นเมืองอีสาน)		0	*Pid2, Pita, Pib, Pi2, Pi-d3, Pigm(t)*	R
23	พานทอง	L55 (ข้าวนาสวนพื้นเมืองอีสาน)		1	*Pid2, PI36, Pita, Pib, Pi2, Pigm(t)*	R

ลำดับที่	พันธุ์	รหัส	ลักษณะใบข้าวที่เกิดโรคไหม้	ระดับความรุนแรง	ยีนต้านทานโรคไหม้	ความต้านทาน
24	อีปี๊ด	L56 (ข้าวนาสวนพื้นเมืองอีสาน)		0	*Pi9, Pi2, Pi-d3, Pigm(t)*	R
25	ป้องแอ้ว 2	L68 (ข้าวนาสวนพื้นเมืองอีสาน)		5	*Pi-d2, Pi36, Pib, Pi2, Pigm(t)*	S
26	หอมทุ่ง 20990	E141 (ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองอีสาน)		5	*Pi36, Pi2, Pi-d3, Pigm(t)*	S

ลำดับที่	พันธุ์	รหัส	ลักษณะใบข้าวที่เกิดโรคไหม้	ระดับความรุนแรง	ยีนต้านทานโรคไหม้	ความต้านทาน
27	ชัยนาท 1	B15		4	*Pi9, Pita, Pib, Pi1(t), Pi2*	MR
28	IR64	B16		5	*Pita, Pib, Pi1(t), Pigm(t)*	S
29	KDML105	C1		6		S

หมายเหตุ ใบข้าวแต่ละใบ มาจากการทดลองแต่ละซ้ำ

จากการทดสอบในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ของข้าวพื้นเมืองแต่ละภาคของประเทศ โดยข้าวพื้นเมืองภาคเหนือแสดงความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่ทำการทดสอบรวม 10 ไอโซเลทได้ดีที่สุด (ตารางที่ 36 และภาพที่ 41) โดยมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ (ความต้านทาน) ในระดับต้านทานปานกลาง (MR) จนถึงต้านทาน (R) และข้าวพื้นเมืองภาคใต้แสดงความแสดงความอ่อนแอ (S) ต่อเชื้อที่ทดสอบมากที่สุด (ตารางผนวกที่ 1 และ 2)

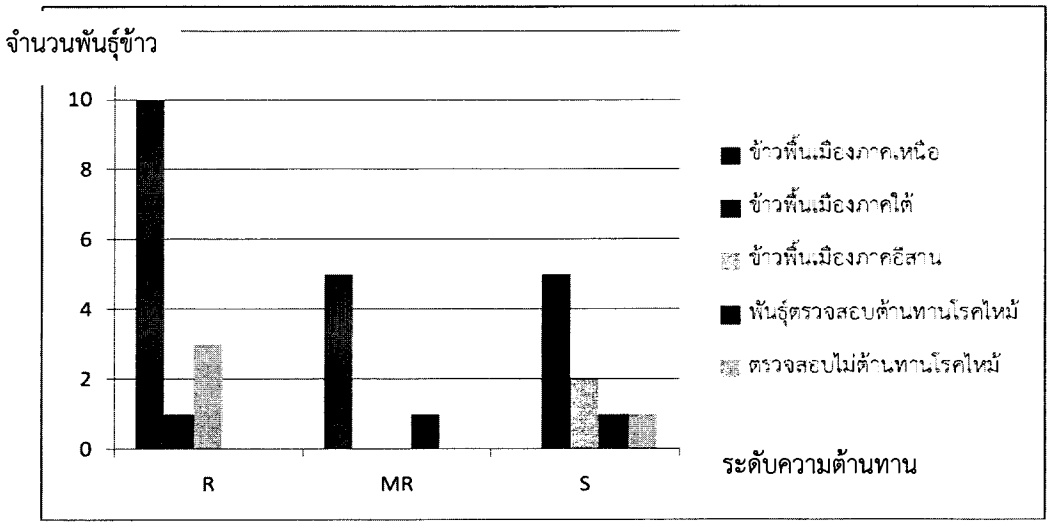
ผลจากการศึกษา พบว่า มีข้าวพื้นเมืองหลายพันธุ์ที่สามารถต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้ทั้ง 10 ไอโซเลท ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ข้าวพื้นเมืองเป็นแหล่งยีนต้านทานโรคไหม้ที่สำคัญ เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ต่อไป

ตารางที่ 36 แสดงกระจายตัวของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองต้านทานโรคไหม้ในแต่ละภาคของประเทศตามระดับความรุนแรงของการเกิดโรคไหม้จากเชื้อสาเหตุ จำนวน 10 ไอโซเลท

ประเภทข้าว	จำนวนพันธุ์แยกตามระดับความรุนแรง							รวม (พันธุ์)
	R			MR		S		
	0	1	2	3	4	5	6	
ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	6	1	3	2	3	-	-	15
ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	-	-	1	-	-	4	1	6
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	2	1	-	-	-	2	-	5
พันธุ์ตรวจสอบต้านทานโรคไหม้*	-	-	-	-	1	1	-	2
พันธุ์ตรวจสอบไม่ต้านทานโรคไหม้**	-	-	-	-	-	-	1	1
รวม	8	2	4	2	4	7	2	29
	14			6		9		

หมายเหตุ * พันธุ์ตรวจสอบต้านทานโรคไหม้ -พันธุ์ชัยนาท และ IR64

** พันธุ์ตรวจสอบไม่ต้านทานโรคไหม้ -พันธุ์ขาวดอกมะลิ105



ภาพที่ 41 แสดงการกระจายตัวของข้าวพื้นเมืองต้านทานโรคไหม้ในแต่ละภาคของประเทศแยกตามระดับความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ผสมรวม จำนวน 10 ไอโซเลท

5. การศึกษาสหสัมพันธ์ระหว่างยีนต้านทานโรคไหม้และปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

จากการวิเคราะห์การถดถอย (regression analysis) ระหว่างยีนต้านทานโรคไหม้และปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ พบว่าลักษณะต้านทานโรคไหม้ที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการทำงานเสริมกันของยีนต้านทานโรคไหม้หลายๆยีน (additive effect) โดยยีน *Pi9* มีอิทธิพลต่อลักษณะการต้านทานโรคไหม้มากที่สุด รองลงมาเป็น ยีน *Pi54* และ *Pi-ta* (ตารางที่ 37 และ 38) จากการวิเคราะห์การถดถอยอย่างง่าย (simple regression analysis) ระหว่างยีนต้านทานโรคไหม้และปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ จำนวน 26 พันธุ์ ต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ จำนวน 10 ไอโซเลท พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54SSR และ NBS2Pi9 มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคไหม้ของข้าวพื้นเมืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) หรือ สัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (Coefficient of determination) เท่ากับ 0.2086 และ 0.2033 ตามลำดับ ซึ่งหมายความว่า 20.86 และ 20.33 เปอร์เซ็นต์ ของความแปรปรวนในปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวพื้นเมืองต่อการเกิดโรคไหม้สามารถอธิบายหรือทำนายได้ด้วยยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* และ *Pi9* ตามลำดับ (ตารางที่ 37)

ตารางที่ 37 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ และ P-value จากการวิเคราะห์การถดถอยอย่างง่าย (single regression analysis) โดยใช้ข้อมูลจีโนไทป์ (เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนต้านทานโรคไหม้ 14 เครื่องหมาย) กับ ระดับต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมือง

marker	r (%)	P-value
NBS2Pi9	20.3307	*
pB8Pi9	8.4507	ns
Pi1(t)	3.11818	ns
Pi2	3.39876	ns
Pi36	9.00297	ns
Pi54indel	13.1034	ns
Pi54SSR	20.8621	*
Pib	2.94011	ns
Pid2	2.17157	ns
Pid3Cap1	2.48276	ns
Pid3Cap2	3.0094	ns
Pigm(t) C5483	0.369004	ns
Pigm(t) S2974	0.11232	ns
Pi-ta	11.2644	ns

อย่างไรก็ตามพบว่า เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54SSR (RM206) มีอิทธิพลต่อลักษณะต้านทานโรคไหม้สูงกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54 MAS ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่พัฒนามาจากตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า ความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ของเครื่องหมาย Pi54SSR เป็นอิทธิพลเนื่องมาจากยีนอื่น ที่นอกเหนือจากยีน *Pi54* เนื่องจาก เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pi54SSR เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi54* อยู่ห่างจากยีนดังกล่าวประมาณ 0.7 cM และมีความจำเพาะกับยีน *Pi54* ประมาณ 80% (Ramkumar et al. 2011) และมีการรายงานว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ RM206 ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรคไหม้อื่น ได้แก่ ยีน *Pi38*, (Koide et al., 2009) และยีน *Pi47* (t) (Huang e t al., 2011) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าลักษณะความต้านทานที่เกิดขึ้นเป็นผลเนื่องมาจากอิทธิพลของยีน *Pi38* และ *Pi47(t)* ซึ่งควรจะมีการศึกษาปฏิกิริยาความต้านทานดังกล่าวต่อไป

