การปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข6 ให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งโดยการเพิ่มยีนต้านทาน *Xa21* และใช้เครื่องหมายโมเลกุล ช่วยในการคัดเลือก

Introgression of *Xa21* gene for bacterial blight resistance into the rice cultivar RD 6 (*Oryza sativa*. L) using marker assisted selection

วิชัย สิทธิการ[1], จิรวัฒน์ สนิทชน[1*] และ พยอม โคเบลลี่[2]

Wichai Sittikarn[1], Jirawat Sanitchon[1*] and Payorm Cobelli[2]

บทคัดย่อ: ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 นิยมปลูกและบริโภคในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย แต่มักประสบกับปัญหาการระบาดของโรคขอบใบแห้ง (bacterial blight) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae (Xoo)* ทำให้ผลผลิตข้าวลดต่ำลง การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ พัฒนาข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ให้ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล Sequence Tagged Site (STS) STSBB21-11 ช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีผสมกลับ (backcrossing) จำนวน 2 ครั้ง ใช้ข้าวพันธุ์ IRBB21 เป็นแหล่งของยีนต้านทาน *Xa21* (donor) ได้ประชากรชั่วรุ่นที่ 3 ของการผสมกลับครั้งที่ 2 ($BC2F_{2:3}$) จำนวน 9 สายพันธุ์ นำไปประเมินความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง จำนวน 3 ไอโซเลท คือ CN1-1, MS1-2 และ NY1-1 พบว่า สายพันธุ์ $BC_2F_{2:3}$ 2-17-71-6 และ $BC_2F_{2:3}$ 2-19-86-9 ต้านทานในระดับปานกลางต่อเชื้อ 3 ไอโซเลท โดยมีค่าเฉลี่ยความยาวแผลระหว่าง 2.60-3.60 เซนติเมตร และ 2.43-3.50 เซนติเมตร ซึ่งน้อยกว่าพันธุ์ IRBB21 ที่มีค่าเฉลี่ยความยาวแผลระหว่าง 4.20-5.43 เซนติเมตร และพันธุ์ กข6 มีค่าเฉลี่ยความยาวแผลระหว่าง 9.57-12.90 เซนติเมตร ตามลำดับ สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือก จะถูกนำไปประเมินลักษณะทางการเกษตรและผลผลิตต่อไป การปรับปรุงพันธุ์ในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าสามารถพัฒนาข้าวพันธุ์ กข6 ให้ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง และสามารถนำไปใช้เป็นประชากรพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข6 ให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งได้ดียิ่งขึ้นในอนาคต

คำสำคัญ: *Xanthomonas oryzae*, การปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยวิธีผสมกลับ, STS

ABSTRACT: The rice cultivar RD 6 is the most famous variety planted and consumed in the North and North-East of Thailand. However this cultivar is susceptible to bacterial blight (BB) caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae (Xoo)* The objective of this study was to increase resistance to bacterial blight resistance in RD6 for through backcrossing method and marker assisted selection. Resistance gene Xa21 from the resistant cultivar IRBB21 was introgressed into RD6 using sequence tagged sites (STS) marker STSBB21-11 that is tightly linked to *Xa21* (0.1 cM) for foreground selection. Nine selected $BC_2F_{2:3}$ lines together with their parental lines and standard check varieties were evaluate for the resistance using artificial inoculation under greenhouse condition against three of *Xoo* isolates (CN2-1, MS1-2 and NY1-1). Two $BC_2F_{2:3}$ introgression lines showed higher resistance against the three bacteria isolates than RD6. The line $BC_2F_{2:3}$ 2-17-71-6 was 2.60 – 3.60 cm. in average lesion length and $BC_2F_{2:3}$ 2-19-86-9

[1] สาขาวิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002
Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

[2] กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว
Rice Research and Development Division, Rice Department

* Corresponding author: jirawat@kku.ac.th

was 2.43 – 3.50 cm. which were greater than IRBB21 (4.20 – 5.43 cm.) and RD6 (9.57 – 12.90). The two selected lines will be evaluated for agronomic traits and yield subsequently. This study was successful in breeding the rice cultivar RD6 for bacterial blight resistance. The introgression lines are promising lines and could be further utilized as material for gene pyramiding to achieve horizontal resistance.
Keywords: *Xanthomonas oryzae*, backcrossing, STS

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นธัญพืชอาหารที่สำคัญของประชากรโลก แต่ในระบบการปลูกข้าว มักประสบปัญหาการระบาดของโรคขอบใบแห้ง (bacterial blight) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae (Xoo)* เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ข้าวมีผลผลิตลดลงได้มากถึง 20-60 เปอร์เซ็นต์ (Ou, 1985) โดยเฉพาะข้าวพันธุ์ กข6 ที่อ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้ง แต่นิยมปลูกและบริโภคกันอย่างแพร่หลายในเขตภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย แนวทางหนึ่งที่ใช้ในการควบคุมโรคขอบใบแห้ง คือ การใช้พันธุ์ต้านทาน ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัย (Khush et al., 1989) เนื่องจากสามารถลดการใช้สารเคมีกำจัดโรค ลดสารพิษตกค้างในข้าวและสิ่งแวดล้อมได้ เป็นวิธีการที่ช่วยลดปัญหาความเสียหายที่เกิดจากโรคขอบใบแห้งได้อย่างยั่งยืน (Zhan et al., 2012)

