

การระบุยีนข้าวที่ตอบสนองในระยะแรกต่อการปลูกเชื้อด้วยเชื้อราสาเหตุโรคไหม้
(*Pyricularia grisea* (Cook) Sacc.)

Identification of Early Stress-induced Genes from Rice Infected with
Rice Blast Pathogen (*Pyricularia grisea* (Cook) Sacc.)

พยุงค์ศักดิ์ รวยอารี^{1/}

สุภาวดี จ้อเหรียญ^{1/}

ภรณ์ สว่างศรี^{1/}

หทัยรัตน์ อุไรรงค์^{1/}

พากเพียร อรัญนารัต^{2/}

Payungsak Rauyaree^{1/}

Suphawadee Ngorian^{1/}

Paranee Sawangsri^{1/}

Hathairat Urairong^{1/}

Parkpian Arunyanart^{2/}

ABSTRACT

Pyricularia grisea is a devastating fungal pathogen of rice that severely causes a reduction of grain yield in certain regions of Thailand. To elucidate the fungal-plant interaction during pathosystem in order to identify genes associated with early stages of rice infection, cDNA libraries were constructed from 3-week old rice seedling (Indica cultivar Hahng -Yi 71, a resistant variety) at 6 and 24 hours after artificial inoculation with fungal spores at the concentration of 1×10^6 spores per ml. The experiments were conducted at the Plant Protection Research and Development Office and the Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture during October 2005 to September 2007. From resistant libraries, named OSHy71/EST6 and OSHy71/EST24 obtained from Hahng Yi-71, a total of sixty cDNA clones of each library are randomly chosen and used to estimate the average insert size of the cDNA clones which are approximately 2.5-kb and 1.5-kb in size, respectively. To identify candidate genes associated with disease resistance, twenty-five ESTs (from OSHy71/EST24) had been further single-passed sequenced and compared with GenBank database. The putative functional classification of these twenty-five genes display the majority of them

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อ. ชัยภูมิ จ. ปทุมธานี 12110

^{1/} Biotechnology Research and Development Ofce, Department of Agriculture, Thanyaburi district, Pathum Thani province 12110

^{2/} สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว จตุจักร บางเขน กรุงเทพฯ 10900

^{2/} Bureau of Rice Research and Development, Department of Rice, Chatuchak, Bangkok 10900

are associated with hypothetical proteins, ligand binder/carrier functions (Ulp1 protease-like protein, glycosylphosphatidylinositol anchor attachment 1-like protein, cytochrome P450 monooxygenase), transcription factor (NAC transcription factor NTL5), cellular components (chloroplast), enzymes (NAC 2, NAM-like protein, enamelin), retrotransposon (Retrosat 1 / retrotransposon and Ty 3 Gypsy-type Retrosat 2 retrotransposon), and importantly previously reported disease resistant genes NBS-LRR resistance gene (RGH 1) and RPM 1 in rice.

Key words: rice blast, rice infection, expressed genes, ESTs

บทคัดย่อ

Pyricularia grisea เป็นเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ที่สำคัญของข้าว ที่เป็นสาเหตุให้ผลผลิตข้าวลดลงอย่างมาก ในหลายๆ พื้นที่ของประเทศไทย เพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างข้าวกับเชื้อรา และเพื่อระบุยีนข้าวที่ตอบสนองในระยะแรกหลังปลูกเชื้อ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างชุดเอ็นเอไลบรารี (cDNA library) จากใบข้าวพันธุ์หางยี 71 อายุ 3 สัปดาห์ (ข้าวอินดิคาพันธุ์ต้านทาน) หลังปลูกเชื้อด้วยการพ่นด้วยสปอร์เชื้อราที่ความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์/มล. ที่ระยะ 6

และ 24 ชม. โดยดำเนินการวิจัยที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2548 – กันยายน พ.ศ. 2550 สุ่มซีดีเอ็นเอโคลนจากไลบรารีข้าวพันธุ์หางยี 71 OSHy71/EST6 และ OSHy71/EST24 เพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและหาคำเฉลี่ยขนาดซีดีเอ็นเอสอดแทรก (cDNA inserts) ผลการทดลองพบขนาดซีดีเอ็นเอสอดแทรกที่ 2.5 และ 1.5 กิโลเบส ตามลำดับ โดยผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนจำนวน 25 ตัวอย่างจากไลบรารี OSHy71/EST24 พบยีนที่เกี่ยวข้องกับการจับตัวหรือการนำพาสารภายในเซลล์ (Ulp1 protease-like protein, glycosylphosphatidylinositol anchor attachment 1-like protein, cytochrome P450 monooxygenase) โปรตีนควบคุมการแสดงออกของยีน (transcription factor, NAC transcription factor NTL5), เอนไซม์ (NAC 2, NAM-like protein, enamelin) องค์ประกอบของเซลล์ (chloroplast) รีโทรทรานโปซอน (Retrosat 1 / retrotransposon และ Ty 3 Gypsy type Retrosat 2 retrotransposon) โปรตีนไม่ทราบหน้าที่ (hypothetical protein) และยีนต้านทาน NBS-LRR (RGH 1) และ RPM 1 ในข้าว

คำหลัก: โรคไหม้ของข้าว การปลูกเชื้อ expressed sequence tags ESTs

คำนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นธัญพืชที่สำคัญที่สุดชนิดหนึ่งของโลก โดยเฉพาะประชากรในแถบทวีปเอเชียที่บริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก สำหรับประเทศไทยข้าวนอกจากเป็นอาหารหลัก ยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญทั้งด้านความมั่นคง สังคมและเศรษฐกิจ ที่ทำรายได้เข้าประเทศปีละนับหมื่นล้านบาท มีพื้นที่เพาะปลูกส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือตอนบน ข้าวหลายสายพันธุ์ต่างมีปัญหาเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ (*Pyricularia grisea* (Cook) Sacc.) (teleomorph: *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr.) ที่สร้างความเสียหายให้กับผลผลิตข้าวเสมอตลอดมา ส่งผลให้ผลผลิตข้าวลดลงเฉลี่ยคิดเป็นปีละ 30% โดยในแต่ละปีโรคไหม้สร้างความเสียหายแก่ผลผลิตข้าวมากถึง 650,000 ตันหรือคิดเป็น 30% ของผลิตรวม เฉพาะในปี พ.ศ. 2535 ประเทศไทยได้รับผลกระทบจากการระบาดของโรคไหม้คอร์รวงที่สร้างความเสียหายให้กับผลผลิตทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือตอนบน 70% ให้ผลผลิตต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานเพียง 345 กก./ไร่ (พูนศักดิ์, 2547) นับเป็นการระบาดครั้งที่รุนแรงที่สุดของโรคไหม้คอร์รวง ความเสียหายที่เกิดขึ้นอยู่ในพื้นที่ภาคเหนือ 90% โดยเฉพาะผลผลิตข้าวของจ.เชียงใหม่ได้รับความเสียหายถึง 16% ของพื้นที่เสียหายในภาคเหนือทั้งหมด คิดเป็นมูลค่าประมาณ 436 ล้านบาท (Smitamana *et al.*, 2000)

