

ความสามารถในการก่อโรค ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *AVR-Pik* ใน
ประชากร *Pyricularia oryzae* และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคใน
เชื้อรา และยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานในข้าวที่มียีน *Pi12*

**PATHOGENICITY, GENETIC DIVERSITY OF *AVR-Pik* IN *PYRICULARIA ORYZAE*
POPULATION AND ANALYSIS OF GENES INVOLVED IN PATHOGENICITY
BETWEEN RICE BLAST ISOLATES AND DIFFERENTIAL RICE VARIETY
HARBORING RESISTANCE GENE *Pi12***

เพ็ญภา จันทน์นวล
PENNAPAR CHANNUAL

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเกษตรศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2565

KMITL-2022-AG-D-064-034

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**PATHOGENICITY, GENETIC DIVERSITY OF *AVR-Pik* IN *PYRICULARIA ORYZAE*
POPULATION AND ANALYSIS OF GENES INVOLVED IN PATHOGENICITY
BETWEEN RICE BLAST ISOLATES AND DIFFERENTIAL RICE VARIETY
HARBORING RESISTANCE GENE *Pi12***



PENNAPAR CHANNUAL

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY IN AGRICULTURE
FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2022

KMITL-2022-AG-D-064-034

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2022

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความสามารถในการก่อโรค ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน <i>AVR-Pik</i> ในประชากร <i>Pyricularia oryzae</i> และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคในเชื้อรา และยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานในข้าวที่มียีน <i>Pi12</i>
นักศึกษา	เพ็ญนภา จันทน์นวล
รหัสประจำตัว	58604047
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชา	เกษตรศาสตร์
พ.ศ.	2565
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร. นงลักษณ์ เกรินทวงศ์

บทคัดย่อ

การสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคไหม้ข้าวในประเทศไทยในช่วงฤดูปลูกปี พ.ศ. 2559 – 2560 พบการระบาดของโรคไหม้ในพื้นที่ 34 จังหวัด แยกเชื้อด้วยวิธี single spore isolation ได้เชื้อรา *P. oryzae* จำนวน 118 ไอโซเลต ผลตรวจสอบแบบของเพศของเชื้อราทั้งหมดด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ Mat gene ที่จำเพาะต่อแบบของเพศของเชื้อรา พบเชื้อราจำนวน 114 ไอโซเลตคิดเป็น 96.6 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราที่ศึกษา ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 940 คู่เบสเหมือนเชื้อราทดสอบมาตรฐานสายพันธุ์ GUY11 ที่มีแบบของเพศ Mat1-2 และพบเชื้อราเพียง 4 ไอโซเลตคิดเป็น 3.4 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราที่ศึกษา ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 809 คู่เบสเหมือนเชื้อราทดสอบมาตรฐานสายพันธุ์ 70-15 ที่มีแบบของเพศ Mat1-1 จึงควรเฝ้าระวังการอุบัติใหม่ของเชื้อราในพื้นที่ปลูกข้าวจังหวัดแพร่และเพชรบูรณ์ เนื่องจากเป็นพื้นที่ที่พบแบบของเพศของเชื้อราทั้ง 2 แบบ การประเมินการเกิดโรคในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนก่อโรคและยีนต้านทานแบบ incompatible interaction (ไม่เกิดโรค) สามารถระบุยีนก่อโรคของเชื้อราแต่ละไอโซเลตได้ ยีนก่อโรคที่พบมากที่สุดและมีบทบาทสำคัญในการก่อโรคของเชื้อราทั้ง 4 ภาคของประเทศไทย ได้แก่ *AVR-Pikp* พบในเชื้อราจำนวน 79 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราที่ศึกษา รองลงมาคือยีนก่อโรคในกลุ่มของยีน *AVR-Pik* แอลลีลอื่นๆ ได้แก่ แอลลีล *AVR-Pikm* *AVR-Pi7(t)* และ *AVR-Pikh* พบในเชื้อราจำนวน 78 77 และ 75 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราที่ศึกษา ตามลำดับ ดังนั้นยีนต้านทานที่มีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ในประเทศไทย คือ ยีนต้านทานกลุ่ม *Pik* (*Pikp* *Pikm* *Pi7(t)* และ *Pikh*) นอกจากนี้ประชากรเชื้อรามากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ในแต่ละภาคมียีนก่อโรค *AVR-Pi5(t)* *AVR-Pita-2* และ *AVR-Pi12* ยีนต้านทาน *Pi5(t)* *Pita-2* และ *Pi12* จึงมีบทบาทสำคัญรองลงมา และเนื่องจากยีนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pik* พบมากในประชากรเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทย จึงศึกษาความหลากหลายของยีนก่อโรค *AVR-Pik* โดยวิเคราะห์ลำดับ

นิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pik* ในเชื้อรา 7 ไอโซเลทที่เคยมีรายงานรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรค โดยการตรวจสอบรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคของเชื้อราบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวกลุ่ม *Pik* จำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ IRBLks-F5 IRBLks-S IRBLkp-K60 IRBLkh-K3 IRBL1-CL IRBL7-M และ IRBLKM-Ts ที่มียีนต้านทานเดี่ยว *Piks Piks Pikip Pikh Pi1 Pi7(t)* และ *Pikm* ตามลำดับ พบว่าเชื้อราไอโซเลท Phitsanulok40.4 มียีนก่อโรค *AVR-Pika* ไอโซเลท UBN7348 และ SKN10389 มียีนก่อโรค *AVR-PikD* นอกจากนี้ไอโซเลท NKI211107 มียีนก่อโรค *AVR-PikF* ที่น่าสนใจ คือ ไอโซเลท THL794 มียีนก่อโรคมมากกว่า 1 แอลลีล คือ *AVR-PikD/A* ในขณะที่ไอโซเลท UBN207129 และ RBR55004 อาจมียีนก่อโรคมมากกว่า 2 แอลลีล คือ *AVR-PikD/A/F* งานวิจัยนี้ยังศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้และยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองในข้าว โดยใช้ cDNA จากตัวอย่างข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M ที่มียีนต้านทานเดี่ยว *Pi12* ที่ถูกปลูกเชื้อ และแสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible และ incompatible interaction พบว่ายีน *MoSlp1* มีการแสดงออกเฉพาะในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) นอกจากนี้ในปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) ยังพบการแสดงออกของยีน *OsWRKY30 OsJAZ2 OsPR5* และ *OsPR10* แต่ไม่พบการแสดงออกของยีน *OsPAL* พบว่ายีน *OsJAZ2 OsPR5* และ *OsPR10* มีระดับการแสดงออกต่ำกว่าในปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction ผลการทดลองที่น่าสนใจ คือ มีการแสดงออกของยีน *OsJAZ2* และยีน *OsPR10* ในระดับสูงในปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (ไม่เกิดโรค) ดังนั้นจึงสันนิษฐานได้ว่ายีนทั้งสองอาจมีบทบาทสำคัญสำหรับการกระตุ้นความต้านทานในข้าวที่เกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนก่อโรค *AVR-Pi12* และยีนต้านทาน *Pi12* บทบาทของยีน *OsJAZ2* และยีน *OsPR10* ในข้าวต้านทานโรคไหม้ควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติม โดยการวิเคราะห์หน้าที่ของยีนด้วยการตัดแปลงพันธุกรรมข้าวทำให้มีการแสดงออกของยีนมากเกินไป หรือตัดแปลงพันธุกรรมข้าวเพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน

Thesis	Pathogenicity, Genetic Diversity of <i>AVR-Pik</i> in <i>Pyricularia oryzae</i> Population and Analysis of Genes Involved in Pathogenicity Between Rice Blast Isolates and Differential Rice Variety Harboring Resistance Gene <i>Pi12</i>
Student	Mrs. Pennapar Channual
Student ID	58604047
Degree	Doctor of Philosophy
Program	Agriculture
The year	2022
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Nonglak Parinthawong

ABSTRACT

Rice blast disease survey and sample collection were conducted during rice-growing seasons from 2016 to 2017 in 34 provinces of blast disease epidemic regions of Thailand. One hundred and eighteen isolates of *P. oryzae* were obtained from infected rice plants using single spore isolation technique. Mating-type determination with mating type gene-specific primers through a polymerase chain reaction (PCR) technique revealed that 114 blast isolates (96.6 %) showed a DNA fragment size of 940 bp corresponding to MAT1-2 fragment of the strain GUY11, while 4 isolates (3.4 %) showed the same size DNA fragment as an 809 bp fragment for MAT1-1 of the strain 70-15. Both mating types were found in the same leaf blast lesion from two provinces, Phrae and Phetchabun. Therefore, the emergence of novel fungi in the abovementioned rice planting areas is precaution. Investigation on the availability of avirulence (*AVR*) gene among the obtained blast fungal isolates based on the incompatible reaction outcome (score 0 – 2) from the interaction of resistance (*R*) genes and pathogen *AVR* genes revealed that *AVR-Pikp* was the most common gene that playing an important role in the pathogenicity among blast isolates obtained from all four regions of Thailand. Out of 118 isolates, 79 % of the blast isolates harboring *AVR-Pikp*, followed by other *AVR-Pik* alleles, including *AVR-Pikm*, *AVR-Pi7(t)* and *AVR-Pikh* with the score of 78, 77 and 75 %, respectively. Therefore, the resistance gene *Pikp* *Pikm* *Pi7(t)* and *Pikh* are important in rice blast resistance breeding

program in Thailand. More than 50 percent of the isolates in the population have *AVR-Pi5(t)*, *AVR-Pita-2* and *AVR-Pi12*, therefore the resistance genes *Pi5(t)*, *Pita-2* and *Pi12* are of secondary important. Due to the high frequency presence of *AVR-Pik* allele in the blast pathogen population, seven pathogenic blast isolates which have been reported were selected and their nucleotide and amino acid sequence of *AVR-Pik* were analyzed. Indeed, pathotypes of the seven blast isolates were also investigated by employing 7 different rice varieties including IRBLks-F5, IRBLks-S, IRBLkp-K60, IRBLkh-K3, IRBL1-CL, IRBL7-M, and IRBLKM-Ts. The aforementioned rice varieties carried each individual resistance genes, *Piks*, *Piks*, *Pikp*, *Pikh*, *Pi1*, *Pi7(t)* and *Pikm*, respectively. The results revealed that fungal isolate Phitsanulok40.4 carried *AVR-PikA*, while both UBN7348 and SKN10389 isolates carried *AVR-PikD*. In addition, the isolate NKI211107 possessed *AVR-PikF*. Interestingly, the fungal isolate THL79 contained more than 1 allele (*AVR-PikD/A*), whereas UBN207129 and RBR55004 may have more than 2 alleles (*AVR-PikD/A/F*). Expression analysis of genes related to fungal pathogenesis and rice blast resistance was carried out using the infected-rice cDNA libraries prepared from either compatible and incompatible rice blast isolates to the rice variety IRBL12-M harboring *Pi12*. The expression of fungal *MoSlp1* was found solely in compatible interaction. *OsWRKY30*, *OsJAZ2*, *OsPR5* and *OsPR10* were upregulated during compatible interaction, but not for *OsPAL*. The expression of *OsJAZ2*, *OsPR5* and *OsPR10* in compatible interaction were lower than incompatible interaction. Interestingly, *OsJAZ2* and *OsPR10* were found to be highly expressed during incompatible interaction. Therefore, both genes may play a crucial role in inducing resistance in rice during the incompatible interaction between *AVR-Pi12* and *Pi12*. This interesting preliminary finding on the function of *OsJAZ2* and *OsPR10* in rice blast disease resistance should be further concretely reconfirmed through the gene functional analysis of the gene overexpression or gene disrupting transgenic rice plant.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดีเพราะได้รับความอนุเคราะห์ ความเอาใจใส่ ให้คำปรึกษา ให้คำแนะนำแก้ไขปรับปรุงข้อบกพร่อง และแนะนำแนวทางในการศึกษาค้นคว้ามาโดยตลอด รวมทั้งให้คำแนะนำองค์ความรู้เป็นอย่างดียิ่งจาก ผศ.ดร.นงลักษณ์ เกรินทวงศ์ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ชัชวาล จันทราสุริยรัตน์ อาจารย์ประจำภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ผศ.ดร.ปวีณา สงกุมาร ผศ.ดร.สุพจน์ กาเข้ม และ ผศ.ดร.ติยากร ฉัตรนภารัตน์ อาจารย์ประจำภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่เพื่อทำงานวิจัย และให้ความอนุเคราะห์วัสดุเพื่อใช้ในการงานวิจัย รวมทั้งแนะนำแนวทางในการแก้ไขปัญหาได้อย่างดียิ่ง ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ คุณผลากานต์ ทองสมบูรณ์ นักวิชาการเกษตรชำนาญการศูนย์วิจัยข้าวแม่ฮ่องสอน คุณนุจรินทร์ จังชันท์ นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษศูนย์วิจัยข้าวเชียงราย คุณกุลชญา ดาร์เวลด นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษศูนย์วิจัยข้าวแพร่ คุณชนะ ศรีสมภาร นักวิชาการเกษตรชำนาญการศูนย์วิจัยข้าวอุดรธานี ดร.อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก คุณเจริญ ทองระย้า เจ้าพนักงานการเกษตรศูนย์วิจัยข้าวราชบุรี คุณอังคณา กันทาจันทร์ นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการศูนย์วิจัยข้าวสกลนคร และคุณดวงกมล บุญช่วย นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษศูนย์วิจัยข้าวชัยนาท ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการสำรวจและเก็บตัวอย่าง โรคไหม้ข้าวเพื่อใช้ในการวิจัย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.พรหมมาศ คูหากาญจน์ รศ.ดร.ชัชวาล จันทราสุริยรัตน์ ดร.มัทธนา ต้นชัย และ ผศ.ดร.ช่อแก้ว อนิลบล ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ผู้วิจัยมีความซาบซึ้งในความกรุณาของทุกท่านที่ได้กล่าวถึง และผู้ที่ไม่ได้เอ่ยนามในที่นี้ ที่มีส่วนช่วยเหลือ ให้การสนับสนุน และให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา จึงขอกราบขอบพระคุณทุกท่านด้วยความจริงใจ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงาน ปลัดกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

เพ็ญนภา จันทรินวล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	X
สารบัญภาพ.....	XI
สารบัญตารางผนวก.....	XVII
สารบัญภาพผนวก.....	XVIII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	3
1.3 สถานที่ดำเนินงาน.....	4
1.4 วิธีการดำเนินการศึกษา.....	4
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว <i>Pyricularia oryzae</i>	6
2.1.1 การบุกรุกเซลล์ข้าวของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้.....	6
2.1.2 โมเลกุล elicitor และ effector ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว.....	8
2.1.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนก่อโรค <i>AVR-Pik</i>	10
2.2 ระบบภูมิคุ้มกันของพืช.....	12
2.3 การส่งทอดสัญญาณและการตอบสนองของพืชหลังถูกกระตุ้นให้เกิดความ ต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้.....	14
2.3.1 การส่งทอดสัญญาณในวิถี MAPK (mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade).....	14
2.3.2 โพรตีนควบคุมการถอดรหัส (transcription factor หรือ TF).....	16
2.3.3 สารไฟโตเล็กซิน phytoalexin.....	17
2.3.4 โพรตีน pathogenesis-related protein (PR).....	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.5 ฮอว์โมนพืช (phytohormone).....	18
2.3.6 การสะสมอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROS).....	19
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	20
3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	20
3.2 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	20
3.3 วิธีการวิจัย.....	22
3.3.1 การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคไหม้ข้าวในช่วงปี 2559 – 2560 และแยกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้.....	22
3.3.2 การตรวจสอบแบบของเพศ (mating type) ของเชื้อรา.....	23
3.3.3 การตรวจสอบรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรค (pathotype) ของเชื้อราบนประชากรข้าวที่มียืนต้านทานเดี่ยว (differential rice varieties).....	25
3.3.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนก่อโรค AVR-Pik ในประชากรเชื้อราของประเทศไทย.....	28
3.3.5 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา และยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองในข้าวที่มียืนต้านทาน Pi2.....	32
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	36
4.1 ผลการสำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคไหม้ข้าว และแยกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้.....	36
4.1.1 ผลการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคไหม้ข้าว.....	36
4.1.2 ผลการแยกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้.....	42
4.2 ผลการตรวจสอบแบบของเพศ (mating type) ของเชื้อรา <i>P. oryzae</i>	48
4.3 ผลการตรวจสอบรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรค (pathotype) ของเชื้อรา <i>P. oryzae</i> บนประชากรข้าวที่มียืนต้านทานเดี่ยว (differential rice varieties).....	48
4.3.1 จัดกลุ่มเชื้อรา <i>P. oryzae</i>	49

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3.2 ระบุยีนก่อโรค (avirulence gene) ของประชากรเชื้อราสาเหตุโรค ไหม้ข้าวในประเทศไทย.....	57
4.4 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนก่อโรค <i>AVR-Pik</i> ใน ประชากรเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ของประเทศไทย.....	63
4.4.1 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>AVR-Pik</i> ในเชื้อรา 7 ไอโซเลท.....	63
4.4.2 โคลนยีน และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนก่อโรค <i>AVR-Pik</i> ในเชื้อราที่ยังไม่สามารถระบุแอสลิตได้ หรืออาจมีมากกว่า 1 แอสลิต.....	65
4.4.3 ตรวจสอบรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคของเชื้อราจำนวน 7 ไอโซเลท บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวกลุ่ม <i>Pik</i> จำนวน 7 สายพันธุ์.....	67
4.4.4 จัดกลุ่มของเชื้อราจำนวน 41 ไอโซเลท ตามรูปแบบปฏิกิริยาการก่อ โรคบนพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว <i>Piks Pikip Pikh Pi1 Pi7(t)</i> และ <i>Pikm</i> ของเชื้อรา 7 ไอโซเลท ที่มียีนก่อโรค <i>AVR-Pika D F</i> และ มากกว่า 1 แอสลิต.....	72
4.5 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อราและ ยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองในข้าว.....	75
4.5.1 ผลการคัดเลือกพันธุ์ข้าวและเชื้อราเพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออก ของยีน.....	75
4.5.2 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อ ราสาเหตุโรคไหม้.....	76
4.5.3 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกัน ตัวเองในข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M ที่มียีนต้านทานเดี่ยว <i>Pi12</i>	77
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง.....	86
5.1 สํารวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคไหม้ข้าวในช่วงปี พ.ศ. 2559 และ 2560.....	86
5.2. ตรวจสอบแบบของเพศ (mating type) ของเชื้อรา.....	87

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.3. ตรวจสอบรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรค (pathotype) ของเชื้อราบนประชากรข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (differential rice varieties).....	90
5.4. ระบุยีนก่อโรค (avirulence gene) ของประชากรเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทย.....	92
5.5. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนก่อโรค AVR-Pik ในประชากรเชื้อราของประเทศไทย.....	93
5.6. ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อราและยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองในข้าวที่มียีนต้านทาน Pi12.....	96
บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	101
บรรณานุกรม.....	103
ภาคผนวก.....	114
ประวัติผู้เขียน.....	131

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ประชากรข้าวที่มียืนต้นทานเคี้ยว (differential rice varieties) จำนวน 31 สายพันธุ์ยืนต้นทานบนโรคไหม้โครโมโซม และสายพันธุ์ผู้ให้.....	26
2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา และยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองในข้าวที่มียืนต้นทานที่นำมาศึกษาในงานวิจัย.....	36
3 ข้อมูลสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคไหม้ข้าว ข้อมูลตำบล อำเภอ จังหวัด และพันธุ์ข้าวที่พบอาการของโรคไหม้ ในพื้นที่ภาคกลาง.....	37
4 ข้อมูลสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคไหม้ข้าว ข้อมูลตำบล อำเภอ จังหวัด และพันธุ์ข้าวที่พบอาการของโรคไหม้ ในพื้นที่ภาคเหนือและภาคเหนือตอนล่าง.....	38
5 ข้อมูลสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคไหม้ข้าว ข้อมูลตำบล อำเภอ จังหวัด และพันธุ์ข้าวที่พบอาการของโรคไหม้ ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.....	40
6 ข้อมูลสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคไหม้ข้าว ข้อมูลตำบล อำเภอ จังหวัด และพันธุ์ข้าวที่พบอาการของโรคไหม้ ในพื้นที่ภาคใต้.....	42
7 เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ 118 ไอโซเลท แยกจากตัวอย่างใบข้าวและคอรวงที่เก็บรวบรวมในฤดูปลูกปี พ.ศ. 2559-2560.....	44
8 สรุปรายชื่อเชื้อรา <i>P. oryzae</i> แยกตามภูมิภาคของประเทศไทย และปีที่เก็บตัวอย่าง.....	48
9 สรุปรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรค (pathotype) ของเชื้อรา 7 ไอโซเลทที่มียืน ก่อโรคแอลลีล <i>AVR-PikA AVR-PikD</i> หรือ <i>AVR-PikF</i> และเชื้อราที่มียืน ก่อโรคมากกว่า 1 แอลลีล.....	72
10 รูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคบนพันธุ์ข้าวที่มียืนต้นทานเคี้ยว <i>Piks Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)</i> และ <i>Pikm</i> ของเชื้อรา 9 ไอโซเลท.....	75

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	อาการของโรคไหม้ข้าว และเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว <i>P. oryzae</i> a) อาการของโรคไหม้บนใบข้าว b) อาการของโรคไหม้บนคอรวงข้าว c) อาการของโรคไหม้บนใบข้าวที่มีขนาดแผลยาวกว่า 1 เซนติเมตร มีการเจริญและสร้างโคนเดี่ยวของเชื้อราในแผลบนใบข้าว d) โคนเดี่ยวของเชื้อราภายใต้กล้อง scanning electron microscope e) รูปร่าง appressorium ที่เจริญบนใบข้าวภายใต้กล้อง scanning electron microscope.....	7
2	ตำแหน่งที่มีการสะสม cytoplasmic และ apoplatic effector ในเซลล์.....	9
3	แผนผังของโปรตีน AVR-Pik แสดงความแตกต่างของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 46 47 48 67 และ 78 ลำดับกรดอะมิโนที่ 1 – 22 คือ signal peptide (SP) กรดอะมิโน ที่ 46 คือ ฮิสติดีน (H) หรือ แอสปารากีน (N) กรดอะมิโนที่ 47 คือ โพรลีน (P) หรือ อะลานีน (A) กรดอะมิโนที่ 48 คือ ไกลซีน (G) หรือ กรดแอสปาร์ติก (D) กรดอะมิโนที่ 67 คือ กรดแอสปาร์ติก (D) หรือ อะลานีน (A) กรดอะมิโนที่ 78 คือ เมตไทโอนีน (M) หรือ ไลซีน (K) หรือ ไอโซลูซีน (I).....	11
4	ทฤษฎีซิกแซกโมเดล (zig-zag model) อธิบายความต้านทานที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นหลังศัตรูพืชบุกรุก (induced resistance).....	13
5	การส่งทอดสัญญาณในวิถี MAPK ที่ควบคุมการสังเคราะห์สาร phytoalexin เพื่อตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรค และโมเลกุล elicitor ของเชื้อสาเหตุโรค ลูกศรเส้นทึบ คือ การควบคุมโดยตรงและลูกศรเส้นประ คือ เส้นทางการส่งทอดสัญญาณ.....	15
6	ลักษณะอาการโรคไหม้และระดับอาการของโรคไหม้ 7 ระดับตามวิธีการจำแนกของ Roumen <i>et al.</i> (1997).....	27
7	แผนที่ระบุตำแหน่งของเชื้อราแต่ละไอโซเลท จุดสีเหลือง คือ ตำแหน่งที่สำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่ระบาดในช่วงฤดูปลูกปี พ.ศ. 2559 – 2560.....	43
8	ระดับความรุนแรงในการก่อโรคไหม้ของเชื้อรากลุ่มที่ 1-1 1-2 1-3 2-1 2-2 และ 2-3 บนประชากรข้าวที่มีอินด้านทานเดี่ยว ข้าวพันธุ์ KDML105 JHN และ IR64 และแบบของเพศของเชื้อรา จำนวน 24 ไอโซเลท เครื่องหมาย - คือ ข้อมูลสูญหาย (missing data).....	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
9	ระดับความรุนแรงในการก่อโรคใหม่ของเชื้อรากลุ่มที่ 3-1 3-2 และ 3-3 บนประชากรข้าวที่มีอินดินทานเดี่ยว ข้าวพันธุ์ KDML105 JHN และ IR64 และแบบของเพศของเชื้อรา จำนวน 35 ไอโซเลท เครื่องหมาย - คือ ข้อมูลสูญหาย (missing data).....	51
10	ระดับความรุนแรงในการก่อโรคใหม่ของเชื้อรากลุ่มที่ 3-4.1 บนประชากรข้าวที่มีอินดินทานเดี่ยว ข้าวพันธุ์ KDML105 JHN และ IR64 และแบบของเพศของเชื้อรา จำนวน 28 ไอโซเลท เครื่องหมาย - คือ ข้อมูลสูญหาย (missing data).....	52
11	ระดับความรุนแรงในการก่อโรคใหม่ของเชื้อรากลุ่มที่ 3-4.2 3-4.3 และ 3-4.4 บนประชากรข้าวที่มีอินดินทานเดี่ยว ข้าวพันธุ์ KDML105 JHN และ IR64 และแบบของเพศของเชื้อรา จำนวน 17 ไอโซเลท เครื่องหมาย - คือ ข้อมูลสูญหาย (missing data).....	53
12	ระดับความรุนแรงในการก่อโรคใหม่ของเชื้อรากลุ่มที่ 3-4.5 3-4.6 3-4.7 3-4.8 และ 3-4.9 บนประชากรข้าวที่มีอินดินทานเดี่ยว ข้าวพันธุ์ KDML105 JHN และ IR64 และแบบของเพศของเชื้อรา จำนวน 14 ไอโซเลท เครื่องหมาย - คือ ข้อมูลสูญหาย (missing data).....	54
13	แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคใหม่ 118 ไอโซเลท บนประชากรข้าวที่มีอินดินทานเดี่ยว ข้าวพันธุ์ KDML105 JHN และ IR64 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc 2.10p เส้นสีแดง คือ ที่ระดับความเหมือน 50 เปอร์เซ็นต์ เส้นสีน้ำเงิน คือ ที่ระดับความเหมือน 60 เปอร์เซ็นต์ เส้นสีเขียว คือ ที่ระดับความเหมือน 90 เปอร์เซ็นต์.....	59
14	จำนวนเชื้อราที่แสดงปฏิสัมพันธ์ในรูปแบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) บนข้าวที่มีอินดินทานเดี่ยวจำนวน 30 สายพันธุ์ ซึ่งมีอินดินทานเดี่ยวจำนวน 30 ยีน.....	60
15	จำนวนเชื้อราของพื้นที่ภาคกลางที่แสดงปฏิสัมพันธ์ในรูปแบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) บนข้าวที่มีอินดินทานเดี่ยวจำนวน 30 สายพันธุ์.....	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
16 จำนวนเชื้อราของพื้นที่ภาคเหนือและภาคเหนือตอนล่างที่แสดงปฏิสัมพันธ์ในรูปแบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวจำนวน 30 สายพันธุ์.....	61
17 จำนวนเชื้อราของพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่แสดงปฏิสัมพันธ์ในรูปแบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวจำนวน 30 สายพันธุ์.....	62
18 จำนวนเชื้อราของพื้นที่ภาคใต้ที่แสดงปฏิสัมพันธ์ในรูปแบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวจำนวน 30 สายพันธุ์.....	63
19 ลำดับกรดอะมิโนโปรตีน AVR-Pik ของเชื้อราไอโซเลท Phitsanulok40.4 SKN10389 UBN7384 และ NKI211170 เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AVR-PikA B C D E และ F จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Jalview Version 2 (Waterhouse <i>et al.</i> 2009) จุดสีดำ หมายถึง มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน.....	64
20 โครมาโทแกรม (chromatogram) แสดงการซ้อนกันของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโนที่ 46 47 48 และ 78 ของเชื้อราไอโซเลท RBR55004 UBN207129 และ THL794.....	65
21 ลำดับกรดอะมิโนโปรตีน AVR-Pik ของเชื้อราไอโซเลท RBR55004 จำนวน 10 โคลน เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AVR-PikA B C D E และ F จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Jalview Version 2 (Waterhouse <i>et al.</i> 2009) จุดสีดำ หมายถึง มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน.....	66
22 ลำดับกรดอะมิโนโปรตีน AVR-Pik ของเชื้อราไอโซเลท UBN207129 จำนวน 10 โคลน เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AVR-PikA B C D E และ F จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Jalview Version 2 (Waterhouse <i>et al.</i> 2009) จุดสีดำ หมายถึง มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน.....	66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
23	ลำดับกรดอะมิโนโปรตีน AVR-Pik ของเชื้อราไอโซเลท THL794 จำนวน 10 โคลน เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AVR-PikA B C D E และ F จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Jalview Version 2 (Waterhouse <i>et al.</i> 2009) จุดสีดำ หมายถึง มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน.....66
24	อาการโรคไหม้บนใบข้าวหลังปลูกเชื้อ 7 วัน แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนก่อโรค AVR-PikA ในเชื้อราไอโซเลท Phitsanulok40.4 และยีนต้านทาน <i>Piks Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)</i> หรือ <i>Pikm</i> ในสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว.....67
25	อาการโรคไหม้บนใบข้าวหลังปลูกเชื้อ 7 วัน แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนก่อโรค AVR-PikD ในเชื้อราไอโซเลท UBN7384 และยีนต้านทาน <i>Piks Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)</i> หรือ <i>Pikm</i> ในสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว.....68
26	อาการโรคไหม้บนใบข้าวหลังปลูกเชื้อ 7 วัน แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนก่อโรค AVR-PikD ในเชื้อราไอโซเลท SKN10389 และยีนต้านทาน <i>Piks Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)</i> หรือ <i>Pikm</i> ในสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว.....69
27	อาการโรคไหม้บนใบข้าวหลังปลูกเชื้อ 7 วัน แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนก่อโรค AVR-PikF ในเชื้อราไอโซเลท NKI211170 และยีนต้านทาน <i>Piks Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)</i> หรือ <i>Pikm</i> ในสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว.....69
28	อาการโรคไหม้บนใบข้าวหลังปลูกเชื้อ 7 วัน แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนก่อโรค AVR-Pik มากกว่า 1 แอลลีลในเชื้อราไอโซเลท THL794 และยีนต้านทาน <i>Piks Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)</i> หรือ <i>Pikm</i> ในสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว.....70
29	อาการโรคไหม้บนใบข้าวหลังปลูกเชื้อ 7 วัน แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนก่อโรค AVR-Pik มากกว่า 1 แอลลีลในเชื้อราไอโซเลท UBN207129 และยีนต้านทาน <i>Piks Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)</i> หรือ <i>Pikm</i> ในสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว.....71
30	อาการโรคไหม้บนใบข้าวหลังปลูกเชื้อ 7 วัน แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนก่อโรค AVR-Pik มากกว่า 1 แอลลีลในเชื้อราไอโซเลท RBR55004 และยีนต้านทาน <i>Piks Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)</i> หรือ <i>Pikm</i> ในสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว.....71

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
<p>31 การแสดงออกของยีน <i>MoHrip1</i> และ <i>MoSlp1</i> ในข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M (<i>Pi12</i>) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลท PNB59003.1 (เกิดโรครุนแรง) แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction และไอโซเลท MSN60009.1 (ไม่เกิดโรค) แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction ที่เวลา 24 48 และ 96 ชั่วโมง ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative realtime RT-PCR ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนสัมพันธ์กับยีน <i>MGG_40S</i> เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$).....</p>	82
<p>32 การแสดงออกของยีน <i>OsPAL</i> และ <i>OsJAZ2</i> ในข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M (<i>Pi12</i>) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลท PNB59003.1 (เกิดโรครุนแรง) แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction และไอโซเลท MSN60009.1 (ไม่เกิดโรค) แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction ที่เวลา 24 48 และ 96 ชั่วโมง ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative realtime RT-PCR ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนสัมพันธ์กับยีน <i>OsActin1</i> เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$).....</p>	83
<p>33 การแสดงออกของยีน <i>OsPR5</i> และ <i>OsPR10</i> ในข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M (<i>Pi12</i>) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลท PNB59003.1 (เกิดโรครุนแรง) แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction และไอโซเลท MSN60009.1 (ไม่เกิดโรค) แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction ที่เวลา 24 48 และ 96 ชั่วโมง ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative realtime RT-PCR ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนสัมพันธ์กับยีน <i>OsActin1</i> เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$).....</p>	84

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
34 การแสดงออกของยีน <i>OsWRKY30</i> และ <i>OsMAPK6</i> ในข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M (<i>Pi12</i>) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลท PNB59003.1 (เกิดโรครุนแรง) แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction และไอโซเลท MSN60009.1 (ไม่เกิดโรค) แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction ที่เวลา 24 48 และ 96 ชั่วโมง ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative realtime RT-PCR ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนสัมพันธ์กับยีน <i>OsActin1</i> เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$)	85

สารบัญตารางผนวก

ตารางผนวกที่		หน้า
1	ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Turekey HSD ของยีน <i>MoHrip1</i>	120
2	ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Turekey HSD ของยีน <i>MoSlp1</i>	121
3	ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Turekey HSD ของยีน <i>OsPAL</i>	122
4	ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Turekey HSD ของยีน <i>OsJAZ2</i>	123
5	ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Turekey HSD ของยีน <i>OsPR5</i>	124
6	ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Turekey HSD ของยีน <i>OsPR10</i>	125
7	ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Turekey HSD ของยีน <i>OsWRKY30</i>	126
8	ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Turekey HSD ของยีน <i>OsMAPK6</i>	127

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพผนวก

ภาพผนวกที่		หน้า
1	ผลการตรวจสอบเพศของเชื้อราจำนวน 118 ไอโซเลท โดยใช้ไพรเมอร์ Mat1-1 และ Mat1-2 เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับเชื้อราทดสอบมาตรฐานสายพันธุ์ 70-15 สายพันธุ์ GUY11 และดีเอ็นเอมาตรฐาน 1000 คู่เบส.....	128
2	รหัสของกรดอะมิโน (triplet code).....	129
3	เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AVR-PikA B C D E และ F ด้วยโปรแกรม Jalview Version 2 (Waterhouse <i>et al.</i> 2009).....	130



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวเป็นพืชที่ประชากรโลกบริโภคเป็นอาหาร มีรายงานความต้องการบริโภคข้าวของโลกเพิ่มขึ้นจาก 469.84 ล้านตันข้าวสาร ในปี 2558/59 เป็น 495.25 ล้านตันข้าวสาร ในปี 2562/63 หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.07 ต่อปี ในประเทศไทยมีการผลิตข้าวเพื่อบริโภคและส่งออกเป็นจำนวนมาก ในปี 2563 สามารถส่งออกได้ประมาณ 5.50 ล้านตันข้าวสาร มูลค่าประมาณ 120,000 ล้านบาท โดยข้าวหอมมะลิและข้าวหอมไทยเป็นที่ต้องการในตลาดต่างประเทศที่มีกำลังซื้อสูง เช่น สหรัฐฯ ฮองกง แคนาดา และสิงคโปร์ เป็นต้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2564) จากข้อมูลเบื้องต้นแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการปลูกข้าวหอมมะลิของไทย ได้แก่ ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ กข15 ปัญหาสำคัญที่ส่งผลให้เกิดการสูญเสียผลผลิตและคุณภาพของข้าวทั้งสองสายพันธุ์นี้ ได้แก่ ความแห้งแล้ง และการบุกรุกของเชื้อโรคและแมลงศัตรูพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคไหม้ข้าว ที่เกิดจากการบุกรุกของเชื้อราสาเหตุโรค *Pyricularia oryzae* ในปี 2535 Mew *et al.* (2001) รายงานการระบาดของโรคไหม้คอรวงในภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือของไทย ซึ่งร้อยละ 90 ของความเสียหายอยู่ในพื้นที่ภาคเหนือ และพบมีการระบาดของโรคไหม้อย่างต่อเนื่องในระยะเวลา 6 ปีที่ผ่านมา (ศูนย์ติดตามและแก้ไขปัญหาภัยพิบัติด้านการเกษตร, 2564) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคไหม้ข้าวในประเทศไทยช่วงฤดูปลูกปี พ.ศ. 2559 – 2560 พร้อมทั้งแยกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวและตรวจสอบแบบของเพศของเชื้อรา ทั้งนี้เพื่อเก็บรักษาเชื้อราและรวบรวมข้อมูลเบื้องต้นสำหรับใช้ในงานวิจัยต่อไป

เชื้อรา *P. oryzae* สามารถบุกรุกข้าวได้ทุกระยะการเจริญเติบโต และสามารถบุกรุกใบ ข้อของใบ ข้อของลำต้น คอรวง และรวงข้าว เชื้อราจะเจริญเมื่ออุณหภูมิและความชื้นเหมาะสม ก่อนโรคได้ตีในเวลากลางคืนที่มีสภาพอากาศชื้นและเย็น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีน้ำค้างปริมาณมากบนใบข้าว เชื้อราสามารถอยู่ข้ามฤดูบนตอซังและเมล็ดได้ จึงพบการระบาดของโรคได้ทั้งปีและทุกฤดูปลูกเพราะมีการปลูกข้าวพันธุ์อ่อนแอต่อโรคไหม้เป็นประจำ (Mew *et al.* 2001) วิธีที่จะประสบความสำเร็จในการป้องกันการสูญเสียผลผลิตของข้าว คือ การลดความเสี่ยงของการระบาดของโรค โดยเร่งรัดการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ ทั้งนี้ความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้เป็นผลสืบเนื่องมาจากความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับข้าวและเชื้อสาเหตุโรคไหม้ที่มีอย่างละเอียดครบถ้วน (ชัชวาล และ สุริพร, 2552) ด้วยเหตุนี้จึงทำการตรวจสอบรูปแบบปฏิบัติการก่อโรคของเชื้อราบนข้าวที่มียืนต้านทานเดี่ยวจำนวน 30 สายพันธุ์ เพื่อระบุยืนก่อโรคของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยที่ระบาดในช่วงฤดูปี 2559 – 2560 ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์

ข้าวต้านทานโรคไหม้ ซึ่งเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการป้องกันการสูญเสียผลผลิตของข้าวจากกระระบาดของโรคไหม้ในประเทศไทย

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประเทศไทยให้ต้านทานโรคไหม้ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา พัฒนาโดยใช้พันธุ์ให้ (donor) ที่มียีนต้านทาน *Pik* เป็นหลัก หลังจากปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ได้ไม่นาน กลับพบว่าพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทาน *Pik* ในประเทศไทยสูญเสียความต้านทาน เนื่องมาจากเชื้อสาเหตุโรคไหม้มีการปรับตัวและเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีนก่อโรค *AVR-Pik* เพื่อหลีกเลี่ยงการตรวจจับของยีนต้านทาน *Pik* ในข้าว จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนก่อโรคในเชื้อรา พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งส่งผลให้กรดอะมิโนของโปรตีน *AVR-Pik* เปลี่ยนไปจำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 46 47 48 67 และ 78 เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยมีรายงานพบยีนก่อโรค *AVR-Pik* แอลลีล *A D* และ *E* และรายงานพบแอลลีล *AVR-PikF* เป็นครั้งแรกในประเทศไทย นอกจากนี้ยังมีรายงานพบเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยมียีนก่อโรค *AVR-Pik* จำนวน 2 แอลลีล ได้แก่ *AVR-PikD/F* (Longya *et al.* 2019) จากรายงานแสดงให้เห็นว่าเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนก่อโรค *AVR-Pik* ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนก่อโรค *AVR-Pik* ในประชากรเชื้อราประเทศไทย เพื่อติดตามและเฝ้าระวังการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีนก่อโรค *AVR-Pik* และการเกิดเชื้อราสายพันธุ์ใหม่

การป้องกันตัวเองของพืชจากการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรค เกิดขึ้นโดยพืชสามารถจดจำโมเลกุลที่เรียกว่า elicitor และ effector ได้ elicitor คือ โมเลกุลของเชื้อสาเหตุโรค (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) หรือ โมเลกุลที่เกิดจากพืชถูกทำลายโดยเชื้อก่อโรค damage-associated molecular patterns (DAMPs) ซึ่งจะถูกจดจำโดย extracellular pattern-recognition receptors (PRRs) ของพืช ได้แก่ โปรตีน transmembrane receptor-like kinases (RLKs) และโปรตีน transmembrane receptor-like proteins (RLPs) (Zipfel, 2008) PRRs ทำหน้าที่เป็นตัวตอบสนองการกระตุ้นทำให้เกิดความต้านทานที่เรียกว่า PAMP-triggered immunity (PTI) ถึงแม้พืชจะถูกกระตุ้นให้เกิดความต้านทาน แต่ก็ยังเป็นเพียงความต้านทานระดับแรกที่เชื้อสาเหตุโรคสามารถยับยั้งได้ เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคมีการหลั่ง effector ซึ่งเป็นโมเลกุลที่เชื้อสาเหตุโรคงเคราะห์ขึ้นเพื่อเพิ่มความสามารถในการบุกรุกพืช (Dangl and McDowell, 2006) อย่างไรก็ตามพืชยังมีกลไกต้านทานต่อเชื้อสาเหตุได้เช่นกัน โดยการสังเคราะห์โปรตีนต้านทาน (R protein) ที่สามารถจดจำ avirulence (AVR) effector แล้วไปกระตุ้นความต้านทานที่เรียกว่า effector-triggered immunity (ETI) ความต้านทานแบบ ETI จะถูกยับยั้งได้โดยการที่เชื้อหลั่ง effector ตัวใหม่ทำให้พืชอ่อนแอ เรียกว่า effector-triggered susceptibility (ETS) ซึ่งในพืชจะต้องมี R protein ตัวใหม่ที่สามารถจดจำ effector ตัวใหม่นี้ได้ จึงจะกระตุ้นให้เกิดความต้านทานแบบ ETI อีกครั้ง พืชจึงจะสามารถต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคได้ (Jones and Dangl, 2006) ความต้านทานที่พืชถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้น ส่งผลให้เซลล์พืชที่ถูกบุกรุกเกิดการตายอย่างเฉียบพลัน (hypersensitive response; เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HR) นอกจากนี้พืชจะกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ reactive oxygen species (ROS) การสะสม callose ตรงบริเวณที่มีการติดเชื้อ การถ่ายโอนสัญญาณผ่านทาง mitogen-activated protein kinases (MAPK) การส่งสัญญาณแคลเซียมไอออน (Ca_2^+) และการกระตุ้นให้เกิดขบวนการถอดรหัส (transcription) สำหรับสังเคราะห์โปรตีน pathogenesis-related protein (PR protein) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค (He *et al.* 2012; Galhano *et al.* 2017)

อย่างไรก็ตามการจดจำระหว่าง R protein และ effector มีหลายรูปแบบทั้งแบบทางตรงและทางอ้อม นอกจากนี้หน้าที่ของ AVR effector ก็มีความแตกต่างกัน เช่น โปรตีน AVR-Pita1 และ AVR-Pita2 ของเชื้อสาเหตุโรคใหม่มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน Pita ในข้าว (Khang *et al.* 2008) กระตุ้นให้เกิด hypersensitive response (HR) ในข้าว (Peyyala and Farman. 2006) หรือ โปรตีน AVR-Piz-t สามารถยับยั้งความต้านทานในพืชแบบ PAMP-triggered immunity (PTI) ได้ โดยยับยั้งการทำงานของ RING E3 ubiquitin ligase (APIP6) ในข้าว ส่งผลให้ข้าวอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคใหม่ (Park *et al.* 2012) จากตัวอย่างดังกล่าวมีความเป็นไปได้ว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่าง R protein และ AVR effector ในแต่ละคู่ ความสัมพันธ์อาจมีการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคและยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองในข้าวแตกต่างกัน เพื่อเข้าใจในปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนก่อโรคในเชื้อรากับยีนต้านทานในข้าวมากขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ 2 ไอโซเลทที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction และ incompatible interaction กับยีนต้านทาน *Pi12* รวมทั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองในข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M ที่มียีนต้านทาน *Pi12* เพียงยีนเดียว ซึ่งเป็นหนึ่งในคู่ความสัมพันธ์ที่สำคัญของประเทศไทย (Parinthawong and Tansian. 2020) และเป็นคู่ความสัมพันธ์ที่ยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน ผลการศึกษาในงานวิจัยนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาบทบาทหน้าที่ของยีนก่อโรคและยีนต้านทานในคู่ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราที่มียีนก่อโรค *AVR-Pi12* และข้าวที่มียีนต้านทาน *Pi12* ต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อรวบรวมเชื้อ ระบุแบบของเพศ และระบุยีนก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ในประชากรเชื้อราประเทศไทย ในช่วงฤดูปี 2559 และ 2560

1.2.2 เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนก่อโรค *AVR-Pik* ในประชากรเชื้อราประเทศไทย

1.2.3 เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา และยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองในข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว *Pi12*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

1.3.1 ห้องปฏิบัติการโรคพืช ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.3.2 ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.4 วิธีการดำเนินการศึกษา

1.4.1 สํารวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างข้าวที่แสดงอาการโรคใหม่ ที่มีการระบาดของโรคในฤดูปลูกปี 2559 และ 2560 พร้อมทั้งรวบรวมข้อมูลพันธุ์ข้าวที่พบอาการของโรคใหม่ และแยกเชื้อสาเหตุโรคใหม่ข้าว ด้วยวิธี single spore isolation

1.4.2 ระบุแบบของเพศ (mating type) ของเชื้อราทั้งหมดที่เก็บรวบรวม ด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *Mat1* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการผสมพันธุ์ที่จำเพาะเจาะจงต่อ mating type ของเชื้อรา *P. oryzae*

1.4.3 ตรวจสอบรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรค (pathotype) ของเชื้อสาเหตุโรคใหม่บนประชากรข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวจำนวน 30 สายพันธุ์ (differential rice varieties) ซึ่งมีฐานพันธุกรรมมาจากข้าวพันธุ์ Lijiangxintuanhegu (LTH) ใช้ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวที่อ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคใหม่ ใช้ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล (JHN) และข้าวพันธุ์ IR64 ซึ่งเป็นข้าวที่ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคใหม่ เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ จากนั้นจัดกลุ่มเชื้อรา *P. oryzae* ตามรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคบนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ข้าวพันธุ์ LTH ข้าวพันธุ์ JHN และข้าวพันธุ์ IR64 พร้อมทั้งจัดกลุ่มความสัมพัทธ์ของเชื้อราด้วยวิธี SHAN วิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) ด้วยวิธี Canberra โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc 2.10p

1.4.4 ระบุยีนก่อโรคของประชากรเชื้อสาเหตุโรคใหม่ข้าวในประเทศไทย โดยใช้ทฤษฎี gene-for-gene ของ Flor. (1971) โดยวิเคราะห์จากผลการตรวจสอบรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรค (pathotype) ของเชื้อราบนประชากรข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวจำนวน 30 สายพันธุ์ (differential rice varieties) ผลประเมินการเกิดโรคที่ระดับคะแนน 0 1 หรือ 2 (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) แสดงให้เห็นว่าเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนก่อโรคในเชื้อราและโปรตีนต้านทานในข้าวแบบ incompatible interaction

1.4.5 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุแอลลีลของยีนก่อโรค *AVR-Pik* ในเชื้อสาเหตุโรคใหม่จำนวน 7 ไอโซเลท ซึ่งคัดเลือกมาจากงานวิจัยของ นวรัตน์ และ นงลักษณ์. (2557) พร้อมทั้งตรวจสอบรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคของเชื้อราทั้ง 7 ไอโซเลทบนสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวจำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ IRBLks-F5 IRBLks-S IRBLkp-K60 IRBLkh-K3 IRBL1-CL IRBL7-M และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

IRBLKM-Ts ซึ่งมียีนต้านทาน *Piks Piks Pkp Pikh Pi1 Pi7(t)* และ *Pikm* ตามลำดับ จากนั้นศึกษาความแปรปรวนของยีนก่อโรค *AVR-Pik* ในประชากรเชื้อราของประเทศไทยที่ระบาดในช่วงฤดูปลูกปี พ.ศ. 2559 – 2560 โดยการจัดกลุ่มตามรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคของเชื้อราแต่ละไอโซเลท และเปรียบเทียบผลกับเชื้อรา 7 ไอโซเลท ที่คัดเลือกรมาจากการวิจัยของ นวรัตน์ และ นงลักษณ์. (2557)

1.4.6 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา (elicitor และ virulence gene) โดยใช้ยีน *MGG_40s* เป็นยีนอ้างอิง (reference gene) และยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองในข้าว ประกอบด้วย กลุ่มยีนที่กระตุ้นให้เกิดการถอดรหัส (transcription factor) กลุ่มยีนควบคุม (regulator gene) และกลุ่มยีนต้านทาน (defense-related gene) โดยใช้ยีน *OsActin1* เป็นยีนอ้างอิง (reference gene) ศึกษาการแสดงออกของยีนในข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M ที่มียีนต้านทานเดี่ยว *Pi12* หลังปลูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท PNB59003.1 และ MSN60009.1 ด้วยวิธี quantitative real-time RT-PCR

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

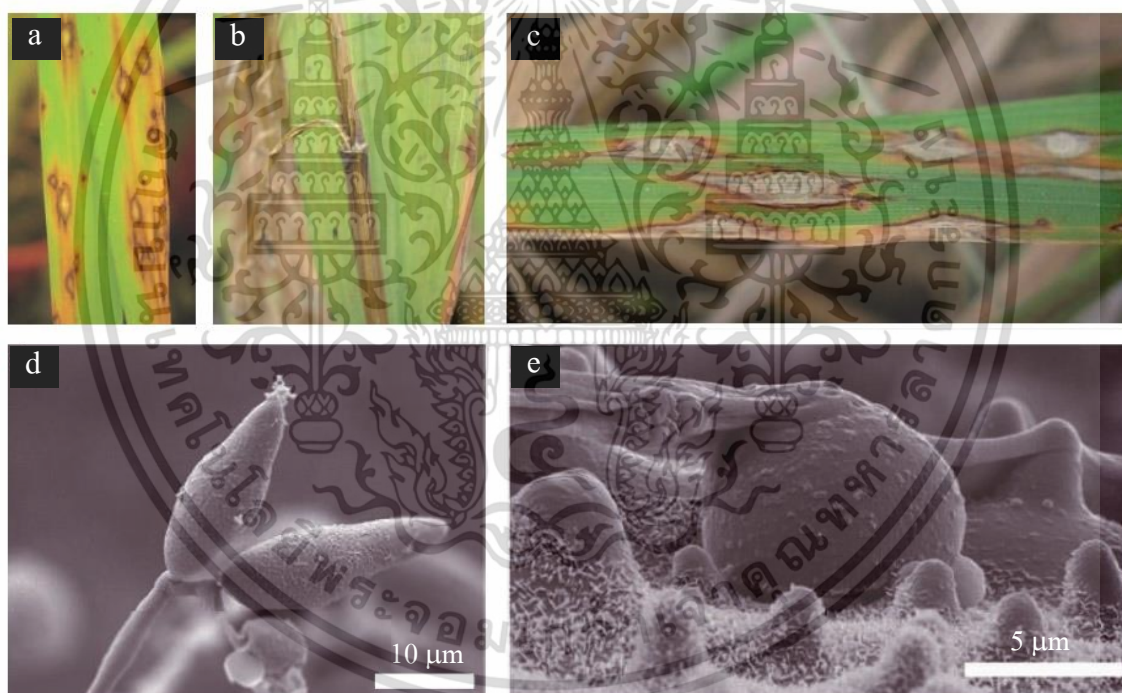
2.1 เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว *Pyricularia oryzae*

เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว เป็นเชื้อราที่สามารถขยายพันธุ์ได้ทั้ง 2 แบบ คือ แบบอาศัยเพศ และแบบไม่อาศัยเพศ *P. oryzae* คือ ชื่อเรียกเชื้อราในระยะที่มีการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorph) ถูกจัดอยู่ในชั้นดิวิชัน (subdivision) Deuteromycotina คลาส (class) Deuteromycetes อันดับ (order) Moniliales และวงศ์ (family) Moniliaceae (Agrios, 1997) เชื้อราสร้างส่วนขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเรียกว่า โคนิเดีย (conidia) มีรูปร่างแบบ pyriform (pear-shaped) ประกอบด้วย 3 เซลล์ โคนิเดียจำนวน 3 – 5 โคนิเดียถูกสร้างจากปลายก้านชูโคนิเดีย (conidiophore) โคนิเดียของเชื้อรามีสีสีสถิงสีมะกอกซีด ก้านชูโคนิเดียเป็นแบบเดี่ยวไม่แตกแขนง และมีการเจริญเติบโตแบบด้านข้างซึ่งเป็นการเจริญของลำต้นที่มีลักษณะแบบเป็นกอ (sympodial growth) (Ou, 1985) ในระยะที่เชื้อรามีการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorph) มีชื่อเรียกเชื้อราว่า *Magnaporthe oryzae* (Couch and Kohn, 2002) (ภาพที่ 1)

2.1.1 การบุกรุกเซลล์ข้าวของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

เชื้อ *P. oryzae* จัดเป็นเชื้อราในกลุ่ม hemibiotroph โดยเชื้อเริ่มบุกรุกข้าวด้วย biotrophic phase เชื้อราจะบุกรุกเข้าสู่ข้าวโดยไม่ทำให้เนื้อเยื่อพืชตาย แต่จะอาศัยอยู่ในเซลล์ข้าวที่มีชีวิต เชื้อราจะดูดซับน้ำและคาร์โบไฮเดรตจากในเซลล์ข้าวเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต หลังจากนั้นเชื้อราจะเปลี่ยนเข้าสู่ necrotrophic phase และทำลายเซลล์ข้าวให้ตายในที่สุด (Ebbole, 2007) ใบข้าวจะแสดงอาการของโรคภายใน 72 – 96 ชั่วโมงภายหลังจากเชื้อสาเหตุโรคบุกรุก หลังจากนั้นภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสมส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราจะถูกสร้างขึ้น และแพร่กระจายไปสู่ข้าวบริเวณข้างเคียง ทำให้เกิดการระบาดของโรคไหม้ (Wilson and Talbot, 2009) ขั้นตอนการบุกรุกข้าวเริ่มต้นจากโคนิเดียของเชื้อรายึดติดกับผิวใบโดยใช้เมือกเหนียวคล้ายกาวซึ่งถูกหลั่งออกจากปลาย โคนิเดีย (Hamer *et al.* 1988; Talbot, 2003) ต่อจากนั้น โคนิเดียของเชื้อราออก germ tube และเจริญอยู่บนผิวใบข้าวอย่างรวดเร็ว (Ryder and Talbot, 2015) เมื่อ germ tube รับรู้สัญญาณทางกายภาพ เช่น ความแข็งของพื้นผิวและพื้นผิวที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic surface) ที่ germ tube ของเชื้อราจะสร้างโครงสร้างเพื่อใช้ในการบุกรุกเซลล์ข้าวที่เรียกว่า appressorium (Wilson and Talbot, 2009; Ryder and Talbot, 2015) ภายในของ appressorium มีการสะสมกลีเซอรอลเพื่อสร้างแรงดันภายในเซลล์ของ appressorium มีการสะสมโคตินและเมลานินที่ผนังของ appressorium ให้หนาแน่นขึ้นจนของเหลวไม่สามารถซึมผ่านได้ ทำให้เกิดแรงดันเต่ง (turgor pressure) ภายในสูงถึง 80 บาร์ (De Jong *et al.* 1997; Chumley and Valent, 1990) แรงดันเต่งนี้จะเปลี่ยนเป็นแรงเชิงกลอยู่ในโครงสร้างที่เรียกว่า penetration peg ซึ่งเป็นโครงสร้างที่สามารถแทงผ่านชั้นคิวติเคิลของใบได้ (Howard เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

and Valent. 1996) หลังจากเชื้อราแทงผ่านชั้นคิวติเคิลของใบข้าว ได้แล้ว penetration peg จะบวมขึ้นและเปลี่ยนเป็น primary infection hyphae (IH) เชื้อราจะเจริญเติบโตภายในเซลล์ข้าว (Heath *et al.* 1992; Heath *et al.* 1990; Koga. 1994) จากนั้นเชื้อราจะเปลี่ยนจากเส้นใยแบบเส้นสาย (filamentous IH) ไปเป็นเส้นใยแบบโป่ง (bulbous IH) ซึ่งเส้นใยของเชื้อราจะถูกล้อมรอบด้วย extrinsic hyphal membrane (EIHM) ที่สร้างโดยเซลล์ข้าว เส้นใย bulbous IH เจริญเติบโตในเซลล์ข้าวเซลล์แรกที่เชื้อรานุกรุกและจะเปลี่ยนกลับไปเป็น filamentous IH เพื่อบุกรุกเซลล์ข้างเคียงที่ไม่ติดเชื่อมผ่านทางพลาสมาเดสมาตาของเซลล์ข้าว (Kankanala *et al.* 2007) เมื่อมีการพัฒนาของ primary IH ที่ปลายของเส้นใยจะปรากฏโครงสร้างที่เรียกว่า biotrophic interfacial complex (BIC) ซึ่งตำแหน่งของ BIC จะแตกต่างกันกับบริเวณที่เป็น bulbous IH (Mosquera *et al.* 2009; Khang *et al.* 2010) ในระยะที่เชื้อรานุกรุกข้าวแบบ biotrophic phase เชื้อราจะหลั่งโมเลกุลที่เรียกว่า effector เพื่อเข้าสู่กระบวนการเกิดโรคไหม้ข้าว (Dangl and McDowell, 2006)