ในปัจจุบันมีรายงานการค้นพบยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งแล้วกว่า 40 ยีน (Khan et al., 2014; Kim et al., 2015) และ Wang et al. (1996) ได้รายงานว่ายีน *Xa21* มีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง และสามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุล STS ช่วยในการคัดเลือกยีนเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายสามารถวิเคราะห์ผลได้บนแผ่นวุ้น agarose ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (พะยอม และคณะ, 2557)

การศึกษาและวิจัยในครั้งนี้จึงได้ทำการปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข6 ให้ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง โดยใช้พันธุ์ IRBB21 เป็นพันธุ์ผู้ให้ยีนต้านทาน *Xa21* โดยการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีผสมกลับ (backcrossing) ร่วมกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection : MAS) โดยนำเครื่องหมายโมเลกุล STS คือ STSBB21-11 ที่อยู่ใกล้กัน (linked) กับยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *Xa21* โดยมีระยะห่างจากยีน 0.1 cM (Chunwongse et al., 1993) มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ในครั้งนี้ เพื่อพัฒนาข้าว กข6 ให้ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งได้ดียิ่งขึ้น

วิธีการศึกษา

1.การสร้างประชากร

ใช้ข้าวเหนียว กข6 เป็นพันธุ์รับ (recurrent parent) และพันธุ์ IRBB21 เป็นพันธุ์ให้ (donor parent) ซึ่งมียีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *Xa21* ที่เป็นยีนเด่น (dominant) อยู่บนโครโมโซมที่ 11 (Khush et al., 1990) ได้ทำการผสมข้ามได้ประชากรลูกผสมชั่วรุ่นที่ 1 (F_1) แล้วผสมกลับไปยังข้าวพันธุ์ กข6 ได้ประชากรชั่วรุ่นที่ 1 ของการผสมกลับครั้งที่ 1 (BC_1F_1) คัดเลือกยีน *Xa21* ลักษณะความเหนียวและลักษณะความหอมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล glutinous-23 (Glu-23) (Wanchana et al., 2003) และ betaine-aldehyde dehydrogenase (BADH) (Jonliza et al., 2006) ผสมกลับไปยังพันธุ์ กข6 อีกครั้งจนกระทั่งได้ประชากรชั่วรุ่นที่ 1ของการผสมกลับครั้งที่ 2(BC_2F_1) คัดเลือกยีน *Xa21* และคัดเลือกลักษณะความนุ่มด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RM587 (จิรพงศ์, 2556) แล้วจึงปล่อยให้ผสมตัวเองจนได้เมล็ดประชากรชั่วรุ่นที่ 2 ของการผสมกลับครั้งที่ 2 (BC_2F_2) คัดเลือกเฉพาะต้นที่มี genotype ในสภาพ homozygous dominant (RR) เหมือนกับพันธุ์ IRBB21 แล้วจึงคัดเลือกลักษณะการแตกกอและลักษณะเมล็ดเฉพาะต้นที่มีความคล้ายกับข้าวพันธุ์ กข6 จึงปล่อยให้ผสมตัวเองอีกครั้งจะได้เมล็ดประชากร $BC_2F_{2:3}$ ซึ่งมีปริมาณเมล็ดเพียงพอจึงนำไปประเมินความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง

2. การคัดเลือกประชากรโดยเครื่องหมายโมเลกุล

คัดเลือกยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *Xa21* ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล STS โดยใช้เครื่องหมาย STSBB21-11 (**Table 1**) ในประชากรชั่วรุ่น BC_1F_1, BC_2F_1 และ BC_2F_2 ร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุล microsatellite (SSR) ชนิด Glu-23, BADH และ RM587 เพื่อใช้คัดเลือกลักษณะ ความเหนียว ความหอม และความนุ่มคล้ายกับข้าวพันธุ์ กข6

Table 1 STS marker used for *Xa21* gene selection.

marker	sequence 5'-3'	PCR product (bp)
STSBB21-11F	AGA CGC GGA AGG GTG GTT CCC GGA	1,000
STSBB21-11R	AGA CGC GGT AAT CGA AAG ATG AAA	

Source: Ronald et al. (1992)

สกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวซึ่งเพาะในถาดเพาะและมีอายุ 21 วัน ด้วยวิธี CTAB (Saghai-Maroof et al., 1984) แล้วตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่องวิเคราะห์ Nanodrop (Thermo scientific) เตรียมปฏิกิริยา Polymerase Chain reaction (PCR) ด้วยไพรเมอร์ STSs คือ STSBB21-11 โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังต่อไปนี้ DNA template (6.5-10 ng.) 10 µl. น้ำกลั่น 0.5 µl. Primer (F) (5 pmol/µl) 1 µl. Primer (R) (5 pmol/µl.) 1 µl*Taq* master mix (Promega) 12.5 µl. ได้ปริมาตรสุดท้าย 25 µl. นำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Thermal cycler (iometra) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ตั้งอุณหภูมิและเวลาตามขั้นตอน ดังต่อไปนี้ 1) pre-denature อุณหภูมิ 95°ซ 5 นาที 2) denaturation อุณหภูมิ 94°ซ 30 วินาที 3) annealing อุณหภูมิ 55°ซ 30 วินาที 4) extention อุณหภูมิ 72°ซ 1 นาที (ทำปฏิกิริยาจากขั้นตอนที่ 2 ถึงขั้นตอนที่ 4 จำนวน 30 รอบ) 5) final extention อุณหภูมิ 72°ซ 5 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง gel document

