

การตรวจสอบยีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในลูกผสมกลับ BC₁F₅

Identification of bacterial blight resistance gene in hybrid rice (BC₁F₅)

พีระพงษ์ เก่ง¹ สุพรรณนิภา เสงส์สาย² สุนิยม ตราปราบ³ สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล¹
และ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ^{1*}

Perapong Kehung¹, Supanyika Sengsai², Suniyom Traprab³, Surin Peyachoknagul¹
and Pradit Pongtongkam^{1*}

¹ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

²ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม 10700

³สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมข้าว กรุงเทพฯ 10900

¹Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

²Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakhon Pathom 10700, Thailand

³Bureau of Rice Research and Development, Rice Department, Bangkok 10900, Thailand

* Corresponding author: fscipdp@ku.ac.th

บทคัดย่อ

ตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *xa5* ของลูกผสมกลับ BC₁F₅ ที่ได้จากการผสมข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับพันธุ์ IRBB5 ซึ่งมียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง *xa5* และนำลูกผสมรุ่นที่ 1 ผสมกลับไปยังพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และผสมตัวเองต่อมาจนได้ลูก BC₁F₅ 14 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RG556 พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1,600 คู่เบส ในทุกสายพันธุ์ และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ *Hpy* CH4 IV พบแถบดีเอ็นเอ ขนาด 1,000 และ 300 คู่เบส เช่นเดียวกับในพันธุ์ IRBB5 แสดงว่าลูกผสมกลับทั้ง 14 สายพันธุ์ มีจีโนมไปของยีน *xa5* อยู่ในสภาพโฮโม

ไซกัส เมื่อทดสอบความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง ด้วยวิธีการปลูกเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* สายพันธุ์ 0701 ให้กับใบอ่อนของต้นกล้าอายุ 45 วัน พบว่าลูกผสมกลับ BC₁F₅ มีความต้านทานต่อเชื้อดังกล่าวในระดับต้านทาน (R) การตรวจสอบเปรียบเทียบองค์ประกอบทางพันธุกรรมระหว่างลูกผสมกลับ BC₁F₅ แต่ละสายพันธุ์กับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยใช้เทคนิค AFLP พบว่าลูกผสมกลับสายพันธุ์ B1, B3, B5, B6, B13 และ B14 มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มากที่สุด คือ 99.06% ซึ่งทั้ง 6 สายพันธุ์นี้จะนำไปทดสอบคุณภาพและผลผลิตต่อไป

ABSTRACT

Identification of *xa5* gene was done using RG556 marker in 14 hybrid rice (BC_1F_5) lines derived from the cross between KDML 105 rice and IRBB5 (a bacterial blight resistant variety having *xa5* gene), backcrossed to KDML 105 followed by selfing for 4 generations. It was found that all BC_1F_5 lines carried 1,600 bp DNA band. Upon treating the PCR amplicon with restriction enzyme *Hpy* CH4 IV, all BC_1F_5 lines gave DNA fragments of 1,000 bp and 300 bp similar to those of bacterial blight resistant line (IRBB5). These results indicated that the tested BC_1F_5 lines had resistance *xa5* gene, in homozygous condition. The level of bacterial blight resistance was also determined by inoculation with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* race 0701 on 45 day young seedling leaves. All BC_1F_5 lines showed resistant to the bacteria. Using AFLP technique, B1, B3, B5, B6, B13 and B14 of BC_1F_5 lines showed 99.06% genetic similarity to KDML105. These six selected lines will be further used for quality and yield testing.

คำสำคัญ: โรคขอบใบแห้ง, ข้าวขาวดอกมะลิ105, เอเอฟแอลพี, ยีน *xa5*

Keywords: bacterial blight, KDML105 rice, AFLP, *xa5* gene

บทนำ

การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืช เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการป้องกันศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อสิ่งแวดล้อม พันธุ์ต้านทานเหล่านี้ย่อมให้ผลผลิตที่สูงและมีคุณภาพที่ดีกว่าพันธุ์ไม่ต้านทานซึ่งเป็นที่ต้องการของเกษตรกร (ศิริพร, 2537; กฤษฎา, 2551) การปลูกข้าวก็เช่นกัน การใช้พันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืช จะส่งผลให้ข้าวมีผลผลิต

