

การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9*, *Pi36*, *Pigm(t)* ในข้าวพื้นเมืองไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Screening Thai landrace rice for blast resistance gene *Pi9*, *Pi36*, *Pigm(t)* using DNA markers

กฤตกิตติศักดิ์ ไพรจิตร¹ อิงอรณ สีก้าว¹ ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์¹ ธาณี ศรีวงศ์ชัย² และ สุรีพร เกตุงาม^{3*}

Kritkittisak Phaitreejit¹, Eng-orn Srikaew¹, Chatchawan Jantasuriyarat¹, Tanece Sriwongchai² and Sureporn Kate-ngam^{3*}

¹ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

² ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

³ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34190

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

² Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

³ Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

* Corresponding author: sureporn.k@ubu.ac.th

บทคัดย่อ

โรคไหม้ในข้าว (rice blast) มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Magnaporthe grisea* เป็นปัญหาสำคัญของการผลิตข้าวทั่วโลก ข้อมูลเกี่ยวกับยีนต้านทานโรคไหม้ของข้าว มีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้ วัตถุประสงค์ของการศึกษครั้งนี้ เพื่อค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9*, *Pi36* และ *Pigm(t)* ในข้าวพื้นเมืองไทย จำนวน 203 พันธุ์ ประกอบด้วย ข้าวพื้นเมืองภาคใต้ 40 พันธุ์ ข้าวไร่ภาคเหนือ 19 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 144 พันธุ์ แบ่งเป็น ข้าวขึ้นน้ำ 45 พันธุ์ และข้าวนาสวน 99 พันธุ์ ตามลำดับ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อยีนต้านทานโรคไหม้ดังกล่าว จากการตรวจสอบ พบว่าข้าวพื้นเมืองของ

ไทยทั้งหมดจำนวน 203 พันธุ์มียีนต้านทานโรคไหม้อย่างน้อยหนึ่งตำแหน่ง และมีข้าวพื้นเมืองจำนวน 42 พันธุ์มียีนต้านทานโรคไหม้ทั้ง 3 ตำแหน่ง ข้อมูลจากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้ต่อไปในอนาคต

ABSTRACT

Rice blast caused by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*, is one of the most devastating diseases in rice production worldwide. Information on rice blast resistant gene is important for rice cultivar development. The objective of this study was to identify rice blast disease resistant genes in 203 landrace Thai rice cultivars including 40

cultivars from the South, 19 cultivars from the North, 144 cultivars from the Northeast of Thailand comprised of 45 floating rice cultivars and 99 lowland rice cultivars using gene specific markers for blast resistant gene *Pi9*, *Pi36* and *Pigm(t)*. The results showed that all 203 cultivars have at least one blast resistant gene and 42 cultivars have all the three blast resistant genes. The outcome of this research will be very useful for development of new blast resistance elite rice cultivars in the future.

คำสำคัญ: โรคไหม้ในข้าว เครื่องหมายดีเอ็นเอ ยีนต้านทาน ข้าวพันธุ์พื้นเมือง

Keywords: rice blast disease, DNA marker, resistant gene, landrace rice

บทนำ

โรคไหม้ในข้าว (rice blast) มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Magnaporthe grisea* จัดเป็นปัญหาสำคัญปัญหาหนึ่งของการผลิตข้าวทั่วโลก โรคไหม้ในข้าวพบครั้งแรกในประเทศจีน ในปี ค.ศ. 1637 โดยเรียกชื่อโรคนี้อา Rice fever disease (Rice knowledge bank, 2009) ในปัจจุบันโรคนี้พบเกือบทุกแห่งที่มีการปลูกข้าวทั่วโลก สำหรับในประเทศไทยนั้น มีรายงานยืนยันว่าพบโรคนี้ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2496 ต่อมาโรคนี้ได้ระบาดไปทุกภูมิภาคของประเทศ และได้ทำความเสียหายให้แก่เกษตรกรเป็นอย่างมาก โดยเชื้อราสาเหตุของโรคไหม้สามารถแพร่กระจายโดยติดไปกับเมล็ด เศษซากพืช หรือกระจายไปตามกระแสลม (ชลาวา, 2531; ทศนีย์, 2540)

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคไหม้เป็นวิธีการที่เหมาะสมในการควบคุมการระบาดของโรค เพราะเป็นวิธีการที่ยั่งยืนและสามารถลดผลภาวะจากสารเคมีได้ (พูนศักดิ์ และคณะ, 2550) และเนื่องจากข้าวพื้นเมืองของไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง จึงเป็นแหล่งพันธุกรรมที่สำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว จากความก้าวหน้าทางเทคโนโลยี