ตารางที่ 38 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ และ P-value จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณ (multiple regression analysis) ของยีนต้านทานโรคไหม้แบบต่าง ๆ สูงสุด 3 อันดับแรก

marker	จำนวนยีน	R^2 (%)	P-value
NBS2Pi9, Pi54indel	2	27.5013	**
NBS2Pi9, *Pi36*	2	22.7075	*
NBS2Pi9, *Pita*	2	20.2851	*
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1	3	39.7917	**
NBS2Pi9, *Pi1(t)*, Pid3C1	3	29.7039	**
NBS2Pi9, *Pi1(t), Pi36*	3	29.2997	*
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi36*	4	30.9675	*
NBS2Pi9, Pi54indel, *Pi1(t), Pi2*	4	26.3429	*
NBS2Pi9, Pi54indel, *Pi1(t), Pi36*	4	26.3116	*
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t), Pi2*	5	44.6842	**
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t), Pib*	5	38.0017	**
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t)*, PigmS2	5	36.1424	*
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, Pi1(t), *Pita, Pi2*	6	42.0639	**
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t), Pita, Pib*	6	35.7143	**
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t), Pita,* PigmS2	6	33.5876	*
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t), Pita, Pi2*, PigmS2	7	42.3659	**
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t), Pita, Pi2, Pib*	7	39.1761	**
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t), Pita, Pib*, PigmS2	7	37.14	*

นอกจากวิเคราะห์ยีนต้านทานโรคไหม้แต่ละยีนที่มีผลต่อความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ของข้าวพื้นเมืองแล้ว ได้ทำการวิเคราะห์ยีนต้านทานโรคไหม้ที่พบในข้าวพื้นเมืองหลายยีนรวมกันว่ามีผลต่อความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ได้มากน้อยเพียงใด โดยการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณ (multiple regression) ของลักษณะการเกิดโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองและ จีโนไทป์ของยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง โดยการรวมยีนต้านทานโรคไหม้จำนวน 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ยีน พบว่า ลักษณะต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการทำงานร่วมกันของยีนต้านทานโรคไหม้มากกว่า 1 ยีน และมีการแสดงออกของยีนเป็นแบบส่งเสริม (additive effect) โดยมีค่าสัมประสิทธ์ของการตัดสินใจ (R Square: R^2) ของการรวมยีนต่างๆ ดังนี้ (ตารางที่ 38)

- ยีนต้านทานโรคไหม้ จำนวน 2 ยีน พบว่าคู่สหสัมพันธ์ระหว่างยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* (NBS2Pi9) และ ยีน *Pi54* (Pi54 indel) มีค่า R^2 สูงสุด คือ 27.5013 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาคู่สหสัมพันธ์ระหว่างยีน *Pi9* และ *Pi36* โดยมีเปอร์เซ็นต์ค่า R^2 เป็น 22.7075 เปอร์เซ็นต์

- ยีนต้านทานโรคไหม้ จำนวน 3 ยีน พบว่า คู่สหสัมพันธ์ระหว่างยีน *Pi9, Pi54, Pi-d3* มีอิทธิพลต่อลักษณะต้านทานโรคไหม้มากที่สุด รองลงมาเป็นคู่สหสัมพันธ์ของยีน *Pi9, Pi1(t), Pi-d3* และคู่ยีน *Pi9, Pi1(t), Pi36* คิดเป็น 39.7917, 29.7039 และ 29.2997 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

- ยีนต้านทานโรคไหม้ที่ทำงานร่วมกัน จำนวน 4 ยีนพบว่า ยีน *Pi9, Pi54, Pi-d3* และ*Pi2* มีค่า R^2สูงสุดคิดเป็น 41.92 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นคู่สหสัมพันธ์ของ *Pi9, Pi54, Pi-d3* และ *Pi1(t)* และคู่ *Pi9, Pi54, Pi-d3* และ *Pi-ta* มีค่า r สูงสุดคิดเป็น 39.99 และ 37.36 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

- ยีนต้านทานโรคไหม้ที่ทำงานร่วมกัน จำนวน 5 ยีนพบว่า ยีน *Pi9, Pi54, Pi-d3, Pi1(t)* และ *Pi2* มีค่า R^2 สูงสุด คิดเป็น 44.68 เปอร์เซ็นต์

- ยีนต้านทานโรคไหม้ที่ทำงานร่วมกัน จำนวน 6 ยีน พบว่า ยีน *Pi9, Pi54, Pi-d3, Pi1(t), Pi-ta* และ *Pi2* มีค่า R^2 สูงสุด คิดเป็น 42.06 เปอร์เซ็นต์

- ยีนต้านทานโรคไหม้ที่ทำงานร่วมกัน จำนวน 7 ยีน พบว่า ยีน *Pi9, Pi54, Pi-d3, Pi1(t), Pi-ta, Pigm(t)* และ *Pi2* มีการแสดงออกทางพันธุกรรมของลักษณะต้านทานโรคไหม้สูงถึง 42.36 เปอร์เซ็นต์

อย่างไรก็ตาม พบว่า ค่า R^2 จะมีค่าสูงสุดเมื่อยีนต้านทานโรคไหม้ที่ทำงานร่วมกัน 5 ยีน และไม่พบความแตกต่างทางสถิติของค่า R^2 ในข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ จำนวน 8, 9 และ 10 ยีน แสดงว่าลักษณะต้านทานโรคไหม้จากการศึกษาในครั้งนี้เป็นอิทธิพลของการทำงานแบบส่งเสริมกันของยีนต้านทานโรคไหม้จำนวน 7 ยีน คือ ยีน *Pi9, Pi54, Pi-d3, Pi1(t), Pi-ta, Pigm(t)* และ *Pi2* ซึ่งไม่มีอิทธิพลของยีน *Pib, Pid2* และ *Pi36* แต่การรวมยีน *Pi9, Pi54, Pi-d3, Pi1(t)* และ *Pi2* มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีนมากที่สุด คิดเป็น 44.68 เปอร์เซ็นต์ของปัจจัยทางพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้

6. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้

วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ จำนวน 26 พันธุ์ (ตารางที่ 33) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ 14 เครื่องหมาย จากยีนต้านทานโรคไหม้จำนวน 10 ยีน ประกอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตรงตำแหน่งยีน (gene specific markers) จำนวน 6 ยีนได้แก่ pB8-Pi9, NBS2-Pi9 (*Pi9*), Pi54indel, Pi54SSR (*Pi54*) , Pi-d2, Pi-d3Cap1, Pi-d3Cap2 (*Pi-d3*), *Pi-ta* และ Pibdom (*Pib*) และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรคไหม้จำนวน 4 ยีน ได้แก่ Pigm(t)C5483, Pigm(t)S2974 [*Pigm(t)*] , RM1233 (*Pi1(t)*), RM140 (*Pi2*) และ R36STS (*Pi36*) (ตารางที่ 33) โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Dice (Dice's Similarity coefficient) (Dice, 1945) จากนั้นนำข้อมูลมาจัดกลุ่มทางพันธุกรรม (Cluster analysis) ด้วยวิธี Unweighted pair group method based on arithmetic average (UPGMA) เพื่อสร้าง dendrogram ของข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้

การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดย UPGMA cluster analysis

จากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Dice พบว่า มีค่าตั้งแต่ 0.14 – 1.00 โดยพันธุ์ข้าวแดง TRI 8409149 (U56) และ พันธุ์ข้าวมันหมู (U57) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้มากที่สุด (1.00) โดยมียีนต้านทานโรคไหม้เหมือนกัน คือ *Pi9, Pi36, Pi2 และ Pi-d3* (ตารางผนวกที่ 4) จากการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดย UPGMA (UPGMA cluster analysis) พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่ม (ภาพที่ 42)

กลุ่มที่ 1 (Cluster I) ประกอบด้วยข้าวพื้นเมือง จำนวน 6 พันธุ์ ภายในกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

Sub-Cluster I-I มีจำนวนสมาชิก 3 พันธุ์ได้แก่ ปือเกษตร (U42), เหลืองหอม (U45) และเหนียวแสงมูเวอ (U43) กลุ่มนี้มีปฏิกิริยาการตอบสนองต่อเชื้อ 10 ไอโซเลท ในระดับต้านทานต่อโรคได้ดี (R) เมื่อพิจารณาที่ยีนต้านทานโรคไหม้พบว่าข้าวพันธุ์ดังกล่าวมียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9, Pi36, Pi1(t), Pi54*, และ *Pigm(t)* เหมือนกัน

Sub-Cluster I-II มีจำนวนสมาชิก 3 พันธุ์ ได้แก่ จะนอไหน (U46), ปิอิ ซูแม่ฟาง (U51), และลายซาน (U48) กลุ่มนี้มีปฏิกิริยาการตอบสนองต่อเชื้อ 10 ไอโซเลท ในระดับต้านทานต่อโรคได้ปานกลาง (MR) เมื่อพิจารณาที่ตำแหน่งยีนต้านทานโรคไหม้พบว่าข้าวพันธุ์ดังกล่าวมียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi36, Pi1(t) และ, Pi54*, เหมือนกัน แต่ต่างจาก Sub-Cluster I-I ที่ตำแหน่งยีน *Pi9* และ *Pigm(t)* เมื่อทำการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณ (multiple regression analysis) ของยีน *Pi36, Pi1(t) และ, Pi54* พบว่ายีนดังกล่าวมีอิทธิพลต่อความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ 12.42 เปอร์เซ็นต์ แต่หากพิจารณายีนเพียงตำแหน่งเดียวจะพบว่ายีน *Pi54* มีอิทธิพลต่อความต้านทานมากที่สุด โดยยีน *Pi54* มีอิทธิพลต่อการต้านทานโรคไหม้สูงถึง 13.10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า