การรวบรวมพันธุ์ข้าวพื้นเมืองในประเทศ

ไทยมีมานานนับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2480 แต่ได้มีการปฏิบัติอย่างเป็นรูปธรรมระหว่างปี พ.ศ. 2489 และ พ.ศ. 2493 จนกระทั่งมีการเปิดศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติโดยสถาบันวิจัยข้าวในปี พ.ศ. 2525 (นิรนาม, 2543) พันธุ์ข้าวพื้นเมืองพันธุ์หนึ่งในจำนวนนั้นของไทย ได้แก่ ทางยี่ 71 นับว่าเป็นแหล่งเชื้อพันธุ์ข้าวที่สำคัญอีกพันธุ์หนึ่งของไทยที่ได้จากการรวบรวมโดยพนักงานข้าว อ.เมือง จ.สกลนคร เมื่อปี พ.ศ. 2506 ปลูกคัดเลือกแบบคัดพันธุ์บริสุทธิ์ตามสถานีทดลองข้าวต่างๆ จนได้สายพันธุ์ทางยี่ 563-2-71 ต่อมาคณะกรรมการพิจารณาพันธุ์ให้ใช้ขยายพันธุ์เมื่อ พ.ศ. 2511 โดยเป็นพันธุ์ข้าวชนิดข้าวเหนียวให้ผลผลิตเฉลี่ย 506 กก./ไร่ พื้นที่แนะนำได้แก่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีคุณสมบัติต้านทานเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ (พูนศักดิ์และคณะ 2550) สำหรับการวิจัยในต่างประเทศ พบยีนต้านทานโรคไหม้ในระดับโมเลกุลได้แก่ *Pib* และ *Pi-ta* ที่ประกอบด้วย NBS และปลายด้าน C ของ LRR ซึ่งเป็นยีนต้านทานประเภทหนึ่งในข้าว (Song and Goodman, 2001) แต่อย่างไร้มีรายงานยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะต้านทานโรคไหม้ในพันธุ์ข้าวพื้นเมืองทางยี่ 71 ของไทย

ESTs หรือ expressed sequence tag เป็นลำดับเบสสายสั้นๆ (partial sequences) ที่ได้จากการหาลำดับเบสจากซีดีเอ็นเอโคลน (cDNA clones) หรือจากซีดีเอ็นเอไลบรารี (cDNA Library) โดยเป็นการหาลำดับเบสแบบทิศทางเดียว (single pass sequencing) ทั้ง

ทางด้านปลาย 5' หรือปลาย 3' โดย ESTs จะแสดงให้เห็นประจักษ์ของการแสดงออกของยีน ณ เวลาใดเวลาหนึ่งหรือในเนื้อเยื่อใดๆ ที่ต้องการศึกษา อีกทั้งเป็นวิธีการที่ใช้ในการค้นหายีนใหม่ๆ การทำแผนที่ยีน และการกำหนดหาบริเวณที่มีการแสดงออกของยีนในลำดับเบสจีโนม (genomic sequence) ทั้งนี้การหาลำดับเบสจากซีดีเอ็นเอไลบรารีเพื่อกำหนด EST เป็นวิธีการที่ง่ายและรวดเร็วในการหายีนที่มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อหรือเซลล์ต่างๆ (Yu *et al.*, 1998) ได้มีการวิจัยด้าน ESTs ในพืชชนิดต่างๆ เช่น วัชพืช (*Arabidopsis*) และข้าว (Ewing *et al.*, 1999-2000; Cooke *et al.*, 1996; Sasaki *et al.*, 1994) ถั่วเหลือง (Umezawa *et al.*, 2008) ฝ้าย (Yuan *et al.*, 2011) ผักกาดก้านขาว (Li *et al.*, 2004) พืชวงศ์แตงเมลอน (Clepet *et al.*, 2011) และองุ่นทำไวน์ (Tillett *et al.*, 2011) เป็นต้น สำหรับการวิจัยด้าน ESTs เพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างข้าวกับเชื้อราหลังปลูกเชื้อด้วยเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ หรือเพื่อใช้ในการค้นหายีนเชื้อราหรือยีนข้าวที่เกี่ยวข้องกับเข้าทำลายเซลล์พืช หรือยีนต้านทานในระยะเริ่มแรกของการปลูกเชื้อ ได้มีการศึกษาในหลายห้องปฏิบัติการด้วยกัน (Xu and Xue, 2002) เช่น เพื่อหายีนที่แสดงออกในช่วงเริ่มแรกของการปลูกเชื้อ (Kim *et al.*, 2001; Rauyaree *et al.*, 2001)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำข้าวพันธุ์ต้านทานเชื้อราโรคไหม้ทางยีน 71 มาใช้ในการศึกษาหายีนข้าวที่ตอบสนองต่อการเข้า

ทำลายด้วยเชื้อราโรคไหม้ ในระยะแรกของการเข้าทำลาย (early stages of rice infection) เพื่อระบุและวิเคราะห์ยีนที่อาจเกี่ยวข้องกับความต้านทานเชื้อราโรคไหม้ของพันธุ์ข้าวไทย ทั้งนี้สามารถนำข้อมูลที่ได้จากการวิจัยมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพ อีกทั้งอาจเป็นประโยชน์ต่อการนำยีนที่ได้มาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในขั้นตอนการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาในปฏิบัติการต้านทาน ได้แก่ ทางยีน 71 และปฏิบัติการอ่อนแอ ได้แก่ พันธุ์ กข 23 และ TN 1 (สำหรับใช้เป็นพันธุ์ควบคุมในขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค) สายพันธุ์เชื้อรา ได้แก่ สายพันธุ์ทุมธานี ขั้นตอนการทดลองการเตรียมเชื้อรา การปลูกพืชและทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค ดำเนินการที่งานโรคพืชวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร สำหรับการสร้างซีดีเอ็นเอไลบรารีและงานชีววิทยาโมเลกุลอื่นๆ ได้ปฏิบัติในห้องปฏิบัติการชีววิทยาโมเลกุลที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2548 – กันยายน พ.ศ. 2550 โดยมีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

1. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค
- การเตรียมเชื้อราที่ใช้ศึกษาและสภาพการเลี้ยงเชื้อ
- เลี้ยงเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ สายพันธุ์ทุมธานี จากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

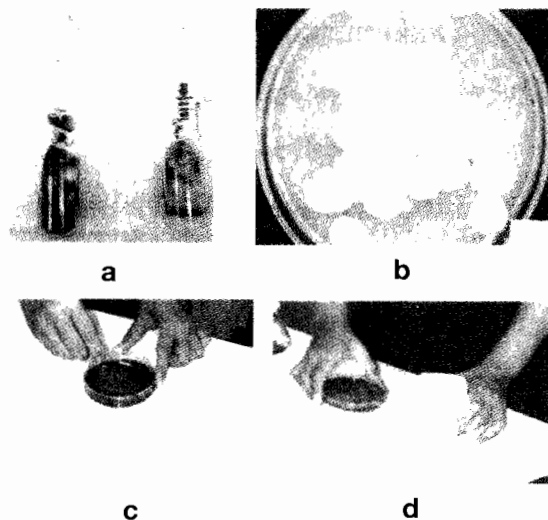


Figure 1. Fungal stock in PDA slant tubes (a), fungal growth (Pathum Thani strain) on an PDA agar plate (b), and fungal spore collection via sterile slide (c) and filtration via miracloth (d)