ดีเอ็นเอ ได้มีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ลักษณะความหอม ความต้านทานโรค และความทนทานต่อสภาพแวดล้อม เป็นต้น ปัจจุบันได้มีการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวกว่า 60 ยีน ซึ่งกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมของข้าว โดยยีนต้านทานโรคไหม้ส่วนใหญ่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6, 11 และ 12 ตัวอย่างเช่น ยีน *Pi2/PiZ*, *Pi8*, *Pi9* และ *Pi13(t)* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ยีน *Pi1*, *Pi7(t)*, *Pi18(t)*, *Pi44(t)*, *Pif* และ *Pik* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 และยีน *Pita*, *Pi6(t)*, *Pi12(t)*, *Pi19(t)*, *Pi31(t)*, และ *Pi32(t)* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 12 เป็นต้น (ชัชวาล และ สุริพร, 2552; Wang *et al.*, 1999; Bryan *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Qu *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007) โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้ชิดกับตำแหน่งยีนดังกล่าว สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ให้มีความสามารถต้านทานโรคไหม้ได้อย่างแม่นยำและมีประสิทธิภาพ

ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* มีตำแหน่งอยู่ที่บริเวณเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมข้าวคู่ที่ 6 (Liu *et al.*, 2002) โดยถ่ายทอดมาจากข้าวป่า (*Oryza minuta*: $2n=4x=48$) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* นี้สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง (broad-spectrum resistance) ตัวอย่างเช่น สถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (The International Rice Research Institute, IRRI) ได้นำข้าวสายพันธุ์ 127-1-75 ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* มาทดสอบกับเชื้อราโรคไหม้ในประเทศฟิลิปปินส์กว่า 100 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อราทุกสายพันธุ์ไม่สามารถทำให้ข้าวเกิดโรคได้ และนอกจากนี้ยังมีการทดสอบกับข้าวสายพันธุ์ 127-1-75 ที่มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* กับเชื้อราโรคไหม้จำนวน 43 สายพันธุ์ จาก 13 ประเทศ พบว่าเชื้อราทุกสายพันธุ์ไม่สามารถทำให้ข้าวเกิดโรคได้เช่นเดียวกัน (Liu *et al.*, 2002) ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9* นี้ถูกโคลนสำเร็จในปี ค.ศ 2006 โดย Qu

และคณะ ยีนต้านทานโรคลำไ้ *Pi36* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมข้าวคู่ที่ 8 พบในข้าวอินดิกาสายพันธุ์ Kasalath รหัส Q61 พบว่าสามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคลำไ้สายพันธุ์ต่างๆ ในประเทศจีนได้ โดยยีนต้านทานโรคลำไ้ *Pi36* กำหนดรหัสโปรตีนที่มีโดเมนโครงสร้างเป็น nucleotide binding site (NBS) และ leucine rich repeat (LRR) motif (Liu *et al.*, 2007) ส่วนยีนต้านทานโรคลำไ้ *Pigm(t)* มีขนาดประมาณ 70 kb โดยยีน *Pigm(t)* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 และ C0428 (Deng *et al.*, 2006)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษายีนต้านทานโรคลำไ้ *Pi9*, *Pi36* และ *Pigm(t)* ในข้าวพื้นเมืองพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคลำไ้ดังกล่าว ข้อมูลของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทานโรคลำไ้ดังกล่าว สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคลำไ้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างข้าวและการสกัดดีเอ็นเอ

รวบรวมพันธุ์ข้าวพื้นเมือง 203 พันธุ์ จากทั่วประเทศประกอบด้วยข้าวพื้นเมืองภาคใต้จำนวน 40 พันธุ์ ข้าวไร่ภาคเหนือจำนวน 19 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 144 พันธุ์ แบ่งเป็นข้าวขึ้นน้ำ และข้าวนาสวน จำนวน 45 พันธุ์ และ 99

พันธุ์ ตามลำดับ นำใบอ่อนของข้าวมาสกัดดีเอ็นเอโดยประยุกต์จากวิธี CTAB extraction (Lodhi *et al.*, 1994) ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer และวิธี agarose gel electrophoresis

การตรวจสอบพันธุ์กรรมข้าวโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะกับยีนต้านทานโรคลำไ้

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากข้าวมาเจือจางให้มีความเข้มข้นประมาณ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน *Pi9*, *Pi36* และ *Pigm(t)* ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, 1X PCR buffer, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์, ไพรมเมอร์ 0.5 ไมโครโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต โดยใช้ไพรมเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนต้านทานโรคลำไ้ (Table 1) การตรวจหายีนต้านทานโรคลำไ้ *Pi9* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ pB8 ใช้อุณหภูมิในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังต่อไปนี้ รอบที่ 1 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที; รอบที่ 2-35 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที; และ รอบสุดท้าย อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาตรวจสอบใน 1% agarose gel electrophoresis