ลักษณะต้านทานที่เกิดขึ้นเป็นอิทธิพลมาจากยีน *Pi54* ตามทฤษฎี gene for gene ของ Flor (1972) และข้าวใน Sub-Cluster I-I ที่มียีน *Pigm และ Pi9* เพิ่มเข้ามา เมื่อวิเคราะห์ multiple regression ของยีน *Pi36, Pi1(t), Pi54, Pigm และ Pi9; Pi54, Pigm และ Pi9* และ *Pi54, Pi9* พบว่ามีอิทธิพลต่อความสามารถในการต้านทานโรคไหม้เป็น 20.00, 24.64 และ 27.50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดั้งนั้นอาจเป็นได้ว่าการทำงานร่วมกันระหว่างยีน *Pi9* และ *Pi54* ส่งเสริมให้ข้าวใน Sub-Cluster I-I มีปฏิกิริยาการตอบสนองต่อเชื้อ 10 ไอโซเลท ในระดับต้านทานต่อโรคได้ดี (R)

กลุ่มที่ 2 (Cluster II) มีสมาชิก 2 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวต้านทานโรคไหม้ ชัยนาท 1 (B15) และ IR64 (B16) มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pita, Pib,*และ *Pi1(t)* เหมือนกัน แต่ข้าวพันธุ์ชัยนาท1 มียีน *Pi9* และ *Pi2* เพิ่มเติมมากกว่าข้าวพันธุ์ IR64 และข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 มีปฏิกิริยาการตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในระดับต้านทาน (R) แต่ข้าว IR64 มีปฏิกิริยาการตอบสนองในระดับอ่อนแอ (S)

กลุ่มที่ 3 (Cluster III) มีสมาชิก 5 พันธุ์ ได้แก่ ปือก่อ (U41), ข้าวแดง TRI 8409149 (U56), ข้าวมันหมู (U57), อีปี๊ด Gs.3376 (L56), และหอมทุ่ง Gs.20990 (E141) กลุ่มนี้ส่วนใหญ่แสดงปฏิกิริยาการตอบสนองต่อเชื้อในระดับต้านทาน ยกเว้นข้าวพันธุ์หอมทุ่ง Gs.20990 (E141) ที่ไม่ต้านทาน เมื่อพิจารณาที่ยีนต้านทานโรคไหม้พบว่ากลุ่มที่ต้านทานมียีน *Pi9* แต่ข้าวหอมทุ่งไม่มียีน *Pi9*

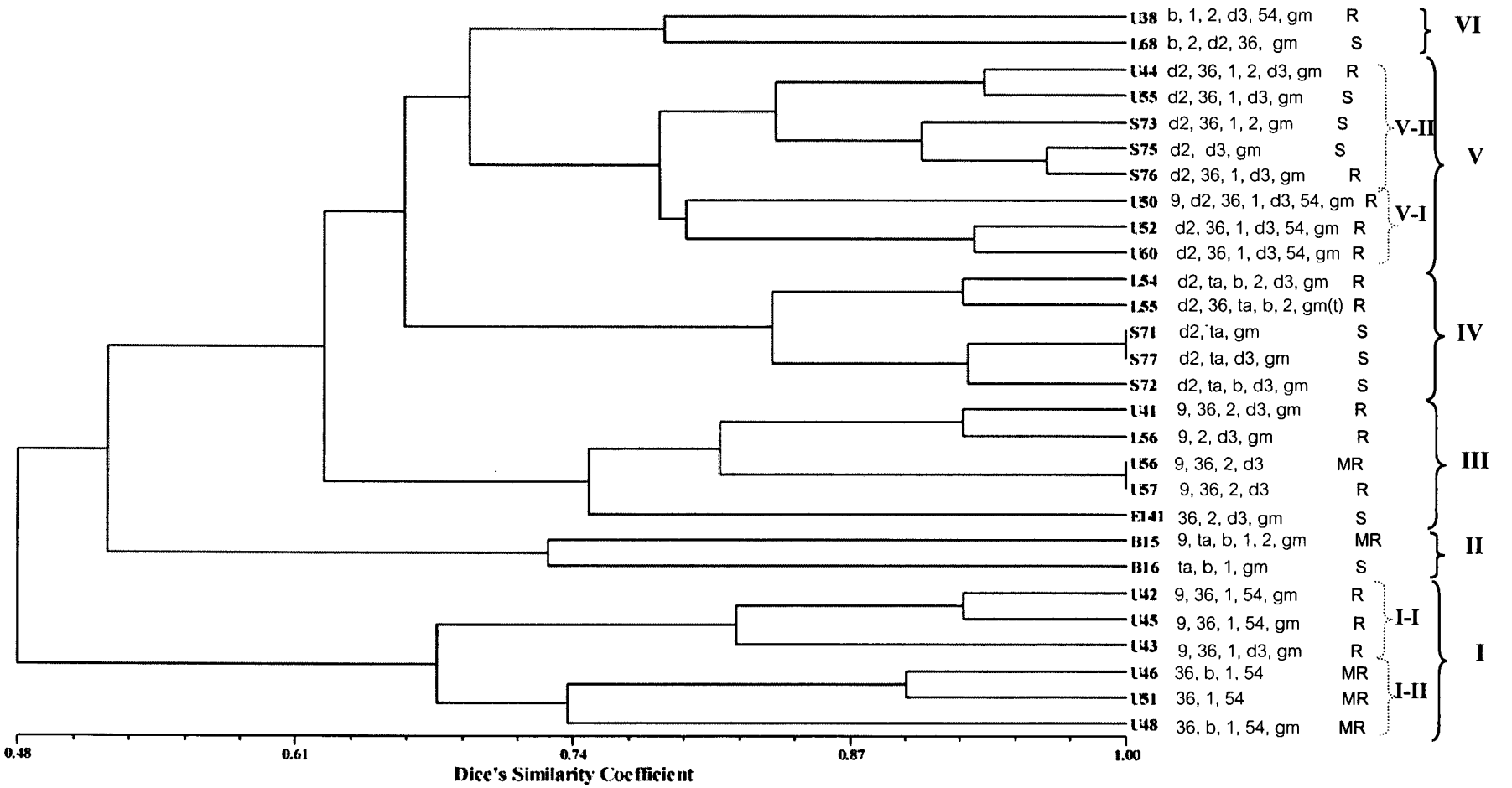
กลุ่มที่ 4 (Cluster IV) มี สมาชิก 5 พันธุ์ ได้แก่ แม่ห้าง Gs.3374 (L54), พานทอง Gs.3375 (L55), หนานหนัก GS.no 10284 (S71), ขืนดิน GS.no 4290 (S77), และ นางมา GS. 7414 (S72) กลุ่มนี้ส่วนใหญ่แสดงปฏิกิริยาการตอบสนองต่อโรคไหม้ในระดับอ่อนแอ ยกเว้นแม่ห้าง Gs.3374 (L54) และ พานทอง Gs.3375 (L55) ที่ตอบสนองต่อโรคไหม้ในระดับต้านทาน

กลุ่มที่ 5 (Cluster V) ประกอบด้วยข้าวพื้นเมือง จำนวน 8 พันธุ์ ภายในกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

Sub-Cluster V-I มี สมาชิก 3 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวกอแผ่ (U52), งอเซระ (U60) และห้วยแล้ง (U50) กลุ่มนี้แสดงปฏิกิริยาการตอบสนองต่อโรคไหม้ในระดับต้านทาน โดยในกลุ่มนี้มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pid2, Pi36, Pi1(t), Pi-d3, Pi54, Pigm(t)* เหมือนกัน

Sub-Cluster V-II มี สมาชิก 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์กะเหรี่ยงขาว (U44), เหลืองลีซอ (U55), เหนียวนาคราช GS. 9982 (S73), แมะแยง GS. 10060 (S75), และ ดอกพวง GS.10062 (S76) กลุ่มนี้แสดงปฏิกิริยาการตอบสนองต่อโรคไหม้ในระดับอ่อนแอ ยกเว้น ข้าวพันธุ์กะเหรี่ยงขาว (U44) และดอกพวง GS.10062 (S76) ที่มีปฏิกิริยาการตอบสนองในระดับต้านทาน