และมีคุณภาพที่ดี

โรคขอบใบแห้ง (bacterial blight) จัดเป็นโรคข้าวที่สำคัญเนื่องจากการระบาดรุนแรงและทำความเสียหายในแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญของประเทศไทย (สถาบันวิจัยข้าวกรมวิชาการเกษตร, 2549) นอกจากนี้ยังก่อความเสียหายในประเทศที่ปลูกข้าวอีกหลายประเทศเช่น จีน เวียดนาม อินโดนีเซีย อินเดีย และฟิลิปปินส์ (Singh *et al.*, 2002; Amar, 2006; Chen *et al.*, 2000) เป็นต้น โดยในประเทศอินเดียต้องสูญเสียผลผลิตของข้าวจากโรคนี้นักเป็น 20-40% (Sonti, 1998) โรคขอบใบแห้งนี้มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) โดยเชื้อแบคทีเรียจะเข้าสู่ต้นพืชทางบาดแผลที่เกิดขึ้นบนผิวใบ หรือ รูเปิดโดยธรรมชาติ จากนั้นเชื้อจะเข้าทำลายท่อน้ำและท่ออาหาร ทำให้เกิดอาการของโรค 2 ลักษณะคือ ลักษณะขอบใบแห้ง (leaf blight) และต้นแห้งตาย (kresek) (ทัศนีย์, 2540; สถาบันวิจัยข้าวกรมวิชาการเกษตร, 2544)

ยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งของข้าวที่นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวมีอย่างน้อย 24 ยีน โดยมีทั้งยีนที่แสดงออกแบบยีนเด่น (*Xa1*, *Xa2*, *Xa3*, *Xa4*, *Xa6*, *Xa7*, *Xa9*, *Xa10*, *Xa11*, *Xa12*, *Xa14*, *Xa16*, *Xa17*, *Xa18*, *Xa19*, *Xa21*, *Xa23*, *Xa24*, *Xa26*) และยีนที่มีการแสดงออกแบบยีนด้อย (*xa5*, *xa8*, *xa13*, *xa19*, *xa20*, *xa22*) (Kottapali *et al.*, 2007) ซึ่งยีนต้านทานเหล่านี้มีผู้นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้สามารถต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง ตัวอย่างเช่น ข้าวอินดิกาพันธุ์ PR106 ซึ่งเป็นพันธุ์พื้นบ้านในรัฐปัญจาบ ประเทศอินเดีย ได้รวบรวมยีน *xa5*, *xa13* และ *Xa21* ไว้เพื่อให้ต้านทานโรคขอบใบแห้ง (Singh *et al.*, 2001) ข้าวอินดิกาพันธุ์ samba mahsuri ที่ปรับปรุงพันธุ์ให้มียีนต้านทาน *xa5*, *xa13* และ *Xa21* (Sundaram *et al.*, 2007) รวมถึงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวอินดิกาให้ต้านทานโรคขอบใบแห้งและโรคใบขีด โดยใช้ยีน *Xa23* และ *Rxo1* (Zhou *et al.*, 2008) และการปรับปรุงพันธุ์ข้าวลูกผสมให้ต้านทานโรคขอบใบ

แห่ง โดยใช้ยีน *Xa4*, *Xa7* และ *Xa21* (Perez *et al.*, 2008)

ในประเทศไทยได้มีการนำพันธุ์ข้าวที่มียืนต้านโรคขอบใบแห้งต่างๆ มาทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* พบว่า ข้าวพันธุ์ IRBB5 ที่มียืน *xa5* อยู่่นั้นสามารถแสดงความต้านทานต่อเชื้อที่มีในประเทศไทย 5 สายพันธุ์ (กาญจนา, 2544) ซึ่งสอดคล้องกับ Nilpanit *et al.* (2004) ที่ศึกษาความต้านทานของข้าว near isogenic lines 9 พันธุ์ คือ IRBB3, IRBB4, IRBB5, IRBB7, IRBB8, IRBB10, IRBB13, IRBB14 และ IRBB21 (แต่ละพันธุ์มียืนต้านทาน *Xa3*, *Xa4*, *xa5*, *Xa7*, *Xa8*, *Xa10*, *Xa13*, *Xa14* และ *Xa21* ตามลำดับ) ต่อเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่คัดแยกได้ในประเทศไทยตั้งแต่ปี 1975 ถึง 2003 ทั้งหมด 109 สายพันธุ์ พบว่า IRBB5 ที่มียืน *xa5* สามารถต้านทานต่อเชื้อก่อโรคที่มีอยู่ในประเทศไทยได้ดีกว่ายืนต้านทานอีก 8 ยืนที่ได้นำมาศึกษา