Table 1 Gene specific primer sequences of *Pi9*, *Pi36* and *Pigm(t)* resistant genes

Resistance gene	Chromosome	DNA marker	Primer sequence (5' 3')	Distance From gene (cM)	Reference
<i>Pi9</i>	6	pB8	F-CCCAATCTCCAATGACCCATAAC R- CCGGACTAAGTACTGGCTTCGATA	0	Liu <i>et al.</i> , 2002
<i>Pi36</i>	8	R36STS	F- CAGAGACCACAGAGCATTTCC R-GCTCCAATGAAACAACAGGGC	0.7	Liu <i>et al.</i> , 2007
<i>Pigm(t)</i>	6	C5483	F-TTAGGCTGCTTGTCTTGGG R-GGGAGGAGGAATGGTAGGAA	-	Deng <i>et al.</i> , 2006

การตรวจหาฮีนต้านทานโรครไหม้ *Pi36* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS ใช้สภาวะปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังต่อไปนี้ รอบที่ 1 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที; รอบที่ 2-30 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส 45 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที; และ รอบสุดท้าย อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*II หลังจากนั้นนำมาแยกขนาดใน 2% agarose gel electrophoresis

การตรวจหาฮีนต้านทานโรครไหม้ *Pigm(t)* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 ใช้สภาวะปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังต่อไปนี้ รอบที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 4 นาที; รอบที่ 2-35 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 45 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที; และ รอบสุดท้าย อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI แล้วตรวจสอบผลโดยนำมาแยกขนาดใน 2% agarose gel electrophoresis

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการตรวจสอบฮีนต้านทานโรครไหม้ *Pi9* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ pB8 ในข้าวพื้นเมืองทั้งหมด 203 ตัวอย่าง พบว่ามีพันธุ์ข้าวพื้นเมืองจำนวน 64 พันธุ์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณให้แถบ

ดีเอ็นเอได้เหมือนกับ positive control (Nipponbare ที่มีฮีนต้านทานโรครไหม้ *Pi9*) ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 500 bp (Figure 1a) โดยแยกเป็นข้าวพื้นเมืองภาคใต้จำนวน 1 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือจำนวน 16 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน จำนวน 47 พันธุ์ ประกอบด้วย ข้าวขึ้นน้ำ 14 พันธุ์ และข้าวนาสวน 33 พันธุ์ (Table 2 and 3) เป็นที่น่าสังเกตว่าข้าวพื้นเมืองในภาคเหนือและภาคอีสานส่วนใหญ่มีฮีนที่ต้านทานโรครไหม้ *Pi9* ในขณะที่ข้าวพื้นเมืองจากภาคใต้มีฮีนต้านทานโรครไหม้ *Pi9* เพียง 1 พันธุ์เท่านั้น จากพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่ตรวจสอบทั้งหมดจำนวน 40 พันธุ์

จากการตรวจสอบฮีนต้านทานโรครไหม้ *Pi36* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ R36STS ในข้าวพื้นเมืองทั้งหมด 203 ตัวอย่าง พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จำนวน 179 พันธุ์ โดยมีขนาดของดีเอ็นเอประมาณ 1,200 คู่เบส และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*II จะให้แถบดีเอ็นเอที่ขนาดแตกต่างกันสามรูปแบบ คือ แอลลีลรูปแบบที่ 1 (R) มีขนาดแถบดีเอ็นเอ 100, 400 และ 500 คู่เบส จำนวน 18 พันธุ์ แอลลีลรูปแบบที่ 2 (X) ซึ่งเป็นแอลลีลรูปแบบใหม่ มีแถบดีเอ็นเอขนาด 100, 200 และ 800 คู่เบส จำนวน 104 พันธุ์ และ แอลลีลรูปแบบที่ 3 (S) มีแถบดีเอ็นเอขนาด 100 และ 800 คู่เบส จำนวน 57 พันธุ์ เหมือนกับ negative control (Nipponbare ที่มีแอลลีลไม่ต้านทานโรครไหม้ *Pi36*) ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 100 และ 800 คู่เบส (Figure 1b) โดยข้าวพื้นเมือง