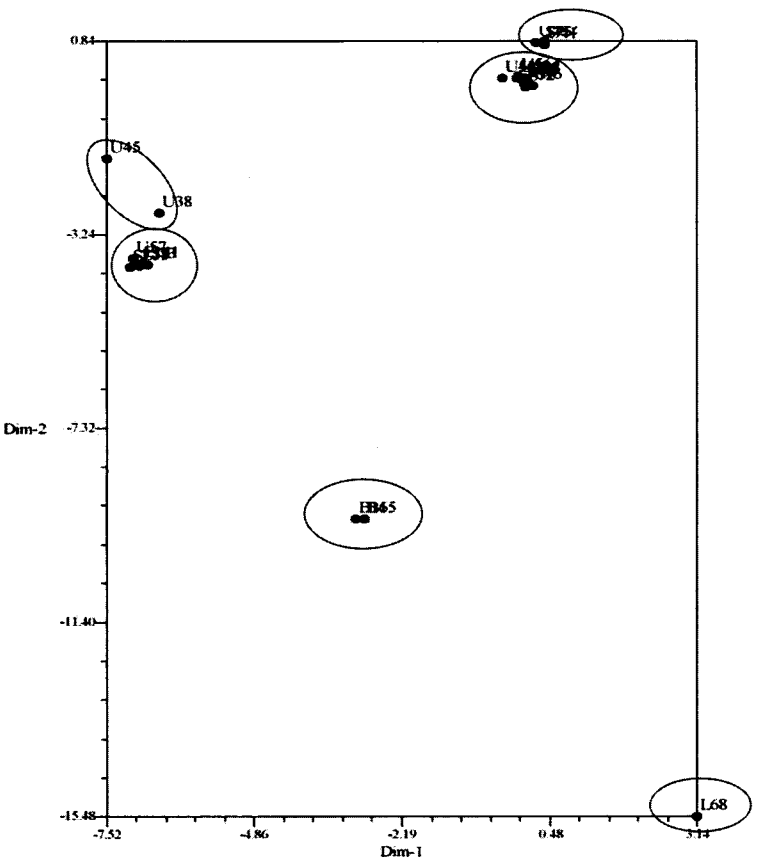
กลุ่มที่ 6 (Cluster VI) ประกอบด้วยข้าวพื้นเมืองจำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์งอเพือน (U38), และป้องแอ้ว 2 Gs.3894 (L68) มีปฏิกิริยาการตอบสนองต่อโรคในระดับต้านทานและอ่อนแอ โดยข้าวพันธุ์ พันธุ์งอเพือน (U38) แสดงปฏิกิริยาการตอบสนองในระดับต้านทาน (R) และ ป้องแอ้ว 2 Gs.3894 (L68) แสดงปฏิกิริยาการตอบสนองในระดับอ่อนแอ (S)



ภาพที่ 42 การจัดกลุ่มทางพันธุกรรม UPGMA ของข้าวพื้นเมืองและข้าวพันธุ์ตรวจสอบ รวมจำนวน 28 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนต้านทานโรคไหม้ (10 ยีน) จำนวน 14 เครื่องหมาย

การวิเคราะห์ (Principal Coordinate Analysis : PCO)

การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองและข้าวพันธุ์ตรวจสอบ จำนวน 28 พันธุ์ โดยการวิเคราะห์ Principal Coordinate (PCO) พบว่า ให้ผลสอดคล้องกับการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมแบบ UPGMA (ภาพที่ 43) โดยค่าวิเคราะห์ปัจจัยหลัก 3 ปัจจัยแรกสามารถอธิบายความผันแปรทั้งหมดของการประเมินความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ 49.94 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 43 แสดง Principal coordinate analysis (PCO) ในพันธุ์ข้าวพื้นเมือง 26 พันธุ์ และข้าวพันธุ์ตรวจสอบ 2 พันธุ์ รวมจำนวน 28 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนต้านทานโรคไหม้ (10 ยีน) จำนวน 14 เครื่องหมาย

จากการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้พบว่ามีข้าวพื้นเมืองบางพันธุ์มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Dice ใกล้ชิดกันมาก แต่มีความสามารถในการต้านทานโรคไหม้แตกต่างกัน เช่น ข้าวพันธุ์กะเหรี่ยงขาว (U44: *Pid2, Pi36, Pi1(t), Pi2, Pi-d3, Pigm(t)*) และ พันธุ์เหลืองลีซอ (U55 *Pid2, Pi36, Pi1(t), Pi-d3, Pigm(t)*) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้ใกล้ชิดกันที่ระดับ 0.93 แต่การตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ของข้าวพันธุ์เหลืองลีซอ อยู่ในระดับอ่อนแอ แต่ข้าวพันธุ์กะเหรี่ยงขาว อยู่ในระดับต้านทาน หากพิจารณาที่ยีนต้านทานโรคไหม้จะพบว่าข้าวพันธุ์กะเหรี่ยงขาวมียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi2* เพิ่มขึ้นมา เมื่อวิเคราะห์ multiple regression ของยีน *Pid2, Pi36, Pi1(t), Pi-d3, Pigm(t)* และ *Pid2, Pi36, Pi1(t), Pi2, Pi-d3, Pigm(t)* พบว่ามีค่า R^2 เท่ากับ 4.58% และ 19.51% ตามลำดับ แสดงว่ายีน *Pi2* มีอิทธิพลช่วยส่งเสริมให้ความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ข้าวพันธุ์กะเหรี่ยงขาวเพิ่มขึ้น ข้าวพันธุ์งอเพือน (U38: *Pib, Pi1(t), Pi 2, Pi-d3, Pi54, Pigm(t)*), และป้องแอ้ว 2 Gs.3894 (L68: *Pi-d2, Pi36, Pib, Pi2, Pigm(t)*) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้ที่ระดับ 0.78 แต่ข้าวพันธุ์งอเพือน (U38) มีการตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในระดับต้านทาน (R) แต่ข้าวพันธุ์ป้องแอ้ว 2 Gs.3894 (L68) มีการตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในระดับอ่อนเอ (S) เมื่อพิจารณาที่ยีนต้านทานโรคไหม้ของข้าวพันธุ์งอเพือน (U38), และป้องแอ้ว 2 Gs.3894 (L68) พบว่าข้าวพันธุ์งอเพือนที่ต้านทานโรคไหม้ในระดับ R มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t), Pi-d3 และ Pi54* ที่แตกต่างจากข้าวพันธุ์ป้องแอ้ว 2 Gs.3894 ซึ่งจากการวิเคราะห์ multiples regression ของยีน *Pi-d2, Pi36, Pib, Pi2, Pigm(t) และ Pib, Pi1(t), Pi 2, Pi-d3, Pi54, Pigm(t)* พบว่ามีอิทธิพลต่อความสารถในการต้านทานโรคไหม้เป็น 0.00 และ 27.01 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่ายีน *Pi1(t), Pi-d3* และ *Pi54* มีอิทธิพลต่อความต้านทานโรคไหม้สูงขึ้นจาก 0.00 เปอร์เซ็นต์ เป็น 27.01 เปอร์เซ็นต์

จากการจัดกลุ่มทางพันธุกรรม แบบ Principal Coordinated Analysis (PCO) (ภาพที่ 41) พบว่า ข้าวพันธุ์งอเพือน (U38) และพันธุ์เหลืองหอม (U45) จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่ข้าวทั้งสองพันธุ์มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้ที่ระดับ 0.58 แต่มีการตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้อยู่ในระดับต้านทาน (R) เหมือนกัน เมื่อเปรียบเทียบยีนต้านทานโรคไหม้ที่พบในข้าวทั้งสองพันธุ์ จะพบว่า ข้าวพันธุ์งอเพือน (U38) และพันธุ์เหลืองหอม (U45) มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pib, Pi1(t), Pi54, และ Pigm* เหมือนกัน เมื่อทำการวิเคราะห์ multiple regression ของยีน *Pib, Pi1(t), Pi54, และ Pigm* พบว่ายีน *Pib, Pi1(t), Pi54, และ Pigm* มีอิทธิพลต่อการต้านทานโรคไหม้ 3.71 เปอร์เซ็นต์ แต่หากพิจารณายีนเพียงตำแหน่งเดียวจะพบว่ายีน *Pi54* มีอิทธิพลต่อความต้านทานมากที่สุด โดยยีน *Pi54* มีอิทธิพลต่อการต้านทานโรคไหม้สูงถึง 13.10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าลักษณะต้านทานที่เกิดขึ้น เป็นอิทธิพลมาจากยีน คือ *Pi54,*

นอกจากนี้ยังพบอีกว่า ข้าวแดง TRI 8409149 (U56: *Pi9, Pi36, Pi2, Pi-d3*) กับ ข้าวมันหมู (U57: *Pi9, Pi36, Pi2, Pi-d3*) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้เหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ข้าวแดง TRI 8409149 (U56) มีความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ในระดับปานกลาง (MR) และ ข้าวมันหมู (U57) มีความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ในระดับต้านทาน (R) โดยข้าวทั้งสองพันธุ์มียีนต้านทานโรคไหม้เหมือนกันคือ *Pi9, Pi36, Pi2* และ *Pi-d3* เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีนต้านทานโรคไหม้ดังกล่าวต่อลักษณะต้านทานโรคไหม้ (multiple regression analysis) พบว่ายีนต้านทานโรคไหม้ทั้ง 4 ตำแหน่ง มีอิทธิพลต่อความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ 18.40 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากข้าวพื้นเมืองเหล่านี้มีพื้นฐานพันธุกรรม (genetic background) ที่ต่างกัน ซึ่งอาจมียีนต้านทานโรคไหม้ชนิดอื่นที่แตกต่างกัน จึงทำให้ระดับความต้านทานของข้าวเหล่านี้แตกต่างกันด้วย โดยในปัจจุบันมีการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้แล้วไม่ต่ำกว่า 70 ยีน (Koide et al., 2009) แต่การวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาเพียง 10 ยีน ซึ่งอาจไม่คลอบคลุมยีนต้านทานโรคไหม้ทั้งหมด หากต้องการทราบปัจจัยที่มีผลต่อความต้านทานที่ต่างกันดังกล่าว ควรมีการทำการศึกษาเพิ่มเติม เนื่องจากลักษณะความต้านทานที่พบในข้าวทั้งสองพันธุ์นี้เป็นอิทธิพลมาจากยีนต้านทานที่ทำการศึกษาในครั้งนี้เพียง 18.40 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่เหลืออีก 81.60 เปอร์เซ็นต์เป็นอิทธิพลมาจากปัจจัยอื่นซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไป

จากข้อมูลในข้างต้นแสดงให้เห็นว่ายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* และ *Pi54 (Pi-k^h)* มีอิทธิพลต่อความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ในระดับสูง และลักษณะต้านทานโรคไหม้ที่พบส่วนใหญ่เกิดจากอิทธิพลของยีนต้านทานโรคไหม้เพียงไม่กี่ยีน ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากการตอบสนองของยีนกับเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่ใช้ทำการทดสอบ ตามทฤษฎี gene for gene ของ Flor (1972) และสอดคล้องกับงานทดลองของ พูนศักดิ์ และคณะ (2550) ซึ่งรายงานว่า ยีนต้านทานโรคไหม้ที่มีศักยภาพแสดงความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่พบในประเทศไทยทั่วประเทศได้ดีที่สุด คือยีน *Pi1(t)* และ *Pik^h* และยีนต้านทานโรคไหม้ที่ดี คือ ยีน *Pi9, Pi5* และ *Pi-ta^2*

ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ในประเทศไทยนั้น ควรมีการรวมยีนต้านทานโรคไหม้หลายๆ ยีน เพื่อให้ข้าวมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้เพิ่มขึ้น อันจะส่งผลให้ข้าวมีความสามารถในการต้านทานโรคไหม้อย่างยั่งยืน ซึ่ง *Pi9* และ *Pi54* เป็นยีนต้านทานโรคไหม้ที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถต้านทานโรคไหม้แบบกว้าง (broad spectrum blast resistance) ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการใช้ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* และ *Pi54* ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของไทยให้ต้านทานโรคไหม้ ตลอดจนยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการค้นพบยีนดังกล่าวในข้าวจากประเทศไทย จากข้อมูลเบื้องต้น จึงควรมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* และ *Pi54* ต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยเพิ่มเติม เพื่อจะได้นำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ได้อย่างยั่งยืน

สรุป

จากการตรวจค้นจีโนมข้าวพื้นเมืองเพื่อค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ จำนวน 10 ยีน ได้แก่ *Pigm(t), Pi1(t), Pi2, Pi9, Pi36, Pi54 (Pi-kh), Pi-d2, Pi-d3, Pi-ta และ Pib* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาตรงตำแหน่งยีน (gene specific markers) [ได้แก่ pB8-Pi9, NBS2-Pi9 *(Pi9),* Pi54indel *(Pi54)* , *Pi-d2,* Pi-d3Cap1, Pi-d3Cap2 *(Pi-d3), Pi-ta และ* Pibdom *(Pib)*] และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรคไหม้ [ได้แก่ Pi54SSR *(Pi54,)* Pigm(t)C5483, Pigm(t)S2974 *[Pigm(t)]* , RM1233 *(Pi1(t)),* SSR140 *(Pi2) และ* R36STS *(Pi36)*] ในข้าวพื้นเมือง รวม 201 พันธุ์ ประกอบด้วย พันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 19 พันธุ์, พันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 38 พันธุ์, พันธุ์ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 144 พันธุ์ แบ่งเป็น ข้าวนาสวนพื้นเมือง และข้าวขึ้นน้ำพื้นเมือง จำนวน 99 และ 45 พันธุ์ตามลำดับ พบการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองภาคต่างๆ โดยยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* มากที่สุด คือ 198 พันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 98.51 ของข้าวพื้นเมืองทั้งหมด (201พันธุ์) รองลงมา ได้แก่ ยีนต้านทานโรค*ไหม้ Pid3, Pi-d2, Pi2(t), Pi36, Pib, Pi9, Pi-ta, Pi1(t),*และ *Pi54* จำนวน 155, 137, 131, 120, 75, 57, 57, 36,และ10 พันธุ์ ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละ 77.11, 68.16, 65.17, 59.70, 37.31, 28.36, 28.36, 17.91 และ 4.98 ของข้าวพื้นเมืองที่ทำการศึกษาทั้งหมดตามลำดับ

ยีนต้านทานโรคไหม้ที่พบมากในข้าวพื้นเมืองแต่ละภาคมีดังนี้ ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือมียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1(t), Pi36,Pi9,* และ *Pi54* มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 94.74, 84.21, 52.63, และ 52.63 ของข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือที่ทำการศึกษา ตามลำดับ ยีนต้านทานโรคไหม้ที่พบมากในข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน คือ *ยีน Pigm(t), Pi2,* และ*Pib,* คิดเป็นร้อยละ 100.00, 84.72 และ 42.36 ของข้าวพื้นเมืองภาคอีสานที่ทำการศึกษาตามลำดับ และในข้าวพื้นเมืองภาคใต้พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pid3* และ *Pigm(t)* ในทุกพันธุ์ที่ทำการตรวจสอบ และพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* และ *Pita* รองลงมา คิดเป็นร้อยละ 97.37 และ 50.00 ของข้าวพื้นเมืองภาคใต้ที่ทำการศึกษา ตามลำดับ

ผลจากการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทย พบว่าข้าวพื้นเมืองพันธุ์อีปง (Gs.3372) (ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคอีสาน) มียีนต้านทานโรคไหม้มากที่สุด จำนวน 9 ยีน ได้แก่ *Pi1(t), Pi2, Pi9, Pi36, Pi-d2, Pi-d3, Pi-ta, Pib* และ *Pigm(t)* รองลงมาคือ พันธุ์หอมมะลิ (Gs.18419; L97) (8 ยีน) และ พันธุ์ห้วยแล้ง (U50) พันธุ์ขี้ตมขาว 222-42-5 (Gs.598; L30) พันธุ์พานทอง (Gs.3375; L55) พันธุ์ข้าวหอม (Gs.4829; L81) และ พันธุ์กะทิ (Gs.5565; L89) ซึ่งมียีนต้านทานโรคไหม้ จำนวน 7 ยีน ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม จากการตรวจสอบจีโนมข้าวพื้นเมืองครั้งนี้ ไม่พบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* และ ยีน *Pi54* ในข้าวพื้นเมืองภาคใต้ ส่วนในข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือนั้นที่นำมาตรวจสอบนั้นไม่พบยีน *Pita* และในข้าวพื้นเมืองภาคอีสานที่นำมาตรวจสอบนั้นไม่พบยีน *Pi54*

จากการศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 8 ไอโซเลท ในข้าวที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* พบว่าเชื้อ *M. grisae* จำนวน 8 isolate ไม่สามารถเข้าทำลายข้าวนิปอนบาเรที่มียีน *Pi9* และข้าวนิปอนบาเรได้

จากการศึกษาปฏิกิริยาการตอบสนองของข้าวพื้นเมืองที่มีการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอว่ามียีนต้านทานโรคไหม้จำนวน 28 พันธุ์ ต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้รวม จำนวน 10 ไอโซเลท พบว่าข้าวพื้นเมืองส่วนใหญ่มีปฏิกิริยาการตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในระดับปานกลาง (MR) จนถึงต้านทาน (R) คิดเป็นร้อยละ 66.67 ของข้าวที่ทดสอบทั้งหมด และข้าวพื้นเมืองภาคเหนือแสดงความต้านทานต่อเชื้อ *M. grisae* รวม 10 isolate ที่ทดสอบดีที่สุด เมื่อนำมาวิเคราะห์รีเกรสชัน พบว่า ลักษณะต้านทานโรคไหม้ที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการทำงานเสริมกันของยีนต้านทานโรคไหม้หลายๆยีน โดยยีน *Pi9* และ *Pi54* มีอิทธิพลต่อลักษณะการต้านทานโรคไหม้มากที่สุด

เมื่อนำข้อมูลมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้โดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของ Dice พบว่าสามารถจัดกลุ่มพันธุกรรมได้ 6 กลุ่ม โดยพันธุ์ข้าวแดง TRI 8409149 (U56) และ พันธุ์ข้าวมันหมู (U57) จากภาคใต้มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้เท่ากับ 1.00 (100 เปอร์เซ็นต์) โดยมียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9, Pi36, Pi2 และ Pi-d3* เหมือนกัน และกลุ่มพันธุ์ข้าวที่ต้านทานโรคไหม้ส่วนใหญ่มียีน *Pi9* และ *Pi54* ซึ่งยีน *Pi9* และ *Pi54* สามารถต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ได้ 20.33 % และ 20.86 % ตามลำดับ

จากการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการสืบค้นยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทย ซึ่งผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นถึงคุณค่าของข้าวพื้นเมือง ซึ่งเป็นแหล่งพันธุกรรมที่สำคัญของยีนต้านทานโรคไหม้ ดังนั้นจึงควรมีการเก็บรักษา และอนุรักษ์ข้าวพื้นเมืองเหล่านี้เอาไว้เพื่อไม่ให้สูญหายไปจากประเทศไทย เพื่อใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมสำหรับปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ได้อย่างยั่งยืน และไม่ให้สูญหายไปจากประเทศไทย และเพื่อให้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการเลือกสายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่จะใช้เป็นคู่ผสมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไทยให้เหมาะสมกับสภาพท้องถิ่นต่อไป

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 แสดงพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคไหม้ จำนวน 29 พันธุ์ และปฏิกิริยาการตอบสนองต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่ศึกษา จำนวน 10 ไอโซเลท