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่เกษตรกรในประเทศไทยนิยมปลูก ให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง จะเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาการสูญเสียผลผลิต อันเนื่องมาจากการระบาดของโรครังกล่าวได้ การทดลองนี้จึงมีจุดประสงค์ ที่จะตรวจสอบยืนต้านทานโรคขอบใบแห้ง ทดสอบความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง และความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของพันธุ์ข้าว ที่ผ่านการปรับปรุงในลูกผสมกลับ BC_1F_5

อุปกรณ์และวิธีการ

ข้าวลูกผสมที่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง BC_1F_5

เมล็ดข้าวลูกผสมที่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง BC_1F_3 ได้จากการผสมข้าวพันธุ์ IRBB5 ซึ่งมียืนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *xa5* กับพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 นำลูกผสมที่ได้ผสมกลับไปยังพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 ได้ลูกผสมกลับ BC_1F_1 นำลูก BC_1F_1 ออกปลูกและปล่อยให้ผสมตัวเองได้ลูก BC_1F_2 นำลูก BC_1F_2 ไปปลูกทดสอบ และคัดเลือกต้นที่ต้านทานต่อโรค

ขอบใบแห้งได้ 13 สายพันธุ์ เก็บเมล็ด BC_1F_3 ทั้ง 13 สายพันธุ์ไว้ (สุพรรณภูมิ, 2549) การศึกษาครั้งนี้ได้นำเมล็ดทั้ง 13 สายพันธุ์มาปลูกและปล่อยให้ผสมตัวเองอีก 2 ชั่วรุ่น โดยคัดพันธุ์เก็บรวม (bulk method) ของแต่ละสายพันธุ์ในการปลูกแต่ละครั้ง คัดเลือกลูก BC_1F_5 มา 14 สายพันธุ์ เพื่อใช้ศึกษาต่อ

การตรวจสอบการคงอยู่ของยืนต้านทานโรคขอบใบแห้ง (*xa5*) ของลูกผสมกลับ BC_1F_5

สกัดดีเอ็นเอจากใบของต้นข้าวลูกผสมทั้ง 14 สายพันธุ์ ตามวิธีของ Agawal *et al.* (1992) นำมาตรวจสอบการคงอยู่ของยืน *xa5* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RG556 (Huang *et al.*, 1997; Sanchez *et al.*, 2000) โดยการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ RG556F: 5' TAGCTGCTGCCGTGCTGTGC 3' และ RG556R: 5' AATATTTCAGTGTGCATCTC 3' และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpy* CH4 IV เพื่อตรวจสอบการคงอยู่ของยืน *xa5* ในข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_5 ทั้ง 14 สายพันธุ์

การทดสอบความต้านทานโรคขอบใบแห้งของลูกผสมกลับ BC_1F_5

ทดสอบความต้านทานโรคขอบใบแห้งของลูกผสมกลับ BC_1F_5 โดยปลูกข้าวทั้ง 14 สายพันธุ์พร้อมกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ไทฮง 1 (TN1) เพื่อใช้เป็นพันธุ์ไม่ต้านทานมาตรฐาน (susceptible check variety) รวมทั้งพันธุ์ IRBB5 และพันธุ์ กข 23 เพื่อใช้เป็นพันธุ์ต้านทานมาตรฐาน (resistant check variety) เมื่อดันกล้าอายุได้ 45 วัน ดำเนินการปลูกถ่ายเชื้อ ด้วยวิธี clipping technique (Kauffman *et al.*, 1973) โดยใช้กรรไกรจุ่มในเชื้อ *X. oryzae* pv. *oryzae* สายพันธุ์ 0701 ของกองโรคพืช กรมวิชาการเกษตรแล้วนำไปตัดใบอ่อนทุกใบของต้นกล้าทั้ง 14 สายพันธุ์ และประเมินความต้านทานของโรคหลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 14 วัน โดยพิจารณาจากพื้นที่ความเสียหายที่เกิดขึ้นตามความ