ส่วนการเตรียมปฏิกิริยา Polymerase Chain reaction (PCR)สำหรับไพรเมอร์SSR ชนิด Glu-23, BADH และ RM587 มีองค์ประกอบดังต่อไปนี้ DNA template 50 ng, 1X PCR buffer, 2mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 0.2µM reverse และforward primer, Taq DNA polymerase ปริมาณ 0.5µl.แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ครบ 10µl. ผสมองค์ประกอบต่างๆ ให้เข้ากันดีแล้วจึงนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Thermal cycler (Biometra) โดยตั้งอุณหภูมิและเวลา ดังต่อไปนี้ 1) pre-denature อุณหภูมิ 95°ซ 5 นาที 2) denaturation อุณหภูมิ 94°ซ 30 วินาที 3) annealing อุณหภูมิ 55°ซ 30 วินาที 4) extention อุณหภูมิ 72°ซ 30 วินาที (ทำปฏิกิริยาจากขั้นตอนที่ 2 ถึงขั้นตอนที่ 4 จำนวน 35 รอบ) 5) final extention อุณหภูมิ 72°ซ 4 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสโดยใช้ตัวกลางชนิดโพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacylamide gel) ที่มีความเข้มข้น 4.5 % เป็นตัวกลางในการแยก

3. การประเมินความต้านทานโรคขอบใบแห้ง

เพาะเมล็ดข้าวประชากร $BC_2F_{2:3}$ เปรียบเทียบกับพันธุ์ต้านทานทดสอบ (resistant-check cultivar) ได้แก่ IR62266, IRBB5 และพันธุ์อ่อนแอทดสอบ (susceptible-check cultivar) ได้แก่ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML 105) ร่วมกับข้าวพันธุ์ กข6, IRBB21 และข้าวสายพันธุ์ $BC_2F_{2:3}$ 2-8-2-36 ที่มียีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *xa5* ในถาดพลาสติกขนาด 105 หลุม ซึ่งมีดินเหนียวบรรจุอยู่ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design; CRD) โดยจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial) จำนวน 3 ซ้ำ (ปลูกข้าวจำนวน 3 ต้น/1 ซ้ำ) ในสภาพเรือนทดลอง (greenhouse) เมื่อข้าวมีอายุ 18 วัน ใส่ปุ๋ยยูเรีย (46-0-0) อัตรา 30 กก./ไร่ และเมื่อข้าวมีอายุ 21วัน หรือระยะที่ข้าวมีใบ 4-5 ใบ แล้วจึงนำไปทดสอบความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งในเดือนตุลาคม 2559

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X. oryzae* จำนวน 3 ไอโซเลท (isolate) ได้แก่ CN2-1, MS1-2 และ NY1-1 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ในอาหาร Nutrient Agar (NA) เป็นเวลา 72 ชั่วโมงเจืองจางโคโลนี (colony) ของเชื้อแต่ละไอโซเลตด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง (OD) 600 nm คำนวณหาค่า colony forming unit (CFU) ต่อสารละลายเชื้อ 1 มิลลิลิตรให้ได้ระดับความเข้มข้นของสารแขวนลอยแบคทีเรีย (bacterial suspension) ที่เหมาะสมต่อการเกิดเชื้อคือ 10^8cfu/ml (OD_{600} = 0.3) ทำการปลูกเชื้อด้วยวิธีตัดใบ (clipping method) ตามวิธีของ Kauffman et al. (1973) บันทึกผลความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง 14 วันหลังการปลูกเชื้อ โดยพิจารณาจากความยาวแผลที่ปรากฏบนใบข้าวแล้วประเมินเป็นระดับความต้านทานโรคโดยใช้วิธีดัดแปลงจากมาตรฐานของ (standard evaluation system : SES) ของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (International Rice Research Institute : IRRI) (IRRI, 1996) ดังต่อไปนี้ (**Table 2**)

Table 2 Reaction of bacterial blight parameter.

Parameter	reaction	lesion length (cm.)
HR	highly resistant	< 1
R	resistant	1-3
MR	moderately resistant	3-6
MS	moderately susceptible	6-10
S	susceptible	>10

Source: modified from IRRI (1996)

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลการประเมินความต้านทานจากปฏิกิริยาการเกิดโรคมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of variance; ANOVA) แล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.01$)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. การสร้างและคัดเลือกประชากรโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

การสร้างประชากรในชั่วรุ่น F_1, BC_1F_1, BC_2F_1 และ BC_2F_2 ทำการคัดเลือกยีนเป้าหมายจากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ดังต่อไปนี้

ชั่วรุ่น F_1 ที่มีลักษณะเป็น heterozygous (มีแถบดีเอ็นเอ จำนวน 2 แถบ ด้านล่างมีขนาดเท่ากับ 700 คู่เบส เท่ากับขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ กข6 และด้านบนมีขนาดเท่ากับ 1,000 คู่เบส เท่ากับขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ IRBB21 ที่เป็นพันธุ์ผู้ให้ยีนต้านทาน) ได้จำนวน 6 ต้น (**Figure 1**) แล้วจึงนำไปผสมกลับไปยังข้าวพันธุ์ กข6 เพื่อสร้างประชากร BC_1F_1

