วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 41(2): 26-40

การตรวจสอบยีนต้านทานและการประเมินความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองที่ปลูกในบางพื้นที่ของภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย

Detection and Evaluation of Resistance against Bacterial Blight Disease in Thai Local Rice Varieties Grown in Some Areas of Lower Northern Thailand

สโรชา ทวาทศปกรณ์[1] เดช วัฒนชัยยิ่งเจริญ[2] สิทธิชัย อุดก่ำ[3] และวันดี วัฒนชัยยิ่งเจริญ[4*]

Sarocha Thawathotsapakorn[1], Det Wattanachaiyingcharoen[2], Sittichai Urtgam[3] and Wandee Wattanachaiyingcharoen[4*]

[1]สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

[2]ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

[3]สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม พิษณุโลก 65000

[4]ภาควิชาชีววิทยาและสถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านความหลากหลายทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

[1]Biological Sciences Program, Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000

[2]Department of Agricultural Sciences, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000

[3]Biology Program, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, Thailand 65000

[4]Department of Biology and Center of Excellence in Biodiversity, Faculty of Science Naresuan University Phitsanulok, Thailand 65000

*Corresponding author: wandeew@nu.ac.th

Received: *September 14, 2023*
Revised: *February 08, 2024*
Accepted: *February 22, 2024*

Abstract

Local rice varieties possess a wide range of genetic diversities, can adapt to their environment, and exhibit resistance to severe diseases such as bacterial blight. Rice crop production in Thailand is affected by this disease caused by the bacterial pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*). This study aimed to use particular primers (*xa5, Xa21, Xa33* (RMWR 7.1), and *Xa33* (RMWR 7.6) to detect bacterial blight resistance genes in 20 local rice varieties growing in lower northern Thailand. Additionally, the level of resistance to this disease was evaluated. The findings revealed that, with the exception of Phichit rice, 19 local rice types possessed the *xa5* bacterial blight resistance gene. The resistance to *Xoo* across all tested local rice types ranged from highly resistant (HR) to moderately sensitive (MS). Moreover, results for genes *Xa21, Xa33*(RMWR 7.1), and *Xa33*(RMWR 7.6) were comparable since each rice variety displayed a distinct degree of resistance regardless of whether it had

a resistance gene or not. Whilst the Khat Na Pho variety demonstrated high level of resistance to the bacterial blight disease, Hom Khrua, Lon Khrok, Thong Yoi, Phut Tam, and Phuang Kradat also demonstrated resistance levels (R). These six local rice varieties could be employed as germplasm in a future breeding program for rice.

Keywords: bacterial blight, local rice varieties, DNA markers, bacterial blight resistance genes

บทคัดย่อ

ข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม รวมทั้งทนทานต่อโรคที่สำคัญได้ดี โรคขอบใบแห้ง (Bacterial blight disease) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) และส่งผลกระทบต่อการผลิตข้าวในประเทศไทย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งในข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองที่ปลูกในบางพื้นที่ของภาคเหนือตอนล่าง จำนวน 20 สายพันธุ์ โดยใช้ไพร์เมอร์จำเพาะ (*xa5*, *Xa21*, *Xa33*(RMWR 7.1) และ *Xa33*(RMWR 7.6)) และประเมินระดับความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุ *Xoo* ผลการศึกษาพบว่าข้าวสายพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 19 สายพันธุ์ มียีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *xa5* ยกเว้นข้าวพิจิตร และเมื่อประเมินระดับความต้านทานต่อเชื้อ *Xoo* พบว่าข้าวมีระดับความต้านทานตั้งแต่ต้านทานสูง (HR) ไปจนถึงอ่อนแอปานกลาง (MS) ส่วนผลการตรวจสอบยีน *Xa21, Xa33*(RMWR 7.1) และ *Xa33*(RMWR 7.6) ให้ผลไปในลักษณะเดียวกัน คือ ข้าวแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในระดับที่แตกต่างกัน และพบว่าข้าวคัดนาโพธิ์ มีความสามารถในการต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในระดับสูง (HR) ส่วนข้าวหอมครัว ข้าวล้นครก ข้าวทองย้อย ข้าวพุดตำ และข้าวพวงกระดาษ มีความต้านทาน (R) ซึ่งข้าวสายพันธุ์เหล่านี้สามารถนำไปเป็นแหล่งเชื้อพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง

คำสำคัญ: โรคขอบใบแห้ง ข้าวสายพันธุ์พื้นเมือง เครื่องหมายดีเอ็นเอ ยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง

คำนำ

โรคขอบใบแห้ง (Bacterial blight disease) สาเหตุเกิดจาก เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* หรือที่เรียกว่า *Xoo* โรคนี้เป็นปัญหาสำคัญที่พบในพื้นที่ปลูกข้าวทั่วโลกรวมทั้งในประเทศไทย สร้างความเสียหายให้กับผลผลิตข้าวสูงถึง 81% เชื้อแบคทีเรียนี้สามารถเข้าทำลายได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าว โดยจะเกิดบาดแผลบริเวณด้านปลายและขอบของใบข้าว (Yasmin *et al.*, 2017) วิธีการหนึ่งในการป้องกันความเสียหายที่เกิดจากโรคนี้ คือ การปลูกข้าวสายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งยังมีไม่มากนัก ดังนั้นจึงมีความพยายามคัดหาแหล่งพันธุกรรมของข้าวสายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคขอบแห้งโดยเฉพาะในข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองของไทยซึ่งเป็นสายพันธุ์ข้าวที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (Kawicha and Thanyasiriwat, 2020)

ข้าวสายพันธุ์พื้นเมือง (Local rice varieties) ถือว่าเป็นแหล่งความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สำคัญของประเทศไทยมีคุณสมบัติเฉพาะตัว ได้แก่ ความทนทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืช และสภาพเครียดต่าง ๆ เนื่องจาก