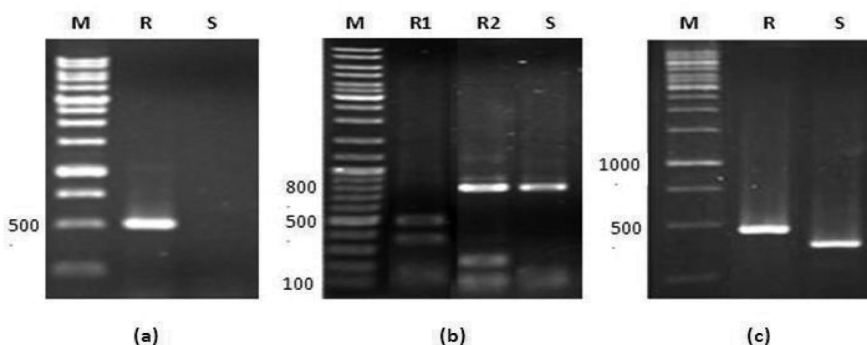


Figure 1 The detection of DNA specific markers for three rice blast resistant genes; *Pi9* (a), *Pi36* (b) and *Pigm(t)* (c) (R, R1, R2 = resistant allele; S = susceptible allele; M = DNA ladder)

จำนวน 18 พันธุ์ ที่มีรูปแบบแอลลีล R นั้น ประกอบด้วยข้าวพื้นเมืองจากภาคใต้จำนวน 13 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองอีสาน จำนวน 5 พันธุ์ แบ่งเป็น ข้าวขึ้นน้ำจำนวน 1 พันธุ์ (ข้าวพวงเงิน) และ ข้าวนาสวนจำนวน 4 พันธุ์ (ข้าวขาวดอกมะลิ 41-1-173 ข้าวเหนียวดำ ข้าวเหลืองบุญมา ข้าวป่องแก้ว) แต่ไม่พบในข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ ส่วนข้าวพื้นเมืองที่มีแอลลีลแบบ X นั้นมีจำนวน 104 พันธุ์ ประกอบด้วยข้าวพื้นเมืองจากภาคใต้จำนวน 15 พันธุ์ ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 18 พันธุ์ ข้าวพื้นเมืองอีสาน จำนวน 71 พันธุ์ แบ่งเป็นข้าวขึ้นน้ำ 25 พันธุ์ และ ข้าวนาสวนพื้นเมือง 46 พันธุ์ (Table 2)

จากการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ C5483 เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 468 คู่เบส และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *EcoRI* พบว่าแอลลีลต้านทานจะไม่สามารถตัดด้วยเอนไซม์จึงมีชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่าเดิมคือ 468 คู่เบส ส่วนแอลลีลไม่ต้านทานจะถูกตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าวได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กลง (Figure 1c) จากการตรวจสอบข้าวพื้นเมืองจำนวน 203 พันธุ์ มีข้าวพื้นเมืองถึง 201 พันธุ์ ที่มีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* นี้ มีเพียงข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์จะโนไหนดและพันธุ์ป้อชูแม่ฟาง ที่ไม่มีแอลลีลต้านทาน

ตารางที่ 2 The alleles distribution of rice blast resistant genes *Pi-9*, *Pi36* and *Pigm(t)* in Thai landrace rice varieties.

Source	Resistance gene			Rice cultivar
	<i>Pi9</i> [†]	<i>Pi36</i> [§]	<i>Pigm(t)</i> [*]	
Southern landrace rice	R	R	R	-
	R	R	S	-
	R	X	R	-
	R	X	S	-
	R	S	R	ซ่อนมิด (Gs.no 10354)
	R	S	S	-
	S	R	R	เหนียวนาคราช (Gs.no 9982), ดอกพวง (Gs.no 10062), สายบัว (Gs.no 10346), ไร่ไพร (Gs.no 11185), นางทอง (Gs.no 12731), ลูกหาวย (จุด) (Gs.no 12736), ลูกดำ (Gs.no 12737), เล็บนกเขา (Gs.no 12743), รวงทอง (Gs.no 12779), ตูลาถั่ว (Gs.no 12802), หอม (Gs.no 12817), ลีโอนูมาเซาะ (Gs.no 12826), นางรอง (Gs.no 12836)
	S	R	S	-
	S	X	R	ดอกพิบูล (Gs.no 9754), คำฉาง (Gs.no 10243), เบาชะมวง (Gs.no 11211), หลายอด (Gs.no 12716), เชียงใหม่ (Gs.no 12739), ลูกแดง (Gs.no 12740), ช่อ (Gs.no 12749), ช่อแดง (Gs.no 12751), ญูนิง (Gs.no 12766), ดอกไม้ไพร (Gs.no 12777), ลูกปลา (Gs.no 12788), นางกลายแดง (Gs.no 12789), ลากอ (Gs.no 12790), ญูนิง (Gs.no 12794), กือแะดำ (Gs.no 12821)
	S	X	S	-
	S	S	R	หนานหนัก (Gs.no 10284), นางมา (Gs.no 7414), เหนียวหอม, ขึ้นดิน (Gs.no 4290), ลาเก้งอ (Gs.no 12717)
	S	S	S	-
	S	ns	R	แม่แยง (Gs.no 10060), ลูกขอ (Gs.no 11148), ชุกิูกอลง (Gs.no 12704), มือจระเข้ (Gs.no 12800), อีตู 3 (Gs.no 12845), อามะ

ตารางที่ 2 The alleles distribution of rice blast resistant genes *Pi-9*, *Pi36* and *Pigm(t)* in Thai landrace rice varieties. (cont.)

