



รายงานผลการวิจัย

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

การค้นหายีนและการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ควบคุมความ
ต้านทานโรคไหม้ของข้าวไทย

IDENTIFICATION AND DEVELOPMENT OF DNA MARKERS FOR
BLAST RESISTANCE GENES FROM THAI RICE

โดย

แสงทอง พงษ์เจริญกิต อุทัย รุ่งเรืองศรี วราภรณ์ แสงทอง



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การค้นหายีนและการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ควบคุมความต้านทานโรคไหม้
ของข้าวไทย

IDENTIFICATION AND DEVELOPMENT OF DNA MARKERS FOR BLAST
RESISTANCE GENES FROM THAI RICE

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2551

จำนวน 323,000 บาท

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. แสงทอง พงษ์เจริญกิต

ผู้ร่วมโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุทัย รุ่งเรืองศรี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ แสงทอง

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

31 สิงหาคม พ.ศ. 2553

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย จากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2551 ขอขอบคุณคณะกรรมการวิจัยมหาวิทยาลัยแม่โจ้ หัวหน้าฝ่ายวิจัย และเจ้าหน้าที่ฝ่ายวิจัยสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตรของมหาวิทยาลัย ที่คอยให้การสนับสนุนในการดำเนินการวิจัยเป็นอย่างดี ขอขอบคุณนางสาวสายันที คำบุญสูง และนายอภิศักดิ์ หลักฐาน บัณฑิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพที่เป็นกำลังสำคัญในการทำวิจัยนี้



สารบัญเรื่อง

	หน้า
สารบัญตาราง	ก
สารบัญภาพ	ข
บทคัดย่อ	1
คำนำ	3
วัตถุประสงค์	6
การตรวจเอกสาร	7
อุปกรณ์และวิธีการ	9
ผลการทดลองและวิจารณ์	20
สรุปผล	32
เอกสารอ้างอิง	33



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 เชื้อราสาเหตุของโรคไหม้ (<i>P. grisea</i>)	10
ตารางที่ 2 แหล่งพันธุ์ข้าวทดสอบ (ชุด A) ที่ใช้ในการทดสอบ	11
ตารางที่ 3 แหล่งพันธุ์ข้าว NILs (ชุด B) ที่ใช้ในการทดสอบ	12
ตารางที่ 4 แสดงค่าความต้านทานแบบ Broad spectrum resistance index (%BSR)	21
ตารางที่ 5 ข้อมูลยืนต้านทานหรือความต้านกับขนาดของยีน $Pi-k'$ ในข้าวไทย	30



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ขั้นตอนการทดสอบโรคไหม้โดย Spraying method	15
ภาพที่ 2 การประเมินระดับความรุนแรงของการเกิดโรคใบไหม้ 7 ระดับ	16
ภาพที่ 3 Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของพันธุ์ข้าวจำนวน 35 พันธุ์ ที่ทดสอบ	22
ภาพที่ 4 ผลการทำ 2% agarose gel electrophoresis ของผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ Pi-ta	23
ภาพที่ 5 ผลการทำ 2% agarose gel electrophoresis ของผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ Pi-37	24
ภาพที่ 6 ผลการทำ 1% agarose gel electrophoresis ของยีน $Pi-k^h$	25
ภาพที่ 7 การเปรียบเทียบลำดับเบสที่อ่านได้จากไพรเมอร์ Pi-kh(F)	26
ภาพที่ 8 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน $Pi-k^h$	28
ภาพที่ 9 การทดสอบไพรเมอร์ของยีน $Pi-k^h$ เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย	31

การค้นหายีนและการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ควบคุม

ความต้านทานโรคไหม้ของข้าวไทย

IDENTIFICATION AND DEVELOPMENT OF DNA MARKERS FOR
BLAST RESISTANCE GENES FROM THAI RICE

แสงทอง พงษ์เจริญกิต อุทัย รุ่งเรืองศรี และวารภรณ์ แสงทอง

SAENGTONG PONGJAROENKIT¹, U-TAI ROONGRUANGSREE² AND
VARAPORN SANGTHONG¹

¹ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สันทราย เชียงใหม่ 50290

² คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สันทราย เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

โรคไหม้ (blast) เป็นโรคที่สำคัญของข้าว โดยในข้าวพันธุ์ต้านทานโรคไหม้จะมียีนต้านทาน (ยีน *Pi*) ในการวิจัยนี้จึงศึกษาความต้านทานต่อโรคไหม้และค้นหายีน *Pi* ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) จากข้าวไทย ผลการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้จำนวน 19 ไอโซเลต พบว่าข้าวไร่พันธุ์น้ำรินและเจ้าฮ่อมีความต้านทานต่อโรคถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าข้าวท่าดอกคำ 1 ของประเทศลาวมีระดับความต้านทาน 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อค้นหายีน *Pi-ta* ยีน *Pi-37* และยีน *Pi-k^h* พบว่าสามารถแยกเพียงยีน *Pi-k^h* ได้จากข้าวไทย ซึ่งยีน *Pi-k^h* ก็เป็นหนึ่งในยีน *Pi* ที่พบในข้าวพันธุ์ต้านทานโรคไหม้ ดังนั้นจึงได้ศึกษาความหลากหลายของยีน *Pi-k^h* ของข้าวไทยจากจีโนมของข้าวจำนวน 29 พันธุ์ พบยีน *Pi-k^h* จำนวน 3 ขนาด คือประมาณ 900, 950 และ 1,100 คู่เบส โดยคาดว่ายีน *Pi-k^h* ขนาด 900 คู่เบส จะเป็นยีนที่ทำให้ต้านทานต่อโรคไหม้ และจากการเปรียบเทียบลำดับเบส ยีน *Pi-k^h* ทั้ง 3 ขนาด พบการแทรกของขึ้นดีเอ็นเอขนาด 37 คู่เบส ในยีน *Pi-k^h* ขนาด 950 คู่เบส และการแทรกของขึ้นดีเอ็นเอขนาด 37 และ 162 คู่เบสในยีน *Pi-k^h* ขนาด 1,100 คู่เบส นอกจากนั้น การทดสอบไพรเมอร์ *Pi-k^hF* และ *Pi-k^hR* พบว่า

สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือกยีน $Pi-k^h$ ขนาด 900 คู่เบส จากยีน $Pi-k^h$ ขนาด 1,100 คู่เบสได้ ดังนั้นสามารถนำข้อมูลความต้านทานต่อโรคไหม้ ความหลากหลายของยีน $Pi-k^h$ ของข้าวไทยและไพรเมอร์ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลต่อไป

คำสำคัญ: โรคไหม้, ความต้านทาน, ยีน $Pi-k^h$, เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Abstract

Blast is an important rice disease. Blast resistance genes (Pi genes) have been reported such as $Pi-1$ (t), $Pi-2$ (t), $Pi-ta$ and $Pi-k^h$. Therefore, the resistance to blast disease of Thai rice and the isolation of Pi genes by polymerase chain reaction (PCR) were investigated in this study. The blast resistance of Thai rice study showed that Nam-Roo and Jow Haw (upland rice) have 100% resistance to 19 isolates of *Magnaporthe grisea*. Moreover Thadongkum 1, rice from Laos, also has the same level of blast resistance. The isolation of Pi genes from Thai rice was able to isolate only $Pi-k^h$ but did not obtain PCR product from $Pi-ta$, $Pi-37$ genes. Then, the $Pi-k^h$ gene was amplified from 29 rice varieties. The result showed 3 forms of $Pi-k^h$ gene which are 900, 950 and 1,100 bp respectively. The resistance information suggested the 900 bp form of $Pi-k^h$ gene may play a role in blast resistance. Sequence comparison revealed the insertion of 37 bp in 950 bp form and the insertion of 37 and 162 bp in 1,100 bp form of $Pi-k^h$. Moreover, the $Pi-k^hF$ and $Pi-k^hR$ primers were tested as DNA markers. The result showed that these primers could be used to separate 900 bp from 1,100 bp form of $Pi-k^h$. Therefore, the blast resistance, the diversity of $Pi-k^h$ gene from Thai rice and primers ($Pi-k^hF$ and $Pi-k^hR$) from this study will be useful for rice breeding program.

Keywords: blast, resistance, $Pi-k^h$ gene, DNA marker

คำนำ

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย แต่ประเทศไทยมีส่วนแบ่งการตลาดรองจากประเทศเวียดนาม เนื่องจากแม้ว่าประเทศไทยจะผลิตข้าวได้มาก แต่มีผลผลิตต่อไร่ต่ำ ในด้านการผลิตข้าวที่ต่ำของไทย มีสาเหตุจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น ปัญหาร้ายธรรมชาติ ปัญหาความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ความไม่เหมาะสมของพื้นที่ (ดินเค็ม) และปัญหาด้านโรคและแมลง พบว่าโรคไหม้ ยังคงเป็นโรคที่มีการระบาดเป็นอันดับ 1 ของโรคและแมลงของข้าว (สถิติการเกษตร สำนักพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร)

โรคไหม้ (Blast) เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia oryzae* (anamorph; *Magnaporthe grisea*) เป็นโรคพบมากในภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ ตะวันตก และภาคใต้ สามารถทำลายข้าวได้ทุกระยะตั้งแต่เริ่มปลูกจนถึงเก็บเกี่ยว ทำให้ต้นข้าวชะงักการเจริญเติบโต ใบจะม้วนและเหลือง ต้นแคระแกร็น หากข้าวอยู่ในระยะตั้งท้องจะผสมไม่ติด ทำให้เมล็ดลีบ ซึ่งวิธีป้องกันกำจัดคือ การใช้สารเคมีคลุกเมล็ดพันธุ์ เช่น คาซูกะมายซิน ไตรไซคลาโซล คาร์เบนดาซิม โปรคลอลาส ในแหล่งที่เคยมีโรคระบาดและพบแผลโรคไหม้ทั่วไป ต้องฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดเชื้อรา เช่น คาซูกะมายซิน อิดิเฟนพอส ไตรไซคลาโซล ไอโซโปรโพรไธเลน คาร์เบนดาซิม หรือการปลูกพันธุ์ต้านทาน เช่น สุรินทร์ 1 เหนียวอุบล 2 เหนียวแพร่ สันป่าตอง 1 หางยี่ 71 กุ่มเมืองหลวง ขาวโปร่งไคร้ (สำหรับภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ) ดอกพยอม (สำหรับภาคใต้) (โรคไหม้ สถาบันวิจัยข้าว) แต่สำหรับพันธุ์หอมดอกมะลิ 105 พันธุ์ กข 6 ที่พันธุ์ข้าวที่มีความต้องการของตลาดสูง กลับไม่มีความต้านทานต่อโรคไหม้

จากแผนแม่บทของการพัฒนาเกษตรของประเทศไทย ที่ออกมาเมื่อปี พ.ศ. 2541 ได้ให้นำเทคโนโลยีมาใช้ในการเพิ่มผลผลิต ลดต้นทุนการผลิต และเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์เกษตร โดยเน้นการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งจากการศึกษาจีโนมข้าว (Rice genome project) ได้รายงานลำดับเบสดีเอ็นเอ (DNA sequence) ความยาวประมาณ 400 ล้านเบส จากความยาวทั้งหมด 430 ล้านเบส ข้อมูลที่รายงานมานั้นสามารถนำมาวิเคราะห์ด้วยชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) เนื่องจากการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพจำนวนมาก ถ้าใช้ชีวสารสนเทศช่วย จะลดระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัยและค่าใช้จ่ายลงไปได้มาก ซึ่งข้อมูลทางชีวสารสนเทศ