ยาวบนใบข้าวจากบาดแผลที่ตัดถึงโคนใบ ตามข้อกำหนดของระบบ Standard Evaluation System (SES) ของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (Table 1; IRRI, 1996)

การตรวจสอบเพื่อเปรียบเทียบพันธุกรรมของลูกผสมกลับ BC₁F₅ กับพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105

การตรวจสอบความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของข้าวลูกผสมกลับ BC₁F₅ ทั้ง 14 สายพันธุ์ โดยใช้สัคคีเอ็นเอจากใบอ่อนของข้าวลูกผสมทั้ง 14 สายพันธุ์ แล้วนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) โดยใช้ไพรเมอร์ EcoRI+3 และ MseI+3 ทั้งหมด 15 คู่ ได้แก่ E1/M1, E1/M4, E1/M8, E2/M1, E2/M3, E3/M2, E3/M4, E4/M6, E4/M7, E4/M8, E5/M6, E5/M7, E7/M1, E8/M6 และ E8/M8 (สุพรรณฤฎิภา, 2549) โดยลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้แสดงใน Table 2

ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจสอบการคงอยู่ของยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง (xa5) ของลูกผสมกลับ BC₁F₅

สัคคีเอ็นเอจากต้นข้าวลูกผสมกลับ BC₁F₅ นำมาทดสอบการคงอยู่ของยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งโดยใช้เครื่องมือดีเอ็นเอ RG556 (Huang *et al.*, 1997; Sanchez *et al.*, 2000) พบว่า ทุกสายพันธุ์มีแถบดีเอ็นเอขนาด 1,600 คู่เบส เหมือนกัน และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Hpy CH4 IV พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,000 และ 300 คู่เบส ในลูกผสมทั้ง 14 สายพันธุ์ เช่นเดียวกับในพันธุ์ IRBB5 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง ที่ควบคุมด้วยยีนด้อยอยู่ในสภาพโฮโมไซกัส (Figure 1) สอดคล้องกับการทดลองของ Sengsai *et al.* (2007) ซึ่งทดลองในลูกผสมกลับ BC₁F₂ ซึ่งให้เห็นว่ายีนต้านทานโรค (xa5) สามารถถ่ายทอดจากรุ่น BC₁F₂ ไปสู่ลูกผสมกลับ

Table 1 General scale used in standard evaluation system (SES)

Index value	Lesion length from the destruction of the disease	Level resistance
1	0-3%	HR (highly resistant)
2	4-6%	R (resistant)
3	7-12%	MR (moderately resistant)
4	13-25%	MS (moderately susceptible)
5	26-50%	MS (moderately susceptible)
6	51-75%	MS (moderately susceptible)
7	76-87%	S (susceptible)
8	88-94%	HS (highly susceptible)
9	95-100%	HS (highly susceptible)

Table 2 Names and sequences of AFLP primers

Sequences of EcoRI primers	Sequences of MseI primers
E1 = GACTGCGTACCAATTCAAC	M1 = CAGGATTCTCTGAGTAACAG
E2 = GACTGCGTACCAATTCAAG	M2 = CAGGATTCTCTGAGTAACAC
E3 = GACTGCGTACCAATTCACA	M3 = CAGGATTCTCTGAGTAACAA
E4 = GACTGCGTACCAATTCACT	M4 = CAGGATTCTCTGAGTAACATA
E5 = GACTGCGTACCAATTCAGC	M6 = CAGGATTCTCTGAGTAACCTT
E7 = GACTGCGTACCAATTCACG	M7 = CAGGATTCTCTGAGTAACAT
E8 = GACTGCGTACCAATTCAGG	M8 = CAGGATTCTCTGAGTAACCTC