ภาพที่ 1 อาการของโรคไหม้ข้าว และเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว *P. oryzae* a) อาการของโรคไหม้บนใบข้าว b) อาการของโรคไหม้บนคอรวงข้าว c) อาการของโรคไหม้บนใบข้าวที่มีขนาดแผลยาวกว่า 1 เซนติเมตร มีการเจริญและสร้างโคนิเดียมของเชื้อราในแผลบนใบข้าว d) โคนิเดียมของเชื้อราภายใต้กล้อง scanning electron microscope e) รูปร่าง appressorium ที่เจริญบนใบข้าวภายใต้กล้อง scanning electron microscope

ที่มา: Wilson and Talbot (2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 โมเลกุล elicitor และ effector ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว

elicitor คือ โมเลกุลของเชื้อสาเหตุโรค (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) หรือ โมเลกุลที่เกิดจากพืชถูกทำลายโดยเชื้อก่อโรค damage-associated molecular patterns (DAMPs) PAMPs ในเชื้อรา *P. oryzae* เช่น ไคติน (chitin) เบต้ากลูแคน (β -glucan) โปรตีนที่หลั่งจากเชื้อสาเหตุโรคไหม้ MSP1 (*M. grisea* snodprot1 homolog 1) (Jeong *et al.* 2007) และ MoHrip1 (*M. oryzae* hypersensitive response-inducing protein 1) (Gupta *et al.* 2019) เป็นต้น โปรตีน MoHrip1 สามารถกระตุ้นให้ต้นกล้าข้าวต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้ จากงานวิจัยของ Chen *et al.* (2012) ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองของข้าว ได้แก่ ยีน *PR1* และ *PR10* ยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานในวิถีฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ยีน *OsEDS1* *OsPAL1* และ *OsNHI* ซึ่งเป็นยีนในวิถีฮอร์โมนกรดซาลิซิลิก (salicylic acid, SA) และยีน *OsLOX2* ซึ่งเป็นยีนในวิถีฮอร์โมนกรดจัสโมนิก (Jasmonic acid, JA) ด้วยวิธี quantitative realtime RT-PCR โดยใช้ cDNA ที่เตรียมจากต้นกล้าข้าวพันธุ์ Nipponbare ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายโปรตีน MoHrip1 เปรียบเทียบกับ Nipponbare ที่ถูกปลูกเชื้อรา *P. oryzae* ไอโซเลท RO1-1 ซึ่งเป็นไอโซเลทที่ก่อโรครุนแรง ศึกษาการแสดงออกของยีนที่ระยะเวลาหลังจากปลูกเชื้อที่แตกต่างกัน คือ 0 1 2 3 และ 4 วัน ในข้าวพันธุ์ Nipponbare ที่เวลา 2 วันหลังถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน MoHrip1 มีการแสดงออกของยีน *OsEDS1* *OsPAL1* และ *OsNHI* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องในวิถี SA และยีน *OsLOX2* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องในวิถี JA นอกจากนี้ยังรายงานว่าที่เวลา 3 วันหลังถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน MoHrip1 และถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราสาเหตุโรค มีการแสดงออกของยีน *PR* (*PR* gene) ในข้าว ได้แก่ ยีน *OsPR1a* และ *OsPR10a* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเสริมสร้างความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ให้กับต้นกล้าข้าว อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีน *OsPR1a* และ *OsPR10a* มีระดับการแสดงออกของยีนในตัวอย่างที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราสาเหตุโรคต่ำกว่าในตัวอย่างที่ถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน MoHrip1

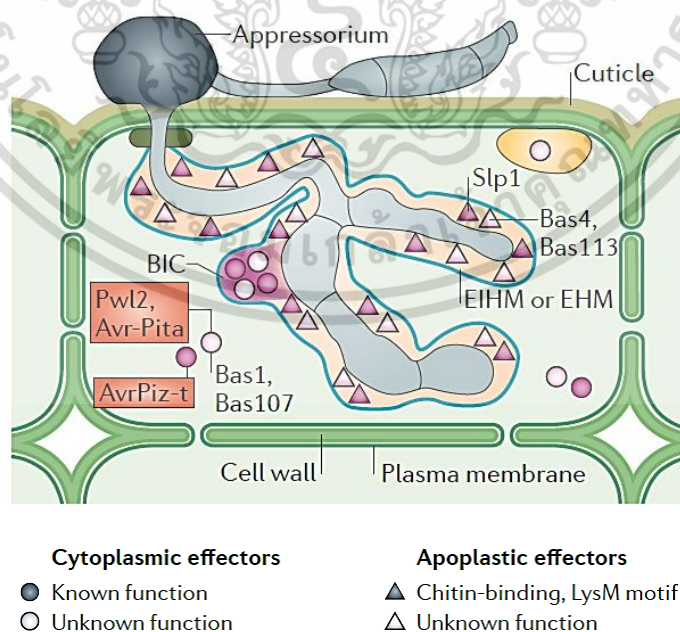
โมเลกุล effector ในเชื้อรา *P. oryzae* แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามปฏิสัมพันธ์ที่มีต่อโปรตีนต้านทาน (resistance (R) protein) กลุ่มแรกเรียกว่า avirulent (AVR) effector ซึ่งเป็น effector ที่มีปฏิสัมพันธ์กับ R protein ในข้าว เช่น โปรตีน PWL1 และ PWL2 เป็นโปรตีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับ R protein ในข้าวฟ่างสามง่าม (finger millet) และหญ้าหาวาย (weeping lovegrass) (Kang *et al.* 1995) โปรตีน AVR-Pita1 และ AVR-Pita2 มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน Pita ในข้าว (Khang *et al.* 2008) โปรตีน AVR-Piz-t สามารถยับยั้งความต้านทานแบบ PAMP-triggered immunity (PTI) ในพืชได้ โดยยับยั้งการทำงานของ RING E3 ubiquitin ligase (APIP6) ในข้าว ส่งผลให้ข้าวอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ (Park *et al.* 2012) โปรตีน AVR1-Co39 มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน Pi-CO39(t) และกระตุ้นให้เกิด hypersensitive response (HR) ในข้าว (Peyyala and Farman. 2006) และโปรตีน ACE1 มีปฏิสัมพันธ์กับโปรตีน Pi33 ในข้าว (Bohnert *et al.* 2004; Fudal *et al.* 2007) ปัจจุบันมี AVR effector ที่ได้รับการศึกษาและได้รับการโคลนยีนแล้วจำนวน 12 ยีน ได้แก่ *PWL1* (Kang *et al.* 1995) *PWL2* (Sweigard *et al.* 1995)

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

AVR-Pita (Orbach *et al.* 2000) *AVR1-Co39* (Farman *et al.* 2002) *ACE1* (Bohnert *et al.* 2004) *AVR-Pia* (Miki *et al.* 2009) *AVR-Pii* (Yoshida *et al.* 2009) *AVR-Piz-t* (Li *et al.* 2009) *AVR-Pik* (Yoshida *et al.* 2009) *AVR-Pi9* (Wu *et al.* 2015) *AVR-Pib* (Zhang *et al.* 2015) และ *AVR-Pi54* (Ray *et al.* 2016)

โมเลกุล effector กลุ่มที่ 2 เป็น effector ที่ไม่มีปฏิสัมพันธ์กับ R protein ในข้าว เรียกว่า virulence effector เช่น โปรตีน LysM protein 1 (Slp1) ทำหน้าที่แทรกแซงการทำงานของ chitin-elicitor binding protein (CEBiP) ในพืช โดย Slp1 จะจับกับ chitin (oligo-saccharides) ของตัวเองเพื่อยับยั้งความต้านทานแบบ PTI เชื้อราจึงบุกรุกพืชได้ ไม่เกิดการสะสมของ reactive oxygen species (ROS) และ pathogenesis-related protein (PR protein) ที่มีคุณสมบัติในการต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคใหม่ (Mentlak *et al.* 2012) virulence effector อีก 4 ชนิด ได้แก่ biotrophy-associated secreted (BAS) protein 1 2 3 และ 4 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีการสะสมในช่วงแรกของการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรคใหม่ และสะสมในข้าวที่แสดงอาการของโรคใหม่ชัดเจน (Mosquera *et al.* 2009)

นอกจากนี้สามารถแบ่ง effector ออกเป็น 2 กลุ่มตามตำแหน่งสะสมในเซลล์พืช ได้แก่ cytoplasmic และ apoplastic effector เช่น โปรตีน BAS (biotrophic-associated secreted) 1 เริ่มมีการสะสมที่บริเวณโครงสร้าง BIC ก่อนเคลื่อนย้ายเข้าสู่ไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ของข้าว เรียกว่า cytoplasmic effector (Khang *et al.* 2010; Park *et al.* 2012; Saitoh *et al.* 2012) ในทางตรงกันข้าม apoplastic effector เช่น โปรตีน Slp1 พบมีการสะสมอยู่ในของเหลวภายในอะโพพลาสต์ (apoplastic matrix) ซึ่งอยู่ระหว่างผนังเซลล์เชื้อราและ extra-invasive hyphal membrane (EIHM) (Khang *et al.* 2010; Giraldo *et al.* 2013; Mentlak *et al.* 2012) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ตำแหน่งที่มีการสะสม cytoplasmic และ apoplastic effector ในเซลล์ข้าว

ที่มา: Giraldo and Valent (2013)

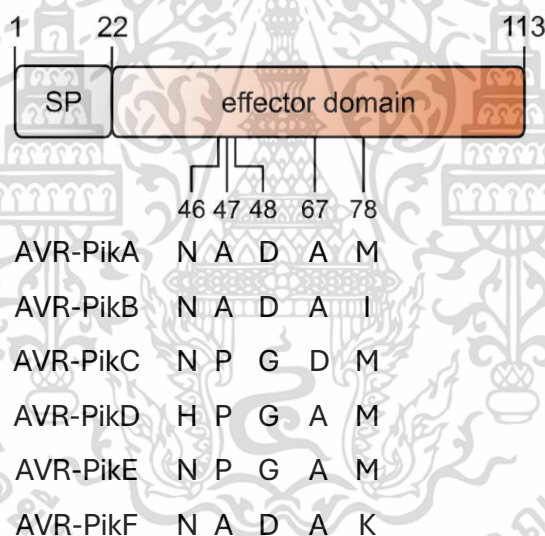
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนก่อโรค *AVR-Pik*

ยีนก่อโรค *AVR-Pik* เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน *AVR-Pik* ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 113 กรดอะมิโน มีบริเวณเพปไทด์ที่ควบคุมการขนส่งโปรตีน (signal peptide) จำนวน 21 กรดอะมิโน (Yoshida *et al.* 2009) เป็นยีนก่อโรคที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม มีรายงานพบแอลลีลจำนวน 6 แอลลีล ได้แก่ แอลลีล *A B C D E* และ *F* พบความแตกต่างของแต่ละแอลลีลที่กรดอะมิโน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 46 47 48 67 และ 78 ของโปรตีน *AVR-Pik* (ภาพที่ 3) ความหลากหลายของแอลลีลของยีน *AVR-Pik* เกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ส่งผลให้ลำดับกรดอะมิโนในโปรตีนเปลี่ยนไป (Yoshida *et al.* 2009; Longya *et al.* 2019) Longya *et al.* (2019) รายงานว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างแอลลีลของยีนต้านทาน *Pik* ในข้าวและแอลลีลของยีนก่อโรค *AVR-Pik* ในเชื้อสาเหตุโรคไหม้มีความสำคัญในประเทศไทย เนื่องจากพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคไหม้ในประเทศไทยในช่วงหลายปีที่ผ่านมาถูกพัฒนาโดยใช้พันธุ์ให้ (donor) ที่มียีนต้านทาน *Pik* เป็นหลัก หลังจากปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ได้ไม่นาน พันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทาน *Pik* ในประเทศไทยสูญเสียความต้านทาน เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคไหม้มีการปรับตัวและเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของยีนก่อโรค *AVR-Pik* เพื่อหลีกเลี่ยงการตรวจจับของยีนต้านทาน *Pik* ในข้าว จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งส่งผลให้กรดอะมิโนของโปรตีน *AVR-Pik* เปลี่ยนไปจำนวน 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่ 46 47 48 67 และ 78 เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยมียีนก่อโรค *AVR-PikA AVR-PikD AVR-PikE* และรายงานการพบแอลลีล *AVR-PikF* ครั้งแรกในประเทศไทย นอกจากนี้ยังรายงานว่ามีเชื้อราจำนวน 28 ไอโซเลต ซึ่งคิดเป็น 48 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราที่ศึกษา มียีนก่อโรค *AVR-Pik* จำนวน 2 แอลลีล ได้แก่ *AVR-PikD* และ *AVR-PikF* ซึ่งจากการตรวจสอบพบยีนทั้งสองแอลลีลแสดงออกในขณะที่เชื้อรานุกรุกข้าว แสดงให้เห็นว่าเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนก่อโรค *AVR-Pik* สูง

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างคู่ของโปรตีนก่อโรค *AVR-Pik* และโปรตีนต้านทานโรคไหม้ *Pik* สามารถกระตุ้นให้เกิด hypersensitive response (HR) (Yoshida *et al.* 2009; Kanzaki *et al.* 2012; Longya *et al.* 2019) โดยโปรตีนก่อโรคแต่ละแอลลีลมีความจำเพาะต่อโปรตีนต้านทานแต่ละแอลลีลแตกต่างกัน ยีน *AVR-PikD* เป็นแอลลีลที่มีปฏิสัมพันธ์กับยีนต้านทาน *Pik* ในรูปแบบ incompatible interaction ได้หลายแอลลีล ได้แก่ *Pik Piks Pikh Pikh* และ *Pikp* (Yoshida *et al.* 2009; Longya *et al.* 2019) กรดอะมิโนของโปรตีน *AVR-PikD* ที่ตำแหน่ง 46 47 48 67 และ 78 คือ ฮิสติดีน (H) โพรลีน (P) ไกลซีน (G) อะลานีน (A) และเมไทโอนีน (M) ตามลำดับ (ภาพที่ 3) ในขณะที่โปรตีน *AVR-PikE* มีความแตกต่างของกรดอะมิโนจาก *AVR-PikD* ที่กรดอะมิโนเพียง 1 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 46 มีกรดอะมิโนเปลี่ยนจาก H (ฮิสติดีน) ไปเป็น N (แอสปาราจีน) (ภาพที่ 3) แต่ยีนก่อโรค *AVR-PikE* มีปฏิสัมพันธ์กับยีนต้านทาน *Pik* ในรูปแบบ incompatible interaction เพียงแอลลีลเดียว คือ *Pik* ในข้าวสายพันธุ์ K60 (Yoshida *et al.* 2009; Kanzaki *et al.* 2012) โปรตีน *AVR-PikA* มีความแตกต่างของกรดอะมิโนจาก *AVR-PikE* ที่กรดอะมิโน

2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 47 มีกรดอะมิโนเปลี่ยนจาก P (โพรลีน) ไปเป็น A (อะลานีน) และตำแหน่งที่ 48 มีกรดอะมิโนเปลี่ยนจาก G (ไกลซีน) ไปเป็น D (กรดแอสปาร์ติก) (ภาพที่ 3) แต่ยีนก่อโรค *AVR-PikA* มีปฏิสัมพันธ์ในรูปแบบ incompatible interaction กับยีนต้านทาน *Pikm* ในข้าวสายพันธุ์ Tsuyuake (Kanzaki *et al.* 2012) โพรตีน AVR-PikC มีความแตกต่างของกรดอะมิโนจากแอลลิล AVR-PikE ที่กรดอะมิโนเพียง 1 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 67 มีกรดอะมิโนเปลี่ยนจาก A (อะลานีน) ไปเป็น D (กรดแอสปาร์ติก) (ภาพที่ 3) แต่ยีนก่อโรค *AVR-Pik-C* ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์กับยีนต้านทาน *Pik* ในรูปแบบ incompatible เชื้อราที่มียีนก่อโรค *AVR-Pik-C* จึงเป็นเชื้อราที่รุนแรงสามารถก่อโรคได้บนพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรค *Pik* ได้ทุกแอลลิล (Yoshida *et al.* 2009) ในขณะที่ AVR-PikF เป็นแอลลิลที่มีความแตกต่างของกรดอะมิโนจาก AVR-PikA ที่กรดอะมิโนเพียงแค่ 1 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ 78 มีกรดอะมิโนเปลี่ยนจาก M (เมตไทโอนีน) ไปเป็น K (ไลซีน) (ภาพที่ 3) แต่ยีนก่อโรค *AVR-PikF* ไม่เกิดปฏิสัมพันธ์กับยีนต้านทาน *Pik* ในรูปแบบ incompatible เชื้อราที่มียีนก่อโรค *AVR-PikF* จึงเป็นเชื้อราที่รุนแรงสามารถก่อโรคได้บนพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรคใหม่ *Pik* ได้ทุกแอลลิล (Longya *et al.* 2019)



ภาพที่ 3 แผนผังของโปรตีน AVR-Pik แสดงความแตกต่างของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 46 47 48 67 และ 78 ลำดับกรดอะมิโนที่ 1 – 22 คือ signal peptide (SP) กรดอะมิโนที่ 46 คือ ฮีสติดีน (H) หรือ แอสปาราจีน (N) กรดอะมิโนที่ 47 คือ โพรลีน (P) หรือ อะลานีน (A) กรดอะมิโนที่ 48 คือ ไกลซีน (G) หรือ กรดแอสปาร์ติก (D) กรดอะมิโนที่ 67 คือ กรดแอสปาร์ติก (D) หรือ อะลานีน (A) กรดอะมิโนที่ 78 คือ เมตไทโอนีน (M) หรือ ไลซีน (K) หรือ ไอโซลูซีน (I) ที่มา: Maidment *et al.* (2021); Longya *et al.* (2019)

Kanzaki *et al.* (2012) ได้อธิบายสมมุติฐานเกี่ยวกับวิวัฒนาการที่มีร่วมกันของยีนก่อโรค *AVR-Pik* และยีนต้านทาน *Pik* เริ่มแรกยีนก่อโรคแอลลิล *AVR-PikD* มีวิวัฒนาการมาจากยีน *AVR-Pik* ที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์เพื่อการแข่งขันในเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นไปขอประโชยณด้านการศึกษาไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นยีนต้นกำเนิดซึ่งถูกตรวจจับด้วยยีนต้านทานในข้าวที่มียีนต้านทาน *Pik* ทุกแอลลีล ข้าวที่มียีนต้านทาน *Pik* สามารถตรวจจับแอลลีล *AVR-PikD* ข้าวคัดเลือกยีนต้านทาน *Pikp* และ *Piks* ไว้ให้สามารถตรวจจับยีนก่อโรคได้ ในขณะที่เดียวกันเชื้อสาเหตุโรคใหม่พยายามหลีกเลี่ยงการตรวจจับของยีนต้านทานในข้าว วิวัฒนาการนี้ทำให้เกิดแอลลีล *AVR-PikE* ซึ่งถูกตรวจจับได้ด้วยยีนต้านทาน *Pik* และ *Piks* แต่สามารถหลีกเลี่ยงการตรวจจับของยีนต้านทานแอลลีลอื่นได้ จากความต้านทานที่เกิดจากยีนต้านทาน *Pik* ที่สามารถตรวจจับยีนก่อโรคแอลลีล *AVR-PikD* และ *AVR-PikE* ได้ ส่งผลให้นักปรับปรุงพันธุ์เลือกใช้ยีน *Pik* ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานต่อโรคใหม่ หรือ มีการเลือกใช้พันธุ์พื้นเมืองที่มียีนต้านทานดังกล่าว และปลูกข้าวพันธุ์นั้นต่อเนื่องมาเป็นเวลานาน หลังจากนั้นเชื้อราจึงพยายามหลีกเลี่ยงการตรวจจับของยีนต้านทาน *Pik* ที่มนุษย์เลือกใช้ โดยการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อให้กรดอะมิโนเปลี่ยน จึงเกิดเป็นโปรตีนใหม่ที่ควบคุมโดยยีนก่อโรคแอลลีล *AVR-PikA* การเปลี่ยนแปลงนี้ส่งผลให้ยีนต้านทาน *Pik* และ *Piks* ในข้าวไม่สามารถตรวจจับแอลลีล *AVR-PikA* ได้ ท้ายที่สุดภายใต้ความกดดันที่เกิดจากการคัดเลือกของนักปรับปรุงพันธุ์ส่งผลให้เกิดวิวัฒนาการของแอลลีล *AVR-PikC* ซึ่งแอลลีล *AVR-PikC* ไม่สามารถถูกตรวจจับได้ด้วยยีนต้านทานทุกแอลลีล ดังนั้นเชื้อราที่มียีนก่อโรค *AVR-PikC* จึงเป็นเชื้อราที่สามารถก่อโรครุนแรงบนพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรคใหม่ *Pik* ได้ทุกแอลลีล

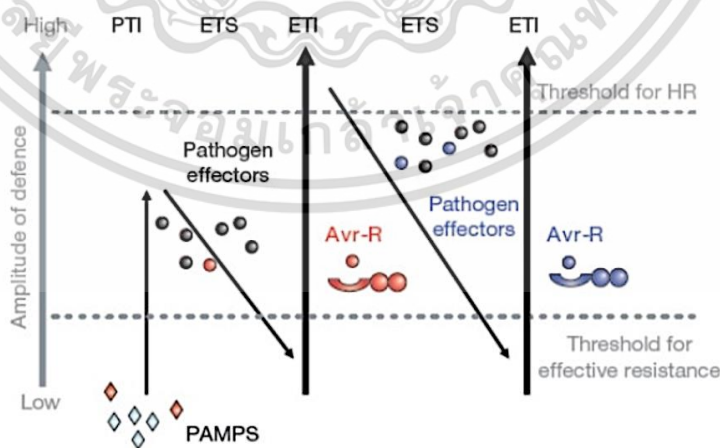
2.2 ระบบภูมิคุ้มกันของพืช

พืชมีระบบภูมิคุ้มกันเพื่อป้องกันตนเองจากการบุกรุกของศัตรูพืช ระบบภูมิคุ้มกันนี้จะทำให้พืชมีความต้านทานต่อศัตรูพืช ซึ่งความต้านทานของพืชถูกแบ่งออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ ความต้านทานที่มีอยู่ในพืชก่อนศัตรูพืชบุกรุก (constitutive resistance) และความต้านทานที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นหลังศัตรูพืชบุกรุก (induced resistance) (Jones and Dangl, 2006)

ความต้านทานที่มีอยู่ในพืชก่อนศัตรูพืชบุกรุก (constitutive resistance) ได้แก่ โครงสร้างทางกายภาพ (physical barrier) เช่น ความแข็งแรงของผนังเซลล์ (cell wall) ชั้นของแว็กซ์ (wax) และคิวติเคิล (cuticle) ที่ปกคลุมบริเวณลำต้นและผิวใบ (นงลักษณ์, 2559; Serrano *et al.* 2014) และการสะสมสารเคมี (chemical barrier) เช่น การผลิตสาร phytoanticipin (Piasecka *et al.* 2015) ความต้านทานแบบ constitutive resistance ไม่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุชนิดใดชนิดหนึ่งแต่จะสามารถต้านทานแบบกว้างหรือทนต่อการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรคได้หลายชนิดและหลายสายพันธุ์ (นงลักษณ์, 2559; Vergne *et al.* 2010)

Jones and Dangl (2006) อธิบายความต้านทานที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นหลังศัตรูพืชบุกรุก (induced resistance) ด้วยทฤษฎีซิกแซกโมเดล (zig-zag model) (ภาพที่ 4) ในการป้องกันตัวเองจากการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรค พืชสามารถจดจำโมเลกุลที่เรียกว่า elicitor และ effector ได้ elicitor คือ โมเลกุลของเชื้อสาเหตุโรค (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) หรือ โมเลกุลที่เกิดจากพืชถูก

ทำลายโดยเชื้อก่อโรค damage-associated molecular patterns (DAMPs) ซึ่งจะถูกรับรู้โดย extracellular pattern-recognition receptors (PRRs) ของพืช ได้แก่ โปรีติน transmembrane receptor-like kinases (RLKs) และโปรีติน transmembrane receptor-like proteins (RLPs) (Zipfel, 2008) PRRs ทำหน้าที่ตอบสนองการกระตุ้นทำให้เกิดความต้านทานที่เรียกว่า PAMP-triggered immunity (PTI) โปรีติน RLKs และ RLPs ในข้าวที่พบรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิดความต้านทานแบบ PTI เช่น CEBiP ที่มีหน้าที่จับกับ chitin ของเชื้อรา (Kaku *et al.* 2006) ถึงแม้พืชจะถูกกระตุ้นให้เกิดความต้านทาน แต่ก็ยังเป็นเพียงความต้านทานระดับแรกที่เชื้อสาเหตุโรคสามารถยับยั้งได้ เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคใหม่มีการหลั่ง effector ซึ่งเป็นโมเลกุลที่เชื้อสาเหตุโรคสังเคราะห์ขึ้นเพื่อเพิ่มความสามารถในการบุกรุกพืช (Dangl and McDowell, 2006) อย่างไรก็ตามพืชยังมีกลไกต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคได้เช่นกัน โดยการสังเคราะห์โปรีตินต้านทาน (R protein) ที่สามารถจดจำ AVR effector แล้วไปกระตุ้นความต้านทานที่เรียกว่า effector-triggered immunity (ETI) ความต้านทานแบบ ETI จะถูกยับยั้งได้โดยการที่เชื้อสาเหตุโรคหลั่ง effector ตัวใหม่ทำให้พืชอ่อนแอ เรียกว่า effector-triggered susceptibility (ETS) ซึ่งในพืชจะต้องมี R protein ตัวใหม่ที่สามารถจดจำ effector ตัวใหม่ได้ จึงจะกระตุ้นให้เกิดความต้านทานแบบ ETI ได้อีกครั้ง ความต้านทานที่พืชถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นนี้ ส่งผลให้เซลล์พืชที่ถูกเชื้อสาเหตุโรคบุกรุกเกิดการตายอย่างเฉียบพลัน (hyper-sensitive response, HR) ซึ่งมีศักยภาพสูงในการยับยั้งการก่อโรคและการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคภายในพืช (Spoel and Dong, 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าในพืชจะมีการกระตุ้นให้เกิดการสร้าง reactive oxygen species (ROS) การสะสม callose ตรงบริเวณที่มีการติดเชื้อ การกระตุ้นให้เกิดการถ่ายโอนสัญญาณผ่านทาง mitogen-activated protein kinases (MAPK) การส่งสัญญาณแคลเซียมไอออน (Ca_2^+) และการกระตุ้นให้เกิดขบวนการ transcription ของยีนเพื่อสังเคราะห์โปรีติน pathogenesis-related protein (PR protein) เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค (He *et al.* 2012; Galhano *et al.* 2017)



ภาพที่ 4 ทฤษฎีซิกแซกโมเดล (zig-zag model) อธิบายความต้านทานที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นหลังศัตรูพืชบุกรุก (induced resistance)

ที่มา: Jones and Dangl (2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนต้านทาน (resistant (R) gene) ในพืช และยีนก่อโรค (avirulence (AVR) gene) ในเชื้อสาเหตุโรคเรียกว่า ปฏิสัมพันธ์ gene-for-gene โดยปฏิสัมพันธ์แบ่งออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ ปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction เป็นลักษณะอาการที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสามารถบุกรุกข้าวได้ ซึ่งเป็นผลมาจากโปรตีนต้านทานในข้าวไม่สามารถตรวจจับโปรตีนก่อโรคในเชื้อสาเหตุโรคได้ ปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction เป็นลักษณะอาการของปฏิกิริยาที่ตอบสนองแบบ hypersensitive response (HR) ซึ่งเป็นผลมาจากโปรตีนต้านทานในข้าวสามารถตรวจจับโปรตีนก่อโรคในเชื้อสาเหตุโรคได้ (Flor, 1971)

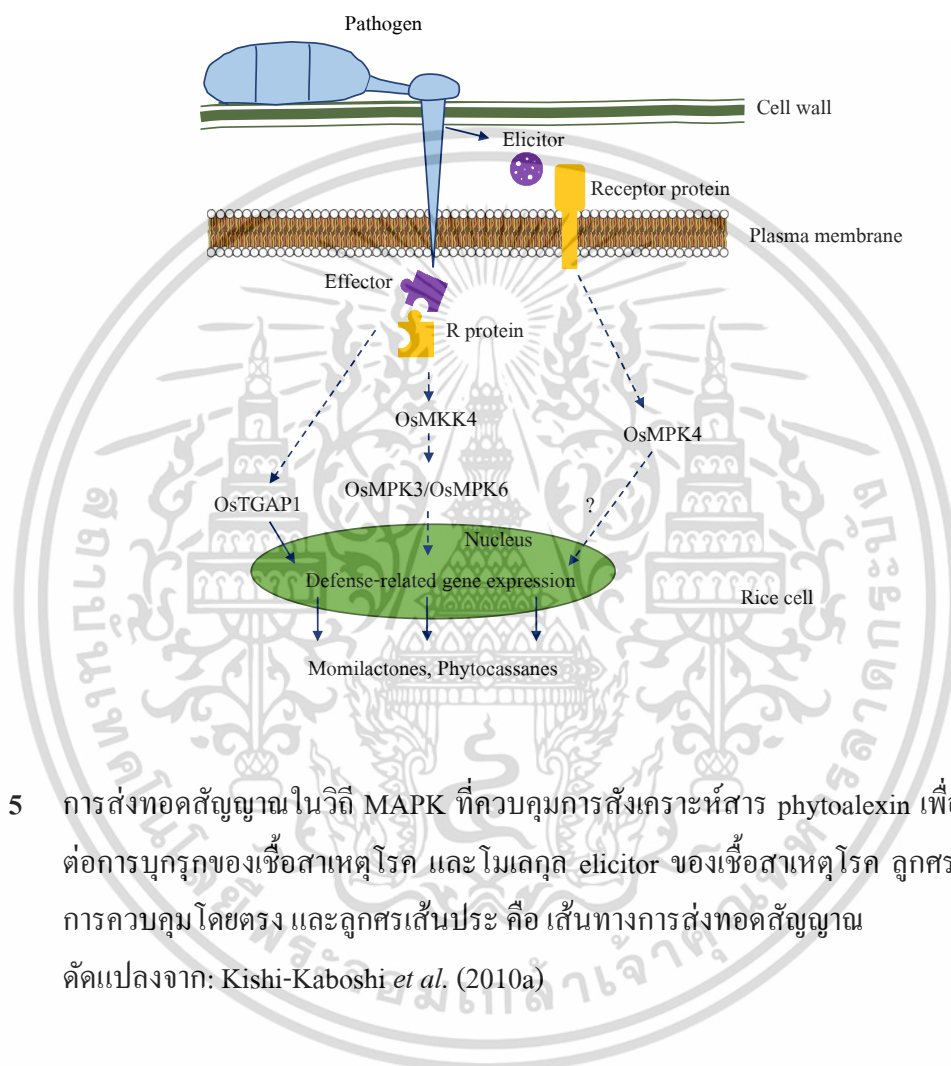
2.3 การส่งทอดสัญญาณและการตอบสนองของพืชหลังถูกกระตุ้นให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคใหม่

2.3.1 การส่งทอดสัญญาณในวิถี MAPK (mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade)

การส่งทอดสัญญาณในวิถี MAPK ในพืชเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการกระตุ้นของสิ่งมีชีวิต (various biotic) และไม่มีชีวิต (abiotic) การแบ่งเซลล์ (cell division) และกระบวนการพัฒนาภายในเซลล์พืช การส่งทอดของโมเลกุลสัญญาณเกิดขึ้นจากผิวเซลล์ด้านนอกผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ โดยส่งผ่านจาก G-protein-linked receptor ผ่าน cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) และ phospholipase C หรืออีกวิถีคือส่งผ่านจาก enzyme-linked receptor ผ่าน phospholipase C และโปรตีน Ras (Rat sarcoma virus) การส่งทอดสัญญาณทั้ง 2 วิถีมีความซับซ้อนมากน้อยแตกต่างกัน และในขั้นสุดท้ายโมเลกุลสัญญาณแต่ละชนิดจะไปกระตุ้นโปรตีนไคเนส (kinase) ซึ่งทำหน้าที่เป็นโมเลกุลสัญญาณตัวหลักในการควบคุมการตอบสนองของเซลล์ ให้เป็นไปตามบทบาทของโมเลกุลสัญญาณที่มากกระตุ้น (Ichimura *et al.* 2002) โปรตีน mitogen-activated protein kinases (MAPKs) มีบทบาทสำคัญในการส่งทอดสัญญาณในวิถี MAPK โดยเริ่มส่งทอดสัญญาณที่ได้รับมาจากภายนอกเซลล์ ไปยังจุดรับสัญญาณภายในเซลล์ โดยผ่านกระบวนการถ่ายโอนหมู่ฟอสเฟต หรือ ปฏิกิริยาฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) มีการศึกษาในอะราบิโดปซิส (*Arabidopsis*) รายงานว่า การส่งทอดสัญญาณในวิถี MAPK ทำหน้าที่ส่งทอดสัญญาณในระบบภูมิคุ้มกันพืชทั้งในความต้านทานแบบ PTI และ ETI (Pitzschke *et al.* 2009) โดยส่งทอดสัญญาณในวิถี MAPK ผ่านทางโปรตีน MPK4 และส่งทอดสัญญาณต่อไปให้กับโปรตีน MPK3/MPK6 จากนั้นจะไปกระตุ้นให้มีการตอบสนองในทั้งในรูปแบบ PTI และ ETI นอกจากนี้ยังพบการส่งทอดสัญญาณในวิถี MAPK ผ่านทางโปรตีน MEKK1 ส่งทอดสัญญาณให้กับ MKK1/MKK2 ส่งต่อให้ MPK4 และส่งทอดสัญญาณให้กับ MKS1 การส่งทอดสัญญาณในวิถีนี้จะไปกระตุ้นให้เกิดความต้านทานพื้นฐาน (basal defense) ในพืช (Devendrakumar *et al.* 2018)

ยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน MAPKs ที่มีรายงานพบในข้าว ได้แก่ ยีน *OsMPK3* *OsMPK4* และ *OsMPK6* ซึ่งมียีนใน *Arabidopsis* ที่เป็น orthologous กัน ได้แก่ ยีน *AtMPK3* *AtMPK4* และ *AtMPK6* เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามลำดับ ยีน *OsMPK3* และ *OsMPK6* จะกระตุ้นการสังเคราะห์สาร phytoalexin ในกลุ่ม diterpenoid ได้แก่ momilactone และ phytocassane โดยมียีน *OsMKK4* เป็นยีนต้นทาง (upstream) ในการส่งทอดสัญญาณให้กับ *OsMPK3/OsMPK6* เพื่อตอบสนองต่อ chitin elicitor จากผนังเซลล์เชื้อราสาเหตุโรค (ภาพที่ 5) (Kishi-Kaboshi *et al.* 2010a)



ภาพที่ 5 การส่งทอดสัญญาณในวิถี MAPK ที่ควบคุมการสังเคราะห์สาร phytoalexin เพื่อตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรค และโมเลกุล elicitor ของเชื้อสาเหตุโรค ลูกศรเส้นทึบ คือ การควบคุมโดยตรง และลูกศรเส้นประ คือ เส้นทางการส่งทอดสัญญาณ
ดัดแปลงจาก: Kishi-Kaboshi *et al.* (2010a)

Kishi-Kaboshi *et al.* (2010b) ศึกษาการส่งทอดสัญญาณในวิถี MAPK ในข้าวที่ถูกกระตุ้นด้วย chitin elicitor โดยเปรียบเทียบการสะสมสาร momilactone และ phytocassane ในเซลล์ข้าว 3 แบบ ได้แก่ 1) เซลล์ข้าวที่ถูกทำให้ยีน *MAPK6* กลายพันธุ์ (*osmpk6*) โดยการแทรกชิ้นส่วน retrotransposon Tos17 ที่บริเวณ exon ลำดับที่ 4 ของยีน *MAPK6* จึงไม่สามารถสังเคราะห์ยีน *MAPK6* ได้ 2) เซลล์ข้าว *osmpk6* ที่แทรกชิ้นส่วน cDNA ของยีน *OsMPK6* (*osmpk6/OsMPK6*) เหนือบริเวณลำดับดีเอ็นเอของยีนในบริเวณที่โปรตีนเข้าจับเพื่อเริ่มถอดรหัสอาร์เอ็นเอ (upstream promoter) และ 3) เซลล์ข้าวสายพันธุ์ wild type (WT) ที่มีการแสดงออกของยีน *MAPK6* เป็นปกติ วิเคราะห์สารด้วยเทคนิค high performance เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry (HPLC–ESI-MS/MS) รายงานว่ามีการสะสมสาร momilactone และ phytocassane ในข้าวที่มีการแสดงออกของยีน *MAPK6* เป็นปกติ หลังถูกกระตุ้นด้วย chitin elicitor และพบการสะสมของสารทั้งสองชนิดในเซลล์ข้าว *osmpk6/OsMPK6* เหมือนในข้าวที่มีการแสดงออกของยีน *MAPK6* เป็นปกติ ในขณะที่ในเซลล์ข้าว *osmpk6* พบการสะสมสาร momilactone ในปริมาณต่ำกว่า และไม่พบการสะสมสาร phytocassane ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการส่งทอดสัญญาณในวิถี MAPK นำไปสู่การสังเคราะห์สาร momilactone และ phytocassane ในข้าว และยีน *MAPK6* เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการส่งทอดสัญญาณในวิถี MAPK

Xiong and Yang (2003) ศึกษาบทบาทของยีน *OsMAPK5* หรือ *OsMPK5* ที่เกี่ยวข้องกับการส่งทอดสัญญาณในวิถี MAPK โดยยับยั้งการแสดงออกของยีน *OsMAPK5* ด้วยวิธี double-stranded RNA interference (dsRNAi) รายงานว่าในข้าวที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *OsMAPK5* มีการแสดงออกของยีน *pathogenesis-related (PR)* ได้แก่ ยีน *PR1* และ *PR10* เพิ่มสูงขึ้น ช่วยเพิ่มความสามารถต้านทานต่อเชื้อรา *P. grisea* และเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* ในข้าวที่ถูกยับยั้งการแสดงออกของยีน *OsMAPK5* จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ายีน *OsMAPK5* เป็นยีนที่ควบคุมเชิงลบต่อความต้านทานในข้าว

2.3.2 โพรตีนควบคุมการถอดรหัส (transcription factor หรือ TF)

transcription factor (TF) เป็นโปรตีนที่สามารถเข้าจับอย่างจำเพาะกับดีเอ็นเอ เพื่อกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสของยีน ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น หรือยับยั้งไม่ให้เกิดการถอดรหัสของยีน TF มีบทบาทในการควบคุมกลไกการสร้างภูมิคุ้มกันในพืช เพื่อให้ต้านทานต่อศัตรูพืช ทั้งที่เป็นสิ่งมีชีวิต (biotic) และไม่มีชีวิต (abiotic) (Century *et al.* 2008) มีรายงานพบ TF จำนวนมากในข้าว ซึ่งแบ่ง TF ออกเป็นหลายกลุ่ม เช่น กลุ่มโปรตีน WRKYGQK หรือ เรียกว่าโปรตีน WRKY มีจำนวนมากกว่า 100 ตำแหน่งในจีโนมข้าว WRKY คือ โปรตีนที่ประกอบด้วย WRKY domain จำนวน 1 หรือ 2 domain ซึ่ง WRKY domain คือ โครงสร้างที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 60 กรดอะมิโน มี heptapeptide WRKYGQK ที่ปลาย N-terminal และ zinc-finger-like ที่ปลาย C-terminal โปรตีน WRKY จำเพาะกับชุดดีเอ็นเอที่เรียกว่า W box ที่ตำแหน่ง promoter และจะไปกระตุ้นยีนที่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรตีน WRKY ให้เกิดการถอดรหัส (Wu *et al.* 2005)

Ryu *et al.* (2006) ศึกษาการแสดงออกของยีน *OsWRKYs* ในข้าวทั้งหมด 45 ยีน เมื่อถูกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้บุกกรุก พบการแสดงออกของยีนจำนวน 15 ยีน ได้แก่ *OsWRKY7* *OsWRKY10* *OsWRKY11* *OsWRKY30* *OsWRKY32* *OsWRKY45* *OsWRKY62* *OsWRKY64* *OsWRKY67* *OsWRKY70* *OsWRKY76* *OsWRKY82* *OsWRKY83* *OsWRKY84* และ *OsWRKY85* ซึ่งมีการแสดงออกในตัวอย่างข้าวที่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction ระหว่างข้าวและเชื้อราสาเหตุโรค นอกจากนี้ยังพบว่า ยีน *OsWRKY45* และ *OsWRKY62* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังถูกกระตุ้นด้วย salicylic acid (SA) ยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

OsWRKY10 *OsWRKY82* และ *OsWRKY85* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังถูกกระตุ้นด้วย jasmonic acid (JA) ยีน *OsWRKY30* และ *OsWRKY83* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังถูกกระตุ้นด้วย SA และ JA ยีนในกลุ่ม WRKY เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้มีการถอดรหัสของยีนต้านทาน (defense-related gene) เพื่อตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุโรค

Peng *et al.* (2012) รายงานว่า การแสดงออกของยีน *WRKY30* ช่วยเพิ่มความต้านทานต่อโรคไหม้ข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *P. grisea* โดยความต้านทานที่เพิ่มสูงขึ้นในข้าวที่ถูกตัดแปลงพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของยีน *WRKY30* เป็นความต้านทานที่เกิดจากการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ JA ได้แก่ ยีน *LOX* และ *AOS2* รวมทั้งการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน *pathogenesis-related (PR)3* และ *PR10*

2.3.3 สารไฟโตอเล็กซิน (phytoalexin)

phytoalexin เป็นสารอินทรีย์โมเลกุลต่ำ มีการสังเคราะห์และสะสมในพืชเพื่อต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคหลังจากพืชถูกเชื้อสาเหตุโรคนุกรุก สาร phytoalexin สามารถแบ่งได้หลายกลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม flavonoid กลุ่ม isoflavonoid กลุ่ม diterpenoid กลุ่ม sesquiterpenoid และกลุ่ม indole ในข้าวมีรายงานพบ phytoalexin จำนวน 15 ชนิด จัดอยู่ในกลุ่ม flavonoid จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ sakuranetin (Grayer and Kokubun, 2001) และในกลุ่ม diterpenoid จำนวน 14 ชนิด ซึ่งถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่ม phytocassane A ถึง E กลุ่ม oryzalexin A ถึง F กลุ่ม momilactone A และ B และกลุ่ม oryzalexin S (Kanno *et al.* 2006; Xu *et al.* 2007) มีรายงานตรวจพบสาร momilactone A สาร oryzalexin E สาร oryzalexin S สาร phytocassane A ถึง E และสาร sakuranetin ในข้าวที่ต้านทานเชื้อสาเหตุโรคไหม้ (Dillon *et al.* 1997; Kodama *et al.* 1992; Umemura *et al.* 2003) Toyomasu (2008) รายงานว่า ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร phytoalexin ในข้าว ได้แก่ ยีน *OsCPS2* และ *OsKSL7* เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร phytocassane A ถึง E ยีน *OsCPS4* และ *OsKSL4* เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร momilactone A และ B ยีน *OsCPS4* และ *OsKSL8* เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร oryzalexin S และยีน *OsCPS2* และ *OsKSL10* เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร oryzalexins A ถึง F

2.3.4 โปรตีน pathogenesis-related protein (PR)

โปรตีน PR มีบทบาทสำคัญในกลไกการป้องกันตัวเองของพืช ในเซลล์พืชจะสังเคราะห์และสะสมโปรตีน PR ภายหลังถูกนุกรุกโดยเชื้อสาเหตุโรค หรือถูกกระตุ้นภายหลังเกิดบาดแผลบนส่วนของพืช หรือการกระตุ้นด้วยสารเคมี โดยปัจจุบันได้มีการจัดจำแนกโปรตีน PR โดยอาศัยคุณสมบัติของโปรตีนไว้ทั้งหมด 17 กลุ่ม ในจำนวนนี้มีโปรตีน PR บางกลุ่มพบว่ามีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราได้ ได้แก่ โปรตีนกลุ่ม PR3 ที่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ chitinase (Sels *et al.* 2008)

Lv *et al.* (2016) ศึกษาการแสดงออกของยีน *PR* ในข้าวที่ถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน MoHrip1 เปรียบเทียบกับข้าวที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน MoHrip1 พบการแสดงออกของยีน *OsPR5* และ *OsPR10* ทั้งในตัวอย่างที่ถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน MoHrip1 และในตัวอย่างที่ไม่ถูกกระตุ้น อย่างไรก็ตามในตัวอย่างที่ไม่ถูกกระตุ้นพบการแสดงออกของยีน *OsPR5* และ *OsPR10* ที่ต่ำกว่าในตัวอย่างที่ถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน MoHrip1

2.3.5 ฮอร์โมนพืช (phytohormone)

phytohormone เป็นสารสำคัญสำหรับการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ของพืช และยังมีส่วนร่วมสำคัญในการส่งทอดสัญญาณในกลไกความต้านทานโรคของพืชเพื่อตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุโรค salicylic acid (SA) จำเป็นสำหรับเครือข่ายการส่งสัญญาณที่พืชใช้เพื่อตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรคที่เป็น biotroph (Bari and Jones. 2009) SA จะมีการสังเคราะห์และสะสมเพิ่มขึ้นในข้าวที่ต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ (Daw *et al.* 2008) ในขณะที่ jasmonic acid (JA) และ ethylene (ET) จำเป็นสำหรับเครือข่ายการส่งสัญญาณที่พืชใช้เพื่อตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรคที่เป็น necrotroph (Bari and Jones. 2009) JA สามารถเพิ่มความต้านทานของข้าวต่อการบุกรุกของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้ โดยกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ยีนกลุ่ม *PR* และมีการสะสมสาร sakuranetin ซึ่งเป็นสาร phytoalexin ในข้าว (Mei *et al.* 2006)

ยีน *OsPAL* เป็นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyases (PALs) เกี่ยวข้องกับการส่งทอดสัญญาณในวิถี SA ในกลไกการป้องกันตัวเองของพืชพบว่ามีแสดงออกของยีน *OsPAL1* ซึ่งเป็นยีนควบคุมการแสดงออกของยีน *Pigm* และ *PIBPI* ในข้าวหลังถูกเชื้อสาเหตุโรคไหม้บุกรุก การแสดงออกของยีน *Pigm* และ *PIBPI* มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างและสะสม lignin ในเซลล์ข้าว (You *et al.* 2020)

ยีน *OsJAZ2* เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน jasmonate-ZIM domain (JAZ) มีบทบาทในการยับยั้งกระบวนการถอดรหัสของยีน (transcriptional repressor) ที่เกี่ยวข้องกับการส่งทอดสัญญาณผ่านทางวิถี JA โดยโปรตีน JAZ จะจับกับโปรตีน MYC2 ซึ่งทำหน้าที่เป็น basic helix-loop-helix leucine zipper-type (bHLHzip-type) transcription factor ในกระบวนการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งทอดสัญญาณวิถี JA การจับกันระหว่างโปรตีน JAZ และ MYC2 จะยับยั้งการทำงานของโปรตีน MYC2 ส่งผลให้กระบวนการถอดรหัสของยีนถูกยับยั้ง หลังจากพืชถูกกระตุ้นจากเชื้อสาเหตุโรค ในกระบวนการส่งทอดสัญญาณวิถี JA จะมีการสังเคราะห์สาร jasmonoyl-l-isoleucine (JA-Ile) ในปริมาณมาก ไปกระตุ้นให้เกิดการจับกันระหว่างโปรตีน COI1 (coronatine insensitive1) และโปรตีน JAZ โปรตีน COI1 คือ F-box protein ซึ่งเป็นโปรตีนหนึ่งในโครงสร้างที่เรียกว่า SCF^{COI1} (SKP1, Cullim, F-box protein E3 ubiquitin ligase) การจับกันระหว่างโปรตีน COI1 และโปรตีน JAZ ทำให้เกิดกระบวนการ ubiquitination เกิดการย่อยสลายโปรตีน JAZ ด้วย 26S proteasome เมื่อโปรตีน JAZ ถูกย่อยสลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีน MYC2 จะเป็นอิสระและไปกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งทอดสัญญาณผ่านทางวิถี JA เพื่อให้พืชต้านทานต่อโรค รวมทั้งเกิดการถอดรหัสของยีน *JAZ* ที่ถอดรหัสให้โปรตีน *JAZ* ด้วย (Chico *et al.* 2008; Staswick. 2007)

2.3.6 การสะสมอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROS)

โมเลกุล ROS ทั้งในรูปของซูเปอร์ออกไซด์ (super oxide; O_2^-) หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide; H_2O_2) เป็นโมเลกุลที่มีคุณสมบัติเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ จึงยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคที่เจริญอยู่ในเซลล์พืชได้ และยังมีคุณสมบัติกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคอื่น ๆ ได้ (Nanda *et al.* 2010)

Lin *et al.* (2018) เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในข้าวไม่เป็นโรคเนื่องจากถูกปลูกเชื้อเชื้อสายพันธุ์ไม่รุนแรง (JS153) และข้าวเป็นโรคใหม่เนื่องจากถูกปลูกเชื้อสายพันธุ์รุนแรง (Guy11) พบยีน *OsPRX59* และ *OsPRX62* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์อนุมูลอิสระ ROS มีการแสดงออกในระดับสูงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ แต่พบการแสดงออกของยีนในข้าวไม่เป็นโรคที่ถูกปลูกเชื้อสายพันธุ์ไม่รุนแรง (JS153) สูงกว่าในข้าวที่ถูกปลูกเชื้อสายพันธุ์รุนแรง (Guy11)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- 3.1.1 กล้องสเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope)
- 3.1.2 เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
- 3.1.3 เครื่องเขย่าสาร (shaker)
- 3.1.4 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking water bath)
- 3.1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- 3.1.6 เครื่องแยกสารพันธุกรรมให้บริสุทธิ์ด้วยไฟฟ้า (gel electrophoresis)
- 3.1.7 เครื่อง BluPAD Dual LED Blue/White Light Transilluminator (Bio-Helix, Taiwan)
- 3.1.8 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR Thermal Cycler)
- 3.1.9 เครื่องฟ่นโคนิเดียเชื้อรา
- 3.1.10 ตู้บ่ม (incubator)
- 3.1.11 เครื่อง CFX96 Touch™ Real-Time PCR System (Bio-Rad, US)

3.2 อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

- 3.2.1 อุปกรณ์
 - 3.2.1.1 หลอดหยดสารปลายตีบ (dropper tube)
 - 3.2.1.2 กระดาษกรอง (Whatman filter paper) ขนาดรูพรุน 11 ไมครอน (Merck, Germany)
 - 3.2.1.3 cork borer
 - 3.2.1.4 โกร่ง
 - 3.2.1.5 หลอดขนาด 1.5 มิลลิเมตร
 - 3.2.1.6 กระบะหลุมขนาดกว้าง 27.5 เซนติเมตร ยาว 53 เซนติเมตร ขนาดหลุม 3x3 เซนติเมตร และลึก 4 เซนติเมตร
 - 3.2.1.7 กระบะสำหรับปลูกขนาดกว้าง 39.5 เซนติเมตร ยาว 53 เซนติเมตร สูง 13 เซนติเมตร
 - 3.2.1.8 งานอาหารเลี้ยงเชื้อ
 - 3.2.1.9 แท่งแก้วรูปตัวแอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.10 กระจกยอคลุมเนียม

3.2.1.11 กระจกยอสึ่น้ำตาลสำหรับเก็บตัวอย่างข้าวเป็นโรค

3.2.2 สารเคมี

3.2.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ water agar (WA)

3.2.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ rice flour agar (RFA)

3.2.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth (PDB)

3.2.2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB)

3.2.2.5 ไนโตรเจนเหลว

3.2.2.6 เอทานอลบริสุทธิ์ (absolute ethanol)

3.2.2.7 ดีย้อมดีเอ็นเอ Novel Juice (Bio-Helix, Taiwan)

3.2.2.8 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Thermo Scientific, USA)

3.2.2.9 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp (Thermo Scientific, USA)

3.2.2.10 ชุด *Taq* DNA polymerase (Thermo Scientific, USA)

3.2.2.11 ชุด deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)

3.2.2.12 ปู๋ยูเรีย (46-0-0)

3.2.2.13 เจลลาติน

3.2.2.14 ชุดสกัด GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, USA)

3.2.2.15 ชุด pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, USA)

3.2.2.16 ชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia)

3.2.2.17 ยาปฏิชีวนะ ampicillin

3.2.2.18 X-gal

3.2.2.19 IPTG

3.2.2.20 Trizol reagent

3.2.2.21 chloroform

3.2.2.22 isopropanol

3.2.2.23 ethyl alcohol 75 เปอร์เซ็นต์

3.2.2.24 DEPC water

3.2.2.25 DNase I (Invitrogen, USA)

3.2.2.26 ชุด RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, USA)

3.2.2.27 ชุด 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (no ROX)

(Solis BioDyne, Estonia)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.28 สารดูดความชื้น (silica gel)

3.2.2.29 สารละลาย 0.5x TAE

3.2.3 เชื้อรา แบคทีเรีย และข้าวที่ใช้ในการทดลอง

3.2.3.1 เชื้อราทดสอบมาตรฐาน *P. oryzae* ไอโซเลท 70-15 และ GUY11

3.2.3.2 ประชากรข้าวที่มีอินดินด้านทานเดี่ยวจำนวน 31 สายพันธุ์

3.2.3.3 ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล

3.2.3.4 ข้าวพันธุ์ IR64

3.2.3.5 ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105

3.2.3.6 *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α

3.3 วิธีการวิจัย

3.3.1 การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคไหม้ข้าวในช่วงปี 2559 – 2560 และแยกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างที่แสดงอาการโรคไหม้จากพื้นที่ปลูกข้าว ที่มีการระบาดของโรคในประเทศไทยช่วงฤดูปลูกปี พ.ศ. 2559 – 2560 และแยกเชื้อราบริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation

3.3.1.1 การเก็บตัวอย่างใบข้าว

เก็บตัวอย่างใบข้าวเป็นโรคไหม้ใส่ถุงกระดาษสีน้ำตาลที่มีสารดูดความชื้น (silica gel) เพื่อป้องกันการสร้างโคนิเดียของเชื้อราก่อนทำการแยกเชื้อ บันทึกข้อมูลพิกัดทางภูมิศาสตร์ ด้วยระบบพิกัด Decimal Degree (DD) แสดงค่าละติจูดและลองจิจูดโดยใช้เลขทศนิยมเป็นเลขฐานสิบ รวมทั้งบันทึกข้อมูล ตำบล อำเภอ จังหวัด และพันธุ์ข้าวที่พบอาการของโรคไหม้

3.3.1.2 การแยกเชื้อราด้วยวิธี single spore isolation

แยกเชื้อราจากตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้ ตัดใบบริเวณที่แสดงอาการของโรคไหม้ขนาด 1 x 1 (กว้าง x ยาว) เซนติเมตร นำไปวางในจานเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษทิชชูเปียกเพื่อให้ความชื้น บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้หลอดหยดสารละลายชนิดแก้ว (dropper tube) ที่ผ่านการลนไฟและดึงให้มีปลายแหลมขนาดเล็ก และที่ปลายของโคนิเดียเชื้อราให้โคนิเดียติดมากับปลายหลอดเล็กน้อย ดำเนินการภายใต้ตู้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป และปลายหลอดบนอาหาร water agar (WA) กลิ้งให้โคนิเดียอยู่ห่างกัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัดปลายเส้นใยเชื้อราที่ออกจากโคนิเดีย ไปเลี้ยงบนอาหาร rice flour agar (RFA) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อราที่แยกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปเก็บรักษาในสภาพเส้นใยแห้งบนกระดาษกรองที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Roumen *et al.* 1997) กำหนดชื่อไอโซเลทของเชื้อราโดยใช้อักษรย่อภาษาอังกฤษของจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง จากนั้นตามด้วยปี พ.ศ. ที่เก็บตัวอย่าง และลำดับของไอโซเลทโดยกำหนดด้วยตัวเลข 3 หลัก กรณีที่โคโคนิเดียของเชื้อราได้มาจากแผลเดียวกันจะระบุด้วยลำดับเลขทศนิยมกำหนดลำดับโคโคนิเดีย เชื้อราที่ขึ้นต้นด้วย BAG ก็คือเชื้อราที่ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