ที่ได้นั้นจะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการนำไปพัฒนาให้เกิดงานวิจัยขั้นสูงต่างๆ ต่อไปอย่างมากมาย ซึ่งการใช้ชีวสารสนเทศเป็นการศึกษาวิจัยหลังจีโนม (Post-Genomics) โดยเป็นการอ่านลำดับเบส ที่หาได้ เพื่อค้นหาชิ้นสำคัญที่ควบคุมหรือทำหน้าที่กำหนดคุณสมบัติของข้าว หรือความต้านทาน ของข้าวต่อโรคหรือแมลง และยังสามารถศึกษาว่ายีนแต่ละตัวทำหน้าที่และมีการแสดงออก อย่างไร เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กรรมต่อไป โดยอาศัยความหลากหลายของข้าวป่าและ ข้าวพื้นเมืองของไทย ที่มีจุดเด่นหลายประการ และจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าว ไทยที่มีลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญหลายอย่าง ทำให้นักวิจัยไทยมีโอกาสค้นพบยีนควบคุม ลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญต่างๆ ในข้าวไทยได้ และยังสามารถใช้ข้อมูลเหล่านั้นในการ ปรับปรุงพันธุ์ด้วยเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย (MAS; marker assisted selection) หรือการดัดแปลงพันธุกรรมของข้าวที่มีลักษณะที่ดีทางการค้าให้มีความต้านทานต่อโรคและแมลง

ปัจจุบันมีการรายงานดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA markers) สำหรับความต้านทานโรคไหม้ ที่ส่วนใหญ่เป็น restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) marker ซึ่งการใช้งาน DNA marker ชนิดนี้เป็นงานที่ซับซ้อน ต้องใช้ทักษะและอุปกรณ์ขั้นสูง ในทางตรงกันข้าม DNA marker ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นที่ยอมรับว่าใช้งานได้ง่าย ซึ่งการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายที่วิเคราะห์ด้วย PCR นั้น จะต้องมีข้อมูลลำดับเบสดีเอ็นเอ ของยีนนั้นก่อน โดยยีนต้านทานโรคไหม้นั้น พบรายงานมากกว่า 20 ยีน ยีนควบคุมความต้านทาน โรคไหม้หลัก คือ ยีน *Pi-1 (t)* บนโครโมโซม 11 ยีน *Pi-2 (t)* ยีน *Pi-ta* บนโครโมโซม 6 และยีน *Pi-4 (t)* บนโครโมโซม 12 โดยที่ยีน *Pi-1 (t)* นั้นอยู่ใกล้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย RZ536 (RFLP DNA marker) และ RM224 (SSR DNA marker) ซึ่งจะครอบคลุม 6 cM ประมาณ 1,500 kb (Rice Genetics Newsletter) ในบริเวณเดียวกันนี้ยังมีพบยีน *Pi* อื่น เช่น ยีน *Pi-m* ยีน *Pi-k* และยีน *Pi-f* จากแผนที่ของยีนควบคุมความต้านทานโรคขอบใบแห้งพบกลุ่มของยีน *Pi* อยู่ระหว่าง SSR marker RM224 และ RM123 (Li ZK. *et al.* 2006) ลักษณะโครงสร้างและรายละเอียดของยีน ของโครโมโซม 11 และ 12 ของข้าว Japonica (The Rice Chromosomes 11 and 12 sequencing Consortia. 2005) และโครงสร้างของโปรตีนที่เป็นผลผลิตจากยีน *Pi* ที่พบว่ามี ลักษณะเป็น Nucleotide binding site (NBS) และ Leucine Rich Repeat (LRR) ที่เป็นลักษณะ จำเพาะของ Resistance gene (R gene) ในข้าวและพืชอื่นๆ ดังนั้นหากวิเคราะห์บริเวณระหว่าง RM224 และ RM123 บนโครโมโซม 11 ด้วยการเปรียบเทียบหา ยีนที่มีลักษณะเป็น NBS-LRR

คาดว่าจะสามารถค้นหากลุ่มยีน Pi ที่ควบคุมความต้านทานโรคไหม้จากพันธุ์ข้าวไทยได้ ในโครงการวิจัยนี้สนใจยีน Pi บนโครโมโซม 11 เนื่องจากมียีนต้านทานโรคไหม้หลัก ($Pi-1$) กลุ่มยีน Pi อื่น และยีนต้านทานโรคอื่นๆ จำนวนมากบนโครโมโซมแท่งนี้ ในข้าวไทยนั้นมีเพียงมีการศึกษาโมเลกุลเครื่องหมาย QTL ที่ใกล้กับยีน Pi ในข้าวหอมดอกมะลิ (บนโครโมโซม 9) (Sirithunya P. *et al.* 2002) และข้าวหอมนิลเท่านั้น แต่ยังไม่มีการรายงานยีน Pi จากข้าวไทย ดังนั้นข้อมูลของยีน Pi ที่ค้นหาได้จะใช้ในการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายยีนต้านทาน สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมาย ซึ่งดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ได้จะทำให้การปรับปรุงพันธุ์ข้าวไทย เช่น ข้าวดอกมะลิ 105 หรือ กข 6 ให้ต้านทานต่อโรคไหม้ ทำให้ลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวลง



วัตถุประสงค์

1. เพื่อค้นหาความต้านทานต่อโรคไหม้จากพันธุ์ข้าวของไทย
2. เพื่อพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายที่จำเพาะต่อความต้านทานโรคไหม้ (gene specific DNA marker) ที่แยกได้จากข้าวไทย



การตรวจเอกสาร

ในปัจจุบันมีการศึกษายีนต้านทานโรคพืช (*R gene*) มากกว่า 40 โรค ซึ่งยีนเหล่านี้ถึงแม้จะต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อแตกต่างกัน เช่น แบคทีเรีย รา ไวรัส แมลง แต่ยีนเหล่านี้จะมีบริเวณ (motif) ที่เหมือนกัน คือ Nucleotide binding site (NBS) และ Leucine Rich Repeat (LRR) โดยยีนเหล่านี้มักจะอยู่เป็นกลุ่ม (cluster) บนโครโมโซม เช่นใน *Arabidopsis* มียีน NBS-LRR จำนวน 149 ยีน เช่นเดียวกับข้าวที่พบยีน NBS-LRR จำนวนมากกว่า 600 ยีน โดยยีนต้านทานโรคใหม่มีรายงานแล้วมากกว่า 20 ยีน เช่น ยีน *Pi-1*, *Pi-6* จากพันธุ์ข้าวอเมริกา ยีน *Pi-1*, *Pi-13*, *Pi-22*, *Pi-25*, *Pi-k*, *Pi-k⁵*, *Pi-k^p*, *Pi-k^h*, *Pi-ta*, *Pi-ta²*, *Pi-z*, *Pi-z¹*, *Pi-a*, *Pi-b*, *Pi-f*, *Pi-i* และ *Pi-m* ได้จากข้าว Japonica ซึ่งปัจจุบันยังมีการรายงานยีน *Pi* ใหม่ที่พบในข้าวพันธุ์หรือข้าวป่าต่างๆ เช่น ยีน *Pi9* ที่ได้จากข้าวลูกผสมข้าวป่า (*O. minuta*) ซึ่งเป็นข้าว Indica (Qu S. et al. 2006) ซึ่งยีนเหล่านี้ตั้งอยู่เป็นกลุ่มบนโครโมโซม 6, 11 และ 12 เช่น ยีน *Pi2*, *Pi9* และ *Pigm(t)* อยู่เป็นกลุ่มบนโครโมโซม 6 (Deng Y. et al. 2006) ยีน *Pi-m*, *Pi-1*, *Pi-k*, *Pi-f*, *Pi-1(t)*, *Pi-sh* และ *Pi-lm2* อยู่เป็นกลุ่มบนโครโมโซม 11 ยีน *Pi-31(t)*, *Pi-21-(t)* และ *Pi-32(t)* อยู่เป็นกลุ่มบนโครโมโซม 12 (Li ZK. et al. 2006)

โครงสร้างและรายละเอียดของยีนของโครโมโซม 11 และ 12 ของข้าว (The Rice Chromosomes 11 and 12 sequencing Consortia. 2005) ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมดของโครโมโซมทั้ง 2 แท่ง ขนาดรวม 55.9 Mb พบยีนทั้งหมด 8,455 ยีน โดยเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคต่างๆ (ยีน *R*) จำนวน 289 ยีน ที่ตั้งอยู่บนโครโมโซม 11 และ 12 จำนวน 201 และ 88 ยีน ตามลำดับ ซึ่งจากการวิเคราะห์พบว่าโครงสร้าง NBS-LRR มากที่สุดเป็นจำนวน 73 ยีน (36.6%) ซึ่งโครงสร้างนี้เป็นของยีน *Pi* เช่นกัน ยีน *R* ที่มีโครงสร้าง NBS-LRR เหล่านี้ตั้งอยู่เป็นกลุ่ม 3 กลุ่ม ที่บริเวณ 30-40 cM (5,658,160-7,920,402 bp) 80-90 cM (20,001,952-22,632,644 bp) และ 110-119 cM (26,213,144-28,180,239 bp) ดังนั้นบริเวณเหล่านี้จึงเป็นเป้าหมายในการศึกษาค้นหายีน *Pi* ของข้าวไทย

ปัจจุบันมีการพัฒนา PCR- based allele-specific และ Insertion/Deletion (InDel) marker สำหรับยีน *Pi-z*, *Pi-t*, *Pi-k*, *Pi-ta* และ *Pi-b* จากข้าว Japonica (Hayashi K., Yoshida H. and Ashikawa L. 2006) เนื่องจากยีน *Pi* นั้นนอกจากจะมีจำนวนมากแล้วยีน *Pi* แต่ละยีนยังมีหลายสภาพ (allele) ซึ่งแต่ละสภาพมีความต้านทานแตกต่างกัน เช่น ยีน *Pi-k* มี allelic form คือ *Pi-ks*, *Pi-kp* และ *Pi-km* และจากการอ่านลำดับเบสของยีน *Pi* แต่ละ allele ที่แยกได้พบความแตกต่างกันที่มีลักษณะเป็น Single nucleotide Polymorphisms (SNPs) หรือมีการเพิ่ม/ลดลงของเบสในยีน ดังนั้นการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายเหล่านี้ที่ใช้หลักการเพิ่มจำนวนยีน *Pi* ที่จำเพาะด้วยเทคนิค PCR จะให้ผลรวดเร็วกว่าการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบอื่นๆ เช่น RFLP



อุปกรณ์และวิธีการ

ส่วนที่ 1 การศึกษาความต้านทานโรคไหม้ของข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือในประเทศไทย

1. เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อราสาเหตุของโรคไหม้ (*P. grisea*) จำนวน 19 เชื้อสายพันธุ์ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. ปัทมา ศิริธัญญา หัวหน้าโครงการ Genetic analysis of plant-pathogen interactions between rice (*Oryza sativa*) and rice blast pathogen (*Magnaporthe grisea*) ศูนย์พันธุ์ วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ เลิกเชื้อ 17 เชื้อพันธุ์ที่ครอบคลุม 6 กลุ่มจากที่ได้ จัดกลุ่มโดยเครื่องหมายโมเลกุล AFLP และ 2 เชื้อพันธุ์ที่เป็นกลุ่มพิเศษ โดยประกอบด้วยจาก ภาคเหนือจำนวน 8 เชื้อพันธุ์ ภาคกลางจำนวน 4 เชื้อพันธุ์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 7 เชื้อพันธุ์ (ตารางที่ 1)

2. พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดสอบ

สายพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 35 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ข้าวปลูก ข้าวปรับปรุงที่มียืนต้านทานต่างกัน (Near-isogenic lines) ข้าวต่างประเทศ จากหน่วยปฏิบัติการ ค้นหาและใช้ประโยชน์จากยีนข้าว (Rice Gene Discovery Unit; RGDU) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม และข้าวพันธุ์พื้นเมือง จากมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาในเบื้องต้นครั้งนี้จำนวน 35 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 4 พันธุ์ ข้าวต่างประเทศ จำนวน 6 พันธุ์ ข้าวปลูก จำนวน 12 พันธุ์ และข้าวที่มียืนต้านทาน เดียว (Near-isogenic lines, NILs) จำนวน 10 สายพันธุ์ที่มียืนต้านทานต่างๆ กัน 10 ยีน คือ *Pi2* *Pi1+Pi33* *Pi1* *Pi-4a* *Pi-4a(PKT)* *Pi3* *Pi-4a(TTP)* และ *Pi-4b* ซึ่งในแต่ละชุดมีข้าวพันธุ์ทดสอบ คือ ข้าวหอมนิล (BT) เป็นพันธุ์ต้านทานต่อโรคไหม้และข้าวหอมดอกมะลิ 105 (KDML105) และ ข้าวเหนียว กข6 เป็นข้าวพันธุ์อ่อนแอต่อโรคไหม้เป็นข้าวทุกชุดการทดสอบ รายละเอียดดังต่อไปนี้ ข้าวชุด A จำนวน 25 พันธุ์ดังนี้

ตารางที่ 1 เชื้อราสาเหตุของโรคไหม้ (*P. grisea*)

ลำดับ	ข้อมูลจากโครงการ Genetic analysis of plant-pathogen interactions between rice (<i>Oryza sativa</i>) and rice blast pathogen (<i>Magnaporthe grisea</i>)					
	ชื่อ เชื้อสาเหตุ	กลุ่มตาม AFLP	แหล่งที่แยกเชื้อ			
			จังหวัด	ภาค	พืชอาศัย	ส่วนของพืช
1	THL374	3.1	นครราชสีมา	อีสาน	ข้าว	กาบใบ
2	THL191	3.1	พิษณุโลก	เหนือ	ข้าว	ใบ
3	THL196	3.1	นครปฐม	กลาง	ข้าว	รวง
4	THL119	3.1	เชียงราย	เหนือ	ข้าว	ใบ
5	THL734	3.2	แม่ฮ่องสอน	เหนือ	ข้าว	คอรวง
6	THL795	3.2	เชียงใหม่	เหนือ	ข้าว	คอรวง
7	THL794	3.2	เชียงใหม่	เหนือ	ข้าว	คอรวง
8	THL934	3.3	หนองคาย	อีสาน	ข้าว	ใบ
9	THL1118	3.3	อุบลราชธานี	อีสาน	ข้าว	คอรวง
10	THL1119	6	หนองคาย	อีสาน	ข้าว	คอรวง
11	THL84	7	พิษณุโลก	เหนือ	ข้าว	ใบ
12	THL557	7	ตาก	เหนือ	ข้าว	คอรวง
13	THL1003	7	กรุงเทพฯ	กลาง	ข้าว	คอรวง
14	THL949	7	สุพรรณบุรี	กลาง	ข้าว	คอรวง
15	THL244	8	ปทุมธานี	กลาง	ข้าว	ใบ
16	THL54	10	แพร่	เหนือ	ข้าว	ใบ
17	TH-16	Ungroup	ขอนแก่น	อีสาน	บาร์เลย์	เมล็ด
18	B1-2	-	อุบลราชธานี	อีสาน	ข้าว	ใบ
19	THL16	-	อุบลราชธานี	อีสาน	ข้าว	ใบ

ตารางที่ 2 แหล่งพันธุ์ข้าวทดสอบ (ชุด A) ที่ใช้ในการทดสอบ ประกอบด้วยชื่อพันธุ์ (รหัสพันธุ์)
ประเภทของข้าวและ แหล่งเมล็ด

ลำดับ	รหัส	ชื่อพันธุ์ (รหัสพันธุ์)	ประเภท	แหล่งเมล็ด
1	Check1	เจ้าหอมนิล (BT)	ข้าวปลูก	RGDU, ม.เกษตรฯ กำแพงแสน
2	Check2	KDML105	ข้าวปลูก	RGDU, ม.เกษตรฯ กำแพงแสน
3	Check3	กข.6(RD6)	ข้าวปลูก	RGDU, ม.เกษตรฯ กำแพงแสน
4	MJ1	น้ำรุ	ข้าวพื้นเมือง	ม.แม่โจ้, เชียงใหม่
5	MJ2	เจ้าฮ่อ	ข้าวพื้นเมือง	ม.แม่โจ้, เชียงใหม่
6	MJ3	หนองเขียว	ข้าวพื้นเมือง	ม.แม่โจ้, เชียงใหม่
7	MJ4	แพรว1	ข้าวพื้นเมือง	ม.แม่โจ้, เชียงใหม่
8	MJ5	พิษณุโลก	ข้าวปลูก	ม.แม่โจ้, เชียงใหม่
9	MJ6	หอมคลองหลวง	ข้าวปลูก	ม.แม่โจ้, เชียงใหม่
10	MJ7	ปทุมธานี	ข้าวปลูก	ม.แม่โจ้, เชียงใหม่
11	MJ8	สุพรรณบุรี	ข้าวปลูก	ม.แม่โจ้, เชียงใหม่
12	MJ9	ชัยนาท	ข้าวปลูก	ม.แม่โจ้, เชียงใหม่
13	MJ10	หอมนิล	ข้าวปลูก	ม.แม่โจ้, เชียงใหม่
14	MJ11	ไทซุง65	ข้าวต่างประเทศ	ม.แม่โจ้, เชียงใหม่
15	C1	กข1	ข้าวปลูก	กรมการข้าว
16	C2	ทำดอคำ 1	ข้าวต่างประเทศ	ประเทศลาว
17	C3	ชัยนาท1	ข้าวปลูก	กรมการข้าว
18	C4	สุพรรณบุรี 1	ข้าวปลูก	กรมการข้าว
19	C5	ปิ่นเกษตร	ข้าวปลูก	RGDU, ม.เกษตรฯ กำแพงแสน
20	C6	พิษณุโลก 60	ข้าวปลูก	กรมการข้าว
21	C7	สุพรรณบุรี 3	ข้าวปลูก	กรมการข้าว
22	C8	IR62266	ข้าวต่างประเทศ	IRRI, ฟิลิปปินส์
23	C9	Azucena	ข้าวต่างประเทศ	IRRI, ฟิลิปปินส์
24	C10	CT9993	ข้าวต่างประเทศ	IRRI, ฟิลิปปินส์
25	C11	IR64	ข้าวต่างประเทศ	IRRI, ฟิลิปปินส์

หมายเหตุ : IRRI; International Rice Research Institute, Philippine

RGDU; Rice Gene Discovery Unit คือ หน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์จากยีนข้าว

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม ประเทศไทย

ข้าวชุด B ข้าว NILs (Near-isogenic lines)

ข้าวชุด B เป็นข้าวที่มียีนต้านทานเดียว (Near-isogenic lines) ที่ประกอบด้วยสายพันธุ์ข้าวจำนวน 9 พันธุ์ ดังนี้

ตารางที่ 3 แหล่งพันธุ์ข้าว NILs (ชุด B) ที่ใช้ในการทดสอบ ประกอบด้วยชื่อพันธุ์ (รหัสพันธุ์) ยีนต้านทาน จากแหล่งเมล็ดและประเทศ

สายพันธุ์ข้าว	ยีนต้านทาน
C101A5	<i>Piz-5, Pi-2</i>
C101LAC	<i>Pi-1</i>
C104LAC	<i>Pi 1(t)LAC</i>
C101PKT	<i>Pi4a(t)</i>
C102PKT	<i>Pi4a(t)PKT</i>
C104PKT	<i>Pi 3</i>
C101TTP	<i>Pi4a(t)TTP</i>
C103TTP	<i>Pi 1(t)TTP</i>
C105TTP-4-L23	<i>Pi 4b(t)</i>
CO-39	-

3. การเตรียมเชื้อ (inoculum)

เลี้ยงเชื้อ *P. grisea* ที่เก็บอยู่ในกระดาศรongsบนอาหาร RFA (Rice Flour Agar) ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยให้แสงฟลูออเรสเซนซ์เป็นเวลา 7-9 วัน จากนั้นเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสปอร์โดยการถูผิวหนังอาหาร (scraping)

ด้วยแท่งแก้วเบา ๆ ให้เส้นใยของเชื้อราขาด แล้วย้ายไปเก็บไว้ตูบ่มในสภาพให้แสง Blue black light โดยให้แสง 12 ชั่วโมงสลับกับการไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง เป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง ใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อปรับความเข้มข้นสปอร์ให้ได้ 10×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร นับโดย haemocytometer ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นผสมเจลาติน 0.5 % แล้วนำมาทดสอบต่อไป

4. การเตรียมพืชทดสอบ

นำเมล็ดข้าวมาเพาะในถาดหลุมสีดำที่มีดินนา ผสมกับปุ๋ยรองพื้น 16-20-0 ใส่ปริมาณ 1 กรัมต่อ 1 ตารางเมตร โดยเพาะ 1 สายพันธุ์ต่อหลุม หลุมละ 5 เมล็ด ใส่ปุ๋ยยูเรีย 2 ครั้ง ครั้งละ 1 กรัมต่อ 1 ตารางเมตร เมื่อต้นข้าวอายุ 2 สัปดาห์ และ 1 วันก่อนการปลูกเชื้อ รดน้ำทุกวัน เมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 21 วัน จึงนำมาทดสอบต่อไป

5. วิธีการทดสอบโรคโดย Spraying method

นำต้นข้าวที่อายุ 21 วันมาทดสอบกับเชื้อจำนวน 19 เชื้อสายพันธุ์ในห้องสำหรับปลูกเชื้อ โดยใช้เครื่องปั๊มลม (Air brush pressure) ฉีดพ่นให้ทั่วทั้งต้น เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ในสภาพความชื้นสูง (moist chamber) เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงหรือข้ามคืน (Veillet และคณะ, 1996) จากนั้นย้ายมาเก็บรักษาในโรงเรือนที่สามารถควบคุมความชื้นได้ เพื่อให้เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค รดน้ำทุกวัน (แสดงในภาพที่ 1) และทำการประเมินระดับความรุนแรงของโรค หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน บันทึกผลโดยใช้ scale 7 ระดับตั้งแต่ 0-6 (Roumen และคณะ, 1997) โดยระดับ 0-2 เป็นปฏิกิริยาที่ข้าวต้านทานต่อเชื้อ (Resistant) ระดับ 3-4 ต้านทานปานกลาง (Moderate) และระดับ 5-6 อ่อนแอ (Susceptible) ดังแสดงในรูปภาพที่ 2 แล้วใช้โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูล NTSYS-pc version 2.01 ทำการจัดกลุ่มเชื้อ (cluster) โดยทำ Phonogram แล้วเปรียบเทียบเพื่อหาความสัมพันธ์ของลักษณะความรุนแรงในการเกิดโรคต่อไป

