

การตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองไทย

Investigation of blast disease resistant genes in Thai local rice

เมทินี กัดมุกข์ นิตยศรี แสงเดือน และ วิภา หงษ์ตระกูล*

Maytinee Kladmook, Nitsri Sangduen and Vipa Hongtrakul*

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding author: fscivph@ku.ac.th

บทคัดย่อ

โรคไหม้มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* เป็นโรคที่สำคัญมากโรคหนึ่งในข้าว ข้อมูลเกี่ยวกับข้าวพันธุ์ต่างๆ ว่ามียีนต้านทานโรคหรือไม่มียีนต้านทานโรค เป็นข้อมูลที่สำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว จากการสำรวจพันธุ์กรรมข้าวพื้นเมืองของไทย 110 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ 3 ตำแหน่งคือยีน *Pi-ta*, *Pi-b* และ *Pi-2t* พบว่าข้าวพื้นเมืองของไทยส่วนใหญ่ (79 ตัวอย่าง) มียีนต้านทานโรคไหม้อย่างน้อยหนึ่งตำแหน่ง และมีข้าวพื้นเมือง 3 ตัวอย่างที่มียีนต้านทานโรคไหม้ทั้ง 3 ตำแหน่ง ข้อมูลจากการทดลองนี้จะประโยชน์สำหรับโครงการปรับปรุงพันธุ์เพื่อการพัฒนาพันธุ์ข้าวใหม่ให้ต้านทานต่อโรคไหม้ในอนาคต

ABSTRACT

Blast disease, caused by *Pyricularia grisea*, is one of the most serious diseases of rice. Information on rice with disease resistant genes is important for rice improvement project. In this study, we identified 110 Thai local rice samples using molecular markers specific to rice blast resistant genes, *Pi-ta*, *Pi-b* and *Pi-2t*. We found that 79 cultivars have at least one resistant gene and three cultivars have all the three resistant genes. The outcome of this study will be very useful for breeding program to develop new blast resistant elite rice cultivars in the future.

คำสำคัญ: ยีนต้านทานโรคไหม้ ข้าวพื้นเมืองไทย

Keywords: blast disease resistant genes, Thai local rice

บทนำ

โรคไหม้ (blast disease) มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. หรือ *Magnaporthe grisea* เป็นโรคที่สำคัญที่สุดโรคหนึ่งในข้าวและสร้างความเสียหายต่อผลผลิตเป็นอย่างมาก สามารถทำลายต้นข้าวได้ในทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ระยะกล้าถึงระยะออกรวง กรณีเกิดโรคระบาดรุนแรง กล้าข้าวจะแห้งและพุ่มตาย อาการคล้ายถูกไฟไหม้ ส่วนระยะแตกกอ พบอาการของโรคได้ทั้งใบ (leaf blast) กาบใบ ข้อต่อใบ และข้อต่อลำต้น ขนาดแผลที่พบจะใหญ่กว่าในระยะกล้า แผลสามารถขยายลุกลามติดต่อกันได้จนถึงข้อต่อใบ และข้อต่อลำต้น ใบจะมีลักษณะเป็นจุดดำ สีน้ำตาล กลางแผลเป็นสีเทาดำ ในระยะออกรวง พบเชื้อเข้าทำลายได้ดีในระยะข้าวเริ่มให้รวง มีฝนตกชุก เชื้อรานี้จะเข้าทำลายที่คอรวง (neck blast) ในระยะเริ่มแก่จะสังเกตเห็นได้ทั้งบริเวณคอรวง จะพบเชื้อรานี้เข้าทำลายเป็นรอยแผลขั้วสีน้ำตาลเทา ทำให้คอรวงหักพับง่าย เมล็ดลีบ รวงข้าวจะร่วง หล่นผลผลิตลดลงอย่างมาก (ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี, 2551)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรค เป็นวิธีการที่เหมาะสมในการควบคุมการระบาดของโรคไหม้ และเป็นแนวทางที่ให้ผลคุ้มค่าในระยะยาว โดยสามารถลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรค และลดมลภาวะที่มีผลต่อสิ่งแวดล้อม (พูนศักดิ์ และคณะ, 2550) ในข้าวพื้นเมืองของประเทศไทยที่มีความหลากหลายของพันธุ์ค่อนข้างสูง และมีลักษณะที่ดีบางประการ เช่น ความต้านทานต่อโรค และแมลงศัตรูพืช ดังนั้นข้าวพื้นเมืองจึงเป็นฐานพันธุ์กรรมที่มีประโยชน์อย่างยิ่ง ในการพัฒนาพันธุ์ข้าวให้ได้พันธุ์ดีในอนาคต ข้อมูลเกี่ยวกับข้าวพันธุ์ต่างๆ ว่ามียีนต้านทานโรคหรือไม่ จึงเป็นข้อมูลที่สำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าว โดยปัจจุบันได้มีการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้เป็นเครื่องมือ ช่วยในการคัดเลือกและตรวจสอบว่า ข้าวมีลักษณะที่ต้องการหรือไม่อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการเข้าถึงยีนที่