BC₁F₅ และสามารถตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ RG556 ได้

การทดสอบความต้านทานโรคขอบใบแห้งของลูกผสมกลับ BC₁F₅

จากการเพาะเมล็ดลูกผสมกลับ BC₁F₅ ทั้ง 14 สายพันธุ์ และพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ไทซุง 1 (TN1) เพื่อใช้เป็นพันธุ์ไม่ต้านทานมาตรฐาน (susceptible check variety) รวมทั้งพันธุ์ IRBB5

และพันธุ์ กข23 เพื่อใช้เป็นพันธุ์ต้านทานมาตรฐาน (resistant check variety) แล้วนำไปปลูกถ่ายเชื้อเพื่อทดสอบความต้านทานโรคด้วยวิธี clipping technique (Kauffman *et al.*, 1973) พบว่าข้าวลูกผสมกลับ BC₁F₅ ทั้ง 14 สายพันธุ์ มีความต้านทานต่อโรคอยู่ในระดับต้านทาน (resistance, R) ทั้งหมด (Table 3) สอดคล้องกับรายงานการทดสอบข้าว PR106 ซึ่งเป็นพันธุ์พื้นบ้านในประเทศอินเดีย ซึ่งมียีน *xa5* อยู่ พบว่าสามารถต้านทานเชื้อถึง 15 สายพันธุ์ของ

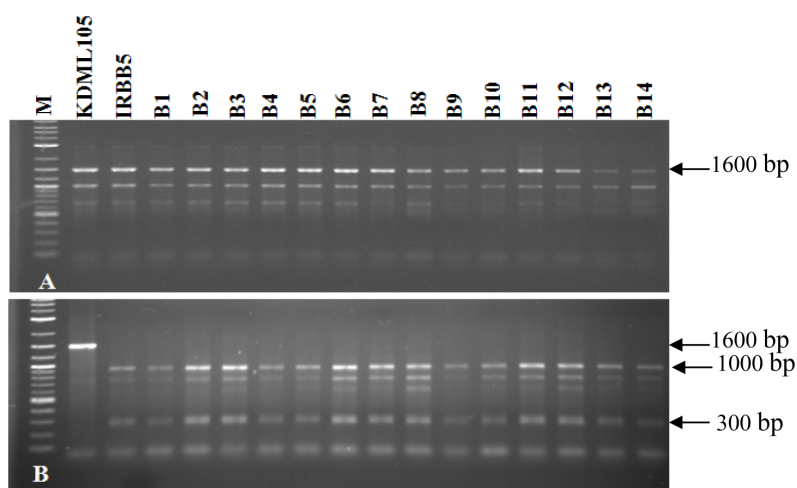


Figure 1 DNA fragment amplified from KDML 105 (susceptible variety), IRBB5 (resistant variety) and BC₁F₅ progenies (B1-B14) using RG556 marker: (A) before and (B) after digestion with *Hpy* CH4 IV enzyme. M is a molecular weight marker.

Table 3 Average score and bacterial blight resistant level of rice samples as determined by standard evaluation system (SES) (IRRI, 1996)

Samples	Average score	Resistant level	Samples	Average score	Resistant level
KDML105	6.6	S	B6	2.4	R
TN1	7.0	HS	B7	2.4	R
IRBB5	1.8	R	B8	2.0	R
RD 23	3.9	MS	B9	2.1	R
B1	2.1	R	B10	2.1	R
B2	2.1	R	B11	1.9	R
B3	1.8	R	B12	2.1	R
B4	2.1	R	B13	2.3	R
B5	2.2	R	B14	2.1	R

S = susceptible, MS = moderately susceptible, HS = highly susceptible, R = resistant

ประเทศอินเดีย และ 5 สายพันธุ์ของประเทศฟิลิปปินส์ (Singh *et al.*, 2002) และ การทดสอบความต้านทานเชื้อของข้าวพันธุ์ IRBB5 ที่มียีน *xa5* อยู่บนนั้นสามารถแสดงความต้านทานต่อเชื้อที่มีในประเทศไทย (กาญจนา, 2544; Nilpanit *et al.*, 2004)