Source	Resistance gene			Rice cultivar
	<i>Pi9</i> [†]	<i>Pi36</i> [‡]	<i>Pigm(t)</i> [#]	
Northern landrace rice	R	R	R	-
	R	R	S	-
	R	X	R	ป๊อเกษตร, เหนียวแสงมูเวอ, กะเหรี่ยงขาว, เหลืองหอม, ลายชาน, ปิ๊อ แม่ละ, ห้วยแล้ง, ข้าวกอแผ่, ป๊อขอฟอ, เหลืองลีซอ, ข้าวแดง (TRI 8409149), ข้าวมันหมู, เหนียวกล้าหอมแสงลีซอ
	R	X	S	จะนอไหนด, ปิ๊อ ชูแม่ฟาง
	R	S	R	-
	R	S	S	-
	S	R	R	-
	S	R	S	-
	S	X	R	คยาหลี่, ป๊อก่อ, งอพระ
	S	X	S	-
	S	S	R	-
	S	S	S	-
	R	ns	R	งอเพื่อน
Northeast floating landrace rice	R	R	R	พวงเงิน
	R	R	S	-
	R	X	R	พวงมาลัย 31-5-6, จำปาจีน 84-8-22, จำปาจีน 84-8-16, สว่างอารมณ์ 84-4-118, พญาชม, เขียว, คุณแม่, ขาวชายคลี่, สามพราน, เหลืองบังใบ
	R	X	S	-
	R	S	R	พวงมาลัย 35-10-8
	R	S	S	-
	S	R	R	-
	S	R	S	-
	S	X	R	พวงทอง, โพลอง 31-34-20, ข้าวเบาที่หนึ่ง 95-1-80, ไข่มวงดา 59-2-73, ลอยใหญ่ 62-40-140, เม็ดเล็กหนัก, เจ้าลอย, ขาวเสมอ, เหนียวบายสี, ขาวนครไชยศรี, เจ้าลอย, ทานตะวัน, หอมทุ่ง, ไร่ไหม้ง, พวงหนัก
	S	X	S	
	S	S	R	ขาวปราจีน, เจ๊กกระโดด, รวงเดี้ยว, เหลืองกล้วย, เหลืองพวงทอง, เหลืองอนันต์, ขาวลี, ขาวดาหยัด, นางเขียว, ลอยสายบัว, นางเขียว, นางเขียว, เกวียนหัก, ขาวโพธิ์, ข้าวลอย
	S	S	S	-
	R	ns	R	ขาวเศรษฐี, หอมทุ่ง
	S	ns	R	สามรวง
Northeast low land landrace rice	R	R	R	ป๊อแก้ว (Gs.no 3895)
	R	R	S	-
	R	X	R	กุ่มเมือง (Gs.no 539), ขาวตาแห้ง 55-5-55 (Gs.no 546), ขาวใหญ่ 33-22-61 (Gs.no 547), ขาวปากหม้อ 74 (Gs.no 548),

ตารางที่ 2 The alleles distribution of rice blast resistant genes *Pi-9*, *Pi36* and *Pigm(t)* in Thai landrace rice varieties. (cont.)