ควบคุมลักษณะทางคุณภาพและทางปริมาณของข้าวโดยตรง เช่น ลักษณะความหอม ความต้านทานโรค ความทนทานต่อสภาพแวดล้อม (อภิชาติ และคณะ, 2544) เครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับยีนหรืออยู่ภายในยีน สามารถนำมาใช้คัดเลือกข้าวที่มียีนหรือลักษณะที่ต้องการได้

ยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคไหม้มีหลายยีน โดยยีนที่มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบได้แก่ยีน *Pi-ta* มีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 12 จากการระบุตำแหน่งของยีนด้วยวิธี map-based cloning ทำให้ทราบตำแหน่งที่แน่นอนของยีน และได้มีการศึกษาลำดับเบสของยีนนี้ พบว่าเป็นยีนเดี่ยว (single gene) กำหนดการสร้าง putative cytoplasmic protein ขนาดกรดอะมิโน 928 เรซิดิว ในข้าว *indica* พบว่าโปรตีนจากยีนต้านทาน (*Pi-ta*) แตกต่างจากโปรตีนจากยีนที่อ่อนแอ (*pi-ta*) เพียง 1 ตำแหน่ง คือกรดอะมิโนที่ 918 โปรตีนในพันธุ์ที่ต้านทานโรคเป็นกรดอะมิโนอะลานีน ส่วนในพันธุ์ที่อ่อนแอเป็นซีรีน และเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่สร้างจากข้าว *japonica* ที่อ่อนแอต่อโรคพบว่า มีกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน 5 ตำแหน่ง (Bryan *et al.*, 2000) จากความแตกต่างของลำดับเบสที่พบจึงมีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด dominant marker ที่จำเพาะกับแอลลีล *Pi-ta* และ *pi-ta* (Jia *et al.*, 2003)

ยีน *Pi-b* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 2 ได้มีการศึกษาลำดับเบสของยีน พบว่ายีนนี้กำหนดการสร้างโปรตีนขนาดกรดอะมิโน 1,251 เรซิดิว (Wang *et al.*, 1999) และมีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด PCR-based marker โดยออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับลำดับเบสบริเวณปลาย 3' ของยีน เมื่อนำไปตรวจสอบจะพบแถบดีเอ็นเอเฉพาะข้าวที่มียีนต้านทานเท่านั้น (Fjellstrom *et al.*, 2004)