6. การคำนวณค่าความต้านทานของพันธุ์ข้าวต่อเชื้อโรคไหม้แบบ Broad spectrum resistance index (BSR)

ค่าความต้านทานของพันธุ์ข้าวต่อเชื้อโรคไหม้ เป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถของพันธุ์ข้าวแต่ละสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบว่าสามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อที่นำมาทดสอบได้มากน้อยเท่าไรโดยคำนวณจาก

สูตร Broad spectrum resistance index, BSR (%)

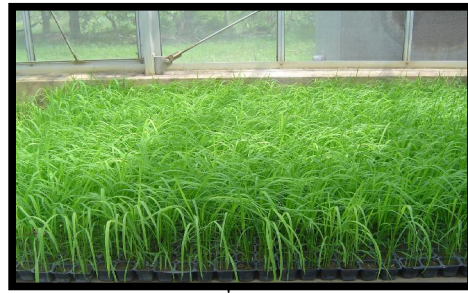
= $\frac{\text{No. of blast isolates affected to rice, showed resistance reaction}}{\text{No. of total blast isolates}} \times 100$

No. of total blast isolates





Stock culture เชื้อในรูป filter paper เก็บ -20 °C



ต้นกล้าอายุ 21 วันที่เพาะในโรงเรือน



เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร RFA ที่ 25 °C นาน 7 วัน

เพื่อนำมาให้เกิดการสร้างสปอร์



ฉีดพ่น inoculums 10×10^4 สปอร์/ml + 0.5% gelatin



ห้องควบคุมอุณหภูมิ 20 °C และความชื้นสูง 1 คืน

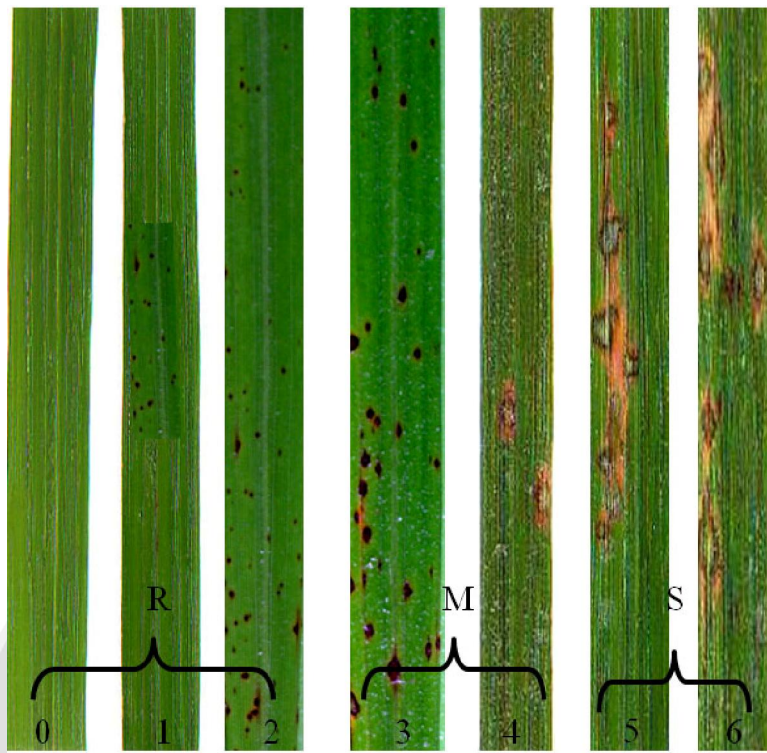


ย้ายไปโรงเรือนที่ใช้ในการทดสอบ



ทำการประเมินโรคหลังจากการปลูกเชื้อ 7 วัน

ภาพที่ 1 ขั้นตอนการทดสอบโรคไหม้โดย Spraying method



ภาพที่ 2 การประเมินระดับความรุนแรงของการเกิดโรคใบไหม้ 7 ระดับ ตั้งแต่ระดับ 0-6 โดยที่ระดับความรุนแรงในการเกิดโรคใบไหม้ แต่ละระดับแสดงลักษณะดังต่อไปนี้

- | | |
|---------|---|
| ระดับ 0 | ไม่มีแผลปรากฏ |
| ระดับ 1 | แผลจุดกลมสีน้ำตาลเล็ก ๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร ไม่มีการสร้าง conidia |
| ระดับ 2 | แผลกลมหรือรียาวขนาดเล็กน้อยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5-1 มิลลิเมตร แผลไม่มีการสร้าง conidia |
| ระดับ 3 | แผลจุดเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1-3 มิลลิเมตร และมีจุดสีเทาตรงกลางแผล |
| ระดับ 4 | แผลจุดเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตรหรือยาวกว่า แผลเป็นสีเทาและมีขอบแผลสีน้ำตาล |
| ระดับ 5 | แผลสีเทาเกาะกันเป็นกลุ่ม มีขอบแผลสีน้ำตาล เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค |
| ระดับ 6 | แผลลุกลามยาวติดต่อกันเป็นสีเทา ไม่มีขอบแผลที่แน่นอน เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค |

ส่วนที่ 2 การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับความต้านทานโรคไหม้ในข้าวไทย

1. ตัวอย่างข้าว

ในการศึกษานี้ ใช้ข้าวจำนวน 29 พันธุ์ ดังนี้ ข้าวดอกมะลิ 105, ข้าวหอมแดง, กข 1, กข 6, กข 33, กข 39, แพร่ 1, กข 29 (ชัยนาท 80), ข้าวเจ้าหอมคลองหลวง 1, ปทุมธานี 1, สุพรรณบุรี 60, ข้าวเจ้าหอมพิษณุโลก 1, สันป่าตอง 1, แจ็กเซยเส้าไห้ (แจ็กเซย 1), เล็บนกปัตตานี, เหลืองประทีพ 123, ปราชญ์บุรี 2, นางมลิ เอส-4, พลายงามปราชญ์บุรี, ขาวตาแห้ง 17, สังข์หยดพัทลุง, 65 วัน, อีแลป (แม่แลบหนัก), หางยี 71, น้ำรุ, เจ้าฮ่อ, บาสมาติ, ไทซุง 65 และนิปปอนบาเล และลูกผสมชั่วแรก (F₁) ระหว่าง กข 6 กับน้ำรุ

2. ไพร์เมอร์ (primer)

ในการทดลองนี้ใช้ไพร์เมอร์ 3 คู่ ที่ออกแบบจากยีน *Pi-kh* ยีน *Pi-ta* และ *Pi-37* ตามลำดับ ซึ่งมีลำดับเบส ได้แก่

คู่ที่ 1 *Pi-kh* R (5'- ATG GTT CTT TAA AAT TGG GGC -3')

Pi-kh F (5'- ATG GCA AAA CTT DAA GAG AAA G -3')

คู่ที่ 2 *Pi-ta* R (5'- GGT TTC AAA CAA TCA TCA AGT CAG GTT -3')

Pi-ta F (5'- AGG CAT AAT CTC GAT CAC TAG CTC TGA TC -3')

คู่ที่ 3 *Pi-37* R (5'- TCT AGT CGA CGT TTC CCA ATC TGG CAC AGC -3')

Pi-37 F (5'- GTA CGT CGA CCC TAC CGA GTC CAG CAA AAT -3')

3. วิธีสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว

ในการสกัด Genomic DNA จากใบข้าว ใช้ชุด GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (SIGMA®) โดยตัดใบอ่อนของข้าวตัวอย่างประมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง นำไปแช่ในไตรเจนเหลว แล้วบดใบข้าวด้วยลูกปัดให้เป็นผงละเอียด นำลูกปัดออก จากนั้นนำผงใบข้าวมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของชุดสกัด วิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ดีเอ็นเอที่สกัดได้จะเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค PCR

การทำ PCR จะใช้ Go Taq® Green Master Mix (Promega) ดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดได้ และไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ ด้วยเครื่อง PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) โดยใช้สภาวะที่อุณหภูมิ 95 °ซ 5 นาที จากนั้นเข้าสู่ 95 °ซ 45 วินาที 54 °ซ 45 วินาที และ 72 °ซ 90 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ สุดท้ายอุณหภูมิ 72 °ซ 7 นาที วิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis จากนั้นเก็บผลผลิต PCR ที่ -20 °ซ

5. การโคลนยีน *Pi-k^h*

สำหรับชิ้นยีน *Pi-k^h* ที่ได้จากการทำ PCR จะทำให้บริสุทธิ์ด้วย PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) แล้วเชื่อมชิ้นยีน *Pi-k^h* ที่แยกบริสุทธิ์ได้ กับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy โดยชุด pGEM®-T Easy Vectors System I (Promega) ตามวิธีการของชุดการเชื่อม ถ่ายดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมเข้าสู่เซลล์ *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α ด้วยชุด TransformAid™ Bacterial Transformation Kit (Fermentas) เพาะเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการถ่ายดีเอ็นเอบนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน, x-gal และ IPTG บ่มที่ 37 °ซ ซ้ำมคืน จากนั้น คัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาว ที่เป็นโคโลนีที่มีดีเอ็นเอสายผสม สกัดดีเอ็นเอสายผสมด้วยวิธีการ CTAB Mini Plasmid Preparation และละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย 5 mM Tris-HCl pH 8.5 ปริมาตร 20 - 30 ไมโครลิตร (μl) เก็บดีเอ็นเอสายผสมที่สกัดได้ที่ -20 °ซ

6. การหาลำดับเบส และการวิเคราะห์

ดีเอ็นเอสายผสมของยีน $Pi-k^h$ จะส่งไปหาลำดับเบสที่บริษัท 1st Base Sequencing (Malaysia) และผลการหาลำดับเบสจะนำไปเปรียบเทียบกับยีน $Pi-k^h$ อื่นๆ ด้วยโปรแกรม ClustalX

7. การทดสอบไพรเมอร์เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย

นำดีเอ็นเอของลูกผสมชั่วแรก (F_1) ระหว่างข้าว กข 6 กับ น้ำอู (Pi- k^h กข 6/Pi- k^h น้ำอู) มาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR แล้ววิเคราะห์ด้วย 1% agarose gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบว่า จะได้ดีเอ็นเอ 2 ขนาดตามที่คาดหมายหรือไม่



ผลการทดลองและวิจารณ์

ส่วนที่ 1 การศึกษาความต้านทานโรคไหม้ของข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือในประเทศไทย

ผลจากการทดสอบความสามารถทำให้เกิดโรคในสายพันธุ์ข้าวจำนวน 35 พันธุ์กับเชื้อจำนวน 19 ไอโซเลต พบว่า ข้าวแต่ละพันธุ์มีการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเชื้อราที่มีระดับความรุนแรงแตกต่างกันและเหมือนกันโดยแสดงปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ข้าวกับเชื้อสาเหตุโรคให้ค่าความต้านทานของพันธุ์ข้าวต่อเชื้อโรคไหม้แบบ Broad spectrum resistance index (BSR) ความต้านทานของพันธุ์ข้าวต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้แบบ BSR พบว่ามีข้าวจำนวน 5 พันธุ์ที่ให้ค่าความต้านทาน 100% ได้แก่ พันธุ์ C104LAC ที่มียีนต้านทาน *Pi-1* และข้าวพื้นเมือง 4 พันธุ์ได้แก่ข้าวน้ำริน ข้าวเจ้าฮ่อ ข้าวหนองเขียว และ ข้าวท่าดอกคำ1 พันธุ์เหล่านี้จัดเป็นพันธุ์ต้านทาน และมีข้าว 13 พันธุ์ที่มีความต้านทานแบบ Broad spectrum resistance สูง ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์ BSR มากกว่า 80.0% ส่วนพันธุ์ข้าวที่ให้ค่าความต้านทานต่ำ ได้แก่ พันธุ์ KDML105 ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ข้าวปิ่นเกษร ข้าวหอมคลองหลวง และ CO39 ให้ค่า ค่าเปอร์เซ็นต์ BSR คือ 42.1 47.4 47.4 47.4 และ 52.6% ตามลำดับ ซึ่งพันธุ์เหล่านี้จัดเป็นพันธุ์อ่อนแอโดยพันธุ์ KDML105 ให้ค่า BSR ที่ต่ำสุด ซึ่งถือว่าเป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อการเกิดเชื้อราโรคไหม้ที่ทำการทดสอบ (แสดงค่าในตารางที่ 4)

เมื่อนำข้อมูลมาจัดกลุ่มสายพันธุ์ข้าว สามารถแบ่งกลุ่มพันธุ์ข้าวได้ 6 กลุ่ม ที่ระดับความเหมือน ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3) โดยสายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองส่วนใหญ่จะแบ่งกลุ่มตามความสามารถต้านทานโรค กลุ่ม 1 2 และ 6 เป็นกลุ่มข้าวที่ให้ความต้านทานสูง และ กลุ่ม 5 ให้ความต้านทานระดับปานกลาง กลุ่มที่ 3 และ 4 เป็นกลุ่มที่ ข้าวที่มีความอ่อนแอโรคไหม้ โดยเป็นกลุ่มเดียวกันกับพันธุ์ข้าว Susceptible check คือ ข้าวหอมมะลิ105 ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 และ ข้าว CO39

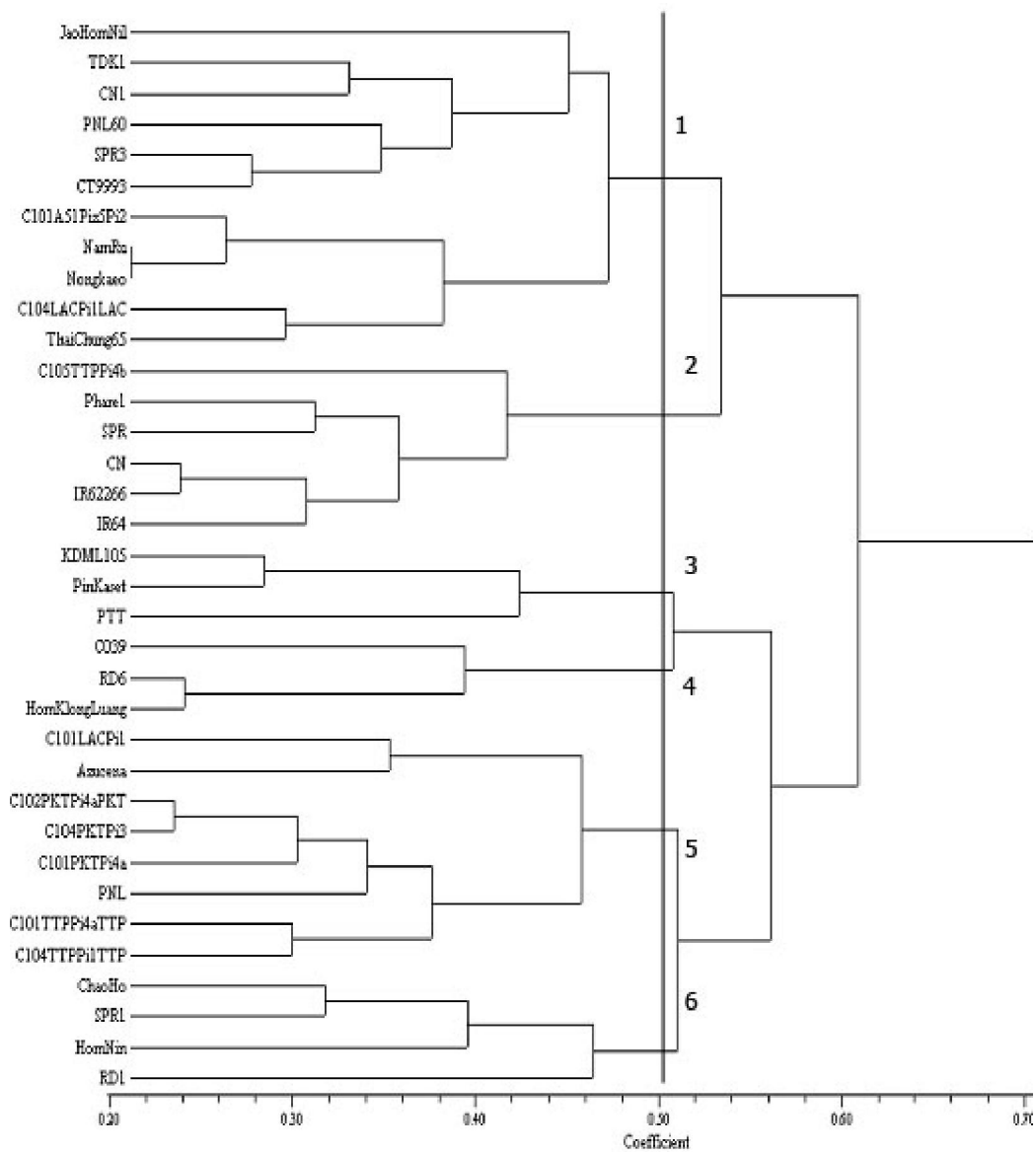
กลุ่ม 1 เป็นกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดมีจำนวน 11 พันธุ์ และสามารถแยกได้เป็น 3 กลุ่มย่อยที่ระดับความเหมือน 60% ข้าวกลุ่ม 1 มีความต้านทานโรคไหม้อย่างสูงและเป็นกลุ่มเดียวกันกับข้าว Resistance check ส่วนข้าวพื้นเมืองพันธุ์น้ำรินและหนองเขียวเป็นกลุ่มเดียวกันกับข้าว NILs ที่มี

ยีนต้านทาน *Pi2* และ *Pi-5z* กลุ่ม 2 ข้าวพื้นเมืองพันธุ์แพร่ 1 เป็นกลุ่มเดียวกันกับข้าว NILs ที่มียีนต้านทาน *Pi4b* และ ข้าวพันธุ์ปรับปรุงจาก IRRI ที่กระจายตัวอยู่ในทุกกลุ่ม 2 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าข้าวพื้นเมืองเหล่านั้นมียีนต้านทานกลุ่มเดียวกันกับยีนเหล่านี้ซึ่งมียีนต้านทานเพียงยีนเดียวหรืออาจมียีนต้านทานมากกว่าหนึ่งยีนหรืออาจเป็นยีนต้านทานชนิดอื่นๆ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงควรเพิ่มปริมาณสายพันธุ์ข้าว NILs หรือพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานอื่นๆ เพื่อให้ครอบคลุมและเพิ่มโอกาสที่จะค้นพบยีนต้านทานใหม่ ๆ จากข้าวพื้นเมือง เพื่อนำมาใช้ในอนาคต

ตารางที่ 4 แสดงค่าความต้านทานแบบ Broad spectrum resistance index (%BSR) ของข้าว

จำนวน 35 สายพันธุ์ต่อเชื้อราโรคไหม้ 19 ไอโซเลต

ลำดับ	พันธุ์	%BSR	ลำดับ	พันธุ์	%BSR
1	BT	89.5	19	หอมคลองหลวง	47.4
2	KDML105	42.1	20	ปทุมธานี	73.7
3	C101A51	89.5	21	สุพรรณบุรี	73.7
4	C101LAC	94.7	22	ชัยนาท	73.7
5	C104LAC	100.0	23	หอมนิล	89.5
6	C102PKT	57.9	24	ไททุ่ง65	78.9
7	C101PKT	63.2	25	กข1	94.7
8	C104PKT	68.4	26	ทาดอกคำ1	100.0
9	C101TTP	73.7	27	ชัยนาท1	94.7
10	C104TTP	94.7	28	สุพรรณบุรี1	84.2
11	C105TTP	89.5	29	ปิ่นเกษร	47.4
12	C039	52.6	30	พิษณุโลก60	89.5
13	RD6	47.4	31	สุพรรณบุรี3	94.4
14	น้ำรู่	100.0	32	IR62266	78.9
15	เจ้าฮ่อ	100.0	33	Azucena	78.9
16	หนองเขียว	100.0	34	CT9993	94.7
17	แพร่ 1	73.7	35	IR64	78.9
18	พิษณุโลก	84.2			



ภาพที่ 3 Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของพันธุ์ข้าวจำนวน 35 พันธุ์ที่ทดสอบ

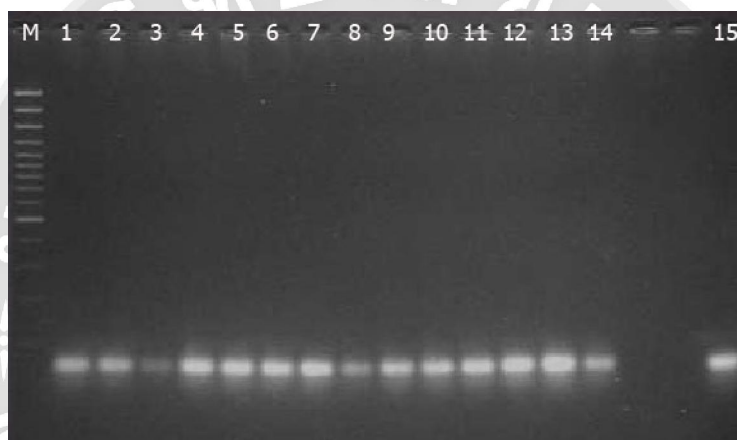
ความสามารถในการเกิดโรคไหม้ ด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ Canberra's coefficient

สามารถจัดกลุ่มพันธุ์ข้าวได้ 6 กลุ่ม ที่ระดับความเหมือนกัน 50%

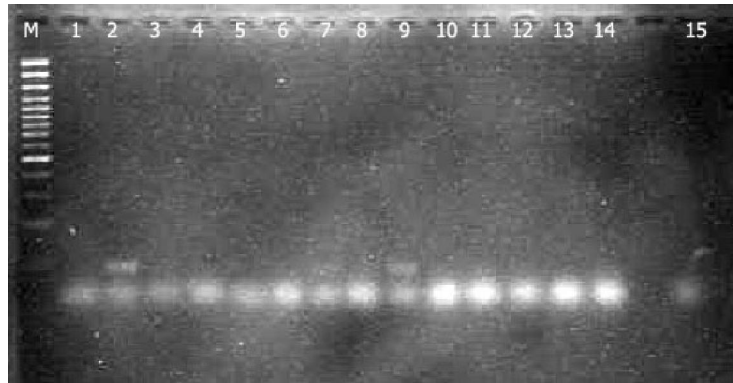
ส่วนที่ 2 การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับความต้านทานโรคไหม้ในข้าวไทย