(Figure 1a) บนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ชนิดแข็งที่อุณหภูมิ 25 °ซ. ภายใต้แสงไฟฟลูออเรสเซนต์ เพื่อชักนำการสร้างสปอร์หรือโคนิเดีย (conidiation) เป็นเวลา 7 วัน (Figure 1b) สกัดสปอร์ออกจากเส้นใยเชื้อราด้วยสไลด์ปลอดเชื้อ และใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเพื่อชะสปอร์ กรองสปอร์เชื้อราบนผ้ากรองปลอดเชื้อ (miracloth) (Figures 1c และ 1d) แยกสปอร์ด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 14,000g (Spectrafuge16M Microcentrifuge, Labnet International, Madison, NJ, USA) ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นซ้ำ 3 ครั้ง ก่อนปรับความเข้มข้นเป็น 1×10^6 สปอร์/มล.

การปลูกเชื้อ

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษาในปฏิบัติการ

ด้านทาน ได้แก่ หางยี 71 และในปฏิบัติการอ่อนแอ ได้แก่ กข 23 และ TN 1 (สำหรับใช้เป็นพันธุ์ควบคุมในขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค) เพาะเมล็ดข้าวจำนวน 6-10 เมล็ด ในกระถางปลูกเหลี่ยมขนาดประมาณ 10 x 10 ซม. ซึ่งบรรจุส่วนผสมดินปลอดเชื้อที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ก่อนปลูกเชื้อด้วยการพ่นสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่ชูดอกจากจานวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ (Biobasic, Thailand) PDA ที่ความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์/มล. ที่ประกอบด้วย 0.25% polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate ให้ทั่วใบข้าว (ประมาณ 10 มล./กระถาง) (Figure 2) ย้ายกระถางเก็บไว้ในสภาพมืด ความชื้นสูงก่อนเก็บใบข้าวตามระยะเวลาที่กำหนดหลังการปลูกเชื้อที่ 6 และ 24 ชม. ก่อนเก็บใบข้าวเพื่อนำมาสกัดอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) ต่อไป

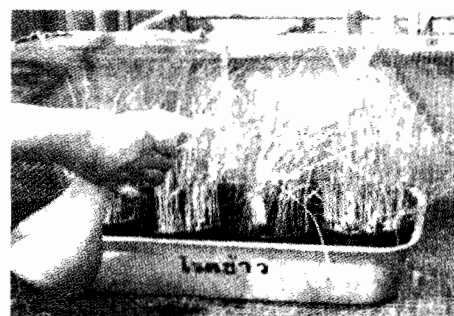


Figure 2. Artificial fungal spore inoculation by spraying method onto rice leaves

2. การจัดทำซีดีเอ็นเอไลบรารีข้าว (cDNA library construction)

พันธุ์ข้าวที่นำมาใช้สร้างซีดีเอ็นเอไลบรารี ได้แก่ หางยี 71 เริ่มต้นโดยใช้อาร์เอ็นเอรวมที่

สกัดได้จากใบข้าวอายุ 3 สัปดาห์ ที่ผ่านการปลูก
เชื้อด้วยเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ก่อนหน้านี้ เพื่อ
สร้างซีดีเอ็นเอ (complementary DNA,
cDNA) จากนั้นเชื่อมต่อ (ligation) ซีดีเอ็นเอที่
ได้เข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pBluescript II SK (+)
XR เพื่อสร้างซีดีเอ็นเอไลบรารีตามคำแนะนำ
คู่มือผู้ผลิต (pBluescript®II XR Library
Construction Kit, Stratagene, La Jolla, CA,
USA, Catalog #200455, Revision A.01,
Agilent Technologies, 2009) ทำการถ่ายฝาก
(transformation) ปฏิกริยาที่ได้จากการเชื่อมต่อ
เข้าสู่คอมพิเทนต์ (competent) เซลล์แบคทีเรีย
XL10 (XL10-Gold ultracompetent cells)
ตามคำแนะนำคู่มือผู้ผลิต (pBluescript®II XR
Library Construction Kit, Stratagene, La
Jolla, CA, USA, Agilent Technologies,
2009) โดยดูดคอมพิเทนต์เซลล์ปริมาตร
10 ไมโครลิตรลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว
SOC อุณหภูมิ 250 ไมโครลิตรก่อนเทลงบน
จานอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่ประกอบด้วยสารปฏิ
ชีวนะแอมพิซิลิน (100 ไมโครกรัม/มล.) 5-
Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Beta-D-Galactoside
(50 ไมโครกรัม/มล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร)
และ Isopropyl--D-1-thiogalactopyranoside
(100 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร/วัน
อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 25 มล. หลังบ่มจาน
อาหารเลี้ยงเชื้อในตูบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็น
เวลา 16 ชม. คัดเลือกและเลี้ยงโคลนเดี่ยว
สีขาว (โคลนที่ประกอบด้วยซีดีเอ็นเอสอดแทรก)
ลงในหลอดทดลองที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยง

เชื้อ LB เหลว (LB broth) ปริมาตร 2 มล. ที่
ประกอบด้วยสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินที่ความ
เข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล. เซย่าหลอดนานข้าม
คืนที่อุณหภูมิ 37°ซ. ด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที
ก่อนดูดสารละลายปริมาตร 1.5 มล. เพื่อนำมา
สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (plasmid DNA) ด้วย
คอลัมน์ ตามคำแนะนำคู่มือผู้ผลิต (Qiagen,
Plasmid Purification Handbook Valencia,
CA, USA, 2003) ตรวจสอบคุณภาพและ
ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอด้วย 1% อะกาโรส
“สแลบ” เจล (agarose “slab” gel) อิเล็กโตรโฟรีซิส
ผ่านกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) ในบัฟเฟอร์
1X tris-acetate EDTA พลาสมิดดีเอ็นเอที่มี
คุณภาพดีจะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ขนาดซีดี
เอ็นเอสอดแทรกและทำการลำดับเบสต่อไป

3. การหาขนาดซีดีเอ็นเอสอดแทรกเฉลี่ยด้วย การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

สุ่มพลาสมิดดีเอ็นเอจำนวน 10 โคลน
ที่มีคุณภาพดี โดยสังเกตบน 1% อะกาโรสเจล
(agarose gel) (Figure 4a) แล้วตัดพลาสมิดดี
เอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะคู่ *EcoRI* และ
XhoI เพื่อหาขนาดซีดีเอ็นเอสอดแทรกเฉลี่ยตาม
คำแนะนำคู่มือผู้ผลิต (Fermentas, USA) ตรวจสอบ
ขนาดพลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์โดย
การทำอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 1% อะกาโรสเจล
เทียบกับ 1 kb ดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ (1kb DNA
ladder, Fermentas, USA) ย้อมด้วยเอธิเดียม
โบรไมด์ ส่องดูแถบดีเอ็นเอและบันทึกผลภายใต้
แสงอัลตราไวโอเลต