ยีน *Pi-2t* มีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 6 อยู่ห่างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอเอชดีเอฟแอลพี RG64 เป็นระยะทาง 2.8 cM (Yu *et*

al., 1991) จึงมีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด cleaved amplified polymorphisms (CAPs) โดยนำลำดับเบสบริเวณเครื่องหมายดีเอ็นเอ RG64 มาออกแบบไพรเมอร์ เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* พบว่าให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ด้านทานที่มียีน *Pi-2t* กับพันธุ์อ่อนแอที่มียีน *Pi-2t* (Hittalmani et al., 1995)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาว่าข้าวพื้นเมืองสายพันธุ์ต่าง ๆ มียีนด้านทานโรคไหม้หรือไม่ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีนด้านทานได้แก่ยีน *Pi-ta*, *Pi-b* และ *Pi-2t* เพื่อประโยชน์แก่นักปรับปรุงพันธุ์ที่จะสามารถนำข้อมูลไปใช้ ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ด้านทานต่อโรคไหม้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างข้าวและการสกัดดีเอ็นเอ

รวบรวมพันธุ์ข้าวพื้นเมืองรวม 110 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) จากทั่วประเทศ นำใบอ่อนของข้าวมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Webb and Knapp, 1990) ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ภายหลังการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เปรียบเทียบปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้นประมาณ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

การตรวจสอบพันธุกรรมข้าวโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะกับยีนด้านทานโรคไหม้

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อยีน *Pi-2t*, *Pi-ta* และ *Pi-b* โดยมีส่วนประกอบของสารดังนี้ ดีเอ็นเอ 20 นาโนกรัม, 10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50mM KCl, 0.08% Nonidet P40, 0.2 μ M ไพรเมอร์, 2.0 μ M $MgCl_2$, 0.1 mM dNTP และ Taq DNA polymerase 1 ยูนิต (Fermentas, Canada) โดยไพรเมอร์จะจำเพาะกับยีนด้านทานโรคไหม้ (ตารางที่ 2) ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน

3 นาที 1 รอบ; อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, อุณหภูมิ annealing (55-62 องศาเซลเซียส) นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1.30 นาที 35 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ เก็บผลผลิตพีซีอาร์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยนำมาแยกด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 110 โวลต์เป็นเวลาประมาณ 40 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดนาน 5 นาที ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* ซึ่งในปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (15 ไมโครลิตร) มีส่วนประกอบดังนี้ ผลผลิตพีซีอาร์ 5 ไมโครลิตร ultra pure water 7.9 ไมโครลิตร 10X buffer (+1X BSA) 1.5 ไมโครลิตร *HaeIII* (10 ยูนิต/ไมโครลิตร) 0.6 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis

ผลการทดลองและวิจารณ์

เครื่องหมายจำเพาะกับยีน *Pi-ta* เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด dominant marker จำเพาะกับแอลลีลที่ให้ลักษณะด้านทานต่อโรคไหม้ มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 12 โดยตัวอย่างที่มียีนด้านทานจะปรากฏชั้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.1 กิโลเบส (ภาพที่ 1 ก) (Jia et al., 2003) เครื่องหมายจำเพาะกับยีน *Pi-b* เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด dominant marker ซึ่งจำเพาะกับแอลลีลที่ให้ลักษณะด้านทานต่อโรคไหม้ มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 2 โดยตัวอย่างที่มียีนด้านทานจะปรากฏชั้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 360 คู่เบส โดยอาจพบ non specific band ขนาดประมาณ 600 และ 700 คู่เบส (ภาพที่ 1 ข) (Fjellstrom et al., 2004) เครื่องหมายจำเพาะกับยีน *Pi-2t* ที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 6 พบว่ามีจำนวนรูปแบบของชั้นดีเอ็นเอหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* ทั้งหมด

ตารางที่ 1 ตัวอย่างพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทยที่ใช้ในการศึกษา (ในวงเล็บระบุหมายเลขพันธุ์ข้าวที่เก็บรวบรวมไว้ที่หน่วยค้นหาและใช้ประโยชน์อื่นข้าว อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม)