1. การค้นหายีน *Pi-37* ยีน *Pi-ta* ด้วยเทคนิค PCR

การค้นหายีน *Pi* ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน *Pi-37* และยีน *Pi-ta* จากข้าวทั้งหมด 14 พันธุ์ ด้วยการทำ PCR เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้นแล้ว นำดีเอ็นเอตัวอย่างที่ได้จากการทำ PCR วิเคราะห์ด้วยการทำ agarose gel electrophoresis ไพรเมอร์ *Pi-ta* และ *Pi-37* ไม่มีผลผลิตจากการทำ PCR จากข้าวทุกสายพันธุ์ (ดังภาพที่ 4 และ 5) ซึ่งอาจจะเป็นด้วยไพรเมอร์นั้นออกแบบจากข้อมูลจากข้าวจาโปนิกาไม่เหมาะกับการเพิ่มจำนวนจากข้าวไทยที่เป็นข้าวอินดิกา



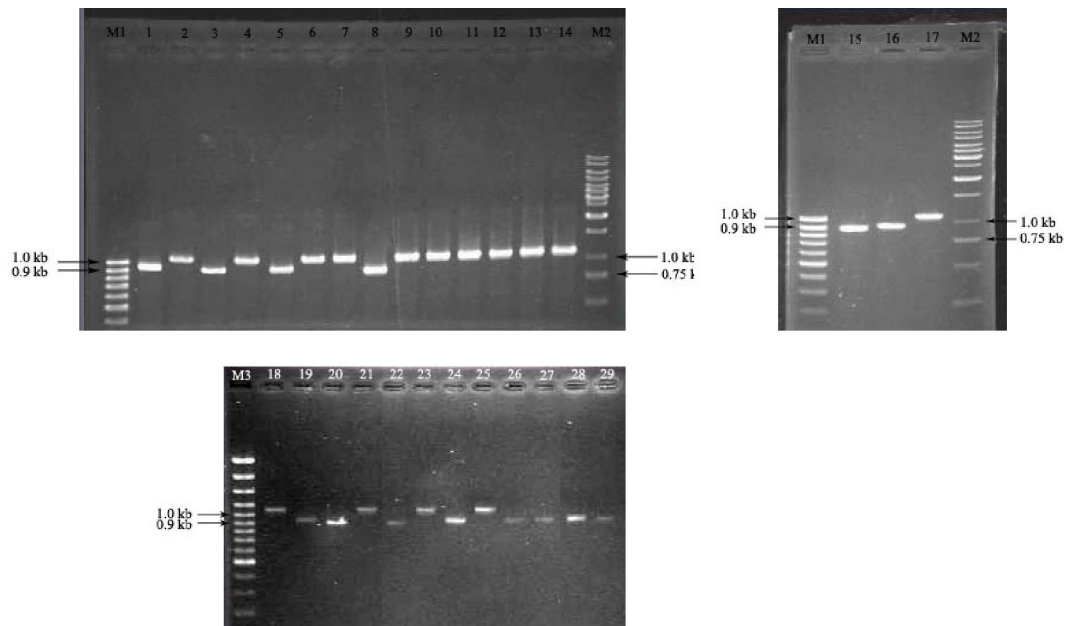
ภาพที่ 4 ผลการทำ 2% agarose gel electrophoresis ของผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ *Pi-ta* ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที เป็นไพรเมอร์โดยที่ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder : เลนที่ 1- 14 คือผลผลิต PCR จากข้าวพันธุ์คลองหลวง 1, ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1, ข้าวพันธุ์น้ำรุ้ง, ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60, ข้าวพันธุ์หอมนิล, ข้าวพันธุ์เจ้าฮ่อ, ข้าวพันธุ์ภูซ 6, ข้าวพันธุ์แพร่ 1, ข้าวพันธุ์หางยี 71, ข้าวพันธุ์ชัยนาท 80, ข้าวพันธุ์พิษณุโลก 1, ข้าวพันธุ์หนองเขียว, ข้าวพันธุ์ไทซุง, ข้าวพันธุ์สันป่าตอง 1 ตามลำดับ เลนที่ 15 คือผลผลิต PCR จากชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอแม่พิมพ์



ภาพที่ 5 ผลการทำ 2% agarose gel electrophoresis ของผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ Pi-37 ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที โดยที่ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder : เลขที่ 1-14 คือ ผลผลิต PCR จากข้าวพันธุ์คลองหลวง 1, ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1, ข้าวพันธุ์น้ำรุ, ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60, ข้าวพันธุ์หอมนิล, ข้าวพันธุ์เจ้าฮ่อ, ข้าวพันธุ์กช 6, ข้าวพันธุ์แพร่ 1, ข้าวพันธุ์หางยี 71, ข้าวพันธุ์ชัยนาท 80, ข้าวพันธุ์พิษณุโลก 1, ข้าวพันธุ์หนองเขียว, ข้าวพันธุ์ไทซุง, ข้าวพันธุ์สันป่าตอง 1 ตามลำดับ เลขที่ 15 คือ ผลผลิต PCR จากชุดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอแม่พิมพ์

2. การค้นหา ยีน $Pi-k^h$ ด้วยเทคนิค PCR

การเพิ่มปริมาณยีน $Pi-k^h$ ด้วยเทคนิค PCR เมื่อวิเคราะห์ผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 6) พบ ยีน $Pi-k^h$ มี 3 ขนาด คือ 900, 950 และ 1,100 คู่เบส โดยที่ยีน $Pi-k^h$ ขนาด 1,100 คู่เบส ได้จากข้าว 15 พันธุ์ ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105, ข้าวหอมแดง, กช 1, กช 6, กช 39, แจ็กเชย 1, เล็บนกปัตตานี, เหลืองประทิว 123, นางมล เอส-4, พลายงามปราจีนบุรี, ขาวตาแห้ง 17, สังข์หยดพัทลุง, ข้าวหอมคลองหลวง 1, สุพรรณบุรี 60 และหางยี 71 ยีน $Pi-k^h$ ขนาด 950 คู่เบส ได้จากข้าว 11 พันธุ์ ได้แก่ กช 33, ปราจีนบุรี 2, แม่แลบหนัก, 65 วัน, ปทุมธานี 1, แพร่ 1, กช 29, ข้าวเจ้าหอมพิษณุโลก 1, สันป่าตอง 1, ไทซุง 65 และนิปปอนบาเล และยีน $Pi-k^h$ ขนาด 900 คู่เบส ได้จากข้าว 3 พันธุ์ คือ น้ำรุ, เจ้าฮ่อ และบาสมาติ



ภาพที่ 6 ผลการทำ 1% agarose gel electrophoresis ของยีน $Pi-k^h$ จากข้าวจำนวน 29 พันธุ์ โดยที่เลน M1, M2 และ M3 คือ GeneRuler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas), GeneRuler™ 1 kb DNA ladder (Fermentas) และ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas) ตามลำดับ และเลน 1-29 เป็นผลผลิตของยีน $Pi-k^h$ จากข้าวพันธุ์ นิปอนบาเล, กข 39, 65 วัน, นางมด เอส-4, กข 33, สังข์หยดพัทลุง, ขาวตาแห้ง 17, ปราชินบุรี 2, กข 1, เล็บนกปัตตานี, แจ็กเซย 1, เหลืองประทิว 123, ขาวดอกมะลิ 105, ข้าวหอมแดง, บาสมาติ, แม่แลบหนัก, พลายงามปราชินบุรี, ข้าวหอมคลองหลวง 1, ปทุมธานี 1, น้ำรุ, สุพรรณบุรี 60, เจ้าฮ่อ, กข 6, แพร่ 1, หางยี 71, กข 29, ข้าวเจ้าหอมพิษณุโลก 1, ไทซุง 65 และสันปาดทอง 1 ตามลำดับ

3. การหาลำดับเบสและผลการวิเคราะห์ยีน $Pi-k^h$

เลือกยีน $Pi-k^h$ จากข้าวพันธุ์หางหยี 71 กข 6 (ขนาด 1100 คู่เบส) แพร่ 1 ไทซุง 65 (ขนาด 950 คู่เบส) โดยนำผลผลิตจากการทำ PCR มาทำบริสุทธิ์แล้วส่งไปหาลำดับเบส ผลการหาลำดับของยีน $Pi-k^h$ พบว่ายีน $Pi-k^h$ จากข้าวพันธุ์หางหยี 71 และ กข 6 มีลำดับเบสแทรกจำนวน 162 คู่เบส ดังแสดงในภาพที่ 7

```

      *      20      *      40      *      60      *
Hangyee_Pi : ATGCTGGAAATGCCAGTAGAATAGATCATGGAAGTACTTGAACCCCTCCAACTAACCAAGTCCCTGAAAACCTTT : 74
RD6_Pikh-F : ATGCTGGAAATGCCAGTAGAATAGATCATGGAAGTACTTGAACCCCTCCAACTAACCAAGTCCCTGAAAACCTTT : 74
Pharel_Pik : ATGCTGGAAATGCCAGTAGAATAGATCATGGAAGTACTTGAACCCCTCCAACTAACCAAGTCCCTGAAAACCTTT : 74
Thaichung_ : ATGCTGGAAATGCCAGTAGAATAGATCATGGAAGTACTTGAACCCCTCCAACTAACCAAGTCCCTGAAAACCTTT : 74

      80      *      100      *      120      *      140
Hangyee_Pi : GAGATTGTTTCGTATGAAGGACATGCATTTCCATCTTGGATAACCAAGCACTGAGCCATATCTCAGATCTCTGGG : 148
RD6_Pikh-F : GAGATTGTTTCGTATGAAGGACATGCATTTCCATCTTGGATAACCAAGCACTGAGCCATATCTCAGATCTCTGGG : 148
Pharel_Pik : GAGATTGTTTCGTATGAAGGACATGCATTTCCATCTTGGATAACCAAGCACTGAGCCATATCTCAGATCTCTGGG : 148
Thaichung_ : GAGATTGTTTCGTATGAAGGACATGCATTTCCATCTTGGATAACCAAGCACTGAGCCATATCTCAGATCTCTGGG : 148

      *      160      *      180      *      200      *      220
Hangyee_Pi : TGAGTATAGCTTGGCTTAATCTGAGATCATGTGAAAAGAGAAGTGCTATACGTACGACCGAGGTGTACTACTAGC : 222
RD6_Pikh-F : TGAGTATAGCTTGGCTTAATCTGAGATCATGTGAAAAGAGAAGTGCTATACGTACGACCGAGGTGTACTACTAGC : 222
Pharel_Pik : TGAGTATAGCTTGGCTTAATCTGAGATCATGTGAAA----- : 184
Thaichung_ : TGAGTATAGCTTGGCTTAATCTGAGATCATGTGAAA----- : 184

      *      240      *      260      *      280      *
Hangyee_Pi : GTACGTCTCAAGACTAATCACATTGCTCAGCTTACTTCTATGTGGGTCCAGATTTTTCATAGCTAGTCATGGTC : 296
RD6_Pikh-F : GTACGTCTCAAGACTAATCACATTGCTCAGCTTACTTCTATGTGGGTCCAGATTTTTCATAGCTAGTCATGGTC : 296
Pharel_Pik : ----- : -
Thaichung_ : ----- : -

      300      *      320      *      340      *      360      *
Hangyee_Pi : GTACAAGAGTCGGATGTACAAGTCGTATGCATAGTCATTCTGATGTGAAAACCTTACCTCCACTTGGGCTAA : 370
RD6_Pikh-F : GTACAAGAGTCGGATGTACAAGTCGTATGCATAGTCATTCTGATGTGAAAACCTTACCTCCACTTGGGCTAA : 370
Pharel_Pik : ----- : 207
Thaichung_ : ----- : 207

      380      *      400
Hangyee_Pi : TGGCATGCTGGAAGATTGTGGAGATAACCGAGTTTTTTTTTTT : 
RD6_Pikh-F : TGGCATGCTGGAAGATTGTGGAGATAACCGAGTTTTTTTTTTT : 
Pharel_Pik : TGGCATGCTGGAAGATTGTGGAGATAACCGAGTTTTTTTTTTT : 
Thaichung_ : TGGCATGCTGGAAGATTGTGGAGATAACCGAGTTTTTTTTTTT : 