ข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองมีความแปรผันทางพันธุกรรมภายในประชากรสูง ประกอบด้วยแหล่งยีนที่ต้านทานต่อโรคหลาย ๆ ยีนรวมกันอยู่ ซึ่งเกิดขึ้นจากการคัดเลือกโดยธรรมชาติและการคัดเลือกโดยเกษตรกรในท้องถิ่นต่าง ๆ ทำให้ข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองมีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม และมีความสามารถในการต้านทานโรคและแมลงได้เป็นอย่างดี (Pusadee *et al.*, 2014) ปัจจุบันเกษตรกรนิยมปลูกข้าวสายพันธุ์ที่เป็นการค้าตามความต้องการของท้องตลาด เนื่องจากให้ผลผลิตสูง เมล็ดมีคุณภาพ ทำให้การปลูกข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองลดน้อยลงซึ่งส่งผลต่อแหล่งพันธุกรรมที่ดี เช่น แหล่งของยีนต้านทานโรคและแมลงต่าง ๆ ที่มีคุณค่าต่อการนำมาใช้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวสูญหายไปได้ (Funta *et al*., 2019)

ปัจจุบันมีการค้นพบยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งไม่น้อยกว่า 40 ยีน มีรายงานความสำเร็จของการโคลนยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งเพื่อนำมาใช้เป็นเครื่องหมายในการช่วยคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่ต้านทานโรคขอบใบแห้งจำนวน 11 ยีน ได้แก่ *Xa1*, *Xa3*, *Xa4*, *xa5*, *Xa10*, *xa13*, *Xa21*, *Xa23*, *xa25*, *Xa27* และ *Xa41* ประเทศไทยมีการรายงานการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *Xa4, xa5, Xa7, xa13* หรือ *Xa21* สำหรับใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าว ยีนต้านทานเหล่านี้ทำหน้าที่กำหนดการสร้างโปรตีน R ที่แตกต่างกันและมีกลไกการตอบสนองต่อไอโซเลทของเชื้อก่อโรคขอบใบแห้งอย่างจำเพาะ (Kumar *et al.*, 2020) เช่นยีน x*a5* เป็นยีนหลักที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งที่พบในหลายประเทศ ในแถบเอเชียมีโครงสร้างโปรตีนแบบ gamma subunit of transcription factor IIA (TFIIAγ) ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนชนิดวาลีนและกรดกลูตามิกระหว่างสายพันธุ์ต้านทานและสายพันธุ์อ่อนแอ (Carpenter *et al.*, 2020) ยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *Xa21* เป็นยีนต้านทานแบบกว้าง (Broad spectrum resistance) พบในสายพันธุ์ข้าวป่า (*Oryzae longistaminata*) มีโครงสร้างโปรตีนแบบ Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) ซึ่งมีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล PCR-based STS marker และ pTA248 จากยีนต้านทาน *Xa21* เพื่อใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง (Nguyen *et al*., 2018)

นอกจากนี้ Korinsak *et al*. (2009) มีการใช้เครื่องหมาย Simple Sequence Repeat (SSR) ในการตรวจสอบพบว่าในข้าว *Ba7* และ *O. nivara* มียีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *Xa33*(t) อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 7 สามารถต้านทานต่อเชื้อ *Xoo* สายพันธุ์ไทย TXO16 ในประเทศไทยมีรายงานการผสมพันธุ์ระหว่างข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 1 กับพันธุ์ที่ต้านทานโรคขอบใบแห้ง คือ พันธุ์ปิ่นเกษตร 1 (PK1-BB-PY) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ต้านทานโรคขอบใบแห้งที่มียีน *xa5*, *Xa21* และ *Xa33* เพื่อให้พันธุ์ลูกผสมที่ได้มีความสามารถในการต้านทานโรคขอบใบแห้ง (Dangthaisong *et al.*, 2014) อย่างไรก็ตามการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอ จึงมีการนำมาใช้ร่วมกับการคัดเลือกโดยการประเมินระดับความต้านทานต่อโรค เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง งานวิจัยครั้งนี้ทำการตรวจสอบยีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองไทยที่ปลูกในพื้นที่ภาคเหนือตอนล่างโดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อยีน *xa5*, *Xa21*, *Xa33*(RMWR 7.1) และ *Xa33*(RMWR 7.6) ร่วมกับการประเมินระดับความต้านทานของข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองต่อเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้ง เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการเป็นแหล่งเชื้อพันธุ์ข้าวสำหรับใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในประเทศไทย รวมถึงเพื่อการส่งเสริมและอนุรักษ์พันธุ์ข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองของไทยต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

นำตัวอย่างข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองจากจังหวัดพิษณุโลก สุโขทัย ตาก และพิจิตร จำนวน 20 สายพันธุ์ ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก และข้าวสายพันธุ์มาตรฐาน จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ ข้าวชัยนาท 1 และข้าวหอมมะลิ 105 (Table 1) มาแช่ในน้ำเป็นเวลา 1 คืน แล้วนำมาปลูกลงดินในถาดพลาสติกสำหรับปลูก เมื่อข้าวมีอายุประมาณ 2-3 สัปดาห์ จะอยู่ในระยะที่มีใบอ่อน นำใบอ่อนของข้าวประมาณ 50-80 มิลลิกรัม มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ที่ดัดแปลงมาจาก Doyle and Doyle (1987) และนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วยกระแสไฟฟ้าใน 1% Agarose gel ในสารละลาย 1X TBE ร่วมกับ 1X SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA) ตรวจสอบภายใต้เครื่อง Gel documentation (Bio-Rad, USA) และเก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่ -20°ซ.

Table 1 Twenty local rice and two standard rice varieties used in this experiment

No.	Varieties name	Source	No.	Varieties name	Source
1	Hom Khrua	Phitsanulok	12	Lueang Luang	Tak
2	Lon Khrok	Phitsanulok	13	Phuang Dokmali	Tak
3	Khao Namkhang	Phitsanulok	14	Phuang Kradat	Tak
4	Saibua	Phitsanulok	15	Sanpa Tong Luang	Tak
5	Kula Lut Ni	Sukhothai	16	Kluai Pi	Tak
6	Ta Khaek	Sukhothai	17	Chet Ruang	Phichit
7	Khat Na Pho	Sukhothai	18	Ko Diao Nak	Phichit
8	Thong Yoi	Sukhothai	19	Lueang Kaset	Phichit
9	Phut Tam	Sukhothai	20	Khao Chalo	Phichit
10	Hom Dong	Sukhothai	21	Chainat 1 (recommended susceptible variety)	
11	Phichit	Tak	22	Hom Mali 105 (recommended resistance variety)	-

การตรวจสอบยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะ

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของข้าวสายพันธุ์พื้นเมือง 20 สายพันธุ์ ๆ ละ 20 ng และข้าวสายพันธุ์มาตรฐาน จำนวน 2 สายพันธุ์ ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยกระบวนการลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) (Mullis *et al*., 1992) ในปริมาตรรวม 25 µl ซึ่งประกอบด้วย 50 mM $MgCl_2$, 10 mM dNTPs, 1X *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA) และ 10 µM Forward และ Reverse primers ที่มีความจำเพาะต่อยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง จำนวน 4 คู่ (Table 2) และใช้สภาวะที่เหมาะสม ดังนี้ Pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95°ซ. เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วย Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°ซ. เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ Annealing ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของแต่ละยีน (ยีน *xa5* และ *Xa21* ที่ 59°ซ. และ *Xa33*(RMWR 7.1) และ *Xa33*(RMWR 7.6) ที่ 57°ซ.) เป็นเวลา 45 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 1 นาที และ Final-extension ที่อุณภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบใน 2% TBE agarose gel และเครื่อง Gel documentation (Bio-Rad)

Table 2 Nucleotide sequences of four specific primers used in this study

Genes	Nucleotide sequences (5'-3')	Reference
xa5	F; GAGTCGATGTAATGTCATCAGTGC R; GAAGGAGGTATCGCTTTGTTGGAC	Blair and McCouch (1997)
Xa21	F; ATAGACGCGGAAGGGTGGTTC R; ATAGACGCGGTAATCGAAAGATG	Korinsak *et al*. (2009)
Xa33 (RMWR 7.1)	F; TTTTATCCCCTTCTTCCTTC R; CGTGTTTTGTGTGTCTTTTG	Podishetty (2014)
Xa33 (RMWR 7.6)	F; CAACAAACACCTCCATGGTC R; GGGAATGAGCAAAAATTGG	Podishetty (2014)

การประเมินระดับความต้านทานของข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองต่อโรคขอบใบแห้ง

ทำการทดสอบความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในข้าวสายพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 20 สายพันธุ์ และสายพันธุ์มาตรฐาน จำนวน 2 สายพันธุ์ (Table 1) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่เป็นเชื้อสาเหตุของโรคขอบใบแห้ง จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ BB-6436 และ BB-6442 ซึ่งเป็นไอโซเลทที่คัดแยกได้จากข้าวที่เป็นโรคขอบใบแห้งในพื้นที่โดยศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก มาเลี้ยงบนอาหาร Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 25-28°ซ. เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียให้ได้ปริมาณเซลล์ เท่ากับ $1x10^6$ Colony-forming units (CFU)/มิลลิลิตร หลังจากปลูกข้าวสายพันธุ์ที่ต้องการทดลองในกระถางขนาดเล็ก วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design: RCBD) จำนวน 3 ซ้ำ เมื่อต้นข้าวมีอายุ 3 สัปดาห์ ทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท ด้วยวิธี Leaf-clipping method (Jennings, 1979) โดยใช้กรรไกรจุ่มสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้นำกรรไกรมาตัดปลายใบข้าวในบริเวณที่ต่ำกว่าปลายใบข้าวลงมาประมาณ 1 เซนติเมตร บันทึกข้อมูลโดยการวัดความยาวของแผลหลังปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 และ 14 วัน ให้คะแนนระดับความต้านทานของข้าวตามเกณฑ์ของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI, 2013) ดังนี้

คะแนน 0 แสดงระดับต้านทานสูง (HR)
= รอยแผลบริเวณใบมีความยาวน้อยกว่า 1 เซนติเมตร
คะแนน 1 แสดงระดับความต้านทาน (R)
= รอยแผลบริเวณใบมีความยาว 1-5 เซนติเมตร
คะแนน 3 แสดงระดับความต้านทานปานกลาง (MR)
= รอยแผลบริเวณใบมีความยาว 5-10 เซนติเมตร
คะแนน 5 แสดงระดับอ่อนแอปานกลาง (MS)
= รอยแผลบริเวณใบมีความยาว 10-15 เซนติเมตร
คะแนน 7 แสดงระดับอ่อนแอ (S)
= รอยแผลบริเวณใบมีความยาว 15-20 เซนติเมตร
คะแนน 9 แสดงระดับอ่อนแอมาก (HS)
= รอยแผลบริเวณใบมีความยาวมากกว่า 20 เซนติเมตร

ผลการวิจัย

จากการตรวจสอบยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งในข้าวสายพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 20 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะ (*xa5*, *Xa21*, *Xa33*(RMWR 7.1) และ *Xa33*(RMWR 7.6) พบยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *xa5* ที่มีขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ประมาณ

227-240 bp (Figure 1) ในข้าวสายพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 19 สายพันธุ์ ยกเว้นข้าวสายพันธุ์พิจิตร คิดเป็น 95% ของสายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่นำมาทดสอบ และจากการตรวจสอบครั้งนี้ พบยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *Xa21* ที่มีขนาดประมาณ 700 bp ในข้าวสายพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวหอมครัว ข้าวล้นครก ข้าวตาแขก ข้าวทองย้อย ข้าวพุดตำ ข้าวพิจิตร ข้าวเหลืองหลวง ข้าวพวงดอกมะลิ ข้าวพวงกระดาษ และข้าวสันป่าตอง คิดเป็น 50% ของสายพันธุ์ข้าวที่นำมาทดสอบ ยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *Xa33*(RMWR 7.1) พบในข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 8 สายพันธุ์ (ข้าวล้นครก ข้าวกุลาหลุดหนี้ ข้าวตาแขก ข้าวทองย้อย ข้าวพุดตำ ข้าวหอมดง ข้าวเหลืองหลวง และข้าวพวงกระดาษ) คิดเป็น 40% โดยมีขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ประมาณ 210 bp และยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *Xa33*(RMWR 7.6) พบในข้าวทั้ง 20 สายพันธุ์ มีขนาดประมาณ 200 bp นอกจากนี้จากการตรวจสอบยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งในข้าวสายพันธุ์มาตรฐาน จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ ข้าวชัยนาท 1 เป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้ง และข้าวสายพันธุ์ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง คือ ข้าวหอมมะลิ 105 พบมียีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *xa5* และปรากฏขนาดของอัลลีลอ่อนแอของยีน *Xa21*, *Xa33*(RMWR 7.1) และ *Xa33*(RMWR 7.6)