4. การหาลำดับเบสซีดีเอ็นเอสอดแทรกด้วย เครื่องลำดับเบส (cDNA sequencing)

นำตัวอย่างซีดีเอ็นเอจากไลบรารี OsHY71/EST24 มาใช้ในขั้นตอนหาลำดับเบส จำนวน 25 ตัวอย่าง ผ่านเครื่องลำดับเบส อัตโนมัตินี้ ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer, CA, USA) โพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลำดับเบส ได้แก่ โพรเมอร์ T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') นำพลาสมิดซีดีเอ็นเอที่เตรียมได้เป็นดีเอ็นเอเทมเพลต (DNA template) ในปฏิกิริยาลำดับเบสปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตรที่ประกอบด้วย BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Perkin-Elmer, CA, USA) และโพรเมอร์เข้มข้น 3.2 พิโคโมล (pmole) รอบปฏิกิริยาการสังเคราะห์ลูกโซ่โพลีเมอเรสในการลำดับเบส ได้แก่ 30 รอบของ 96°ซ./10 วินาที 50°ซ./5 วินาที และ 60°ซ./4 นาที ขึ้นต้นด้วย 96°ซ./10 วินาที ในเครื่องทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส Gene Amp PCR system 9700 (applied biosystems, Foster, CA, USA)

5. การวิเคราะห์ลำดับเบสและเปรียบเทียบกับ ฐานข้อมูลชีวภาพสากลด้วยชีวสารสนเทศ ศาสตร์ (bioinformatics)

ขจัดลำดับเบสโพรเมอร์ ลำดับเบสพลาสมิดเวกเตอร์ ลำดับเบสออกดาพเตอร์และลำดับเบสที่ไม่ถูกต้อง (unambiguous sequence) ด้วยโปรแกรม DNASTar expert sequence analysis software (DNASTAR, Inc, USA)

ตามคำแนะนำคู่มือผู้ผลิต เปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้จาก OsHY71/EST24 จำนวน 25 ตัวอย่าง (clone codes : PS 1330 ถึง PS 1554) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลชีวภาพสากลผ่านโปรแกรมอัลกอริทึม (blast algorithm/gapped BLASTX version 2.2.25+) (Altschul et al., 1997) ที่เว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ของ NCBI (National Centre for Biotechnology Information) ฐานข้อมูลที่ใช้ในการกำหนดหน้าที่ของลำดับกรดอะมิโนในแต่ละตัวอย่าง ได้แก่ ฐานข้อมูลโปรตีน (GenBank non-redundant protein sequences database) บันทึกรายละเอียดยีนพร้อมระดับความเหมือน (similarity) ที่ปรากฏ นำลำดับเบสที่ได้จากการศึกษานี้ในรูป FASTA จำนวนทั้งหมด 25 ตัวอย่าง ไปฝากไว้ในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้หมายเลขเข้าถึงหรือ sequence accession number ตั้งแต่ EX 493715 ถึง EX 493739 โคลนที่มีระดับความเหมือนสูงมีค่าทางสถิติ $p\text{-value} \leq e^{-30}$ โคลนที่มีระดับความเหมือนปานกลางมีค่าทางสถิติ e^{-3} ถึง e^{-29} และโคลนที่มีระดับความเหมือนต่ำมีค่าทางสถิติ $\geq e^{-2}$ (ค่า $p\text{-value}$ คือความน่าจะเป็น (probability) หรือค่าระดับนัยสำคัญทางสถิติที่น้อยที่สุดที่จะยอมรับสมมุติฐานหลัก และค่า $e\text{-value}$ คือค่าคาดหวัง (expected value) ในการเกิดการสอดคล้องกันของลำดับเบสที่ต้องการ (query) เมื่อเทียบกับลำดับเบสที่ปรากฏในฐานข้อมูลชีวภาพสากล (subject) โดยบังเอิญ (by chance) ซึ่งค่า $e\text{-value}$ เป็นค่าที่ได้จากการค่า

คำนวณ หรือคะแนนเชิงสถิติโดยขึ้นอยู่กับคุณภาพการเปรียบเทียบลำดับเบสนำมาใช้เปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ปรากฏในฐานข้อมูลและเปอร์เซ็นต์ max identity หมายถึงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูงสุดที่ได้จากคู่ลำดับเบสที่ต้องการเปรียบเทียบ (blast input หรือ query) กับลำดับเบสที่ได้ (matched sequences หรือ subject) ที่มีความเหมือนหรือคะแนนความเหมือนสูงสุด (high scoring pairs) ที่อยู่ในช่วงการเปรียบเทียบ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคและการสร้างซีดีเอ็นเอไลบรารีข้าว

ซีดีเอ็นเอไลบรารีที่นำมาใช้สร้างไลบรารีเป็นไลบรารีที่ได้จากใบข้าวอายุ 3 สัปดาห์ที่ผ่านการปลูกเชื้อตามระยะเวลาที่กำหนด ในระยะนี้อาการของโรคบนใบข้าว เริ่มปรากฏเป็นจุดสีดำซึ่งไม่มีการนำเสนอข้อมูล คุณภาพอาร์เอ็นเอมีความบริสุทธิ์ดีที่จะนำมาใช้ในการสร้างไลบรารีได้ต่อไป สังเกตได้จากแถบ rRNA ที่คมชัด (Figure 3a) และมีอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสง OD_{260/280} ที่ 1.8 - 2.0 ตรวจสอบการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอสายแรก (first-stranded cDNA) และซีดีเอ็นเอสายสอง (second-stranded cDNA) เป็นไปอย่างสมบูรณ์โดยสังเกตเห็นเป็นแถบเด่นชัดบน 1% อะกาโรสเจล (Figure 3b)

2. การหาขนาดซีดีเอ็นเอสอดแทรกเฉลี่ยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ไลบรารีมีขนาดซีดีเอ็นเอสอดแทรกที่แตกต่างกัน หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะคู่ *EcoRI* และ *XhoI* (Figure 4b) โดยไลบรารีพันธุ์ข้าวทางยี่ 71 OSHy71/EST6 มีขนาดซีดีเอ็นเอสอดแทรกเฉลี่ยที่ 2.5 กิโลเบส (kb) และ OSHy71/EST24 มีขนาดซีดีเอ็นเอสอดแทรกเฉลี่ยที่ 1.5 กิโลเบส แถบดีเอ็นเอแฉกบนแสดงดีเอ็นเอเวกเตอร์ที่มีขนาด 3 กิโลเบส