หมายเลข	ชื่อพันธุ์ข้าว	หมายเลข	ชื่อพันธุ์ข้าว	หมายเลข	ชื่อพันธุ์ข้าว
1	ข้าวแดง (A001)	38	ข้าวกำ (C028)	75	ข้าวหนอนน้อย (D026)
2	ข้าวเหลืองบุญมา (D064)	39	ข้าวห้าว (C029)	76	ข้าวปึก (D027)
3	ข้าวคอ (D065)	40	ข้าวเหนียวดำ (C031)	77	ข้าวหยวก (D028)
4	ข้าวขาวอ้ายเชิด (A022)	41	ข้าวกำหรือข้าวเหนียว (C032-1)	78	ข้าวหอมหมื่นต้น (D029)
5	ข้าวหอมลูกวัง (A023)	42	ข้าวอีหนอนแดง (C033)	79	ข้าวสารแก้ว (D030)
6	ข้าวดำ (A026)	43	ข้าวดำหรือข้าวกำ (C034)	80	ข้าวแถบแดง (D031)
7	ข้าวหอมพื้นเมือง (A027)	44	ข้าวอาบขย (C035)	81	ข้าวปลาชีวิตอกคู่ (D033)
8	ข้าวดอกพยอม (A030)	45	ข้าวมันปู (C037)	82	ข้าวปลาชีวิตอกคู่ (D034)
9	ข้าวเจ้า (A035)	46	ข้าวจีบหรือข้าวแดง (C038)	83	ข้าวกอเดียว (D035)
10	ข้าวพื้นเมือง (A036)	47	ข้าวเหนียวดำ (C040)	84	ข้าวหนอนคอ (D036)
11	ข้าวเม่นคุ่มลาย (A037)	48	ข้าวเหนียวแดงน้ำหมาก (C041)	85	ข้าวปลาชีวิต (D037)
12	ข้าวคายเหียง (A038)	49	ข้าวกำ (C042)	86	ข้าวคอหรือข้าวแม่ฮ้าง (D038)
13	ข้าวคายเหียง (A039)	50	ข้าวขาวใหญ่ (D001)	87	ข้าวหอมทุ่ง (D039)
14	ข้าวคายเหียง (A040)	51	ข้าวขี้ตมใหญ่ (D002)	88	ข้าวคออุบล (D040)
15	ข้าวเจ้าแดง (A041)	52	ข้าวเส้นแตก (D003)	89	ข้าวคอปลาชีวิต (D041)
16	ข้าวเจ้าแดง (A042)	53	ข้าวแม่ตัง (D004)	90	ข้าวอินางคูน (D042)
17	ข้าวนก (A043)	54	ข้าวหอมภูพาน (D005)	91	ข้าวขาวคอ (D043)
18	ข้าวเหลืองทอง เล้าแตก (D066)	55	ข้าวอีกลีง (D006)	92	ข้าวปักขามคอ (D044)
19	ข้าวเงาะระหิน (A045)	56	ข้าวชีวะแม่จัน (D007)	93	ข้าวคองนางบุญมา (D045)
20	ข้าวเงาะบุญมือสะเอย (A046)	57	ข้าวขาวปลาชีวิต (D008)	94	ข้าวคองนางบุญมา (D047)
21	ข้าวเงาะเพื่อน (A047)	58	ข้าวแก่นลือหัก (D009)	95	ข้าวเหลืองบุญมา (D048)
22	ข้าวขาวใหญ่ (A048)	59	ข้าวกำน้ำปุ่น (D010)	96	ข้าวคองนางวี (D049)
23	ข้าวคายเหียง (A052)	60	ข้าวพระยาสิมแกง (D011)	97	ข้าวอีเป็ดน้อย (D050)
24	ข้าวจะกลอ (A053)	61	ข้าวเขียว (D012)	98	ข้าวหอมตม (D051)
25	ข้าวอีโต้ (A057)	62	ข้าวอีโพ (D013)	99	ข้าวป่องแก้ว (D052)
26	ข้าวคายเหียง (A058)	63	ข้าวสมสมัย (D014)	100	ข้าวเหนียวปลาชีวิต (D053)
27	ข้าวกำ (C001)	64	ข้าวขี้ตมเหลือง (D015)	101	ข้าวเหนียวป่องแก้ว (D054)
28	ข้าวเบาะหัวบอน (C004)	65	ข้าวคืบหมาย (D016)	102	ข้าวอีเก็ด (D055)
29	ข้าวมะลิแดง (C015)	66	ข้าวตะหมาย (D017)	103	ข้าวมันเป็ด (D056)
30	ข้าวกำ (C017)	67	ข้าวกอเดียว (D018)	104	ข้าวอีตม (D057)
31	ข้าวกำเล้า (C021)	68	ข้าวเงินขาว (D019)	105	ข้าวเหนียวแพร่ไร่ (D058)
32	ข้าวเหนียวแดง (C022)	69	ข้าวมันมูม (D020)	106	ข้าวคอเหมย (D059)
33	ข้าวพื้นเมือง (C023)	70	ข้าวสารแก้ว (D021)	107	ข้าวเล็บช้าง (D060)
34	ข้าวพื้นเมือง (C024)	71	ข้าวดอกกย (D022)	108	ข้าวปลีก (D061)
35	ข้าวพื้นเมือง (C025)	72	ข้าวคอกทอง (D023)	109	ข้าวป่องแก้ว (D062)
36	ข้าวกำ (C026)	73	ข้าวมะเกาะ (D024)	110	ข้าวเหลืองบุญมา (D063)
37	ข้าวแดง (C027)	74	ข้าวหนอนใหญ่ (D025)		