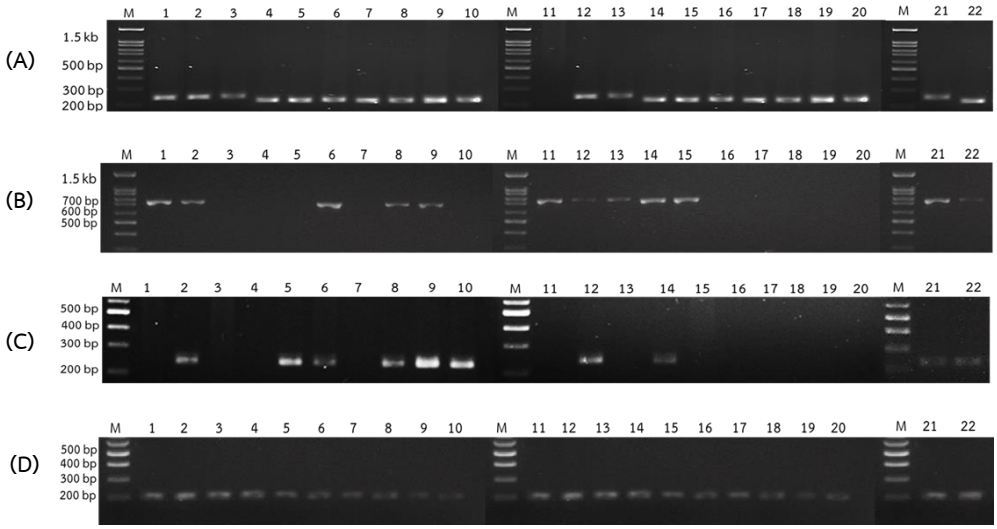

Figure 1 The PCR products of four specific primers for bacterial blight resistance genes; (A) *xa5* gene (with PCR products ranging from 227 to 240 bp); (B) *Xa21* gene (produced PCR products with an approximate size of 700 bp); (C) *Xa33* (RMWR 7.1) gene (with PCR products with an approximate size of 210 bp); and (D) *Xa33* (RMWR 7.6) gene (with PCR products with an approximate size of 210 bp.); (M) = 100 bp DNA ladder (1) Hom Khrua, (2) Lon Khrok, (3) Khao Namkhang, (4) Saibua, (5) Kula Lut Ni, (6) Ta Khaek, (7) Khat Na Pho, (8) Thong Yoi, (9) Phut Tam, (10) Hom Dong, (11) Phichit, (12) Lueang Luang, (13) Phuang Dokmali, (14) Phuang Kradat, (15) Sanpa Tong Luang, (16) Kluai Pi, (17) Chet Ruang, (18) Ko Diao Nak, (19) Lueang Kaset, (20) Khao Chalo, (21) Chainat 1 and (22) Hom Mali 105

การประเมินระดับความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง

จากการประเมินระดับความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 2 ไอโซเลท คือ BB-6436 และ BB-6442 ในข้าวสายพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 20 สายพันธุ์ และข้าวสายพันธุ์มาตรฐาน จำนวน 2 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Leaf clipping technique และประเมินผลหลังปลูกเชื้อ 7 และ 14 วัน พบว่าหลังปลูกเชื้อ 7 วัน ข้าวทุกสายพันธุ์ยังไม่พบบาดแผลบริเวณใบข้าวที่ทำการปลูกเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท (BB-6436 และ BB-6442) และเมื่อทำการประเมินผลหลัง 14 วัน พบว่าข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่นำมาทดสอบตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งทั้ง 2 ไอโซเลท ในทิศทางเดียวกัน (Table 3, Figure 2-3) โดยแบ่งระดับความต้านทานของข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองได้ 5 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1) ข้าวที่มีความต้านทานในระดับสูง (HR) (คะแนน 0) มี 1 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวคัด นาโพธิ์ โดยมีความยาวของแผลหลังจากปลูกเชื้อไอโซเลท BB-6436 และ BB-6442 เท่ากับ 0.50±0.00 และ 0.40±0.17เซนติเมตร ตามลำดับ (Table 3) กลุ่มที่ 2) ข้าวที่มีความต้านทาน (R) (คะแนน 1) มีจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวล้นครก ข้าวหอมครัว ข้าวทองย้อย ข้าวพุดตำ และข้าวพวงกระดาษ โดยมีความยาวของแผลเฉลี่ยหลังจากปลูกเชื้อไอโซเลท BB-6436 และ BB-6442 เท่ากับ 2.63±0.73 และ 2.76±0.61 เซนติเมตร ตามลำดับ กลุ่มที่ 3) ข้าวที่มีความต้านทานอยู่ที่ระดับปานกลาง (MR) (คะแนน 3) จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวขาวน้ำค้าง ข้าวกุลาหลุดหนี้ ข้าวตาแขก ข้าวหอมดง ข้าวพวงดอกมะลิ ข้าวสันป่าตองหลวง ข้าวกล้วยปี ข้าวเจ็ดรวง ข้าวเหลืองเกษตร และข้าวขาวชลอ มีความยาวแผลเฉลี่ยหลังปลูกเชื้อไอโซเลท BB-6436 เท่ากับ 7.16±1.73 เซนติเมตร และไอโซเลท BB-6442 เท่ากับ 7.78±0.81 เซนติเมตร กลุ่มที่ 4) ข้าวที่มีความอ่อนแอในระดับปานกลาง (MS) (คะแนน 5) จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวสายบัว ข้าวเหลืองหลวง และข้าวขาวกอเดียวหนัก มีความยาวแผลเฉลี่ยหลังปลูกเชื้อไอโซเลท BB-6436 เท่ากับ 13.86±2.26 เซนติเมตร และไอโซเลท BB-6442 เท่ากับ 12.86±0.42 เซนติเมตร และกลุ่มที่ 5) ข้าวที่มีความอ่อนแอ (S) (คะแนน 7) ต่อเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง จำนวน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวพิจิตร มีความยาวแผลหลังปลูกเชื้อไอโซเลท BB-6436 เท่ากับ 16.93±1.01 เซนติเมตร และไอโซเลท BB-6442 เท่ากับ 17.33±0.76 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวชัยนาท 1 ซึ่งเป็นข้าวสายพันธุ์มาตรฐานอ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้ง มีความยาวของแผลหลังปลูกเชื้อไอโซเลท BB-6436 และ BB-6442 เท่ากับ 24.33±4.04 และ 27.00±1.73 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีความอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุของโรคขอบใบแห้งในระดับอ่อนแอมาก (HS) (คะแนน 9) ส่วนข้าวหอมมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวสายพันธุ์ต้านทานมาตรฐาน มีความยาวแผลหลังปลูกเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท (BB-6436 และ BB-6442) เท่ากับ 0.40±0.17 เซนติเมตร ซึ่งอยู่ในระดับความต้านทานสูง (HR) (คะแนน 0)