3. การวิเคราะห์ลำดับเบสและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล

ลำดับเบสของซีดีเอ็นเอที่ได้จากไลบรารี OSHy71/EST24 จำนวน 25 ตัวอย่าง มีขนาดเล็กสุดที่ 199 bp [PS1344] และขนาดใหญ่สุดที่ 1,190 bp [PS1330] ตรวจสอบคุณภาพลำดับเบสที่ได้จากเครื่องลำดับเบสโดยใช้โครมาโตแกรมโฟลบบนเครื่องลำดับเบส (ABI Prism chromas, ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer, CA, USA)) (Figure 5) นำลำดับเบสทั้งหมดไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล BLASTx (แปลรหัสนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน) โดยตัวอย่างซีดีเอ็นเอใดที่มีความเหมือนอย่างสูงกับฐานข้อมูลระบุไว้เป็นผลบวก (ปรากฏชนิดโปรตีนในฐานข้อมูล) หรือผลลบ (ไม่ปรากฏชนิดโปรตีนในฐานข้อมูล) (Table 1) ณ เวลาที่ทำการวิเคราะห์ผลการทดลอง พบว่ามีเพียง 2 ตัวอย่าง (8 %) ที่ไม่พบชนิดโปรตีนในฐานข้อมูล (หมายเลข PS 1334 และ PS 1336) เป็นไปได้ว่าตัวอย่างซีดีเอ็นเอ 2 ตัวอย่างนี้เป็นยีนชนิดใหม่ที่ยังไม่พบ

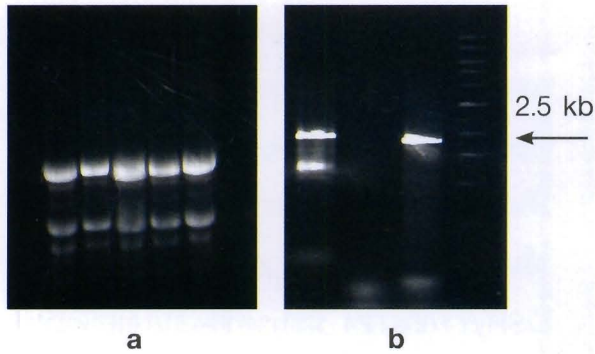


Figure 3. Denaturing agarose gel that shows the quality of total RNAs extracted from infected rice leaves (a), and completed first-stranded and second-stranded cDNA synthesis from messenger RNA (mRNA) using reverse transcriptase (b)

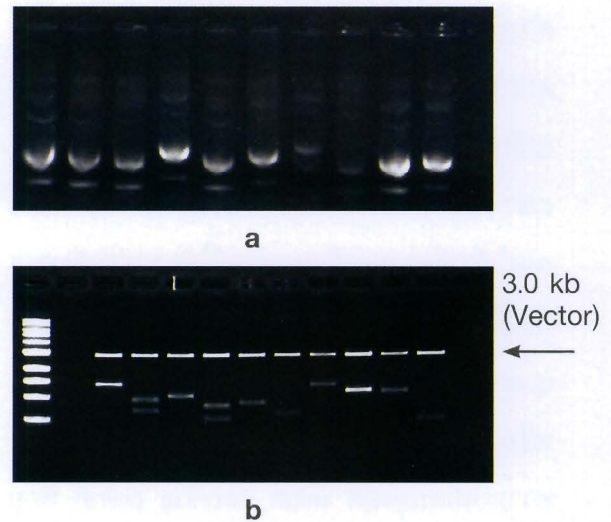


Figure 4. Plasmid DNAs extracted from cDNA library (a), insert sizes from random 10 cDNA clones from the cDNA library after digestion with restriction enzymes *EcoRI* and *XhoI* (b)

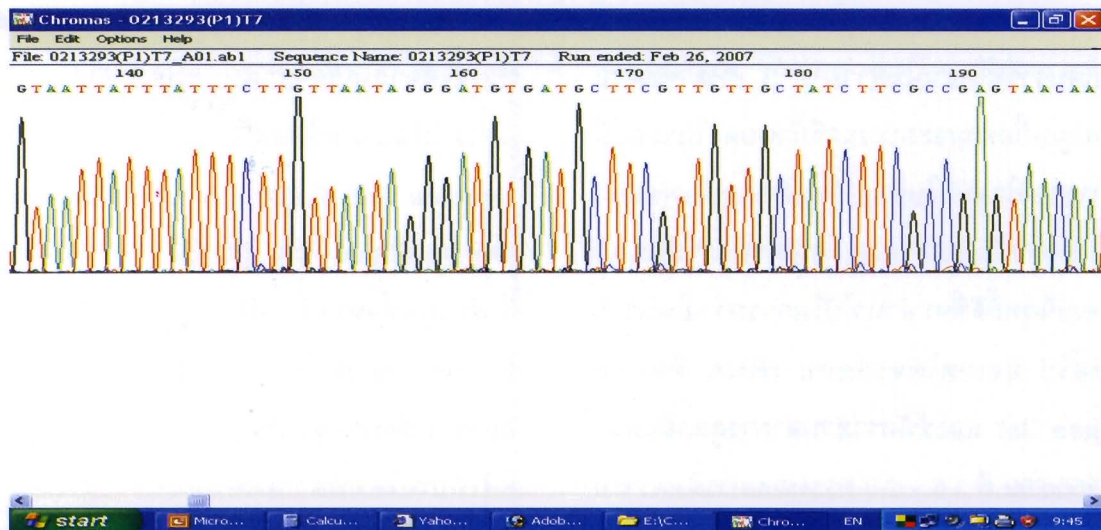


Figure 5. Chromatogram of DNA sequence obtained from chosen cDNA clone analyzed by automated DNA sequencer.

มีรายงานในฐานข้อมูลว่า บางชนิดอาจมีความเกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคไหม้ของข้าว ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาในรายละเอียดต่อไป

การเปรียบเทียบขนาดซีดีเอ็นเอโคลนที่มีความเหมือนกับโปรตีน ที่ปรากฏในฐานข้อมูลชีวภาพสากล ผลการทดลองปรากฏโปรตีนที่ไม่

Table 1. Clone code having various insert sizes and hits (shows similarity) in database

Clone code	Insert size (nt)	Hit in database ^{1/}
PS 1330	1,190	+
PS 1331	1,177	+
PS 1332	588	+
PS 1333	611	+
PS 1334	520	-
PS 1335	1,182	+
PS 1336	1,146	-
PS 1337	902	+
PS 1338	489	+
PS 1339	327	+
PS 1340	513	+
PS 1341	302	+
PS 1342	872	+
PS 1343	662	+
PS 1344	199	+
PS 1345	406	+
PS 1346	352	+
PS 1347	384	+
PS 1348	1,162	+
PS 1349	1,123	+
PS 1350	1,052	+
PS 1351	746	+
PS 1352	454	+
PS 1353	298	+
PS 1354	662	+

^{1/} + = (cDNA clones that show similarity with genes submitted in GenBank database)

- = (cDNA clones that show no similarity with genes submitted in GenBank database)

ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน (hypothetical protein) จำนวน 11 ตัวอย่างหรือ 44% โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนส่วนใหญ่อยู่ในเปอร์เซ็นต์ที่สูง และอีกจำนวน 12 ตัวอย่างหรือ 48% พบว่ามีความเหมือนกับยีนทราบหน้าที่ ณ เวลาที่ทำการวิเคราะห์ผลการทดลอง เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ยีนต้านทาน เช่น ตัวอย่างหมายเลข EX 493729 ที่มีความเหมือนอย่างสูงในระดับโปรตีน putative NBS-LRR resistance protein (RGH 1) ในข้าว (Sasaki *et al.*, 2001) ซึ่งจัดเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ตอบสนองในลักษณะต้านทานโรคในพืช (Hammond-Kosack and Jones, 1997; Belkhader *et al.*, 2004) (Table 2) และในตัวอย่างหมายเลข EX 493736 ที่มีความเหมือนค่อนข้างสูงกับยีนต้านทาน RPM 1 ในข้าว (Boyes *et al.*, 1998) ตัวอย่างซีดีเอ็นเอมีความเหมือนกับยีนที่มีการแสดงออกในช่วงที่มีสภาพแวดล้อมทางกายภาพที่ไม่เหมาะสมและในช่วงพัฒนาการของพืช (development stage) ยีนดังกล่าว ได้แก่ NAC2 หรือ NAM-like protein (Sourer *et al.*, 1996) ในตัวอย่างหมายเลข EX 493730 ซึ่งการศึกษาในทั้งสองชนิดในเชิงการแสดงออกทางปัจจัยชีวเคมีในรายละเอียดต่อไป จะเป็นอีกหนทางหนึ่งที่ช่วยเพิ่มความเข้าใจปฏิสัมพันธ์ระหว่างข้าวกับเชื้อรา

การศึกษานี้ยังสามารถระบุกลุ่มยีนได้หลายชนิดด้วยกัน โดยตัวอย่างหมายเลข EX 493718 มีความเหมือนกับยีนยูบิควิติน Upl1 (Ubiquitin protease-like protein 1) (Sasaki *et al.*, 2002) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับองค์

Table 2. EST name and clone codes that show similarity to nucleotide sequences in GenBank database using BLASTx similarity search protein database.

EST name/ clone code	GenBank accession numbers	Putative identity	P- value ^{1/}	Max identity ^{2/} (%)
OSHy71/EST 24(PS 1330)	EX 493715	<i>Oryza sativa</i> L. ypothetical protein	1e-05	88
OSHy71/EST 24(PS 1331)	EX 493716	<i>Oryza sativa</i> hypothetical protein	1e-72	98
OSHy71/EST 24(PS 1332)	EX 493717 ^{*/}	(<i>Oryza sativa</i> chromosome 12) / (hypothetical protein)	0.0	100
OSHy71/EST 24(PS 1333)	EX 493718	<i>Oryza sativa</i> Ulp1 protease-like protein	4e-16	95
OSHy71/EST 24(PS 1334)	EX 493719 ^{*/}	(<i>Oryza sativa</i> chromosome 10 BAC OSJNBb0015111 genomic sequence) / No significant similarity found	7e-103	81
OSHy71/EST 24(PS 1335)	EX 493720	<i>Oryza sativa</i> hypothetical protein / glycosylphosphatidylinositol anchor attachment 1-like protein	2e-163	99
OSHy71/EST 24(PS 1336)	EX 493721 ^{*/}	(<i>Oryza sativa indica</i> Retrosat 1 / retrotransposon และ Ty 3 Gypsy type Retrosat 2 retrotransposon) / No significant similarity found	2e-95	95
OSHy71/EST 24(PS 1337)	EX 493722	Hypothetical protein / retrotransposon protein	3e-71	95
OSHy71/EST 24(PS 1338)	EX 493723	<i>Oryza sativa</i> hypothetical protein	1e-28	92
OSHy71/EST 24(PS 1339)	EX 493724	<i>Sorghum bicolor</i> L. hypothetical protein	3.5	31
OSHy71/EST 24(PS 1340)	EX 493725	<i>Sorghum bicolor</i> hypothetical protein	0.12	44
OSHy71/EST 24(PS 1341)	EX 493726	Hypothetical protein (Stigmatella aurantiaca)	5.5	45
OSHy71/EST 24(PS 1342)	EX 493727	<i>Oryza sativa</i> hypothetical protein	1e-41	98
OSHy71/EST 24(PS 1343)	EX 493728 ^{*/}	(<i>Oryza sativa Japonica</i> Group chromosome 5) / <i>Sorghum bicolor</i> hypothetical protein / Hypothetical protein	0 / 6e-22	96 / 83
OSHy71/EST 24(PS 1344)	EX 493729	Putative NBS-LRR resistance gene RGH1 (<i>Oryza sativa</i>)	1e-18	100
OSHy71/EST 24(PS 1345)	EX 493730	<i>Oryza sativa</i> putative NAC2 protein / NAC transcription factor NTL5 (<i>Triticum aestivum</i> L.) / NAM-like protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	2e-09 / 2e-09 / 1.5	100 / 100 / 44
OSHy71/EST 24(PS 1346)	EX 493731 ^{*/}	(<i>Oryza sativa Japonica</i> Group chromosome 11) / (spermatid maturation protein 1- like) / predicted protein	9e-105	96
OSHy71/EST 24(PS 1347)	EX 493732	<i>Sorghum bicolor</i> hypothetical protein / probable cytochrome P 450 monooxygenase (maize)	1e-40 / 2e-32	98 / 95

Table 2. (cont.)

EST [*] name/ clone code	GenBank accession numbers	Putative identity	P- value ^{1/}	Max identity ^{2/} (%)
OSHy71/EST 24(PS 1348)	EX 493733	<i>Oryza sativa</i> putative transposon protein (transposase)	0.0	80
OSHy71/EST 24(PS 1349)	EX 493734 ^{1/}	(rice chloroplast)/ hypothetical protein	0.0	96
OSHy71/EST 24(PS 1350)	EX 493735	Enamelin (<i>Procapra capensis</i>)	8.0	47
OSHy71/EST 24(PS 1351)	EX 493736	<i>Oryza sativa</i> hypothetical protein / RPM1	1e-100 / 2e-29	92 / 40
OSHy71/EST 24(PS 1352)	EX 493737	(alpha)-aspartyl dipeptidase (<i>Alteromonas</i> sp.) (<i>Alteromonas</i> sp. SN2)	9.9	35
OSHy71/EST 24(PS 1353)	EX 493738 ^{1/}	(<i>Oryza sativa</i> Japonica Group genomic DNA, chromosome 2) / (putative secreted protein)	3e-91	93
OSHy71/EST 24(PS 1354)	EX 493739	<i>Oryza sativa</i> hypothetical protein	1e-100	92

* EST (expressed sequenced tag)

^{1/} High similarity (clones that have p-value <= e-30)

Moderate similarity (clones that have p-value e-3 to e-29)

Low similarity (clones that have p-value >= e-2)

^{2/} Max identity (%) or alignment length refer to the alignment of the BLAST input (query) sequence to its matched (subject) sequence and indicate the maximum percentage of identical nucleotides or amino acids within the noted alignment length. (Altschul et al., 1997)

* Clone codes used for BLASTn (nucleotide similarity search) and putative identity of each search result obtained from BLASTn is shown in parenthesis.