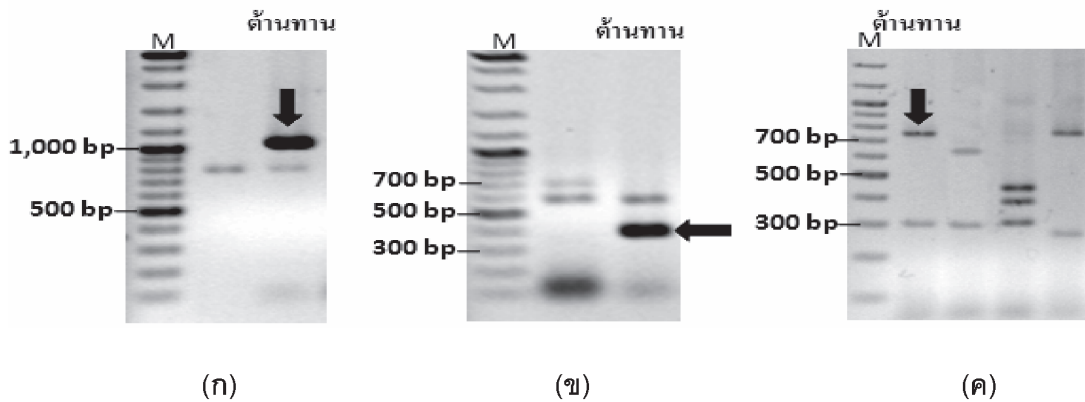
4 รูปแบบ (ภาพที่ 1 ค) โดยพบว่ารูปแบบที่ 1 มีขนาดของซินติเอ็นเอประมาณ 300 และ 750 คู่เบส เป็นซินติเอ็นเอจำเพาะกับแอลลีล *Pi-2t* ให้ลักษณะ

ด้านทานโรคไหม้ในข้าว ส่วนแอลลีลรูปแบบ 2 มีขนาดซินติเอ็นเอประมาณ 300 และ 650 คู่เบส เป็นรูปแบบที่พบในพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อโรคที่พบในข้าว