นอกจากนี้ ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อประเมินความสัมพันธ์ระหว่างยีนต้านทานและระดับความต้านทานโรคขอบใบแห้ง พบว่าข้าวคัดนาโพธิ์ ที่มีระดับความต้านทานสูง (HR) มียีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง 2 ยีน คือ *xa5* และ *Xa33*(RMWR 7.6) ส่วนข้าวที่มีระดับความต้านทานอยู่ที่ระดับ R มีจำนวน 5 สายพันธุ์ โดยข้าว 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวล้นครก ข้าวทองย้อย ข้าวพุดตำ และข้าวพวงกระดาษ พบว่ามียีนต้านทานโรคขอบใบแห้งทั้ง 4 ยีน (*xa5, Xa21, Xa33*(RMWR 7.1) และ *Xa33*(RMWR 7.6)) เช่นเดียวกันพบว่าข้าวหอมมะลิ 105 ที่มีความต้านทานระดับ R และพบยีนต้านทานครบทั้ง 4 ยีน แต่ข้าวหอมครัวซึ่งมีความต้านทานอยู่ในระดับเดียวกัน พบยีนต้านทาน 3 ยีน ได้แก่ *xa5, Xa21* และ *Xa33*(RMWR 7.6) ส่วนในข้าวสายพันธุ์ที่มีความต้านทานระดับปานกลาง (MR) มีจำนวน 10 สายพันธุ์ (ข้าวขาวน้ำค้าง ข้าวกุลาหลุดหนี้ ข้าวตาแขก ข้าวหอมดง ข้าวพวงดอกมะลิ ข้าวสันป่าตองหลวง ข้าวกล้วยปี ข้าวเจ็ดรวง ข้าวเหลืองเกษตร และข้าวขาวชะลอ) แต่พบว่าสายพันธุ์ข้าวเหล่านี้มียีนต้านทานที่แตกต่างกัน ดังนี้ ข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง 2 ยีน (*xa5* และ

Xa33(RMWR 7.6)) ได้แก่ ข้าวขาวน้ำค้าง ข้าวกล้วยปี ข้าวเจ็ดรวง ข้าวเหลืองเกษตร และข้าวขาวชลอ ข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง 3 ยีน ได้แก่ ข้าวกุลาหลุดหนี้ และข้าวหอมดง พบยีน *xa5, Xa33* (RMWR 7.1) และ *Xa33*(RMWR 7.6) ข้าวพวงดอกมะลิ และข้าวสันป่าตองหลวง พบยีน 3 ยีน แต่แตกต่างกัน คือ ยีน *xa5, Xa21* และ *Xa33*(RMWR 7.6) และข้าวตาแขก พบยีนต้านทานทั้ง 4 ยีน (*xa5, Xa21, Xa33*(RMWR 7.1) และ *Xa33*(RMWR 7.6)) ข้าวที่มีระดับความอ่อนแอปานกลาง (MS) มีจำนวน 3 สายพันธุ์ โดยข้าวสายบัว และข้าวขาวกอเดียวหนัก พบยีนต้านทาน 2 ยีน คือ *xa5* และ *Xa33*(RMWR 7.6) ส่วนข้าวเหลืองหลวง พบยีนต้านทานทั้ง 4 ยีน คือ *xa5, Xa21, Xa33*(RMWR 7.1) และ *Xa33*(RMWR 7.6) ในขณะที่ข้าวพิจิตร ซึ่งมีความอ่อนแอต่อโรค (S) พบยีนต้านทาน 2 ยีน คือ *Xa21* และ *Xa33*(RMWR 7.6) ส่วนข้าวชัยนาท 1 ที่มีความอ่อนแอต่อโรคมาก (HS) พบยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งทั้ง 4 ยีน

Table 3 The disease incidences of bacterial blight resistance genes and the resistance level of twenty local rice and standard varieties evaluated at 14 days after inoculation

No.	Rice Varieties	Bacterial blight resistance genes				Level of resistance to bacterial blight[a]			
		xa5	*Xa21*	*Xa33* (RMWR7.1)	*Xa33* (RMWR7.6)	BB-6436 isolate		BB-6442 isolate	
						Lesion length (cm) (mean±SD)	Resistance level	Lesion length (cm) (mean±SD)	Resistance level
1	Hom Khrua	√	√		√	2.00±0.87	R	2.17±0.76	R
2	Lon Khrok	√	√	√	√	4.67±0.58	R	4.50±0.50	R
3	Khao Namkhang	√			√	8.73±1.08	MR	8.33±1.26	MR
4	Saibua	√			√	12.60±0.53	MS	12.43±0.40	MS
5	Kula Lut Ni	√		√	√	5.67±0.58	MR	6.00±0.50	MR
6	Ta Khaek	√	√	√	√	5.00±0.00	MR	5.50±0.50	MR
7	Khat Na Pho	√			√	0.50±0.00	HR	0.40±0.17	HR
8	Thong Yoi	√	√	√	√	2.67±0.58	R	3.00±0.50	R
9	Phut Tam	√	√	√	√	2.50±1.32	R	3.00±1.00	R
10	Hom Dong	√		√	√	9.33±1.15	MR	9.67±1.04	MR
11	Phichit		√		√	16.93±1.01	S	17.33±0.76	S
12	Lueang Luang	√	√	√	√	15.00±1.73	MS	11.83±0.29	MS
13	Phuang Dokmali	√	√		√	5.97±0.87	MR	7.50±0.50	MR
14	Phuang Kradat	√	√	√	√	1.33±0.29	R	1.17±0.29	R
15	Sanpa Tong Luang	√	√		√	8.40±1.97	MR	9.50±1.00	MR
16	Kluai Pi	√			√	6.77±0.93	MR	7.50±0.50	MR

Table 3 (Continued)