ประกอบโครงสร้างของเซลล์ และเป็นโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่มีความเหมือนอย่างมาก (conserved) ในสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอตที่มีหน้าที่ค่อนข้างหลากหลายด้วยกัน (Hochstrasser, 2000) ตัวอย่างหมายเลข EX 493720 มีความเหมือนกับโปรตีนไกลโคซิลฟอสฟาติดีลอินอสitol anchor attachment 1-like protein) ซึ่งสามารถพบยีนนี้ได้ทั้งในข้าวและวัชพืชอะราบิดอซิส (Eisenhaber

et al., 2003) ตัวอย่างหมายเลข EX 493732 มีความเหมือนกับโปรตีนไซโตโครมพี 450 โมโนออกซิเจเนส (probable cytochrome P 450 monooxygenase) ตัวอย่างหมายเลข EX 493733 มีความเหมือนกับทรานส์โพซอนโปรตีน (putative transposon protein หรือ transposase) และตัวอย่างหมายเลข EX 493722 มีความเหมือนกับโปรตีนรีโทรทรานส์โพซอน (retrotransposon protein) ทั้งสองโปรตีนเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้อง

กับทรานส์โพซิเบิลเอลิเมนต์ (transposable element) ในข้าว (Feschotte *et al.*, 2003) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบมีรายงานการแสดงออกในระยะตอบสนองต่อการเข้าทำลายด้วยเชื้อสาเหตุหลายชนิดด้วยกัน และตัวอย่างหมายเลข EX 493734 มีความเหมือนกับยีนคลอโรพลาสต์ในข้าว ซึ่งเป็นโครงสร้างของเซลล์พืชที่จำเป็นในกระบวนการสังเคราะห์แสง

ในการวิเคราะห์ลำดับเบสและเปรียบเทียบความเหมือนกับยีนที่ปรากฏในฐานข้อมูลไม่พบยีนที่มีความเหมือนที่จำเพาะกับยีนที่ได้จากเชื้อรา ยกเว้นยีนที่ปรากฏพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตยูคาริโอต เช่น ยูบิควิติน เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับระยะเวลาที่เลือกนำใบข้าวที่ระยะ 6 และ 24 ชม. หลังการปลูกเชื้อ ซึ่งยังเป็นระยะที่มีปริมาณเชื้อราน้อย (fungal biomass) และเชื้อราอยู่ในระยะเริ่มแรกของการปลูกเชื้อ (early stage of infection) โดยระยะนี้พืชจะเริ่มตอบสนองต่อการปลูกเชื้อ ลำดับเบสที่ได้จากการศึกษานี้ในรูป FASTA จำนวนทั้งหมด 25 ตัวอย่าง ได้นำไปฝากไว้ในฐานข้อมูล NCBI ภายใต้หมายเลขเข้าถึง (GenBank accession number) EX 493715 - EX 493739

ผลที่ได้แสดงว่าไลบรารีที่สร้างขึ้นในการทดลองนี้ เป็นตัวแทนไลบรารีข้าวที่มีการแสดงออกของยีนที่สอดคล้องกับยีนที่ได้จากรายงานก่อนหน้านี้ได้เป็นอย่างดี โดยสามารถระบุยีนที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูลได้ ทั้งนี้ผลการลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถระบุยีนที่มีการแสดงออก หรือตอบสนองในปฏิกิริยาด้านทาน

ระหว่างข้าวทางยี่ 71 กับเชื้อราสาเหตุโรคไหม้ในข้าวพันธุ์ปทุมธานีได้ ข้อมูลที่ได้จึงเป็นอีกหนึ่งแนวทางที่ช่วยให้นักวิชาการมีข้อมูลเพิ่มเติมในการนำข้อมูลยีนที่ได้ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหรือพืชอื่นๆ ต่อไปในอนาคต

สรุปผลการทดลอง

ไลบรารีพันธุ์ข้าวทางยี่ 71 (พันธุ์ด้านทาน) ในระยะปลูกเชื้อที่ 6 และ 24 ชม. ใบข้าวมีลักษณะจุดสีดำ ไลบรารี OsHY71/EST6 และ OsHY71/EST24 มีขนาดซีดีเอ็นเอสอดแทรกเฉลี่ยหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะคู่ *EcoRI* และ *XhoI* ที่ 2.5 และ 1.5 กิโลเบส โดยประมาณ ลำดับเบสซีดีเอ็นเอจำนวน 25 ตัวอย่างจากไลบรารี OsHY71/EST24 มีขนาดตั้งแต่ 199 - 1,190 bp มีเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างซีดีเอ็นเอที่ไม่พบมีความเหมือนกับยีนในฐานข้อมูลอยู่ที่ 8% ยีนที่ปรากฏพบมีความเหมือนกับตัวอย่างซีดีเอ็นเอมากที่สุด ได้แก่ โปรตีนที่ไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด (hypothetical protein) หรือคิดเป็น 44% ของตัวอย่างซีดีเอ็นเอทั้งหมด ส่วนตัวอย่างซีดีเอ็นเอที่เหลืออีก 48% พบมีความเหมือนกับยีนที่ปรากฏมีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล NCBI ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการจับตัวหรือการนำพาภายในเซลล์ รีโทรทรานส์โพซอนส์ เอนไซม์ องค์ประกอบของเซลล์ และโปรตีนไม่ทราบชนิด ที่สำคัญรวมทั้งยีนด้านทานในพืช NBS-LRR (RGH 1) และ RPM 1 ที่มีรายงานผลการวิจัยก่อนหน้านี้

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่งานโรคพืชวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร สำหรับงานทดสอบโรคและอำนวยความสะดวกโรงปฏิบัติการ และฝ่ายวิชาการกรมการข้าว สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ในการอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษา และขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตร ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- นิรนาม. 2543. *บทความพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทย*. สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติและศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 215 หน้า.
- นิรนาม. *บทความพันธุ์ข้าวนาสวนไผ่ต่อช่วงแสง องค์ความรู้เรื่องข้าว (Rice Knowledge Bank) ทางยี่ 71 (Hahng Yi 71)*. กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ http://www.brrd.in.th/rkb/data__002/a1/rice__xx2-03__ricebreed__Hahng_Yi_71.html, 28/8/2554.
- พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์. 2547. *บทความการจัดงานวันแนะนำข้าวหอมมะลิสายพันธุ์ใหม่ด้านทานโรคไหม้*. ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี กรมวิชาการเกษตร. http://ubn/ricethailand.go.th/document/poonsak/f-day/f-day/HTML_5/9/2551.
- พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ พยอม โคเบลล์ อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ ถนอมจิตร ฤทธิมนตรี กุลธนา เกศสุวรรณ ธนสิริน กลิ่นมณี สงวน เทียงดีฤทธิ. 2550. การตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวของข้าวในประเทศไทย. *ว.ข้าว* 1(1):52-64.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Shaffer, Z. Zhang, J. Zhang, W. Miller and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Boyes, D.C., J. Nam and, J.L. Dangl. 1998. The *Arabidopsis thaliana* RPM 1 disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 15849-15854.
- Belkhadir, Y., R. Subramaniam and J.L. Dangl. 2004. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR protein and their partners. *Current Opinion in Plant Biol.* 7:391-399.
- Clepet, C., T. Joobeur, Y. Zheng, D. Jublot, M. Huang, V. Truniger, A. Boualem, M.E. Hernandez-Gonzalez, R. Dolcet-Sanjuan, V. Portnoy, A. Mascarelli-Creus, A.I. Cao-Delgado, N. Katzir, A.