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ 3 ตำแหน่ง ที่ใช้ในการศึกษา

Locus	Chromosome	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Annealing temp. (°C)	Distance from gene (cM)
<i>Pi-ta</i> ¹	12	agcaggttataagctaggcc	ctaccaacaagttcatcaaa	55	0.0
<i>Pi-2t</i> ²	6	gttggttgagctctccaatgcctgttc	ctgcagtgcaatgtacggccagg	60	2.8
<i>Pi-b</i> ³	2	gaacaatgcccaaaacttgaga	gggtccacatgtcagtgagc	62	0.0

¹ไพรเมอร์จาก Jia *et al.* (2003), ²ไพรเมอร์จาก Hittalmani *et al.* (1995), ³ไพรเมอร์จาก Fjellstrom *et al.* (2004)



ภาพที่ 1 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของข้าว โดยใช้เครื่องหมายจำเพาะกับยีน 3 ตำแหน่ง คือ ยีน *Pi-ta* (ก), *Pi-b* (ข) และ *Pi-2t* (ค) (M = molecular DNA ladder)

indica แอลลีลรูปแบบที่ 3 พบในข้าว *japonica* และรูปแบบที่ 4 ปรากฏขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 270 และ 750 คู่เบส ซึ่งไม่พบในรายงานมาก่อน ตัวอย่างข้าวที่ปรากฏแอลลีล *Pi-ta*, *Pi-2t* และ *Pi-b* ที่ให้ลักษณะต้านทานต่อโรคไหม้ แสดงไว้ในตารางที่ 3 เนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะกับยีน *Pi-2t* อยู่ห่างจากยีนเป็นระยะทาง 2.8 cM ดังนั้นอาจมีความผิดพลาดในการตรวจสอบเนื่องจากการเกิด recombination ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอและยีนที่ต้องการตรวจสอบได้ โดยมีโอกาสที่จะเกิดความผิดพลาด 2.8% (Hittalmani *et al.*, 1995) กรณีต้องการยืนยันผลการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอว่าข้าวมียีนต้านทาน *Pi-2t* จริง จำจะต้องตรวจสอบโดยปลูกเชื้อลงบนต้นข้าว แล้วตรวจสอบการเกิดโรคเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ยีนต้านทาน *Pi-2t* ประกอบกับได้มีรายงานการศึกษาลำดับเบสของยีน *Pi-2t* ในพันธุ์ข้าว

ที่มีแอลลีลต้านทานและอ่อนแอต่อโรค (Zhou *et al.*, 2006) จึงน่าจะมีศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างของลำดับเบสของยีนบริเวณต่างๆ กับความต้านทานโรค เพื่อนำมาพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีน *Pi-2t* โดยตรง

ยีน *Pi-ta* มีรายงานว่าพบในข้าวพันธุ์ Tadukan จากประเทศฟิลิปปินส์ เป็นยีนต้านทาน หรือยีน R ด้านทานต่อการบุกรุกของเชื้อราก่อโรคไหม้ ยีนที่ให้ลักษณะต้านทานเป็นยีนเด่น (dominant gene) มีตำแหน่งอยู่บริเวณใกล้เซนโทรเมียร์ของโครโมโซมที่ 12 บริเวณนี้มีกลุ่มยีน R โดยพบว่ามียีนที่ต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta* อยู่บริเวณนี้ด้วย ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ข้าวที่พบว่ามียีน *Pi-ta* แสดงลักษณะความต้านทานแบบกว้าง (broad spectrum resistance) (Rybka *et al.*, 1997) ยีน *Pi-b* เป็นยีนที่ให้ลักษณะความต้านทานเชื้อก่อโรคไหม้ที่มีรายงานครั้งแรกใน

ตารางที่ 3 แอลลีลต้านทานโรคไหม้ *Pi-ta*, *Pi-2t* และ *Pi-b* ที่พบในตัวอย่างข้าวพื้นเมืองไทย 110 ตัวอย่าง (X = พบว่ามีแอลลีลต้านทาน และ * = สภาพเสถียรโรโซโกด)