No.	Rice Varieties	Bacterial blight resistance genes				Level of resistance to bacterial blight[a]			
		xa5	*Xa21*	*Xa33* (RMWR7.1)	*Xa33* (RMWR7.6)	BB-6436 isolate		BB-6442 isolate	
						Lesion length (cm) (mean±SD)	Resistance level	Lesion length (cm) (mean±SD)	Resistance level
17	Chet Ruang	√			√	6.87±0.98	MR	7.17±0.76	MR
18	Ko Diao Nak	√			√	14.00±0.00	MS	14.33±0.58	MS
19	Lueang Kaset	√			√	7.67±1.26	MR	9.00±0.50	MR
20	Khao Chalo	√			√	7.27±1.55	MR	7.67±1.53	MR
21	Chainat 1	√	√	√	√	24.33±4.04	HS	27.00±1.73	HS
22	Hom Mali 105	√	√	√	√	0.40±0.17	HR	0.40±0.17	HR

[a]The average lesion length from three replicates; Resistance level; HR = Highly resistant, less than 1 cm; R = Resistant, 1-5 cm; MR = Moderately resistant, 5-10 cm; MS = Moderately susceptible, 10-15 cm; S = Susceptible, more than 15 cm; HS = Highly susceptible, more than 20 cm

Figure 2 Symptom characteristics at each resistance level after inoculating with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* bacterium isolate BB-6436 on rice leaves 14 days after inoculation; HR = Highly resistant, >1 cm; R = Resistant, >1-5 cm; MR = Moderately resistant, >5-10 cm; MS = Moderately susceptible, >10-15 cm; S = Susceptible, >15 cm; HS = Highly susceptible, >20 cm; scale bar = 5 mm

Figure 3 Symptom characteristics at each resistance level after inoculating with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* bacterium isolate BB-6442 on rice leaves for 14 days after inoculation; HR = Highly resistant, >1 cm; R = Resistant, >1-5 cm; MR = Moderately resistant, >5-10 cm; MS = Moderately susceptible, >10-15 cm; S = Susceptible, >15 cm; HS = Highly susceptible, >20 cm; scale bar = 5 mm

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการประเมินระดับความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในข้าวสายพันธุ์พื้นเมือง 20 สายพันธุ์ และมีกลุ่มควบคุมโดยใช้ข้าวชัยนาท 1 (Chainat 1) เป็นตัวแทนของข้าวอ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้ง และข้าวหอมมะลิ 105 (Hom Mali 105) เป็นตัวแทนของข้าวต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง เมื่อพิจารณาจากการตรวจสอบยีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งทั้ง 4 ยีน พบว่ายีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งตำแหน่ง *xa5* ซึ่งมีลักษณะเป็นยีนด้อย (Recessive resistance gene) (Blair and McCouch, 1997) พบในข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองถึงร้อยละ 95 โดยมีขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่สอดคล้องกับยีน *xa5* ที่ในข้าวสายพันธุ์สายพันธุ์ต้านทานโรคขอบใบแห้ง Zhongzu14 (227 bp) (Ji *et al*., 2016) เช่นเดียวกับผลการประเมินระดับความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองทั้ง 20 สายพันธุ์ในการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าข้าว 16 สายพันธุ์ (80%) มีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง จึงสามารถกล่าวได้ว่ายีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งตำแหน่ง *xa5* เป็นยีนที่มีความสำคัญในกลไกป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคขอบใบแห้ง เช่นเดียวกับการปรับปรุงข้าว Manawthukha โดยใช้ยีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งตำแหน่ง *xa5* เป็นหนึ่งในยีนหลักที่ให้ผลการต้านทานสูง (Win *et al*., 2013) ส่วนการพบยีนนี้ในข้าวชัยนาท 1 ที่เป็นข้าวสายพันธุ์อ่อนแอ (HS) แต่พบว่ามีขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ใหญ่กว่าในตัวอย่างข้าวอื่น ๆ ซึ่งอาจเกิดการกลายพันธุ์ขึ้นในยีน *xa5* ของข้าวชัยนาท 1 จึงไม่สามารถแสดงคุณสมบัติในการต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งได้

ยีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งตำแหน่ง *Xa21* พบได้เพียงร้อยละ 50 ของข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองที่นำมาทดสอบ ซึ่งข้าวที่พบยีนนี้มีผลการประเมินระดับความต้านทานสอดคล้องกันถึง 8 จาก 10 สายพันธุ์ (80%) โดยมีความต้านทานตั้งแต่ในระดับต้านทานปานกลาง (MR) ไปจนถึงระดับต้านทาน (R) แสดงให้เห็นว่าการมียีน *Xa21* สามารถส่งเสริมกลไกการต้านทานต่อโรคขอบใบ

แห้ง ซึ่งโปรตีนของยีน *Xa21* มีโครงสร้างโปรตีนแบบ Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) เป็นกลุ่มยีนต้านทานของพืชที่แสดงออกเป็น Pattern Recognition Receptor (PRR) ทำหน้าที่ในการเป็นตัวรับสัญญาณระบบภูมิคุ้มกันของข้าวเพื่อตรวจจับสารกลุ่มซัลเฟต (RaxX) ที่ผลิตจากแบคเรียแกรมลบ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. นับเป็นปราการด่านแรกของระบบภูมิคุ้มกันในข้าว (Ercoli *et al*., 2022) โดยเกี่ยวข้องในกระบวนการตรวจสอบ Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) จากภายนอกเซลล์พืชเพื่อกระตุ้นความต้านทานแบบ PAMP-triggered immunity (PTI) ต่อไป ส่งผลให้เกิดการป้องกันการบุกรุกของเชื้อ โดยชักนำการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานโรค (Jones and Dangl, 2006; Dodds and Rathjen, 2010) อย่างไรก็ตามในข้าวพิจิตรและข้าวเหลืองหลวง รวมถึงข้าวชัยนาท 1 ที่พบยีน *Xa21* เช่นกัน แต่แสดงความอ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้ง เมื่อพิจารณาจากขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดเพียง 700 bp แตกต่างจากยีน pTA248 (*Xa21*) ในข้าวที่มีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง ที่มีผลผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 1,000 bp (Mishra *et al*., 2018) ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์โปรตีนมีขนาดเล็กลงถึง 100 อะมิโน อาจทำให้ตัวรับสัญญาณระบบภูมิคุ้มกันต่อสาร RaxX ไม่สมบูรณ์และส่งผลต่อประสิทธิภาพในการรับสัญญาณได้ (Ercoli *et al*., 2022)