- Bendahmane, J.J. Giovannoni, M.A. Aranda, J. Garcia-Mas., Z. Fei. 2011. Analysis of expressed sequence tags generated from full-length enriched cDNA libraries of melon. *BMC Genomics* 20: 12:252.
- Cooke, R., M. Raunal, M. Laudie, M. Grellet, M. Delsyny, P.C. Morris, D. Guerrier, J. Giraudat, F. Quigley, G. Clabault, Y.F. Li, R. Mache, M. Krivitzky, J.J. Gy, M. Kreis, A. Lecharny, Y. Parmentier, J. Marbach, J. Fleck, B. Clement, G. Phillipps, C. Herve, C. Bardet, D. Tremousaygue, B. Lescure, C. Lecomme, D. Roby, M.F. Jourion, P. Chabrier, J.L. Charpentreau, T. Desprez, J. Amselem, H. Chiapello and H. Hofte. 1996. Further progress towards a catalogue of all *Arabidopsis* genes: analysis of a set of 5000 non-redundant ESTs. *The Plant J.* 9: 101-124.
- Eisenhaber, B., Wildpaner, M., Chultz, T.J., Borner, G.H.H., Dupree, P., and F. Eisenhaber. 2003. Glycosylphosphatidylinositol lipid anchoring of plant proteins, sensitive prediction from sequence- and genome-wide studies for *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* 133(4): 1691-1701.
- Ewing, R., Poirot, O., and J.M. Claverie. 1999-2000. Comparative analysis of the *Arabidopsis* and rice expressed sequences tag (EST) sets. *In Silico Biol.* 1(4): 197-213.
- Feschotte, C., L. Swamy and S.R. Wessler. 2003. Genome-wide analysis of mariner-like transposable elements in rice reveals complex relationships with *Stowaway* miniature inverted repeat transposable elements (MITEs). *Genetics* 163: 747-758.
- Hammond-Kosack, K.E. and J.D.G. Jones. 1997. Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 48: 575-607.
- Hochstrasser, M. 2000. All in the ubiquitin family. *Sci.* 289, 563-564.
- Kim, S., I.P. Ahn and Y.H. Lee. 2001. Analysis of genes expressed during rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 1,340-1,346.
- Li, R., R. Rimmer, L. Buchwaldt, A.G. Sharpe, G. Sguin-Swartz, C. Coutu, D.D. Hegedus. 2004. Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* with a resistant *Brassica napus* cultivar: expressed sequence tag analysis

- identifies genes associated with fungal pathogenesis. *Fungal Genet Biol.* 41(8):735-53.
- Rauyaree, R., W. Choi, E. Fang, B. Blackmon and R.A. Dean. 2001. Genes expressed during early stages of rice infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant Pathol.* 2: 347-354.
- Sasaki, T., J. Song, Y. Koga-Ban, E. Matsui, F. Fang, H. Higo, H. Nagasaki, M. Hori, M. Miya, E. Murayama-Kayano, T. Takiguchi, A. Takasuga, T. Niki, K. Ishimaru, H. Ikeda, Y. Yamamoto, Y. Mukai, T. Ohta, I. Miyadera. and Y. Minobe. 1994. Toward cataloguing all rice genes: large-scale sequencing of randomly chosen rice cDNAs from a callus cDNA library. *The Plant J.* 6:615-624.
- Sasaki, T., T. Matsumoto and K. Yamamoto. 2001. *Oryza sativa* Nipponbare (GA3) Genomic DNA, Chromosome 8, BAC clone. OJ1006__H01. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, 29/8/2011.
- Sasaki, T., T. Matsumoto and K. Yamamoto. 2002. *Oryza sativa* Nipponbare (GA3) Genomic DNA, Chromosome 6, PAC clone: P064ODO1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, 29/8/2011.
- Smitamana, P., P. Gypmantasiri, W. Phumsathit, S. Panyafu, C. Boonchitsirikul, and A. Na Lampang. 2000. Biodiversity of blast pathogens and implication for blast management, Page 169-179. In : *Proceedings of Impact Symposium on Exploiting Biodiversity for Sustainable Pest Management*. 21-23 August 2000, Kunming Hotel, Kunming, China.
- Song, F., and R.M. Goodman. 2001. Molecular biology of disease resistance in rice. *Physiol. Molec. Plant Pathol.* 59: 1-11.
- Souer, E., van Houwelingen, A., Kloos, D., J. Mol and R. Koes. 1996. The no apical meristem gene of petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordial boundaries. *Cell* 85: 159-170.
- Tillett, R.L., A. Ergl, R.L. Albion, K.A. Schlauch, G.R. Cramer, J.C. Cushman. 2011. Identification of tissue-specific, abiotic stress-

- responsive gene expression patterns in wine grape (*Vitis vinifera* L.) based on curation and mining of large-scale EST data sets. *BMC Plant Biol.* 11:86.
- Umezawa, T., T. Sakurai, Y. Totoki, A. Toyoda, M. Seki, A. Ishiwata, K. Akiyama, A. Kurotani, T. Yoshida, K. Mochida, M. Kasuga, D. Todaka, K. Maruyama, K. Nakashima, A. Enju, S. Mizukado, S. Ahmed, K. Yoshiwara, K. Harada, Y. Tsubokura, M. Hayashi, S. Sato, T. Anai, M. Ishimoto, H. Funatsuki, M. Teraishi, M. Osaki, T. Shinano, R. Akashi, Y. Sakaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki. 2008. Sequencing and analysis of approximately 40,000 soybean cDNA clones from a full-length-enriched cDNA library. *DNA Res.* 15(6):333-346.
- Xu, J-R and C.,Xue. 2002. Time for a blast: genomics of *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant Pathol.* 3(3): 173-176.
- Yuan, D., L. Tu and X. Zhang. 2011. Generation, Annotation and Analysis of First Large-scale Expressed Sequence Tags from Developing Fiber of *Gossypium barbadense* L. *PLoS One* ; 6(7):e22758.doi:10.1371/journal.pone.0022758, 29/8/2011.
- Yu, H.J., M.S. Moon, H-S. Lee, J.H. Mun, Y.M. Kwon and S.G. K. 1999. Analysis of cDNAs expressed during first cell division of petunia petal protoplast cultures using expressed sequenced tags. *Mol. Cells* 9(3):258-264.