ชั่วรุ่น BC_1F_1 คัดเลือกประชากรด้วยเครื่องหมายโมเลกุล STSs เฉพาะต้นที่มีลักษณะเป็น heterozygous เหมือนกับประชากรชั่วรุ่น F_1 ได้จำนวน 28 ต้น คัดลักษณะข้าวเหนียวด้วยเครื่องหมายโมเลกุล Glu-23 คัดเลือกประชากรที่เป็นข้าวเหนียวได้จำนวน 19 ต้น จากนั้นนำไปคัดเลือกลักษณะความหอม โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด BADH ได้ข้าวเหนียวที่มีความหอม จำนวน 10 ต้น ในการคัดเลือกประชากรจากลักษณะที่ปรากฏบนแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุล Glu-23 และ BADH จะคัดเลือกเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่เหมือนข้าว กข6 และมี genotype อยู่ในสภาพ homozygous (rr) จำนวน 10 ต้น ใช้ผสมข้ามกลับไปยังข้าวพันธุ์ กข6 อีกครั้งเพื่อสร้างประชากร BC_2F_1

ชั่วรุ่น BC_2F_1 คัดเลือกประชากรด้วยเครื่องหมายโมเลกุล STSs เฉพาะต้นที่มีลักษณะเป็น heterozygous เหมือนกับประชากรชั่วรุ่น F_1 จากนั้นเก็บเมล็ดและนำไปปลูกแล้วปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อสร้างประชากร BC_2F_2 คัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล STS แต่ในชั่วรุ่นนี้ได้คัดเลือกเฉพาะต้นที่มีลักษณะเป็น homozygous dominant ซึ่งจะปรากฏลักษณะของแถบดีเอ็นเอ จำนวน 1 แถบ มีขนาดเท่ากับ 1,000 คู่เบส ซึ่งเท่ากับขนาดแถบดีเอ็นเอของพันธุ์ IRBB21 (**Figure 2**) และคัดเลือกลักษณะความนุ่มด้วยเครื่องหมายโมเลกุล RM587 ร่วมกับการคัดเลือกลักษณะทาง phenotype เฉพาะต้นที่คล้ายข้าวพันธุ์ กข6 มากที่สุดได้จำนวน 9 ต้น ปล่อยให้ผสมตัวเองอีกครั้งแล้วจึงเก็บเมล็ดประชากร $BC_2F_{2:3}$ ไว้ทำการประเมินโรคขอบใบแห้งโดยวิธีการปลูกเชื้อในลำดับต่อไป

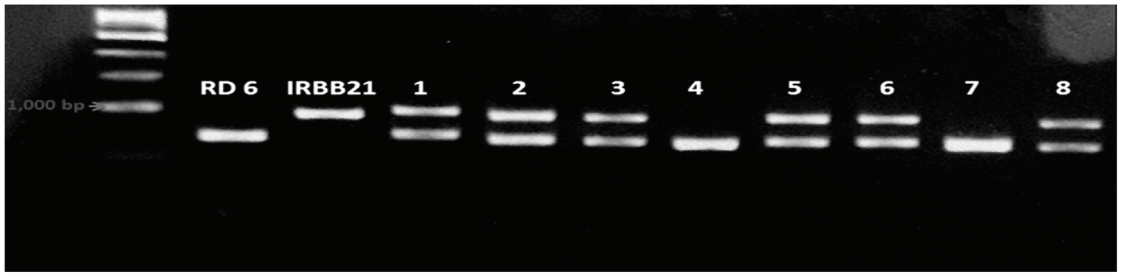

Figure 1 Banding patterns amplified by STSs marker on 2% agarose gel, showing segregation of *Xa21* gene in the F_1 populations, RD 6 (recurrent parent), IRBB21 (donor parent), Lane 1-8= F_1 populations.

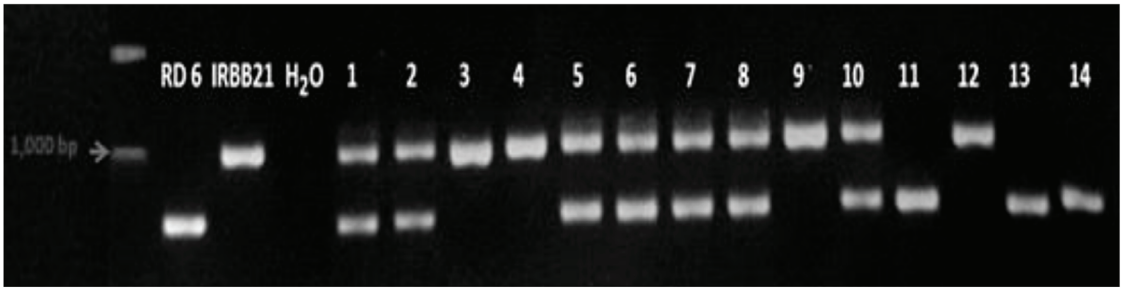

Figure 2 Banding patterns amplified by STSs marker on 2% agarose gel, showing segregation of *Xa21* gene in the BC_2F_2 populations, RD 6 (recurrent parent), IRBB21 (donor parent), Lane 1-14= BC_2F_2 populations.