พันธุ์	ยีน	ระดับความรุนแรง	ระดับความต้านทาน
งอเพือน	*Pib, Pi1(t),Pi 2, Pi-d3, Pi54, Pigm(t)*	0	R
ปือก่อ	*Pi9, Pi36, Pi2, Pi-d3, Pigm(t)*		
เหนียวแสงมูเวอ	*Pi9, Pi36, Pi1(t), Pi-d3, Pigm(t)*		
กะเหรี่ยงขาว	*Pid2, Pi36, Pi1(t), Pi2, Pi-d3, Pigm(t)*		
เหลืองหอม	*Pi9, Pi36, Pi1(t), Pi54, Pigm(t)*		
งอเชระ	*Pid2, Pi36, Pi1(t), Pi-d3, Pi54, Pigm(t)*		
แม่ห้าง (Gs.3374)	*Pid2, Pita, Pib, Pi2, Pi-d3, Pigm(t)*		
อีปึ๊ด (Gs.3376)	*Pi9, Pi2, Pi-d3, Pigm(t)*		
ข้าวมันหมู	*Pi9, Pi36, Pi2, Pi-d3*	1	
พานทอง (Gs.3375)	*Pid2, PI36, Pita, Pib, Pi2, Pigm(t)*		
ปือเกษตร	*Pi9, Pi36, Pi1(t), Pi54, Pigm(t)*	2	
ห้วยแล้ง	*Pi9, Pi-d2, Pi36, Pi1(t), Pi-d3, Pigm(t)*		
ข้าวกอแผ่	*Pid2, Pi36, Pi1(t), Pi-d3, Pi54, Pigm(t)*		
ดอกพวง (GS.10062)	*Pid2, Pi36, Pi1(t), Pi-d3, Pigm(t)*		
ปิอิ ชูแม่ฟาง	*Pi36, Pi1(t), Pi54*	3	MR
ข้าวแดง(TRI 8409149)	*Pi9, Pi36, Pi2, Pi-d3*		
จะนอไหน	*Pi36, Pib, Pi1(t), Pi54*	4	
ลายซาน	*Pi36, Pib, Pi1(t), Pi54, Pigm(t)*		
เหลืองลีซอ	*Pid2, Pi36, Pi1(t), Pi-d3, Pigm(t)*		
ชัยนาท 1	*Pi9, Pita, Pib, Pi1(t), Pi2*		
หอมทุ่ง (Gs.20990)	*Pi36, Pi2, Pi-d3, Pigm(t)*	5	S
ป้องแอ้ว 2 Gs.3894)	*Pi-d2, Pi36, Pib, Pi2, Pigm(t)*		
หนานหนัก (GS.no 10284)	*Pid2, Pita, Pigm(t)*		
เหนียวนาคราช (GS. 9982)	*Pid2, Pi36, Pi1(t), Pi2, Pigm(t)*		
แมะแยง (GS. 10060)	*Pid2, Pi-d3, Pigm(t)*		
ขีนดิน(GS.no 4290)	*Pid2, Pita, Pi-d3, Pigm(t)*		
IR64	*Pita, Pib, Pi1(t), Pigm(t)*		
นางมา (GS. 7414)	*Pid2, Pita, Pib, Pi-d3, Pigm(t)*	6	
ขาวดอกมะลิ 105			

ตารางผนวกที่ 2 แสดงจำนวนข้าวพื้นเมืองต้านทานโรคไหม้ในแต่ละภาคของประเทศแยกตามระดับความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ จำนวน 10 ไอโซเลท

ประเภทข้าว	จำนวนพันธุ์แยกตามระดับความต้านทาน			รวม (พันธุ์)
	R	MR	S	
ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ	10	5	0	15
ข้าวพื้นเมืองภาคใต้	1	0	5	6
ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน	3	0	2	5
พันธุ์ตรวจสอบต้านทานโรคไหม้ (ชัยนาท และ IR64)		1	1	2
พันธุ์ตรวจสอบไม่ต้านทานโรคไหม้ (พันธุ์ขาวดอกมะลิ105)			1	1
รวม	14	6	9	29

ตารางผนวกที่ 3 แสดงค่าสัมประสิทธ์ของการตัดสินใจ (Coefficient of determination) หรือ R^2 ค่า P value ค่า Correlation coefficient และ สมการ ที่ได้จากการรวิเคราะห์ถดถอยพหุคูณ (multiple regression analysis) ของยีนต้านทานโรคไหม้ต่อความสามารถในการต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมือง

Marker	R^2 (%)	R^2 adjusted (%)	P-value	Correlation Coefficient	Equation
NBS2Pi9	20.3307		*	0.450896	resistant = 1.53216 +0.415205*NBS2Pi9
pB8Pi9	8.4507		ns	0.290701	resistant = 1.75 +0.25*pB8Pi9
Pi1(t)	3.11818		ns	0.176584	resistant = 1.86325 +0.196581*Pi1(t)
Pi2	3.39876		ns	0.184357	resistant = 1.90769 +0.158974*Pi2
Pi36	9.00297		ns	0.30005	resistant = 1.48947 +0.310526*Pi36
Pi54indel	13.1034		ns	0.361987	resistant = 1.66667 +0.333333*Pi54indel
Pi54SSR	20.8621		*	0.45675	resistant = 1.32143 +0.392857*Pi54SSR
Pib	2.94011		ns	-0.171467	resistant = 2.47368 -0.157895*Pib
Pid2	2.17157		ns	-0.147363	resistant = 2.46429 -0.130952*Pid2
Pid3Cap1	2.48276		ns	0.157568	resistant = 1.85 +0.15*Pid3_Cap1
Pid3Cap2	3.0094		ns	-0.173476	resistant = 2.68182 -0.181818*Pid3_Cap2
Pigm(t) C5483	0.369004		ns	0.0607457	resistant = 1.9 +0.1*Pigm(t) C5
Pigm(t) S2974	0.11232		ns	0.0335142	resistant = 2.16364 +0.0363636*Pigm(t) S2
Pi-ta	11.2644		ns	-0.335624	resistant = 2.71429 -0.333333*Pi-ta
NBS2Pi9, *Pi1(t)*	25.4235	19.4574	*		resistant = 1.04459 +0.437367*NBS2Pi9 +0.252654*Pi1(t)
NBS2Pi9, *Pi36*	29.4285	22.7075	*		resistant = 0.987903 +0.407258*NBS2Pi9 +0.241935*Pi36
NBS2Pi9, Pi54indel	32.8716	27.5013	**		resistant = 1.00575 +0.409483*NBS2Pi9 +0.326149*Pi54indel
NBS2Pi9, Pid3C1	23.9705	17.8881	*		resistant = 1.06893 +0.427984*NBS2_Pi9 +0.182099*Pid3_Cap1
NBS2Pi9, Pid3C2	21.0559	14.7403	*		resistant = 1.79264 +0.399225*NBS2_Pi9 -0.0910853*Pid3_Cap2
NBS2Pi9, *Pi-ta*	26.1899	20.2851	*		resistant = 1.98478 +0.364754*NBS2Pi9 -0.246487*Pi-ta

Marker	R^2 (%)	R^2 adjusted (%)	P-value	Correlation Coefficient	Equation
Pi2, Pi54indel	23.5936	17.4811	*		resistant = 0.92155 +0.439036*Pi54indel +0.296314*Pi2
Pi54indel, Pid3C1	24.3995	18.3515	*		resistant = 0.584975 +0.350985*Pid3_Cap1 +0.472906*Pi54_indel
NBS2Pi9, *Pi1(t)*, Pi54indel	32.911	24.5249	*		resistant = 0.974208 +0.412137*NBS2Pi9 +0.027577*Pi1(t) +0.312718*Pi54indel
NBS2Pi9, *Pi1(t), Pi2*	27.9165	18.9061	*		resistant = 0.684928 +0.39802*NBS2Pi9 +0.324846*Pi1(t) + 0.153164*Pi2
NBS2Pi9, *Pi1(t), Pi36*	38.5215	29.2997	*		resistant = 0.644999 + 0.49794*NBS2Pi9 + 0.418402*Pi1(t) + 0.0394827*Pi36
NBS2Pi9, *Pi1(t), Pid2*	35.0276	24.7687	*		resistant = 0.175352 + 0.564502*NBS2Pi9 + 0.548484*Pi1(t) + 0.116617*Pid2
NBS2Pi9, Pi1(t), Pid3C1	37.5145	29.7039	**		resistant = - 0.353595 + 0.381764*Pid3_Cap1 + 0.483568*NBS2_Pi9 + 0.473931*Pi1(t)
NBS2Pi9, *Pi1(t), Pi-ta*	29.5452	20.7383	*		resistant = 1.51573 + 0.390432*NBS2Pi9 + 0.208848*Pi1(t) - 0.210538*Pi-ta
NBS2Pi9, *Pi2,* Pi54indel	36.8185	28.9208	**		resistant = 0.619973 + 0.351397*NBS2Pi9 + 0.190695*Pi2 + 0.395194*Pi54indel
NBS2Pi9, *Pi36*, Pi54indel	32.6424	22.5388	*		resistant = 0.890727 + 0.405529*NBS2Pi9 + 0.170004*Pi36 + 0.171528*Pi54indel
NBS2Pi9, *Pi36,* Pid3C1	32.0707	21.8813	*		resistant = 0.447835 + 0.400591*NBS2_Pi9 + 0.295276*Pi36 + 0.165354*Pid3_Cap1
NBS2Pi9, *Pi36,* Pigm(t) S2	34.0657	23.6551	*		resistant = 0.291667 + 0.383191*NBS2Pi9 + 0.325499*Pi36 + 0.215456*Pigm(t) S2
NBS2Pi9, Pi54indel, *Pib*	33.0474	24.6783	*		resistant = 1.09167 + 0.396875*NBS2Pi9 + 0.327083*Pi54indel - 0.040625*Pib
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1	46.4815	39.7917	**		resistant = - 0.224047 + 0.433901*NBS2_Pi9 + 0.479319*Pi54_indel + 0.386253*Pid3_Cap1
NBS2Pi9, Pi54indel, Pigm(t) S2	33.8741	25.249	*		resistant = 0.469622 + 0.434319*NBS2Pi9 + 0.316913*Pi54indel + 0.204433*Pigm(t) S2
NBS2Pi9, Pi54indel, *Pi-ta*	34.0462	25.802	*		resistant = 1.29828 + 0.385567*NBS2Pi9 + 0.282131*Pi54indel - 0.120619*Pi-ta
NBS2Pi9, *Pib, Pi-ta*	26.9057	17.7689	*		resistant = 1.86702 + 0.384309*NBS2Pi9 + 0.0917553*Pib - 0.289894*Pi-ta
NBS2Pi9, Pigm(t) S2, *Pi-ta*	29.5984	20.4155	*		resistant = 1.61832 + 0.364973*NBS2Pi9 + 0.176471*Pigm(t) S2 - 0.284091*Pi-ta
Pi1(t), Pid2, Pid3C1	32.8314	22.2258	*		resistant = 0.442933 + 0.613802*Pi1(t) - 0.459854*Pid2 + 0.666556*Pid3_Cap1
Pi2, Pi54indel, *Pib*	28.6725	19.7565	*		resistant = 1.18664 + 0.325438*Pi2 + 0.453103*Pi54indel - 0.209616*Pib
Pi2, Pi54indel, Pid3C1	35.5181	27.4578	*		resistant = - 0.21255 + 0.305179*Pi2 + 0.585657*Pi54_indel + 0.360757*Pid3_Cap1
Pi2, Pi54indel, Pigm(t) S2	27.996	18.6041	*		resistant = 0.476665 + 0.363529*Pi2 + 0.434583*Pi54indel + 0.141321*Pigm(t) S2
Pi54indel, *Pid2,* Pid3C1	33.4846	22.9822	*		resistant = 2.95521 + 0.516453*Pi54indel - 0.320841*Pid2 - 0.659049*Pid3C1