Source	Resistance gene			Rice cultivar
	<i>Pi9</i> [†]	<i>Pi36</i> [§]	<i>Pigm(t)</i> [#]	
				ขาวพวง 74-3-38 (Gs.no 551), ดี 569 (Gs.no 593), มั่นเป็ด (Gs.no 2943), หมากแข้ง (Gs.no 3365), ป้องแอ้ว (Gs.no 3370), อีปง (Gs.no 3372), ป้องแอ้ว 2 (Gs.no 3894), โออ่อน (Gs.no 4377), ข้าวหอม (Gs.no 4814), ข้าวหอม (Gs.no 4831), คอเหลือ้ง (Gs.no 5567), เจ้าขาว (Gs.no 5572), เหลือ้ง (Gs.no 13232), กะทิ (Gs.no 5565)
	R	X	S	-
	R	S	R	ขี้ต้มหอม (Gs.no 2720), ข้าวกำ (Gs.no 3369), ป้องแอ้ว 1 (Gs.no 3893), ข้าวหอม (Gs.no 4870), หอมมะลิ (Gs.no 18418), หอมมะลิ (Gs.no 18420), หอมมะลิ (Gs.no 19398)
	R	S	S	-
	S	R	R	ขาวดอกมะลิ 41-1-173 (Gs.no 542), เหนียวคำ (Gs.no 2723), เหลือ้งบุญมา (Gs.no 3364)
	S	R	S	-
	S	X	R	แก้วรวง 17-2-106 (Gs.no 536), เม็ดใหญ่ 94-4-87 (Gs.no 550), เจ้าเหลือ้ง 27-3-91 (Gs.no 564), เหลืองนูน 6-4-102 (Gs.no 589), บีเล 289 (Gs.no 591), ขี้ต้ม 222-24-72 (Gs.no 595), ขี้ต้มใหญ่ 35-16-45 (Gs.no 596), ขี้ต้มขาว 222-42-5 (Gs.no 598), จันดง 34-3-95 (Gs.no 599), คอป้องแอ้ว (Gs.no 2725), ขาว (Gs.no 3361), ข้าวปน (Gs.no 3378), พานทอง (Gs.no 3375), คอสามเดือน (Gs.no 3377), อีโตน (Gs.no 3379), นางนวล (Gs.no 3380), ดวงจันทร์ (Gs.no 3382), เป็ดน้ำ (Gs.no 3385), พันธุ์หลัก (Gs.no 3386), ปลาแข้ง (Gs.no 3384), ขาวใหญ่ (Gs.no 4375), ข้าวหอม (Gs.no 4809), ข้าวหอม (Gs.no 4810), ข้าวหอม (Gs.no 4815), ข้าวหอม (Gs.no 4829), ข้าวหอม (Gs.no 4834), ข้าวคอก (Gs.no 5566), กระดุกเสือ (Gs.no 13233)
	S	X	S	-
	S	S	R	หลุดหนี 75-3-2 (Gs.no 549), เจ้าหางหมูใหญ่ 32-27 (Gs.no 554), เจ้าหางหมูใหญ่ 32-27 (Gs.no 555), เจ้าหอม 32-18-69 (Gs.no 556), ใบลด 36-10-90 (Gs.no 559), เจ้าเหลือ้ง 27-3-19 (Gs.no 563), ใบลด 36-19-40 (Gs.no 572), ใบลด 36-27-29 (Gs.no 573), เหลือ้งใหญ่ (Gs.no 584), บีเล 563 (Gs.no 592), ขี้ต้มขาว 222-42-3 (Gs.no 597), คอดอกพร้าว 48-3-123 (Gs.no 601), ทอง (Gs.no 2942), ขาวกรุง (Gs.no 3358), ขาวเศรษฐี, เหนียวนางนวล (Gs.no 3367),

ตารางที่ 2 The alleles distribution of rice blast resistant genes *Pi-9*, *Pi36* and *Pigm(t)* in Thai landrace rice varieties. (cont.)

Source	Resistance gene			Rice cultivar
	<i>Pi9</i> [†]	<i>Pi36</i> [§]	<i>Pigm(t)</i> [#]	
				แม่ห้าง (Gs.no 3374), อีปัด (Gs.no 3376), ข้าวหาง (Gs.no 3387), มะปราง (Gs.no 3897), นางคำผาย (Gs.no 4373), ข้าวหอม (Gs.no 4816), ข้าวหอม (Gs.no 4817), ข้าวหอม (Gs.no 4818), ข้าวหอม (Gs.no 4832), ข้าวหอม (Gs.no 4833), ข้าวหอม (Gs.no 4835), หอมมะลิ (Gs.no 18419)
	S	S	S	-
	S	ns	R	เจ้าแม่ 31-28-1 (Gs.no 566), ดอกมะลิ 109-1-119 (Gs.no 569), เหลืองเล็ก 30-1-57 (Gs.no 586), ดอกตู (Gs.no 2872), เหนียวแดง (Gs.no 3360), ค้ออ่าง (Gs.no 3368), ข้าวหอม (Gs.no 4869), ขาวใหญ่ (Gs.no 5573)
	R	ns	R	รวงเดียว 68-10-85 (Gs.no 582), ขาว (Gs.no 3356), นางนวล (Gs.no 3357), ค้อขาว (Gs.no 3363), นางนวล (Gs.no 3373), สามเดือน (Gs.no 3892)