2. การประเมินความต้านทานโรคขอบใบแห้ง

จากการประเมินความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง 3 ไอโซเลท พบว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทมีระดับความรุนแรงไม่แตกต่างกันทางสถิติ พันธุ์/สายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และพบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์/สายพันธุ์กับเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้ง (**Table 3**)

Table 3 Analysis of variance of $BC_2F_{2:3}$ selected line and check varieties against 3 isolates of *X. oryzae*.

SOV	Df	MS
Isolate (I)	2	0.44
Genotype (G)	14	87.38 **
G x I	28	3.67 **
Error	90	0.78

C.V. (%) = 20.28

** Significant at P<0.01 by LSD

ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความยาวแผลบนใบข้าว (**Table 4**) พบว่า ข้าวพันธุ์ กข6 (พันธุ์ผู้รับ) แสดงอาการอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งทั้ง 3 ไอโซเลท โดยมีความยาวแผล 9.57-12.90 เซนติเมตร เช่นเดียวกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 (susceptible check) ซึ่งมีความยาวแผล 11.20-14.53 เซนติเมตร แตกต่างทางสถิติกับพันธุ์ต้านทาน IRBB21 (พันธุ์ผู้ให้) ที่มีความยาวแผล 4.20-5.43 เซนติเมตร และพันธุ์ต้านทาน IRBB21 มีความยาวแผลแตกต่างจากพันธุ์ต้านทานทดสอบ (resistance check) คือพันธุ์ IRBB5 ที่มีความยาวแผล 0.73-1.07 เซนติเมตร (**Figure 3,4,5**) เมื่อนำค่าเฉลี่ยความยาวแผลไปแปลผลเป็นปฏิกิริยาความต้านทาน (**Table 5**) พบว่าประชากรที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ 2 สายพันธุ์คือ $BC_2F_{2:3}$ 2-17-71-6 และ $BC_2F_{2:3}$ 2-19-86-9 นั้นแสดงปฏิกิริยาต้านทานกับเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท โดยสายพันธุ์ $BC_2F_{2:3}$ 2-17-71-6 แสดงปฏิกิริยาต้านทาน (R) ต่อไอโซเลท CN2-1 และ MS1-2 ค่อนข้างต้านทาน (MR) ต่อไอโซเลท NY1-1 ส่วนสายพันธุ์ $BC_2F_{2:3}$ 2-19-86-9 แสดงปฏิกิริยาต้านทาน (R) ต่อไอโซเลท MS1-2 และ NY1-1 ค่อนข้างต้านทาน (MR) ต่อไอโซเลท CN2-1 โดยทั้ง 2 สายพันธุ์แสดงปฏิกิริยาต้านทานได้ดีกว่าพันธุ์ กข6 ที่มีปฏิกิริยาอ่อนแอต่อเชื้อ ทั้ง 3 ไอโซเลท แสดงให้เห็นถึงการปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข6 ในครั้งนี้สามารถเพิ่มระดับความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งได้ดีกว่าข้าว กข6 พันธุ์เดิม แต่ไม่ถึงกับมีระดับความต้านทานที่สูงมาก ดังนั้นวิธีการที่จะเพิ่มความต้านทานให้กับข้าวสายพันธุ์ $BC_2F_{2:3}$ 2-17-71-6 และ $BC_2F_{2:3}$ 2-19-86-9 ให้มีความต้านทานมากยิ่งขึ้น ควรมีการรวมยีนต้านทานเข้าด้วยกันหลายๆ ยีน (gene pyramiding) โดยเฉพาะยีน *xa5* เป็นยีนหลักที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในงานปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง เนื่องจากสามารถต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อได้หลายไอโซเลท (Huang et.al., 1997) ดังการศึกษาของ Kottapalli et al. (2010) ที่ได้ทำการ pyramiding ยีน *xa5*, *xa13* และ *Xa21* เข้าไว้ในข้าวพันธุ์ Samba Muhsuri ใช้เครื่องหมายโมเลกุล STS คัดเลือกยีนต้านทาน ได้ข้าว Samba Muhsuri สายพันธุ์ใหม่ ที่มีความต้านทานต่อเชื้อในระดับสูงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อ่อนแอ และพันธุ์ Samba Muhsuri สายพันธุ์เดิม สอดคล้องกับ Huang et al. (1997) ที่สามารถรวมยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งจำนวน 4 ยีนได้แก่ *Xa4, xa5*, *xa13* และ *Xa21* เข้าไปในข้าวและใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RFLP และ PCR-based marker ช่วยในการคัดเลือกเลือก ทำให้สายพันธุ์ที่มีการรวมยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งแสดงระดับความต้านทานที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่มียีนต้านทานเพียงยีนเดียวทั้งนี้ระดับความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งที่แตกต่างกันนั้น เป็นไปตามกฎของ gene for gene interaction ที่ความต้านทานนั้นขึ้นอยู่กับยีนที่มีอยู่ในข้าว (host) และชนิดของเชื้อสาเหตุโรค (pathogen) (Kosack and Jones, 1997)