Marker	R^2 (%)	R^2 adjusted (%)	P-value	Correlation Coefficient	Equation
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t)*	48.8878	39.9987	**		resistant = - 0.674098 + 0.459702*NBS2_Pi9 + 0.391038*Pi54_indel + 0.445246*Pid3_Cap1 + 0.229279*Pi1(t)
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi2*	50.5273	41.9234	**		resistant = - 0.61912 + 0.37518*NBS2_Pi9 + 0.549784*Pi54_indel + 0.387662*Pid3_Cap1 + 0.193074*Pi2
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi36*	42.9732	30.9675	*		resistant = - 0.52763 + 0.387363*NBS2_Pi9 + 0.383987*Pi54_indel + 0.39741*Pid3_Cap1 + 0.209105*Pi36
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pib*	46.9714	37.749	**		resistant = -0.446144 + 0.457354*NBS2_Pi9 + 0.486657*Pi54_indel + 0.408871*Pid3_Cap1 + 0.0709628*Pib
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, Pigm(t) S2	46.622	36.9169	**		resistant = - 0.314761 + 0.425904*NBS2_Pi9 + 0.457148*Pi54_indel + 0.379571*Pid3_Cap1 + 0.0716773*Pigm(t) _S2974
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi-ta*	46.5624	37.2689	**		resistant = - 0.124134 + 0.427047*NBS2_Pi9 + 0.464835*Pi54_indel + 0.379583*Pid3_Cap1 - 0.0324404*Pi-ta
NBS2Pi9, Pi54indel, *Pi1(t), Pi2*	37.2551	26.3429	*		resistant = 0.48273 + 0.35602*NBS2Pi9 + 0.354599*Pi54indel + 0.094192*Pi1(t) + 0.205286*Pi2
NBS2Pi9, Pi54indel, *Pi1(t), Pi36*	39.127	26.3116	*		resistant = 0.606075 + 0.526607*NBS2Pi9 - 0.114905*Pi54indel + 0.545326*Pi1(t) + 0.0262538*Pi36
NBS2Pi9, Pi54indel, *Pi1(t), Pib*	33.0976	21.4624	*		resistant = 1.05877 + 0.399472*NBS2Pi9 + 0.311932*Pi54indel + 0.0311688*Pi1(t) - 0.0419237*Pib
NBS2Pi9, Pi54indel, *Pi1(t),* Pigm(t) S2	33.9039	21.8864	*		resistant = 0.432111 + 0.43758*NBS2Pi9 + 0.305904*Pi54indel + 0.0236486*Pi1(t) + 0.207288*Pigm(t) S2
NBS2Pi9, Pi54indel, *Pi1(t), Pi-ta*	34.1203	22.6629	*		resistant = 1.25991 + 0.388809*NBS2Pi9 + 0.26293*Pi54indel + 0.0378892*Pi1(t) - 0.122663*Pi-ta
NBS2Pi9, Pi54indel, *Pi-ta, Pi2*	37.4773	26.6038	*		resistant = 0.86372 + 0.336688*NBS2Pi9 + 0.357877*Pi54indel - 0.0912418*Pi-ta +

Marker	R^2 (%)	R^2 adjusted (%)	P-value	Correlation Coefficient	Equation
					0.179593*Pi2
NBS2Pi9, Pi54indel, *Pi-ta, Pib*	34.0672	22.6007	*		resistant = 1.28667 + 0.38875*NBS2Pi9 + 0.278333*Pi54indel - 0.13*Pi-ta + 0.01625*Pib
NBS2Pi9, Pi54indel, *Pi-ta,* Pigm(t) S2	36.0852	24.4643	*		resistant = 0.901321 + 0.39678*NBS2Pi9 + 0.253097*Pi54indel - 0.163295*Pi-ta + 0.198803*Pigm(t) S2
NBS2Pi9, Pi54indel, *Pi2, Pib*	37.7489	26.9226	*		resistant = 0.77452 + 0.313848*NBS2Pi9 + 0.40637*Pi54indel + 0.21542*Pi2 - 0.096724*Pib
NBS2Pi9, Pi54indel, *Pi2, Pid2*	42.197	29.3518	*		resistant = - 0.943293 + 0.446951*NBS2Pi9 + 0.619512*Pi54indel + 0.379878*Pi2 + 0.322561*Pid2
NBS2Pi9, Pi54indel, *Pi2*, Pigm(t) S2	41.2697	30.5915	*		resistant = - 0.114687 + 0.354737*NBS2Pi9 + 0.405006*Pi54indel + 0.259173*Pi2 + 0.235075*Pigm(t) S2
NBS2Pi9, Pi54indel, *Pib,* Pigm(t) S2	34.0218	22.0258	*		resistant = 0.368243 + 0.446777*NBS2Pi9 + 0.315297*Pi54indel + 0.0378423*Pib + 0.213195*Pigm(t) S2
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t), Pi2*	54.9278	44.6842	**		resistant = -1.34851 + 0.395925*NBS2_Pi9 + 0.445022*Pi54_indel + 0.470227*Pid3_Cap1 + 0.319471*Pi1(t) + 0.243069*Pi2
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t), Pi36*	45.4402	30.2847	*		resistant = - 0.470437 + 0.469626*NBS2_Pi9 + 0.160309*Pi54_indel + 0.329249*Pid3_Cap1 + 0.356475*Pi1(t) + 0.10843*Pi36
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t),* Pigm(t) S2	48.4227	36.1424	*		resistant = - 0.717434 + 0.451559*NBS2_Pi9 + 0.384226*Pi54_indel + 0.42594*Pid3_Cap1 + 0.193449*Pi1(t) + 0.0788067*Pigm(t) _S2974
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t), Pib*	49.4829	38.0017	**		resistant = - 0.929361 + 0.486164*NBS2_Pi9 + 0.397131*Pi54_indel + 0.471541*Pid3_Cap1 + 0.234483*Pi1(t) + 0.0782963*Pib
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t), Pid2*	43.7838	27.2496	ns		resistant = - 0.398734 + 0.379747*NBS2_Pi9 + 0.18038*Pi54_indel + 0.496835*Pid3_Cap1 + 0.487342*Pi1(t) - 0.170886*Pid2
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t),Pi-ta, Pi2*	54.9386	42.0639	**		resistant = -1.39003 + 0.398054*NBS2_Pi9 + 0.450674*Pi54_indel + 0.472884*Pid3_Cap1 + 0.320181*Pi1(t) + 0.0119779*Pi-ta + 0.244652*Pi2