```

ภาพที่ 7 การเปรียบเทียบลำดับเบสที่อ่านได้จากไพรเมอร์ Pi-kh(F) บริเวณที่แรงแสงน้ำตาลเป็น

บริเวณที่มีลำดับเบสเหมือนกันจากข้าว 4 สายพันธุ์

จากนั้นเลือกยีน $Pi-k^h$ จากข้าว 7 พันธุ์ คือ น้ำรุ, ข้าวหอมคลองหลวง 1, สุพรรณบุรี 60, แม่แลบหนัก, กข 33, บาสมาติ และนิปอนบาเล่ ไปทำให้บริสุทธิ์จากเจลและโคลนเข้าดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy แล้ว ถ่ายเข้าสู่ *E. coli* DH5 α คัดเลือกดีเอ็นเอสายผสม แล้วส่งไปหาลำดับเบสพบว่า ยีน $Pi-k^h$ ของข้าวพันธุ์แม่แลบหนัก, กข 33, นิปอนบาเล่, น้ำรุ และบาสมาติ มีขนาด 942, 943, 940, 904 และ 904 คู่เบส ตามลำดับ ส่วนยีน $Pi-k^h$ จากข้าวหอมคลองหลวง 1 และสุพรรณบุรี 60 มีขนาด 1,103 และ 1,104 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน $Pi-$

k^h จากข้าวทั้ง 7 พันธุ์กับ ยีนจากฐานข้อมูล คือ ยีน $Pi-k^h$ จากข้าว Tetep (AY914077) และยีน $Pi-k^h$ จากข้าว Peiai (EF532592) (ภาพที่ 8) พบว่า ยีน $Pi-k^h$ ของข้าวน้ำรา และบาสมาติ มีลำดับเหมือนกับยีน $Pi-k^h$ จากข้าว Tetep ส่วนยีน $Pi-k^h$ จากข้าวแม่แลบหนัก, กข 33, นิปอนบาเล มีลำดับเบสเหมือนกับยีน $Pi-k^h$ จากข้าว Peiai (EF532592) ที่มีลำดับเบสแทรกขนาด 37 คู่เบสเมื่อเทียบกับยีน $Pi-k^h$ จากข้าว Tetep (AY914077) ส่วนยีน $Pi-k^h$ จากข้าวหอมคลองหลวง 1 และสุพรรณบุรี 60 มีลำดับเบสแทรก 2 บริเวณ คือ ลำดับเบสแทรกขนาด 37 และ 162 คู่เบสเมื่อเทียบกับยีน $Pi-k^h$ จากข้าว Tetep (AY914077) และ จากผลการทดสอบที่พบว่า ข้าวพันธุ์น้ำรา และเจ้าฮ่อสามารถต้านทานต่อโรคไหม้ที่แยกได้ในประเทศไทย ส่วนข้าวพันธุ์ Tetep นั้น มีรายงานว่าต้านทานต่อโรคไหม้ในประเทศอินเดีย (Kumar *et al.*, 2007 และ Sharma *et al.*, 2010) และจากข้อมูลในตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่า ยีน $Pi-k^h$ ที่ต้านทานต่อโรคไหม้จะมีขนาด 900 คู่เบส ซึ่งได้แก่ ยีน $Pi-k^h$ จากข้าวพันธุ์น้ำรา, เจ้าฮ่อ, บาสมาติ และ Tetep ส่วนยีน $Pi-k^h$ ขนาด 950 คู่เบสอาจจะทำให้ต้านทานระดับปานกลาง แต่ยีน $Pi-k^h$ ขนาด 1,100 คู่เบสเป็นยีนในสภาพอ่อนแอต่อโรคไหม้ ซึ่งจะต้องศึกษาค้นคว้าต่อไปในระดับการแสดงออกเป็นโปรตีนต่อไปว่าแตกต่างกันอย่างไรในยีนแต่ละขนาด ดังนั้น พันธุ์ข้าวไทยที่ควรจะใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวอื่นให้ต้านทานต่อโรคไหม้ คือ พันธุ์น้ำรา และเจ้าฮ่อ


```

      960      980      1000      1020      1040
แมลงบก : AAGTTGGAGATATGTTGTCATGAATTTCATGCTCCACAGGGTTTGAGCATCTTTCTCTCTGCGCAGCTTGAAATTGATAACTGCAACAAATTGGAG : 803
กข 33 : AAGTTGGAGATATGTTGTCATGAATTTCATGCTCCACAGGGTTTGAGCATCTTTCTCTCTGCGCAGCTTGAAATTGATAACTGCAACAAATTGGAG : 802
ศอธพวง 1 : AAGTTGGAGATATGTTGTCATGAATTTCATGCTCCACAGGGTTTGAGCATCTTTCTCTCTGCGCAGCTTGAAATTGATAACTGCAACAAATTGGAG : 804
สุพรรณบุรี 60 : AAGTTGGAGATATGTTGTCATGAATTTCATGCTCCACAGGGTTTGAGCATCTTTCTCTCTGCGCAGCTTGAAATTGATAACTGCAACAAATTGGAG : 805
นิปปอนฯ : AAGTTGGAGATATGTTGTCATGAATTTCATGCTCCACAGGGTTTGAGCATCTTTCTCTCTGCGCAGCTTGAAATTGATAACTGCAACAAATTGGAG : 801
EF532592 : AAGTTGGAGATATGTTGTCATGAATTTCATGCTCCACAGGGTTTGAGCATCTTTCTCTCTGCGCAGCTTGAAATTGATAACTGCAACAAATTGGAG : 801
น้ำจ : AAGTTGGAGATATGTTGTCATGAATTTCATGCTCCACAGGGTTTGAGCATCTTTCTCTCTGCGCAGCTTGAAATTGATAACTGCAACAAATTGGAG : 805
นาทม : AAGTTGGAGATATGTTGTCATGAATTTCATGCTCCACAGGGTTTGAGCATCTTTCTCTCTGCGCAGCTTGAAATTGATAACTGCAACAAATTGGAG : 805
AY914077 : AAGTTGGAGATATGTTGTCATGAATTTCATGCTCCACAGGGTTTGAGCATCTTTCTCTCTGCGCAGCTTGAAATTGATAACTGCAACAAATTGGAG : 849

      1060      1080      1100      1120      1140
แมลงบก : ATTTTGCCAGATGGTTGGAGAACCTACCTTTCTACAGATAATGTGTTTGCTGGCTGICCAATTCTGCACTCCATTCCTGAAGGCTACATGTAGCGACATT : 908
กข 33 : ATTTTGCCAGATGGTTGGAGAACCTACCTTTCTACAGATAATGTGTTTGCTGGCTGICCAATTCTGCACTCCATTCCTGAAGGCTACATGTAGCGACATT : 907
ศอธพวง 1 : ATTTTGCCAGATGGTTGGAGAACCTACCTTTCTACAGATAATGTGTTTGCTGGCTGICCAATTCTGCACTCCATTCCTGAAGGCTACATGTAGCGACATT : 1069
สุพรรณบุรี 60 : ATTTTGCCAGATGGTTGGAGAACCTACCTTTCTACAGATAATGTGTTTGCTGGCTGICCAATTCTGCACTCCATTCCTGAAGGCTACATGTAGCGACATT : 1070
นิปปอนฯ : ATTTTGCCAGATGGTTGGAGAACCTACCTTTCTACAGATAATGTGTTTGCTGGCTGICCAATTCTGCACTCCATTCCTGAAGGCTACATGTAGCGACATT : 906
EF532592 : ATTTTGCCAGATGGTTGGAGAACCTACCTTTCTACAGATAATGTGTTTGCTGGCTGICCAATTCTGCACTCCATTCCTGAAGGCTACATGTAGCGACATT : 906
น้ำจ : ATTTTGCCAGATGGTTGGAGAACCTACCTTTCTACAGATAATGTGTTTGCTGGCTGICCAATTCTGCACTCCATTCCTGAAGGCTACATGTAGCGACATT : 870
นาทม : ATTTTGCCAGATGGTTGGAGAACCTACCTTTCTACAGATAATGTGTTTGCTGGCTGICCAATTCTGCACTCCATTCCTGAAGGCTACATGTAGCGACATT : 870
AY914077 : ATTTTGCCAGATGGTTGGAGAACCTACCTTTCTACAGATAATGTGTTTGCTGGCTGICCAATTCTGCACTCCATTCCTGAAGGCTACATGTAGCGACATT : 954

      1160      1180
แมลงบก : ATTGTTGAAATTGCCCAATTTTAAAGAACCATT : 942
กข 33 : ATTGTTGAAATTGCCCAATTTTAAAGAACCATT : 941
ศอธพวง 1 : ATTGTTGAAATTGCCCAATTTTAAAGAACCATT : 1103
สุพรรณบุรี 60 : ATTGTTGAAATTGCCCAATTTTAAAGAACCATT : 1104
นิปปอนฯ : ATTGTTGAAATTGCCCAATTTTAAAGAACCATT : 940
EF532592 : ATTGTTGAAATTGCCCAATTTTAAAGAACCATT : 942
น้ำจ : ATTGTTGAAATTGCCCAATTTTAAAGAACCATT : 904
นาทม : ATTGTTGAAATTGCCCAATTTTAAAGAACCATT : 904
AY914077 : ATTGTTGAAATTGCCCAATTTTAAAGAACCATT : 991

```

ภาพที่ 8 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน $Pi-k'$ จากข้าวพันธุ์น้ำจ สุพรรณบุรี 60 แมลงบก กข 33 บาสมาติ นิปปอนบาเล พันธุ์ Peiai (EF532592) และพันธุ์ Tetep (AY914077) โดยใช้โปรแกรม ClustalX

ตารางที่ 5 ข้อมูลยืนด้านทานหรือความต้านกับขนาดของยีน $Pi-k^h$ ในข้าวไทย

ยีน Pi /ความต้านทาน	พันธุ์	%BSR	ขนาดของยีน $Pi-k^h$
$Pi\ 1(t)LAC$	C104LAC	100	-
-	น้ำรุ	100	900
-	เจ้าฮ่อ	100	900
$Pi-1$	C101LAC	94.7	-
$Pi\ 1(t)TTP$	C104TTP	94.7	-
อ่อนแอ	กข 1	94.7	1100
-	CT9993	94.7	-
$Piz-5, Pi-2$	C101A51	89.5	-
$Pi\ 4b(t)$	C105TTP	89.5	-
ต้านทาน	BT	89.5	-
ค่อนข้างต้านทาน	พิษณุโลก 1	84.2	950
-	ไทซุง 65	78.9	950
-	IR62266	78.9	-
-	Azucena	78.9	-
-	IR64	78.9	-
$Pi4a(t)TTP$	C101TTP	73.7	-
ต้านทาน	แพร่ 1	73.7	950
ต้านทาน	ปทุมธานี 1	73.7	950
ต้านทาน	สุพรรณบุรี 60	73.7	1100
อ่อนแอ	ชัยนาท 80	73.7	950
$Pi\ 3$	C104PKT	68.4	-
$Pi4a(t)$	C101PKT	63.2	-
$Pi4a(t)PKT$	C102PKT	57.9	-
อ่อนแอ	C039	52.6	-
อ่อนแอ	กข 6	47.4	1100
ค่อนข้างต้านทาน	หอมคลองหลวง 1	47.4	1100
อ่อนแอ	ขาวดอกมะลิ 105	42.1	1100