ตัวอย่างที่	<i>Pi-ta</i>	<i>Pi-2t</i>	<i>Pi-b</i>	ตัวอย่าง	<i>Pi-ta</i>	<i>Pi-2t</i>	<i>Pi-b</i>	ตัวอย่างที่	<i>Pi-ta</i>	<i>Pi-2t</i>	<i>Pi-b</i>
1	x	x		38		x		75			
2	x	x		39		x		76			
3	x	x		40		x		77			
4				41	x			78			
5		x		42				79			
6		x		43	x			80			
7		x		44				81		x	
8				45				82		x	
9				46		x		83		x	
10		x		47		x		84		x	
11				48		x		85	x	x	
12		x	x	49		x		86	x	x	
13				50	x	x	x	87		x	
14				51	x	x		88	x	x	
15	x	x		52		x		89		x	x
16		x		53				90	x	x	
17	x	x*		54		x		91	x	x	
18		x		55		x		92		x	
19		x		56				93	x	x	
20		x		57		x		95	x	x	
21		x	x	58				96	x	x	
22		x		59		x		97	x	x	
23				60		x		98		x	
24				61				99	x	x	
25		x		62				100	x	x	
26				63		x		101	x	x	
27	x	x		64		x		102	x	x	
28				65	x	x		103		x	
29		x	x	66	x	x	x	104		x	
30	x	x		67		x		105	x	x	x
31		x		68				106	x	x	
32				69		x		107		x	
33		x		70		x		108			
34		x		71				109		x	
35		x		72				110		x	
36	x	x		73							
37		x		74							

ประเทศญี่ปุ่น (Shinoda *et al.*, 1971) จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอพบว่า ข้าวพื้นเมืองของไทยมียืนต้นต้านทาน *Pi-ta* และ *Pi-b* เช่นเดียวกันกับที่พบในข้าวต่างประเทศสำหรับยืน *Pi-2t* เป็นยืนต้นต้านทานต่อโรคไหม้ อีกยืนหนึ่ง ที่ให้ลักษณะความต้านทานแบบกว้าง สามารถต้านทานเชื้อก่อโรคไหม้ที่พบในประเทศฟิลิปปินส์ได้ถึง 415 สายพันธุ์ (Chen *et al.*, 1996) พบในข้าว *indica* พันธุ์ 5173 ข้าวพื้นเมืองของไทยส่วนใหญ่ (79 ตัวอย่าง) มียืนต้นต้านทานโรคไหม้อย่างน้อยหนึ่งตำแหน่ง ตัวอย่างข้าวที่ไม่พบแอลลีลต้านทานมีทั้งหมด 31 ตัวอย่าง และมีข้าว 3 ตัวอย่างที่มียืนต้นต้านทานโรคไหม้ทั้ง 3 ตำแหน่ง คือ ข้าวขาวใหญ่ (ตัวอย่างที่ 50, D001) ข้าวตะหมาย (ตัวอย่างที่ 66, D017) และข้าวเหนียวแพร่ไร่ (ตัวอย่างที่ 105, D058) ข้าวพื้นเมืองเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้ได้

สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจพันธุ์กรรมข้าวพื้นเมืองไทย 110 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะกับยืนต้นต้านทานโรคไหม้ 3 ตำแหน่งคือยืน *Pi-ta*, *Pi-b* และ *Pi-2t* พบว่าข้าวพื้นเมืองของไทยส่วนใหญ่จำนวน 79 ตัวอย่าง มียืนต้นต้านทานต่อโรคไหม้อย่างน้อยหนึ่งตำแหน่ง และมีข้าวพื้นเมือง 3 ตัวอย่างได้แก่ ข้าวขาวใหญ่ (D001) ข้าวตะหมาย (D016) และข้าวเหนียวแพร่ไร่ (D058) มียืนต้นต้านทานโรคไหม้ทั้ง 3 ตำแหน่ง การตรวจสอบพันธุ์กรรมของข้าวพื้นเมืองว่ามียืนที่ควบคุมลักษณะที่เป็นประโยชน์ดังกล่าวหรือไม่เป็นข้อมูลที่สำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ดร. ปัทมา ศิริชัยญา และ ดร. ชีรยุทธ ตูจินดา สำหรับการอนุเคราะห์ตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษา งานวิจัยนี้ เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยที่ได้

รับทุนสนับสนุนจากศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปี 2550-2551 และทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2551

เอกสารอ้างอิง

- พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ พยอม โคเบลล์ อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ ถนอมจิตร ฤทธิมนต์ ฤกษ์นา เกศสุวรรณ ชนสิริน กลิ่นมณี และ สงวนเที่ยงดีฤทธิ. 2550. การตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทย. *Thai Rice Res J* 1: 52–64.
- ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี. 2551. โรคไหม้ในข้าว. แหล่งที่มา: http://ubn.ricethailand.go.th/NE_knowledge/pests/disease/blast.htm, 29 สิงหาคม 2551.
- อภิชาติ วรรณวิจิตร สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง และชีรยุทธ ตูจินดา. 2544. เทคโนโลยีชีวภาพกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ใน *วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกับข้าวไทย*. ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, กรุงเทพฯ. น. 79–122.
- Bryan, G.T., Wu, K.S., Farrall, L., Jia, Y., Hershey, H.P., McAdams, S.A., Faulk, K.N., Donaldson, G.K., Tarchini, R. and Valent, B. 2000. A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell* 12: 2033–2045.
- Chen, D.H., Zeigler, R.S., Ahn, S.W. and Nelson, R.J. 1996. Phenotypic characterization of the rice blast resistance gene *Pi-2t*. *Plant Dis* 80: 52–56.
- Fjellstrom, R., McClung, A.M., Marchetti, M.A. and Shank, A.R. 2004. Development of DNA markers suitable for marker assisted selection of

- three *Pi* genes conferring resistance to multiple *Pyricularia grisea* pathotypes. *Crop Sci* 44: 1790–1798.
- Hittalmani, S., Foolad, M.R., Mew, T., Rodriguez, R.L. and Huang, N. 1995. Development of a PCR-based marker to identify rice blast resistance gene, *Pi-2(t)*. *Theor Appl Genet* 91: 9–14.
- Jia, Y., Bryan, G.T., Farrall, L. and Valent, B. 2003. Natural variation at the *Pi-ta* rice blast resistance locus. *Phytopathology* 93: 1452–1459.
- Rybka, K., Miyamoto, M., Ando, I., Saito, A., and Kawasaki, S. 1997. High resolution mapping of the indica-derived rice blast resistance gene II. *Pi-ta*² and *Pi-ta* and a consideration of their origin. *Mol Plant Microbe Interact* 10: 517–524.
- Shinoda, H., Toriyama, K., Yunoki, T., Ezuka, A. and Sakurai, Y. 1971. Studies in the varietal resistance of rice to blast. 6. Linkage relationship of blast resistance genes. *Bull Chugoku Agric Exp Stn Ser A* 20: 1–25. (in Japanese with English summary)
- Wang, Z.X., Yano, M., Yamanouchi, U., Iwamoto, M., Monna, L., Hayasaka, H., Katayose, Y. and Sasaki, T. 1999. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J* 19: 55–64.
- Webb, D.M. and Knapp, S.J. 1990. DNA extraction from previously recalcitrant plant genus. *Mol Biol Res* 8: 180–185.
- Yu, Z.H., Mackill, D.J., Bonman, J.M. and Tanksley, S.D. 1991. Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers. *Theor Appl Genet* 81: 471–476.
- Zhou, B., Dolan, M., Sakai, H. and Wang, G.L. 2006. The genomic dynamics and evolutionary mechanism of *Pi2/9* locus in rice. *Mol Plant Microbe Interact* 20: 63–71.