Marker	R^2 (%)	R^2 adjusted (%)	P-value	Correlation Coefficient	Equation
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t),Pi-ta, Pi36*	48.1822	29.8936	*		resistant = -1.56072 + 0.588439*NBS2_Pi9 + 0.0538962*Pi54_indel + 0.274154*Pid3_Cap1 + 0.557146*Pi1(t) + 0.321847*Pi-ta + 0.266592*Pi36
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t),Pi-ta*, Pigm(t) S2	48.9135	33.5876	*		resistant = - 0.467626 + 0.433265*NBS2_Pi9 + 0.349088*Pi54_indel + 0.408958*Pid3_Cap1 + 0.18934*Pi1(t) - 0.0787521*Pi-ta + 0.0815348*Pigm(t) _S2974
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t),Pi-ta, Pib*	50	35.7143	**		resistant = - 0.768018 + 0.479561*NBS2_Pi9 + 0.359036*Pi54_indel + 0.465244*Pid3_Cap1 + 0.236112*Pi1(t) - 0.0929201*Pi-ta + 0.117162*Pib
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t),Pi-ta, Pid2*	46.0259	25.7856	ns		resistant = - 0.920653 + 0.445965*NBS2_Pi9 + 0.0975024*Pi54_indel + 0.518492*Pid3_Cap1 + 0.705572*Pi1(t) + 0.223727*Pi-ta - 0.251681*Pid2
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t),Pi-ta, Pi36*, Pigm(t) S2	47.1468	22.4819	ns		resistant = -1.29405 + 0.433624*NBS2_Pi9 + 0.233072*Pi54_indel + 0.348182*Pid3_Cap1 + 0.183537*Pi1(t) + 0.120462*Pi-ta + 0.313163*Pi36 + 0.133152*Pigm(t) _S2974
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t),Pi-ta, Pi36, Pi2*	54.3384	34.3614	*		resistant = -2.64771 + 0.601877*NBS2_Pi9 + 0.0934221*Pi54_indel + 0.287469*Pid3_Cap1 + 0.846675*Pi1(t) + 0.424302*Pi-ta + 0.177575*Pi36 + 0.289898*Pi2
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t),Pi-ta, Pi2*, Pigm(t) S2	57.8827	42.3659	**		resistant = -1.44895 + 0.364719*NBS2_Pi9 + 0.428206*Pi54_indel + 0.437488*Pid3_Cap1 + 0.288944*Pi1(t) - 0.040691*Pi-ta + 0.294409*Pi2 + 0.119697*Pigm(t) _S2974
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t),Pi-ta, Pi2, Pib*	54.9452	39.1761	**		resistant = -1.3952 + 0.401117*NBS2_Pi9 + 0.448066*Pi54_indel + 0.474704*Pid3_Cap1 + 0.319529*Pi1(t) + 0.00600919*Pi-ta + 0.241238*Pi2 + 0.0101644*Pib
NBS2Pi9, Pi54indel, Pid3C1, *Pi1(t),Pi-ta, Pib*, Pigm(t) S2	54.0639	37.14	*		resistant = - 0.843677 + 0.483649*NBS2_Pi9 + 0.288052*Pi54_indel + 0.457141*Pid3_Cap1 + 0.181907*Pi1(t) - 0.258235*Pi-ta + 0.284721*Pib + 0.123517*Pigm(t) _S2974

ตารางผนวกที่ 4 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) ของข้าวพื้นเมือง จำนวน 26 พันธุ์ และข้าวพันธุ์ตรวจสอบต้านทานโรคไหม้ (B15; พันธุ์ชัยนาท และ B16; IR64) โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอของยีนต้านทานโรคไหม้ (10 ยีน) จำนวน 14 เครื่องหมาย

	U38	U41	U42	U43	U44	U45	U46	U48	U50	U51	U52	U55	U56	U57	U60	E141	L54	L55	L56	L68	S71	S72	S73	S75	S76	S77	B15	B16
U38	1.00																											
U41	0.61	1.00																										
U42	0.67	0.67	1.00																									
U43	0.58	0.74	0.79	1.00																								
U44	0.77	0.81	0.71	0.79	1.00																							
U45	0.58	0.56	0.92	0.85	0.57	1.00																						
U46	0.62	0.30	0.64	0.57	0.47	0.79	1.00																					
U48	0.72	0.31	0.67	0.59	0.48	0.74	0.76	1.00																				
U50	0.69	0.67	0.71	0.79	0.73	0.71	0.47	0.62	1.00																			
U51	0.48	0.31	0.67	0.59	0.48	0.81	0.90	0.71	0.48	1.00																		
U52	0.72	0.62	0.67	0.74	0.83	0.67	0.55	0.64	0.83	0.64	1.00																	
U55	0.69	0.74	0.64	0.86	0.93	0.64	0.53	0.55	0.80	0.55	0.90	1.00																
U56	0.64	0.85	0.67	0.74	0.76	0.59	0.48	0.36	0.62	0.50	0.57	0.69	1.00															
U57	0.64	0.83	0.64	0.72	0.74	0.56	0.44	0.38	0.67	0.46	0.54	0.67	1.00	1.00														
U60	0.64	0.69	0.59	0.67	0.76	0.59	0.48	0.57	0.76	0.57	0.93	0.83	0.50	0.46	1.00													
E141	0.64	0.83	0.64	0.56	0.74	0.56	0.44	0.54	0.52	0.46	0.54	0.67	0.69	0.69	0.62	1.00												
L54	0.64	0.67	0.32	0.40	0.67	0.16	0.22	0.31	0.44	0.08	0.46	0.59	0.46	0.46	0.54	0.62	1.00											
L55	0.64	0.75	0.40	0.48	0.74	0.24	0.30	0.38	0.52	0.15	0.54	0.67	0.54	0.54	0.62	0.69	0.92	1.00										
L56	0.64	0.92	0.59	0.67	0.69	0.52	0.28	0.29	0.55	0.29	0.50	0.62	0.79	0.77	0.57	0.77	0.69	0.62	1.00									
L68	0.78	0.67	0.48	0.56	0.81	0.32	0.44	0.54	0.67	0.31	0.62	0.74	0.69	0.75	0.54	0.67	0.75	0.83	0.54	1.00								
S71	0.48	0.62	0.30	0.52	0.62	0.30	0.21	0.36	0.62	0.21	0.57	0.69	0.43	0.46	0.64	0.62	0.85	0.77	0.64	0.62	1.00							
S72	0.56	0.54	0.22	0.44	0.55	0.22	0.28	0.43	0.55	0.14	0.50	0.62	0.36	0.38	0.57	0.54	0.92	0.85	0.57	0.69	0.93	1.00						
S73	0.69	0.88	0.62	0.69	0.93	0.46	0.36	0.44	0.71	0.37	0.74	0.86	0.67	0.67	0.81	0.81	0.74	0.81	0.74	0.80	0.74	0.67	1.00					
S75	0.56	0.75	0.40	0.64	0.74	0.40	0.30	0.46	0.74	0.31	0.69	0.81	0.54	0.58	0.77	0.75	0.75	0.75	0.69	0.75	0.92	0.85	0.88	1.00				
S76	0.62	0.74	0.50	0.71	0.80	0.50	0.40	0.55	0.80	0.41	0.76	0.87	0.55	0.59	0.83	0.74	0.67	0.74	0.62	0.74	0.83	0.76	0.93	0.96	1.00			
S77	0.48	0.67	0.32	0.56	0.67	0.32	0.22	0.31	0.59	0.23	0.62	0.74	0.46	0.46	0.69	0.62	0.85	0.77	0.69	0.58	1.00	0.92	0.74	0.92	0.81	1.00		
B15	0.48	0.55	0.52	0.43	0.52	0.38	0.43	0.36	0.35	0.36	0.36	0.43	0.64	0.60	0.36	0.50	0.60	0.60	0.55	0.50	0.36	0.45	0.48	0.27	0.35	0.40	1.00	
B16	0.57	0.45	0.43	0.52	0.61	0.48	0.52	0.64	0.43	0.45	0.64	0.70	0.36	0.30	0.64	0.60	0.70	0.70	0.45	0.50	0.64	0.73	0.57	0.55	0.61	0.70	0.73	1.00

การนำเสนอผลงานทางวิชาการ

การนำเสนอผลงานวิจัย

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

Jantasuriyarat, C and S. Katengam. 2009. Rice blast disease and current status of rice blast disease resistance genes research in rice. Khon Kaen Agriculture Journal. 37: 69-78.

Khanthong, S; C. Jantasuriyarat and S. Katengam. 2010. Blast disease and rice breeding for blast disease resistance through marker-assisted selection. Thai Journal of genetics. 3 (2) : 106-119.

Srikeaw, E; C. Jantasuriyarat and S. Katengam. 2010. Screening landrace Thai rice in North and Northeast regions of Thailand for rice blast resistance gene, *Pi-d2*, with DNA marker. Khon Kaen University Research Journal 5 (2): 123-131

Phaitreejit, K., E. Srikaew, C. Jantasuriyarat, T. Sriwongchai, and S. Katengam. 2011. Screening Thai landrace rice for blast resistance gene Pi9, Pi36, Pigm(t) using DNA markers. Thai Journal of Genetics. 4(1): 52-62.

Posters and Proceedings

Khanthong, S; C. Jantasuriyarat and S. Katengam. 2010. The use of DNA marker to investigate rice blast resistant gene, *Pita*, in wild and local Thai rice in Northeast of Thailand. *In* Proceeding of the 4th Ubon Ratchathani University Research Conference. 9-10 August 2010, Laithong Hotel, Ubon Ratchathani. 132-140.

Jantasuriyarat, C., S. Kate-ngam. 2010. Identification of rice blast disease resistance gene, Pi-d2, in local Thai rice cultivars. In 3rd International rice congress. 8-12 November 2010, Hanoi Vietnam. pp.3816.

Khanthong, S; C. Jantasuriyarat and S. Katengam. 2010. Searching for the presence of a broad apectrum blast resistance gene *Pib* in local Thai rice using DNA marker. In: The 1st National rice research conference "Moving rice research towards innovation". 15-17 December 2010, Kasetsart University, Bangkok.