3.3.2 การตรวจสอบแบบของเพศ (mating type) ของเชื้อรา

ตรวจสอบแบบของเพศของประชากรเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างใบข้าวทั้งหมด เนื่องจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศอาจเป็นสาเหตุสำคัญของความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคใหม่ ซึ่งอาจมีผลต่อการเพิ่มความรุนแรงของโรคใหม่ได้ในอนาคต

3.3.2.1 การเตรียมดีเอ็นเอของเชื้อรา

นำกระดาษกรองที่มีเชื้อราแต่ละไอโซเลทมาเลี้ยงบนอาหาร RFA นาน 4 วัน ใช้ cork borer เจาะชิ้นวุ้นที่บริเวณปลายเส้นใยเชื้อราจำนวน 3 ชิ้น ย้ายลงในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) ปริมาณ 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน กรองเส้นใยเชื้อราด้วยกระดาษกรอง (Whatman filter paper) ขนาดรูพรุน 11 ไมครอน (Merck, Germany) บดเส้นใยเชื้อราให้เป็นผงละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว นำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia) สกัดตามขั้นตอนที่บริษัทแนะนำ ขั้นแรกทำให้แห้งเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มนิวเคลียสแตกออกเพื่อหั่นดีเอ็นเอออกมา โดยเติม buffer PL ปริมาณ 280 ไมโครลิตรในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีผงละเอียดของเชื้อราปริมาณ 100 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) นาน 30 วินาที ย่อยโปรตีนโดยเติม Proteinase K ปริมาณ 20 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเพื่อผสมสารให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ตกตะกอนส่วนที่ไม่ต้องการโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ย้ายสารละลายที่มีดีเอ็นเอผสมอยู่ด้านบนใส่ในหลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย buffer PB ปริมาณ 2 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอที่มีอยู่ในหลอดใหม่ พลิกหลอดไปมาเพื่อผสมสารให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติมเอทานอลบริสุทธิ์ (absolute ethanol) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันโดยทันทีด้วยวิธีพลิกหลอดไปมาเพื่อป้องกันการตกตะกอนของกรดนิวคลีอิกที่ไม่สม่ำเสมอ ย้ายสารละลายดีเอ็นเอปริมาณ 650 ไมโครลิตรใส่ในคอลัมน์ (column) ที่สวมอยู่ในหลอด (collection tube) ที่ให้มาพร้อมชุดสกัด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อให้สารละลายที่ไม่ต้องการไหลผ่าน column ทำซ้ำโดยย้ายสารละลายดีเอ็นเอที่เหลือใส่ใน column เดิม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ล้าง column ด้วย wash buffer ปริมาณ 650 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาน 1 นาที เพื่อให้ wash buffer ไหลผ่าน column กำจัด ethanol ออกให้หมด โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที สะตื้นเอ็นเอที่จับกับ column ออก โดยย้าย column ใส่งในหลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตรหลอดใหม่ ค่อย ๆ หยด elution buffer ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงบริเวณแผ่นกรอง (column membrane) ปล่อยให้สารละลายสะตื้นเอ็นเอออกจาก column membrane นาน 2 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A260) และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis นำดีเอ็นเอผสมกับสีย้อม Novel Juice (Bio-Helix, Taiwan) ในอัตราส่วน 1:5 หยดลงในหลุมของแผ่นอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปล่อยให้โมเลกุลดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที โดยใช้สารละลาย 0.5X TAE เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอไปตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอภายใต้ UV illumination ด้วยเครื่อง BluPAD Dual LED Blue/White Light Transilluminator (Bio-Helix, Taiwan) เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส (Thermo Scientific, USA)

3.3.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *Mat1* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการผสมพันธุ์ที่จำเพาะเจาะจงต่อแบบของเพศ (mating type) ของเชื้อรา *P. oryzae* คือไพรเมอร์ *MAT1-1* (Forward 5'-TCAGCTCGCCAAATCAACAAT-3' และ Reverse 5'-ACTCAAGACCCGGCACGAACAT-3') และไพรเมอร์ *MAT1-2* (Forward 5'-GAGTTGCCTGCCCGCTTCTG-3' และ Reverse 5'-GGCTTGGTCGTTGGGGATTGT-3') ดำเนินการตามวิธีการของ Samanta *et al.* (2014) เตรียมปฏิกิริยา PCR ในปริมาณรวม 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยน้ำกลั่นมาเชื่อมแล้วปริมาณ 5.6 ไมโครลิตร PCR buffer ความเข้มข้น 10X ปริมาณ 1 ไมโครลิตร MgCl₂ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร dNTPs ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 0.8 ไมโครลิตร *Taq* polymerase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.1 ไมโครลิตร ส่วนผสมคู่ไพรเมอร์ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอเชื้อราความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ขั้นตอนในการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย 1) initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 2) denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 3) annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 4) extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 – 4 จำนวน 35 รอบ และขั้นตอน 5) final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที นำผลผลิต PCR ที่ได้ผสมกับสีย้อม Novel Juice (Bio-Helix, Taiwan) ในอัตราส่วน 1:5 ตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และเปรียบเทียบผลกับเชื้อทดสอบมาตรฐาน เชื้อราที่ปรากฏขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 809 คู่เบส เหมือนกับเชื้อรา *P. oryzae* ไอโซเลทเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

70-15 คือ เชื้อราที่มีแบบของเพศ Mat1-1 เชื้อราที่ปรากฏขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 950 คู่เบส เหมือนกับเชื้อรา *P. oryzae* ไอโซเลท GUY11 คือ เชื้อราที่มีแบบของเพศ Mat1-2

3.3.3 การตรวจสอบรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรค (pathotype) ของเชื้อราบนประชากรข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (differential rice varieties)

นำประชากรเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างใบข้าวทั้งหมด มาตรวจสอบรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคบนประชากรข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวจำนวน 31 สายพันธุ์ เพื่อระบุยีนก่อโรคของประชากรเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทย โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ

3.3.3.1 การเตรียมกล้าข้าว

ชุดประชากรข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (differential rice varieties) จำนวน 30 สายพันธุ์ ซึ่งมีฐานพันธุกรรมมาจากข้าวสายพันธุ์ Lijiangxintuanhegu (LTH) (ตารางที่ 1) ได้รับความอนุเคราะห์จาก International Rice Research Institute (IRRI) ประเทศฟิลิปปินส์ ข้าวพันธุ์เปรียบเทียบ 3 พันธุ์ ได้แก่ ข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล ข้าวพันธุ์ IR64 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานโรคไหม้ และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ ปลูกข้าวแต่ละสายพันธุ์ลงกระบะหลุม ขนาด 7×12 หลุม (กระบะกว้าง 27.5 เซนติเมตร ยาว 53 เซนติเมตร ขนาดหลุม 3×3 เซนติเมตร ลึก 4 เซนติเมตร) ที่มีดินปลูกผสมปุ๋ยยูเรีย 3 กรัมต่อกระบะ โดยปลูกสายพันธุ์ละ 1 หลุม หลุมละ 2 ต้น วางกระบะหลุมลงในกระบะสำหรับปลูก ขนาดกว้าง 39.5 เซนติเมตร ยาว 53 เซนติเมตร สูง 13 เซนติเมตร เติมน้ำให้พอดีกับผิวหน้าดิน ใส่ปุ๋ยยูเรียอีกครั้งเมื่อข้าวอายุ 11 วัน ปริมาณ 1 กรัมต่อกระบะ นำข้าวไปใช้ในการทดลองปลูกเชื้อเมื่อต้นกล้าข้าวอายุครบ 14 วัน

3.3.3.2 การเตรียมเชื้อราและการปลูกเชื้อบนกล้าข้าว

เตรียมเชื้อราและปลูกเชื้อราลงบนต้นกล้าข้าวตามวิธีการของ Sreewongchai *et al.* (2009) เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร RFA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 – 10 วัน กระตุ้นให้เชื้อราสร้างโคนิเดียมด้วยการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 200 ไมโครลิตรบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโคนิเดียมเชื้อราเจริญใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลดูบเส้นใยเชื้อราบนผิวหน้าอาหารเพื่อให้เส้นใยแตกหัก เป็นการกระตุ้นให้เชื้อราสร้างโคนิเดียม จากนั้นปล่อยให้เชื้อราสร้างโคนิเดียมเป็นเวลา 2 วัน เก็บโคนิเดียมเชื้อราโดยการเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อในงานเลี้ยงเชื้อปริมาณ 2 – 5 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลดูบเส้นใยเชื้อราบนผิวหน้าอาหารเพื่อให้โคนิเดียมหลุดจากก้านชูโคนิเดียม หลังจากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกเส้นใยเชื้อราและเศษชิ้นส่วนเลี้ยงเชื้อออกจากโคนิเดียมแขวนลอย ปรับความหนาแน่นโคนิเดียมให้ได้ 10^5 โคนิเดียมต่อมิลลิลิตร เติมน้ำลงในอัตรา 2 เปอร์เซ็นต์ปริมาณ 20 มิลลิลิตรต่อโคนิเดียมแขวนลอย 80 มิลลิลิตร ปลูกเชื้อลงบนต้นกล้าข้าวด้วยเครื่องพ่น โดยใช้โคนิเดียมแขวนลอย 100 มิลลิลิตรต่อกระบะ ปลูกเชื้อไอโซเลทละ 2 กระบะ เก็บกระบะข้าวที่ผ่านการปลูกเชื้อไว้ที่ความชื้นสูง 80 – 90 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 18 – 24 ชั่วโมง ย้ายกระบะข้าวเข้าโรงเรือน และพ่นละอองน้ำเพื่อให้ความชื้น เป็นเวลา 3 วันหลังปลูกเชื้อ

ตารางที่ 1 ประชากรข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว (differential rice varieties) จำนวน 31 สายพันธุ์ ยีนต้านทานโรคไหม้ โครโมโซม และสายพันธุ์ผู้ให้

ลำดับ	ชื่อสายพันธุ์	ยีนต้านทานโรคไหม้	โครโมโซม	สายพันธุ์ผู้ให้
1	IRBLt-K59	<i>Pit</i>	1	K59 (J)
2	IRBLsh-S	<i>Pish</i>	1	Shin 2 (J)
3	IRBLsh-B	<i>Pish</i>	1	BL1 (J)
4	IRBLb-B	<i>Pib</i>	2	BL1 (J)
5	IRBLz-Fu	<i>Piz</i>	6	Fukunishiki (J)
6	IRBLz5-CA	<i>Piz-5</i>	6	C101A51(J)
7	IRBLzt-T	<i>Piz-t</i>	6	Toride 1 (J)
8	IRBL9-W	<i>Pi9</i>	6	WHD-IS-75-1-127
9	IRBL11-Zh	<i>Pi11(t)</i>	8	Zhaiyeqing (J)
10	IRBL1-F5	<i>Pii</i>	9	Fujisaka 5 (J)
11	IRBL3-CP4	<i>Pi3</i>	9	C104PKT (I)
12	IRBL5-M	<i>Pi5(t)</i>	9	RIL249
13	IRBLa-A	<i>Pia</i>	11	Aichi Asahi (J)
14	IRBLa-C	<i>Pia</i>	11	CO39 (I)
15	IRBLk-Ka	<i>Pik</i>	11	Kanto 51 (J)
16	IRBLks-F5	<i>Piks</i>	11	Fujisaka 5 (J)
17	IRBLks-S	<i>Piks</i>	11	Shin 2 (J)
18	IRBLkp-K60	<i>Pikp</i>	11	K60 (J)
19	IRBLkh-K3	<i>Pikh</i>	11	K3 (J)
20	IRBLKM-Ts	<i>Pikm</i>	11	Tsuyuake (J)
21	IRBL1-CL	<i>Pi1</i>	11	C101LAC (I)
22	IRBL7-M	<i>Pi7(t)</i>	11	RIL29
23	IRBLta-K1	<i>Pita</i>	12	K1 (J)
24	IRBLta-CT2	<i>Pita</i>	12	C105TTP2L9 (I)
25	IRBLta-CP1	<i>Pita</i>	12	C101PKT (I)
26	IRBLta2-Pi	<i>Pita-2</i>	12	Pi No.4 (J)
27	IRBLta2-Re	<i>Pita-2</i>	12	Reiho (J)
28	IRBL12-M	<i>Pi12</i>	12	RIL10
29	IRBL19-A	<i>Pi19</i>	12	Aichi Asahi (J)
30	IRBL20-	<i>Pi20</i>	12	ARL24 (Asominori)
31	LTH	-	-	-

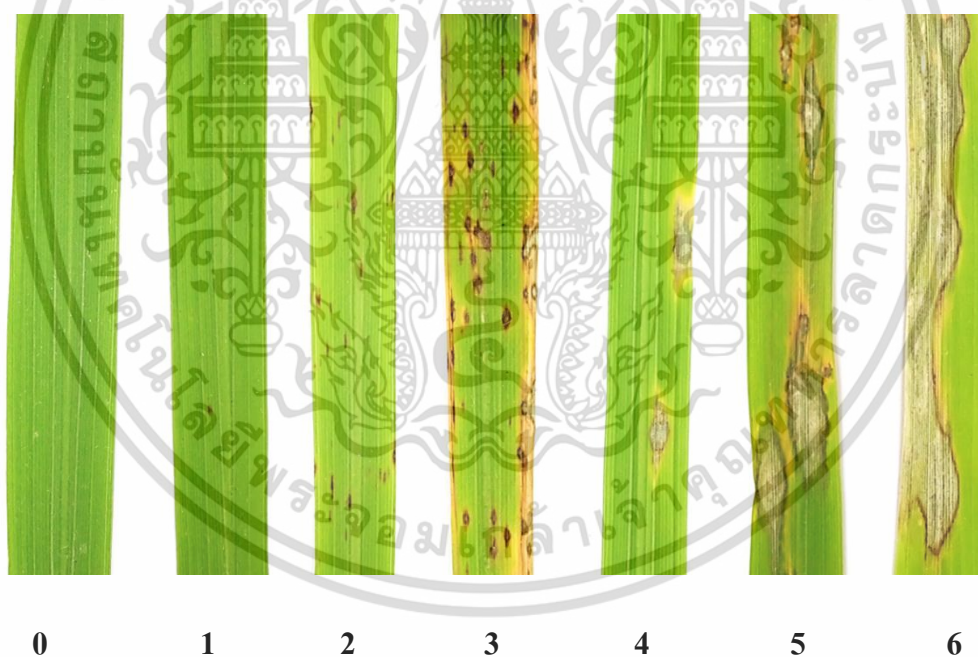
I คือ Indica-type และ J คือ Japonica-type

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3.3 การประเมินระดับความรุนแรงของอาการโรคไหม้ข้าว

ประเมินระดับความรุนแรงของโรคไหม้หลังจากปลูกเชื้อ 7 วันโดยใช้มาตรฐานกำหนดระดับความรุนแรงของโรคตามวิธีของ Roumen *et al.* (1997) ดังนี้ ระดับ 0 คือ ไม่มีแผลปรากฏ ระดับ 1 คือ แผลจุดกลมสีน้ำตาลเล็ก ๆ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร และไม่มีสีเทาตรงกลางแผล ระดับ 2 คือ แผลกลมหรือรียาวเล็กน้อย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 – 1 มิลลิเมตร ไม่มีสีเทาตรงกลางแผล ระดับ 3 คือ แผลขนาดเล็กประมาณ 1 – 3 มิลลิเมตร และมีสีเทาตรงกลางแผล ระดับ 4 คือ แผลขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร หรือยาวกว่า กลางแผลเป็นสีเทาและมีขอบสีน้ำตาล ระดับ 5 คือ กลางแผลเป็นสีเทามีขอบสีน้ำตาล และแผลเกาะกันเป็นกลุ่ม เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรค ระดับ 6 คือ แผลสีเทาลูกกลมติดต่อกันเป็นกลุ่ม ไม่มีขอบแผลที่แน่นอน เป็นอาการที่แสดงถึงความอ่อนแอต่อโรคไหม้ (ภาพที่ 6)

วิเคราะห์ระดับความรุนแรงของอาการโรคไหม้ในข้าวแต่ละสายพันธุ์ จากผลการทดลองทั้งหมด 2 ข้า รวมวิเคราะห์ในข้าวทั้งหมด 8 ต้น (ประมาณ 24 – 32 ใบ)



ภาพที่ 6 ลักษณะอาการโรคไหม้และระดับอาการของโรคไหม้ 7 ระดับตามวิธีการจำแนกของ Roumen *et al.* (1997)

เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในปริมาณรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 10.6 ไมโครลิตร PCR buffer ความเข้มข้น 10X ปริมาณ 2 ไมโครลิตร $MgCl_2$ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร dNTPs ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร *Taq* polymerase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.2 ไมโครลิตร ส่วนผสมคู่ไพรเมอร์ ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอเชื้อราความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ขั้นตอนในการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย 1) initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 2) denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 3) annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 4) extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 – 4 จำนวน 35 รอบ และขั้นตอน 5) final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำผลผลิต PCR ที่ได้ผสมกับสีย้อม Novel Juice (Bio-Helix, Taiwan) ในอัตราส่วน 1:5 หยอดลงในหลุมของแผ่นอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปล่อยให้โมเลกุลดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที โดยใช้สารละลาย 0.5X TAE เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า หลังจากนั้นตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอภายใต้ UV illumination ด้วยเครื่อง BluPAD Dual LED Blue/White Light Transilluminator (Bio-Helix, Taiwan) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส (Thermo Scientific, USA) นำผลผลิต PCR ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนก่อโรค *AVR-Pik* ต่อไป

2) การวิเคราะห์ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนก่อโรค *AVR-Pik*

วิเคราะห์ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จำนวน 2 เส้น ได้แก่ เส้น forward ซึ่งเป็นสายที่เรียงลำดับนิวคลีโอไทด์จากปลาย 5' ไปยังปลาย 3' และ เส้น reverse ซึ่งเป็นสายที่เรียงจากปลาย 3' ไปยังปลาย 5' ทำการกลับด้านของลำดับนิวคลีโอไทด์เส้น reverse ให้เรียงจากปลาย 5' ไปยังปลาย 3' เหมือนเส้น forward หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองเส้นมาประกบกัน (contiguous) ให้ได้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ 1 เส้น ทำขั้นตอนทั้งหมดด้วยโปรแกรม BioEdit บันทึกข้อมูลเป็นไฟล์นามสกุล .txt หลังจากนั้นแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน โดยใช้เครื่องมือ Translate tool ของเว็บไซต์ ExPASy (www.expasy.org) เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AVR-Pik จำนวน 6 แอลลิล จากฐานข้อมูล GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) ได้แก่ AVR-PikA (BAH59487.1) AVR-PikB (BAH59488.1) AVR-PikC (BAH59489.1) AVR-PikD (BAH59486.1) AVR-PikE (BAH59490.1) และ AVR-PikF (AZS27733.1) เปรียบเทียบด้วยโปรแกรม ClustalW ของเว็บไซต์ GenomeNet (www.genome.jp)

3.3.4.2 การศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *AVR-Pik* ในเชื้อราไอโซเลทที่พบแอลลีลของยีนมากกว่า 1 แอลลีล

1) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *AVR-Pik* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนก่อโรค *AVR-Pik* โดยดำเนินการตามข้อ 1) ในหัวข้อ 3.3.4.1 นำผลผลิต PCR ทั้งหมดที่ได้ผสมกับสีย้อม Novel Juice (Bio-Helix, Taiwan) ในอัตราส่วน 1:5 หยดลงในหลุมของแผ่นอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปล่อยให้โมเลกุลดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที โดยใช้สารละลาย 0.5X TAE เป็นตัวกลางในการนำกระแสไฟฟ้า หลังจากนั้นตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอภายใต้ UV illumination ด้วยเครื่อง BluPAD Dual LED Blue/White Light Transilluminator (Bio-Helix, Taiwan) เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส (Thermo Scientific, USA) ตัดชิ้นส่วนเจลบริเวณแถบของผลผลิตพีซีอาร์ ขนาด 626 คู่เบส ซึ่งเป็นดีเอ็นเอของยีน *AVR-Pik* นำไปสกัดดีเอ็นเอออกจากชิ้นส่วนอะกาโรสเจล

2) การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล

สกัดดีเอ็นเอออกจากชิ้นส่วนอะกาโรสเจล โดยใช้ชุดสกัด GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, USA) สกัดด้วยวิธีปั่นเหวี่ยง ตัดชิ้นส่วนอะกาโรสเจลที่แสดงแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ ย้ายใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ผ่านการล้างน้ำหนักหลอดแล้วเพื่อคำนวณน้ำหนักของเจลที่ตัด เติม binding buffer ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาณต่อน้ำหนักเจล) บ่มไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (shaking water bath) ที่อุณหภูมิ 50 – 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หรือนานกว่าจะละลายผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) ย้ายสารละลายดีเอ็นเอทั้งหมดใส่ column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 – 60 วินาที เทสารละลายที่ไหลผ่าน column ที่เติม binding buffer ปริมาณ 100 ไมโครลิตรใน column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทสารละลายที่ไหลผ่าน column ที่เติม wash buffer ปริมาณ 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทำให้ column แห้งปราศจาก wash buffer โดยนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ย้าย column ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม elution buffer ปริมาณ 20 ไมโครลิตร โดยค่อย ๆ หยดลงตรงกลาง column บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3) การโคลนยีนก่อโรค *AVR-Pik*

โคลนและวิเคราะห์ยีนก่อโรค *AVR-Pik* จากไอโซเลทที่มีแอลลีลของยีนมากกว่า 1 แอลลีล โดยใช้ชุด pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega, USA) ขั้นตอนการเตรียมเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยา ligation ดำเนินการตามคู่มือที่บริษัทแนะนำ โดยความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ต้องการโคลน (DNA insert) ใช้อัตราส่วน 3:1 (DNA insert:vector) เตรียมปฏิกิริยาปริมาณ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย rapid ligation buffer ความเข้มข้น 2X ปริมาณ 5 ไมโครลิตร pGEM®-T Easy Vector ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร DNA insert ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 3 ไมโครลิตร T4 DNA Ligase ความเข้มข้น 3 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยา ligation ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นละลาย competent cell (*E. coli* สายพันธุ์ DH5 α) ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ในน้ำแข็งอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผสมลงในหลอด ligation บ่มในน้ำแข็งอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที แล้วรีบแช่ในน้ำแข็งอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทันที แช่นาน 2 นาที ย้ายเลี้ยงในอาหารเหลว Luria Bertani (LB) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร เขย่า 180 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมยาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และผ่านการเกลี่ยสาร X-gal ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 40 ไมโครลิตร และสาร IPTG ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาณ 40 ไมโครลิตร หลังจากนั้นบ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง เลือกโคโลนีสีขาวไปตรวจสอบการมีอยู่ของยีนก่อโรค *AVR-Pik* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามขั้นตอนในข้อ 1) ของหัวข้อ 3.4.1.1 จากนั้นคัดเลือกผลผลิตพีซีอาร์ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 626 คู่เบส จากจำนวน 10 โคโลนีต่อไอโซเลท ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนก่อโรค *AVR-Pik* และวิเคราะห์ผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนก่อโรค *AVR-Pik* เพื่อยืนยันการมีแอลลีลของยีนก่อโรค *AVR-Pik* มากกว่า 1 แอลลีลในเชื้อราไอโซเลทเดียวกัน ตามขั้นตอนข้อ 2) ในหัวข้อ 3.3.4.1

3.3.4.3 ตรวจสอบรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรค (pathotype) ของเชื้อราจำนวน 7 ไอโซเลทที่มียีนก่อโรค *AVR-Pik* แอลลีล A D F และมากกว่า 1 แอลลีล บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวกลุ่ม *Pik* จำนวน 7 สายพันธุ์

ตรวจสอบรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรค (pathotype) ของเชื้อราจำนวน 7 ไอโซเลทบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวสายพันธุ์ IRBLks-F5 IRBLks-S IRBLkp-K60 IRBLkh-K3 IRBL1-CL IRBL7-M และ IRBLKM-Ts ที่มียีนต้านทาน *Piks* *Piks* *Pikp* *Pikh* *Pi1* *Pi7(t)* และ *Pikm* ตามลำดับและบนข้าว LTH ซึ่งเป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ ดำเนินการปลูกกล้าข้าว เตรียมโคนินเดียแวนลอยของเชื้อราปลูกเชื้อบนต้นกล้าข้าว และประเมินระดับความรุนแรงของอาการโรคไหม้ข้าว ตามหัวข้อ 3.3.3.1 ถึง 3.3.3.3 โดยปลูกข้าวสายพันธุ์ละ 1 หลุม หลุมละ 2 ต้น ปลูกเชื้อกระบะละ 20 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 2 กระบะ ทำการทดลองทั้งหมด 2 ครั้ง ประเมินระดับความรุนแรงของการก่อโรคบนข้าวทั้งหมดไอโซเลทละ 8 ต้น (24 – 32 ใบ)

3.3.5 การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา และยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองในข้าวที่มียีนต้านทาน *Pi12*

คัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ 2 ไอโซเลทที่แสดงความสัมพันธ์แบบ compatible และ incompatible interaction บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวสายพันธุ์ IRBL12-M โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ทริตเมนต์ ได้แก่ ทริตเมนต์ที่ 1 ปลูกเชื้อบนข้าวด้วยเชื้อราไอโซเลทที่แสดงความสัมพันธ์แบบ compatible interaction ทริตเมนต์ที่ 2 ปลูกเชื้อบนข้าวด้วยเชื้อราไอโซเลทที่แสดงความสัมพันธ์แบบ incompatible interaction และทริตเมนต์ที่ 3 ไม่ปลูกเชื้อ (untreated control)

3.3.5.1 การเตรียมกล้าข้าว

เตรียมกล้าข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว IRBL12-M ซึ่งมียีนต้านทาน *Pi12* ข้าวพันธุ์ LTH และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่อ่อนแอต่อโรคใหม่ ปลูกข้าวแต่ละสายพันธุ์ลงกระบะหลุมที่มีดินปลูกผสมปุ๋ยยูเรีย 3 กรัมต่อกระบะ โดยแต่ละกระบะปลูกข้าวหลุมละ 1 ต้นจำนวน 50 หลุม ประกอบด้วยข้าวพันธุ์ IRBL12-M ปลูกจำนวน 30 หลุม ข้าวพันธุ์ LTH และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ปลูกด้านข้าง (ล้อมรอบ) สายพันธุ์ละ 12 หลุม ใส่กระบะหลุมลงในกระบะสำหรับปลูกขนาดกว้าง 39.5 เซนติเมตร ยาว 53 เซนติเมตร สูง 13 เซนติเมตร เติมน้ำให้พอดีกับผิวหน้าดิน ใส่ปุ๋ยยูเรียอีกครั้งเมื่อข้าวอายุ 11 วัน ปริมาณ 1 กรัมต่อกระบะ นำข้าวไปใช้ในการทดลองปลูกเชื้อเมื่อต้นกล้าข้าวอายุครบ 14 วัน

3.3.5.2 การเตรียมเชื้อราและการปลูกเชื้อบนกล้าข้าว

เตรียมเชื้อราตามข้อ 3.3.3.2 ปลูกเชื้อลงบนต้นกล้าข้าวโดยใช้โคนิเดียแขวนลอย 100 มิลลิลิตรต่อกระบะ ทำซ้ำทริตเมนต์ละ 3 กระบะ เก็บกระบะข้าวที่ผ่านการปลูกเชื้อไว้ที่ความชื้นสูง 80 – 90 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3.3.5.3 การเก็บตัวอย่างและการบันทึกผลการทดลอง

เก็บตัวอย่างใบข้าวหลังจากปลูกเชื้อที่เวลา 24 48 และ 96 ชั่วโมง โดยตัดเก็บตัวอย่างเฉพาะใบข้าวจำนวน 10 ใบ จาก 10 ต้น (สุ่มเก็บจาก 3 กระบะ) นำตัวอย่างใบข้าวเก็บพับไว้ในกระดาษอลูมิเนียมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส

3.3.5.4 การเตรียมอาร์เอ็นเอ

เตรียมอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบที่เก็บไว้ใน -80 องศาเซลเซียส โดยบดใบข้าวให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Trizol reagent ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากันแล้วเติม chloroform ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 – 3 นาทีเขย่าให้เข้ากันจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดสารละลายด้านบนปริมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม isopropanol ปริมาณ 500 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากัน และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้งให้เหลือเพียงตะกอนอาร์เอ็นเอที่ก้นหลอดด้านล่าง ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย ethyl alcohol 75 เปอร์เซ็นต์ปริมาณ 1 มิลลิลิตรแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษทิชชู เพื่อให้ตะกอนอาร์เอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย DEPC water ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A260 และ A280) โดยเจือจางอาร์เอ็นเอในอัตราส่วน 1:100 (DEPC water ปริมาณ 98 ไมโครลิตร และอาร์เอ็นเอ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร) อาร์เอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงจะมีค่า A260/A280 เข้าใกล้ 2.0 (Sambrook *et al.* 1989) เก็บรักษาอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3.5.5 การเตรียมปฏิกิริยากำจัดดีเอ็นเอ

กำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนในสารละลายอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNase I (Invitrogen, USA) เตรียมปฏิกิริยาในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร ประกอบด้วยอาร์เอ็นเอความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร 10x DNase I Reaction Buffer ความเข้มข้น 10X ปริมาณ 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ DNase I ความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 10 ไมโครลิตร ด้วย DEPC water ปล่อยให้เอนไซม์ DNase I ทำปฏิกิริยาย่อยสลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร เพื่อป้องกัน RNA ไม่ให้ย่อยสลายเมื่ออยู่ในอุณหภูมิสูง และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นแช่ในน้ำแข็งก่อนนำไปเตรียม complementary DNA (cDNA) ในขั้นตอนต่อไป

3.3.5.6 การเตรียม cDNA ด้วยปฏิกิริยา Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

เตรียมปฏิกิริยาเพื่อสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ชุด RvertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, USA) นำอาร์เอ็นเอที่ผ่านการกำจัดดีเอ็นเอออกแล้วจากข้อ 3.3.5.5 ปริมาณ 11 ไมโครลิตร ผสมกับ Oligo(dT)₁₈ primer ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร เติมสารละลายรวม (master mix) ปริมาณ 8 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย reaction buffer ความเข้มข้น 5X ปริมาณ 4 ไมโครลิตร Ribolock™ RNase Inhibitor ความเข้มข้น 20 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร dNTPs ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร และ RvertAid Reverse Transcriptase ความเข้มข้น 200 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน บ่มปฏิกิริยา reverse transcription ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และหยุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่โดยหน่วยงานราชการ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปฏิกิริยาของเอนไซม์ reverse transcriptase ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที เก็บ cDNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำ cDNA ที่ได้ไปเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative realtime RT-PCR

3.3.5.7 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative realtime RT-PCR

เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ ได้แก่ *MoHrip1* (elicitor) และ *MoSlp1* (virulence effector) โดยใช้ยีน *MGG_40s* เป็นยีนอ้างอิง (reference gene) พร้อมทั้งเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองของข้าว ในกลุ่มยีนที่กระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสของยีน (transcription factor) ได้แก่ *OsWRKY30* กลุ่มยีนควบคุม (regulator gene) ได้แก่ *OsMAPK6* *OsPAL* และ *OsJAZ2* และกลุ่มยีนต้านทาน (defense-related gene) ได้แก่ *OsPR5* และ *OsPR10* โดยใช้ยีน *OsActin1* เป็นยีนอ้างอิง (reference gene) (ตารางที่ 2) วิเคราะห์การแสดงออกของยีนเชิงปริมาณ (quantitative analysis) ด้วยเทคนิค quantitative realtime RT-PCR ในระบบตรวจจับสัญญาณ SYBR Green fluorescence โดยใช้เครื่อง CFX96 Touch™ Real-Time PCR System (Bio-Rad, U.S.) เตรียมปฏิกิริยาโดยใช้ชุด 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (no ROX) (Solis BioDyne, Estonia) ในปริมาณรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 10 ไมโครลิตร HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus ความเข้มข้น 5X ปริมาณ 4 ไมโครลิตร ส่วนผสมคู่มือไพรเมอร์ ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และ cDNA ต้นแบบ ความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อในอัตราส่วน 1:5 (cDNA:น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) ปริมาณ 5 ไมโครลิตร โปรแกรมการทดสอบปฏิกิริยา ประกอบด้วย 1) initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 12 นาที 2) denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที 3) annealing ที่อุณหภูมิเหมาะสมของไพรเมอร์แต่ละคู่ตามตารางที่ 2 นาน 20 วินาที 4) elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 – 4 จำนวน 40 รอบ วิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีนจำนวน 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง cDNA ที่เวลา 24 48 และ 96 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ

ประเมินระดับการแสดงออกของยีนเชิงสัมพัทธ์ (relative expression) โดยการเปรียบเทียบจากค่า threshold cycle (C_t) ซึ่งจะได้อัตราส่วนเท่า (fold change) ตามวิธีของ Livak and Schmittgen (2001) โดยใช้สูตรการคำนวณดังนี้

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-[(\text{sample}, C_t \text{ target gene} - C_t \text{ reference gene}) - (\text{calibrator}, C_t \text{ target gene} - C_t \text{ reference gene})]}$$

Sample คือ กลุ่มตัวอย่างข้าวที่ทำการปลูกเชื้อด้วยไอโซเลท avirulent หรือ virulent

Calibrator คือ กลุ่มตัวอย่างข้าวที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (untreated control)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น มิใช่เผยแพร่ให้ประชาชนได้ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Turkey HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) ค่า relative expression ratio > 1 หมายถึงการแสดงออกของยีนที่มีการยกระดับมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่างไม่ได้ปลูกเชื้อ (control)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อรา และยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองในข้าวที่นำมาศึกษาในงานวิจัย

กลุ่มของยีน	รายชื่อยีน	รายละเอียดของยีน	ไพรเมอร์ (5'-3')	อุณหภูมิของ annealing (°C)	ขนาดแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	อ้างอิง
ยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค (elicitor, virulence effector)	<i>MoHrip1</i>	เป็น PAMPs	Forward-CGCAAGACGGTGGACAACA Reverse-TGACCAGGGCGAAGGAGTAG	55	151	Nie <i>et al.</i> 2019
	<i>MoSlp1</i>	ทำหน้าที่แทรกแซงการทำงานของ CEBiP ในพืช	Forward-CTGCTGGCAGCTCACCTACA Reverse-GGCCAATGTTGAAGCCAGAG	54	85	Mentlak <i>et al.</i> 2012
ยีนอ้างอิง (reference gene)	<i>MGG_40s</i>	40S ไรโบโซมอลโปรตีนหน่วยย่อย S27a ของเชื้อรา	Forward-ACAAGCTCAAGACCCTCGTC Reverse-GGTGGTGATGGTGAAGCAG	56	80	Omar <i>et al.</i> 2016
ยีนที่กระตุ้นให้เกิดการถอดรหัส (transcription factor)	<i>OsWRKY30</i>	เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ JA และโปรตีน PR10	Forward-CTACCAATGGTCTTCTCACC Reverse-GTTCACCTTCATCTCACCTCT	60	248	Peng <i>et al.</i> 2012
ยีนควบคุม (regulator gene)	<i>OsMAPK6</i>	เกี่ยวข้องกับการส่งทอดสัญญาณ MAPK	Forward-GCCGTTCAATATGGTGTTC AAG Reverse-GCCTTATATCTGGGTGGATGGG	59	131	Lieberherr <i>et al.</i> 2005
	<i>OsPAL</i>	เกี่ยวข้องกับวิถี SA	Forward-GAGATCAACTCCGTCAAC Reverse-TGTAGAAGTCGTTACCA	53	178	Lv <i>et al.</i> 2016
	<i>OsJAZ2</i>	เกี่ยวข้องกับวิถี JA	Forward-TTGCCTACCAGACATGCC Reverse-ACTCCGCCTCCTTCTCT	53	119	Lv <i>et al.</i> 2016
ยีนต้านทาน (defense-related gene)	<i>OsPR5</i>	สังเคราะห์โปรตีน pathogenesis-related (PR) protein	Forward-CAGCCAGGACTTCTACGA Reverse-TGTGTCTTGGTGTGTCTTC	58	144	Lv <i>et al.</i> 2016
	<i>OsPR10</i>		Forward-CTCAACCCTGCTGTGGAT Reverse-CTCGATCTTCGTCTCTGTCA	59	153	Lv <i>et al.</i> 2016
ยีนอ้างอิง (reference gene)	<i>OsActin1</i>	actin ของข้าว	Forward-CAGCACATTCCAGCAGAT Reverse-GGCTTAGCATTCTTGGGGT	60	188	Omar <i>et al.</i> 2016

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการสำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคไหม้ข้าว และแยกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

4.1.1 ผลการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคไหม้ข้าว

ในช่วงฤดูปลูกปี พ.ศ. 2559 – 2560 สำรวจและเก็บตัวอย่างใบข้าวและคอรวงข้าว ที่พบอาการของโรคไหม้ในพื้นที่ปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทย รวมทั้งเก็บข้อมูล ตำบล อำเภอ จังหวัด และพันธุ์ข้าวที่พบอาการของโรคไหม้ จากการสำรวจพบการระบาดของโรคไหม้ข้าวในประเทศไทย 34 จังหวัด ครอบคลุม 73 อำเภอ และ 86 ตำบล โดยรายละเอียดแบ่งออกเป็นภาคต่าง ๆ ดังนี้

4.1.1.1 เขตภาคกลาง

พบการระบาดของโรคไหม้ในพื้นที่ภาคกลางทั้งหมด 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ชัยนาท ราชบุรี ลพบุรี สุพรรณบุรี และอุทัยธานี กระจายไปในพื้นที่ 8 อำเภอ และ 9 ตำบล พันธุ์ข้าวที่พบอาการของโรคไหม้ ได้แก่ ข้าวพันธุ์ กข31 กข41 และปทุมธานี 1 (ตารางที่ 3) สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคไหม้ข้าวจังหวัดลพบุรีและชัยนาทในเดือนกรกฎาคมปี พ.ศ. 2559 จังหวัดกาญจนบุรีและราชบุรีในเดือนกันยายนปี พ.ศ. 2559 จังหวัดอุทัยธานีในเดือนพฤศจิกายนปี พ.ศ. 2560 และจังหวัดสุพรรณบุรีในเดือนธันวาคมปี พ.ศ. 2560

ตารางที่ 3 ข้อมูลสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคไหม้ข้าว ข้อมูลตำบล อำเภอ จังหวัด และพันธุ์ข้าวที่พบอาการของโรคไหม้ในพื้นที่ภาคกลาง

จังหวัด	อำเภอ	ตำบล	พืชอาศัย	บริเวณที่พบอาการ
ชัยนาท	เมือง	เขาท่าพระ	กข31 กข41	ใบ
		ท่าชัย	ปทุมธานี 1	ใบ
สุพรรณบุรี	ศรีประจันต์	บ้านกร่าง	กข41 หล้า	ใบ
	สามชุก	หนองผักนาก	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	ใบ
		หนองหญ้าไซ	หนองหญ้าไซ	ข้าวไม่ทราบพันธุ์
ราชบุรี	จอมบึง	แก้มอัน	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	ใบ
ลพบุรี	-	-	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	ใบ
อุทัยธานี	-	-	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	ใบ
กาญจนบุรี	-	-	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	ใบ

- หมายถึง ไม่มีข้อมูล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.1.2 เขตภาคเหนือและภาคเหนือตอนล่าง

พบการระบาดของโรคใหม่ในพื้นที่ภาคเหนือและภาคเหนือตอนล่าง 8 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกำแพงเพชร เชียงราย ตาก พะเยา เพชรบูรณ์ แพร่ แม่ฮ่องสอน และลำปาง กระจายไปในพื้นที่ 24 อำเภอ และ 43 ตำบล พันธุ์ข้าวที่พบอาการของโรคใหม่ ได้แก่ กข6 กข10 กข14 กข15 กข21 กข27 กข39 กข53 กข57 กข59 ขาวดอกมะลิ 105 บือซอมี ปทุมธานี 80 พิษณุโลก 2 แพร่ 1 ลืมฝัว สันป่าตอง 1 สุพรรณบุรี 1 หางยี่ 71 ข้าวไม่ทราบสายพันธุ์ ข้าวไร่ไม่ทราบสายพันธุ์ และหญ้า (ตารางที่ 4) เก็บตัวอย่างโรคใหม่ข้าวในภาคเหนือและภาคเหนือตอนล่างในเดือนกรกฎาคม ปี พ.ศ. 2559 และ 2560

ตารางที่ 4 ข้อมูลสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคใหม่ข้าว ข้อมูลตำบล อำเภอ จังหวัด และพันธุ์ข้าวที่พบอาการของโรคใหม่ในพื้นที่ภาคเหนือและภาคเหนือตอนล่าง

จังหวัด	อำเภอ	ตำบล	พืชอาศัย	บริเวณที่พบอาการ
กำแพงเพชร	โกสัมพินคร	โกสัมพิตี	พิษณุโลก 2	ใบ
	พาน	เมืองพาน	กข6 กข15 ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
เชียงราย	แม่ลาว	โป่งแพร่	กข6	ใบ
	เทิง	ดัวเต่า	กข6 ลืมฝัว หญ้า	ใบ
	จุน	หงส์หิน	หญ้า	ใบ
	เชียงคำ	ห้วยน	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	ใบ
	เชียงคำ	เชียงบาน	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
	เวียงแก่น	ป่อ	ลืมฝัว	ใบ
	แม่จัน	ป่าซาง	หญ้า	ใบ
	แม่จัน	ศรีค้ำ	กข6 กข14	ใบ
	แม่สาย	แม่สาย	สันป่าตอง1 ปทุมธานี 80	ใบ
	เมือง	แม่ข้าวต้ม	ข้าวไม่ทราบพันธุ์ หญ้า	ใบ
	เวียงเชียงรุ้ง	ดงมหาวัน	กข6 หญ้า	ใบ
	เวียงเชียงรุ้ง	ทุ่งก่อ	กข6	ใบ
	เวียงชัย	เมืองชุม	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	ใบ
	เวียงชัย	เวียงชัย	กข6 กข14 สันป่าตอง 1	ใบ
ตาก	เมืองตาก	วังหิน	หญ้าหยาบ	ใบ
พะเยา	ดอกคำใต้	ดอกคำใต้	กข57 ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
	เชียงคำ	เชียงบาน	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	ใบ
เพชรบูรณ์	เขาค้อ	หนองแม่นา	ข้าวไม่ทราบพันธุ์ หญ้า	ใบ
	เมือง	ท่าพล	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	ใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 (ต่อ)

จังหวัด	อำเภอ	ตำบล	พืชอาศัย	บริเวณที่พบอาการ
แม่ฮ่องสอน	เมือง	หมอกจำแป๋	ข้าวไม่ทราบพันธุ์ หล้า	ใบ
	เมือง	ห้วยโป่ง	กข59	ใบ
	เมือง	ฝ่าบ่อง	กข21 กข27 ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
	เมือง	ปางหมู	กข15 ข้าวดอกมะลิ 105	ใบและคอรวง
	ปางมะผ้า	สบป่อง	กข39 ทางยี 71 ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
	ปางมะผ้า	ถ้ำลอด	ข้าวไร่ไม่ทราบพันธุ์	ใบ
	ปาย	เวียงเหนือ	สันป่าตอง 1 ข้าวดอกมะลิ 105 ข้าวเหนียวไม่ทราบพันธุ์	ใบ
	ปาย	แม่नाเติง	กข6 หล้า	ใบ
	ปาย	-	กข15	ใบและคอรวง
	ปาย	-	สันป่าตอง 1	คอรวง
	ขุนขวม	แม่อุก	บือชอมี	ใบ
	ขุนขวม	ขุนขวม	กข21	ใบ
	ขุนขวม	เมืองปอน	กข21	ใบ
	แม่ลาน้อย	แม่ลาหลวง	กข21 ข้าวไร่ไม่ทราบพันธุ์	ใบ
	แม่ลาน้อย	-	กข21	ใบ
	แม่ลาน้อย	-	กข21	ใบ
	แม่ลาน้อย	แม่ลาน้อย	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	ใบ
แม่สะเรียง	แม่ขวม	กข21	ใบ	
แม่สะเรียง	บ้านกาศ	กข21 ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ	
ลำปาง	แม่เมาะ	บ้านดง	กข6	ใบ
	เมือง	ชมพู	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	ใบ

- หมายถึง ไม่มีข้อมูล

4.1.1.3 เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

พบการระบาดของโรคไหม้ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือทั้งหมด 16 จังหวัด ได้แก่ กาฬสินธุ์ ขอนแก่น นครราชสีมา นครพนม หนองคาย หนองบัวลำภู บุรีรัมย์ มหาสารคาม ยโสธร ร้อยเอ็ด ศรีสะเกษ สกลนคร สุรินทร์ อำนาจเจริญ อุรธานี และอุบลราชธานี กระจายไปในพื้นที่ 48 อำเภอ และ 53 ตำบล พันธุ์ข้าวที่พบอาการของโรคไหม้ ได้แก่ กข6 กข12 กข15 กข22 ข้าวดอกมะลิ 105 พิษณุโลก 2 ชัยลิติน สกลนคร ทางยี 71 และหล้า (ตารางที่ 5) เก็บตัวอย่างโรคไหม้ข้าวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือในเดือนกรกฎาคมและพฤศจิกายนปี พ.ศ. 2560

ตารางที่ 5 ข้อมูลสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคไหม้ข้าว ข้อมูลตำบล อำเภอ จังหวัด และพันธุ์ข้าวที่พบอาการของโรคไหม้ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

จังหวัด	อำเภอ	ตำบล	พืชอาศัย	บริเวณที่พบอาการ
กาฬสินธุ์	นาคู	ภูแล่นช้าง	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	ใบ
	เขาวง	หนองผือ	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	ใบ
	ยางตลาด	คลองขาม	กข6	ใบ
ขอนแก่น	บ้านไผ่	ในเมือง	กข6	ใบ
	น้ำพอง	น้ำพอง	กข6 ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
นครราชสีมา	พิมาย	กระเบื้องใหญ่	ข้าวดอกมะลิ 105 หล้า	ใบ
	โชคชัย	หนองเป็ด	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	ใบ
	ปะคำ	ห้วยน้ำบ	ข้าวดอกมะลิ 105 หล้า	ใบ
บุรีรัมย์	นางรอง	สะเดา	ข้าวดอกมะลิ 105 หล้า	ใบ
	หนองกี่	คอนอระวาง	ข้าวดอกมะลิ 105 หล้า	ใบ
	หนองกี่	เขียปราสาท	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
	ประโคนชัย	ตะโกตาพิ	ข้าวดอกมะลิ 105 หล้า	ใบ
	พลับพลายชัย	จันทุม	ข้าวดอกมะลิ 105 หล้า	ใบ
	กระสัง	บัวถ่าน	ข้าวดอกมะลิ 105 หล้า	ใบ
	มหาสารคาม	เมือง	แก่งเลิงจาน	กข6 หล้า
ยโสธร	เลิงนกทา	สาวาท	ข้าวดอกมะลิ 105 หล้า	ใบ
	กุฉินท	กุฉินท	กข6	ใบ
	ทรายมูล	ทรายมูล	กข6	ใบ
	เมือง	ทุ่งนางโอก	ข้าวดอกมะลิ 105 หล้า	ใบ
ร้อยเอ็ด	พนมไพร	ขานวรรณ	กข6 ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
	สุวรรณภูมิ	หัวช้าง	ข้าวดอกมะลิ 105 หล้า	ใบ
	สุวรรณภูมิ	สระคู	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
	เกษตรวิสัย	เกษตรวิสัย	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
	เมือง	โคกพิลา	ข้าวดอกมะลิ 105 หล้า	ใบ
ศรีสะเกษ	ขุขันธ์	ปราสาท	ข้าวดอกมะลิ 105 หล้า	ใบ
	วังหิน	โพนยาง	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
	เมือง	โพธิ์	ข้าวดอกมะลิ 105 หล้า	ใบ
	กันทรารมย์	ตุน	ข้าวดอกมะลิ 105 หล้า	ใบ
สกลนคร	เต่างอย	จันทร์เพ็ญ	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	ใบ
	โคกศรีสุพรรณ	ตองโขบ	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	ใบ
	เมือง	ธาตุนาเวง	กข6 กข12 กข15 กข22 สกลนคร ข้าวดอกมะลิ 105	ใบและคอรวง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 (ต่อ)

จังหวัด	อำเภอ	ตำบล	พืชอาศัย	บริเวณที่พบอาการ
สุรินทร์	เมือง	เจดีย์	ข้าวดอกมะลิ 105 หญ้า	ใบ
	ปราสาท	ปรือ	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
	พนมดงรัก	โคกกลาง	กข15 ข้าวดอกมะลิ 105 หญ้า	ใบ
	กาบเชิง	คูตัน	ข้าวดอกมะลิ 105 หญ้า	ใบ
	สังขะ	สังขะ	ข้าวดอกมะลิ 105 หญ้า	ใบ
นครพนม	เมือง	ขามเต่า	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	ใบ
หนองคาย	ท่าบ่อ	ท่าบ่อ	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	ใบ
	เมือง	เวียงคุก	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	ใบ
	เมือง	คำขบหวาน	กข6	คอรวง
หนองบัวลำภู	นากลาง	นากลาง	กข6 ธัญสิริน	คอรวง
อำนาจเจริญ	ลืออำนาจ	โคกกลาง	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
	เมือง	นาเกลือ	กข6 ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
	เสนางคนิคม	เสนางคนิคม	กข6 ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
อุครธานี	บ้านฝื่อ	ข้าวสาร	กข6	ใบ
	บ้านฝื่อ	หายโศก	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	ใบ
	กุดจับ	เมืองเพี้ย	พิษณุโลก 2 หางยี 71	ใบและคอรวง
			ข้าวไม่ทราบพันธุ์	
อุบลราชธานี	ตระกาดพืชผล	ขามเปี้ย	ข้าวดอกมะลิ 105 หญ้า	ใบ
	ตระกาดพืชผล	กุศกร	ข้าวดอกมะลิ 105	ใบ
	ศรีเมืองใหม่	แก้งกอก	หญ้า	ใบ
	สว่างวีรวงค์	แก้งโคม	ข้าวดอกมะลิ 105 หญ้า	ใบ
	วารินชำราบ	แสนสุข	กข6 หญ้า	ใบ
	ม่วงสามสิบ	ม่วงสามสิบ	ข้าวดอกมะลิ 105 หญ้า	ใบ

4.1.1.4 เขตภาคใต้

พบการระบาดของโรคไหม้ข้าวในพื้นที่ภาคใต้ 4 จังหวัด ได้แก่ กระบี่ นครศรีธรรมราช พัทลุง และสงขลา กระจายไปในพื้นที่ 6 อำเภอ และ 6 ตำบล พันธุ์ข้าวที่พบอาการของโรคไหม้ ได้แก่ กข41 กข49 ข้าวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 ไรซ์เบอร์รี่ และสังข์หยดพัทลุง (ตารางที่ 6) เก็บตัวอย่างโรคไหม้ข้าวในพื้นที่ภาคใต้ ในเดือนพฤศจิกายนปี พ.ศ. 2560

ตารางที่ 6 ข้อมูลสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคไหม้ข้าว ข้อมูลตำบล อำเภอ จังหวัด และพันธุ์ข้าวที่พบอาการของโรคไหม้ในพื้นที่ภาคใต้

จังหวัด	อำเภอ	ตำบล	พืชอาศัย	บริเวณที่พบอาการ
กระบี่	เหนือคลอง	-	ปทุมธานี 1	ใบ
นครศรีธรรมราช	เฉลิมพระเกียรติ	เชียรเขมา ม.9	กข41	ใบ
พัทลุง	ควนขนุน	พนางตุง ม.6	กข41	ใบ
		เมือง	ขาวดอกมะลิ 105	ใบ
		ปากพูน	ดอนทราย ม.1	สังข์หยดพัทลุง ไรซ์เบอร์รี่
สงขลา	ระโนด	ตะเคียนชะ ม.5	กข49	ใบ

4.1.2 ผลการแยกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

แยกเชื้อราจากตัวอย่างใบและคอรวงข้าว ด้วยวิธี single spore isolation ได้เชื้อรา *P. oryzae* จำนวน 118 ไอโซเลท

4.1.2.1 แยกเชื้อรา *P. oryzae* จากตัวอย่างข้าวที่เก็บในปี พ.ศ. 2559

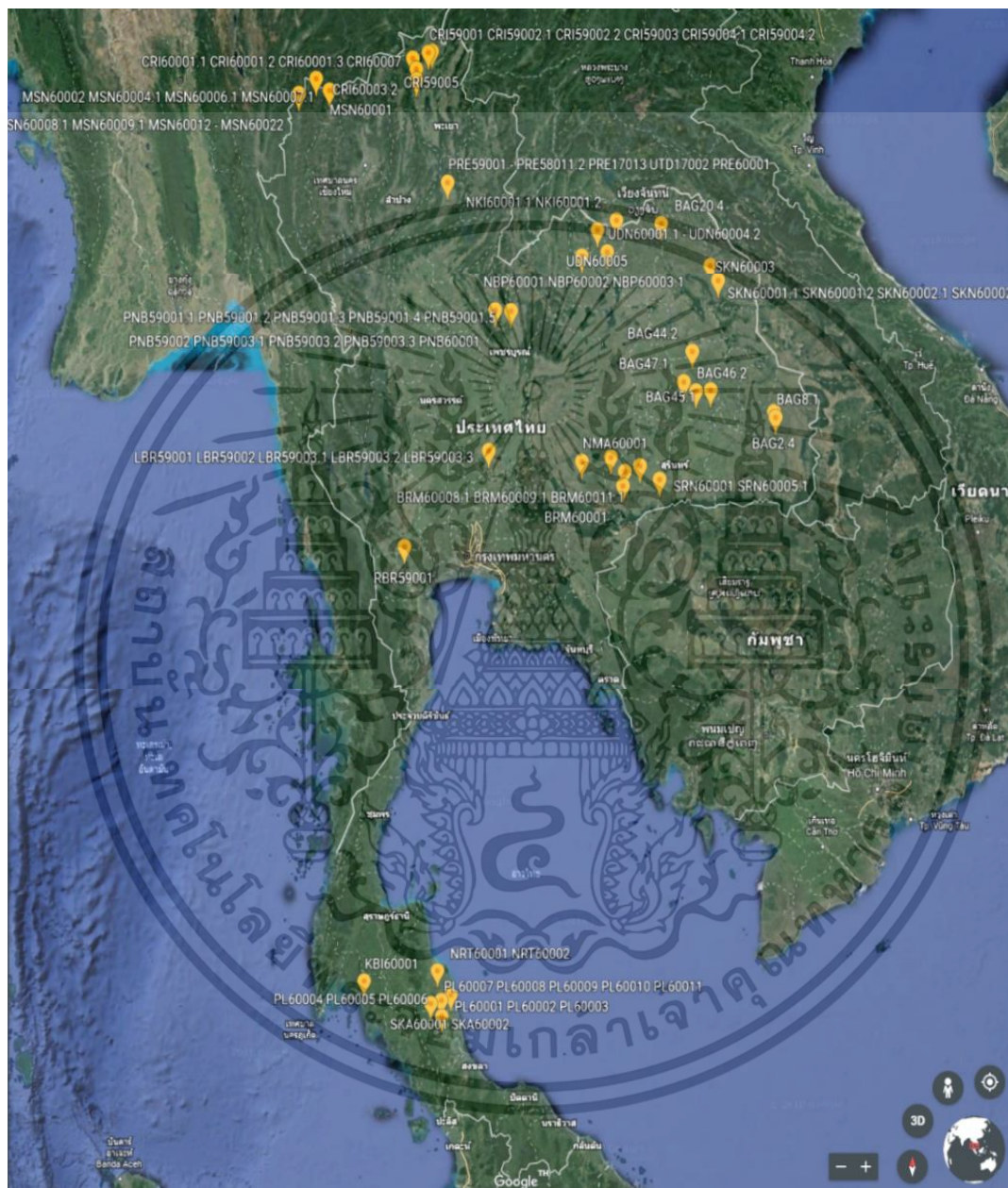
แยกเชื้อราได้ทั้งหมด 47 ไอโซเลท โดยแบ่งออกเป็นเชื้อราภาคกลาง จำนวน 6 ไอโซเลท เชื้อราภาคเหนือและภาคเหนือตอนล่าง จำนวน 34 ไอโซเลท ตัวอย่างใบข้าวเป็นโรคไหม้ที่รวบรวมจากพื้นที่ภาคกลาง สามารถแยกเชื้อราได้จากจังหวัดราชบุรี และลพบุรี จำนวน 1 และ 5 ไอโซเลทตามลำดับ และจากพื้นที่ภาคเหนือและภาคเหนือตอนล่าง สามารถแยกเชื้อราได้จากจังหวัดเชียงราย เพชรบูรณ์ แพร่ และอุดรดิตถ์ จำนวน 7 10 18 และ 1 ไอโซเลทตามลำดับ (ภาพที่ 7 ตารางที่ 7 และ 8)