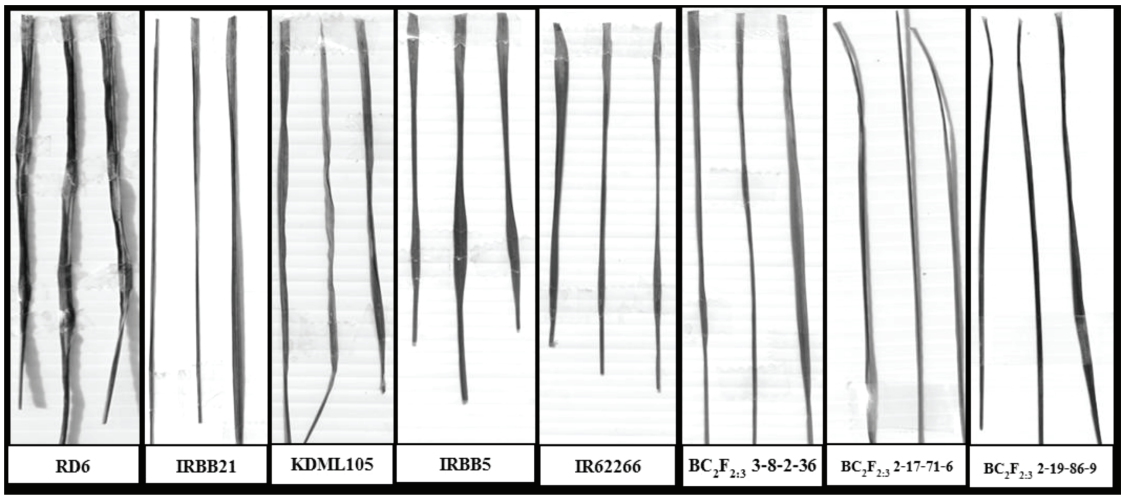

Figure 3 Reaction of lesion length to *X. oryze* isolate CN2-1

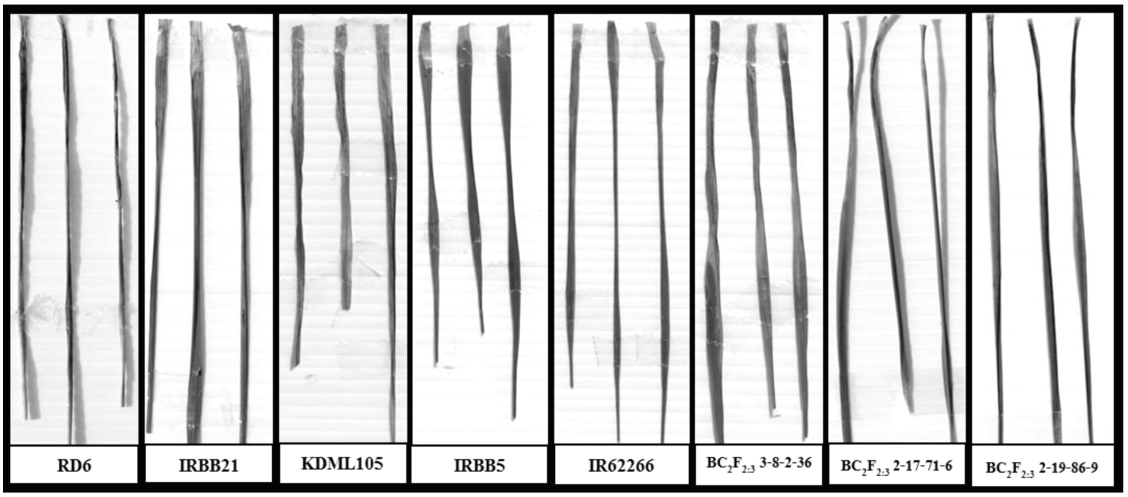

Figure 4 Reaction of lesion length to *X. oryze* isolate MS1-2

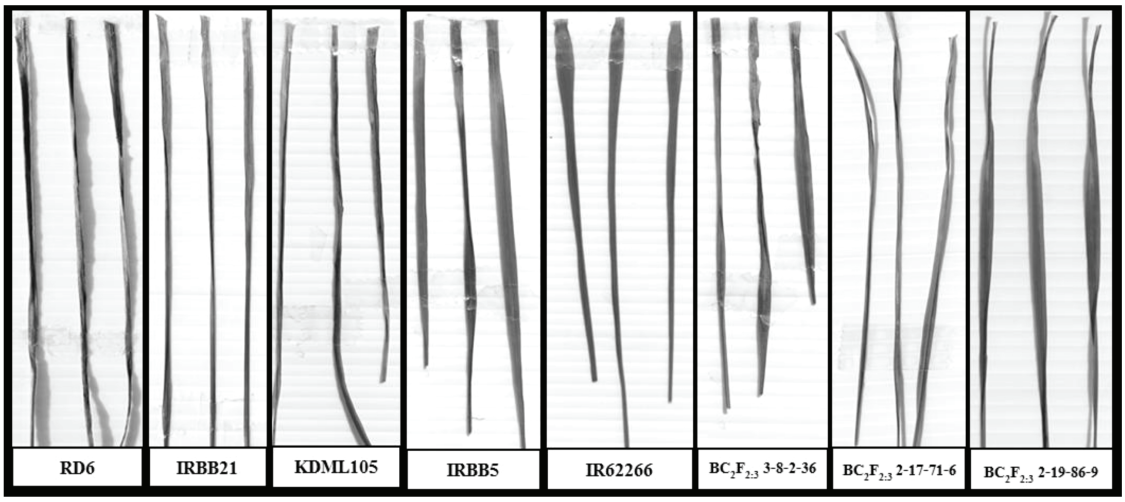

Figure 5 Reaction of lesion length to *X. oryze* isolate NY2-1

Table 4 Means of lesion length of 9$BC_2F_{2:3}$ population recurrent parent (RD 6) donor parent (IRBB21) and 1 susceptible check,2 resistant checksand $BC_2F_{2:3}$ 3-8-2-36 to 3 Bacterial blight isolate.