ส่วนยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *Xa33*(RMWR 7.1) ที่ตรวจพบในข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ทดสอบมีขนาดของผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดต่างจากอัลลีลต้านทานในข้าว *O. nivara* (IRGC105710) (Kumar *et al*., 2012) แต่มีขนาดใกล้เคียงกับอัลลีลอ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้งที่พบในข้าว Taichung Native 1 เช่นเดียวกับ *Xa33*(RMWR 7.6) ที่ตรวจพบก็มีขนาดใกล้เคียงกับอัลลีลอ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้ง (Podishetty, 2014) ดังนั้นยีน *Xa33*(RMWR 7.1) และ *Xa33*(RMWR 7.6) ที่พบในข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองที่นำมาทดสอบในครั้งนี้จึงไม่ส่งผลต่อความสามารถในการต้านทานโรคขอบใบแห้ง

แต่หากพิจารณาความสอดคล้องของการปรากฏของยีนต้านทานโรคของใบแห้งต่อความสามารถในการต้านทานโรคของใบแห้ง จากการศึกษาครั้งนี้พบยีนที่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง จะเห็นได้ว่าข้าวบางสายพันธุ์ในการศึกษานี้ที่ตรวจพบยีนมีระดับความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งที่ไม่สอดคล้องกับการมีอยู่ของยีนต้านทาน เนื่องจากการมีอัลลีลอ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้งอาจมีผลต่อการยับยั้งการแสดงออกของยีนอีกคู่หนึ่ง ทำให้ลักษณะทางฟีโนไทป์สามารถข่มการแสดงออกของยีนอีกตำแหน่งหนึ่งได้ และส่งผลต่อการสร้างโปรตีน R ที่แตกต่างกันและมีกลไกการตอบสนองต่อไอโซเลทของเชื้อก่อโรคขอบใบแห้งอย่างจำเพาะ (Tian *et al*., 2014; Kumar *et al*., 2020) นอกจากนี้กลไกการทำงานในการต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งอาจจะอาศัยการทำงานร่วมกันของยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งหลายยีน เพื่อกระตุ้นกลไกการป้องกันตัวของพืช (Jones and Dangl, 2006; Dodds and Rathjen, 2010) ในปัจจุบันมีการรายงานยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งไม่น้อยกว่า 40 ยีน และบางยีนถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง เช่น ยีนต้านทาน *Xa4, xa5, Xa7* และ *xa13* สำหรับคัดเลือกข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองของไทย (Sombunjitt *et al*., 2017) นอกจากนั้นยังมีการผสมพันธุ์ข้าวให้มียีนต้านทานโรคขอบใบแห้งหลายตำแหน่ง เช่น ยีน *Xa4* กับ *Xa21* หรือ ยีน *xa5*, *Xa21* กับ *Xa33* เพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีความสามารถในการต้านทานโรคขอบใบแห้ง (Dangthaisong *et al*., 2014; Yaodam *et al*., 2017)

การศึกษาครั้งนี้จึงชี้ให้เห็นว่าข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองเป็นแหล่งของยีนที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง โดยการปรากฏของยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งที่เป็นอัลลีลต้านทาน ช่วยให้ข้าวมีความสามารถในการต้านทานต่อการเข้าทำลายของ

เชื้อ *Xoo* ได้ดียิ่งขึ้น ข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองที่สามารถตรวจสอบพบยีนได้หลาย ๆ ตำแหน่งจึงเป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับการนำไปใช้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความสามารถในการต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษายีนต้านทานโรคขอบใบแห้งในตำแหน่งอื่น ๆ รวมไปถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองให้มากยิ่งขึ้น เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลในการเลือกนำไปใช้เป็นต้นพันธุ์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป

สรุปผลการวิจัย

การตรวจสอบยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งในข้าวสายพันธุ์พื้นเมือง โดยใช้เครื่องหมายที่มีความจำเพาะจำนวน 4 ยีน (*xa5*, *Xa21*, *Xa33*(RMWR 7.1) และ *Xa33*(RMWR 7.1)) พบว่าข้าวทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบมียีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *xa5* คิดเป็น 90% ส่วนยีนต้านทาน *xa21*, *Xa33*(RMWR 7.1) และ *Xa33*(RMWR 7.6) จะพบในข้าวบางสายพันธุ์เท่านั้น และเมื่อทดสอบความต้านทานโรคขอบใบแห้งด้วยเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ไอโซเลท BB-6436 และ BB-6442 พบว่าข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองแสดงความต้านทานต่อเชื้อในระดับที่แตกต่างกัน และจากการศึกษาความสัมพันธ์ของการปรากฏของยีนต้านทานและระดับความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง พบว่าข้าวที่มีระดับความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งอยู่ที่ R จนถึง MS จะมียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง *xa5* ในขณะที่ข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองที่ไม่พบยีนต้านทาน *xa5* คือ ข้าวสายพันธุ์พิจิตรมีความอ่อนแอ (S) ต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง ส่วนยีน *Xa21* ที่พบในการศึกษาครั้งนี้เป็นอัลลีลที่อ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้ง ซึ่งพบในสายพันธุ์ข้าวประมาณ 50% ที่ทำการทดสอบ (10 สายพันธุ์) ผลการตรวจสอบยีน *Xa33*(RMWR 7.1) ให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับยีน *Xa21* และ *Xa33*(RMWR 7.6) ซึ่งการปรากฏของยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งทั้ง 4 ยีนนี้ยังไม่สอดคล้องกับระดับความต้านทานของโรคขอบใบแห้งที่ประเมินได้ในการศึกษาครั้งนี้

อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้พบว่าข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองที่มีความสามารถต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งโดยเป็นข้าวที่มีความต้านทานสูง (HR) 1 สายพันธุ์ คือ ข้าวคัดนาโพธิ์ และข้าวที่มีระดับความต้านทานอยู่ที่ต้านทาน (R) จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ ข้าวหอมครัว ข้าวล้นครก ข้าวทองย้อย ข้าวพุดตำ และข้าวพวงกระดาษ ดังนั้นข้าวพื้นเมืองทั้ง 6 สายพันธุ์นี้ จึงเป็นสายพันธุ์ข้าวที่มีศักยภาพสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งเชื้อพันธุ์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองและเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งเพื่อใช้ในการทดสอบครั้งนี้ ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Blair, M.W. and S.R. McCouch. 1997. Microsatellite and sequence-tagged site markers diagnostic for the rice bacterial leaf blight resistance gene *xa-5*. **Theoretical and Applied Genetics** 95: 174-184.