ผลการตรวจสอบเพื่อเปรียบเทียบพันธุกรรมของลูกผสมกลับ BC_1F_5 กับข้าวขาวดอกมะลิ 105

จากการนำดีเอ็นเอของข้าวลูกผสมกลับทั้ง 14 สายพันธุ์ มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางพันธุกรรมเปรียบเทียบกับ พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 โดยใช้เทคนิค AFLP ด้วยไพรเมอร์ 15 คู่ พบแถบดีเอ็นเอที่สามารถตรวจนับได้ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ทั้งหมด 212 แถบ และนำมาเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอของข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_5 ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเหมือนกับข้าวดอกมะลิ 105 (Figure 2) เพื่อวิเคราะห์ความ

คล้ายคลึงทางพันธุกรรม พบว่า ลูกผสม BC_1F_5 ทั้ง 14 สายพันธุ์ มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับข้าวดอกมะลิ 105 ตั้งแต่ 96.23-99.06% โดยที่ลูกผสม B1, B3, B5, B6, B13 และ B14 มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 มากที่สุด คือ 99.06% (Table 4) ซึ่งคาดว่าลูกผสมเหล่านี้มีคุณภาพใกล้เคียงกับพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 มาก และมีความต้านทานโรคขอบใบแห้ง ซึ่งจะต้องนำสายพันธุ์เหล่านี้ไปทดสอบคุณภาพและผลผลิตต่อไป

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค AFLP นั้น ได้คิดแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 เทียบกับสายพันธุ์ลูกผสมซึ่งในทางทฤษฎีเมื่อผสมพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 กับ พันธุ์ IRBB5 และเมื่อนำลูกผสมที่ได้ผสมกลับไปยังข้าวขาวดอกมะลิ 105 พันธุกรรมของลูกผสมควรจะเหมือนกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ไม่เกิน

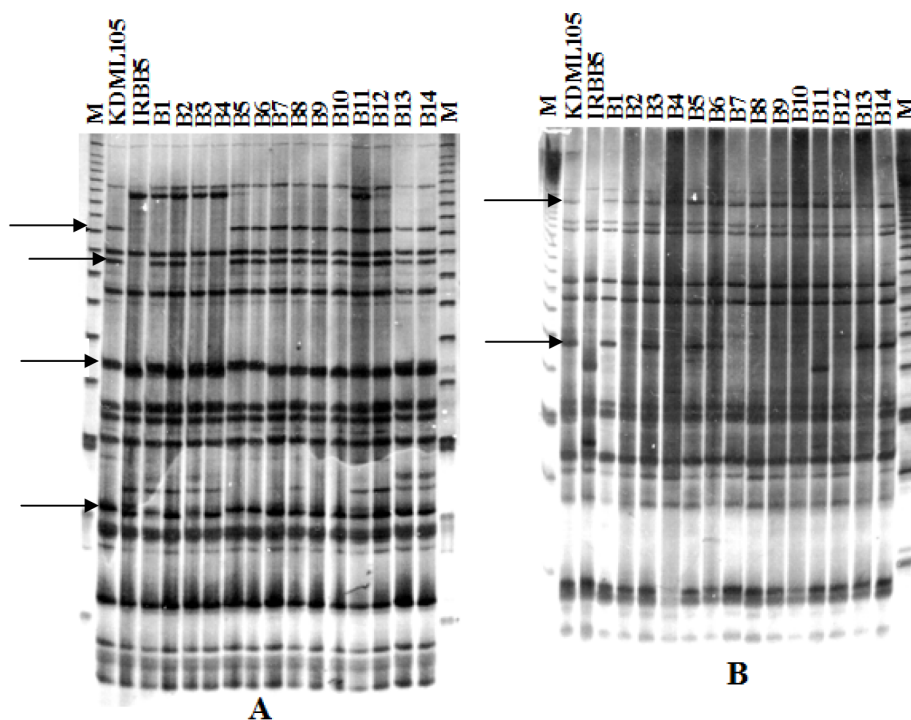


Figure 2 AFLP fingerprints of KDML 105 (susceptible variety), IRBB5 (resistant variety) and BC_1F_5 progenies (B1-B14) generated by E-AAC/M-CAG primer (A) and E-AGG/M-CTC primer (B). M is a 25 bp DNA marker, arrows indicate polymorphic bands specific to KDML 105.