ได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จำนวน 5 ไอโซเลท และได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวแพร่ จำนวน 2 ไอโซเลท (ตารางที่ 7)

4.1.2.2 แยกเชื้อรา *P. oryzae* จากตัวอย่างข้าวที่เก็บในปี พ.ศ. 2560

แยกเชื้อราได้ทั้งหมด 71 ไอโซเลท โดยแบ่งออกเป็นภาคเหนือและภาคเหนือตอนล่างรวม 27 ไอโซเลท ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 28 ไอโซเลท และภาคใต้ จำนวน 16 ไอโซเลท (ตารางที่ 7) ตัวอย่างใบข้าวและคอรวงข้าวเป็นโรคไหม้ที่รวบรวมจากพื้นที่ภาคเหนือและภาคเหนือตอนล่าง สามารถแยกเชื้อราได้จากจังหวัดเชียงราย เพชรบูรณ์ แพร่ และแม่ฮ่องสอน จำนวน 7 1 1 และ 18 ไอโซเลทตามลำดับจากพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สามารถแยกเชื้อราได้จากจังหวัดนครราชสีมา บุรีรัมย์ สกลนคร สุรินทร์ หนองคาย หนองบัวลำภู และอุดรธานี แยกเชื้อได้ 1 10 5 2 2 3 และ 5 ไอโซเลทตามลำดับ และจากพื้นที่

ภาคใต้ สามารถแยกเชื้อราได้จากจังหวัดกระบี่ นครศรีธรรมราช พัทลุง และสงขลา จำนวน 12 11 และ 2 ไอโซเลต ตามลำดับ (ภาพที่ 7 ตารางที่ 7 และ 8)



ภาพที่ 7 แผนที่ระบุตำแหน่งของเชื้อราแต่ละไอโซเลต จุดสีเหลือง คือ ตำแหน่งที่สำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ที่ระบาดในช่วงฤดูปลูกปี พ.ศ. 2559 – 2560
คัดแปลงภาพจาก: www.google.com/maps

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 เชื้อราสาเหตุโรคใหม่ 118 ไอโซเลต แยกจากตัวอย่างใบและคอรวงข้าว ที่เก็บรวบรวมในช่วงฤดูปลูกปี พ.ศ. 2559 – 2560

จังหวัด	อำเภอ	ตำบล	พืชอาศัย	ความรุนแรง	ชื่อไอโซเลต	
เชียงราย	พาน	เมืองพาน	กข6	6	CRI60001.1	
			ขาวดอกมะลิ 105	-	CRI60007	
		ทรายขาว	กข6	3	CRI60004.1 CRI60006.2	
				4	CRI60005.1 CRI60005.2	
	แม่ลาว	โป่งแพร์	กข6	4	CRI60003.2	
			ข้าวไม่ทราบพันธุ์	5	CRI59001	
	เวียงชัย		เวียงชัย		5	CRI59002.1 CRI59002.2
				สันป่าตอง 1	5	CRI59003
				5	CRI59004.1 CRI59004.2	
			เมืองชุม	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	4	CRI59005
เพชรบูรณ์	เมือง	ท่าพล	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	4	PNB59001.1 PNB59001.2 PNB59001.3 PNB59001.4	
					PNB59001.5	
	เขาค้อ	หนองแม่นา	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	2	PNB59002	
				4	PNB59003.1 PNB59003.2 PNB59003.3	
				5	PNB59004	
				4	PNB60001	
แพร์	เมือง	แม่คำมี	สุพรรณบุรี 1	5	PRE59001	
				5	PRE59002	

ตารางที่ 7 (ต่อ)

จังหวัด	อำเภอ	ตำบล	พืชมูลค่า	ความรุนแรง*	ชื่อไอโซเลข			
แพร่	เมือง	แม่คำมี	พืชมูลค่า 2	3	PRE59003			
			กข53	3	PRE59004.1 PRE59004.2			
				2	PRE59005			
			กข6	5	PRE59006.1 PRE59006.2 PRE59006.3			
				5	PRE59007.1 PRE59007.2			
			ชาวดอกมะลิ 105	4	PRE59008.1 PRE59008.2			
			แพร่ 1	4	PRE59009.1			
				4	PRE59010.2			
			4	PRE59011.1 PRE59011.2				
			ข้าวไม่ทราบพันธุ์	-	PRE17013			
			แม่ฮ่องสอน	ปางมะผ้า	สบป่อง	หางยี 71	4	MSN60001
						4	MSN60012 MSN60013 MSN60014 MSN60015	
						4	MSN60016 MSN60017 MSN60018 MSN60019 MSN60020	
4	MSN60021							
5	MSN60022							
แม่ฮ่องสอน	เมือง	ปางหมู	กข15	(คอรวง)	MSN60008.1 MSN60009.1			
				(คอรวง)	MSN6005.1 MSN6006.1 MSN60007.1			
				(คอรวง)	MSN60002 MSN60004.1			
แม่ฮ่องสอน	ป่า	-	กข15	(คอรวง)	MSN6005.1 MSN6006.1 MSN60007.1			
		-	สันป่าตอง 1	(คอรวง)	MSN60002 MSN60004.1			

ตารางที่ 7 (ต่อ)

จังหวัด	อำเภอ	ตำบล	พืชอาศัย	ความรุนแรง*	ชื่อไอโซเลข				
อุตรดิตถ์	-	-	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	-	UTD17002				
ลพบุรี	-	-	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	-	LRI59001				
				5	LRI59002				
				5	LRI59003.1 LRI59003.2 LRI59003.3				
ราชบุรี	จอมบึง	แก้มอัน	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	4	RBR59001				
ร้อยเอ็ด	-	-	ข้าวดอกมะลิ105	-	BAG44.2 BAG46.2				
นครราชสีมา	โชคชัย	หนองแปลน	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	-	NMA60001				
				ปะคำ	หูก้านบ	ข้าวดอกมะลิ105	4	BRM60001	
				นางรอง	สะเดา	ข้าวกลาง	4	BRM60003.1	
				หนองกี่	เขี้ยปราสาท	ข้าวดอกมะลิ105	6	BRM60002.1 BRM60004.1	
				บุรีรัมย์	ประโคนชัย	ตะโกตาพิ	ข้าวดอกมะลิ105	6	BRM60006.1 BRM60006.2
								4	BRM60012.2
								6	BRM60008.1
								6	BRM60009.1
สกลนคร	เมือง	ธาตุนาเวง	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	(คอรวง)	SKN60001.1 SKN60001.2 SKN60002.1 SKN60002.2				
				6	BRM60011.1				
				ต่างอย	จันทร์เพ็ญ	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	-	SKN60003	

ตารางที่ 7 (ต่อ)

จังหวัด	อำเภอ	ตำบล	พืชมัธยมศึกษา	ความรุนแรง*	ชื่อไอโซเลต
สุรินทร์	พนมดงรัก	โลกกลาง	กข15	-	SRN60001
			ขาวดอกมะลิ105	-	SRN60005.1
หนองคาย	เมือง	ค่ายบกหวาน	กข6	(คอรวง)	NKI60001.1 NKI60001.2
หนองบัวลำภู	นากลาง	นากลาง	กข6	(คอรวง)	NBP60001 NBP60002 NBP60003.1
อุบลราชธานี	-	-	ขาวดอกมะลิ105	-	BAG2.4 BAG8.1
	-	-	ขาวดอกมะลิ105	-	BAG20.4
อุดรธานี	กุฉินชัย	เมืองเพี้ย	ข้าวไม่ทราบพันธุ์	(คอรวง)	UDN60001.1 UDN60001.2
			ข้าวไม่ทราบพันธุ์	(คอรวง)	UDN60002.1
			ข้าวไม่ทราบพันธุ์	(คอรวง)	UDN60003.1 UDN60003.2
			บ้านฝื่อ	ข้าวสาร	กข6
กระบี่	เหนือคลอง	-	ปทุมธานี 1	-	KBI60001
นครศรีธรรมราช	เฉลิมพระเกียรติ	เชียรเขา	กข41	-	NRT60001 NRT60002
	ควนขนุน	พนาสูง	กข41	-	PL60001 PL60002 PL60003
พัทลุง	เมือง	ควนมะพร้าว	ขาวดอกมะลิ105	-	PL60004 PL60005 PL60006
	ปากพูน	คอนทราย	ตั้งห้วยคตพัทลุง	-	PL60007 PL60008 PL60009 PL60010
			ไรซ์เบอร์รี่	-	PL60011
สงขลา	ระโนด	ตะเคียนชะ	กข49	-	SKA60001 SKA60002

* ระดับความรุนแรงของโรคไหม้ข้าว ตามวิธีของ Roumen *et al.* (1997)

ตารางที่ 8 สรุปจำนวนเชื้อรา *P. oryzae* แยกตามภูมิภาคของประเทศไทย และปีที่เก็บตัวอย่าง

ภูมิภาคของประเทศไทย	จังหวัด	อำเภอ	ตำบล	แยกเชื้อได้จำนวน (ไอโซเลท)		
				ปี พ.ศ. 2559	ปี พ.ศ. 2560	รวม 2 ปี
กลาง	6	8	9	6	0	6
เหนือและภาคเหนือตอนล่าง	8	11	16	34	27	61
ตะวันออกเฉียงเหนือ	16	48	55	0	28	28
ใต้	4	6	6	0	16	16
ได้รับอนุเคราะห์*				7	0	7
รวม	34	73	86	47	71	118

* ได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จำนวน 5 ไอโซเลท และได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์วิจัยข้าวแพร่ จำนวน 2 ไอโซเลท

4.2 ผลการตรวจสอบแบบของเพศ (mating type) ของเชื้อรา *P. oryzae*

ตรวจสอบแบบของเพศของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อยีน *Mat1* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการผสมพันธุ์ที่จำเพาะเจาะจงต่อ mating type ของเชื้อรา *P. oryzae* คือ *Mat1-1* และ *Mat1-2* เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอของเชื้อราทั้งหมดกับเชื้อทดสอบมาตรฐานที่ได้รับการยืนยันแบบของเพศแล้ว ได้แก่ *P. grisea* สายพันธุ์ 70-15 และ GUY11 ที่มีแบบของเพศชนิด *Mat1-1* และ *Mat1-2* ตามลำดับ จากเชื้อราจำนวน 118 ไอโซเลท พบเชื้อราเพียง 4 ไอโซเลท ได้แก่ PRE59006.2 PNB59003.1 PNB59003.3 และ PNB60001 ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 809 คู่เบส เหมือนเชื้อราทดสอบมาตรฐานสายพันธุ์ 70-15 ที่มีแบบของเพศชนิด *Mat1-1* (ภาพที่ 8 12 และภาพผนวกที่ 1) เชื้อราจำนวน 114 ไอโซเลท ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 940 คู่เบส เหมือนเชื้อราทดสอบมาตรฐานสายพันธุ์ GUY11 ที่มีแบบของเพศชนิด *Mat1-2* (ภาพที่ 8 9 10 11 12 และภาพผนวกที่ 1) ประชากรเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่เก็บรวบรวมในปี พ.ศ. 2559 จากจังหวัดแพร่ และเพชรบูรณ์ มีแบบของเพศทั้งสองแบบ ในขณะที่ปี พ.ศ. 2560 พบเฉพาะในประชากรเชื้อราจากจังหวัดเพชรบูรณ์เท่านั้นที่มีแบบของเพศทั้งสองแบบ

4.3 ผลการตรวจสอบรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรค (pathotype) ของเชื้อรา *P. oryzae* บนประชากรข้าวที่มียืนต้านทานเดี่ยว (differential rice varieties)

ตรวจสอบรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคของเชื้อรา จำนวน 118 ไอโซเลท บนประชากรข้าวที่มียืนต้านทานเดี่ยวจำนวน 31 สายพันธุ์ ซึ่งมีฐานพันธุกรรมมาจากข้าวพันธุ์ Lijiangxintuanhegu (LTH) พร้อมทั้งตรวจสอบรูปแบบการก่อโรคของเชื้อราบนข้าวพันธุ์เปรียบเทียบ ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ เจ้าหอมนิล (JHN) และ IR64 ที่ต้านทานต่อโรคไหม้ แบ่งระดับความรุนแรงของอาการโรคไหม้ข้าว ตามรูปแบบของปฏิสัมพันธ์ระหว่างยืนก่อโรคในเชื้อราและยืนต้านทานเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในข้าว incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) เป็นลักษณะอาการของปฏิกิริยาที่ตอบสนองแบบ hypersensitive response (HR) ซึ่งเกิดการจดจำระหว่างโปรตีนก่อโรคในเชื้อสาเหตุโรคและโปรตีนต้านทานโรคในข้าว คือ ก่อโรคไม่รุนแรง (ระดับคะแนน 0 – 2) และ ก่อโรครุนแรงปานกลาง (ระดับคะแนน 3 – 4) compatible interaction เป็นลักษณะอาการที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสามารถบุกกรุกพันธุ์ข้าวได้ ซึ่งเกิดจากโปรตีนต้านทานโรคในข้าวไม่สามารถจดจำโปรตีนก่อโรคในเชื้อสาเหตุโรคได้ คือ ก่อโรครุนแรง (ระดับคะแนน 5 – 6)

4.3.1 จัดกลุ่มเชื้อรา *P. oryzae*

4.3.1.1 จัดกลุ่มตามรูปแบบการก่อโรคของเชื้อราบนข้าวพันธุ์ KDML105 และข้าวพันธุ์ LTH

จากเชื้อราทั้งหมด 118 ไอโซเลท สามารถจัดกลุ่มเชื้อราตามรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคบนข้าวพันธุ์ KDML105 ได้ 3 กลุ่มใหญ่ ดังนี้ กลุ่ม 1 ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 9 ไอโซเลท ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคไม่รุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 จากนั้นจัดกลุ่มเชื้อราตามรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคบนข้าวพันธุ์ LTH ซึ่งเป็นฐานพันธุกรรมของข้าวที่มีถิ่นกำเนิดเดียว จัดเชื้อราได้ 3 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มย่อย 1-1 เป็นเชื้อราก่อโรคไม่รุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 และ LTH พบเชื้อราในกลุ่มนี้จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ BAG20.4 BRM60001 MSN60001 MSN60005.1 UDN60001.1 และ PRE59011.2 กลุ่มย่อย 1-2 เป็นเชื้อราก่อโรคไม่รุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 แต่ก่อโรครุนแรงปานกลางบนข้าวพันธุ์ LTH พบเชื้อราในกลุ่มเพียง 1 ไอโซเลท ได้แก่ PNB60001 และกลุ่มย่อย 1-3 เป็นเชื้อราก่อโรคไม่รุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 แต่ก่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ LTH พบเชื้อราในกลุ่มนี้จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ NRT60002 และ PRE59006.2 (ภาพที่ 8)

กลุ่ม 2 ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 15 ไอโซเลท เป็นเชื้อราก่อโรครุนแรงปานกลางบนข้าวพันธุ์ KDML105 จากนั้นจัดกลุ่มเชื้อราตามรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคบนข้าวพันธุ์ LTH จัดเชื้อราได้ 3 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มย่อย 2-1 เป็นเชื้อราก่อโรครุนแรงปานกลางบนข้าวพันธุ์ KDML105 แต่ก่อโรคไม่รุนแรงบนข้าวพันธุ์ LTH จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ BRM60003.1 BRM60006.1 BRM60011.1 PL60001 และ SKN60001.2 กลุ่มย่อย 2-2 เป็นเชื้อราก่อโรครุนแรงปานกลางบนข้าวพันธุ์ KDML105 และ LTH พบเชื้อราจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ NKI60001.2 PL60011 และ PRE59004.2 และกลุ่มย่อย 2-3 เป็นเชื้อราก่อโรครุนแรงปานกลางบนข้าวพันธุ์ KDML105 และก่อโรครุนแรงบนข้าวสายพันธุ์ LTH พบเชื้อราในกลุ่มนี้จำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ CRI60006.2 NMA60001 NRT60001 PL60002 PL60008 PL60009 และ UDN60002.1 (ภาพที่ 8)

	IRBL+KS9 (Pit)	IRBLsh-S (Pish)	IRBLsh-B (Pish)	IRBLsh-B (Pib)	IRBLz-Fu (Piz)	IRBLz5-CA (Piz-5)	IRBLz-T (Piz-1)	IRBL9-W (Piz)	IRBL11-Zh (Pih10)	IRBL1-F5 (Pih)	IRBL3-CP4 (Piz)	IRBL5-M (Piz)	IRBLa-A (Pia)	IRBLa-C (Pia)	IRBLk-Ka (Pik)	IRBLs-F5 (Pis)	IRBLs-S (Pis)	IRBLp-K60 (Pihp)	IRBLb-K3 (Pikh)	IRBLkm-Ts (Pikm)	IRBL1-CL (Pih)	IRBL7-M (Pih)	IRBLu-K1 (Pia)	IRBLu-CT2 (Pia)	IRBLu-CP1 (Pia)	IRBLu2-P1 (Pia-2)	IRBLu2-Re (Pia-2)	IRBL12-M (Pih2)	IRBL19-A (Pih9)	IRBL20-IR24 (Pih9)	LTH	KDML105	JHN	IR64	Group	Mating type							
1 BAG20.4	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1-1	Mat1-2				
2 BRM60001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1-1	Mat1-2		
3 MSN60001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1-1	Mat1-2		
4 UDN60001.1	1	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	2	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	2	2	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1-1	Mat1-2		
5 MSN60005.1	4	0	2	0	-	3	0	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1-1	Mat1-2		
6 PRE59011.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	3	0	0	0	1-1	Mat1-2		
7 PNB60001	2	1	3	1	0	1	2	0	0	2	0	3	0	0	1	3	1	0	2	0	0	0	3	0	3	0	0	0	3	3	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	1-2	Mat1-1	
8 NRT60002	6	3	3	6	0	5	6	3	0	1	6	0	5	4	0	5	5	1	1	1	-	0	6	1	0	0	0	6	1	0	6	2	1	0	0	0	0	0	0	1-3	Mat1-2		
9 PRE59006.2	0	0	0	0	0	3	5	0	0	0	0	-	1	1	0	4	6	5	0	4	0	4	2	0	0	0	4	-	-	0	5	0	2	0	0	0	0	0	0	1-3	Mat1-1		
10 BRM60003.1	1	2	2	0	0	1	1	0	1	1	1	3	0	1	0	1	0	0	3	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	4	1	0	4	1	0	0	0	2-1	Mat1-2		
11 BRM60006.1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	0	0	-	0	0	0	0	0	0	3	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2-1	Mat1-2	
12 BRM60011.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	5	0	6	0	4	0	0	0	0	0	0	0	2-1	Mat1-2	
13 PL60001	3	0	3	6	0	3	0	0	0	2	0	-	-	4	3	4	0	4	4	0	3	0	0	6	5	6	0	0	0	0	0	3	4	0	0	0	0	0	0	0	2-1	Mat1-2	
14 SKN60001.2	0	0	0	0	0	1	0	3	4	3	3	-	-	4	0	4	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	4	4	0	1	4	5	5	0	0	0	0	0	0	0	2-1	Mat1-2	
15 NKI60001.2	3	2	1	0	3	1	1	3	0	3	0	0	2	3	1	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	3	5	3	4	2	0	0	0	0	0	0	0	2-2	Mat1-2	
16 PL60011	0	4	0	-	0	2	0	5	0	0	0	-	4	0	1	1	1	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	4	3	0	4	0	0	0	0	0	0	0	2-2	Mat1-2	
17 PRE59004.2	4	1	1	0	0	4	0	0	4	0	0	0	1	0	0	4	1	0	4	0	0	2	2	1	0	0	0	4	0	4	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2-2	Mat1-2	
18 CRI60006.2	6	5	5	3	6	3	5	0	6	4	4	6	5	4	4	5	0	3	0	3	0	5	0	0	0	0	6	3	6	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2-3	Mat1-2
19 NMA60001	3	0	0	4	-	0	0	0	4	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	4	-	0	0	0	0	0	0	2-3	Mat1-2	
20 NRT60001	6	2	3	6	1	3	6	0	3	1	2	1	4	9	0	5	3	0	0	0	0	0	5	0	3	1	0	1	0	0	6	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2-3	Mat1-2
21 PL60002	6	3	6	6	1	3	2	1	0	1	2	3	6	6	5	6	0	3	3	3	6	1	6	3	0	2	6	2	-	1	6	3	2	6	0	0	0	0	0	0	0	2-3	Mat1-2
22 PL60008	3	4	1	4	0	0	0	-	0	-	3	4	-	-	4	0	0	0	-	1	6	5	3	0	-	2	1	0	1	6	4	2	3	0	0	0	0	0	0	0	2-3	Mat1-2	
23 PL60009	6	-	1	6	0	5	6	6	0	6	6	6	6	6	0	3	0	0	4	1	3	0	0	6	6	5	6	3	0	5	3	6	4	6	6	0	0	0	0	0	2-3	Mat1-2	
24 UDN60002.1	-	-	3	3	1	5	9	6	3	6	9	6	6	6	6	-	4	0	1	0	0	0	0	6	3	4	4	0	0	1	-	6	4	5	0	0	0	0	0	0	2-3	Mat1-2	

ภาพที่ 8 ระดับความรุนแรงในการก่อโรคใหม่ของเชื้อรากลุ่มที่ 1-1 1-2 1-3 2-1 2-2 และ 2-3 บนประชากรข้าวที่มีอินดินแทนเดียว ข้าวพันธุ์ KDML105 JHN และ IR64 และแบบของเพศของเชื้อรา จำนวน 24 ไอโซเลท เครื่องหมาย - คือ ข้อมูลสูญหาย (missing data)

กลุ่ม 3 ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 94 ไอโซเลท เป็นเชื้อราก่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 จากนั้นจัดกลุ่มเชื้อราตามรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคบนข้าวพันธุ์ LTH จัดเชื้อราได้ 4 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มย่อย 3-1 เป็นเชื้อราก่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 และไม่มีข้อมูลปฏิกิริยาการก่อโรคบนข้าวพันธุ์ LTH พบเชื้อราในกลุ่มนี้จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ BRM60002.1 BRM60006.2 BRM60008.1 CRI60003.2 PL60005 และ SKN60003 กลุ่มย่อย 3-2 เป็นเชื้อราก่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 แต่ก่อโรคไม่รุนแรงบนข้าวพันธุ์ LTH พบเชื้อราในกลุ่มนี้จำนวน 14 ไอโซเลท ได้แก่ BAG46.2 BAG8.1 BRM60012.2 CRI59003 CRI60005.2 KBI60001 MSN60018 MSN60021 MSN60022 PRE59005 PRE59008.1 UDN60001.2 UDN60003.2 และ MSN60013 กลุ่มย่อย 3-3 ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 และก่อโรครุนแรงปานกลางบนข้าวพันธุ์ LTH พบเชื้อราในกลุ่มจำนวน 15 ไอโซเลท ได้แก่ BRM60009.1 MSN60002 MSN60004.1 MSN60008.1 MSN60014 MSN60016 MSN60017 MSN60019 MSN60020 NKI60001.1 PL60004 PL60007 PL60010 SRN60001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ UDN60003.1 (ภาพที่ 9) กลุ่มย่อย 3-4 ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 59 ไอโซเลท เป็นเชื้อร่าก่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 และ LTH ในกลุ่มย่อย 3-4 สามารถจัดกลุ่มย่อยตามรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคบนข้าวพันธุ์ JHN และ IR64 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานโรคใหม่ได้ 9 กลุ่ม ได้แก่ 3-4.1 3-4.2 3-4.3 3-4.4 3-4.5 3-4.6 3-4.7 3-4.8 และ 3-4.9 (ภาพที่ 10 11 และ 12)

	IRBL-K59 (Pht)	IRBL-K59 (Pht)	IRBLsh-S (Pish)	IRBLsh-B (Pish)	IRBLb-B (Pib)	IRBLz-Fu (Piz)	IRBLz5-CA (Piz-5)	IRBLzT (Piz-4)	IRBL9-W (Piz)	IRBL11-Zh (Piz/10)	IRBL1-F5 (Pht)	IRBL3-CP4 (Piz)	IRBL5-M (Piz)	IRBLA-A (Pia)	IRBLA-C (Pia)	IRBLK-Ka (Pik)	IRBLKs-F5 (Piks)	IRBLKs-S (Piks)	IRBLkp-K60 (Pikp)	IRBLkh-K3 (Pikh)	IRBLkm-Ts (Pikm)	IRBL1-CL (Pit)	IRBL7-M (Piz/10)	IRBLA-K1 (Pia)	IRBLA-CT 2 (Pia)	IRBLA-CP1 (Pia)	IRBLA2-PI (Pia-2)	IRBLA2-Re (Pia-2)	IRBL12-M (Piz/12)	IRBL19-A (Piz/19)	IRBL20-IR24 (Piz/20)	LTH	KDML105	JHN	IR64	Group	Mating type
1 BRM60002.1	5	4	3	5	0	5	0	0	0	0	0	0	3	5	0	4	4	0	0	0	-	0	4	0	0	0	0	5	-	5	-	5	0	0	3-1	Mat1-2	
2 BRM60006.2	1	1	1	5	0	0	5	0	3	0	0	1	6	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	-	6	1	0	3-1	Mat1-2
3 BRM60008.1	5	2	2	3	0	0	5	-	2	0	0	0	4	2	0	0	0	0	0	4	0	0	5	0	0	0	0	0	-	5	-	6	0	0	3-1	Mat1-2	
4 CRI60003.2	4	0	2	6	0	0	4	0	5	4	0	0	5	4	4	5	2	0	4	0	0	0	4	4	4	4	0	0	0	5	-	5	0	0	3-1	Mat1-2	
5 PL60005	5	0	3	0	0	5	0	3	5	0	0	0	4	6	0	4	4	0	0	0	0	0	3	2	0	6	6	0	0	6	-	6	0	5	3-1	Mat1-2	
6 SKN60003	6	4	4	6	1	4	6	3	6	6	6	6	6	6	6	6	6	3	1	0	0	4	6	3	0	0	4	2	6	6	-	6	3	1	3-1	Mat1-2	
7 BAG46.2	3	0	0	2	0	-	3	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	6	-	0	3-2	Mat1-2	
8 BAG8.1	5	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	4	5	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	0	3-2	Mat1-2
9 BRM60012.2	0	0	3	0	0	3	3	0	4	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	6	4	0	3-2	Mat1-2		
10 CRI59003	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	4	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	3-2	Mat1-2	
11 CRI60005.2	0	4	4	3	3	0	4	5	0	4	4	4	0	4	0	4	0	0	0	2	0	2	3	2	3	0	4	5	5	0	6	1	0	3-2	Mat1-2		
12 KBI60001	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	3	0	0	-	0	0	3	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	3-2	Mat1-2	
13 MSN60018	1	2	3	3	-	3	3	0	0	0	1	0	2	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	3	2	3	1	3	0	6	0	0	3-2	Mat1-2		
14 MSN60021	0	2	0	0	-	0	2	3	4	0	0	2	0	0	1	0	0	3	0	0	0	1	2	4	3	3	2	0	0	6	0	0	3-2	Mat1-2			
15 MSN60022	1	0	1	3	2	3	1	0	1	0	0	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	1	0	1	0	0	6	0	0	3-2	Mat1-2			
16 PRE59005	6	0	0	6	0	4	6	0	-	0	6	6	0	5	0	-	0	6	0	5	-	0	6	0	0	6	-	0	0	-	0	6	0	0	3-2	Mat1-2	
17 PRE59008.1	5	0	-	0	0	0	-	0	5	0	5	6	4	0	0	0	-	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	-	3-2	Mat1-2	
18 UDN60001.2	5	0	1	0	3	0	0	0	0	3	2	1	3	0	3	0	0	0	0	3	0	3	0	0	3	0	3	5	0	2	6	3	0	3-2	Mat1-2		
19 UDN60003.2	3	2	1	0	0	0	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	5	0	0	0	0	6	0	0	3-2	Mat1-2			
20 MSN60013	0	5	3	5	-	0	5	0	-	0	1	0	5	1	0	3	0	3	0	3	1	0	1	0	0	0	0	3	1	6	0	0	3-2	Mat1-2			
21 BRM60009.1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	3	5	0	0	3-3	Mat1-2		
22 MSN60002	6	3	2	6	0	3	4	4	6	6	3	4	-	-	1	5	5	0	0	0	3	4	4	3	6	3	1	0	0	3	4	6	5	2	3-3	Mat1-2	
23 MSN60004.1	6	0	5	6	5	0	5	0	0	0	0	0	8	6	3	6	6	0	0	0	0	3	0	0	2	0	0	0	4	6	0	4	3-3	Mat1-2			
24 MSN60008.1	6	2	3	4	0	4	6	0	4	6	6	4	6	6	2	5	0	0	0	4	0	5	0	0	2	0	0	5	3	5	1	0	3-3	Mat1-2			
25 MSN60014	3	3	5	5	-	0	4	0	4	0	1	2	0	4	0	2	4	0	0	2	0	2	0	1	0	0	1	0	5	4	6	0	0	3-3	Mat1-2		
26 MSN60016	0	2	2	3	-	4	4	0	4	0	1	1	0	3	0	0	3	0	0	0	0	3	0	3	4	0	5	0	0	4	6	1	0	3-3	Mat1-2		
27 MSN60017	0	2	0	3	-	6	3	0	5	0	2	2	0	3	0	0	0	3	0	0	3	0	0	2	0	3	0	6	4	6	0	0	3-3	Mat1-2			
28 MSN60019	2	3	2	3	-	3	3	0	3	1	0	2	0	3	0	0	0	0	2	0	2	2	0	0	0	0	0	0	5	3	6	1	0	3-3	Mat1-2		
29 MSN60020	1	3	3	0	-	1	3	0	0	0	3	2	5	3	0	0	3	0	0	3	0	0	0	0	0	4	0	4	4	3	6	2	0	3-3	Mat1-2		
30 NKI60001.1	6	3	3	5	3	1	6	3	0	6	6	5	5	6	0	6	3	1	0	0	3	2	5	0	3	0	3	3	3	5	5	0	3-3	Mat1-2			
31 PL60004	3	0	5	6	0	0	5	0	1	0	0	0	5	3	0	5	0	0	0	0	0	0	0	3	4	2	0	0	4	6	0	4	3-3	Mat1-2			
32 PL60007	3	3	1	0	0	-	0	2	3	4	-	2	-	-	0	4	0	0	1	2	0	4	0	1	1	1	0	1	3	5	4	4	3-3	Mat1-2			
33 PL60010	4	3	2	4	0	0	5	2	3	4	4	3	-	-	0	4	0	0	1	0	0	4	3	0	0	0	1	0	4	5	1	1	3-3	Mat1-2			
34 SRN60001	0	3	5	3	-	0	5	0	3	1	3	0	-	3	3	0	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	5	4	6	0	0	3-3	Mat1-2		
35 UDN60003.1	5	5	3	0	0	0	6	4	5	6	6	6	-	-	0	3	3	0	0	0	6	0	4	4	6	6	5	0	-	3	3	6	1	2	3-3	Mat1-2	

ภาพที่ 9 ระดับความรุนแรงในการก่อโรคใหม่ของเชื้อรากลุ่มที่ 3-1 3-2 และ 3-3 บนประชากรข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว ข้าวพันธุ์ KDML105 JHN และ IR64 และแบบของเพศของเชื้อรา จำนวน 35 ไอโซเลท เครื่องหมาย - คือ ข้อมูลสูญหาย (missing data)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มย่อย 3-4.1 เป็นเชื้อราก่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 และ LTH แต่ก่อโรคไม่รุนแรงบนข้าวพันธุ์ JHN และ IR64 ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 28 ไอโซเลท ได้แก่ BAG2.4 BAG44.2 CRI59004.1 CRI59005 CRI60001.1 CRI60004.1 CRI60007 LRI59001 LRI59003.2 LRI59003.3 MSN60006.1 MSN60007.1 MSN60012 MSN60015 PNB59001.1 PNB59001.2 PNB59001.3 PNB59004 PRE17013 PRE59001 PRE59002 PRE59008.2 PRE59011.1 SKA60001 SKA60002 SKN60002.1 UDN60005 และ UTD17002 (ภาพที่ 10)

	IRBL+KS9 (Ph)	IRBLsh-S (Pish)	IRBLsh-B (Pish)	IRBLb-B (Pib)	IRBLz-Fu (Piz)	IRBLz5-CA (Piz-5)	IRBLz-T (Piz-1)	IRBL9-W (Piz)	IRBL11-Zh (Pill10)	IRBL1-F5 (Ph)	IRBL3-CP4 (Piz)	IRBL5-M (Piz)	IRBLa-A (Pia)	IRBLa-C (Pia)	IRBLa-Ka (Pik)	IRBLks-F5 (Piks)	IRBLks-S (Piks)	IRBLkp-K60 (Pikp)	IRBLkb-K3 (Pikh)	IRBLkm-Ts (Pikom)	IRBL1-CL (PIL)	IRBL7-M (PIT70)	IRBLta-K1 (Pita)	IRBLta-CT2 (Pita)	IRBLta-CP1 (Pita)	IRBLta2-P (Pita-2)	IRBLta2-Re (Pita-2)	IRBL12-M (PIL2)	IRBL19-A (PIL9)	IRBL20-IR24 (PIL20)	LTH	KDML105	JHN	IR64	Group	Mating type
1 BAG2.4	0	0	-	6	0	0	6	0	5	0	0	2	5	6	0	5	-	0	0	0	-	0	5	0	0	0	0	0	6	5	6	6	0	0	3-4.1	Mat1-2
2 BAG44.2	6	6	3	6	0	6	6	0	-	4	6	3	5	0	0	5	3	0	1	3	0	0	6	6	0	3	6	6	3	3	6	6	0	0	3-4.1	Mat1-2
3 CRI59004.1	6	6	0	0	6	0	6	0	6	6	9	6	5	0	0	6	-	4	0	0	-	0	6	0	6	4	0	4	0	3	6	6	0	0	3-4.1	Mat1-2
4 CRI59005	6	5	1	5	0	5	6	5	6	0	0	2	5	6	0	4	0	0	-	0	0	6	5	0	5	-	0	0	0	5	6	5	0	0	3-4.1	Mat1-2
5 CRI60001.1	5	0	0	0	4	0	0	5	0	5	6	0	6	6	-	0	5	0	0	0	0	5	-	0	2	6	6	4	5	6	6	6	2	0	3-4.1	Mat1-2
6 CRI60004.1	3	3	3	0	3	-	5	3	0	4	3	0	0	4	3	0	1	1	0	3	0	0	3	0	0	0	0	4	6	5	6	6	0	0	3-4.1	Mat1-2
7 CRI60007	4	3	3	6	6	0	6	0	6	4	0	0	5	6	0	0	0	0	0	4	0	0	6	0	5	0	6	6	0	-	6	6	0	0	3-4.1	Mat1-2
8 LRI59001	6	4	4	6	0	5	5	4	6	0	0	0	6	9	0	4	-	0	0	0	0	4	6	4	6	5	4	0	0	6	6	0	0	3-4.1	Mat1-2	
9 LRI59003.2	5	0	1	5	0	3	5	4	3	3	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0	1	4	0	5	6	5	0	0	3-4.1	Mat1-2	
10 LRI59003.3	0	0	0	4	4	0	4	3	6	0	0	0	4	5	-	0	5	0	-	0	0	6	0	0	0	0	0	0	6	5	0	0	0	3-4.1	Mat1-2	
11 MSN60006.1	5	2	1	6	1	3	5	3	0	2	0	0	5	5	0	4	1	0	0	0	0	2	0	0	0	3	0	6	6	6	0	0	3-4.1	Mat1-2		
12 MSN60007.1	6	4	3	5	0	4	4	0	5	0	4	2	5	-	0	0	4	4	0	4	0	5	5	3	5	5	5	4	0	6	6	0	0	3-4.1	Mat1-2	
13 MSN60012	3	3	4	5	-	5	5	3	5	0	1	0	2	4	0	0	2	1	0	0	1	3	2	4	1	0	1	0	4	6	6	0	0	3-4.1	Mat1-2	
14 MSN60015	3	3	0	6	-	3	5	0	3	0	0	1	1	3	2	0	2	0	0	3	0	0	3	3	0	0	0	6	0	5	6	0	0	3-4.1	Mat1-2	
15 PNB59001.1	6	6	6	6	5	5	6	4	6	6	6	6	6	-	6	6	6	6	0	0	4	6	6	0	0	3	0	4	6	0	5	6	0	2	3-4.1	Mat1-2
16 PNB59001.2	6	5	5	6	5	0	6	5	6	6	6	6	6	0	6	6	0	0	0	4	0	6	5	6	2	6	6	0	6	6	0	0	3-4.1	Mat1-2		
17 PNB59001.3	6	5	3	6	3	0	6	0	-	4	6	5	6	0	5	0	0	0	0	5	3	6	0	0	0	0	5	6	0	6	6	0	0	3-4.1	Mat1-2	
18 PNB59004	6	0	3	0	4	5	6	1	3	4	5	4	5	4	0	5	4	5	2	0	0	6	0	5	0	0	0	6	5	5	5	1	0	3-4.1	Mat1-2	
19 PRE17013	6	5	6	5	4	5	5	0	6	5	5	0	6	6	0	5	6	0	0	4	0	5	6	3	2	0	5	6	0	6	5	0	0	3-4.1	Mat1-2	
20 PRE59001	5	3	0	5	0	6	5	0	0	0	1	5	-	0	6	0	0	-	0	1	0	6	0	0	0	0	-	6	6	6	0	0	3-4.1	Mat1-2		
21 PRE59002	5	4	2	4	0	0	4	0	-	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	3	0	6	0	0	5	-	0	5	6	0	0	0	3-4.1	Mat1-2		
22 PRE59008.2	0	6	0	6	0	0	2	3	-	0	0	0	0	5	0	0	0	0	-	0	0	0	0	6	0	0	5	5	0	6	6	0	0	3-4.1	Mat1-2	
23 PRE59011.1	6	5	1	5	0	5	6	5	6	0	0	2	5	6	-	4	0	0	-	0	0	6	5	0	5	-	0	0	5	6	5	0	0	3-4.1	Mat1-2	
24 SKA60001	6	6	6	6	0	6	6	6	6	3	2	-	6	6	6	5	3	4	0	0	6	3	6	2	2	5	0	6	0	6	6	5	2	0	3-4.1	Mat1-2
25 SKA60002	4	0	2	3	0	2	2	2	6	0	3	0	4	2	0	4	2	0	0	0	0	4	1	3	0	0	5	0	4	6	5	2	0	3-4.1	Mat1-2	
26 SKN60002.1	5	3	5	5	4	5	5	4	6	1	3	0	0	5	0	0	3	0	3	2	3	0	5	1	0	0	1	0	5	5	6	1	0	3-4.1	Mat1-2	
27 UDN60005	0	0	0	4	3	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	3	0	5	0	0	6	6	0	0	3-4.1	Mat1-2	
28 UTD17002	6	6	6	6	4	6	6	0	6	6	0	6	6	0	4	-	0	0	0	0	0	6	0	0	0	2	6	0	6	5	0	0	3-4.1	Mat1-2		

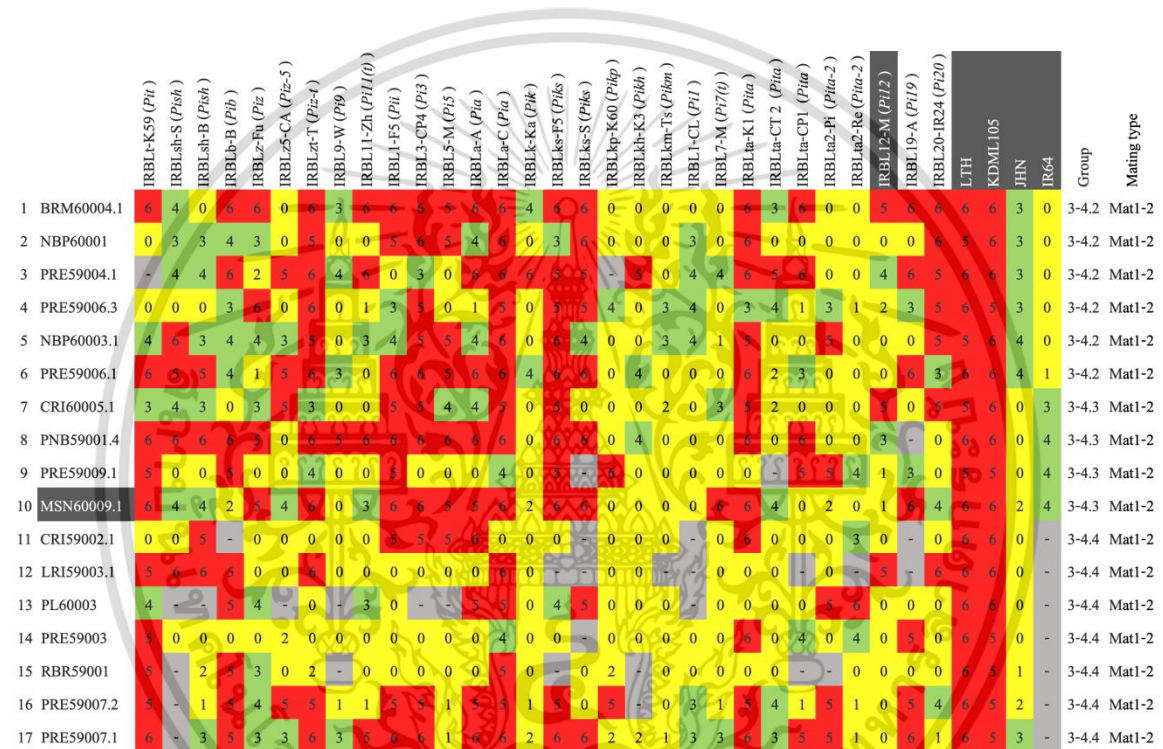
ภาพที่ 10 ระดับความรุนแรงในการก่อโรคใหม่ของเชื้อราในกลุ่มที่ 3-4.1 บนประชากรข้าวที่มียืนต้นทานเดี่ยว ข้าวพันธุ์ KDML105 JHN และ IR64 และแบบของเพศของเชื้อรา จำนวน 28 ไอโซเลท เครื่องหมาย - คือ ข้อมูลสูญหาย (missing data)

กลุ่มย่อย 3-4.2 เป็นเชื้อราก่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 และ LTH ก่อโรครุนแรงปานกลางบนข้าวพันธุ์ JHN และก่อโรคไม่รุนแรงบนข้าวพันธุ์ IR64 ประกอบด้วยเชื้อราเอกสารเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานี้เท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เข้าถึงระบบงานด้านการศึกษา ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ BRM60004.1 NBP60001 PRE59004.1 PRE59006.3 NBP60003.1 และ PRE59006.1 (ภาพที่ 11)

กลุ่มย่อย 3-4.3 เป็นเชื้อรากล่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 และ LTH ก่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ JHN และก่โรครุนแรงปานกลางบนข้าวพันธุ์ IR64 ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ CRI60005.1 PNB59001.4 PRE59009.1 และ MSN60009.1 (ภาพที่ 11)

กลุ่มย่อยที่ 3-4.4 เป็นเชื้อรากล่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 และ LTH แต่ไม่มีข้อมูลปฏิบัติการการก่โรครบนข้าวพันธุ์ IR64 ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ CRI59002.1 LRI59003.1 PL60003 PRE59003 RBR59001 PRE59007.2 และ PRE59007.1 (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ระดับความรุนแรงในการก่โรคใหม่ของเชื้อรากลุ่มที่ 3-4.2 3-4.3 และ 3-4.4 บนประชากรข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว ข้าวพันธุ์ KDML105 JHN และ IR64 และแบบของเพศของเชื้อราจำนวน 17 ไอโซเลต เครื่องหมาย - คือ ข้อมูลสูญหาย (missing data)

กลุ่มย่อย 3-4.5 เป็นเชื้อรากล่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 LTH และ IR64 แต่ก่โรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ JHN ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ NBP60002 PNB59001.5 และ SKN60001.1 (ภาพที่ 12)

กลุ่มย่อย 3-4.6 เป็นเชื้อรากล่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 LTH และ JHN และก่โรครุนแรงปานกลางบนข้าวพันธุ์ IR64 คือ PNB59002 (ภาพที่ 12)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มย่อย 3-4.7 เป็นเชื้อรากล่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 LTH และ IR64 และก่อโรคไม่รุนแรงบนข้าวพันธุ์ JHN ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ CRI59001 CRI59002.2 CRI59004.2 PL60006 และ SKN60002.2 (ภาพที่ 12)

กลุ่มย่อย 3-4.8 เป็นเชื้อรากล่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 LTH และ JHN แต่ก่อโรคไม่รุนแรงบนข้าวพันธุ์ IR64 ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ LRI59002 PNB59003.1 และ PRE59010.2 (ภาพที่ 12)

กลุ่มย่อย 3-4.9 เป็นเชื้อรากล่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 LTH JHN และ IR64 พบเชื้อราในกลุ่มนี้เพียง 2 ไอโซเลต ได้แก่ PNB59003.2 และ PNB59003.3 (ภาพที่ 12)

	IRBL1-K59 (Pit)	IRBL1sh-S (Pish)	IRBL1sh-B (Pish)	IRBL1b-B (Pib)	IRBL1z-Fu (Piz)	IRBL1z5-CA (Piz-5)	IRBL1z-T (Piz-4)	IRBL1z-W (Piz)	IRBL11-Zh (Pih)	IRBL1-F5 (Pih)	IRBL3-CP4 (P13)	IRBL5-M (P15)	IRBL1a-A (Pia)	IRBL1a-C (Pia)	IRBL1-Ka (Pik)	IRBL1ks-F5 (Piks)	IRBL1ks-S (Piks)	IRBL1kp-K60 (Pikp)	IRBL1kh-K3 (Pikb)	IRBL1km-Ts (Pikm)	IRBL1-CL (Pli)	IRBL17-M (P17)	IRBL1a-K1 (Pia)	IRBL1a-CT 2 (Pia)	IRBL1a-CP1 (Pia)	IRBL1a2-Pi (Pia-2)	IRBL1a2-Re (Pia-2)	IRBL12-M (PH2)	IRBL19-A (P19)	IRBL120-IR24 (P120)	LTH	KDML105	JHN	IR64	Group	Mating type	
1 NBP60002	5	4	4	4	4	0	5	0	3	6	5	3	5	4	0	4	5	0	4	0	0	1	5	2	0	1	0	3	3	5	5	5	3	4	3-4.5	Mat1-2	
2 PNB59001.5	6	6	5	6	6	5	6	0	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	3	5	2	0	6	6	6	0	5	5	6	6	6	6	4	3	3-4.5	Mat1-2	
3 SKN60001.1	4	3	4	6	3	6	5	3	0	3	4	2	4	6	5	0	4	0	5	3	0	0	5	4	0	4	0	5	3	4	5	6	4	4	3-4.5	Mat1-2	
4 PNB59002	6	6	6	6	6	6	6	0	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4	6	4	6	-	6	6	6	4	3-4.6	Mat1-2	
5 CRI59001	6	2	5	6	6	6	6	4	6	6	6	5	6	6	6	6	5	5	5	0	6	5	6	6	6	5	0	0	5	6	6	6	0	5	3-4.7	Mat1-2	
6 CRI59002.2	5	5	4	6	6	3	6	2	6	6	6	5	6	6	0	6	5	1	0	3	3	0	6	5	6	4	5	6	4	5	6	6	0	5	3-4.7	Mat1-2	
7 CRI59004.2	6	5	6	6	6	4	6	0	6	6	6	6	6	6	2	6	6	2	4	0	4	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6	3-4.7	Mat1-2	
8 PL60006	6	0	6	6	0	0	4	0	6	1	-	0	6	6	0	6	0	6	0	0	0	-	0	0	0	6	5	0	3	0	6	6	6	1	6	3-4.7	Mat1-2
9 SKN60002.2	6	2	3	6	6	4	6	6	6	2	0	0	2	6	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	5	5	6	6	6	0	6	3-4.7	Mat1-2	
10 LRI59002	6	5	0	6	3	0	5	0	5	5	5	0	6	5	0	5	5	0	0	0	0	0	5	0	3	5	5	0	6	4	5	6	6	0	3-4.8	Mat1-2	
11 PRE59010.2	6	4	5	5	0	-	6	4	6	6	0	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	3	2	6	6	6	6	5	6	2	3-4.8	Mat1-2		
12 PNB59003.1	6	6	6	6	6	6	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	6	2	3-4.8	Mat1-1
13 PNB59003.2	6	6	6	6	6	6	2	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	6	6	6	6	6	6	6	3-4.9	Mat1-2
14 PNB59003.3	6	6	6	6	6	6	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	5	6	6	6	3-4.9	Mat1-1

ภาพที่ 12 ระดับความรุนแรงในการก่อโรคใหม่ของเชื้อรากลุ่มที่ 3-4.5 3-4.6 3-4.7 3-4.8 และ 3-4.9 บนประชากรข้าวที่มีถิ่นกำเนิดเดียว ข้าวพันธุ์ KDML105 JHN และ IR64 และแบบของเพศของเชื้อรา จำนวน 14 ไอโซเลต เครื่องหมาย - คือ ข้อมูลสูญหาย (missing data)

จากเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ทั้งหมด 118 ไอโซเลต พบเชื้อราสามารถก่อโรครุนแรงระดับ 5 หรือ 6 บนข้าวต้านทานโรคใหม่พันธุ์ JHN จำนวน 11 ไอโซเลต ได้แก่ LRI59002 MSN60002 NKI60001.1 PL60009 PNB59002 PNB59003.1 PNB59003.2 PNB59003.3 PRE59010.2 SKN60001.2 และ UDN60002.1 ซึ่งเป็นเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างใบข้าวที่เก็บจากจังหวัดลพบุรี แพร่ เพชรบูรณ์ และพัทลุง ในขณะที่เชื้อราจากจังหวัดแม่ฮ่องสอน หนองคาย สกลนคร และอุดรธานี เป็นเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างคอรวงข้าว (ภาพที่ 8 9 11 และ 12)

พบเชื้อราสามารถก่อโรครุนแรงระดับ 5 หรือ 6 บนข้าวต้านทานโรคใหม่พันธุ์ IR64 จำนวน 11 ไอโซเลต ได้แก่ CRI59001 CRI59002.2 CRI59004.2 PL60002 PL60005 PL60006 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PL60009 PNB59003.2 PNB59003.3 SKN60001.2 และ SKN60002.2 ซึ่งเป็นเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างใบข้าวที่เก็บจากจังหวัดเชียงราย เพชรบูรณ์ และพัทลุง ในขณะที่เชื้อราจากจังหวัดสกลนคร เป็นเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างคอรวงข้าว (ภาพที่ 8 และ 9)

4.3.1.2 จัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อรา ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc 2.10p

จากรูปแบบปฏิบัติการก่อโรคของเชื้อราจำนวน 118 ไอโซเลท บนประชากรข้าวที่มีถิ่นกำเนิดเดียว ข้าวพันธุ์ KDML105 JHN และ IR64 นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Similarity coefficient; SimInt) ด้วยวิธี Canberra และจัดกลุ่มจากค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนด้วยวิธี SHAN พร้อมทั้งสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ (dendrogram) ของเชื้อราด้วยวิธี Tree plot โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc 2.10p ที่ระดับความเหมือน 50 เปอร์เซ็นต์ สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ได้ 8 กลุ่ม โดยกำหนดชื่อกลุ่มเป็นตัวอักษร A-H (ภาพที่ 13)

กลุ่ม A ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 54 ไอโซเลท เป็นกลุ่มที่มีประชากรเชื้อราจำนวนมากที่สุดคิดเป็น 45.76 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ที่ศึกษาทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของประชากรที่ระดับความเหมือน 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เชื้อราในกลุ่ม A สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้ 6 กลุ่ม ได้แก่ A-1 A-2 A-3 A-4 A-5 และ A-6 ซึ่งประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 17 5 3 6 20 และ 2 ไอโซเลทตามลำดับ และมีเชื้อราจำนวน 1 ไอโซเลทที่ถูกจัดกลุ่มแยกเดี่ยว

กลุ่ม B ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ PRE59004.2 และ PRE59006.2 ซึ่งคิดเป็น 1.69 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ที่ศึกษาทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของประชากรที่ระดับความเหมือน 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เชื้อราถูกแยกเดี่ยวออกจากกัน

กลุ่ม C ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 4 ไอโซเลท ซึ่งคิดเป็น 3.39 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ที่ศึกษาทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของประชากรที่ระดับความเหมือน 60 เปอร์เซ็นต์ สามารถแบ่งได้ออกเป็น 1 กลุ่มย่อย คือกลุ่ม C-1 ประกอบด้วยเชื้อรา 2 ไอโซเลท ได้แก่ BRM60003.1 และ UDN60001.1 และพบเชื้อราไอโซเลท MSN60018 และ PNB60001 ถูกแยกเดี่ยวออกจากกลุ่ม

กลุ่ม D ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ MSN60021 และ SKN60001.2 ซึ่งคิดเป็น 1.69 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ที่ศึกษาทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของประชากรที่ระดับความเหมือน 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เชื้อราถูกแยกเดี่ยวออกจากกัน

กลุ่ม E เป็นกลุ่มที่เชื้อราถูกจัดกลุ่มแยกเดี่ยวเพียง 1 ไอโซเลท ได้แก่ PL60001 ซึ่งคิดเป็น 0.85 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ที่ศึกษาทั้งหมด

กลุ่ม F ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 46 ไอโซเลท คิดเป็น 38.98 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่ศึกษาทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของประชากรที่ระดับความเหมือน 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อราในกลุ่ม F สามารถแบ่งได้ออกเป็นกลุ่มย่อยจำนวน 5 กลุ่ม ได้แก่ F-1 F-2 F-3 F-4 และ F-5 ซึ่งประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 2 23 14 2 และ 2 ไอโซเลทตามลำดับ และมีเชื้อราที่ถูกจัดกลุ่มแยกเดี่ยวจำนวน 2 ไอโซเลท

กลุ่ม G ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 5 ไอโซเลท ซึ่งคิดเป็น 4.24 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่ศึกษาทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของประชากรที่ระดับความเหมือน 60 เปอร์เซ็นต์ สามารถแบ่งได้ออกเป็น 1 กลุ่มย่อย คือกลุ่ม G-1 ประกอบด้วยเชื้อรา 4 ไอโซเลท ได้แก่ CRI60005.1 PL60007 PL60008 และ PL60010 และพบเชื้อราไอโซเลท PL60002 ถูกแยกเดี่ยวออกจากกลุ่ม

กลุ่ม H ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 5 ไอโซเลท ซึ่งคิดเป็น 4.24 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่ศึกษาทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของประชากรที่ระดับความเหมือน 60 เปอร์เซ็นต์ สามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่ม H-1 ประกอบด้วยเชื้อรา 2 ไอโซเลท ได้แก่ CRI60001.1 และ NKI60001.2 กลุ่ม H-2 ประกอบด้วยเชื้อรา 2 ไอโซเลท ได้แก่ CRI60005.2 และ UDN60001.2 และพบเชื้อราไอโซเลท PRE59006.3 ถูกแยกเดี่ยวออกจากกลุ่ม

จากแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ เชื้อราที่ระบาดในช่วงฤดูปลูกปี พ.ศ. 2559 – 2560 มีความหลากหลายทางรูปแบบปฏิบัติการก่อโรครอบคอบมาก ที่ระดับความเหมือน 90 เปอร์เซ็นต์ เชื้อราส่วนใหญ่ถูกแยกเดี่ยวออกจากกลุ่ม มีเชื้อราเพียง 12 ไอโซเลทยังคงถูกจัดกลุ่มร่วมกัน โดยถูกจัดอยู่ใน 4 กลุ่ม ได้แก่ A-1.1 A-5.1 A-5.2 และ F-2.1 กลุ่ม A-1.1 ได้แก่ ไอโซเลท CRI59005 และ PRE59011.1 กลุ่ม A-5.1 ได้แก่ BAG8.1 และ NMA60001 ได้แก่ กลุ่ม A-5.2 ได้แก่ BRM60001 MSN60001 PRE59011.2 และ BRM60011.1 กลุ่ม F-2.1 ได้แก่ PNB59002 PNB59003.1 PNB59003.2 และ PNB59003.3 (ภาพที่ 13)

ที่ระดับความเหมือน 90 เปอร์เซ็นต์ เชื้อราในกลุ่ม A-1.1 ได้แก่ ไอโซเลท CRI59005 และ PRE59011.1 พบว่ามีรูปแบบการก่อโรคเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา 2 ไอโซเลท เป็นเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างต่างพื้นที่กัน ไอโซเลท CRI59005 แยกได้จากตัวอย่างใบข้าวจากอำเภอเวียงชัย จังหวัดเชียงราย และ PRE59011.1 แยกได้จากตัวอย่างใบข้าวจากอำเภอมือง จังหวัดแพร่ (ภาพที่ 10 13 และตารางที่ 7)

วิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อราที่แยกได้จากแผลเดียวกัน ที่ระดับความเหมือน 50 เปอร์เซ็นต์ เชื้อราที่แยกได้จากแผลเดียวกัน ถูกจัดกลุ่มแยกจากกัน ได้แก่ ไอโซเลท CRI60005.1 และ CRI60005.2 จากอำเภอฟาน จังหวัดเชียงราย CRI59002.1 และ CRI59002.2 จากอำเภอเวียงชัย จังหวัดเชียงราย PRE59004.1 PRE59004.2 PRE59006.1 PRE59006.2 และ PRE59006.3 จากอำเภอมือง จังหวัดแพร่ SKN60001.1 SKN60001.2 SKN60002.1 และ SKN60002.2 จากอำเภอมือง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จังหวัดสกลนคร NKI60001.1 และ NKI60001.2 จากอำเภอเมือง จังหวัดหนองคาย UDN60001.1 และ UDN60001.2 จากอำเภอกุดจับ จังหวัดอุดรธานี UDN60003.1 และ UDN60003.2 จากอำเภอบ้านฝาง จังหวัดอุดรธานี (ภาพที่ 13 และตารางที่ 7)

อย่างไรก็ตามพบมีเชื้อราที่แยกได้จากแผลเดียวกัน ถูกจัดอยู่กลุ่มเดียวกันที่ระดับความเหมือน 50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ CRI59004.1 และ CRI59004.2 แยกได้จากแผลเดียวกันของตัวอย่างใบข้าวจากอำเภอเวียงชัย จังหวัดเชียงราย ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม F ไอโซเลท PNB59001.1 PNB59001.2 PNB59001.3 PNB59001.4 และ PNB59001.5 จากอำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม F ไอโซเลท PRE59007.1 PRE59007.2 PRE59011.1 และ PRE59011.2 จากอำเภอเมือง จังหวัดแพร่ ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม F ไอโซเลท LRI59003.1 LRI59003.2 และ LRI59003.3 จากจังหวัดลพบุรี ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม A BRM60006.1 และ BRM60006.2 จากอำเภอประโคนชัย จังหวัดบุรีรัมย์ ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม A แต่เมื่อวิเคราะห์แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ ที่ระดับความเหมือน 90 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อราถูกจัดกลุ่มแยกกัน (ภาพที่ 12 13 และตารางที่ 7)

ยกเว้นเชื้อราในกลุ่ม F-5.1 ไอโซเลท PNB59003.1 PNB59003.2 และ PNB59003.3 แยกได้จากแผลเดียวกันของตัวอย่างใบข้าวจากอำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ เชื้อราถูกจัดกลุ่มร่วมกันที่ระดับความเหมือน 50 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อวิเคราะห์ที่ระดับความเหมือน 90 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรายังคงถูกจัดกลุ่มร่วมกัน (ภาพที่ 13 และตารางที่ 7) อย่างไรก็ตามเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลท มีความแตกต่างของรูปแบบการก่อโรค เมื่อจัดกลุ่มตามรูปแบบการก่อโรค (pathotype) บนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่อ่อนแอต่อโรคใหม่ และข้าวพันธุ์ LTH เชื้อราไอโซเลท PNB59003.1 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม 3-4.8 เชื้อราสามารถก่อโรครุนแรงระดับ 5-6 บนประชากรข้าวมียืนต้นทานเดี่ยวได้ทุกสายพันธุ์ รวมทั้งสามารถก่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ LTH พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์เจ้าหอมนิล (JHN) แต่ก่อโรคไม่รุนแรงบนข้าวพันธุ์ IR64 (ภาพที่ 12) เชื้อราไอโซเลท PNB59003.2 และ PNB59003.3 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม 3-4.9 เชื้อราสามารถก่อโรครุนแรงบนข้าวต้นทานโรคใหม่สายพันธุ์ IR64 ซึ่งแตกต่างจากไอโซเลท PNB59003.1 นอกจากนี้ไอโซเลท PNB59003.1 และ PNB59003.3 เป็นเชื้อราที่มีแบบของเพศชนิด MAT1-1 ต่างจากไอโซเลท PNB59003.2 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีแบบของเพศชนิด MAT1-2 (ภาพที่ 12)

4.3.2 ระบุยีนก่อโรค (avirulence gene) ของประชากรเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ข้าวในประเทศไทย

ระบุยีนก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคใหม่แต่ละไอโซเลท โดยใช้ผลประเมินการเกิดโรคที่เกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนก่อโรคในเชื้อราและยืนต้นทานในข้าวแบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) คือ ระดับคะแนน 0 1 หรือ 2

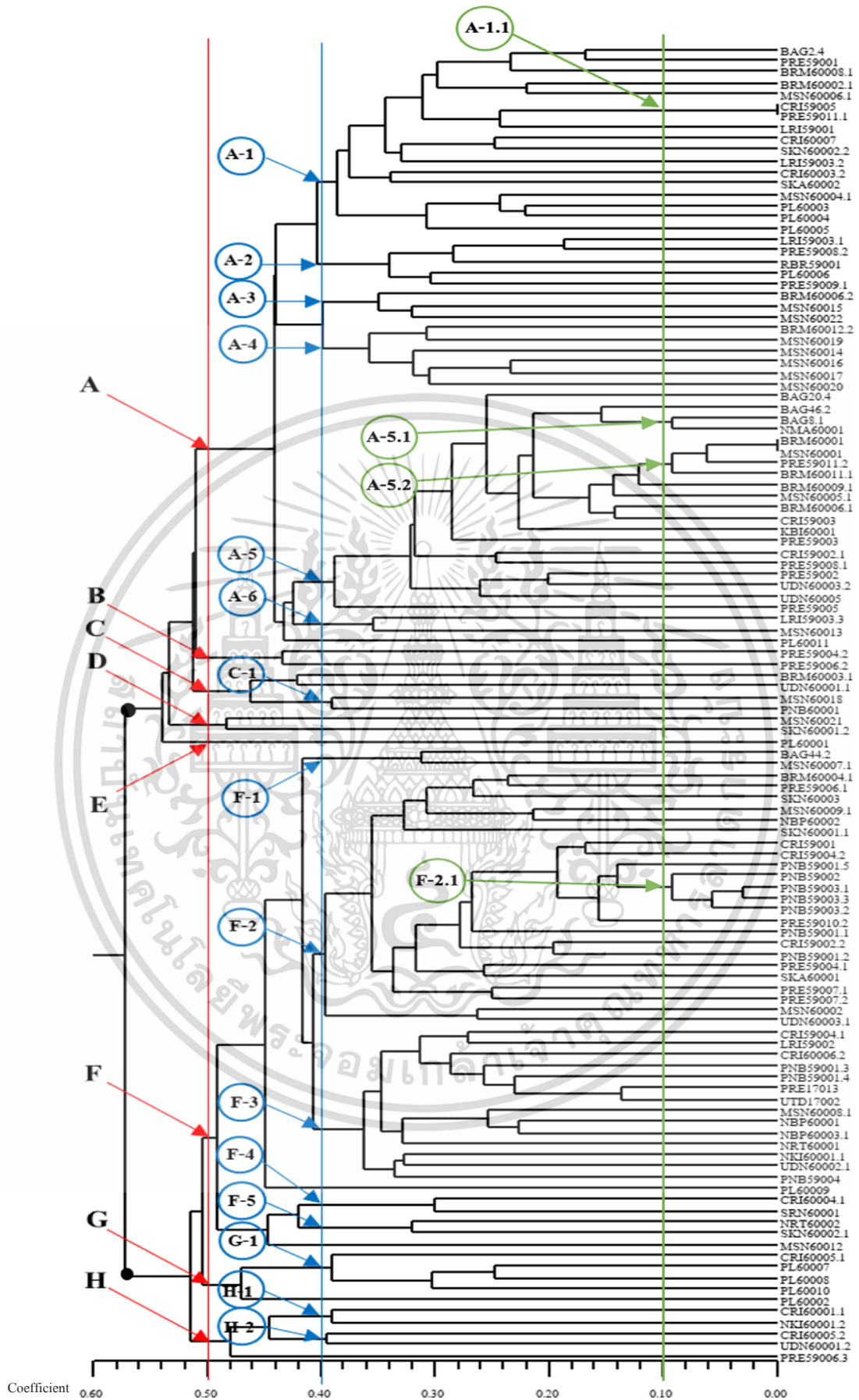
ในประชากรเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ของประเทศไทยที่ระบาดช่วงฤดูปลูกปี พ.ศ. 2559 – 2560 จำนวน 118 ไอโซเลท ยีนก่อโรคที่พบน้อยที่สุด คือ *AVR-Pia* พบเชื้อราจำนวน 25 ไอโซเลทที่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) กับข้าวพันธุ์ IRBLA-C ที่

มียืนต้านทาน *Pia* ซึ่งคิดเป็น 21 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราที่ศึกษาทั้งหมด (ภาพที่ 14) ยืนก่อโรคที่พบมากที่สุด ได้แก่ *AVR-Pikp* พบเชื้อราจำนวน 93 ไอโซเลทที่เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) กับข้าวพันธุ์ IRBLkp-K60 ที่มียืนต้านทาน *Pikp* ซึ่งคิดเป็น 79 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราที่ศึกษาทั้งหมด (ภาพที่ 14) นอกจากนี้ยังพบว่ายืนก่อโรคในกลุ่มของยืน *AVR-Pik* ได้แก่ แอลลีล *AVR-Pikm* *AVR-Pi7(t)* และ *AVR-Pikh* พบในเชื้อราจำนวน 92 91 และ 89 ไอโซเลทตามลำดับ ซึ่งคิดเป็น 78 77 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อราที่ศึกษาทั้งหมด ตามลำดับ ซึ่งเป็นกลุ่มยืนที่พบในเชื้อมากกว่ายืนก่อโรคอื่น ๆ (ภาพที่ 14)

เมื่อวิเคราะห์แยกตามภูมิภาคของประเทศไทย เชื้อราสาเหตุโรคใหม่ที่ระบาดในพื้นที่ภาคกลางจำนวน 6 ไอโซเลท ทุกไอโซเลทมียืนก่อโรคแอลลีล *AVR-Pikp* และ *AVR-Pi5(t)* เชื้อราภาคกลาง 83 เปอร์เซ็นต์มียืนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pik* แอลลีล *AVR-Pikm* *AVR-Pi7(t)* และ *AVR-Pi1* ยืนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pita* แอลลีล *AVR-Pita* (IRBLta-CT2) และยืนก่อโรค *AVR-Pi3* เชื้อรา 67 เปอร์เซ็นต์มียืนก่อโรค *AVR-Pik* แอลลีล *AVR-Pikh* และ *AVR-Pik* (IRBLk-Ka) ยืนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pita* แอลลีล *AVR-Pi19* และ *AVR-Pita* (IRBLta-K1) ยืนก่อโรค *AVR-Piz-5* *AVR-Pii* และ *AVR-Pish* (IRBL1-F5) เชื้อราภาคกลาง 50 เปอร์เซ็นต์มียืนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pita* แอลลีล *AVR-Pita-2* (IRBLta2-Re) *AVR-Pita-2* (IRBLta2-Pi) *AVR-Pi12* และ *AVR-Pi20* และมียืนก่อโรค *AVR-Piz* นอกจากนี้เชื้อมียืนก่อโรคมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์มียืนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pik* แอลลีล *AVR-Piks* (IRBLks-S) และ *AVR-Piks* (IRBLks-F5) ยืนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pita* แอลลีล *AVR-Pita* (IRBLta-CP1) และ *AVR-Pita* (IRBLt-K59) ยืนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pi9* แอลลีล *AVR-Pi9* และ *AVR-Piz-t* ยืน *AVR-Pish* (IRBLsh-S) *AVR-Pia* (IRBLa-A) และ *AVR-Pi11* ในขณะที่ไม่พบยืนก่อโรค *AVR-Pia* (IRBLa-C) และ *AVR-Pib* ในประชากรเชื้อราภาคกลาง (ภาพที่ 15)

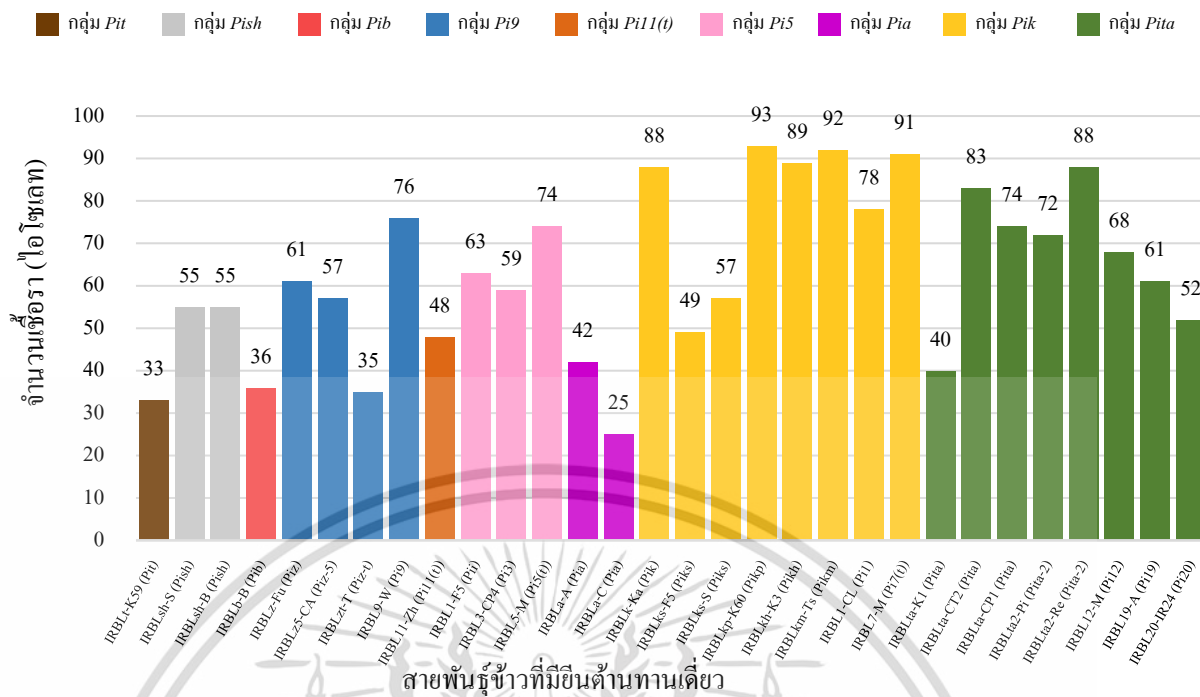
เชื้อราสาเหตุโรคใหม่ที่ระบาดในพื้นที่ภาคเหนือและภาคเหนือตอนล่างจำนวน 63 ไอโซเลท ร้อยละ 75 ของเชื้อราภาคเหนือและภาคเหนือตอนล่างมียืนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pik* แอลลีล *AVR-Pikm* และ *AVR-Pik* (IRBLk-Ka) เชื้อรามากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์มียืนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pita* แอลลีล *AVR-Pi12* *AVR-Pita-2* (IRBLta2-Re) *AVR-Pita-2* (IRBLta2-Pi) *AVR-Pita* (IRBLta-CT2) และ *AVR-Pita* (IRBLta-CP1) ยืนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pik* แอลลีล *AVR-Pikp* *AVR-Pikh* *AVR-Pi7(t)* และ *AVR-Pi1* มียืนก่อโรค *AVR-Pi9* และ *AVR-Pi5(t)* นอกเหนือจากนี้เป็นยืนก่อโรคที่พบน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ยืนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pik* แอลลีล *AVR-Piks* (IRBLks-S) และ *AVR-Piks* (IRBLks-F5) ยืนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pita* แอลลีล *AVR-Pi19* *AVR-Pi20* *AVR-Pita* (IRBLta-K1) และ *AVR-Pita* (IRBLt-K59) ยืนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pi9* แอลลีล *AVR-Piz-5* *AVR-Piz* และ *AVR-Piz-t* ยืนก่อโรค *AVR-Pii* และ *AVR-Pi3* ซึ่งเป็นยืนก่อโรคในกลุ่มเดียวกัน ยืนก่อโรค *AVR-Pish* ทั้ง 2 แอลลีล (IRBLsh-S และ IRBLsh-B) ยืนก่อโรค *AVR-Pia* ทั้ง 2 แอลลีล (IRBLa-A และ IRBLa-C) ยืนก่อโรค *AVR-Pib* และ *AVR-Pi11* (ภาพที่ 16)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

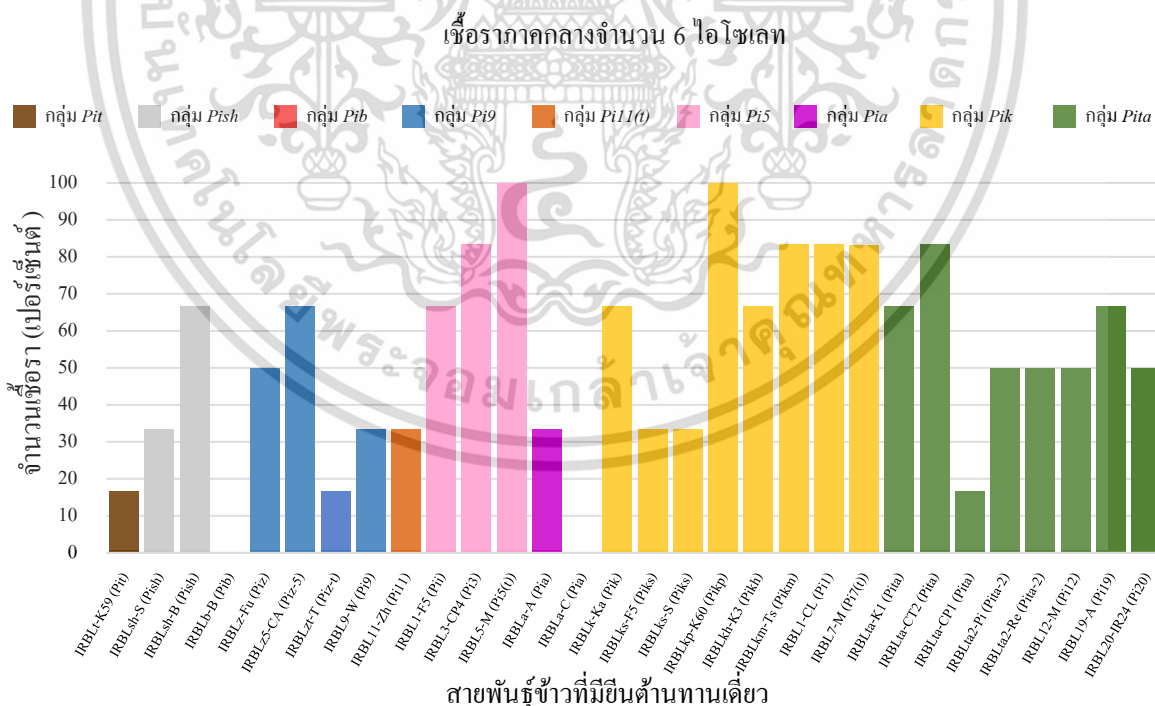


ภาพที่ 13 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อสาเหตุโรคไหม้ 118 ไอโซเลต บนประชากรข้าวที่มีถิ่นกำเนิดที่ข้าวพันธุ์ KDML105 JHN และ IR64 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc 2.10p เส้นสีแดง คือ ที่ระดับความเหมือน 50 เปอร์เซ็นต์ เส้นสีน้ำเงิน คือ ที่ระดับความเหมือน 60 เปอร์เซ็นต์ เส้นสีเขียว คือ ที่ระดับความเหมือน 90 เปอร์เซ็นต์

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



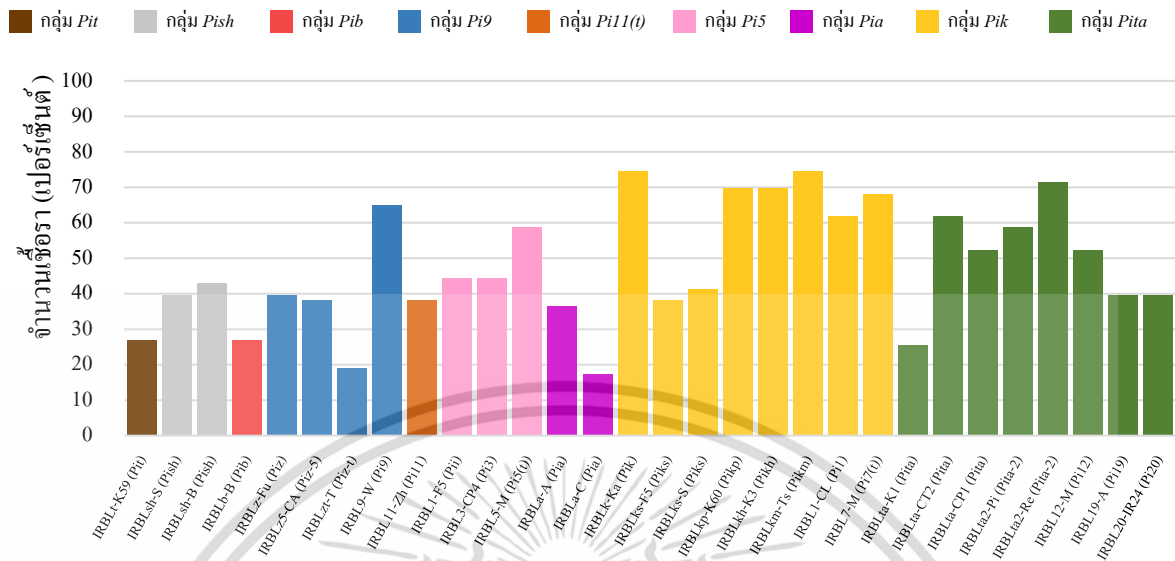
ภาพที่ 14 จำนวนเข็วราที่แสดงปฏิสัมพันธ์ในรูปแบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรงหรือไม่เกิดโรค) บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวจำนวน 30 สายพันธุ์ ซึ่งมียีนต้านทานเดี่ยวจำนวน 30 ยีน



ภาพที่ 15 จำนวนเข็วราของพื้นที่ภาคกลางที่แสดงปฏิสัมพันธ์ในรูปแบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรงหรือไม่เกิดโรค) บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวจำนวน 30 สายพันธุ์ ซึ่งมียีนต้านทานเดี่ยวจำนวน 30 ยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อราภาคเหนือและเหนือตอนล่างจำนวน 63 ไอโซเลต



สายพันธุ์ข้าวที่มียืนต้านทานเดี่ยว

ภาพที่ 16 จำนวนเชื้อราของพื้นที่ภาคเหนือและภาคเหนือตอนล่างที่แสดงปฏิสัมพันธ์ในรูปแบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) บนข้าวที่มียืนต้านทานเดี่ยวจำนวน 30 สายพันธุ์ ซึ่งมียืนต้านทานเดี่ยวจำนวน 30 ยืน

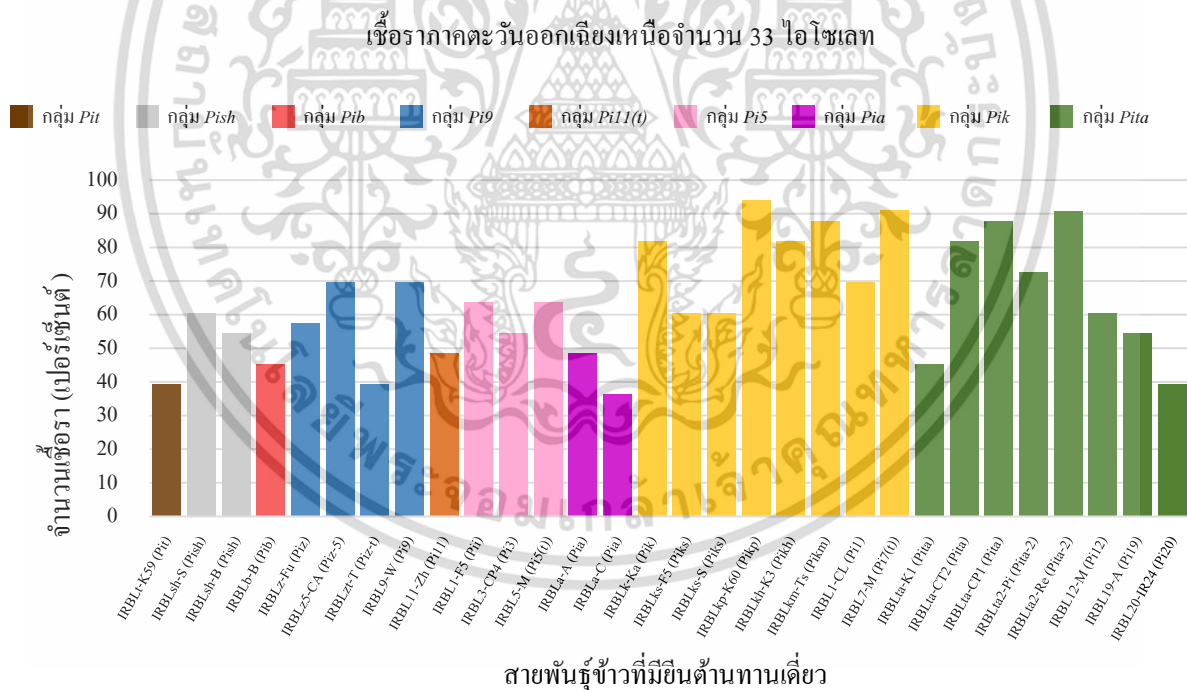
เชื้อราสาเหตุโรคใหม่ที่ระบาดในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 33 ไอโซเลต เชื้อรามากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์มียืนก่อโรคในกลุ่ม AVR-Pik แอลลิล AVR-Pikp และ AVR-Pi7(t) ยืนในกลุ่ม AVR-Pita แอลลิล AVR-Pita-2 (IRBLta2-Re) เชื้อรามากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์มียืนก่อโรคในกลุ่ม AVR-Pik แอลลิล AVR-Pikm AVR-Pikh AVR-Pik (IRBLk-Ka) ยืนก่อโรคในกลุ่ม AVR-Pita แอลลิล AVR-Pita (IRBLta-CP1) และ AVR-Pita (IRBLta-CT2) เชื้อราจำนวนมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์มียืนก่อโรคในกลุ่ม AVR-Pik แอลลิล AVR-Piks (IRBLks-S) AVR-Piks (IRBLks-F5) และ AVR-Pi1 ยืนก่อโรคในกลุ่ม AVR-Pita แอลลิล AVR-Pi12 AVR-Pi19 และ AVR-Pita-2 (IRBLta2-Pi) ยืนก่อโรคในกลุ่ม AVR-Pi9 แอลลิล AVR-Pi9 AVR-Piz และ AVR-Piz-5 ยืนก่อโรค AVR-Pi3 AVR-Pi5(t) AVR-Pii ซึ่งเป็นยืนก่อโรคในกลุ่มเดียวกัน ยืนก่อโรค AVR-Pish ทั้ง 2 แอลลิล (IRBLsh-S และ IRBLsh-B) เชื้อราจำนวนน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์มียืนก่อโรคในกลุ่ม AVR-Pita แอลลิล AVR-Pita (IRBLta-K1) AVR-Pita (IRBLt-K59) และ AVR-Pi20 ยืนก่อโรค AVR-Pia ทั้ง 2 แอลลิล (IRBLa-A และ IRBLa-C) ยืนก่อโรค AVR-Piz-t AVR-Pi11 และ AVR-Pib (ภาพที่ 17)

เชื้อราสาเหตุโรคใหม่ที่ระบาดในพื้นที่ภาคใต้จำนวน 16 ไอโซเลต เชื้อรามากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์มียืนก่อโรคในกลุ่ม AVR-Pik แอลลิล AVR-Pikh และ AVR-Pi7(t) ยืนก่อโรค AVR-Pi19 และ AVR-Piz เชื้อราจำนวนมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์มียืนก่อโรคในกลุ่ม AVR-Pik แอลลิล AVR-Pikp AVR-Pikm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

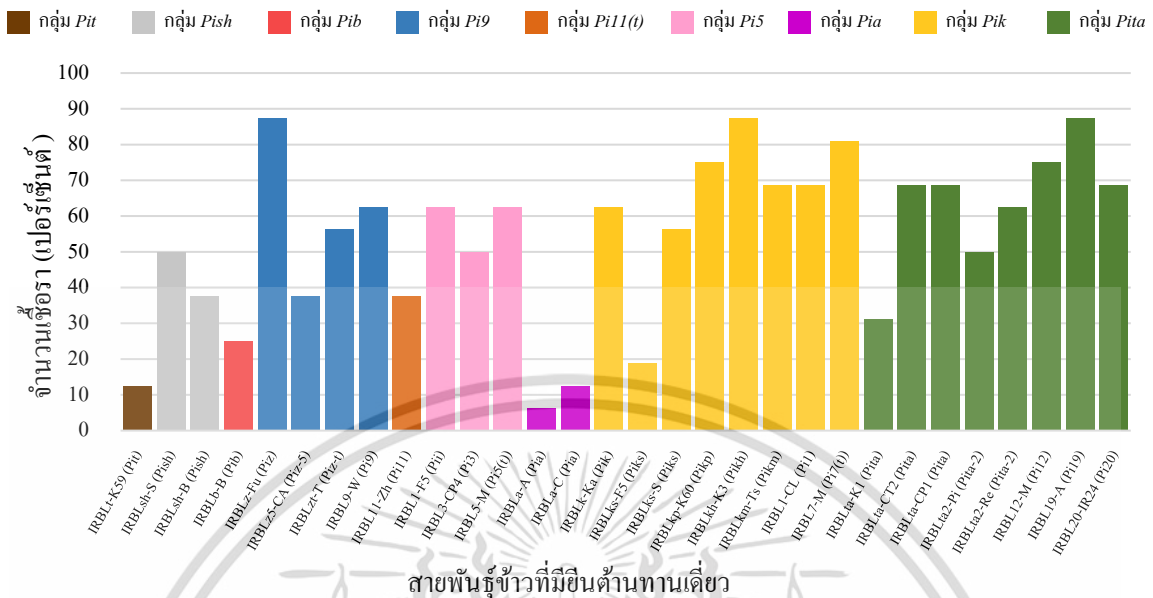
AVR-Pi1 AVR-Pik (IRBLk-Ka) และ *AVR-Piks* (IRBLs-S) ยีนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pita* แอลลีล *AVR-Pi12 AVR-Pita* (IRBLta-CP1) *AVR-Pita* (IRBLta-CT2) *AVR-Pita-2* (IRBLta2-Re) *AVR-Pita-2* (IRBLta2-Pi) และ *AVR-Pi20* ยีนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Piz* แอลลีล *AVR-Pi9* และ *AVR-Piz-t* ยีนก่อโรค *AVR-Pi5(t)* *AVR-Pii* และ *AVR-Pi3* ซึ่งเป็นยีนก่อโรคในกลุ่มเดียวกัน และยีน *AVR-Pish* (IRBLsh-S) เชื้อราจำนวนน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์มียีนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pita* แอลลีล *AVR-Pita* (IRBLt-K59) และ *AVR-Pita* (IRBLta-K1) ยีนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pik* แอลลีล *AVR-Piks* (IRBLks-F5) ยีนก่อโรค *AVR-Pia* ทั้ง 2 แอลลีล (IRBLa-C และ IRBLa-A) ยีนก่อโรค *AVR-Piz-5 AVR-Pish* (IRBLsh-B) *AVR-Pi11* และ *AVR-Pib* (ภาพที่ 18)

นอกจากยีนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pik* ที่พบมากในประชากรเชื้อราทั้ง 4 ภาคของประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคเหนือรวมทั้งเหนือตอนล่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้) ยังมียีนก่อโรคอื่นที่พบได้ในเชื้อราทั้ง 4 ภาค และพบมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของประชากรเชื้อราในแต่ละภาค ได้แก่ ยีนก่อโรค *AVR-Pi5(t)* และยีนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pita* จำนวน 4 แอลลีล ได้แก่ *AVR-Pita* (IRBLta-CT2) *AVR-Pita-2* (IRBLta2-Re) *AVR-Pita-2* (IRBLta2-Pi) และ *AVR-Pi12*



ภาพที่ 17 จำนวนเชื้อราของพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่แสดงปฏิสัมพันธ์ในรูปแบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) บนข้าวที่มียีนต้านทานเดียวจำนวน 30 สายพันธุ์ ซึ่งมียีนต้านทานเดียวจำนวน 30 ยีน

เชื้อราภาคใต้จำนวน 16 ไอโซเลต



ภาพที่ 18 จำนวนเชื้อราของพื้นที่ภาคใต้ที่แสดงปฏิสัมพันธ์ในรูปแบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวจำนวน 30 สายพันธุ์ ซึ่งมียีนต้านทานเดี่ยวจำนวน 30 ยีน

4.4 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนก่อโรค AVR-Pik ในประชากรเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ของประเทศไทย

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AVR-Pik ในเชื้อรา 7 ไอโซเลต ได้แก่ NKI211170 Phitsanulok40.4 RBR55004 SKN10389 THL794 UBN7384 และ UBN207129 ซึ่งคัดเลือกรวมจากงานวิจัยของนวรรตน์ และ นงลักษณ์, 2557 เป็นเชื้อราที่ระบุว่ามียีนก่อโรค AVR-Pik จากการวิเคราะห์ตามทฤษฎี gene-for-gene (Flor, 1971) ระหว่างยีนก่อโรคของเชื้อราและยีนต้านทานในสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวกลุ่ม Pik จากนั้นจัดกลุ่มของเชื้อราที่แยกได้ในงานวิจัยนี้ จากเชื้อราทั้งหมด 118 ไอโซเลต คัดเลือกเชื้อราที่มีผลรูปแบบการก่อโรคของเชื้อราบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวกลุ่ม Pik ครบทั้ง 7 แอลลีล สามารถก่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ Lijiangxintuanhegu (LTH) และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) พบเชื้อราจำนวน 41 ไอโซเลตที่แยกได้ในงานวิจัยนี้ เป็นเชื้อราที่เหมาะสมนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายของยีนก่อโรค AVR-Pik

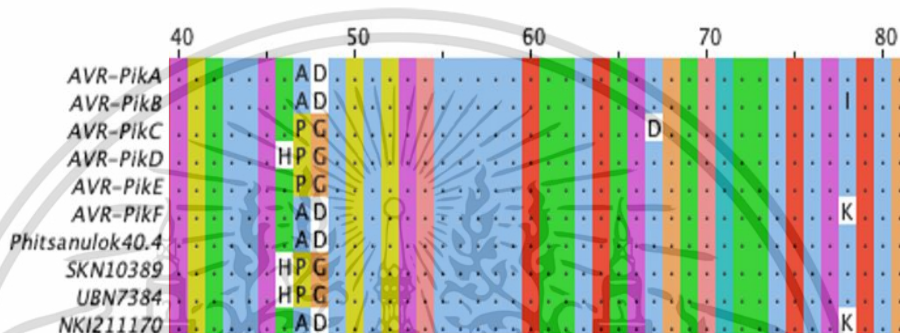
4.4.1 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน AVR-Pik ในเชื้อรา 7 ไอโซเลต

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนก่อโรค AVR-Pik ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ นำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นวิเคราะห์ผลที่ได้โดยแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน และเปรียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นประโยชน์ในการนำไปใช้ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนกับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อราที่มียื่นก่อโรค *AVR-Pik* แอลลีล *A B C D E* และ *F* จากฐานข้อมูล GenBank (ภาพผนวกที่ 3)

จากเชื้อราจำนวน 7 ไอโซเลท พบว่าเชื้อราไอโซเลท Phitsanulok40.4 มีกรดอะมิโนเหมือนยื่นก่อโรค *AVR-PikA* ไอโซเลท SKN10389 และ UBN7384 มีกรดอะมิโนเหมือนยื่นก่อโรค *AVR-PikD* และไอโซเลท NKI211170 มีกรดอะมิโนเหมือนยื่นก่อโรค *AVR-PikF* (ภาพที่ 19) ในขณะที่เชื้อราอีกจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ THL794 RBR55004 และ UBN207129 พบการซ้อนกันของนิวคลีโอไทด์บนโครมาโทแกรมที่แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยื่นก่อโรค *AVR-Pik* (ภาพที่ 20)



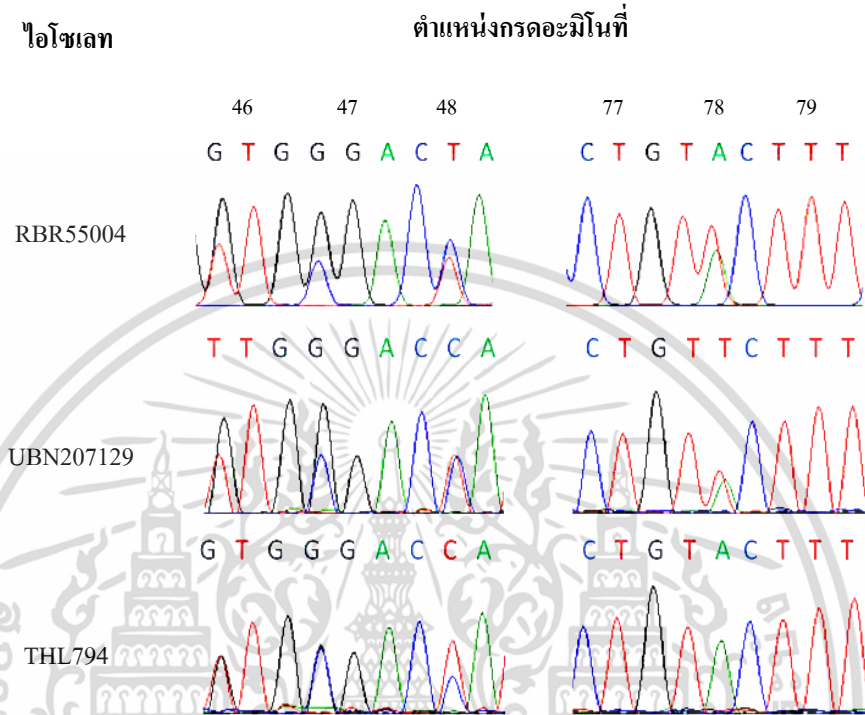
ภาพที่ 19 ลำดับกรดอะมิโนโปรตีน AVR-Pik ของเชื้อราไอโซเลท Phitsanulok40.4 SKN10389 UBN7384 และ NKI211170 เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AVR-PikA B C D E และ F จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Jalview Version 2 (Waterhouse *et al.* 2009) จุดสีดำ หมายถึง มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน

เชื้อราไอโซเลท RBR55004 และ UBN207129 พบว่านิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1 ที่ถอดรหัสให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 46 มีการซ้อนกันของนิวคลีโอไทด์กวานีน (G, guanine) และ ไทมีน (T, thymine) นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 1 ที่ถอดรหัสให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 47 มีการซ้อนกันของนิวคลีโอไทด์ไซโตซีน (C, cytosine) และกวานีน (G, guanine) นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2 ที่ถอดรหัสให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 48 มีการซ้อนกันของนิวคลีโอไทด์ไซโตซีน (C, cytosine) และไทมีน (T, thymine) และนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2 ที่ถอดรหัสให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 78 มีการซ้อนกันของนิวคลีโอไทด์อะดีนีน (A, adenine) และไทมีน (T, thymine) (ภาพที่ 20)

เชื้อราไอโซเลท THL794 มีนิวคลีโอไทด์ซ้อนกันที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 46 47 และ 48 เหมือนกับเชื้อราไอโซเลท RBR55004 และ UBN207129 แต่ไม่พบการซ้อนกันของนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2 ที่ถอดรหัสให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 78 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อราไอโซเลท THL794 มีกรดอะมิโนที่แตกต่างจากไอโซเลท RBR55004 และ UBN207129 (ภาพที่ 20) อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถระบุแอลลีลของยื่นก่อโรค *AVR-Pik* ในเชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลทได้ หรือ เชื้อราอาจมีแอลลีลของยื่นก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

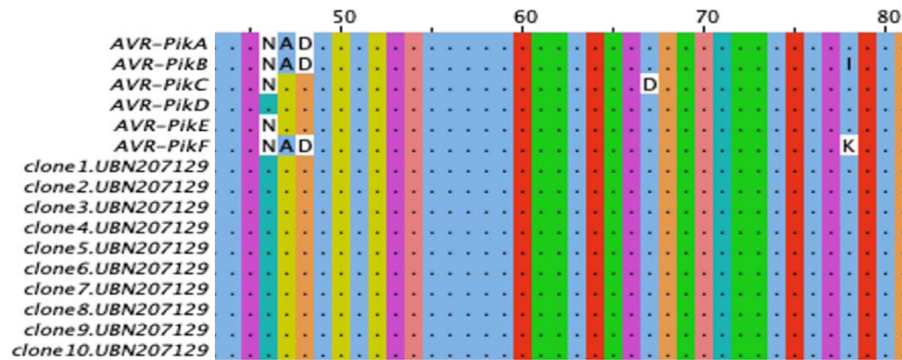
AVR-Pik มากกว่า 1 แอลลีล ดังนั้น จึงทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนก่อโรค จากผลผลิต PCR ของยีนก่อโรค *AVR-Pik* ที่ผ่านการโคลนยีนแล้ว เพื่อให้ได้ผลนิวคลีโอไทด์แยกเป็นแอลลีลเดี่ยว และค้นหาการมีอยู่ของแอลลีลของยีนก่อโรค *AVR-Pik* ที่มีมากกว่า 1 แอลลีลในเชื้อราไอโซเลทเดียวกัน



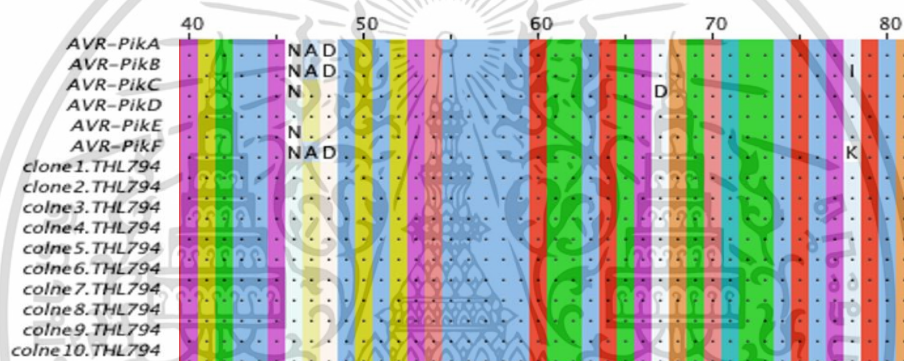
ภาพที่ 20 โครมาโทแกรม (chromatogram) แสดงการซ้อนกันของนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโนที่ 46 47 48 และ 78 ของเชื้อราไอโซเลท RBR55004 UBN207129 และ THL794

4.4.2 โคลนยีน และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนก่อโรค *AVR-Pik* ในเชื้อราที่ยังไม่สามารถระบุแอลลีลได้ หรือ อาจมีมากกว่า 1 แอลลีล

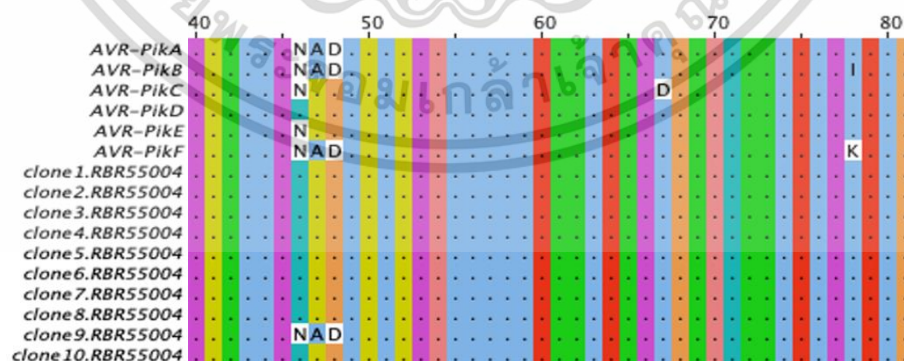
โคลนยีนก่อโรค *AVR-Pik* ในเชื้อราไอโซเลท RBR55004 UBN207129 และ THL794 คัดเลือกโคลนจำนวน 10 โคลนต่อเชื้อรา 1 ไอโซเลท นำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แผลผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ให้เป็นลำดับกรดอะมิโน และเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AVR-PikA B C D E และ F จากฐานข้อมูล GenBank (ภาพผนวกที่ 3) พบไอโซเลท UBN207129 และ THL794 มีกรดอะมิโนของโปรตีน AVR-Pik ทั้ง 10 โคลนนี้เหมือนโปรตีน AVR-PikD ซึ่งคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 22 และ 23) ในขณะที่ไอโซเลท RBR55004 มีกรดอะมิโนของโปรตีน AVR-Pik เหมือนโปรตีน AVR-PikD จำนวน 9 โคลนนี้ คิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนโปรตีน AVR-PikA จำนวน 1 โคลนนี้ คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 ลำดับกรดอะมิโนโปรตีน AVR-Pik ของเชื้อราไอโซเลท RBR55004 จำนวน 10 โคลน เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AVR-PikA B C D E และ F จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Jalview Version 2 (Waterhouse *et al.* 2009) จุดสีดำ หมายถึง มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน



ภาพที่ 22 ลำดับกรดอะมิโนโปรตีน AVR-Pik ของเชื้อราไอโซเลท UBN207129 จำนวน 10 โคลน เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AVR-PikA B C D E และ F จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Jalview Version 2 (Waterhouse *et al.* 2009) จุดสีดำ หมายถึง มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน











ภาพที่ 23 ลำดับกรดอะมิโนโปรตีน AVR-Pik ของเชื้อราไอโซเลท THL794 จำนวน 10 โคลน เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AVR-PikA B C D E และ F จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Jalview Version 2 (Waterhouse *et al.* 2009) จุดสีดำ หมายถึง มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.3 ตรวจสอบรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคของเชื้อราจำนวน 7 ไอโซเลทบนข้าวที่มียืนด้านทานเดี่ยวกลุ่ม *Pik* จำนวน 7 สายพันธุ์

ตรวจสอบรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรค (pathotype) ของเชื้อราจำนวน 7 ไอโซเลทบนข้าวที่มียืนด้านทานเดี่ยวจำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ IRBLks-F5 IRBLks-S IRBLkp-K60 IRBLkh-K3 IRBL1-CL IRBL7-M และ IRBLKM-Ts ที่มียืนด้านทาน *Piks Piks Pikip Pikh Pi1 Pi7(t)* และ *Pikm* ตามลำดับ และข้าวพันธุ์ Lijiangxintuanhegu (LTH) ซึ่งเป็นฐานพันธุกรรมของข้าวที่มียืนด้านทานเดี่ยวทั้ง 7 สายพันธุ์

ไอโซเลท Phitsanulok40.4 มียืนก่อโรค *AVR-Pika* ก่อโรคระดับคะแนน 6 บนข้าวสายพันธุ์ IRBLks-F5 IRBLks-S IRBLkp-K60 และ IRBL7-M ซึ่งหมายถึงเกิดปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction ต่อยืนด้านทาน *Piks Piks Pikip* และ *Pi7(t)* ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อราไม่ก่อโรคบนข้าวสายพันธุ์ IRBLkh-K3 และ IRBL1-CL โดยพบระดับคะแนน 2 และ 0 ตามลำดับ ซึ่งหมายถึงเกิดปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ต่อยืนด้านทาน *Pikh* และ *Pi1* (ตารางที่ 9 และภาพที่ 24) นอกจากนี้พบว่าเชื้อราสามารถก่อโรคระดับคะแนน 3 บนข้าวสายพันธุ์ IRBLKM-Ts ที่มียืนด้านทาน *Pikm*









ชื่อพันธุ์ข้าว	ยืนด้านทาน	ลักษณะอาการโรคไหม้บนใบข้าว
IRBLks-F5 (Fujisaka5)	<i>Piks</i>	
IRBLks-S (Shin2)	<i>Piks</i>	
IRBLkp-K60 (K60)	<i>Pikip</i>	
IRBLkh-K3 (K3)	<i>Pikh</i>	
IRBL1-CL (C101LAC)	<i>Pi1</i>	
IRBL7-M (RIL249 (Moroberekan))	<i>Pi7(t)</i>	
IRBLKM-Ts (Tsuyuake)	<i>Pikm</i>	
LTH		

ภาพที่ 24 อาการโรคไหม้บนใบข้าวหลังปลูกเชื้อ 7 วัน แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยืนก่อโรค *AVR-Pika* ในเชื้อราไอโซเลท Phitsanulok40.4 และยืนด้านทาน *Piks Pikip Pikh Pi1 Pi7(t)* หรือ *Pikm* ในสายพันธุ์ข้าวที่มียืนด้านทานเดี่ยว









ไอโซเลท UBN7384 มียีนก่อโรค *AVR-PikD* ก่อโรคระดับคะแนน 6 บนข้าวสายพันธุ์ IRBLks-F5 และ IRBLks-S ซึ่งหมายถึงเกิดปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction ต่อยีนต้านทาน *Piks* ทั้ง 2 แอลลีล เชื้อราไม่ก่อโรค (ระดับคะแนน 0) บนข้าวสายพันธุ์ IRBLkp-K60 IRBLkh-K3 IRBL1-CL IRBL7-M และ IRBLKM-Ts ซึ่งหมายถึงเกิดปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ต่อยีนต้านทาน *Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)* และ *Pikm* (ตารางที่ 9 และภาพที่ 25)

ไอโซเลท SKN10389 มียีนก่อโรค *AVR-Pik-D* ก่อโรคระดับคะแนน 6 บนข้าวสายพันธุ์ IRBLks-F5 ซึ่งหมายถึงเกิดปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction ต่อยีนต้านทาน *Piks* เชื้อราไม่ก่อโรค (ระดับคะแนน 0) บนข้าวสายพันธุ์ IRBLkp-K60 IRBLkh-K3 IRBL1-CL IRBL7-M และ IRBLKM-Ts ซึ่งหมายถึงเกิดปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ต่อยีนต้านทาน *Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)* และ *Pikm* (ตารางที่ 9 และภาพที่ 26) นอกจากนี้พบว่าเชื้อราสามารถก่อโรคระดับคะแนน 3 บนข้าวสายพันธุ์ IRBLks-S ที่มียีนต้านทาน *Piks*




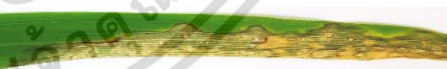




ไอโซเลท NK1211170 มียีนก่อโรค *AVR-PikF* ก่อโรคระดับคะแนน 6 บนข้าวทั้ง 7 สายพันธุ์ ซึ่งหมายถึงเกิดปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction ต่อยีนต้านทาน *Piks Piks Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)* และ *Pikm* (ตารางที่ 9 และ ภาพที่ 27)

ชื่อพันธุ์ข้าว	ยีนต้านทาน	ลักษณะอาการโรคไหม้บนใบข้าว
IRBLks-F5 (Fujisaka5)	<i>Piks</i>	
IRBLks-S (Shin2)	<i>Piks</i>	
IRBLkp-K60 (K60)	<i>Pikp</i>	
IRBLkh-K3 (K3)	<i>Pikh</i>	
IRBL1-CL (C101LAC)	<i>Pi1</i>	
IRBL7-M (RIL249 (Moroberekan))	<i>Pi7(t)</i>	
IRBLKM-Ts (Tsuyuake)	<i>Pikm</i>	
LTH		

ภาพที่ 25 อาการโรคไหม้บนใบข้าวหลังปลูกเชื้อ 7 วัน แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนก่อโรค *AVR-PikD* ในเชื้อราไอโซเลท UBN7384 และยีนต้านทาน *Piks Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)* หรือ *Pikm* ในสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว

ชื่อพันธุ์ข้าว	ยีนต้านทาน	ลักษณะอาการโรคไหม้บนใบข้าว
IRBLks-F5 (Fujisaka5)	<i>Piks</i>	
IRBLks-S (Shin2)	<i>Piks</i>	
IRBLkp-K60 (K60)	<i>Pikp</i>	
IRBLkh-K3 (K3)	<i>Pikh</i>	
IRBL1-CL (C101LAC)	<i>Pi1</i>	
IRBL7-M (RIL249 (Moroberekan))	<i>Pi7(t)</i>	
IRBLKM-Ts (Tsuyuake)	<i>Pikm</i>	
LTH		









ภาพที่ 26 อาการโรคไหม้บนใบข้าวหลังปลูกเชื้อ 7 วัน แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนก่อโรค *AVR-PikD* ในเชื้อราไอโซเลต SKN10389 และยีนต้านทาน *Piks Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)* หรือ *Pikm* ในสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว

ชื่อพันธุ์ข้าว	ยีนต้านทาน	ลักษณะอาการโรคไหม้บนใบข้าว
IRBLks-F5 (Fujisaka5)	<i>Piks</i>	
IRBLks-S (Shin2)	<i>Piks</i>	
IRBLkp-K60 (K60)	<i>Pikp</i>	
IRBLkh-K3 (K3)	<i>Pikh</i>	
IRBL1-CL (C101LAC)	<i>Pi1</i>	
IRBL7-M (RIL249 (Moroberekan))	<i>Pi7(t)</i>	
IRBLKM-Ts (Tsuyuake)	<i>Pikm</i>	
LTH		

ภาพที่ 27 อาการโรคไหม้บนใบข้าวหลังปลูกเชื้อ 7 วัน แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนก่อโรค *AVR-PikF* ในเชื้อราไอโซเลต NKI211170 และยีนต้านทาน *Piks Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)* หรือ *Pikm* ในสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว









เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อราไอโซเลท THL794 มียีนก่อโรค *AVR-Pik* มากกว่า 1 แอลลีล ก่อโรคระดับคะแนน 6 บนข้าวสายพันธุ์ IRBLks-F5 และ IRBLks-S ซึ่งหมายถึงเกิดปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction ต่อ ยีนต้านทาน *Piks* ทั้ง 2 แอลลีล เชื้อราไม่ก่อโรค (ระดับคะแนน 0) บนข้าวสายพันธุ์ IRBLkp-K60 IRBLkh-K3 IRBL1-CL IRBL7-M และ IRBLKM-Ts ซึ่งหมายถึงเกิดปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ต่อยีนต้านทาน *Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)* และ *Pikm* (ตารางที่ 9 และภาพที่ 28)









ชื่อพันธุ์ข้าว	ยีนต้านทาน	ลักษณะอาการโรคไหม้บนใบข้าว
IRBLks-F5 (Fujisaka5)	<i>Piks</i>	
IRBLks-S (Shin2)	<i>Piks</i>	
IRBLkp-K60 (K60)	<i>Pikp</i>	
IRBLkh-K3 (K3)	<i>Pikh</i>	
IRBL1-CL (C101LAC)	<i>Pi1</i>	
IRBL7-M (RIL249 (Moroberekan))	<i>Pi7(t)</i>	
IRBLKM-Ts (Tsuyuake)	<i>Pikm</i>	
LTH		

ภาพที่ 28 อาการโรคไหม้บนใบข้าวหลังปลูกเชื้อ 7 วัน แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนก่อโรค *AVR-Pik* มากกว่า 1 แอลลีลในเชื้อราไอโซเลท THL794 และยีนต้านทาน *Piks Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)* หรือ *Pikm* ในสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดียว

ไอโซเลท UBN207129 และ RBR55004 ที่มียีนก่อโรค *AVR-Pik* มากกว่า 1 แอลลีล เชื้อราไม่ก่อโรค (ระดับคะแนน 0) และก่อโรคไม่รุนแรง (ระดับคะแนน 1 – 2) บนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวกลุ่ม *Pik* ทุกสายพันธุ์ ซึ่งหมายถึงเกิดปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ต่อยีนต้านทาน *Piks Piks Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)* และ *Pikm* (ตารางที่ 9 และภาพที่ 29 30)

ชื่อพันธุ์ข้าว	ยีนต้านทาน	ลักษณะอาการโรคไหม้บนใบข้าว
IRBLks-F5 (Fujisaka5)	<i>Piks</i>	
IRBLks-S (Shin2)	<i>Piks</i>	
IRBLkp-K60 (K60)	<i>Pikp</i>	
IRBLkh-K3 (K3)	<i>Pikh</i>	
IRBL1-CL (C101LAC)	<i>Pi1</i>	
IRBL7-M (RIL249 (Moroberekan))	<i>Pi7(t)</i>	
IRBLKM-Ts (Tsuyuake)	<i>Pikm</i>	
LTH		

ภาพที่ 29 อาการโรคไหม้บนใบข้าวหลังปลูกเชื้อ 7 วัน แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนก่อโรค *AVR-Pik* มากกว่า 1 แอลลีลในเชื้อราไอโซเลต UBN207129 และยีนต้านทาน *Piks Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)* หรือ *Pikm* ในสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว

ชื่อพันธุ์ข้าว	ยีนต้านทาน	ลักษณะอาการโรคไหม้บนใบข้าว
IRBLks-F5 (Fujisaka5)	<i>Piks</i>	
IRBLks-S (Shin2)	<i>Piks</i>	
IRBLkp-K60 (K60)	<i>Pikp</i>	
IRBLkh-K3 (K3)	<i>Pikh</i>	
IRBL1-CL (C101LAC)	<i>Pi1</i>	
IRBL7-M (RIL249 (Moroberekan))	<i>Pi7(t)</i>	
IRBLKM-Ts (Tsuyuake)	<i>Pikm</i>	
LTH		

ภาพที่ 30 อาการโรคไหม้บนใบข้าวหลังปลูกเชื้อ 7 วัน แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนก่อโรค *AVR-Pik* มากกว่า 1 แอลลีลในเชื้อราไอโซเลต RBR55004 และยีนต้านทาน *Piks Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)* หรือ *Pikm* ในสายพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว

ตารางที่ 9 สรุปรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรค (pathotype) ของเชื้อรา 7 ไอโซเลทที่มียีนก่อโรคแอลลีล *AVR-Pika AVR-PikD* หรือ *AVR-PikF* และเชื้อราที่มียีนก่อโรคมกกว่า 1 แอลลีล

พันธุ์ข้าว (พันธุ์ผู้ให้)	ยีนต้านทาน	ยีนก่อโรค <i>AVR-Pik</i> (แอลลีล)						
		A	D		F	มากกว่า 1 แอลลีล		
		Phitsanulok40.	UBN7384	SKN10389	NKI211170	THL794	UBN207129	RBR55004
IRBLks-F5 (Fujisaka5)	<i>Piks</i>	6	6	6	6	6	1	0
IRBLks-S (Shin2)	<i>Piks</i>	5	5	3	6	5	0	0
IRBLkp-K60 (K60)	<i>Pikp</i>	6	0	0	6	0	0	0
IRBLkh-K3 (K3)	<i>Pikh</i>	2	0	1	6	0	0	0
IRBL1-CL (C101LAC)	<i>Pi1</i>	0	0	0	6	0	0	1
IRBL7-M (Moroberekan)	<i>Pi7(t)</i>	6	0	0	6	0	0	2
IRBLKM-Ts (Tsuyuaque)	<i>Pikm</i>	3	0	0	6	0	0	0
LTH		6	6	6	6	6	5	5

4.4.4 จัดกลุ่มของเชื้อราจำนวน 41 ไอโซเลท ตามรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคบนพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว *Piks Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)* และ *Pikm* ของเชื้อรา 7 ไอโซเลท ที่มียีนก่อโรค *AVR-Pika D F* และมากกว่า 1 แอลลีล

จากผลรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคของเชื้อราทั้งหมด 118 ไอโซเลท (ภาพที่ 8 9 10 11 และ 12) เลือกวิเคราะห์รูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคเฉพาะเชื้อราจำนวน 41 ไอโซเลท ที่สามารถก่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ Lijiangxintuanhegu (LTH) และข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) สามารถจัดกลุ่มเชื้อราตามรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคบนพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว *Piks* 2 แอลลีล *Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)* และ *Pikm* ของเชื้อรา 7 ไอโซเลท ที่มียีนก่อโรค *AVR-Pika D F* และมากกว่า 1 แอลลีล ได้ออกเป็น 16 กลุ่ม ได้แก่ a – p

กลุ่ม a เป็นเชื้อราที่พบรูปแบบการก่อโรคเหมือนกับเชื้อราไอโซเลท UBN7348 (ภาพที่ 25) ซึ่งเป็นเชื้อราที่มียีนก่อโรค *AVR-PikD* กลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อรา 2 ไอโซเลท ได้แก่ BRM60004.1 และ LRI59002 (ตารางที่ 10)

กลุ่ม b เป็นเชื้อราที่พบรูปแบบการก่อโรคเหมือนกับเชื้อราไอโซเลท NKI211107 (ภาพที่ 27) ซึ่งเป็นเชื้อราที่มียีนก่อโรค *AVR-PikF* กลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อรา 4 ไอโซเลท ได้แก่ PNB59003.1 PNB59003.2 PNB59003.3 และ PRE59010.2 (ตารางที่ 10)

กลุ่ม c เป็นเชื้อราที่พบรูปแบบการก่อโรคเหมือนกับเชื้อราไอโซเลท RBR55004 (ภาพที่ 30) ซึ่งเป็นเชื้อราที่มียีนก่อโรค *AVR-PikD/A* กลุ่มนี้ประกอบด้วยเชื้อรา 3 ไอโซเลท ได้แก่ LRI59003.2 SKN60002.2 และ UDN60005 (ตารางที่ 10)

กลุ่ม d พบเพียง 1 ไอโซเลท ได้แก่ PNB59001.1 เป็นเชื้อราที่ก่อโรครุนแรงบนข้าวสายพันธุ์ IRBLks-F5 IRBLks-S IRBLkp-K60 และ IRBL7-M เชื้อราามีปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction ต่อยีนต้านทาน *Piks* ทั้ง 2 แอลลีล และยีนต้านทาน *Pikp* และ *Pi7(t)* ตามลำดับ

กลุ่ม e เชื้อราไอโซเลท PNB59002 เป็นเชื้อราที่ก่อโรครุนแรงบนข้าวสายพันธุ์ IRBLks-F5 IRBLks-S IRBLkp-K60 IRBLkh-K3 IRBL7-M และ IRBLkm-Ts ซึ่งหมายถึงเชื้อราามีปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction ต่อยีนต้านทาน *Piks* ทั้ง 2 แอลลีล และยีนต้านทาน *Pikp* *Pikh* *Pi7(t)* และ *Pikm* ตามลำดับ

กลุ่ม f ไอโซเลท PNB59001.5 เป็นเชื้อราที่ก่อโรครุนแรงบนข้าวสายพันธุ์ IRBLks-F5 IRBLks-S IRBLkp-K60 และ IRBLkm-Ts ซึ่งหมายถึงเชื้อราามีปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction ต่อยีนต้านทาน *Piks* ทั้ง 2 แอลลีล และยีนต้านทาน *Pikp* และ *Pikm* ตามลำดับ

กลุ่ม g ไอโซเลท CRI59001 เป็นเชื้อราที่ก่อโรครุนแรงบนข้าวสายพันธุ์ IRBLks-F5 IRBLks-S IRBLkp-K60 IRBLkh-K3 IRBL1-CL และ IRBL7-M ซึ่งหมายถึงเชื้อราามีปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction ต่อยีนต้านทาน *Piks* ทั้ง 2 แอลลีล และยีนต้านทาน *Pikp* *Pikh* *Pi1* และ *Pi7(t)* ตามลำดับ

กลุ่ม h เป็นเชื้อราที่ก่อโรครุนแรงบนข้าวสายพันธุ์ IRBLks-F5 IRBLks-S และ IRBL7-M ซึ่งหมายถึงเชื้อราามีปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction ต่อยีนต้านทาน *Piks* ทั้ง 2 แอลลีล และยีนต้านทาน *Pi7(t)* ตามลำดับ ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ CRI59004.2 และ MSN60009.1

กลุ่ม i เป็นเชื้อราที่ก่อโรครุนแรงบนข้าวสายพันธุ์ IRBLks-F5 และ IRBLks-S ซึ่งหมายถึงเชื้อราามีปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction ต่อยีนต้านทาน *Piks* ทั้ง 2 แอลลีล ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ PNB59001.4 PRE59006.1 PRE59006.3 PRE59007.1 CRI59002.2 PNB59001.2 และ PRE17013

กลุ่ม j ไอโซเลท PNB59004 เป็นเชื้อราที่ก่อโรครุนแรงบนข้าวสายพันธุ์ IRBLks-F5 และ IRBLp-K60 ซึ่งหมายถึงเชื้อราามีปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction ต่อยีนต้านทาน *Piks* และ *Pikp* ตามลำดับ

กลุ่ม k เป็นเชื้อราที่ก่อโรครุนแรงบนข้าวสายพันธุ์ IRBLks-F5 และ IRBL1-CL ซึ่งหมายถึงเชื้อราามีปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction ต่อยีนต้านทาน *Piks* และ *Pi1* ตามลำดับ ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ SKA60001 และ PNB59001.3

กลุ่ม 1 เป็นเชื้อราที่ก่อโรครุนแรงบนข้าวสายพันธุ์ IRBLks-F5 ซึ่งหมายถึงเชื้อราที่มีปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction ต่ออินด้านทาน *Piks* ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ NBP60003.1 BAG44.2 และ CRI60005.1

กลุ่ม m ไอโซเลท CRI60001.1 เป็นเชื้อราที่ก่อโรครุนแรงบนข้าวสายพันธุ์ IRBLks-S และ IRBL7-M ซึ่งหมายถึงเชื้อราที่มีปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction ต่ออินด้านทาน *Piks* และอินด้านทาน *Pik7(t)* ตามลำดับ

กลุ่ม n เป็นเชื้อราที่ก่อโรครุนแรงบนข้าวสายพันธุ์ IRBLks-S ซึ่งหมายถึงเชื้อราที่มีปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction ต่ออินด้านทาน *Piks* ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ NBP60001 และ NBP60002

กลุ่ม o ไอโซเลท SKN60001.1 เป็นเชื้อราที่ก่อโรครุนแรงบนข้าวสายพันธุ์ IRBLkh-K3 ซึ่งหมายถึงเชื้อราที่มีปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction ต่ออินด้านทาน *Pikh*

กลุ่ม p เป็นเชื้อราที่ก่อโรคไม่รุนแรงบนข้าวที่มีอินด้านทานกลุ่ม *Pik* ทุกสายพันธุ์ ซึ่งหมายถึงเชื้อราที่มีปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ต่ออินด้านทาน *Piks* *Pikp* *Pikh* *Pi1* *Pi7(t)* และ *Pikm* ประกอบด้วยเชื้อราจำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ MSN60006.1 SKA60002 CRI60004.1 CRI60007 MSN60007.1 MSN60012 MSN60015 PRE59002 และ SKN60002.1

เชื้อราที่แยกได้จากรอยแผลเดียวกัน และแสดงรูปแบบการก่อโรค (pathotype) บนพันธุ์ข้าวที่มีอินด้านทานเดี่ยว *Pik* ทั้ง 7 แอลลีลเหมือนกัน ได้แก่ PNB59003.1 PNB59003.2 PNB59003.3 จากกลุ่ม b ไอโซเลท PRE59006.1 และ PRE59006.3 จากกลุ่ม i ไอโซเลท NBP60001 และ NBP60002 จากกลุ่ม n

เชื้อราที่แยกได้จากแผลเดียวกัน พบรูปแบบการก่อโรคบนพันธุ์ข้าวที่มีอินด้านทานเดี่ยว *Pik* ทั้ง 7 แอลลีลต่างกัน ได้แก่ PNB59001.1 PNB59001.2 PNB59001.3 PNB59001.4 และ PNB59001.5

อย่างไรก็ตาม จากเชื้อราจำนวน 41 ไอโซเลทที่ทำการจัดกลุ่ม ตามรูปแบบการก่อโรคบนพันธุ์ข้าวที่มีอินด้านทานเดี่ยว *Pik* ทั้ง 7 แอลลีล พบมีเพียง 9 ไอโซเลท ได้แก่ BRM60004.1 LRI59002 PNB59003.1 PNB59003.2 PNB59003.3 PRE59010.2 LRI59003.2 SKN60002.2 และ UDN60005 แสดงรูปแบบการก่อโรคเหมือนกับเชื้อราไอโซเลท UBN7348 NKI211107 และ RBR55004 ซึ่งเป็นเชื้อราที่ผ่านการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และสามารถระบุแอลลีลของยีนก่อโรค *AVR-Pik* ได้ (ตารางที่ 10)

เชื้อราไอโซเลท BRM60004.1 และ LRI59002 อาจมีอินก่อโรค *AVR-PikD* ไอโซเลท PNB59003.1 PNB59003.2 PNB59003.3 และ PRE59010.2 อาจมีอินก่อโรค *AVR-PikF* ในขณะที่ ไอโซเลท LRI59003.2 SKN60002.2 และ UDN60005 อาจมีอินก่อโรค *AVR-Pik* มากกว่า 1 แอลลีล (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 รูปแบบปฏิกริยาการก่อโรคบนพันธุ์ข้าวที่มียืนต้นทานเดี่ยว *Piks Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)* และ *Pikm* ของเชื้อรา 9 ไอโซเลต

ไอโซเลต	ยืนต้นทานโรคใหม่									Group	Pathotype (candidate <i>AVR-Pik alleles</i>)
	<i>Piks</i> ¹	<i>Piks</i> ²	<i>Pikp</i>	<i>Pikh</i>	<i>Pi1</i>	<i>Pi7(t)</i>	<i>Pikm</i>	<i>LTH</i>	<i>KD</i>		
BRM60004.1	6	6	0	0	0	0	0	6	6	a	<i>AVR-PikD</i>
LRI59002	5	5	0	0	0	0	0	5	6	a	<i>AVR-PikD</i>
PNB59003.1	6	6	6	6	6	6	5	6	5	b	<i>AVR-PikF</i>
PNB59003.2	6	6	6	6	6	6	6	6	6	b	<i>AVR-PikF</i>
PNB59003.3	6	6	6	6	6	6	6	6	5	b	<i>AVR-PikF</i>
PRE59010.2	6	6	6	6	6	6	6	6	5	b	<i>AVR-PikF</i>
LRI59003.2	0	0	0	0	0	1	0	6	5	c	มากกว่า 1 แอลลีล
SKN60002.2	0	0	0	0	0	0	0	6	6	c	มากกว่า 1 แอลลีล
UDN60005	0	0	0	0	0	0	0	6	6	c	มากกว่า 1 แอลลีล

¹ ยืนต้นทาน *Piks* ในข้าวที่มียืนต้นทานเดี่ยว IRBLks-F5

² ยืนต้นทาน *Piks* ในข้าวที่มียืนต้นทานเดี่ยว IRBLks-S

4.5 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ และยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองในข้าว

4.5.1 ผลการคัดเลือกพันธุ์ข้าวและเชื้อราเพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน

จากผลการตรวจสอบรูปแบบปฏิกริยาการก่อโรค สามารถระบุยีนก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ ด้วยปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนก่อโรคในเชื้อราและยืนต้นทานในข้าว (incompatible interaction) จากเชื้อราที่ศึกษาทั้งหมด 118 ไอโซเลต ยีนก่อโรคที่พบมากในเชื้อราทุกภาคของประเทศไทย คือ ยีนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pik* รองลงมา คือ ยีนก่อโรค *AVR-Pi5(t)* และยีนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pita* จำนวน 4 แอลลีล ได้แก่ ยีนก่อโรค *AVR-Pita* ยีนก่อโรค *AVR-Pita-2* ทั้ง 2 แอลลีล และยีนก่อโรค *AVR-Pi12*

เลือกศึกษายีนก่อโรค *AVR-Pi12* เนื่องจากเป็นยีนก่อโรคที่พบในประชากรเชื้อราจากทุกภาคของประเทศไทย และพบยีนก่อโรค *AVR-Pi12* มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราที่ศึกษา นอกจากนี้ในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อราที่มียืน *AVR-Pi12* และยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองในข้าวที่มียืนต้นทานโรคใหม่ *Pi12*

คัดเลือกพันธุ์ข้าวและเชื้อราที่สนใจ ผลการคัดเลือกแสดงเป็นลำดับขั้นดังนี้

1) คัดเลือกเชื้อราที่ก่อโรครุนแรง ซึ่งแสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (ระดับคะแนน 5 หรือ 6) บนข้าวที่มียืนต้นทานเดี่ยวสายพันธุ์ IRBL12-M (มียืนต้นทานโรคใหม่ *Pi12*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) และ Lijiangxintuanhegu (LTH) พบเชื้อราที่มีปฏิสัมพันธ์ดังกล่าวจำนวน 21 ไอโซเลท (ภาพที่ 10 11 และ 12) เลือกไอโซเลท PNB59003.1 เนื่องจากเป็นเชื้อราที่ก่อโรครุนแรงได้บนข้าวที่มีถิ่นกำเนิดอื่น ๆ ทุกสายพันธุ์ รวมทั้งก่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์เจ้าหอมนิล (JHN) และ IR64 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคไหม้

2) คัดเลือกเชื้อราที่ก่อโรคไม่รุนแรง ซึ่งแสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (ระดับคะแนน 1) บนข้าวที่มีถิ่นกำเนิดเดียวสายพันธุ์ IRBL12-M (มีถิ่นกำเนิดโรคไหม้ *Pi12*) แต่ก่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 และ LTH พบเชื้อราที่มีปฏิสัมพันธ์ดังกล่าวจำนวน 3 ไอโซเลท (ภาพที่ 10 11 และ 12) เลือกเชื้อราไอโซเลท MSN60009.1 เนื่องจากเชื้อราสามารถก่อโรครุนแรงบนข้าวที่มีถิ่นกำเนิดเดียวได้จำนวน 13 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นจำนวนที่มากกว่าเชื้อราอีก 2 ไอโซเลท

3) ข้าวที่ใช้ในการทดลองเป็นข้าวที่มีถิ่นกำเนิดเดียวสายพันธุ์ IRBL12-M มีถิ่นกำเนิดโรคไหม้ *Pi12* ใช้เป็นพันธุ์ข้าวทดสอบ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) และ Lijiangxintuanhegu (LTH) ใช้เป็นพันธุ์ข้าวเปรียบเทียบ

4.5.2 ผลศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้

ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ 2 ไอโซเลท บนข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M ที่มีถิ่นกำเนิดเดียว *Pi12* ได้แก่ PNB59003.1 ซึ่งเป็นเชื้อราที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) และ MSN60009.1 ซึ่งเป็นเชื้อราที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ภายหลังปลูกเชื้อเก็บตัวอย่าง ที่เวลา 24 48 และ 96 ชั่วโมง ด้วยวิธี Quantitative realtime RT-PCR

4.5.2.1 การแสดงออกของยีน *MoHrip1*

ยีน *MoHrip1* เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน *MoHrip1* (*M. oryzae* hypersensitive response-inducing protein 1) มีบทบาทเป็น PAMPs ที่กระตุ้นให้เกิดกระบวนการความต้านทานแบบ PTI ในข้าว

ในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) พบการแสดงออกของยีน *MoHrip1* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แต่ไม่พบการแสดงออกของยีนที่เวลา 96 ชั่วโมง หลังปลูกเชื้อไอโซเลท PNB59003.1 และในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) พบการแสดงออกของยีน *MoHrip1* ที่เวลา 24 และ 96 ชั่วโมง แต่ไม่พบการแสดงออกของยีนที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังปลูกเชื้อไอโซเลท MSN60009.1 (ภาพที่ 31)

เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *MoHrip1* ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ พบการแสดงออกของยีนในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) สูงกว่าในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ซึ่งมีค่า relative expression ratio แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) (ภาพที่ 31).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่ให้ใช้โดยไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ ในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) พบระดับการแสดงออกของยีน *MoHrip1* เพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้ามในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ไม่พบการแสดงออกของยีน ซึ่งมีค่า relative expression ratio แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) (ภาพที่ 31)

ที่เวลา 96 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ ไม่พบการแสดงออกของยีน *MoHrip1* ในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) ในทางตรงกันข้ามพบระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น ในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ซึ่งมีค่า relative expression ratio แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม เชื้อราไอโซเลต MSN60009.1 ไม่สามารถบุกกรุกข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M ที่มียีนต้านทานเดี่ยว *Pi12* ได้ (ภาพที่ 31)

4.5.2.2 การแสดงออกของยีน *MoSlp1*

ยีน *MoSlp1* เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน Slp1 (LysM protein 1) จัดเป็น virulence effector ทำหน้าที่แทรกแซงการทำงานของ chitin-elicitor binding protein (CEBiP) ในพืช เพื่อยับยั้งความต้านทานแบบ PTI

ในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) พบการแสดงออกของยีน *MoSlp1* ที่เวลา 24 ชั่วโมง แต่ไม่พบการแสดงออกของยีนที่เวลา 48 และ 96 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อไอโซเลต PNB59003.1 และในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ไม่พบการแสดงออกของยีน *MoSlp1* ที่เวลา 24 48 และ 96 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อไอโซเลต MSN60009.1 (ภาพที่ 31)

4.5.3 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองในข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M ที่มียีนต้านทานเดี่ยว *Pi12*

เปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองในข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M ที่มียีนต้านทานเดี่ยว *Pi12* ภายหลังปลูกเชื้อสาเหตุโรคใหม่ 2 ไอโซเลต ได้แก่ PNB59003.1 และ MSN60009.1 ซึ่งเป็นเชื้อราที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) และ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ตามลำดับ เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 48 และ 96 ชั่วโมง

4.5.3.1 การแสดงออกของยีน *OsPAL*

ยีน *OsPAL* เป็นยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyases (PALs) เป็นเอนไซม์สำหรับการสังเคราะห์ lignin สาร phytoalexin และสาร SA (salicylic acid) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ PALs ยังเกี่ยวข้องกับสารส่งทอดสัญญาณในวิถี SA ซึ่งเป็นวิถีที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้ข้าวสังเคราะห์ฮิซันที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานเชื้อสาเหตุโรค

ในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือ ไม่เกิดโรค) พบการแสดงออกของยีน *OsPAL* ที่เวลา 24 และ 96 ชั่วโมง หลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราไอโซเลท MSN60009.1 แต่ไม่พบการแสดงออกของยีนที่เวลา 48 ชั่วโมง และในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) พบการแสดงออกของยีน *OsPAL* ที่เวลา 96 ชั่วโมง หลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราไอโซเลท PNB59003.1 แต่ไม่พบการแสดงออกของยีนที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 32)

ที่เวลา 96 ชั่วโมงหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา พบการแสดงออกของยีน *OsPAL* ในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราไอโซเลท PNB59003.1 สูงกว่าในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือ ไม่เกิดโรค) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราไอโซเลท MSN60009.1 อย่างไรก็ตามมีค่า relative expression ratio ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) (ภาพที่ 32)

4.5.3.2 การแสดงออกของยีน *OsJAZ2*

ยีน *OsJAZ2* เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน jasmonate-ZIM domain (JAZ2) ยีน *OsJAZ2* มีบทบาทในการยับยั้งกระบวนการถอดรหัสของยีน (transcriptional repressor) ที่เกี่ยวข้องกับการส่งทอดสัญญาณผ่านทางวิถี JA (jasmonic acid) เพื่อให้พืชต้านทานต่อโรค เมื่อโปรตีน JAZ ถูกย่อยสลายด้วย 26S proteasome โปรตีน MYC2 จะเป็นอิสระและไปกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งทอดสัญญาณผ่านทางวิถี JA เพื่อให้พืชต้านทานต่อโรค รวมทั้งยีน *JAZ* ที่ถอดรหัสให้โปรตีน JAZ ด้วย จากผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *OsJAZ2* แสดงให้เห็นว่าโปรตีน JAZ2 มีบทบาทสำคัญทั้งในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) และ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือ ไม่เกิดโรค) (ภาพที่ 32)

พบการแสดงออกของยีน *OsJAZ2* ที่เวลา 24 48 และ 96 ชั่วโมงหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราไอโซเลท PNB59003.1 และ MSN60009.1 ซึ่งแสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction และ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือ ไม่เกิดโรค) ตามลำดับ บนข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M ที่มียีนต้านทานเดี่ยว *Pi12* (ภาพที่ 32)

เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *OsJAZ2* ที่ 24 ชั่วโมงหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา พบการแสดงออกของยีนในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือ ไม่เกิดโรค) สูงกว่าในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) ซึ่งมีค่า relative expression ratio ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) (ภาพที่ 32)

ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา พบระดับการแสดงออกของยีน *OsJAZ2* ในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ลดลง ในทางตรงกันข้ามในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) พบระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีน *OsJAZ2* ในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) สูงกว่าในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) ซึ่งมีค่า relative expression ratio ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) (ภาพที่ 32)

ที่เวลา 96 ชั่วโมงหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา พบการแสดงออกของยีน *OsJAZ2* ในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) และ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) มีค่า relative expression ratio ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) (ภาพที่ 32)

4.5.3.3 การแสดงออกของยีน *OsPR5*

ยีน *OsPR5* เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนในกลุ่ม pathogenesis-related-5 (PR-5) คือ โปรตีน thaumatin-like ซึ่งเป็นโปรตีนที่พืชสร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค จากผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *OsPR5* แสดงให้เห็นว่าโปรตีน thaumatin-like ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นทั้งในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) และ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) โดยพบการแสดงออกของยีน *OsPR5* ที่เวลา 24 48 และ 96 ชั่วโมงหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราไอโซเลท PNB59003.1 และ MSN60009.1 ซึ่งแสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) และ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ตามลำดับ (ภาพที่ 33)

เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา พบการแสดงออกของยีน *OsPR5* ในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) และ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) มีค่า relative expression ratio ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) (ภาพที่ 33)

ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา พบการแสดงออกของยีน *OsPR5* ในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) สูงกว่าในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) ซึ่งมีค่า relative expression ratio ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) ในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) พบมีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 33)

ที่เวลา 96 ชั่วโมงหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา พบการแสดงออกของยีน *OsPR5* ในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) สูงกว่าในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) อย่างไรก็ตามมีค่า relative expression ratio ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) ในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) มีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้ามในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) มีระดับการแสดงออกของยีนลดลง (ภาพที่ 33)

4.5.3.4 การแสดงออกของยีน *OsPR10*

ยีน *OsPR10* เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนในกลุ่ม pathogenesis-related-10 (PR-10) คือ โปรตีน ribonuclease-like ซึ่งเป็นโปรตีนที่พืชสร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค จากผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *OsPR10* แสดงให้เห็นว่า โปรตีน ribonuclease-like ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นทั้งในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) และ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) โดยพบการแสดงออกของยีน *OsPR10* ที่เวลา 24 48 และ 96 ชั่วโมง หลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราไอโซเลท PNB59003.1 และ MSN60009.1 ซึ่งแสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) และ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ตามลำดับ (ภาพที่ 33)

เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *OsPR10* ที่เวลา 24 48 และ 96 ชั่วโมง หลังปลูกเชื้อ พบระดับการแสดงออกของยีน *OsPR10* มีค่า relative expression ratio ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) หลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราไอโซเลท MSN60009.1 พบระดับการแสดงออกของยีนสูงกว่าในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) หลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราไอโซเลท PNB59003.1 ในทางตรงกันข้ามที่เวลา 96 ชั่วโมงหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา ในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) พบระดับการแสดงออกของยีนต่ำกว่าในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) (ภาพที่ 33)

4.5.3.5 การแสดงออกของยีน *OsWRKY30*

ยีน *OsWRKY30* เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน WRKY30 มีบทบาทในการควบคุมกลไกการสร้างภูมิคุ้มกันในข้าวเพื่อเพิ่มความต้านทานต่อโรคไหม้ข้าว จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนแสดงให้เห็นว่า โปรตีน WRKY30 มีบทบาทสำคัญในการควบคุมกลไกความต้านทานในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) ตั้งแต่ในช่วงระยะแรกหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา (24 ชั่วโมง) ในขณะที่โปรตีน WRKY30 มีบทบาทสำคัญในการควบคุมกลไกความ

ด้านทานในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา (ภาพที่ 34)

ในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) พบการแสดงออกของยีน *OsWRKY30* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แต่ไม่พบการแสดงออกของยีนที่เวลา 96 ชั่วโมงหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราไอโซเลท PNB59003.1 และในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) พบการแสดงออกของยีน *OsWRKY30* ที่เวลา 48 ชั่วโมง แต่ไม่พบการแสดงออกของยีนที่เวลา 24 และ 96 ชั่วโมงหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราไอโซเลท MSN60009.1 (ภาพที่ 34)

เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *OsWRKY30* ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา พบการแสดงออกของยีนในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) แต่ไม่พบการแสดงออกของยีนในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ซึ่งมีค่า relative expression ratio ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) (ภาพที่ 34)

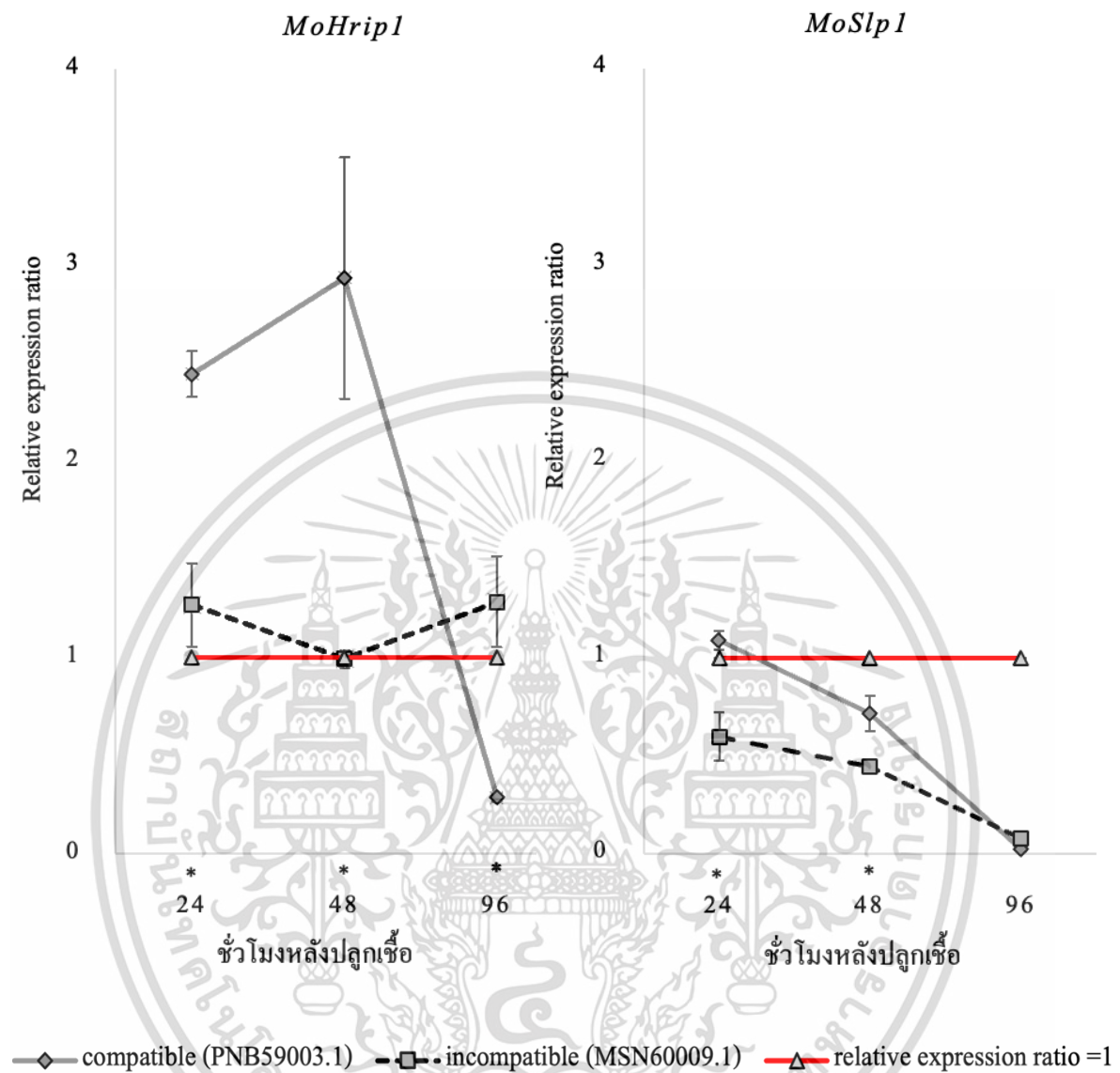
ที่เวลา 48 ชั่วโมง ในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) มีระดับการแสดงออกของยีน *OsWRKY30* เพิ่มขึ้น และมีระดับการแสดงออกของยีนสูงกว่าในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ซึ่งมีค่า relative expression ratio ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) (ภาพที่ 34)

4.5.3.6 การแสดงออกของยีน *OsMAPK6*

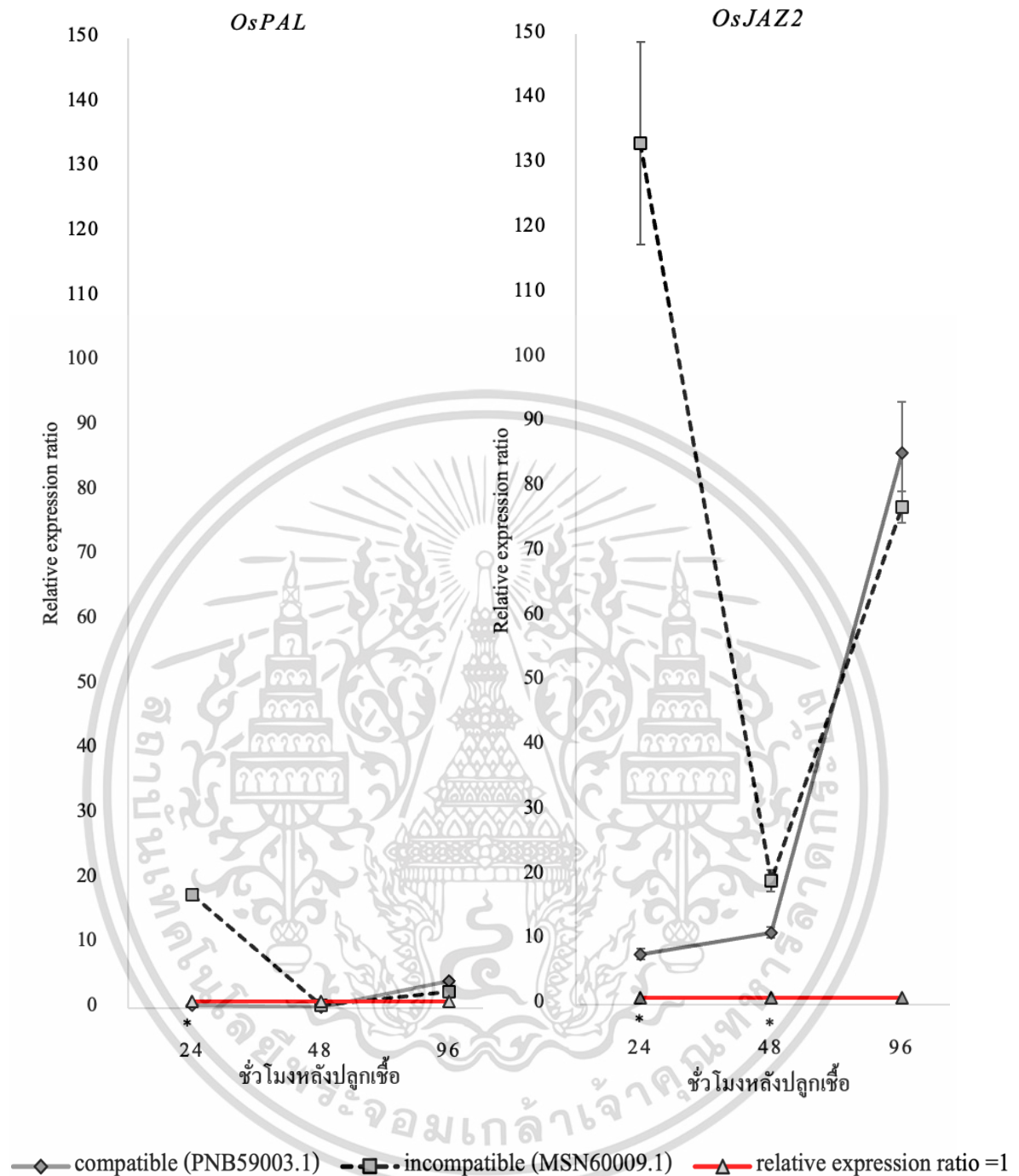
ยีน *OsMAPK6* เป็นยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน MAPKs ทำหน้าที่ส่งทอดสัญญาณในระบบภูมิคุ้มกันพืชทั้งในความต้านทานแบบ PTI และ ETI โดยยีน *OsMAPK6* จะส่งทอดสัญญาณที่ไปกระตุ้นการสังเคราะห์สาร phytoalexin ในกลุ่ม diterpenoid จากการศึกษาพบว่า โปรตีน MAPKs ทำหน้าที่ส่งทอดสัญญาณในระบบภูมิคุ้มกันพืชทั้งในปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) และ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ที่เวลา 96 ชั่วโมงหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา (ภาพที่ 34)

ไม่พบการแสดงออกของยีน *OsMAPK6* ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา ทั้งในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) และ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) หลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา PNB59003.1 และเชื้อรา MSN60009.1 ตามลำดับ แต่พบการแสดงออกของยีนที่เวลา 96 ชั่วโมงหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา โดยพบการแสดงออกของยีนในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) สูงกว่าในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction ซึ่งมีค่า relative expression ratio ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$) (ภาพที่ 34)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

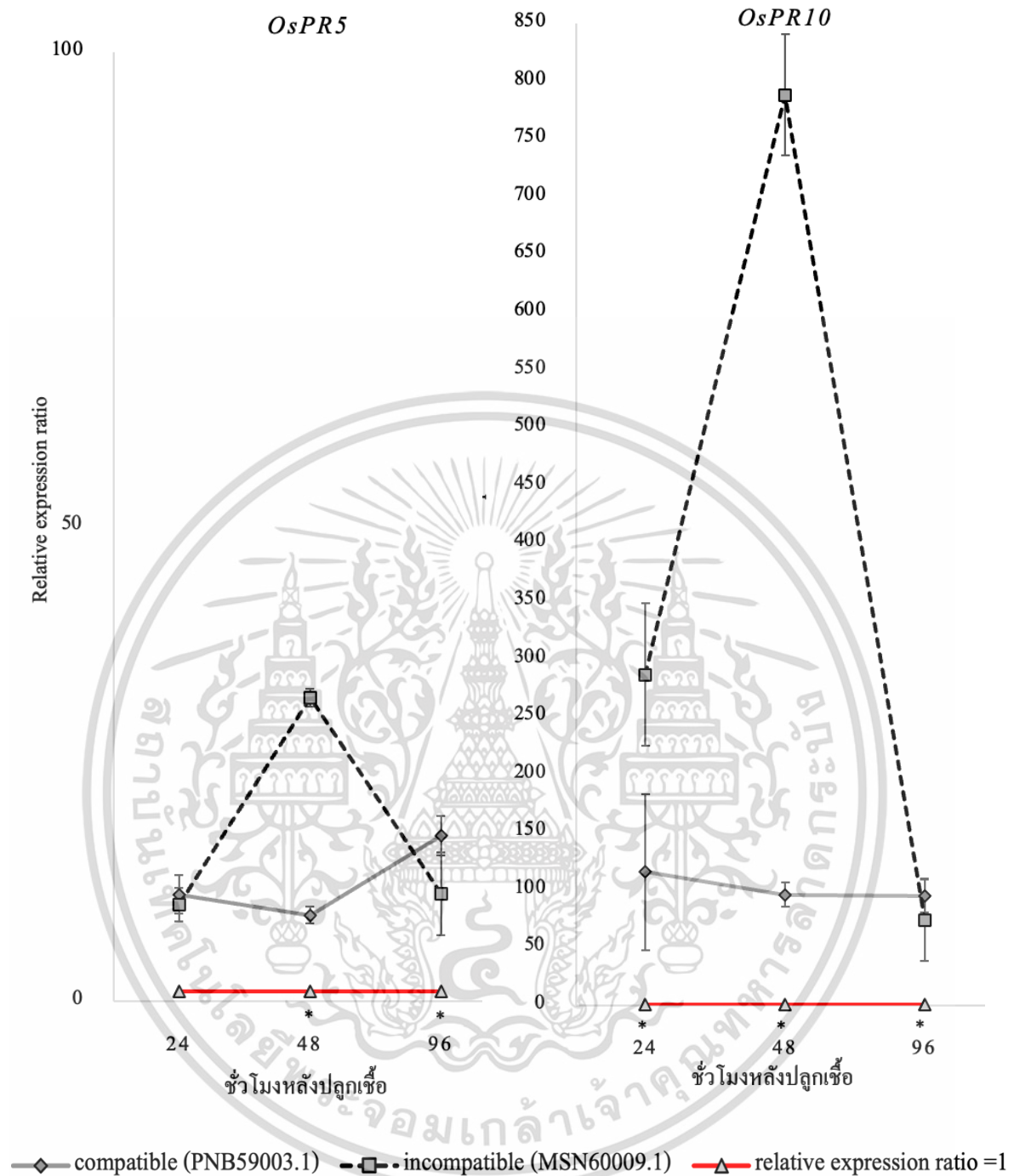


ภาพที่ 31 การแสดงออกของยีน *MoHrip1* และ *MoSlp1* ในข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M (*Pi12*) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลท PNB59003.1 (เกิดโรครุนแรง) แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction และไอโซเลท MSN60009.1 (ไม่เกิดโรค) แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction ที่เวลา 24 48 และ 96 ชั่วโมง ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative realtime RT-PCR ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนสัมพันธ์กับยีน *MGG_40S* เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$)



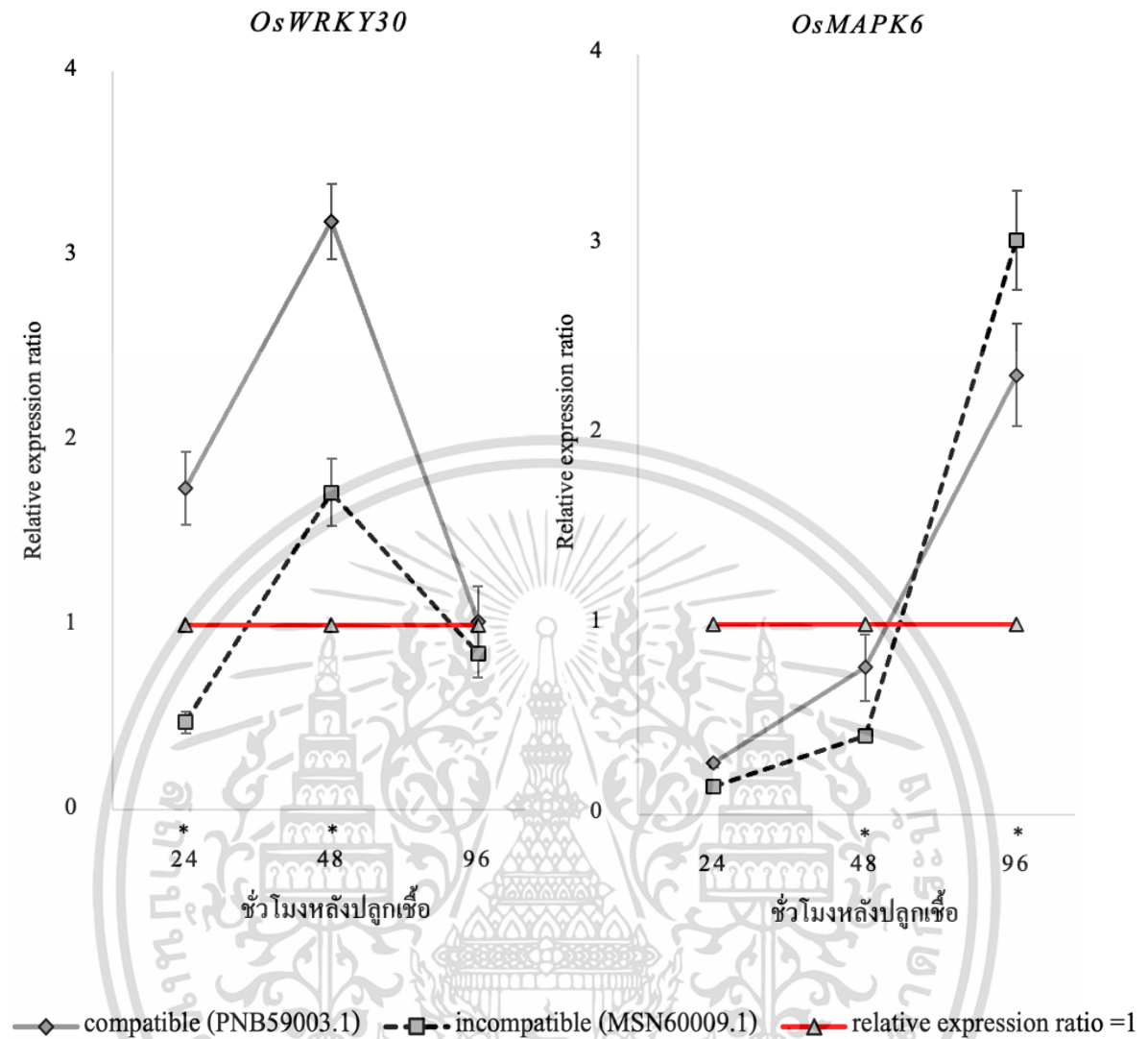
ภาพที่ 32 การแสดงออกของยีน *OsPAL* และ *OsJAZ2* ในข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M (*Pi12*) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลต PNB59003.1 (เกิดโรครุนแรง) แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction และไอโซเลต MSN60009.1 (ไม่เกิดโรค) แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction ที่เวลา 24 48 และ 96 ชั่วโมง ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative realtime RT-PCR ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนสัมพันธ์กับยีน *OsActin1* เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 33 การแสดงออกของยีน *OsPR5* และ *OsPR10* ในข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M (*Pi12*) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลต PNB59003.1 (เกิดโรครุนแรง) แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction และไอโซเลต MSN60009.1 (ไม่เกิดโรค) แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction ที่เวลา 24 48 และ 96 ชั่วโมง ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative realtime RT-PCR ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนสัมพันธ์กับยีน *OsActin1* เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 34 การแสดงออกของยีน *OsWRKY30* และ *OsMAPK6* ในข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M (*Pi12*) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อสาเหตุโรคไหม้ไอโซเลท PNB59003.1 (เกิดโรครุนแรง) แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction และไอโซเลท MSN60009.1 (ไม่เกิดโรค) แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction ที่เวลา 24 48 และ 96 ชั่วโมง ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative realtime RT-PCR ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยการแสดงออกของยีนสัมพันธ์กับยีน *OsActin1* เครื่องหมาย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Turkey HSD, $p < 0.05$)

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 ดำรงและเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคใหม่ข้าวในช่วงปี พ.ศ. 2559 และ 2560

ผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคใหม่ข้าวในประเทศไทยปี พ.ศ. 2559 – 2560 พบการระบาดของโรคใหม่ในพื้นที่ 34 จังหวัด แบ่งออกเป็น พื้นที่ภาคกลาง 6 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี ชัยนาท ราชบุรี ลพบุรี สุพรรณบุรี และอุทัยธานี พื้นที่ภาคเหนือและเหนือตอนล่าง 8 จังหวัด ได้แก่ กำแพงเพชร เชียงราย ตาก พะเยา เพชรบูรณ์ แพร่ แม่ฮ่องสอน และลำปาง พื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 16 จังหวัด ได้แก่ กาฬสินธุ์ ขอนแก่น นครราชสีมา นครพนม หนองคาย หนองบัวลำภู บุรีรัมย์ มหาสารคาม ยโสธร ร้อยเอ็ด ศรีสะเกษ สกลนคร สุรินทร์ อำนาจเจริญ อุรธานี และอุบลราชธานี และพื้นที่ภาคใต้ 4 จังหวัด ได้แก่ กระบี่ นครศรีธรรมราช พัทลุง และสงขลา

รายงานสถานการณ์การระบาดของโรคใหม่ข้าว ในระหว่างปี พ.ศ. 2556 – 2558 โดยกองส่งเสริมการอารักขาพืชและจัดการดินปุ๋ย (2558) พบการระบาดของโรคใหม่ในพื้นที่ 20 จังหวัด แบ่งออกเป็น พื้นที่ภาคเหนือและเหนือตอนล่าง 5 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย พะเยา แพร่ ลำพูน และลำปาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 12 จังหวัด ได้แก่ กาฬสินธุ์ ขอนแก่น ชัยภูมิ นครราชสีมา บุรีรัมย์ มุกดาหาร มหาสารคาม ศรีสะเกษ สกลนคร สุรินทร์ หนองคาย และอุบลราชธานี ภาคใต้ 2 จังหวัด ได้แก่ สงขลา และปัตตานี ภาคตะวันออก 1 จังหวัด ได้แก่ จันทบุรี และไม่พบการระบาดในพื้นที่ภาคกลาง เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลการระบาดในงานวิจัยนี้พบว่า จังหวัดที่ไม่มีรายงานการระบาดในปี พ.ศ. 2556 – 2558 แต่พบการระบาดของโรคในปี พ.ศ. 2559 – 2560 ได้แก่ กำแพงเพชร ตาก นครพนม เพชรบูรณ์ แม่ฮ่องสอน หนองบัวลำภู อำนาจเจริญ และอุรธานี อย่างไรก็ตาม จังหวัดที่พบการระบาดของโรคในปี พ.ศ. 2556 – 2558 แต่ไม่ได้ถูกสำรวจและรายงานไว้ในงานวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ จังหวัด จันทบุรี ชัยภูมิ มุกดาหาร ลำพูน และปัตตานี

ข้อมูลการระบาดของโรคใหม่ในปี พ.ศ. 2562 – 2564 ตามรายงานสถานการณ์ภัยพิบัติด้านการเกษตร ของศูนย์ติดตามและแก้ไขปัญหาภัยพิบัติด้านการเกษตร (2564) รายงานว่า ในปี พ.ศ. 2562 – 2564 พบการระบาดของโรคใหม่ 12 จังหวัด แบ่งตามภูมิภาค ดังนี้ พื้นที่ภาคกลาง 4 จังหวัด ได้แก่ นครปฐม ราชบุรี สุพรรณบุรี และอุทัยธานี ภาคเหนือและเหนือตอนล่าง 7 จังหวัด ได้แก่ เชียงราย ตาก น่าน แพร่ พะเยา ลำพูน และลำปาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 16 จังหวัด ได้แก่ กาฬสินธุ์ ขอนแก่น ชัยภูมิ นครราชสีมา บุรีรัมย์ บึงกาฬ มุกดาหาร มหาสารคาม ยโสธร เลย ศรีสะเกษ สกลนคร สุรินทร์ หนองบัวลำภู อุรธานี และอุบลราชธานี ภาคใต้ 3 จังหวัด ได้แก่ นครศรีธรรมราช ตรัง และสงขลา ภาคตะวันออก 4 จังหวัด ได้แก่ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี และสระแก้ว เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลการระบาดของโรคใหม่ พบว่าจังหวัดที่ไม่มีรายงานการระบาดของโรคใหม่ในงานวิจัยในช่วงปี พ.ศ. 2559 –

2560 แต่พบการระบาดของโรคในปี พ.ศ. 2562 – 2564 ในพื้นที่ภาคกลาง ได้แก่ นครปฐม ภาคเหนือและเหนือตอนล่าง ได้แก่ ลำพูน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ ชัยภูมิ บึงกาฬ และเลย ภาคใต้ คือ ตรัง และภาคตะวันออก ได้แก่ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี และสระแก้ว

จากรายงานการระบาดของโรคไหม้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2556 จนถึงปัจจุบัน จำนวนจังหวัดที่พบการระบาดของโรคไหม้มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะในพื้นที่ภาคกลางที่ไม่พบการระบาดของโรคในปี พ.ศ. 2556 – 2558 แต่พบการระบาดในการสำรวจปี พ.ศ. 2559 – 2560 และ พ.ศ. 2562 – 2564 ซึ่งอาจเกิดจากเชื้อรามีการปรับตัวให้สามารถงอกรุกพันธุ์ข้าวที่ปลูกในพื้นที่ภาคกลางได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวที่ถูกปรับปรุงพันธุ์ให้ต้านทานต่อโรคไหม้ กรมการข้าวรับรองพันธุ์และแนะนำให้ปลูกในพื้นที่ภาคกลาง มีรายงานยืนยันต้านทานโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ได้แก่ *Pia Pib Pigmt) Pita* และ *Pi54* (Poonsin and Parinthawong, 2020) ในงานวิจัยนี้พบการระบาดของโรคไหม้ในข้าวต้านทานโรคไหม้พันธุ์ปทุมธานี 1 ในจังหวัดชัยนาท โดยพบอาการของโรคไหม้บริเวณใบข้าว

พื้นที่ที่พบการระบาดของโรคไหม้มากที่สุด คือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รองลงมาคือภาคเหนือและเหนือตอนล่างของไทย เนื่องจากเป็นแหล่งผลิตข้าวหอมมะลิ (ขาวดอกมะลิ 105 และ กข15) ที่กำหนดให้เป็นข้าวคุณภาพระดับพรีเมียม (premium quality) ซึ่งเป็นที่ต้องการของตลาดโลก แต่ข้าวทั้งสองเป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ ในงานวิจัยนี้พบโรคไหม้ระบาดรุนแรงในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ กข15 ที่ปลูกในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือและเหนือตอนล่าง โดยสามารถพบอาการของโรคไหม้รุนแรงบริเวณใบข้าวและคอรวงข้าว

สถานการณ์การระบาดของโรคไหม้ข้าวควรมีการสำรวจเก็บข้อมูลอย่างต่อเนื่อง เพื่อเฝ้าระวังการระบาดของโรคที่อาจเกิดความรุนแรงทำให้เกิดความเสียหายของผลผลิตมากขึ้น และเพื่อเป็นข้อมูลในการพยากรณ์การเกิดโรคไหม้ได้ในอนาคต รวมทั้งการเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ เพื่อศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา จะทำให้ได้ข้อมูลทางด้านเชื้อราที่ครอบคลุม ซึ่งเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยอื่นๆ ต่อไป

5.2 ตรวจสอบแบบของเพศ (mating type) ของเชื้อรา

ตรวจสอบแบบของเพศของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ทั้งหมด ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อแบบของเพศของเชื้อรา *P. oryzae* จากเชื้อราจำนวน 118 ไอโซเลท พบเชื้อรา จำนวน 114 ไอโซเลท คิดเป็น 96.6 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราที่ศึกษา ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 940 คู่เบส เหมือนเชื้อราทดสอบมาตรฐานสายพันธุ์ GUY11 ที่มีแบบของเพศชนิด Mat1-2 (ภาพที่ 3) และพบเชื้อราเพียง 4 ไอโซเลท คิดเป็น 3.4 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราที่ศึกษา ได้แก่ PRE59006.2 PNB59003.1 PNB59003.3 และ

PNB60001 ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 809 คู่เบส เหมือนเชื้อราทดสอบมาตรฐานสายพันธุ์ 70-15 ที่มีแบบของเพศชนิด Mat1-1

เชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท เป็นเชื้อราจากพื้นที่ปลูกข้าวภาคเหนือและเหนือตอนล่าง ไอโซเลท PRE59006.2 แยกได้จากตัวอย่างใบข้าวพันธุ์ กข6 ปลูกอยู่ในแปลงทดสอบของศูนย์วิจัยข้าวแพร่ ตำบลแม่คำมี อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ ในขณะที่ PNB59003.1 PNB59003.3 และ PNB60001 แยกได้จากตัวอย่างใบข้าวลูกผสมโดยมีข้าวลิ้มฝัวเป็นพันธุ์ให้ (donor) ปลูกอยู่ในแปลงทดสอบตำบลหนองแม่นา อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ การพบเชื้อราที่มีแบบของเพศชนิด Mat1-1 จำนวน 4 ไอโซเลทในงานวิจัยนี้ จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาที่จำเป็นต้องใช้เชื้อราที่มีแบบของเพศ Mat1-1 เช่น งานทดลองที่ต้องการผสมพันธุ์เชื้อรา เพื่อสร้างประชากรลูกผสมของเชื้อรา หรืองานที่ศึกษาการกลายพันธุ์ของสายพันธุ์เชื้อราที่มีแบบของเพศชนิด Mat1-1

เชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างข้าวเมล็ดเดียวกันมีแบบของเพศต่างกัน เช่น เชื้อราไอโซเลท PNB59003.1 (Mat1-1) PNB59003.2 (Mat1-2) และ PNB59003.3 (Mat1-1) เป็นเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างใบข้าวที่ปลูกอยู่ในแปลงทดสอบตำบลหนองแม่นา อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ ไอโซเลท PRE59006.1 (Mat1-2) PRE59006.2 (Mat1-1) และ PRE59006.3 (Mat1-2) เป็นเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างใบข้าวที่ปลูกอยู่ในแปลงทดสอบของศูนย์วิจัยข้าวแพร่ ตำบลแม่คำมี อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ การขยายพันธุ์ของเชื้อราโดยอาศัยเพศอาจเกิดขึ้นได้ในพื้นที่ปลูกข้าวดังกล่าว เนื่องจากในประชากรเชื้อราสาเหตุโรคใหม่สามารถขยายพันธุ์โดยใช้เพศ ซึ่งเชื้อราจะผสมพันธุ์กันเมื่อเชื้อรามีแบบของเพศ (mating type) ที่ตรงข้ามกัน แบบของเพศของเชื้อราถูกควบคุมด้วยตำแหน่งบนโครโมโซม (locus) ที่เรียกว่า MAT1 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ฝังของยีน *Mat1-1* และ *Mat1-2* (Yoder *et al.* 1986) หลังจากผสมพันธุ์กันระหว่างเชื้อรา 2 สายพันธุ์ เชื้อราจะสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า perithecia และภายใน perithecia จะมีส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราที่เรียกว่า ascospore เชื้อราที่สร้าง perithecia คือ สายพันธุ์ female-fertile (male-sterile) สายพันธุ์ตรงข้ามที่มาผสมพันธุ์กัน คือ male-fertile (female-sterile) (Kolmer and Ellingboe. 1988) หากเชื้อราสร้าง perithecia ได้ทั้งคู่จะเรียกว่าเป็นสายพันธุ์ hermaphroditic (male- and female-fertile) (Chao and Ellingboe. 1991) การสร้าง perithecia ของเชื้อราถูกควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับยีนที่ควบคุมแบบของเพศ (mating type) และยีนที่ควบคุมความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา (Kolmer and Ellingboe. 1988) สำหรับประชากรเชื้อราของประเทศไทยมีรายงานพบเชื้อราที่เป็นสายพันธุ์ female-fertile และ hermaphroditic ซึ่งสามารถสร้าง perithecia และมี ascospore อยู่ภายใน ทั้งในเชื้อราที่มีแบบของเพศชนิด Mat1-1 และ Mat1-2 อย่างไรก็ตามเชื้อราส่วนใหญ่เป็นเชื้อราไอโซเลท male-fertile (female-sterile) คือไม่สร้าง perithecia (Mekwatanakam *et al.* 1999) จากรายงานแสดงให้เห็นถึงโอกาสในการขยายพันธุ์แบบใช้เพศของเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ในประเทศไทย และหากเกิดการขยายพันธุ์แบบใช้เพศได้ตามธรรมชาติ จะเป็นผลเสียต่อการควบคุมโรคใหม่ข้าว เนื่องจากในปัจจุบันวิธีที่ดีที่สุดที่จะลดความเสี่ยงหายจากการบูรณาการของเชื้อราสาเหตุโรคเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใหม่ข้าว คือ การเลือกใช้พันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ ความสำเร็จในการป้องกันโรคไหม้ข้าวด้วยการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ ขึ้นอยู่กับการสืบพันธุ์ของเชื้อราสาเหตุ. โรคไหม้ด้วย เนื่องจาก การเกิด recombination จากการผสมพันธุ์ระหว่างเชื้อราจะเพิ่มความน่าจะเป็น ในการสร้างแอลลีลของ ยีนก่อโรคแอลลีลใหม่ ซึ่งอาจเป็นแอลลีลที่มีความสามารถหลีกเลี่ยงการตรวจ จับด้วยยีนต้านทานในข้าว ต้านทานโรคไหม้ ส่งผลให้ข้าวสูญเสียความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ (McDonald and Linde. 2002) ดังนั้นจึงควรเฝ้าระวังการอุบัติใหม่ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในพื้นที่ตำบลแม่คำมี อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ และตำบลหนองแม่นา อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ เนื่องจากพบแบบของเพศของเชื้อรา ทั้ง 2 ชนิด (Mat1-1 และ Ma1-2) อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาภาวะเจริญพันธุ์โดยใช้เพศ (sexual fertility) ของเชื้อรา ซึ่งจะช่วยให้เข้าใจถึงโอกาสในการเกิดการผสมพันธุ์ของ เชื้อราได้ดีมากขึ้น

เมื่อจัดกลุ่มตามรูปแบบการก่อโรคของเชื้อราบนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML 105) ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ และข้าวพันธุ์ LTH ที่เป็นฐานพันธุกรรมของประชากรข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว พบว่าเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลทถูกจัดกลุ่มแยกกัน ไอโซเลท PNB60001 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 1-2 คือ เชื้อรา ก่อโรคไม่รุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 แต่ก่อโรครุนแรงปานกลางบนข้าวพันธุ์ LTH (ภาพที่ 8) ไอโซเลท PRE59006.2 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 1-3 คือ เชื้อราก่อโรคไม่รุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 แต่ก่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ LTH (ภาพที่ 8) ไอโซเลท PNB59003.1 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มย่อยที่ 3-4.8 เชื้อราก่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 พันธุ์ LTH และ JHN แต่ก่อโรคไม่รุนแรงบนข้าวพันธุ์ IR64 (ภาพที่ 12) และไอโซเลท PNB59003.3 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มย่อยที่ 3-4.9 เชื้อราก่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 พันธุ์ LTH พันธุ์ JHN และพันธุ์ IR64 (ภาพที่ 12)

ผลการจัดกลุ่มเชื้อราด้วยข้อมูลรูปแบบการก่อโรคของเชื้อราโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.10p วิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนด้วยวิธี Canberra และจัดกลุ่มความสัมพันธ์จากค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน ด้วยวิธี SAHN ที่ระดับความเหมือน 50 เปอร์เซ็นต์ เชื้อราไอโซเลท PRE59006.2 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม B ไอโซเลท PNB60001 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม C ไอโซเลท PNB59003.1 และ PNB59003.3 ซึ่งแยกได้จากอาการ โรคไหม้ในแผลเดียวกันถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือ กลุ่ม F

จากผลการตรวจสอบรูปแบบการก่อโรคของเชื้อราที่มีแบบของเพศแบบ Mat1-1 บนประชากรข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว 30 สายพันธุ์ เชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลทมีความสามารถในการก่อโรคที่แตกต่างกัน ไอโซเลท PNB59003.1 สามารถก่อโรครุนแรงบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวได้ทุกสายพันธุ์ ไอโซเลท PNB59003.3 สามารถก่อโรครุนแรงบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวได้ 29 สายพันธุ์ และไอโซเลท PRE59006.2 สามารถก่อโรครุนแรงบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวได้เพียง 3 สายพันธุ์ ในขณะที่เชื้อราไอโซเลท PNB60001 ไม่สามารถก่อโรครุนแรงบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวทุกสายพันธุ์ ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราไม่สามารถอธิบายได้ด้วยการระบุแบบของเพศของเชื้อรา (mating type) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า การกลายพันธุ์ของภาวะเจริญพันธุ์โดยใช้เพศ (sexual fertility) ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ ในเชื้อราสายพันธุ์ female fertile อาจส่งผลให้เชื้อรามีความรุนแรงในการก่อโรคเพิ่มมากขึ้น ตามเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานของ Saleh *et al.* (2012) ทำการเหนี่ยวนำเชื้อราสายพันธุ์ female-fertile ที่มีแบบของเพศชนิด Mat1-1 จำนวน 2 ไอโซเลท และแบบของเพศชนิด Mat1-2 จำนวน 2 ไอโซเลท ให้เกิดการกลายพันธุ์โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร rice flour agar แล้วย้ายโคนินเดียลงจานเลี้ยงเชื้อใหม่ทุกสัปดาห์ เมื่อตรวจสอบภาวะเจริญพันธุ์โดยใช้เพศ (sexual fertility) รายงานว่าเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท (female fertile) กลายเป็นหมัน (female sterile) เมื่อย้ายโคนินเดียใส่จานเลี้ยงเชื้อใหม่จำนวน 10 – 19 รอบ โดยไม่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เชื้อราที่กลายเป็นหมัน (female sterile) สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (conidia) ได้ในปริมาณที่เท่ากับเชื้อราสายพันธุ์ female fertile และมากกว่านั้น conidia ของเชื้อราที่กลายเป็นหมัน (female sterile) ยังมีประสิทธิภาพในการบุกรุกเซลล์ข้าวได้ดีกว่าในเชื้อราสายพันธุ์ female fertile ดังนั้นอาจสันนิษฐานได้ว่าเชื้อราไอโซเลท PNB59003.1 และ PNB59003.3 อาจมีภาวะเจริญพันธุ์โดยใช้เพศ (sexual fertility) กลายเป็นหมัน (female-sterile) conidia ของเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลทจึงมีประสิทธิภาพในการบุกรุกเซลล์ข้าวได้ดีกว่าเชื้อราไอโซเลท PNB60001 และ PRE59006.2 อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ไม่ได้ตรวจสอบภาวะเจริญพันธุ์โดยใช้เพศ (sexual fertility) ของเชื้อราจึงยังไม่สามารถสรุปข้อสันนิษฐานนี้ได้

เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทย มีโอกาสพบภาวะการเจริญพันธุ์โดยใช้เพศเป็นหมัน (infertile) หรือที่เรียกว่า female-sterile ได้สูงถึง 67 เปอร์เซ็นต์ ตามรายงานของ Mekwatanakarn *et al.* (1999) ที่ได้ทำการตรวจสอบภาวะเจริญพันธุ์โดยใช้เพศ (sexual fertility) ของเชื้อรา พร้อมทั้งตรวจสอบแบบของเพศ (mating type) ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทย ด้วยการจับคู่เชื้อราจำนวน 341 ไอโซเลทกับเชื้อรามารฐานที่เป็นไอโซเลท hermaphroditic (male- and female-fertile) คือ ไอโซเลท TH12 (Mat1-2) และ TH16 (Mat1-1) เลี้ยงบนอาหารอาหาร rice flour agar ในห้องทดลอง รายงานว่าเมื่อเชื้อราที่มีแบบของเพศ (mating type) ที่ต่างกันผสมพันธุ์กันมีเชื้อราจำนวน 67 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อราที่ตรวจสอบไม่สามารถสร้าง perithecia ได้ จึงไม่สามารถขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศได้ ซึ่งเชื้อราที่มีภาวะการเจริญพันธุ์แบบเป็นหมัน (female sterile) พบได้ทั้งในเชื้อราที่มีแบบของเพศชนิด Mat1-1 และ Mat1-2 ในขณะที่เชื้อราสายพันธุ์ที่สามารถสร้าง perithecia ได้ คือ สายพันธุ์ female fertile เป็นเชื้อราที่แยกได้จากพื้นที่ปลูกข้าวภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย โดยพบเชื้อราที่มีแบบของเพศ Mat1-2 มากกว่า Mat1-1

5.3 ตรวจสอบรูปแบบปฏิกริยาการก่อโรค (pathotype) ของเชื้อราบนประชากรข้าวที่มีถิ่นกำเนิดต่าง (differential rice varieties)

จากการจัดกลุ่มของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ตามรูปแบบการก่อโรค (pathotype) บนข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่อ่อนแอต่อโรคไหม้ และข้าวพันธุ์ LTH ที่เป็นฐานพันธุกรรมของประชากรข้าวที่มีถิ่นกำเนิดเดียว และจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ตามรูปแบบการก่อโรค ด้วยเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc 2.10p โดยการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนด้วยวิธี Canberra จากนั้นจัดกลุ่มจากค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนด้วยวิธี SHAN

ผลการจัดกลุ่มมีความสอดคล้องกันในเชื้อรากลุ่มที่ 1-1 จำนวน 6 ไอโซเลท (ภาพที่ 8) ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม A-5 เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี SHAN ที่ระดับความเหมือน 60 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 13) แสดงให้เห็นว่าเชื้อราในกลุ่ม A-5 เป็นเชื้อราที่ก่อโรคไม่รุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 และ LTH เชื้อรากลุ่มที่ 3-4.5 จำนวน 3 ไอโซเลท และเชื้อรากลุ่มที่ 3-4.9 จำนวน 2 ไอโซเลท (ภาพที่ 12) ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม F-2 เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี SHAN ที่ระดับความเหมือน 60 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 13) เชื้อราในกลุ่ม F-2 เป็นเชื้อราที่ก่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ KDML105 และ LTH และก่อโรครุนแรงบนประชากรข้าวที่มียืนต้นทานเดี่ยวได้หลายสายพันธุ์

อัจฉราพร และ พูนศักดิ์ (2552) ศึกษาความหลากหลายของ pathotype ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทย และยืนต้นทานโรคไหม้ที่เป็นประโยชน์ในภาคเหนือตอนล่าง จัดกลุ่มตามรูปแบบการก่อโรค (pathotype) ของเชื้อราตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 ถึง 2550/51 รวบรวมเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้จำนวน 80 ไอโซเลท ในจำนวนนี้เป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดอาการบนข้าวที่ปลูกในแปลงทดสอบโรคไหม้ข้าว (blast nursery) ณ ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก และแปลงนาเกษตรกรในเขตภาคเหนือตอนล่าง โดยเก็บจากอาการบนข้าวที่มีฐานพันธุกรรมหลากหลายทั้งจากนิเวศนาชลประทาน นาน้ำฝน ข้าวพื้นเมือง และข้าวไร่ แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์โดยวิธี single spore isolation จัดกลุ่มตามรูปแบบการก่อโรค (pathotype) ของเชื้อราด้วยการทดสอบกับชุดข้าวที่มียืนต้นทานเดี่ยว จำนวน 18 สายพันธุ์ จัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ตามรูปแบบการก่อโรค (pathotype) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc 2.10p สามารถจัดกลุ่มเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้ 13 รูปแบบการก่อโรค (pathotypes) โดยมีสัดส่วน isolate : pathotype เป็น 6.2 : 1 แสดงว่ามีความหลากหลายของเชื้อสาเหตุไม่มากนัก

ในงานวิจัยนี้พบว่าให้ผลไม่สอดคล้องกันกับรายงานของอัจฉราพร และ พูนศักดิ์ (2552) ที่กล่าวมาข้างต้น เมื่อวิเคราะห์แยกเฉพาะประชากรเชื้อราภาคเหนือและภาคเหนือตอนล่าง จำนวน 63 ไอโซเลท ที่ระดับความเหมือน 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถจัดกลุ่มเชื้อสาเหตุโรคไหม้ได้ 51 กลุ่ม พบเชื้อราเพียง 14 ไอโซเลทที่สามารถจัดกลุ่มได้และจัดกลุ่มอยู่ใน 4 กลุ่ม ในขณะที่เชื้อราอีกจำนวน 49 ไอโซเลทมีรูปแบบการก่อโรคที่แตกต่างกัน ไม่สามารถจัดกลุ่มรวมกันได้ โดยมีสัดส่วน isolate : group เป็น 1.2 : 1 แสดงให้เห็นว่าประชากรเชื้อสาเหตุโรคไหม้ภาคเหนือและภาคเหนือตอนล่างที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ มีความหลากหลายมากกว่า อย่างไรก็ตามพบว่าความหลากหลายของเชื้อราภาคเหนือและภาคเหนือตอนล่างในงานวิจัยนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ พูนศักดิ์ และคณะ (2554) ที่ศึกษาความหลากหลายในประชากรเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าว เพื่อนำผลมาใช้ในการจัดกลุ่มยืนต้นทานและการพัฒนาข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้ ในปี พ.ศ. 2548 – 2552 พบประชากรเชื้อสาเหตุโรคไหม้ข้าวที่ระบาดในพื้นที่ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีความหลากหลายมาก จำแนกสายพันธุ์เชื้อราได้ทั้งสิ้นจำนวน 552 สายพันธุ์ จากประชากรทั้งสิ้น 2,293 ไอโซเลท ซึ่งในจำนวนนี้เป็นเชื้อราที่แยกได้เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากพื้นที่ภาคเหนือที่มีความหลากหลายของพื้นที่ปลูก โดยมีสัดส่วน isolate : group เป็น 4.2 : 1 ซึ่ง เป็นสัดส่วนที่แสดงให้เห็นว่าเมื่อแยกเชื้อราจากตัวอย่างโรคไหม้ที่มีความหลากหลายของพื้นที่ปลูกมากขึ้น จะพบประชากรเชื้อรามีความหลากหลายมากขึ้น

แสดงให้เห็นว่าความหลากหลายของเชื้อราในการศึกษาแต่ละการทดลองนั้น ขึ้นอยู่กับ ความหลากหลายของพื้นที่สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคไหม้ข้าว ดังนั้นการสำรวจโรคและเฝ้าระวังการ ปรับตัวของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้จำเป็นต้องกระทำครอบคลุมทั่วพื้นที่ปลูกข้าวในทุกภูมิภาคของ ประเทศไทย

Xu *et al.* (2018) ศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา *P. oryzae* ในพื้นที่เทือกเขาอู่หลิง (Wuling) ในประเทศจีน จัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อราจำนวน 108 ไอโซเลทที่เก็บตัวอย่างในปี พ.ศ. 2555 – 2557 โดยการทดสอบบนข้าวที่มียืนต้นทานเดี่ยว 22 สายพันธุ์ จัดกลุ่มจากค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน ด้วยวิธี SHAN ที่ระดับความเหมือน 72 เปอร์เซ็นต์ สามารถจัดกลุ่มเชื้อราได้ 7 กลุ่ม เมื่อวิเคราะห์แยกตาม ปีที่เก็บพบว่า เชื้อราที่เก็บจากปีเดียวกันถูกจัดกลุ่มแยกกัน ผลการจัดกลุ่มชี้ให้เห็นว่า เชื้อราที่เก็บจากปี เดียวกันมีความหลากหลายสูงมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ เชื้อราที่เก็บจากปีเดียวกันมีความหลากหลายมาก ไม่สามารถจัดกลุ่มเดียวกันได้ แสดงให้เห็นว่าปีที่พบการระบาดของเชื้อราไม่มีความสัมพันธ์ กับการจัดกลุ่มความหลากหลายตามวิธี SHAN หรือความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา

5.4 การระบุยีนก่อโรค (avirulence gene) ของประชากรเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทย

ยีนก่อโรค *AVR-Pia* และ *AVR-Pib* พบในเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างโรคไหม้ข้าวจาก ภาคเหนือและภาคเหนือตอนล่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ แต่ไม่พบยีนก่อโรค *AVR-Pia* และ *AVR-Pib* ในประชากรเชื้อราภาคกลาง ข้าวที่มียืนต้นทานเดี่ยวสายพันธุ์ IRBLa-C และ IRBLb-B ที่มียืนต้นทานโรคไหม้ *Pia* และ *Pib* ตามลำดับ ไม่สามารถต้านทานต่อเชื้อราจากภาคกลาง โดยพบว่าเชื้อ ราภาคกลางทุกไอโซเลทสามารถก่อโรครุนแรงบนข้าวทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ได้ ด้วยเหตุนี้จึงอาจเป็นเหตุให้ ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ซึ่งเป็นข้าวพันธุ์รับรองและแนะนำให้ปลูกในพื้นที่ภาคกลาง ไม่สามารถต้านทาน ต่อเชื้อราภาคกลาง เนื่องจากในข้าวมียืนต้นทานโรคไหม้ *Pia* และ *Pib* (Poonsin and Parinthawong, 2020) แสดงให้เห็นว่ายืนต้นทาน *Pia* และ *Pib* ไม่เหมาะสำหรับนำมาใช้เป็นยืนต้นทานโรคไหม้ใน การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้เกษตรกรภาคกลางเลือกใช้

ในทางตรงกันข้ามพันธุ์ข้าวที่จะปลูกในพื้นที่ภาคเหนือ เหนือตอนล่าง ตะวันออกเฉียง เหนือ และภาคใต้ ยังคงจำเป็นต้องมียืนต้นทานโรคไหม้ *Pia* และ *Pib* ถึงแม้จะพบว่าประชากรเชื้อราใน ประเทศไทยมียีนก่อโรค *AVR-Pia* และ *AVR-Pib* เพียง 21 และ 31 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ยีนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pik* มีบทบาทมากที่สุดในการก่อโรคของเชื้อราจากทุกภาคของประเทศไทย ดังนั้นยีนต้านทานที่มีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ของประเทศไทย คือ ยีนต้านทานกลุ่ม *Pik* (ยกเว้นแอลลีล *Piks*) นอกจากนี้ยังมียีนต้านทานอื่น ๆ ที่สำคัญรองลงมา ได้แก่ ยีนต้านทานกลุ่ม *Pita* (แอลลีล *Pita-2 Pita* และ *Pi12(t)*) ยีนต้านทาน *Pi9* และยีนต้านทาน *Pi5(t)* เนื่องจากพบเชื้อราจำนวนไม่น้อยมียีนก่อโรคที่สามารถถูกตรวจจับด้วยยีนต้านทานดังกล่าว

จึงควรมีการเฝ้าระวังเชื้อราที่มียีนก่อโรคกลุ่ม *AVR-Pik* กลุ่ม *AVR-Pita* ยีนก่อโรค *AVR-Pi9* และ *AVR-Pi5(t)* อย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคของเชื้อราในประเทศไทย

ผลการตรวจสอบรูปแบบการก่อโรค และระบุยีนก่อโรคในเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในงานวิจัยนี้ เป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ ทั้งยีนต้านทานที่ควรเลือกใช้และเชื้อราที่ควรเลือกใช้ในการทดสอบความต้านทานโรค

5.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนก่อโรค *AVR-Pik* ในประชากรเชื้อราของประเทศไทย

ยีนก่อโรคในกลุ่ม *AVR-Pik* มีบทบาทในการก่อโรคบนข้าวที่ปลูกในทุกภาคของประเทศไทย ในขณะที่เดียวกันยีนต้านทานโรคไหม้ *Pik* เป็นยีนต้านทานที่มีประสิทธิภาพในการต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทย (Chaipanya *et al.* 2017) ยีนต้านทาน *Pik* ถูกนำมาใช้เป็นฐานพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ แต่เมื่อเวลาผ่านไปไม่นานเชื้อราที่มียีนก่อโรค *AVR-Pik* สามารถก่อโรคบนข้าวที่มียีนต้านทาน *Pik* ได้ เนื่องจากเชื้อรามีการปรับตัวเพื่อให้สามารถหลีกเลี่ยงการถูกตรวจจับด้วยยีนต้านทานในข้าว ซึ่งเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสตรงตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรค หรือ มีการเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซมของเชื้อรา ส่งผลให้เกิดยีนก่อโรคยีนใหม่เพื่อหลีกเลี่ยงการถูกตรวจจับโดยยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าว (Chiapello *et al.* 2015) ดังนั้นการมีอยู่ของยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าว จึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่กดดันให้เชื้อราโรคไหม้มีการปรับตัว (Gallet *et al.* 2015) ในประเทศไทยพบยีนก่อโรค *AVR-Pik* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยพบยีนก่อโรค *AVR-Pik* แอลลีล *AD* และ *F* ซึ่งแอลลีล *F* เป็นแอลลีลใหม่ที่มีรายงานพบเป็นครั้งแรกในประชากรเชื้อราของประเทศไทย รายงานโดย Longya *et al.* (2019) ด้วยเหตุนี้จึงเป็นที่มาของการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนก่อโรค *AVR-Pik* ในประชากรเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่ระบาดในช่วงฤดูปลูกปี พ.ศ. 2559 – 2560

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบเชื้อราไอโซเลท Phitsanulok40.4 มียีนก่อโรคแอลลีล *AVR-PikA* และจากผลการตรวจสอบรูปแบบการก่อโรคบนข้าวสอดคล้องกับ Li *et al.* (2019) ที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานพบว่าพบเชื้อราที่มียีนก่อโรค *AVR-PikA* มีปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction กับยีนต้านทาน *Pikh* (IRBLkh-K3) และมีปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction กับยีนต้านทาน *Piks* (IRBLs-F5) และ *Pikp* (IRBLkp-K60) อย่างไรก็ตาม Li *et al.* (2019) ไม่ได้รายงานรูปแบบการก่อโรคของเชื้อราบนข้าวสายพันธุ์ IRBLks-S IRBL1-CL และ IRBL7-M ที่มียีนต้านทาน *Piks Pi1* และ *Pi7(t)* ตามลำดับ

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราไอโซเลท UBN7384 พบว่ามียีนก่อโรคแอลลิล *AVR-PikD* และจากผลการตรวจสอบรูปแบบการก่อโรคบนข้าวสอคดคล้องกับ Longya *et al.* (2019) ที่รายงานพบว่าพบเชื้อราที่มียีนก่อโรค *AVR-PikD* มีปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction กับยีนต้านทาน *Pikp* (IRBLkp-K60) *Pikh* (IRBLkh-K3) *Pi1* (IRBL1-CL) *Pik7(t)* (IRBL7-M) และ *Pikm* (IRBLKM-Ts) และมีปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction กับยีนต้านทาน *Piks* (IRBLs-F5)

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เชื้อราไอโซเลท NKI211170 มียีนก่อโรคแอลลิล *AVR-PikF* ผลการตรวจสอบรูปแบบการก่อโรคบนข้าวสอคดคล้องกับ Longya *et al.* (2019) ที่รายงานว่าเชื้อราที่มียีนก่อโรค *AVR-PikF* สามารถก่อโรคบนข้าวที่มียีนต้านทาน *Pik* ทุกสายพันธุ์

ผลโครมาโทแกรมของไอโซเลท UBN207129 และ RBR55004 (ภาพที่ 20) พบการซ้อนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถอดรหัสให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 46 47 48 และ 78 กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 46 มีการซ้อนกันของนิวคลีโอไทด์กวานีน (G, guanine) และ ไทมีน (T, thymine) (ภาพผนวกที่ 2) กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 47 มีการซ้อนกันของนิวคลีโอไทด์ไซโตซีน (C, cytosine) และกวานีน (G, guanine) กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 48 มีการซ้อนกันของนิวคลีโอไทด์ไซโตซีน (C, cytosine) และไทมีน (T, thymine) กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 78 มีการซ้อนกันของนิวคลีโอไทด์อะดีนีน (A, adenine) และไทมีน (T, thymine) จากผลโครมาโทแกรมของเชื้อราไอโซเลท UBN207129 และ RBR55004 เมื่อเปรียบเทียบกรดอะมิโนพบว่ามีโอกาสเป็นยีนก่อโรค *AVR-PikD* (46=H 47=P 48=G 67=A 78=M) (ภาพที่ 3) หรือยีนก่อโรค *AVR-PikF* (46=N 47=A 48=D 67=A 78=K) สันนิษฐานได้ว่าเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลทมียีนก่อโรคมมากกว่า 1 แอลลิล ได้แก่ *AVR-PikD* และ *AVR-PikF* (*AVR-PikD/F*) ซึ่งข้อสันนิษฐานนี้สอดคล้องกับ Longya *et al.* (2019) ที่รายงานพบว่าพบเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยจำนวน 28 ไอโซเลทมียีนก่อโรค *AVR-Pik* จำนวน 2 แอลลิล ได้แก่ *AVR-PikD/F*

ผลการพิสูจน์ข้อสันนิษฐานที่ระบุว่าเชื้อราไอโซเลท UBN207129 และ RBR55004 มียีนก่อโรคมมากกว่า 1 แอลลิล คือ *AVR-PikD/F* พบไอโซเลท UBN207129 มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนยีนก่อโรค *AVR-PikD* จำนวน 10 โคลน (ภาพที่ 22) ผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับผลโครมาโทแกรม (ภาพที่ 20) ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเชื้อราที่มีเพียงยีนก่อโรค *AVR-PikD* เท่านั้น เชื้อราไอโซเลท RBR55004 มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนยีนก่อโรค *AVR-PikD* จำนวน 9 โคลน และ *AVR-PikA* จำนวน 1 โคลน (ภาพที่ 21) สรุปได้ว่าเชื้อราที่มียีนก่อโรคมมากกว่า 1 แอลลิล แต่เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 78 พบว่าผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับผลโครมาโทแกรมของเชื้อรา (ภาพที่ 20) ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเชื้อราที่มียีนก่อโรค *AVR-PikD/A* แต่อาจสันนิษฐานได้ว่าไอโซเลท RBR55004 มียีนก่อโรคมมากกว่า 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอลลีล คือ *AVR-PikD A* หรือ *F* (*AVR-PikD*, 46=H 47=P 48=G 67=A 78=M; *AVR-PikA*, 46=N 47=A 48=D 67=A 78=M; *AVR-PikF*, 46=N 47=A 48=D 67=A 78=K)

ผลการพิสูจน์ข้อสันนิษฐานที่ระบุว่าเชื้อราไอโซเลท UBN207129 อาจมียีนก่อโรคมมากกว่า 1 แอลลีล คือ *AVR-PikD/F* พบว่าเชื้อราไม่สามารถก่อโรคบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว *Pik* ทุกแอลลีล (ภาพที่ 29 และ 30) ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานของ Longya *et al.* (2019) ที่รายงานว่ารูปแบบการก่อโรคใหม่ของเชื้อราที่มียีนก่อโรคมมากกว่า 1 แอลลีล คือ *AVR-PikD/F* จะมีรูปแบบการก่อโรคเหมือนกับ *AVR-PikD* คือ เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction กับยีนต้านทาน *Piks* เกิดจากยีนก่อโรค *AVR-PikD/F* สามารถหลีกเลี่ยงการตรวจจับของยีน *Piks* ได้ เชื้อราจึงก่อโรครุนแรงบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยว IRBLks-F5

เชื้อราไอโซเลท UBN207129 มีรูปแบบการก่อโรคเหมือนกับไอโซเลท RBR55004 ดังนั้นสันนิษฐานได้ว่าเชื้อราไอโซเลท UBN207129 อาจมียีนก่อโรคมมากกว่า 2 แอลลีล คือ *AVR-PikD/A/F* เหมือนกับไอโซเลท RBR55004

ข้อสันนิษฐานที่ว่าเชื้อราไอโซเลท UBN207129 และ RBR55004 อาจมียีนก่อโรคมมากกว่า 2 แอลลีล คือ *AVR-PikD/A/F* ยังไม่สามารถพิสูจน์ได้ และไม่สามารถเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นได้ เนื่องจากไม่เคยมีรายงานพบเชื้อราที่มียีนก่อโรค 3 แอลลีล คือ *AVR-PikD/A/F* อย่างไรก็ตามงานวิจัยของ Kusabu *et al.* (2014) รายงานว่าพบเชื้อราที่มียีนก่อโรคมมากกว่า 2 แอลลีลในไอโซเลทเดียวกัน ได้แก่ เชื้อราถูกผสมสายพันธุ์ 327 (F1-327) มียีนก่อโรคแอลลีล *AVR-PikD AVR-PikA* และ *AVR-PikC* (*AVR-PikD/A/C*) เกิดปฏิสัมพันธ์ในรูปแบบ incompatible interaction กับยีนต้านทาน *Pik Pikm Pikp* และ *Pib* และเกิดปฏิสัมพันธ์ในรูปแบบ compatible interaction กับยีนต้านทาน *Piks* ซึ่งจะเห็นว่าเป็นรูปแบบการก่อโรคของเชื้อราที่มียีนก่อโรคมมากกว่า 2 แอลลีลจะแสดงออกเหมือนกับการมียีนก่อโรค *AVR-PikD* เพียงแอลลีลเดียว ยีนต้านทานโรคใหม่ *Pik* ทุกแอลลีล (ยกเว้น *Piks*) สามารถตรวจจับยีนก่อโรค *AVR-PikD* ได้ จากรายงานดังกล่าวสอดคล้องกับ Longya *et al.* (2019) แต่ไม่สอดคล้องกับผลงานวิจัยนี้ ดังนั้นจึงสันนิษฐานได้ว่าเชื้อราทั้ง 2 ไอโซเลทอาจมีแอลลีลต้นกำเนิดของยีนก่อโรค *AVR-Pik* ตามสมมุติฐานเกี่ยวกับวิวัฒนาการที่มีร่วมกันของยีนก่อโรคและยีนต้านทาน Kanzaki *et al.* (2012) ได้รายงานว่าก่อนที่จะมีแอลลีล *AVR-PikD* จะมีแอลลีล *AVR-Pik* ที่สามารถถูกตรวจจับได้ด้วยยีนต้านทาน *Pik* ทุกแอลลีล

ผลโครมาโทแกรมของเชื้อราไอโซเลท THL794 (ภาพที่ 23) พบการซ้อนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถอดรหัสให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 46 47 และ 48 แต่ไม่พบนิวคลีโอไทด์ซ้อนกันที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 78 ซึ่งแตกต่างจากไอโซเลท UBN207129 และ RBR55004 ที่กล่าวมาข้างต้น จากผลโครมาโทแกรมของเชื้อราไอโซเลท THL794 เปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของโปรตีนพบว่ามีโอกาสเป็นยีนก่อโรค *AVR-PikD* (46=H 47=P 48=G 67=A 78=M) (ภาพที่ 3) และยีนก่อโรค *AVR-PikA* (46=N 47=A 48=D 67=A 78=M) สันนิษฐานได้ว่าเชื้อราไอโซเลท THL794 มียีนก่อโรคมมากกว่า 1 แอลลีล ได้แก่ *AVR-PikD/A* ซึ่งข้อสันนิษฐานนี้สอดคล้องกับ Yoshida *et al.* (2009) ที่รายงานว่าเชื้อราที่มียีนก่อโรคเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรค *AVR-PikD/A* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนแปลงไป 3 ตำแหน่ง ได้แก่ กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 46 47 และ 48

ผลการพิสูจน์ข้อสันนิษฐานที่ว่าเชื้อราไอโซเลท THL794 มียีนก่อโรคมมากกว่า 1 แอลลีล คือ *AVR-PikD/A* พบทั้ง 10 โคลนเป็นยีนก่อโรค *AVR-PikD* ทั้งหมด ซึ่งผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับผลโครมาโทแกรมและรายงานของ Yoshida *et al.* (2009) ที่กล่าวมาข้างต้น ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเชื้อรามีเพียงยีนก่อโรค *AVR-PikD* แอลลีลเดียวเท่านั้น

ผลการพิสูจน์ข้อสันนิษฐานที่ว่าเชื้อราไอโซเลท THL794 มียีนก่อโรคมมากกว่า 1 แอลลีล คือ *AVR-PikD/A* ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษารูปแบบการก่อโรคของเชื้อราบนข้าวพบว่าเชื้อราไอโซเลท THL794 ก่อโรคบนข้าวสายพันธุ์ IRBLks-F5 และ IRBLks-S ยีนก่อโรคในเชื้อราไอโซเลท THL794 มีปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction ต่อยีนต้านทาน *Piks* ทั้ง 2 แอลลีล แสดงว่าเชื้อราสามารถหลีกเลี่ยงการตรวจจับของยีน *Piks* ทั้ง 2 แอลลีลได้ ในขณะที่เชื้อราไอโซเลท THL794 ไม่ก่อโรคบนข้าวสายพันธุ์ IRBLkp-K60 IRBLkh-K3 IRBL1-CL IRBL7-M และ IRBLKM-Ts ที่มียีนต้านทาน *Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)* และ *Pikm* ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kusabu *et al.* (2014) ที่รายงานว่าเชื้อราที่มียีนก่อโรค *AVR-PikD/A* เกิดปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) กับยีนต้านทาน *Pikm* (Tusyuake) และ *Pikp* (K60) และเกิดปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction กับยีนต้านทาน *Piks* (Shin2) ดังนั้นข้อสันนิษฐานที่ว่าเชื้อราไอโซเลท THL794 มียีนก่อโรคมมากกว่า 1 แอลลีล คือ *AVR-PikD/A* อาจเป็นจริง

ในงานวิจัยนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเชื้อราไอโซเลท THL794 มียีนก่อโรคมมากกว่า 1 แอลลีล คือ *AVR-PikD/A* ไอโซเลท UBN207129 และ RBR55004 มียีนก่อโรคมมากกว่า 2 แอลลีล คือ *AVR-PikD/A/F* ถึงแม้จะมีผลรูปแบบการก่อโรคช่วยยืนยัน จึงควรตรวจสอบการแสดงออกของยีนหลังปลูกเชื้อ หรือวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราทั้งจีโนม (whole-genome sequencing) เพื่อช่วยยืนยันและสรุปข้อสันนิษฐานดังกล่าว

อย่างไรก็ตามมีโอกาสพบยีนก่อโรค *AVR-Pik* มากกว่า 1 หรือ 2 แอลลีลได้ หากเชื้อรามีการรวมตัวของยีนที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมต่างกัน (parasexual recombination) เกิดการจับกลุ่มของยีนเพื่อปรับสภาพของลักษณะทางพันธุกรรมใหม่ (Noguchi, 2011)

5.6 การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อราและยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองในข้าวที่มียีนต้านทาน *Pi12*

ยีนต้านทาน *Pi12* มีตำแหน่งที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 12 อยู่ใกล้กับเครื่องหมาย RG869 มีระยะห่างจากเครื่องหมาย 5.1 เซนติมอร์แกน (centimorgan, cM.) (Zhuang *et al.* 1998) ยีนต้านทานโรคใหม่ *Pi12* ในข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M ได้มาจากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวลูกผสมสายพันธุ์ RIL10 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(recombinant inbred line, RIL) และข้าวพันธุ์ LTH (Lijiangxintuanheigu) ซึ่งข้าวลูกผสมสายพันธุ์ RIL10 ได้มาจากการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวพันธุ์ Moroberekan และ CO39 (Tsunematsu *et al.* 2000) ยีนก่อโรค *AVR-Pi12* มีตำแหน่งที่ตั้งอยู่บริเวณ telomere บนโครโมโซมที่ 6 ของข้าว อยู่ในใกล้กับเครื่องหมาย LSM6-5 (Li *et al.* 2018) ยีนต้านทาน *Pi12* และ ยีนก่อโรค *AVR-Pi12* ยังไม่มีรายงานการโคลนยีน หรือรายงานเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนทั้งสอง งานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคในข้าวที่แตกต่างกัน 2 ไอโซเลท คือ มียีนก่อโรค *AVR-Pi12* (MSN60009.1) และไม่มียีนก่อโรค *AVR-Pi12* (PNB59003.1) และศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองในข้าว IRBL12-M ที่มียีนต้านทานโรคใหม่ *Pi12* ที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) และในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) หลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา

ผลการแสดงออกของยีน *MoHrip1* *PAL* *PR5* และ *PR10* ไม่สอดคล้องกับรายงานของ Nie *et al.* (2019) ที่ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกความต้านทานในข้าวหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ KJ201 ที่มียีน *MoHrip1* และสายพันธุ์ที่ถูกตัดแปลงพันธุกรรมให้ไม่มียีน *MoHrip1* (*Δmohrip1-10*) โดยการแทนที่ยีน *MoHrip1* บนจีโนมของข้าวด้วยยีน *HPT* ตรวจสอบโดยวิธี quantitative RT-PCR (qRT-PCR) ที่เวลา 72 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ รายงานว่าการแสดงออกของยีน *PAL* และ *PR10* ในข้าวหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Δmohrip1-10* สูงกว่าในข้าวหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราสายพันธุ์ KJ201 ที่มียีน *MoHrip1* แสดงออกปกติ ในทางตรงกันข้ามการแสดงออกของยีน *PR5* ในข้าวหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อรา *Δmohrip1-10* ต่ำกว่าในข้าวหลังถูกกระตุ้นด้วยเชื้อราสายพันธุ์ KJ201 ที่มียีน *MoHrip1*

ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ ในปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ไม่พบการแสดงออกของยีน *MoHrip1* แต่มีการแสดงออกของยีน *OsPR5* และ *OsPR10* ผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับรายงานของ Lv *et al.* (2016) ที่ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกความต้านทานในข้าวหลังถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน *MoHrip1* เปรียบเทียบกับข้าวที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น ด้วยวิธี qRT-PCR รายงานว่ามีการแสดงออกของยีน *OsPAL* *OsPR5* และ *OsPR10* ทั้งในตัวอย่างที่ถูกกระตุ้นและไม่ถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน *MoHrip1* แต่มีการแสดงออกของยีนทั้งสามในตัวอย่างที่ไม่ถูกกระตุ้นต่ำกว่าในตัวอย่างที่ถูกกระตุ้น

ผลการแสดงออกของยีน *MoHrip1* *PAL* และ *PR10* สอดคล้องกับรายงานของ Chen *et al.* (2012) ที่ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกความต้านทานในข้าวหลังถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน *MoHrip1* ที่เวลา 0 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง ด้วยวิธี qRT-PCR รายงานว่าหลังกระตุ้นด้วยโปรตีน *MoHrip1* มีการแสดงออกของยีน *OsPAL* เวลา 24 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ และมีการแสดงออกลดลง ที่เวลา 48 72 และ 96 ชั่วโมง นอกจากนี้รายงานว่ามีการแสดงออกของยีน *PR10* ที่เวลา 24 ชั่วโมง และมีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นไปจนถึงเวลา 96 ชั่วโมงหลังถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน *MoHrip1*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีน *MoSlp1* มีความจำเป็นในการก่อโรคของเชื้อราที่ก่อโรครุนแรงบนข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction โดยมีบทบาทในการยับยั้งการสังเคราะห์ยีน *OsPAL* ผลการศึกษาการแสดงผลการออกของยีน *MoSlp1* สอดคล้องกับรายงานของ Mentlak *et al.* (2012) ที่รายงานว่าผลการแสดงออกของยีน *PAL1* ถูกยับยั้งเมื่อถูกกระตุ้นด้วยโปรตีน Slp1 โดยมีระดับการแสดงออกของยีนแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวที่ไม่ถูกกระตุ้น การหลั่งโปรตีน Secreted LysM Protein1 (Slp1) ของเชื้อรา *P. oryzae* จะยับยั้งการแสดงออกของยีน *PAL1* ด้วยการจับกันระหว่างโปรตีน Slp1 และ chitin (oligosaccharides) ของเชื้อราเอง

การแสดงออกของยีน *OsWRKY30* *OsPR10* และ *OsPAL* สอดคล้องกับรายงานของ Peng *et al.* (2012) ที่เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *OsPAL* และ *OsPR10* ในข้าวพันธุ์เปรียบเทียบ (wild type) และข้าวที่ถูกตัดแต่งพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของยีน *OsWRKY30* ตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี qRT-PCR รายงานว่าการแสดงออกของยีน *OsPAL* ในข้าวที่ถูกตัดแต่งพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของยีน *OsWRKY30* ทั้งก่อนและหลังปลูกเชื้อ 48 ชั่วโมงพบระดับการแสดงออกของยีน *OsPAL* ไม่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์เปรียบเทียบ (wild type) แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน *OsPAL* ไม่ได้ถูกควบคุมด้วยยีน *OsWRKY30* ในขณะที่พบการแสดงออกของยีน *OsPR10* ที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อในข้าวที่ถูกตัดแต่งพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของยีน *OsWRKY30* สูงกว่าในข้าวพันธุ์เปรียบเทียบ (wild type) แสดงให้เห็นว่ายีน *OsWRKY30* มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีน *PR10* เพื่อให้ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรค

พบการแสดงออกของยีน *OsMAPK6* ที่เวลา 96 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ ทั้งในปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) และในปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) สันนิษฐานได้ว่าอาจมีการสังเคราะห์สาร diterpenoid phytoalexin โดยผ่านทางโปรตีน MAPK6 ในวิถี MAPK ซึ่งจะสอดคล้องกับรายงานของ Kishi-Kaboshi *et al.* (2012b) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง chitin elicitor และวิถี MAPK ด้วยวิธี immunoprecipitation (IP) kinase assay โดยศึกษาในเซลล์ข้าว 3 แบบ ได้แก่ 1) เซลล์ข้าวที่ถูกทำให้ยีน *MAPK6* กลายพันธุ์ (*osmpk6*) โดยการแทรกชิ้นส่วน retrotransposon Tos17 ที่บริเวณ exon ลำดับที่ 4 ของยีน *MAPK6* จึงไม่สามารถสังเคราะห์ยีน *MAPK6* ได้ 2) เซลล์ข้าว *osmpk6* ที่แทรกชิ้นส่วน cDNA ของยีน *OsMPK6* (*osmpk6/OsMPK6*) เหนือบริเวณลำดับดีเอ็นเอของยีนในบริเวณที่โปรตีนเข้าจับเพื่อเริ่มถอดรหัสอาร์เอ็นเอ (upstream promoter) และ 3) เซลล์ข้าวที่มีการแสดงออกของยีน *MAPK6* เป็นปกติ โดยรายงานว่าหลังจากกระตุ้นด้วย chitin elicitor เซลล์ข้าวที่มีการแสดงออกของยีน *MAPK6* เป็นปกติ ปรากฏแถบโปรตีนขนาด 45 kDa และพบแถบโปรตีนขนาดต่ำกว่าขนาดที่พบในเซลล์ *osmpk6* และ *osmpk6/OsMPK6* เมื่อศึกษาการสังเคราะห์และสะสมสาร momilactone และ phytocassane ด้วยวิธี high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) รายงานว่ามีการสะสมสาร momilactone และ phytocassane ในข้าวที่มีการแสดงออกของยีน *MAPK6* เป็นปกติ หลังถูกกระตุ้นด้วย chitin elicitor เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และพบการสะสมของสารทั้งสองชนิดในเซลล์ข้าว *osmpk6/OsMPK6* เหมือนในข้าวที่มีการแสดงออกของยีน *MAPK6* เป็นปกติ ในขณะที่ในเซลล์ข้าว *osmpk6* พบการสะสมสาร momilactone ในปริมาณต่ำกว่า และไม่พบการสะสมสาร phytocassane ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการส่งทอดสัญญาณวิถี MAPK นำไปสู่การสังเคราะห์สาร momilactone และ phytocassane ในข้าว และยีน *MAPK6* เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการส่งทอดสัญญาณวิถี MAPK อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ไม่ได้ทำการตรวจสอบการสะสมของสาร momilactone และ phytocassane ในข้าว จึงยังไม่สามารถสรุปข้อสันนิษฐานนี้ได้

การแสดงออกของยีน *OsJAZ2* และ *PR10* ในระดับสูงที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อต้นนิษฐานได้ว่าทั้งสองยีน อาจมีบทบาทสำคัญสำหรับการกระตุ้นให้เกิดความต้านทานในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ยีนต้านทาน *Pi12* ในข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M สามารถตรวจจับยีนก่อโรค *AVR-Pi12* ในเชื้อราไอโซเลท MSN60009.1 ได้ และไปกระตุ้นให้เกิดการส่งทอดสัญญาณผ่านทางวิถี JA โปรตีน JAZ จึงถูกย่อยด้วย 26S proteasome และถูกสังเคราะห์ใหม่ในปริมาณมาก จากนั้นถูกกระตุ้นให้เกิดการย่อยโปรตีน JAZ อีกครั้ง ในทุก ๆ กระบวนการย่อยสลายโปรตีน JAZ จะไปกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสของยีนต้านทานเพื่อให้พืชต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรค (Chico *et al.* 2008; Staswick. 2007) ยีน *PR10* เป็นหนึ่งในยีนต้านทานที่ถูกกระตุ้นผ่านทางวิถี JA อย่างไรก็ตามผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในงานวิจัยนี้ยังไม่สามารถสรุปข้อสันนิษฐานนี้ได้ เป็นเพียงการทดลองเริ่มต้น (preliminary) ที่น่าสนใจ ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *OsJAZ2* ในงานวิจัยนี้สนับสนุนรายงานของ Antico *et al.* (2012) ที่รายงานว่า JA มีบทบาทสำคัญในเครือข่ายการส่งทอดสัญญาณที่พืชใช้ในการตอบสนองความต้านทานต่อเชื้อราที่เป็น biotroph เพื่อหาข้อสรุปควรศึกษาถึงบทบาทหน้าที่และความสัมพันธ์ของทั้งสองยีนในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction โดยการดัดแปลงพันธุกรรมข้าว ทำให้ข้าวมีการแสดงออกของยีนที่มากเกินไป (overexpression) หรือยับยั้งการถอดรหัสอาร์เอ็นเอ (RNA interference) ทำให้ไม่มีการแสดงออกของยีนที่สนใจ

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคไหม้ข้าวในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2559 และ 2560 พบการระบาดของโรคไหม้ในพื้นที่ 34 จังหวัด ระบาดรุนแรงในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ กข15 ที่ปลูกในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือและเหนือตอนล่างของไทย พบอาการของโรคไหม้รุนแรงบริเวณใบข้าวและคอรวงข้าว แยกเชื้อราจากตัวอย่างใบและคอรวงข้าว ซึ่งเก็บรวบรวมได้จากแปลงนาที่พบการระบาดของโรคไหม้ในพื้นที่ 34 จังหวัด สามารถแยกเชื้อรา *P. oryzae* ได้จำนวน 118 ไอโซเลท สถานการณ์การระบาดของโรคไหม้ข้าวควรมีการสำรวจเก็บข้อมูลอย่างต่อเนื่อง เพื่อเฝ้าระวังการระบาดของโรคที่อาจเกิดความรุนแรงทำให้เกิดความเสียหายของผลผลิตมากขึ้น และเพื่อเป็นข้อมูลในการพยากรณ์การเกิดโรคไหม้ได้ในอนาคต รวมทั้งการเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อราสาเหตุโรคไหม้เพื่อศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา จะทำให้ได้ข้อมูลทางด้านเชื้อราที่ครอบคลุม ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยอื่น ๆ ต่อไป

การตรวจสอบแบบของเพศของเชื้อรา 118 ไอโซเลท พบแบบของเพศของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด เชื้อราจำนวน 96.6 เปอร์เซ็นต์มีแบบของเพศชนิด Mat1-2 และ 3.4 เปอร์เซ็นต์มีแบบของเพศชนิด Mat1-1 เชื้อราที่แยกได้จากตำบลหนองเม่นา อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ และตำบลแม่คำมี อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ มีโอกาสขยายพันธุ์โดยอาศัยเพศ เนื่องจากพบเชื้อราในพื้นที่ที่มีแบบของเพศ (mating type) ทั้ง 2 ชนิด (Mat1-1 และ Mat1-2) จึงควรเฝ้าระวังการอุบัติใหม่ของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในพื้นที่ดังกล่าว และควรทำการศึกษาในเรื่องภาวะเจริญพันธุ์โดยใช้เพศ (sexual fertility) ของเชื้อรา เพื่อช่วยอธิบายถึงโอกาสในการขยายพันธุ์โดยอาศัยเพศของประชากรเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ประเทศไทย

จากรูปแบบปฏิกิริยาก่อโรคของเชื้อราบนประชากรข้าวที่มียืนต้นทานเดี่ยวจำนวน 30 สายพันธุ์ ผลประเมินการเกิดโรคที่ระดับคะแนน 0 1 หรือ 2 คือ อาการของโรคที่เกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างยืนก่อโรคในเชื้อราและยืนต้นทานในข้าวแบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรงหรือไม่เกิดโรค) สามารถระบุยืนก่อโรคในเชื้อราได้ ยืนก่อโรคในกลุ่ม AVR-Pik มีบทบาทมากที่สุดในการก่อโรคของเชื้อราในประเทศไทย ดังนั้นยืนต้นทานที่มีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ของประเทศไทย คือ ยืนต้นทานกลุ่ม Pik (ยกเว้นแอลลีล Pika) นอกจากนี้ยังมียืนต้นทานอื่น ๆ ที่สำคัญรองลงมา ได้แก่ ยืนต้นทานกลุ่ม Pita (แอลลีล Pita-2 Pita และ Pi12(t)) ยืนต้นทาน Pi9 และยืนต้นทาน Pi5(t) เนื่องจากพบเชื้อราจำนวนไม่น้อยมียืนก่อโรคที่สามารถถูกตรวจจับด้วยยืนต้นทานดังกล่าว ดังนั้นจึงควรมีการเฝ้าระวังเชื้อราที่มียืนก่อโรคกลุ่ม AVR-Pik กลุ่ม AVR-Pita ยืนก่อโรค AVR-Pi9 และ AVR-Pi5(t) อย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเป็นยืนที่มีบทบาทสำคัญในการก่อโรคของเชื้อราในประเทศไทย ผลการตรวจสอบรูปแบบการก่อโรคของเชื้อรา และระบุยืนก่อโรคในเชื้อราเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาเหตุโรคใหม่ในงานวิจัยนี้ เป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคใหม่ ทั้งการเลือกยีนต้านทานและเชื้อราที่ควรเลือกใช้ในการทดสอบความต้านทานโรค

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AVR-Pik* ในเชื้อรา 7 ไอโซเลท พบว่าเชื้อราไอโซเลท Phitsanulok40.4 มีกรดอะมิโนเหมือนยีนก่อโรค *AVR-PikA* ไอโซเลท SKN10389 และ UBN7384 มีกรดอะมิโนเหมือนยีนก่อโรค *AVR-PikD* ไอโซเลท NKI211170 มีกรดอะมิโนเหมือนยีนก่อโรค *AVR-PikF* ในขณะที่เชื้อราอีกจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ THL794 RBR55004 และ UBN207129 ยังไม่สามารถระบุแอลลีลของยีนก่อโรค *AVR-Pik* ได้ จากการพบการซ้อนกันของนิวคลีโอไทด์บนโครมาโทแกรม เมื่อนำมาวิเคราะห์ร่วมกับผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 10 โคลนต่อไอโซเลท และผลรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคของเชื้อราบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวทั้ง 7 แอลลีล (*Piks Piks Pikp Pikh Pi1 Pi7(t)* และ *Pikm*) สันนิษฐานได้ว่าไอโซเลท THL794 มียีนก่อโรคมกกว่า 1 แอลลีล (*AVR-PikD/A*) ไอโซเลท RBR55004 และ UBN207129 มียีนก่อโรคมกกว่า 2 แอลลีล (*AVR-PikD/A/F*) เพื่อช่วยยืนยันและสรุปข้อสันนิษฐานดังกล่าว งานวิจัยในอนาคตควรตรวจสอบการแสดงออกของยีนแต่ละแอลลีลหลังปลูกเชื้อ หรือวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราทั้งจีโนม (whole-genome sequencing) การมียีนก่อโรค *AVR-Pik* มากกว่า 1 แอลลีลเป็นเรื่องที่ควรให้ความสำคัญเนื่องจากเกี่ยวข้องกับวิวัฒนาการของเชื้อรา ที่อาจส่งผลกระทบต่อความรุนแรงของโรคใหม่ได้ในอนาคต ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีนก่อโรค *AVR-Pik* จึงควรดำเนินการอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคใหม่

พบยีนก่อโรค *AVR-Pik* ในประชากรเชื้อราปี 2559 – 2560 มีความแปรปรวนสูง อธิบายได้จากการจัดกลุ่มของเชื้อราตามรูปแบบปฏิกิริยาการก่อโรคบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวทั้ง 7 แอลลีล จากเชื้อราจำนวน 41 ไอโซเลท ซึ่งมีข้อมูลการก่อโรคบนข้าวที่มียีนต้านทานเดี่ยวครบทั้ง 7 แอลลีล และสามารถก่อโรครุนแรงบนข้าวพันธุ์ LTH และ KDML105 นำมาจัดกลุ่มเชื้อราได้ 16 กลุ่ม คิดเป็นอัตราส่วนเพียง 2.6 : 1 (จำนวนเชื้อรา : จำนวนกลุ่ม) แสดงว่าเชื้อราที่มีรูปแบบการก่อโรคหลากหลายมาก เชื้อราจำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ BRM60004.1 และ LRI59002 อาจมียีนก่อโรค *AVR-PikD* เหมือนกับเชื้อราไอโซเลท UBN7348 เชื้อราจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ PNB59003.1 PNB59003.2 PNB59003.3 และ PRE59010.2 อาจมียีนก่อโรค *AVR-PikF* เหมือนกับเชื้อราไอโซเลท NKI211107 และ เชื้อราจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ LRI59003.2 SKN60002.2 และ UDN60005 อาจมียีนก่อโรค *AVR-Pik* มากกว่า 2 แอลลีล (*AVR-PikD/A/F*) เหมือนกับเชื้อราไอโซเลท RBR55004

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองในข้าว IRBL12-M ที่มียีนต้านทานเดี่ยว *Pi12* ภายหลังจากปลูกเชื้อสาเหตุโรคใหม่ 2 ไอโซเลท พร้อมทั้งศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ทั้ง 2 ไอโซเลท ได้แก่ PNB59003.1 และ MSN60009.1 ซึ่งเป็นเชื้อราที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) และ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ตามลำดับ พบว่าในปฏิสัมพันธ์แบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ระหว่างข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M ที่มียีนต้านทาน *Pi12* และเชื้อราไอโซเลต MSN60009.1 ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ พบการแสดงออกของยีน *MoHrip1* *OsPAL* *OsJAZ2* *OsPR5* และ *OsPR10* ต่อมาที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ พบการแสดงออกของยีน *OsJAZ2* ลดลง ไม่พบการแสดงออกของยีน *MoHrip1* และยีน *OsPAL* ในข้าว แต่พบการแสดงออกของยีน *OsWRKY30* และพบว่ามีการแสดงออกของยีน *OsPR5* และ *OsPR10* เพิ่มขึ้น จากนั้นที่เวลา 96 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ ไม่พบการแสดงออกของยีน *OsWRKY30* พบการแสดงออกของยีน *MoHrip1* ยีน *OsMAPK6* และพบมีการแสดงออกของยีน *OsPAL* และ *OSJAZ2* เพิ่มขึ้น

ในปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรครุนแรง) ระหว่างข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M ที่มียีนต้านทาน *Pi12* และเชื้อราไอโซเลต PNB59003.1 ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ พบการแสดงออกของยีน *MoHrip1* และ *MoSlp1* ไม่พบการแสดงออกของยีน *OsPAL* ในข้าว แต่พบการแสดงออกของยีน *OsWRKY30* *OsJAZ2* *OsPR5* และ *OsPR10* ต่อมาที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ ไม่พบการแสดงออกของยีน *MoSlp1* พบการแสดงออกของยีน *MoHrip1* *OsJAZ2* *OsPR5* และ *OsWRKY30* เพิ่มขึ้น แต่พบการแสดงออกของยีน *OsPR10* ที่มีแนวโน้มลดลง จากนั้นที่เวลา 96 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ ไม่พบการแสดงออกของยีน *MoHrip1* และ *MoSlp1* แต่พบการแสดงออกของยีน *OSJAZ2* *OsPR5* และ *OsWRKY30* เพิ่มขึ้น และพบการแสดงออกของยีน *OsPR10* ยังคงลดลง นอกจากนี้พบยีน *OsMAPK6* แสดงออกที่เวลา 96 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ

ยีน *OSJAZ2* และ *OsPR10* มีการแสดงออกในระดับสูงมากในปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) และสูงกว่าในปฏิสัมพันธ์แบบ compatible interaction (เกิดโรค) สันนิษฐานได้ว่าการแสดงออกของยีน *OsJAZ2* และ *OsPR10* อาจมีบทบาทสำคัญสำหรับการกระตุ้นให้เกิดความต้านทานในข้าวที่แสดงปฏิสัมพันธ์แบบ incompatible interaction (เกิดโรคไม่รุนแรง หรือไม่เกิดโรค) ยีนต้านทาน *Pi12* ในข้าวสายพันธุ์ IRBL12-M สามารถตรวจจับยับยั้งก่อโรค AVR-*Pi12* ในเชื้อราไอโซเลต MSN60009.1 ได้ และกระตุ้นให้เกิดการส่งทอดสัญญาณผ่านทางวิถี JA จากนั้นกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสของยีนต้านทาน *OsPR10* เพื่อให้ข้าวต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคใหม่ อย่างไรก็ตามเพื่อหาข้อสรุปสันนิษฐานนี้ควรศึกษาถึงบทบาทหน้าที่ และความสัมพันธ์ของยีนทั้งสองในข้าว โดยการตัดแปลงพันธุกรรมข้าว ทำให้ต้นข้าวมีการแสดงออกของยีนที่มากเกินไป (overexpression) หรือยับยั้งการถอดรหัสของอาร์เอ็นเอของยีน (RNA interference) ทำให้ข้าวไม่มีการแสดงออกของยีนที่ต้องการศึกษา

บรรณานุกรม

- กองส่งเสริมการอารักขาพืชและจัดการดินปุ๋ย. 2558. **สรุปและสถิติสถานการณ์ศัตรูพืชที่สำคัญ ปี 2556 – 2558 และแนวทางการจัดการศัตรูพืชในปี 2559.** [Online]. Available : http://www.ppsf.doae.go.th/pdfevents/pest_forecasting/สรุปภาพรวมสถานการณ์ศัตรูพืช%20ปี2558.pdf.
- ชัชวาล จันทราสุริยรัตน์ และ สุริพร เกตุงาม. 2552. โรคใหม่ในข้าวและสถานการณ์ปัจจุบันของงานวิจัยด้านอินตันทานโรคใหม่ข้าว. **แก่นเกษตร** 37 : 69 – 78.
- นงลักษณ์ เกรินทวงศ์. 2559. กลไกการต้านทานโรคของพืช. **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า** 31 : 76 – 82.
- นวรรตน์ ใจหอม และ นงลักษณ์ เกรินทวงศ์. 2557. การประเมินความหลากหลายและการจัดกลุ่มความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ข้าวที่เก็บรวบรวมในประเทศไทย. น71 – 78. ใน **ประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52 : สาขาพืช กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.**
- พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ วราพงษ์ ชมภูภักย์ จีรพงศ์ ใจรินทร์ อุไรวรรณ คชสถิต อนุชาติ คชสถิต บุญรัตน์ จงดี สมใจ สาลีโท วีระศักดิ์ หอมสมบัติ อัครพร ณ ลำปางเนินพลับ และ พันนิภา ยาใจ. 2554. ความหลากหลายของเชื้อราสาเหตุโรคใหม่กับการพัฒนาข้าวต้านทานโรคใหม่. น249 – 267. ใน **ประชุมวิชาการข้าวและธัญพืช เมืองหนาว ประจำปี 2554.** กรุงเทพฯ : โรงแรมอมารี แอร์พอร์ต ดอนเมือง.
- ศูนย์ติดตามและแก้ไขปัญหาภัยพิบัติด้านการเกษตร. 2564. **รายงานสถานการณ์ภัยพิบัติด้านการเกษตร.** [Online]. Available : https://www.moac.go.th/service_all-agriculture_situation.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2564. **สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มในปี 2564.** [Online]. Available : https://www.oae.go.th/assets/portals/1/ebookcategory/57_trend-2564/#page=1.
- อัครพร ณ ลำปาง เนินพลับ และ พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2552. ความหลากหลายของ pathotype ของเชื้อราสาเหตุโรคใหม่ข้าวในปี 2550/51 และอินตันทานกว้างขวางที่เป็นประโยชน์ในภาคเหนือตอนล่าง. น208 – 219. ใน **การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว ประจำปี 2552.** ชลบุรี : โรงแรม ซิปรีท จอมเทียน พัทยา.
- Agrios, G. N. 1997. **Plant Pathology.** 4thed. New York : Academic Press Incorporation.
- Antico, J. C., Colon, C., Banks, T., and Ramonell, M. K. 2012. Insights into the role of jasmonic acid-mediated defenses against necrotrophic and biotrophic fungal pathogens. **Frontiers in Biology** 7(1) : 48 – 56.
- Bari, R. and Jones, J. D. 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Molecular Biology** 69 : 473 – 488.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Bohnert, H. U., Fudal, I., Dioh, W., Tharreau, D., Nottoghem, J. L. and Lebrun, M. H. 2004. A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistant rice. **Plant Cell** 16 : 2499 – 2513 .
- Century, K., Reuber, T. L. and Ratcliffe, O. J. 2008. Regulating the regulators: the future prospects for transcription-factorbased agricultural biotechnology products. **Plant Physiology** 147 : 20 – 29.
- Chaipanya, C., Telebanco-Yanoria, M. J., Quime, B., Longya, A., Korinsak, S., Korinsak, S., Toojinda, T., Vanavichit, A., Jantasuriyarat, C. and Zhou, B. 2017. Dissection of broad-spectrum resistance of the Thai rice variety Jao Hom Nin conferred by two resistance genes against rice blast. **Rice** 10(1) : 18.
- Chao, C-C. T. and Ellingboe, A. H. 1991. Selection for mating competence in *Magnaporthe grisea* pathogenic to rice. **Canadian Journal of Botany** 69 : 2130 – 2134.
- Chen, M., Zeng, H., Qiu, D., Guo, L., Yang, X., Shi, H., Zhou, T. and Zhao, J. 2012. Purification and characterization of a novel hypersensitive response-inducing elicitor from *Magnaporthe oryzae* that triggers defense response in rice. **PLOS ONE** 7(5) : e37654.
- Chiapello, H., Mallet, L., Guerin, C., Aguilera, G., Amselem, J., Kroj, T., Ortega-Abboud, E., Lebrun, M.H., Henrissat, B., Gendrault, A., Rodolphe, F., Tharreau, D. and Fournier, E. 2015. Deciphering genome content and evolutionary relationships of isolates from the fungus *Magnaporthe oryzae* attacking different host plants. **Genome Biology and Evolution** 7(10) : 2896 – 2912.
- Chico, J. M., Chini, A., Fonseca, S. and Solano, R. 2008. JAZ repressors set the rhythm in jasmonate signaling. **Current Opinion in Plant Biology** 11 : 486 – 494.
- Chumley, F. G. and Valent, B. 1990. Genetic analysis of melanin-deficient, nonpathogenic mutants of *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 3 : 135 – 143 .
- Couch, B. C. and Kohn, L. M. 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae* from *M. grisea*. **Mycologia** 94 : 683 – 693.
- Dangl, J. L. and McDowell, J. M. 2006. Two modes of pathogen recognition by plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 103 : 8575 – 8576.
- Daw, B. D., Zhang, L. H. and Wang, Z. Z. 2008. Salicylic acid enhances antifungal resistance to *Magnaporthe grisea* in rice plants. **Australasian Plant Pathology** 37 : 637 – 644.