Carpenter, S.C., P. Mishra, C. Ghoshal, P.K. Dash L. Wang, S. Midha, G.S. Laha, J.S. Lore, W. Kositratana, N.K. Singh and K. Singh. 2020. An *xa5* resistance gene-breaking Indian strain of the rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is nearly identical to a Thai strain. **Frontiers in Microbiology** 11: 579504.

Dangthaisong, P., R. Kaewcheenchai and A.W. Sattayachiti. 2014. Pathumthani 1 Rice Improvement for Submergence Tolerance, Bacterial Blight and Brown Planthopper Resistance by Marker-Assisted Selection. pp. 116-134. *In* **Proceedings of Winter Rice and Cereals Academic Conference.** Bangkok: Division of Rice Research and Development. [in Thai]

Dodds, P.N. and J.P. Rathjen. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics** 11(8): 539-548.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin** 19(1): 11-15.

Ercoli, M.F., D.D. Luu, E.Y. Rim, A. Shigenaga, A.T. de Araujo Jr, M. Chern, R. Jain, R. Ruan, A. Joe, V. Valley Stewart and P. Ronald. 2022. Plant immunity: rice XA21-mediated resistance to bacterial infection. **PNAS** 119(8): e2121568119.

Funta, S., U. Rakmak and A. Wongtamee. 2019. Variation of seed morphology in local rice varieties from the lower North of Thailand. **Naresuan Agriculture Journal** 16(2): 55-62. [in Thai]

IRRI (International Rice Research Institute). 2013. **Standard Evaluation System for Rice**. Manila (Philippines): International Rice Research Institute. 56 p.

Jennings, P.R. 1979. **Rice Improvement**. Los Banos, The Philippines: International Rice Research Institute. 189 p.

Ji, Z.J., S.D. Yang, Y.X. Zeng, Y. Liang, C.D. Yang and Q. Qian. 2016. Pyramiding blast, bacterial blight and brown planthopper resistance genes in rice restorer lines. **Journal of Integrative Agriculture** 15(7): 1432-1440.

Jones J.D.G and J.L. Dangl. 2006. The plant immune system. **Nature** 444: 323-329.

Kawicha, P. and T. Thanyasiriwat. 2020. Screening of local rice varieties for gene resistance to bacterial leaf blight using DNA markers. **Songklanakarin Journal of Plant Science** 7(1): 17-34. [in Thai]

Korinsak, S., S. Sriprakhon, P. Sirithanya, J. Jairin, S. Korinsak, A. Vanavichit and T. Toojinda. 2009. Identification of microsatellite markers (SSR) linked to a new bacterial blight resistance gene *xa33* (t) in rice cultivar 'Ba7'. **Maejo International Journal of Science and Technology** 3(2): 235-247.

Kumar, P.N., K. Sujatha, G.S. Laha, K.S. Rao, B. Mishra, B.C. Viraktamath, Y. Hari, C.S. Reddy, S.M. Balachandran, T. Ram, and M.S. Madhav. 2012. Identification and fine-mapping of *Xa33*, a novel gene for resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Phytopathology** 102(2): 222-228.

Kumar, A., R. Kumar, D. Sengupta, S.N. Das, M.K. Pandey, A. Bohra, N.K. Sharma, P. Sinha, H. Sk, I.A. Ghazi, and G.S. Laha. 2020. Deployment of genetic and genomic tools toward gaining a better understanding of rice-*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* interactions for development of durable bacterial blight resistant rice. **Frontiers in Plant Science** 2020(11): 1152. DOI: 10.3389/fpls.2020.01152

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1992. Specific enzymatic amplification of DNA *In Vitro*: the polymerase chain reaction. **Biotechnology Series** 1992(24): 17-27.

Mishra, S.K., N. Kumar, P. Chand, M. Kumar, D. Singh and R. Kumar. 2018. Expression of *Xa21* allele resistant to bacterial blight under artificial epiphytic condition in Indian Basmati rice (*Oryza sativa* L.). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences** 7(6): 747-755.

Nguyen, H.T., Q.H. Vu and L. Van Vu. 2018. Marker-assisted selection of *Xa21* conferring resistance to bacterial leaf blight in indica rice cultivar LT2. **Rice Science** 25(1): 52-56.

Podishetty, N.K. 2014. **Bacterial Leaf Blight Resistance Gene, *Xa33* in Rice: Identification and Genetic Characterization of New Bacterial Leaf Blight (BLB) Resistance Gene in Rice.** California: University of California. 238 p.

Pusadee, T., P. Oupkaew, B. Rerkasem, S. Jamjod and B.A. Schaal. 2014. Natural and human–mediated selection in a landrace of Thai rice (*Oryza sativa*). **Annals of Applied Biology** 165(2): 280-292.

Sombunjitt, S., T. Sriwongchai, C. Kuleung and V. Hongtrakul. 2017. Searching for and analysis of bacterial blight resistance genes from Thailand rice germplasm. **Agriculture and Natural Resources** 51(5): 365-375. [in Thai]

Tian, D., J. Wang and Z. Yin. 2014. The rice TAL effector–dependent resistance protein *XA10* triggers cell death and calcium depletion in the endoplasmic reticulum. **The Plant Cell** 26(1): 497-515.

Win, K.M., S. Korinsak, P. Sirithunya, J. Lanceras-Siangliw, W. Jamboonsri, T. Da, S. Patarapuwadol and T. Toojinda. 2013. Marker assisted introgression of multiple genes for bacterial blight resistance into aromatic Myanmar rice MK-75. **Field Crops Research** 154: 164-171.

Yaodam, K., P. Sripichitt, T. Sriwongchai and S. Junbuathong. 2017. Development of rice lines for bacterial leaf blight resistance using backcross method and marker–assisted selection. **KKU Science Journal** 45(3): 595-604. [in Thai]

Yasmin, S., F.Y. Hafeez and M.S. Mirza. 2017. Biocontrol of bacterial leaf blight of rice and profiling of secondary metabolites produced by Rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa BRp3*. **Biocontrol Science Technology** 24: 1227-1242.