$BC_2F_{2:3}$ population/ Varieties	Lesion length (cm.) of isolate[1/]		
	CN2-1	MS1-2	NY1-1
$BC_2F_{2:3}$ 2-17-66-4	3.13 de	2.67 cd	3.57 bcd
$BC_2F_{2:3}$ 2-17-71-4	3.13 de	1.77 de	3.77 bcd
$BC_2F_{2:3}$ 2-17-71-6	2.60 ef	2.63 cd	3.60 bcd
$BC_2F_{2:3}$ 2-19-86-9	3.50 cde	2.57 cd	2.43 def
$BC_2F_{2:3}$ 5-24-110-1	3.67 cde	3.00 cd	2.87 de
$BC_2F_{2:3}$ 5-24-110-2	5.27 cd	2.63 cd	3.73 bcd
$BC_2F_{2:3}$ 5-24-110-8	3.03 e	2.83 cd	4.07 bcd
$BC_2F_{2:3}$ 5-24-110-10	2.90 e	3.77 c	3.40 d
$BC_2F_{2:3}$ 6-51-38-3	3.03 e	2.93 cd	3.50 cd
RD 6 (recurrent parent)	9.57 b	12.90 a	10.00 a
IRBB21 (donor parent)	5.40 c	4.20 c	5.43 bc
KDML105 (susceptible check)	14.53 a	11.33 a	11.20 a
IRBB5 (resistance check)	0.73 f	0.73 e	1.07 ef
IR62266 (resistance check)	2.73 ef	4.17 c	0.53 f
$BC_2F_{2:3}$ 3-8-2-36	3.63 cde	6.37 b	5.53 b
F-test	**	**	**
C.V. (%)	21.43	18.75	20.48

** = significant at P< 0.01. by LSD.

[1/]Means in the same column followed by the same letter(s) are not significantly different at P< 0.01 by LSD

Table 5 Reaction of 9 $BC_2F_{2:3}$ population recurrent parent (RD 6) donor parent (IRBB21) and 1 susceptible checks 2 resistant checksand $BC_2F_{2:3}$ 3-8-2-36 to 3 Bacterial blight isolates.

$BC_2F_{2:3}$ population/ Varieties	Reaction in isolate[1/]		
	CN2-1	MS1-2	NY1-1
$BC_2F_{2:3}$ 2-17-66-4	MR	R	MR
$BC_2F_{2:3}$ 2-17-71-4	MR	R	MR
$BC_2F_{2:3}$ 2-17-71-6	R	R	MR
$BC_2F_{2:3}$ 2-19-86-9	MR	R	R
$BC_2F_{2:3}$ 5-24-110-1	MR	MR	R
$BC_2F_{2:3}$ 5-24-110-2	MR	R	MR
$BC_2F_{2:3}$ 5-24-110-8	MR	R	MR
$BC_2F_{2:3}$ 5-24-110-10	R	MR	MR
$BC_2F_{2:3}$ 6-51-38-3	MR	R	MR
RD 6 (recurrent parent)	MS	S	S
IRBB21 (donor parent)	MR	MR	MR
KDML105 (susceptible check)	S	S	S
IRBB5 (resistance check)	HR	HR	R
IR62266 (resistance check)	R	MR	HR
$BC_2F_{2:3}$ 3-8-2-36	MR	MS	MR

[1/]Reactions;HR: highly resistance, R: resistance, MR: moderate resistance, MS: moderate susceptible and S: susceptible

สรุป

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้พัฒนาข้าว กข6 ให้มีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งด้วยวิธีผสมกลับ ร่วมกับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกพบว่าได้ประชากร $BC_2F_{2:3}$ จำนวน 2 สายพันธุ์ ที่มีลักษณะคล้ายกับข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 มียีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *Xa21* ที่แสดงปฏิกิริยาต้านทานได้ปานกลางกับเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งทั้ง 3 ไอโซเลท คือ $BC_2F_{2:3}$ 2-17-71-6 และ $BC_2F_{2:3}$ 2-19-86-9 สามารถบอกได้ถึงความได้ผลในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข6 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล STS ที่ใช้ในการคัดเลือกยีนเป้าหมาย *Xa21* ได้อย่างแม่นยำ ถึงแม้ข้าวที่ผ่านการคัดเลือกทั้ง 2 สายพันธุ์จะแสดงการต้านทานปานกลางต่อเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งแต่ก็แสดงให้เห็นถึงปฏิกิริยาต้านทานที่มากกว่าข้าว กข6 พันธุ์เดิม แต่ต้องนำไปปลูกทดสอบในสภาพแปลงในฤดูทำนาปกติ เพื่อทดสอบปฏิกิริยาต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคขอบใบแห้งในสภาพแปลงทดสอบ หากข้าวที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์สามารถแสดงปฏิกิริยาต้านทานได้ ก็สามารถใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ในการเพาะปลูกอีกทั้งยังสามารถเป็นประชากรพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข6 ให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งได้ดียิ่งขึ้นในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่นและศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้สนับสนุนงบประมาณและเชื้อพันธุกรรมข้าวในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