75% แต่จากการทดลองก่อนหน้านี้ พบว่ามีลูกผสมกลับ BC_1F_2 มีพันธุกรรมคล้ายคลึงกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 อยู่ที่ 67.21%-82.19% (สุพรรณณีกา, 2549) และในลูกผสมชั่วรุ่นที่ 5 จากการทดลองนี้มีพันธุกรรมเหมือนกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 อยู่ระหว่าง 96.23-99.06% นั้นอาจเกิดจากการที่พันธุกรรมของลูกผสมในชั่วแรกๆ ยังไม่คงที่ โครโมโซมของข้าวขาวดอกมะลิกระจายตัวปนกับโครโมโซมของข้าว IRBB5 และเมื่อมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย จะมีการแยกตัวของคู่โครโมโซมแบบสุ่ม และการผสมกันระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ก็เป็นไปอย่างสุ่ม ประกอบกับการคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะคล้ายกับพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จึงทำให้ได้ลูกผสมที่มีการรวมตัวกันของกลุ่มโครโมโซมของพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มากขึ้น และเมื่อทำการผสมไปหลายๆ ชั่วรุ่นก็จะมีโอกาสที่จะได้ลูกผสมกลับที่มีพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เพิ่มขึ้นถึง 99.06% ซึ่งจะเริ่มคงที่เมื่อเข้าสู่การผสมชั่วรุ่นที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *xa5* ในข้าวลูกผสมกลับ BC_1F_5 โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ RG556 พบว่าทั้ง 14 สายพันธุ์มียืนด้านทานโรค *xa5* อยู่ในสภาพโฮโมไซกัส และเมื่อตรวจสอบระดับความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค *X. oryzae* pv. *oryzae* สายพันธุ์ 0701 พบว่า ลูกผสมกลับ BC_1F_5 ทั้ง 14 สายพันธุ์ ด้านทานเชื้อก่อโรสดังกล่าวในระดับด้านทาน และมีลูกผสมกลับ BC_1F_5 จำนวน 6 สายพันธุ์ คือ B1, B3, B5, B6, B13 และ B14 มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับข้าวดอกมะลิ 105 มากที่สุด คือ 99.06% ซึ่งทั้ง 6 สายพันธุ์นี้จะนำไปทดสอบคุณภาพและผลผลิตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนวิจัยในเบื้องต้น และศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานีที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ปลูกทดลอง และอำนวยความสะดวกต่างๆ

Table 4 The percentage of genetic similarity between KDML 105 and BC_1F_5 derived lines based on AFLP band pattern.

BC_1F_5 Lines	Number of bands presented only in KDML105	Number of similar bands found in BC_1F_5	% genetic similarity
B1	212	210	99.06
B2	212	206	97.17
B3	212	210	99.06
B4	212	205	96.7
B5	212	210	99.06
B6	212	210	99.06
B7	212	205	96.7
B8	212	205	96.7
B9	212	205	96.7
B10	212	204	96.23
B11	212	207	97.64
B12	212	206	97.17
B13	212	210	99.06
B14	212	210	99.06