Note

- [†]*Pi9* R : resistant allele; after PCR amplification with *Pi9* gene specific pB8 marker giving 500 bp fragment
S : susceptible allele, no PCR product
- [§]*Pi36* R : resistant allele; after PCR amplification with *Pi36* gene specific R36STS marker then digest with *HinfI* giving 100, 400 and 500 bp fragments
X : new allele; after PCR amplification with *Pi36* gene specific R36STS marker then digest with *HinfI* giving 100, 200 and 800 bp fragments
S : susceptible allele; after PCR amplification with *Pi36* gene specific R36STS marker then digest with *HinfI* giving 100 and 800 bp fragments
- [#]*Pigm(t)* R : resistant allele; after PCR amplification with *Pigm(t)* gene specific C5483 marker then digest with *HinfI* giving 468 bp fragment
S : susceptible allele; after PCR amplification with *Pigm(t)* gene specific C5483 marker then digest with *HinfI* giving 400 bp fragment
ns : could not be amplified

(Table 2 and 3) เนื่องจากยีนต้านทานโรคไหม้มีความจำเพาะกับสายพันธุ์ของเชื้อรา (Boman *et al.*, 1992) จึงอาจเป็นไปได้ว่าสายพันธุ์ของเชื้อราที่จำเพาะกับยีนต้านทานทานโรคไหม้ *Pigm(t)* นี้เป็นสายพันธุ์ที่พบทั่วไปในประเทศไทย จึงเป็นเหตุให้พันธุ์ข้าวพื้นเมืองต่างๆ ส่วนใหญ่ได้ปรับตัวให้มียีนต้านทานโรคไหม้ *Pigm(t)* นี้

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 3 ชนิด สามารถนำมาใช้คัดเลือกแอลลิล

ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าว *Pi9*, *Pi36* และ *Pigm(t)* ได้ ดังตัวอย่างการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย (marker-assisted selection) เช่น การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi1*, *Pi2* และ *Pi3* คัดเลือกข้าวอินดิกา สายพันธุ์ GM4 จากมณฑลเสฉวนประเทศจีน และนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์สำหรับโครงการปรับปรุงพันธุ์ในประเทศจีน (Peng *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 2004)

Table 3 The distribution of alleles for blast resistant genes *Pi-9*, *Pi36* and *Pigm(t)* in Thai landrace rice with pB8 R36STS and C5483 DNA markers.

Source of rice varieties	Total amount	Pi9			Pi36			Pigm(t)		
		No. of amplification	No. with R allele	No. with S allele	No. of amplification	No. with R allele	No. with S allele	No. of amplification	No. with R allele	No. with S allele
Southern land race rice	40	40	1	39	34	28	6	40	40	0
Northern land race rice	19	19	16	3	18	18	0	19	17	2
Northeast land race rice	144	144	47	97	127	76	51	144	144	0
- floating rice	(45)	(45)	(14)	(31)	(42)	(26)	(16)	(45)	(45)	0
- low land rice	(99)	(99)	(33)	(66)	(85)	(50)	(35)	(99)	(99)	0
total	203	203	64	139	179	122	57	203	201	2

เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ pB8Pi9 ที่จำเพาะกับยีนต้านทานในการคัดเลือก BAC clone เพื่อโคลนยีน *Pi9* จนสำเร็จ (Qu *et al.*, 2006)

สำหรับการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวนั้น การคัดเลือกแต่ละครั้งควรตรวจสอบพันธุ์ข้าวทั้งพันธุ์ที่มีแอลลีลต้านทาน (positive control) และพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ (negative control) เพื่อใช้เปรียบเทียบให้ผลการวิเคราะห์แม่นยำยิ่งขึ้น แต่ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถหาพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานโรคไหม้ของยีน *Pi36* และ *Pigm(t)* เพื่อนำมาเป็น positive control ได้ ดังนั้นจึงควรมีการตรวจสอบซ้ำ หากมีเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาจากยีนดังกล่าวโดยตรงเพื่อความถูกต้อง และแม่นยำในการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป

สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทยจำนวน 203 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ 3 ตำแหน่งคือ ยีน *Pi9*, *Pi36* และ *Pigm(t)* พบว่าข้าวพื้นเมืองของไทยทั้งหมดมียีนต้านทานโรคไหม้อย่างน้อย 1 ตำแหน่ง และมีข้าวพื้นเมืองจำนวน 42 พันธุ์ มียีนต้านทานโรคไหม้ทั้ง 3 ตำแหน่ง ซึ่งผลการตรวจสอบพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองพบว่ามียีนที่ต้านทานโรคไหม้ เป็นตัวอย่างที่แสดงให้เห็นว่าข้าวพื้นเมืองเป็นแหล่งพันธุกรรมที่มีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว เพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวที่มีคุณภาพดีและมีความต้านทานต่อโรคไหม้ได้ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ที่ให้การสนับสนุนพันธุ์ข้าวพื้นเมืองเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปี 2553 และทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา

แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และทุนสนับสนุนบางส่วนจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

- ชลาวา บุณศิริ. 2531. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.
- ชัชวาล จันทราสุริยรัตน์ และ สุริพร เกตุงาม. 2552. โรคไหม้ในข้าวและสถานการณ์ปัจจุบันของงานวิจัยด้านยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าว. *วารสารแก่นเกษตร* 37: 69-78.
- ทัศนีย์ สงวนสัง. 2540. บทบาทของพันธุกรรมต้านทานโรคและแมลงกับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของไทย. ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ พยอม โคเบลล์ อัจฉาพรณ ลำปาง เนินพลับ ถนอมจิตร ฤทธิมนตรี กุลขนา เกศสุวรรณ ชนสิริน กลิ่นมณี และ สงวน เทียงดีฤทธิ. 2550. การตรวจสอบความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคไหม้ข้าวในประเทศไทย. *Thai Rice Res J* 1: 52-64.
- Boman, J.M., Khush, G.S. and Nelson, R. 1992. Breeding rice for resistance to pests. *Annu Rev Phytopathol* 30: 507-528.
- Bryan, G.T., Wu, K.S., Farrall, L., Jia, Y., Hershey, H.P., McAdams, S.A., Faulk, K.N., Domaldson 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: 2033-2046.
- Chen, X., Shang, J., Chen, D., Lei, C., Zou, Y., Zhai, W., Lin, G., Xu, J., Ling, Z., Cao, G., Ma, B., Wang, Y., Zhao, X., Li, S. and Zhu, L. 2006. A β lectin receptor kinase gene conferring riceblast resistance. *Plant J* 46: 794-804.
- Deng, Y., Zhu, X., Shen, Y. and He, Z. 2006. Genetic characterization and fine mapping of the blast resistance locus *Pigm(t)* tightly linked to *Pi2* and *Pi9* in a broad-spectrum resistant Chinese variety. *Theor Appl Genet* 113: 705-713.
- Fukuoka, S. and Okuno, K. 2001. QTL analysis and mapping of *pi21*, a recessive gene for field resistance to rice blast in Japanese upland rice. *Theor Appl Genet*. 103: 185-190.
- Lin, F., Chen, S., Que, Z., Wang, L., Liu, X.Q. and Pan, Q.H. 2007. The blast resistance gene *Pi37* encodes an NBS-LRR protein and is a member of a resistance gene cluster on rice chromosome 1. *Genetics* 177: 1871-1880.
- Liu, G., Lu, G., Zen, L. and Wang, G.L. 2002. Two broad-spectrum blast resistance genes, *Pi9(t)* and *Pi2(t)*, are physically linked on rice chromosome 6. *Mol Genet Genomics* 267: 472-480.
- Liu, X., Lin, F., Wang, L. and Pan, Q. 2007. The in silico map-based cloning of *Pi36*, a rice coiled-coil-nucleotide-binding site-leucine-rich repeat gene that confers race-specific resistance to the blast fungus. *Genetics* 176: 2541-2549.
- Lodhi, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F. and Reisch, B.I. 1994. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Rept* 12: 6-13.
- Peng, S.Q., Huang, F.Y., Sun, G.C., Liu, E.M., Sun, Y.J., Ai, R.X., Zhao, J.X., Bai, S.Z., Xiao, F.H. 1996. Studies on durable resistance to

- blast disease in diVerent latitude for rice. *Scientia Agr Sinica* 29: 52–58.
- Qu, S., Liu, G., Zhou, B., Bellizzi, M., Zeng, L., Dai, L., Han, B. and Wang, G.L. 2006. The broad spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice. *Genetics* 172: 1901-1914.
- Rice knowledge bank. 2009. Introduction to rice blast. Fungal diseases of rice. <http://www.knowledgebank.irri.org/ipm/index.php/rice-blast> (20 September 2009).
- Sharma, T.M., Madhav, B., Singh, P., Shanker, T., Jana, V., Dalal, A., Pandit, A., Singh, K., Gaik, H. and Singh, N. 2005. High-resolution mapping, cloning and molecular characterization of the *Pi-kh* gene of rice, which confer resistance to *Magnaporthe grisea*. *Mol Genet Genomics* 274: 569-578.
- Shen, Y., Adreit, H., Zhu, X.D., Milazzo, J., Chen, H.Q., Tharreau, D. 2004. Resistance evaluation of some hybrid rice, conventional early *indica* and late *japonica* rice to *Magnaporthe grisea* in China. *Scientia Agr Sinica* 37: 362–369.
- 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 belong to nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance gene. *The Plant J* 19: 55-64.