พยอม โคเบลลี่, จิตติมา วงศ์หนองหว้า, วราพงษ์ ชมาฤกษ์, สมทรง โชติชื่น, รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์วิชชุดา, รัตนากาญจน์ นุชกานต์ ศิลป์ประสิทธิ์ และธีรดา หวังสมบูรณ์ดี. 2557. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด STSs สำรวจแหล่งพันธุกรรมยีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งของข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยที่เก็บรวบรวมไว้ที่ศูนย์ปฏิบัติการและเก็บเมล็ดเชื้อพันธุ์ข้าวแห่งชาติ. น.213-226. ใน: การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาวครั้งที่ 31 พ.ศ.2557. สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว, กรุงเทพฯ.

จิรพงศ์ ใจรินทร์. 2556. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล.สัมมนาเชิงปฏิบัติการ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่องานปรับปรุงพันธุ์ข้าว 9-12 เมษายน 2556. ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี, อุบลราชธานี.

Chuwongse, J., G.B. Martin, and S.D. Tanksley. 1993. Pregermination genotypic screening using PCR amplification of half seeds. Theor. Appl. Genet. 86: 694-698.

Huang, N., E.R. Angeles, J. Domingo, G. Magpantay, S. Singh, G. Zhang, N. Kumaravadivel, J. Bennett, and G.S. Khush. 1997. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice marker-assisted selection using RFLP and PCR.Theor. Appl. Genet. 95: 313-320.

IRRI. 1996. Standard evaluation system for rice. INGER, Genetic Resources Center, International Rice Research Institute, P.O. Box 933, 1099 Manila, Philippines.

Jonaliza, L. S., B. Jongdee, G. Pantuwanc, and T. Toojinda. 2006. Developing KDML105 backcross introgression lines using marker-assisted selection for QTLs associated with drought tolerance in rice. Sci. Asia. 33: 207-214.

Kauffman, H.E., A.P.K. Reddy, S.P.Y. Hsieh, and S.D. Merca. 1973. An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. Plant Dis. 357: 537-541.

Khan, M.A., M. Naeem, and M. Iqbal. 2014. Breeding approaches for bacterial leaf blight resistance in rice (*Oryza sativa* L.), current status and future directions. Eur. J. Plant Pathol. 139: 27–37.

Khush, G.S., D.J. Mackill and G.S. Sidhu. 1989. Breeding rice for resistance to bacterial blight. pp. 207-217. In: bacterial blight of rice. International Rice Research Institute, Los, Banos, Manila, Philippines.

Khush, G.S., E. Bacalangco, and T. Ogawa, 1990.A new gene for resistance to bacterial blight from*O. longistaminata*. Rice Genet. Newsl. 7: 121-122.

Kim, S.M., J.P. Suh, Y. Qin, T.H. Noh, R.F Reinke, and K.K. Jena. 2015. Identification and fine-mapping of a new resistance gene, *Xa40*, conferring resistance to bacterial blight races in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 128: 1933-1943.

Kosack, K.E.H., and J.D.G. Jones. 1997. Plant disease resistance genes. Plant Mol.Biol. 48: 575–607.

Kottapalli, K.R., N.M. Lakshmi, and K.K. Jena. 2010. Effective strategy for pyramiding three bacterial blight resistance genes into fine grain rice cultivar, Samba Mahsuri, using sequence tagged site markers. Department of Plant and Soil Science, Texas Tech University, Lubbock, TX, 79409, USA. Biotechnol. Lett. 32: 989-96.

Ou, S.H. 1985. Rice diseases. 2nd Edition. Commonwealth Mycological Institute, England.

Ronald, P.C., B. Albano, R. Tabien, L. Abenes, K. Wu, S.R. McCouch, and S.D. Tanksley. 1992. Genetic and physical analysis of the rice bacterial blight disease resistance locus, *Xa21*. Mol. Gen. Genet. 236: 113–120.

Wanchana S., T. Toojinda, S. Tragoonrung, and A. Vanavichit. 2003. Duplicated coding sequence in the waxy allele of tropical glutinous rice (*Oryza sativa* L.). Plant Sci. 165: 1193-1199.

Wang, G.L., W.Y. Song, D.L. Ruan, S. Sideris, and P.C. Ronald.1996. The cloned gene, *Xa21*, confers resistance to multiple *Xanthomonascampestris*pv. *oryzae* isolate in transgenic plant. Molecular Plant-Microbe Interaction. 9: 850-885.

Zhan, X.D., H.P. Zhou, R.Y. Chai, J.Y. Zhuang, S.H. Cheng, and L.Y. Cao. 2012. Breeding of R8012, a Rice Restorer Line Resistant to Blast and Bacterial Blight through Marker-Assisted Selection. Rice Sci. 19: 29-35.