เอกสารอ้างอิง

- กฤษฎา สัมพันธ์รักษ์. 2551. *ปรับปรุงพันธุ์พืช พันฐาน วิธีการและแนวคิด*. ภาควิชาพืชไร่นา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- กาญจนา กล้าแจ้ง. 2544. *การตรวจหาเครื่องหมายเชิงโมเลกุลที่ใช้บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคขอบใบแห้งของข้าวด้วยวิธีเอฟแอลพี (AFLP) ของพันธุ์ Near Isogenic Line*. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ทัศนีย์ สงวนสัง. 2540. *บทบาทของพันธุกรรมต้านทานโรคและแมลงกับการปรับปรุงข้าวของไทย*. ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก, สถาบันวิจัยข้าวกรมวิชาการเกษตร.
- ศิริพร พงศ์สุกสมิทธิ์. 2537. *การปรับปรุงพันธุ์พืช ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่*.
- สถาบันวิจัยข้าวกรมวิชาการเกษตร. 2544. *เทคโนโลยีการผลิตข้าวพันธุ์ดี*. กรุงเทพฯ.
- สุพรรณฉีกา เล็งสาย. 2549. *การปรับปรุงพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ต้านทานต่อเชื้อขอบใบแห้งโดยวิธีการผสมกลับและการเพาะเลี้ยงอับเรณูร่วมกับการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล*. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Agawal, R.K., Pandey, R.N. and Agawal, V.P. 1992. Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* leaves. *Biotech Biodiv Lett* 2: 19-24.
- Amar, G.B. 2006. Nitrogen fertilization and severity of bacterial leaf blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) in relation to yield of hybrid rice *Oryzae sativa* L. Master Thesis, UPLB, College, Laguna.
- Chen, S., Lin, X.H., Xu, C.G. and Zhang, Q. 2000. Improvement of bacterial blight resistance of 'Minghui 63', an elite restorer line of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection. *Crop Sci* 40: 239-244.
- Huang, N., Angles, E.R., Domingo, J., Magpantay, G., Singh, S., Zhang, G., Kumaravadiel, K., ennett, J. and Khush, G.S. 1997. Pyramiding of bacterial blight resistance gene in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theor Appl Genet* 95: 313-320.
- IRRI. 1996. *Standard Evaluation System for Rice*. The International Rice Research Institute, Manila, Philippines.
- Kauffman, H.E., Reddy, A.P.K., Hsieh, S.P.Y. and Merca, S.D. 1973. An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Dis. Rep.* 57: 537-541.
- Kottapalli, K.R., Kottapalli, P., Agrawal, G.K., Kikuchi, S. and Rakwal, R. 2007. Recessive bacterial leaf blight resistance in rice: complexity, challenges and strategy. *Biochem Biophys Res Commun* 355: 295-301.
- Nilpanit, N., Kositcharoenkul, N. and Dhitikiattipong, R. 2004. Race distribution of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Thailand. International Congress, Tsukuba Science City, Ibaraki, Japan 17-19 March, 2004.
- Perez, L.M., Redona, E.D., Mendioro, M.S., Cruz, C.M.V. and Leung, H. 2008. Introgression of *Xa4*, *Xa7* and *Xa21* for resistance to bacterial blight in thermosensitive genetic male sterile rice (*Oryzae sativa* L.) for the development of two-line hybrids. *Euphytica* 164: 627-636.
- Sanchez, A.C., Brar, D.S., Huang, N., Li, Z. and Khush, G.S. 2000. Sequence tagged site marker-assisted selection for three bacterial blight resistance gene in rice. *Crop Sci* 40: 792-797.
- Sengsai, S., Peyachoknagul, S., Sripichit, P., Thongpan, A. and Pongtongkarm, P. 2007. Anther culture

- of BC₁F₁ (KDML105//IRBB5/KDML105) hybrid to produce bacterial blight resistance double haploid rice. *Kasetsart J* 41: 251-261.
- Singh, S., Sidhu, J.S., Huang, N., Vikal, Y., Li, Z., Brar, D.S., Dhaliwal, H.S. and Khush, G.S. 2001. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. *Theor App Genet* 102: 1011-1015.
- Singh, S., Sodhi, M., Vikal, Y., George, M.L.C., Bala, G.S., Mangat, G.S., Garg, M., Sidhu, J.S. and Dhaliwal, H.S. 2002. DNA fingerprinting and virulence analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates from Punjab, northern India. *Euphytica* 130: 107-115.
- Sonti, R.V. 1998 Bacterial leaf blight of rice: new insights from molecular genetics. *Curr Sci* 74: 206-212.
- Sundaram, R.M., Vishnupriya, M.R., Biradar, S.K., Laha, G.S., Reddy, G.A., Rani, N.S., Sarma, N.P. and Sonti, R.V. 2007. Marker assisted introgression of bacterial blight resistance in Samba Mahsuri, an elite indica rice variety. *Euphytica* 160: 411-422.
- Zhou, Y.L., Xu, J.L., Zhou, S.C., Yu, J., Xie, X.W., Xu, M.R., Sun, Y. and Li, Z.K. 2008. Pyramiding *Xa23* and *Rxo1* for resistance to two bacterial diseases into an elite indica rice variety using molecular approaches. *Mol Breed* 23: 279-287.