6. การทดสอบไพรเมอร์เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย

จากรายงานที่พบว่ายีน $Pi-k^h$ ของข้าวน้ำรา (ต้านทานโรคไหม้) มีขนาด 900 คู่เบส ให้ชื่อว่า $Pi-k^h$ น้ำรา และยีน $Pi-k^h$ จากข้าว กข 6 (ไม่ต้านทานโรคไหม้) มีขนาด 1,100 คู่เบส ให้ชื่อว่า $Pi-k^h$ กข 6 ดังนั้นเพื่อทดสอบว่าไพรเมอร์ $Pi-k^hF$ และ $Pi-k^hR$ จะสามารถแยกความแตกต่างของยีน $Pi-k^h$ ทั้ง 2 สภาพได้ จึงได้ทำ PCR โดยใช้ดีเอ็นเอจากข้าวลูกผสม F_1 ระหว่าง กข 6 กับ น้ำรา, กข 6 และ น้ำรา ซึ่งจากภาพที่ 9 ที่แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ $Pi-k^hF$ และ $Pi-k^hR$ สามารถแยกยีน $Pi-k^h$ $Pi-k^h$ กข 6 $Pi-k^h$ น้ำรา จากต้นข้าวที่มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ($Pi-k^h$ กข 6 $Pi-k^h$ น้ำรา) ได้ ทำให้ไพรเมอร์คู่นี้มีประสิทธิภาพในการใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานต่อโรคไหม้



ภาพที่ 9 การทดสอบไพรเมอร์ของยีน $Pi-k^h$ เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย โดย M1 คือ แถบ DNA มาตรฐาน 100 bp ladder (Fermentas) เลนที่ 1 คือ ผลผลิต PCR ที่ได้จากข้าว น้ำรา เลนที่ 2 คือ ผลผลิต PCR ที่ได้จากข้าว กข 6 เลนที่ 3 คือ ผลผลิต PCR ที่ได้จาก ลูกผสม F_1 ระหว่าง น้ำรา กับ กข 6 และ M2 คือ แถบ DNA มาตรฐาน 1 kb ladder (Fermentas)

สรุปผล

1. จากการศึกษาความต้านทานต่อโรคไหม้ในข้าวจำนวน 11 พันธุ์โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าวทั้งกลุ่มที่ยีน Pi ต่างๆ และข้าวพันธุ์อ่อนแอ โดยใช้เชื้อราจำนวน 19 ไอโซเลต พบว่าข้าวไร่น้ำเจ้าพระยา และข้าวท่าดอกคำ 1 มีระดับความต้านทาน 100 เปอร์เซ็นต์

2. จากการศึกษา ยีน $Pi-ta$ และ $Pi-37$ พบว่าไม่สามารถแยกยีนนี้ได้จากข้าวไทย ซึ่งอาจจะต้องมีการศึกษาข้อมูลลำดับเบสเพิ่มเพื่อออกแบบไพรเมอร์ให้เหมาะสมต่อไป

3. จากการศึกษาความหลากหลายของยีน $Pi-k^h$ พบว่า ยีน $Pi-k^h$ มี 3 ขนาด คือประมาณ 900, 950 และ 1,100 คู่เบส โดยยีน $Pi-k^h$ ที่มีขนาด 900 คู่เบส ได้จากข้าวพันธุ์น้ำเจ้าพระยา และบางmati ส่วนยีน $Pi-k^h$ ที่มีขนาด 950 คู่เบส ได้จากข้าว 11 พันธุ์ ดังนี้ กข 33, ปราจีนบุรี 2, แม่แลบนก, 65 วัน, ปทุมธานี 1, แพร่ 1, กข 29, ข้าวเจ้าหอมพิษณุโลก 1, สันป่าตอง 1, ไทซุง 65 และนิปปอนบาเล และยีน $Pi-k^h$ ที่มีขนาด 1,100 คู่เบส ได้จากข้าว 15 พันธุ์ ดังนี้ ข้าวดอกมะลิ 105, ข้าวหอมแดง, กข 1, กข 6, กข 39, แจกเขย 1, เล็บนกปัตตานี, เหลืองประทิว 123, นางมด เอส-4, พลายงามปราจีนบุรี, ข้าวตาแห้ง 17, สังข์หยดพัทลุง, ข้าวหอมคลองหลวง 1, สุพรรณบุรี 60 และหางยี 71 ซึ่งจะต้องมีการศึกษาในระดับการแสดงออกต่อไปว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่อย่างไร และจากข้อมูลความต้านทานโรคไหม้ อาจตั้งข้อสังเกตได้ว่า ยีน $Pi-k^h$ ที่มีขนาด 900 คู่เบส น่าจะเป็นยีนที่ต้านทานต่อโรคไหม้

4. จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน $Pi-k^h$ ทั้ง 3 ขนาด พบการแทรกของขึ้นดีเอ็นเอขนาด 37 คู่เบส ในยีน $Pi-k^h$ ขนาด 950 คู่เบส และการแทรกของขึ้นดีเอ็นเอขนาด 37 และ 162 คู่เบสในยีน $Pi-k^h$ ขนาด 1,100 คู่เบส

5. ไพรเมอร์ $Pi-k^hF$ และ $Pi-k^hR$ สามารถแยกยีน $Pi-k^h$ ขนาด 900 และ 1,100 คู่เบส ออกจากกันได้ ไพรเมอร์นี้จึงสามารถใช้คัดเลือกต้นข้าวที่มีความต้านทานต่อโรคไหม้ของข้าวได้ อีกทั้งยังสามารถแยกยีนขนาด 950 คู่เบสออกจาก 900 และ 1,100 คู่เบส โดยการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของเจลในการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟิซิส

เอกสารอ้างอิง

งานวิจัยชีวสารสนเทศศาสตร์ ยีนข้าว (Rice Genome Bioinformatics) ข้อมูลออนไลน์ที่
<http://library.uru.ac.th/webdb/images/nectec-bc202-45.htm>

ปรีชา ชัมพานนท์ และสงกรานต์ จิตรากร. 2527. เอกสารประกอบการสัมมนาทาง
 วิชาการ. เรื่องแหล่งพันธุกรรมทางพืชแห่งชาติ. ครั้งที่2. กรมวิชาการเกษตร.

โรคไหม้ สถาบันวิจัยข้าว ข้อมูลออนไลน์ที่
http://www.ricethailand.go.th/brrd/rice_tech.htm

สถิติการเกษตร สำนักพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร ข้อมูลออนไลน์ที่
<http://www.doe.go.th/knowledgeinternet/menu6.htm>

สถิติการเกษตรของไทย ปี 2548 สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ข้อมูลออนไลน์ที่
<http://www.oae.go.th/statistic/yearbook48/>

Dean, R.A., Nicholas, J., Talbot, Danie, J.E., Mark, L.F., Thomas, K.M., Marc, J.O., Michael, T., Resham, K.I., Jin, R.X., Huaqin, P., Nick, D.R., Yong, H.L., Ignazio, C., Doug, B., Yeon Y.O., Nicole, D., Jun, S. J., Darren, M.S., Slavica, D., Elena, K., Cathryn, R., Weixi, L., Michael, H., Soonok, K., Marc, H.L., Heidi, B., Sean, C., Jonathan, B., Sarah, C., Li, J. M., Robert, N., Seth, P., Chad, N., James, E.G., and Bruce W.B. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Nature 434: 980-981.

Deng Y., Zhu X., Shen Y., He Z. 2006. Genetic characterization and fine mapping of the blast resistance locus *Pigm(t)* tightly linked to *Pi2* and *Pi9* in a broad-spectrum resistant Chinese variety. Theor Appl Genet.113(4):705-13.

Disthaporn, S. 1994. Rice Disease Control by farmers. Thai Phytopathology Society, Thailand, 116 pp.

Hayashi K., Yoshida H., Ashikawa I. 2006. Development of PCR-based allele-specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes. *Theor Appl Genet.* 113(2):251-60.

Kumar, S.P., V. Dalai, N.K. Singh and T.R. Sharma. 2007. Comparative analysis of the 100 kb region containing *Pi-k^h* locus Between indica and japonica rice lines. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics.* 5(1): 35-44.

Li ZK., Arif M., Zhong DB., Fu BY., Xu JL., Domingo-Rey J., Ali J., Vijayakumar CH., Yu SB., Khush GS. 2006. Complex genetic networks underlying the defensive system of rice (*Oryza sativa* L.) to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23;103(21):7994-9.

Mekwatanakarn, P. 1996. Characterization of *Pyricularia grisea* population by lineage using MGR-DNA fingerprinting in Thailand. Present in the Third Asia pacific Conference on Agricultural Biotechnology: issue and Choices. Hua-Hin, Prachupkirihhan, Thailand. 66 p.

Noenplab A., Sirithunya P., Sriprakhon S., Vongsaprom C., Vanavichit A., Toojinda T. Mapping of QTL (quantitative trait loci) conferring resistance to a broad spectrum of blast isolates in a high nutritional rice cultivar 'Jao Hawm Nin' (in preparation).

Qu S., Liu G., Zhou B., Bellizzi M., Zeng L., Dai L., Han B., Wang GL. 2006. The broad-spectrum blast resistance gene Pi9 encodes a nucleotide-binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice. *Genetics.* 172(3):1901-14.

Rice Chromosomes 11 and 12 Sequencing Consortia. 2005. The sequence of rice chromosomes 11 and 12, rich in disease resistance genes and recent gene duplications. *BMC Biol.* 27;3:20.

Sharma, T.R., A.K. Rai, S. Gupta, N.K. Singh. 2010. Broad-spectrum blast resistance gene *Pi-k^h* cloned from rice line Tetep designated as *Pi54*. J. Plant Biochem. Biotechnol. 19(1): 87-89.

Sharma, T.R., M.S. Madhav, B.K. Singh, P. Shanker, T.K. Jana, V. Dalal, A. Pandit, A. Singh, K. Gaikwad, H.C. Upreti and N.K. Singh. 2005. High-resolution mapping, cloning and molecular characterization of the *Pi-k^h* gene of rice, which confers resistance to *Magnaporthe grisea*. Mol. Genet. Genomics. 274: 569-578.

Sirithunya P., Tragoonrung S., Vanavichit A., Pa-In N., Vongsaprom C., Toojinda T. 2002. Quantitative trait loci associated with leaf and neck blast resistance in recombinant inbred line population of rice (*Oryza sativa* L). DNA Research 9(3): 79-88.

Veillet, S., Filippi, M.C., and Gallais, A. 1996. Combined genetic analysis of partial blast resistance in upland rice population and recurrent selection for line hybrid values. Theor. Appl. Genet. 92: 644-653.