- De Jong, J. C., McCormack, B. J., Smirnov, N. and Talbot, N. J. 1997. Glycerol generates turgor in rice blast. **Nature** 389 : 244 – 245.
- Devendrakumar, K. T., Li, X. and Zhang, Y. 2018. MAP kinase signalling: interplays between plant PAMP- and effector-triggered immunity. **Cellular and Molecular Life Sciences** 75 : 2981 – 2989.
- Dillon, V. M., Overton, L., Grayer, R. J. and Harborne, J. E. 1997. Differences in phytoalexin response among rice cultivars of different resistance to blast. **Phytochemistry** 44 : 599 – 603.
- Ebbole, D. J. 2007. *Magnaporthe* as a model for understanding host-pathogen interactions. **Annual Review of Phytopathology** 45 : 437 – 456.
- Farman, M. L., Eto, Y., Nakao, T., Tosa, Y., Nakayashiki, H., Mayama, S. and Leong, S. A. 2002. Analysis of the structure of the *AVRI-CO39* avirulence locus in virulent rice-infecting isolates of *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 15(1) : 6 – 16.
- Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology** 9 : 275 – 296.
- Fudal, I., Collemare, J., Bohnert, H. U., Melayah, D. and Lebrun, M. H. 2007. Expression of *Magnaporthe grisea* avirulence gene *ACE1* is connected to the initiation of appressorium-mediated penetration. **Eukaryotic Cell** 6 : 546 – 554.
- Galhano, R., Illana, A., Ryder, L. S., Rodriguez-Romero, J., Demuez, M., Badaruddin, M., Martinez-Rocha, A. L., Soanes, D. M., Studholme, D. J., Talbot, N. J. and Sesma, A. 2017. Tpc1 is an important Zn(II)₂Cys₆ transcriptional regulator required for polarized growth and virulence in the rice blast fungus. **PLOS Pathogens** 13 : e1006516.
- Gallet, R., Fontaine, C., Bonnot, F., Milazzo, J., Tertois, C., Adreit, H., Ravigné, V., Fournier, E. and Tharreau, D. 2015. Evolution of compatibility bange in the rice-*Magnaporthe oryzae* system: an uneven distribution of R genes between rice subspecies. **Phytopathology** 106(4) : 348 – 354.
- Giraldo, C. M. and Valent, B. 2013. Filamentous plant pathogen effectors in action. **Nature Reviews Microbiology** 11 : 800 – 814.
- Giraldo, M. C., Dagdas, Y. F., Gupta, Y. K., Mentlak, T. A., Yi, M., Martinez-Rocha, A. L., Saitoh, H., Terauchi, R., Talbot, N. J. and Valent, B. 2013. Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Nature Communications** 4(1) : 1996.
- Grayer, R. J. and Kokubun, T. 2001. Plant-fungal interactions: The search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. **Phytochemistry** 56 : 253 – 263.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Gupta, R., Min, C. W., Kim, Y. J. and Kim, S. T. 2019. Identification of Msp1-induced signaling components in rice leaves by integrated proteomic and phosphoproteomic analysis. **International Journal of Molecular Science** 20 : 4135.
- Hamer, J. E., Howard, R. J., Chumley, F. G. and Valent, B. 1988. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus. **Science** 239 : 288 – 290.
- He, M., Kershaw, M. J., Soanes, D. M., Xia, Y. and Talbot, N. J. 2012. Infection-associated nuclear degeneration in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* requires non-selective macroautophagy. **PLOS ONE** 7 : e33270.
- Heath, M. C., Howard, R. J., Valent, B. and Chumley, F. G. 1992. Ultrastructural interactions of one strain of *Magnaporthe grisea* with goosegrass and weeping lovegrass. **Canadian Journal of Botany** 70 : 779 – 787.
- Heath, M. C., Valent, B., Howar, R. J. and Chumley, F. G. 1990. Interactions of two strains of *Magnaporthe grisea* with rice, goosegrass, and weeping lovegrass. **Canadian Journal of Botany** 68: 1627 – 1637 .
- Howard, R. J. and Valent, B. 1996. Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Microbiology** 50 : 491 – 512.
- Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S., Hirt, H. and Wilson, C. 2002. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature. **Trends in Plant Science** 7(7) : 301 – 308.
- Jeong, J. S., Mitchell, T. K. and Dean, R. A. 2007. The *Magnaporthe grisea* snodprot1 homolog, MSP1, is required for virulence. **FEMS Microbiol** 273(2) : 157 – 165.
- Jones, J. D. and Dangl, J. L. 2006. The plant immune system. **Nature** 444 : 323 – 329.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiya, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E. and Shibuya, N. 2006. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 103 : 11086 – 11091.
- Kang, S., Sweigard, J. A. and Valent, B. 1995. The PWL host specificity gene family in the blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 8 : 939 – 948.
- Kankanala, P., Czymmek, K. and Valent, B. 2007. Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. **Plant Cell** 19 : 706 – 724.

- Kanno, Y., Otomo, K., Kenmoku, H., Mitsuhashi, W., Yamane, H., Oikawa, H., Toshima, H., Matsuoka, M., Sassa, T. and Toyomasu, T. 2006. Characterization of a rice gene family encoding type-A diterpene cyclases. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 70 : 1702 – 1710.
- Kanzaki, H., Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisaki, K., Hirabuchi, A., Alaux, L., Fournier, E., Tharreau, D. and Terauchi, R. 2012. Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* AVR-Pik and rice Pik genes driven by their physical interactions. **The Plant Journal** 72 : 894 – 907.
- Khang, C. H., Berruyer, R., Giraldo, M. C., Kankanala, P., Park, S. Y., Czymmek, K., Kang, S. and Valent, B. 2010. Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. **Plant Cell** 22 : 1388 – 1403.
- Khang, C. H., Park, S. Y., Lee, Y. H., Valent, B. and Kang, S. 2008. Genome organization and evolution of the AVR-Pita avirulence gene family in the *Magnaporthe grisea* species complex. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 21 : 658 – 670.
- Kishi-Kaboshi, M., Takahashi, A. and Hirochika, H. 2010a. MAMP responsive MAPK cascades regulate phytoalexin biosynthesis. **Plant Signaling & Behavior** 5 : 1653 – 1656.
- Kishi-Kaboshi, M., Okada, K., Kurimoto, L., Murakami, S., Umezawa, T., Shibuya, N., Yamane, H., Miyao, A., Takatsuji, H., Takahashi, A. and Hirochika, H. 2010b. A rice fungal MAMP-responsive MAPK cascade regulates metabolic flow to antimicrobial metabolite synthesis. **The Plant Journal** 63(4) : 599 – 612.
- Kodama, O., Li, W. X., Tamogami, S. and Akatsuka, T. 1992. Oryzalexin S, a novel stemarane-type diterpene rice phytoalexin. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 56 : 1002 – 1003.
- Koga, H. 1994. Hypersensitive death, autofluorescence, and ultrastructural changes in cells of leaf sheaths of susceptible and resistant near-isogenic lines of rice (*Pi-zt*) in relation to penetration and growth of *Pyricularia oryzae*. **Canadian Journal of Botany** 72 : 1463 – 1477.
- Kolmer, J. A. and Ellingboe, A. E. 1988. Genetic relationships between fertility and pathogenicity and virulence to rice in *Magnaporthe grisea*. **Canadian Journal of Botany** 66 : 891 – 897.
- Kusaba, M., Mochida, T., Naridomi, T., Fujita, Y., Chuma, I. and Tosa, Y. 2014. Loss of a 1.6 Mb chromosome in *Pyricularia oryzae* harboring two alleles of AVR-Pik leads to acquisition of virulence to rice cultivars containing resistance alleles at the *Pik* locus. **Current Genetics** 60(4) : 315 – 325.
- Li, J., Wang, Q., Li, C. Bi, Y., Fu, X. and Wang, R. 2019. Novel haplotypes and networks of AVR-Pik alleles in *Magnaporthe oryzae*. **BMC Plant Biology** 19 : 204.

- Li, T., Wen, J., Zhang, Y., Correll, J., Wang, L. and Pan, Q. 2018. Reconstruction of an SSR-based *Magnaporthe oryzae* physical map to locate avirulence gene *AvrPi12*. **BMC Microbiology** 18 : 47.
- Li, W., Wang, B., Wu, J., Lu, G., Hu, Y., Zhang, X., Zhang, Z., Zhao, Q., Feng, Q., Zhang, H., Wang, Z., Wang, G., Han, B., Wang, Z. and Zhou, B. 2009. The *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AVR-Pizt* encodes a predicted secreted protein that triggers the immunity in rice mediated by the blast resistance gene *Piz-t*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 22(4) : 411 – 420.
- Lieberherr, D., Thao, N. P., Nakashima, A., Umemura, K., Kawasaki, T. and Shimamoto, K. 2005. A sphingolipid elicitor-inducible mitogen-activated protein kinase is regulated by the small GTPase OsRac1 and heterotrimeric G-protein in rice. **Plant Physiology** 138 : 1644 – 1652.
- Lin, S., Nie, P., Ding, S., Zheng, L., Chen, C., Feng, R., Wang, Z., Wang, L., Wang, J., Fang, Z., Zhou, S., Ma, H. and Zhao, H. 2018. Quantitative proteomic analysis provides insights into rice defense mechanisms against *Magnaporthe oryzae*. **International Journal of Molecular Science** 19 : 1950.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$. **Method** 25(4) : 402 – 408.
- Longya, A., Chaipanya, C., Franceschetti, M., Maidment, J. H. R., Banfield, M. J. and Jantasuriyarat, C. 2019. Gene duplication and mutation in the emergence of a novel aggressive allele of the *AVR-pik* effector in the rice blast fungus. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 32(6) : 740 – 749.
- Lv, S., Wang, Z., Yang, X., Guo, L., Qiu, D. and Zeng, H. 2016. Transcriptional profiling of rice treated with MoHrip1 reveal the function of protein elicitor in enhancement of disease resistance and plant growth. **Frontiers in Plant Science** 7 : 1818.
- Maidment, J. H. R., Franceschetti, M., Maqbool A., Saitoh, H., Jantasuriyarat, C., Kamoun, S., Terauchi, R. and Banfield, M. J. 2021. Multiple variants of the fungal effector AVR-Pik bind the HMA domain of the rice protein OsHIPP19, providing a foundation to engineer plant defense. **Journal of Biological Chemistry** 296 : 100371
- McDonald, B.A. and Linde, C. 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. **Annual Review of Phytopathology** 40 : 349 – 479.

- Mei, C., Qi, M., Sheng, G. and Yang, Y. 2006. Inducible overexpression of a rice allene oxide synthase gene increases the endogenous jasmonic acid level, PR gene expression, and host resistance to fungal infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 19 : 1127 – 1137.
- Mekwatanakarn, P., Kositratana, W., Phromraksa, T. and Zeigler, R.S. 1999. Sexually fertile *Magnaporthe grisea* rice pathogens in Thailand. **Plant Disease** 83 : 939-994.
- Mentlak, T. A., Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L. S., Otomo, I., Saitoh, H., Terauchi, R., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B. P. H. J. and Talbot, N. J. 2012. Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. **Plant Cell** 24 : 322 – 335.
- Mew, T. W., Borromeo, E., and Hardy, B. 2001. **Exploiting Biodiversity for Sustainable Pest Management** : IRRI.
- Miki, S., Matsui, K., Kito, H., Otsuka, K., Ashizawa, T., Yasuda, N., Fukiya, S., Sato, J., Hirayae, K., Fujita, Y., Nakajima, T., Tomita, F. and Sone, T. 2009. Molecular cloning and characterization of the *AVR-Pia* locus from a Japanese field isolate of *Magnaporthe oryzae*. **Molecular Plant Pathology** 10(3) : 361 – 374.
- Mosquera, G., Giraldo, M. C., Khang, C. H., Coughlan, S. and Valent, B. 2009. Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* Bas1-4 as biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease. **Plant Cell** 21 : 1273 – 1290.
- Nanda, A. K., Andrio, E., Marino, D., Pauly, N. and Dunand, C. 2010. Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. **Journal of Integrative Plant Biology** 52(2) : 195 – 204.
- Nie, H. Z., Zhang, L., Zhuang, H. Q., Shi, W. J., Yang, X. F., Qiu, D. W. and Zeng, H. M. 2019. The secreted protein MoHrip1 is necessary for the virulence of *Magnaporthe oryzae*. **International Journal of Molecular Science** 20 : 1643.
- Noguchi, M.T. 2011. Parasexual recombination in *Magnaporthe oryzae*. **Japan Agricultura Research Quarterly** 45(1) : 39 – 45.
- Omar, S. C., Bentley, M. A., Morieri, G., Preston, G. M., Gurr, S. J. 2016. Validation of reference genes for robust qRT-PCR gene expression analysis in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **PLOS ONE** 11(8) : e0160637.
- Orbach, M. J., Farrall, L., Sweigard, J. A., Chumley, F. G. and Valent, B. 2000. A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. **Plant Cell** 12(11) : 2019 – 2032.
- Ou, S. H. 1985. **Rice Diseases**. 2nd ed. Great Britain : Cambrian News (Aberystwyth) Ltd.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Parinthawong, N. and Tansian, P. 2020. Pathogenicity of *Pyricularia oryzae* on elite rice cultivars and geographical distribution of avirulence genes causing blast disease in Thailand. **International Journal of Agricultural Technology** 16(4) : 897 – 906.
- Park, C. H., Chen, S., Shirsekar,, G., Zhou B., Khang, C. H., Songkumarn, P., Afzal, A. J., Ning, Y., Wang, R., Bellizzi, M., Valent, B. and Wang, G. L. 2012. The *Magnaporthe oryzae* effector *AVRPiz-t* targets the RING E3 ubiquitin ligase APIP6 to suppress pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in rice. **Plant Cell** 24 : 4748 – 4762.
- Peng, X., Hu, Y., Tang, X., Zhou, P., Deng, X., Wang, H. and Guo, Z. 2012. Constitutive expression of rice WRKY30 gene increases the endogenous jasmonic acid accumulation, PR gene expression and resistance to fungal pathogens in rice. **Planta** 236 : 1485 – 1498.
- Peyyala, R. and Farman, M. L. 2006. *Magnaporthe oryzae* isolates causing gray leaf spot of perennial ryegrass possess a functional copy of the *AVR1-CO39* avirulence gene. **Molecular Plant Pathology** 7 : 157 – 165.
- Piasecka, A., Jedrzejczak-Rey, N. and Bednarek, P. 2015. Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. **New Phytologist** 206 : 948 – 964.
- Pitzschke, A., Schikora, A. and Hirt, H. 2009. MAPK cascade signalling networks in plant defence. **Current Opinion in Plant Biology** 12 : 421 – 426.
- Poonsin, R. and Parinthawong, N. 2020. Investigation of rice blast resistant genes in Thai elite rice varieties (*Oryza sativa* L.) for improvement of broad-spectrum blast disease resistance. **International Journal of Agricultural Technology** 16(1): 109 – 118.
- Ray, S., Singh, P. K., Gupta, D. K., Mahato, A. K., Sarkar,, C., Rathour R., Singh, N. K. and Sharma, T.R. 2016. Analysis of *Magnaporthe oryzae* genome reveals a fungal effector, which is able to induce resistance response in transgenic rice line containing resistance gene, *Pi54*. **Frontiers in Plant Science** 7 : 1 – 16.
- Roumen, E., Levy, M. and Nottoghem, J. L. 1997. Characterization of the european pathogen population of *Magnaporthe grisea* by DNA finger printing and pathotype analysis. **European Journal of Plant Pathology** 103 : 363 – 371.
- Ryder, L. S. and Talbot, N. J. 2015. Regulation of appressorium development in pathogenic fungi. **Current Opinion in Plant Biology** 26 : 8 – 13.

- Ryu, H. S., Han, M., Lee, S. K., Cho, J. I., Ryoo, N., Heu, S., Lee, Y. H., Bhoo, S. H., Wang, G. L., Hahn, T. R. and Jeon, J. S. 2006. A comprehensive expression analysis of the WRKY gene superfamily in rice plants during defense response. **Plant Cell Reports** 25 : 836 – 847.
- Saitoh, H., Fujisawa, S., Mitsuoka, C., Ito, A., Hirabuchi, A., Ikeda, K., Irieda, H., Yoshino, K., Yoshida, K., Matsumura, H., Tosa, Y., Win, J., Kamoun, S., Takano, Y. and Terauchi, R. 2012. Large-scale gene disruption in *Magnaporthe oryzae* identifies MC69, a secreted protein required for infection by monocot and dicot fungal pathogens. **PLOS Pathogens** 8 : e1002711.
- Saleh, D., Xu, P., Shen, Y., Li, C., Adreit, H., Milazzo, J., Ravigne, V., Bazin, E., Nottoghem, J. L., Fournier, E. and Tharreau, D. 2012. Sex at the origin; An asian population of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* reproduces sexually. **Molecular Ecology** 21(6) : 1330 – 1344.
- Samanta, S., Dhua, U., Nayak, S., Behera, L. and Mukherjee, A. K. 2014. Mating types analysis of *Magnaporthe oryzae* populations by molecular methods. **The Open Biotechnology Journal** 8 : 6 – 12.
- Sambrook, J., Fritschi, E. F. and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B. M., Cammue, B. P. and De Bolle, M. F. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry** 46 : 941 – 950.
- Serrano, M., Coluccia, F., Torres, M., L'haridon, F. and Métraux, J. P. 2014. The cuticle and plant defense to pathogens. **Frontier in Plant Science** 5 : 274.
- Spoel, S. and Dong, X. 2012. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. **Nature Reviews Immunology** 12(2) : 89 – 100.
- Sreewongchai, T., Sriprakhon, S., Wongsaprom, C., Vanavichit, A., Toojinda, T., Tharreau, D. and Sirithunya, P. 2009. Genetic mapping of *Magnaporthe grisea* avirulence gene corresponding to leaf and panicle blast resistant QTLs in Jao Hom Nin rice cultivar. **Journal of Phytopathology** 157 : 338 – 343.
- Staswick, E. P. 2007. JAZing up jasmonate signaling. **Trends in Plant Science** 13(2) : 66 – 71.
- Sweigard, J. A. 1995. Identification, cloning, and characterization of *PWL2*, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. **Plant Cell** 7 : 1221 – 1233.
- Talbot, N. J. 2003. On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Microbiology** 57 : 177 – 202.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Toyomasu, T. 2008. Recent advances regarding diterpene cyclase genes in higher plants and fungi. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 72 : 1168 – 1175.
- Tsunematsu, H., Yanoria, M., Ebron, L., Hayashi, N., Ando, I., Kato, H., Imbe, T. and Khush, G. S. 2000. Development of monogenic lines of rice for blast resistance. **Breeding Science** 50: 229 – 234.
- Umemura, K., Ogawa, N., Shimura, M., Koga, J., Usami, H., and Kono, T. 2003. Possible role of phytocassane, rice phytoalexin, in disease resistance of rice against the blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 67 : 899 – 902.
- Vergne, E., Grand, X., Ballini, E., Chalvon, V., Saindrenan, P., Tharreau, D., Nottéghem, J. L. and Morel J. B. 2010. Preformed expression of defense is a hallmark of partial resistance to rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. **BMC Plant Biology** 10 : 206.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A, Clamp, M. and Barton, G. J. 2009. Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics** 25(9) : 1189 – 1191.
- Wilson, R. A. and Talbot, N. J. 2009. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. **Nature Reviews Microbiology** 7 : 185 – 195.
- Wu, J., Kou, Y., Bao, J., Li, Y., Tang, M., Zhu, X., Ponaya, A., Xiao, G., Li, J., Li, C., Song, M. Y., Cumagun, C. J. R., Deng, Q., Lu, G., Jeon, J. S., Naqvi, N. I. and Zhou, B. 2015. Comparative genomics identifies the *Magnaporthe oryzae* avirulence effector *AVR-Pi9* that triggers *Pi9*-mediated blast resistance in rice. **New Phytologist** 206 : 1463 – 1475.
- Wu, K. L., Guo, Z. J., Wang, H. H. and Li, J. 2005. The WRKY family of transcription factors in rice and Arabidopsis and their origins. **DNA Research** 12 : 9 – 26.
- Xiong, L. and Yang, Y. 2003. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid inducible mitogen-activated protein kinase. **Plant Cell** 15 : 745 – 759.
- Xu, M., Wilderman, P. R., Morrone, D., Xu, J., Roy, A., Margis-Pinheiro, M., Upadhyaya, N. M., Coates, R. M. and Peters R. J. 2007. Functional characterization of the rice kaurene synthase-like gene family. **Phytochemistry** 68 : 312 – 326.
- Xu, X., Yang, W., Tian, K., Zheng, J., Liu, X., Li, K., Lu, W., Tan, Y., Qin, Y. and Wang, C. 2018. Genetic diversity and pathogenicity dynamics of *Magnaporthe oryzae* in the wuling mountain area of china. **European Journal of Plant Pathology** 153(3) : 731 – 742.

- Yoder, O. C., Valent, B., and Chumley, F. G. 1986. Genetic nomenclature and practice for plant pathogenic fungi. **Phytopathology** 76 : 383 – 385.
- Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisawa, S., Kanzaki, H., Matsumura, H., Yoshida, K., Tosa, Y., Chuma, I., Takano, Y., Win, J., Kamoun, S. and Terauchi, R. 2009. Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Plant Cell** 21(5) : 1573 – 1591.
- You, X., Fang, H., Wang, R., Wang, G.-L. and Ning, Y. 2020. Phenylalanine ammonia lyases mediate broad-spectrum resistance to pathogens and insect pests in plants. **Science Bulletin** 65(17) : 1425 – 1427.
- Zhang, S., Wang, L., Wu, W., He, L., Yang, X. and Pan, Q. 2015. Function and evolution of *Magnaporthe oryzae* avirulence gene *AVRPib* responding to the rice blast resistance gene *Pib*. **Scientific Reports** 5 : 11642.
- Zhuang, J. Y., Lu, J., Qian, H. R., Lin, H. X., and Zheng, K. L. 1998. **Tagging of Blast Resistance Gene(s) to DNA Markers and Marker-Assisted Selection (MAS) in Rice Improvement. IAEA-TECDOC:1010**. Vienna : International Atomic Energy Agency (IAEA).
- Zipfel, C. 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. **Current Opinion in Immunology** 20 : 10 – 16.



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ water agar (WA) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Agar powder	17 กรัม
-------------	---------

ต้มน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตรให้เดือด เติม agar powder ในน้ำกลั่นที่กำลังเดือด คนจน agar powder ละลาย จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เทอาหารใส่ขวดแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันอากาศของไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

1.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ rice flour agar (RFA) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Rice flour	20 กรัม
Yeast extract	2 กรัม
Agar powder	17 กรัม

ต้มน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนจน rice flour และ yeast extract ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อน้ำเดือดเติม agar powder คนจนละลาย จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เทอาหารใส่ขวดแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันอากาศของไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

1.3 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Potato	200 กรัม
Dextrose	20 กรัม
Agar powder	17 กรัม

ปอกมันฝรั่งและล้างด้วยน้ำให้สะอาด หั่นมันฝรั่งให้เป็นลูกเต๋ารายละเอียด ชั่งให้น้ำหนัก 200 กรัม ต้มในน้ำกลั่นปริมาณ 500 มิลลิลิตร เมื่อมันฝรั่งสุกนำมากรองเอาชิ้นมันฝรั่งออกด้วยผ้าขาวบาง ต้มต่อจนน้ำเดือดเติมน้ำตาล dextrose และ agar powder คนจนละลาย จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เทอาหารใส่ขวดแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันอากาศของไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

1.4. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani (LB) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Tryptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
NaCl	5 กรัม
pH 7.0	

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.0 จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เทอาหารใส่ขวดแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันอากาศของไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

สำหรับอาหารแข็ง (LB agar) เติม agar powder ปริมาณ 20 กรัม นำไปต้มให้ร้อนจนวุ้นละลาย แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันอากาศของไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

สำหรับอาหารที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ ampicillin ให้ผสมสารละลายยาปฏิชีวนะ ampicillin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและตั้งทิ้งไว้ให้เย็น โดยอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีอุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลายยาปฏิชีวนะ ampicillin ในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการเตรียม

2. เตรียมสารละลาย

2.1 เตรียมยาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

Ampicillin	1 มิลลิกรัม
------------	-------------

ละลาย ampicillin ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 800 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตร กรองด้วยตัวกรองสารละลายเคมีขนาดเล็กสำหรับหลอดฉีดยา (syringe filter ขนาดรูกรอง 0.22 ไมครอน) เก็บละลาย ampicillin ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 diethylpyrocarbonate (DEPC) -treated Water ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

DEPC	100 มิลลิลิตร
------	---------------

ควรสวมถุงมือขณะเตรียม เนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และป้องกันการปนเปื้อน เติม DEPC ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (เขย่าขวดบ่อยๆ เพื่อให้ RNase ในขวดเสถียรภาพไป) นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อเอกซารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันอากาศของไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เพื่อระเหย DEPC ออกให้หมด (ถ้ายังได้กลิ่น DEPC ให้นำไป autoclave อีกครั้ง) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.3 500 mM EDTA, pH 8.0 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

EDTA 186.1 กรัม

ละลาย EDTA ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย NaOH เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันอากาศของไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2.4 สารละลาย 50x TAE ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Tris 242 กรัม

Glacial acetic acid 57.1 กรัม

500 mM EDTA, pH 8.0 100 มิลลิลิตร

ละลาย Tris และ Glacial acetic acid ในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร เติม EDTA ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ที่มีค่า pH เท่ากับ 8 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันอากาศของไอน้ำที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที



ภาคผนวก ข
ผลวิเคราะห์ค่าทางสถิติ และภาพประกอบผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 1 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey HSD ของยีน *MoHrip1*

	df	Sum of square	Mean square	F value	Pr(>F)	significant
Treatment	1	3.010	3.010	36.78	9.88e-06	***
Time	2	6.794	3.397	41.50	1.81e-07	***
Treatment:Time	2	9.340	4.670	57.06	1.62e-08	***
Residuals	18	1.473	0.082			

Significant codes: 0 =**** 0.001 =*** 0.01 =** 0.05 =*

> Tukey multiple comparisons of means. 95% family-wise confidence level

Treatment:Time	diff	lwr	upr	p adj
PNB:24-MSN:24	-1.1800	-1.8229142	-0.53708581	0.0001986
MSN:48-MSN:24	0.4875	-0.1554142	1.13041419	0.2044862
PNB:48-MSN:24	-1.4575	-2.1004142	-0.81458581	0.0000137
MSN:96-MSN:24	-2.1625	-2.8054142	-1.51958581	0.0000000
PNB:96-MSN:24	-1.1625	-1.8054142	-0.51958581	0.0002368
MSN:48-PNB:24	1.6675	1.0245858	2.31041419	0.0000021
PNB:48-PNB:24	-0.2775	-0.9204142	0.36541419	0.7424814
MSN:96-PNB:24	-0.9825	-1.6254142	-0.33958581	0.0015052
PNB:96-PNB:24	0.0175	-0.6254142	0.66041419	0.9999992
PNB:48-MSN:48	-1.9450	-2.5879142	-1.30208581	0.0000002
MSN:96-MSN:48	-2.6500	-3.2929142	-2.00708581	0.0000000
PNB:96-MSN:48	-1.6500	-2.2929142	-1.00708581	0.0000025
MSN:96-PNB:48	-0.7050	-1.3479142	-0.06208581	0.0269549
PNB:96-PNB:48	0.2950	-0.3479142	0.93791419	0.6931262
PNB:96-MSN:96	1.0000	0.3570858	1.64291419	0.0012544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย
ด้วยวิธี Tukey HSD ของยีน *MoSlp1*

	df	Sum of square	Mean square	F vault	Pr(>F)	significant
Treatment	1	0.3191	0.3191	62.59	2.87e-07	***
Time	2	2.5616	1.2808	251.19	7.09e-14	***
Treatment:Time	2	0.3163	0.1581	31.02	1.47e-06	***
Residuals	18	0.0918	0.0051			

Significant codes: 0 =**** 0.001 =*** 0.01 =** 0.05 =*

> Tukey multiple comparisons of means. 95% family-wise confidence level

Treatment:Time	diff	lwr	upr	p adj
PNB:24-MSN:24	0.48927811	0.32881346	0.649742763	0.0000002
MSN:48-MSN:24	-0.15331805	-0.31378270	0.007146602	0.0659444
PNB:48-MSN:24	0.11798556	-0.04247909	0.278450210	0.2302898
MSN:96-MSN:24	-0.50691495	-0.66737960	-0.346450296	0.0000001
PNB:96-MSN:24	-0.57560543	-0.73607008	-0.415140777	0.0000000
MSN:48-PNB:24	-0.64259616	-0.80306081	-0.482131509	0.0000000
PNB:48-PNB:24	-0.37129255	-0.53175720	-0.210827902	0.0000104
MSN:96-PNB:24	-0.99619306	-1.15665771	-0.835728408	0.0000000
PNB:96-PNB:24	-1.06488354	-1.22534819	-0.904418889	0.0000000
PNB:48-MSN:48	0.27130361	0.11083896	0.431768259	0.0005104
MSN:96-MSN:48	-0.35359690	-0.51406155	-0.193132247	0.0000200
PNB:96-MSN:48	-0.42228738	-0.58275203	-0.261822728	0.0000017
MSN:96-PNB:48	-0.62490051	-0.78536516	-0.464435855	0.0000000
PNB:96-PNB:48	-0.69359099	-0.85405564	-0.533126336	0.0000000
PNB:96-MSN:96	-0.06869048	-0.22915513	0.091774170	0.7487423

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 3 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย
ด้วยวิธี Tukey HSD ของยีน *OsPAL*

	df	Sum of square	Mean square	F value	Pr(>F)	significant
Treatment	1	153.8	153.83	136.4	7.78e-10	***
Time	2	308.8	154.42	137.0	1.29e-11	***
Treatment:Time	2	436.0	218.01	193.4	6.81e-13	***
Residuals	18	20.3	1.13			

Significant codes: 0 =**** 0.001 =*** 0.01 =** 0.05 =*

> Tukey multiple comparisons of means. 95% family-wise confidence level

Treatment:Time	diff	lwr	upr	p adj
PNB:24-MSN:24	-17.04254817	-19.42863449	-14.656462	0.0000000
MSN:48-MSN:24	-17.09455439	-19.48064071	-14.708468	0.0000000
PNB:48-MSN:24	-17.34228583	-19.72837215	-14.956200	0.0000000
MSN:96-MSN:24	-15.00576129	-17.39184761	-12.619675	0.0000000
PNB:96-MSN:24	-12.90559714	-15.29168346	-10.519511	0.0000000
MSN:48-PNB:24	-0.05200622	-2.43809255	2.334080	0.9999997
PNB:48-PNB:24	-0.29973766	-2.68582399	2.086349	0.9984578
MSN:96-PNB:24	2.03678688	-0.34929945	4.422873	0.1209790
PNB:96-PNB:24	4.13695103	1.75086470	6.523037	0.0003846
PNB:48-MSN:48	-0.24773144	-2.63381777	2.138355	0.9993840
MSN:96-MSN:48	2.08879310	-0.29729322	4.474879	0.1066219
PNB:96-MSN:48	4.18895725	1.80287092	6.575044	0.0003335
MSN:96-PNB:48	2.33652454	-0.04956178	4.722611	0.0569319
PNB:96-PNB:48	4.43668869	2.05060237	6.822775	0.0001702
PNB:96-MSN:96	2.10016415	-0.28592218	4.486250	0.1036885

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 4 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ด้วยวิธี Tukey HSD ของยีน *OsJAZ2*

	df	Sum of square	Mean square	F value	Pr(>F)	significant
Treatment	1	10438	10438	196.3	4.02e-11	***
Time	2	20055	10027	188.6	8.44e-13	***
Treatment:Time	2	21296	10648	200.2	5.04e-13	***
Residuals	18	957	53			

Significant codes: 0 =**** 0.001 =*** 0.01 =** 0.05 =*

> Tukey multiple comparisons of means. 95% family-wise confidence level

Treatment:Time	diff	lwr	upr	p adj
PNB:24-MSN:24	-125.4250	-141.811686	-109.038314	0.0000000
MSN:48-MSN:24	-113.9925	-130.379186	-97.605814	0.0000000
PNB:48-MSN:24	-122.0650	-138.451686	-105.678314	0.0000000
MSN:96-MSN:24	-56.2775	-72.664186	-39.890814	0.0000000
PNB:96-MSN:24	-47.9050	-64.291686	-31.518314	0.0000004
MSN:48-PNB:24	11.4325	-4.954186	27.819186	0.2776219
PNB:48-PNB:24	3.3600	-13.026686	19.746686	0.9850736
MSN:96-PNB:24	69.1475	52.760814	85.534186	0.0000000
PNB:96-PNB:24	77.5200	61.133314	93.906686	0.0000000
PNB:48-MSN:48	-8.0725	-24.459186	8.314186	0.6294758
MSN:96-MSN:48	57.7150	41.328314	74.101686	0.0000000
PNB:96-MSN:48	66.0875	49.700814	82.474186	0.0000000
MSN:96-PNB:48	65.7875	49.400814	82.174186	0.0000000
PNB:96-PNB:48	74.1600	57.773314	90.546686	0.0000000
PNB:96-MSN:96	8.3725	-8.014186	24.759186	0.5944933

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 5 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ด้วยวิธี Tukey HSD ของยีน *OsPR5*

	df	Sum of square	Mean square	F value	Pr(>F)	significant
Treatment	1	421.5	421.5	180.1	<2e-16	***
Time	2	907.8	453.9	194.0	<2e-16	***
Treatment:Time	2	21296	950.8	406.3	<2e-16	***
Residuals	48	112.3	2.3			

Significant codes: 0 =**** 0.001 =*** 0.01 =** 0.05 =*

> Tukey multiple comparisons of means. 95% family-wise confidence level

Treatment:Time	diff	lwr	upr	p adj
PNB:24-MSN:24	0.9477778	-1.1923080	3.0878636	0.7757074
MSN:48-MSN:24	21.6388889	19.4988031	23.7789747	0.0000000
PNB:48-MSN:24	-0.6044444	-2.7445302	1.5356413	0.9587458
MSN:96-MSN:24	3.2088889	1.0688031	5.3489747	0.0006903
PNB:96-MSN:24	7.7422222	5.6021364	9.8823080	0.0000000
MSN:48-PNB:24	20.6911111	18.5510253	22.8311969	0.0000000
PNB:48-PNB:24	-1.5522222	-3.6923080	0.5878636	0.2787943
MSN:96-PNB:24	2.2611111	0.1210253	4.4011969	0.0327640
PNB:96-PNB:24	6.7944444	4.6543587	8.9345302	0.0000000
PNB:48-MSN:48	-22.2433333	-24.3834191	-20.1032476	0.0000000
MSN:96-MSN:48	-18.4300000	-20.5700858	-16.2899142	0.0000000
PNB:96-MSN:48	-13.8966667	-16.0367524	-11.7565809	0.0000000
MSN:96-PNB:48	3.8133333	1.6732476	5.9534191	0.0000426
PNB:96-PNB:48	8.3466667	6.2065809	10.4867524	0.0000000
PNB:96-MSN:96	4.5333333	2.3932476	6.6734191	0.0000013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 6 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ด้วยวิธี Tukey HSD ของยีน *OsPR10*

	df	Sum of square	Mean square	F value	Pr(>F)	significant
Treatment	1	472637	472637	224.8	1.30e-11	***
Time	2	532618	266309	126.7	2.49e-11	***
Treatment:Time	2	545490	272745	129.7	2.04e-11	***
Residuals	18	37849	2103			

Significant codes: 0 =**** 0.001 =*** 0.01 =** 0.05 =*

> Tukey multiple comparisons of means. 95% family-wise confidence level

Treatment:Time	diff	lwr	upr	p adj
PNB:24-MSN:24	0.9477778	-1.1923080	3.0878636	0.7757074
MSN:48-MSN:24	21.6388889	19.4988031	23.7789747	0.0000000
PNB:48-MSN:24	-0.6044444	-2.7445302	1.5356413	0.9587458
MSN:96-MSN:24	3.2088889	1.0688031	5.3489747	0.0006903
PNB:96-MSN:24	7.7422222	5.6021364	9.8823080	0.0000000
MSN:48-PNB:24	20.6911111	18.5510253	22.8311969	0.0000000
PNB:48-PNB:24	-1.5522222	-3.6923080	0.5878636	0.2787943
MSN:96-PNB:24	2.2611111	0.1210253	4.4011969	0.0327640
PNB:96-PNB:24	6.7944444	4.6543587	8.9345302	0.0000000
PNB:48-MSN:48	-22.2433333	-24.3834191	-20.1032476	0.0000000
MSN:96-MSN:48	-18.4300000	-20.5700858	-16.2899142	0.0000000
PNB:96-MSN:48	-13.8966667	-16.0367524	-11.7565809	0.0000000
MSN:96-PNB:48	3.8133333	1.6732476	5.9534191	0.0000426
PNB:96-PNB:48	8.3466667	6.2065809	10.4867524	0.0000000
PNB:96-MSN:96	4.5333333	2.3932476	6.6734191	0.0000013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 7 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย
ด้วยวิธี Tukey HSD ของยีน *OsWRKY30*

	df	Sum of square	Mean square	F value	Pr(>F)	significant
Treatment	1	5.476	5.476	194.90	4.26e-11	***
Time	2	11.210	5.605	199.48	5.21e-13	***
Treatment:Time	2	1.886	0.943	33.57	8.44e-07	***
Residuals	18	0.506	0.028			

Significant codes: 0 =**** 0.001 =*** 0.01 =** 0.05 =*

> Tukey multiple comparisons of means. 95% family-wise confidence level

Treatment:Time	diff	lwr	upr	p adj
PNB:24-MSN:24	1.22234438	0.845652848	1.5990359	0.0000001
MSN:48-MSN:24	1.24421491	0.867523384	1.6209064	0.0000001
PNB:48-MSN:24	2.71274033	2.336048807	3.0894319	0.0000000
MSN:96-MSN:24	0.37066874	-0.006022788	0.7473603	0.0552613
PNB:96-MSN:24	0.54590275	0.169211222	0.9225943	0.0025594
MSN:48-PNB:24	0.02187054	-0.354820992	0.3985621	0.9999645
PNB:48-PNB:24	1.49039596	1.113704432	1.8670875	0.0000000
MSN:96-PNB:24	-0.85167564	-1.228367163	-0.4749841	0.0000142
PNB:96-PNB:24	-0.67644163	-1.053133153	-0.2997501	0.0002567
PNB:48-MSN:48	1.46852542	1.091833896	1.8452170	0.0000000
MSN:96-MSN:48	-0.87354617	-1.250237699	-0.4968546	0.0000101
PNB:96-MSN:48	-0.69831216	-1.075003689	-0.3216206	0.0001764
MSN:96-PNB:48	-2.34207160	-2.718763122	-1.9653801	0.0000000
PNB:96-PNB:48	-2.16683759	-2.543529112	-1.7901461	0.0000000
PNB:96-MSN:96	0.17523401	-0.201457517	0.5519255	0.6813253

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 8 ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ด้วยวิธี Tukey HSD ของยีน *OsMAPK6*

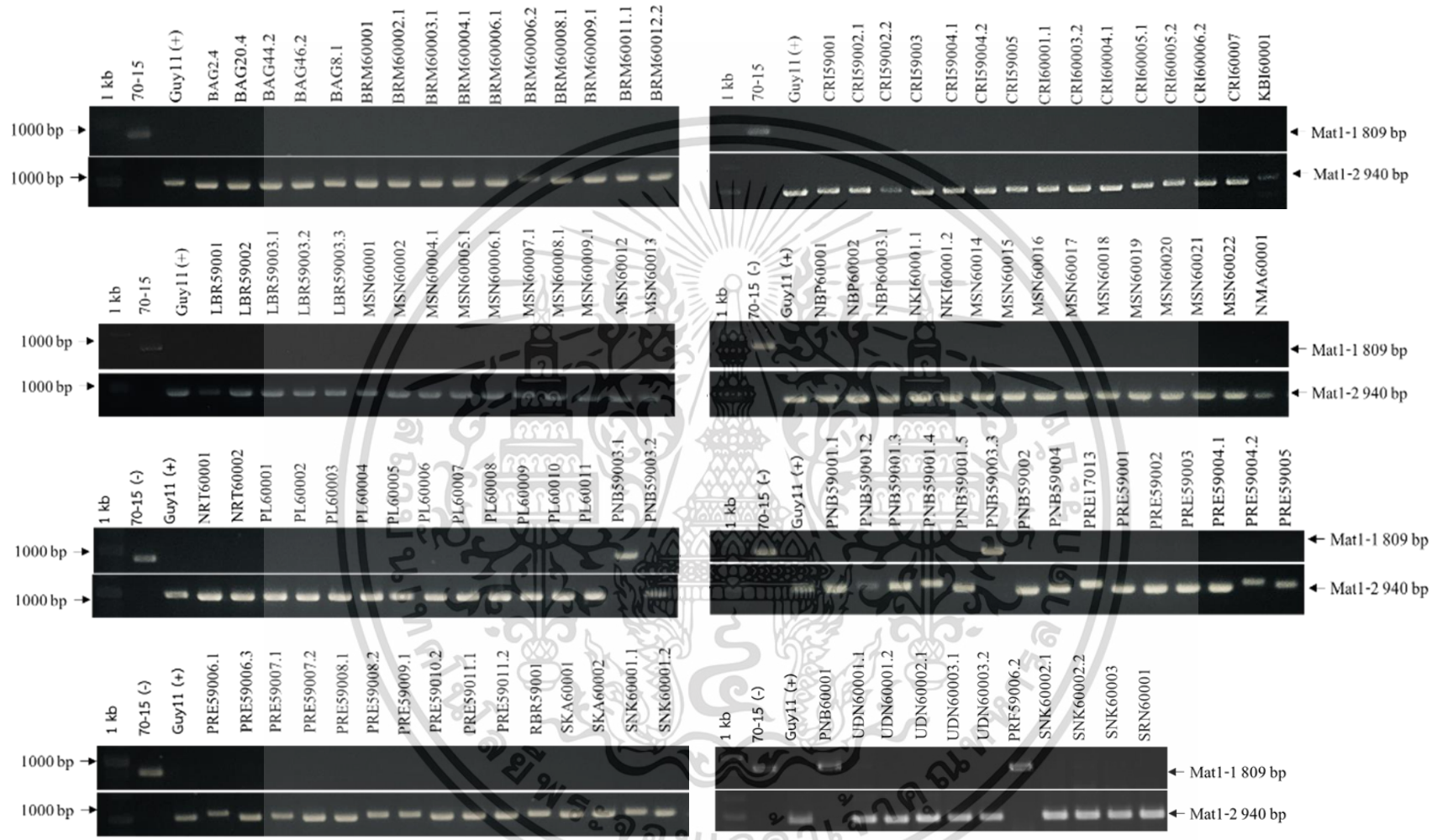
	df	Sum of square	Mean square	F value	Pr(>F)	significant
Treatment	1	0.06	0.0	58		***
Time	2	61.03	30.5	16	64	***
Treatment:Time	2	2.33	1.1	64	2	***
Residuals	18	2.27	0.0	47		

Significant codes: 0 =**** 0.001 =*** 0.01 =** 0.05 =*

> Tukey multiple comparisons of means. 95% family-wise confidence level

Treatment:Time	diff	lwr	upr	p adj
PNB:24-MSN:24	-0.1124801	-0.191638298	0.4165984	0.8798887
MSN:48-MSN:24	0.2992243	-0.004894093	0.6033426	0.0561784
PNB:48-MSN:24	0.6297336	0.325615244	0.9338520	0.0000022
MSN:96-MSN:24	2.8071745	2.503056115	3.1112929	0.0000000
PNB:96-MSN:24	2.1682008	1.864082458	2.4723192	0.0000000
MSN:48-PNB:24	0.1867442	-0.117374165	0.4908626	0.4615268
PNB:48-PNB:24	0.5172535	0.213135172	0.8213719	0.0000962
MSN:96-PNB:24	2.6946944	2.390576043	2.9988128	0.0000000
PNB:96-PNB:24	2.0557208	1.751602386	2.3598391	0.0000000
PNB:48-MSN:48	0.3305093	0.026390966	0.6346277	0.0259289
MSN:96-MSN:48	2.5079502	2.203831837	2.8120686	0.0000000
PNB:96-MSN:48	1.8689766	1.564858180	2.1730949	0.0000000
MSN:96-PNB:48	2.1774409	1.873322500	2.4815592	0.0000000
PNB:96-PNB:48	1.5384672	1.234348843	1.8425856	0.0000000
PNB:96-MSN:96	-0.6389737	-0.943092028	-0.3348553	0.0000016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 1 ผลการตรวจสอบเพศของเชื้อราจำนวน 118 ไอโซเลท โดยใช้ไพรเมอร์ Mat1-1 และ Mat1-2 เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับเชื้อราทดสอบมาตรฐานสายพันธุ์ 70-15 สายพันธุ์ GUY11 และดีเอ็นเอมาตรฐาน 1000 คู่เบส

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop* UAG Stop*	UGU } Tyr UGC } UGA Stop* UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG Met*	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

* Methionine (AUG) is both the start codon initiating translation and encodes the amino acid methionine.

* UAA, UAG, and UGA are the three stop codons terminating translation. Unlike AUG, these codons do not code for an amino acid.

Jack Westin

ภาพผนวกที่ 2 รหัสของกรดอะมิโน (triplet code)

ที่มา: <https://jackwestin.com/resources/mcat-content/genetic-code/the-triplet-code>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 3 เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AVR-PikA B C D E และ F จากฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Jalview Version 2 (Waterhouse *et al.* 2009)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นางเพ็ญภา จันทน์นวล
 วัน เดือน ปีเกิด 14 กันยายน 2531
 ที่อยู่ 88/37 หมู่บ้านบุญญกร เลคพาร์ค หมู่ 4 ต.คลองหก อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี
 12120 โทร.06-3476-8666
 ประวัติการศึกษา 2553 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยี
 การเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
 2556 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะ
 เทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

งานวิจัยที่ตีพิมพ์

- พ.ศ. 2563 Parinthawong, N. and Tansian, P. 2020. Pathogenicity of *Pyricularia oryzae* on elite rice cultivars and geographical distribution of avirulence genes causing blast disease in Thailand. **International Journal of Agricultural Technology** 16(4): 897 – 906.
- พ.ศ. 2561 Tansian, P. and Parinthawong, N.. 2018. Mating type and genetic diversity analysis of *Pyricularia oryzae* collected from Thai rice varieties. **International Journal of Agricultural Technology** 14(7): 2041 – 2050.
- พ.ศ. 2560 Tansian, P. and Parinthawong, N. 2017. Study of optimum mobile phase for determination of phytoalexin in rice by thin layer chromatography. **International Journal of Agricultural Technology** 13(7.1): 1245-1250.
- พ.ศ. 2558 Parinthawong, N., Tansian, P. and Sreewongchai, T. 2015. Genetic mapping of leaf blast resistance gene in landrace rice cultivar ‘GS19769’. **Maejo International Journal of Science and Technology** 9: 278-287.
- พ.ศ. 2557 เพ็ญภา ตันเชียน ธานี ศรีวงศ์ชัย และ นงลักษณ์ เกรินทวงศ์. 2557. วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์. น400-406. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 52. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พ.ศ. 2553 Parinthawong, N., Tansian, P. and Youngnit, C. 2010. Effects of three plant crude extracts on fungal spore germination and hyphal growth of *Curvularia* sp. In

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Proceedings of 16th Asian Agricultural Symposium and 1st International Symposium on Agricultural Technology. Bangkok : King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.

บทคัดย่อที่นำเสนอในการประชุมและสัมมนา

พ.ศ. 2562 Tansian, P., Jaihom, N. and Parinthawong, N. Diversity analysis of Avr-Pik effectors of rice blast population collecting in Thailand between year 2007 – 2013. น76. In **The 8th International Rice Blast Conference.** Chengdu : China.

พ.ศ. 2561 เพ็ญญา ดันเชียน นวรัตน์ ใจหอม และ นงลักษณ์ เกรินทวงศ์. การสำรวจยีนก่อโรคของประชากรเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในประเทศไทยโดยใช้ข้าวคู่แข่งที่มียีนต้านทานเดี่ยว. ใน **การประชุมวิชาการข้าวแห่งชาติ ครั้งที่ 5.** กรุงเทพฯ โรงแรมเซ็นทรา.

เข้าร่วมอบรม/สัมมนา

พ.ศ. 2561 The 8th AG-BIO/PERDO Graduate Conference on Agricultural Biotechnology and The 5th KU-UT Joint Graduate Conference on Agriculture, Food, Engineering and Environment. 6 – 7 December 2018, Lecture hall 3 Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom.

พ.ศ. 2559 The 7th AG-BIO/PERDO Graduate Conference on Agricultural Biotechnology and KU-UT Joint Seminar IV, 8 – 9 December 2016, Lecture hall 3 Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้