

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับแยกแอสลีสต้านทาน กับแอสลีสอ่อนแอของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37*

Development of DNA Markers to Differentiate Resistance and Susceptible Alleles of Rice Blast Resistance Gene, *Pi37*

ภัทรพร มูลทรัพย์, ธนากรณ์ ศรีรัตน์ และชัชวาล จันทราสุริยารัตน์*

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

สุรพร เกตุงาม

ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ตำบลเมืองศรีไค อำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

Pattaraborn Moonsap, Tanakorn Srirat and Chatchawan Jantasuriyarat*

Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok Campus,

Ladyao, Chatuchak, Bangkok, 10900

Sureeporn Kate-ngam

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University,

Muang Sri Khai, Warin Chamrap, Ubon Ratchathani 34190

บทคัดย่อ

โรคไหม้มีสาเหตุมาจากรา *Magnaporthe oryzae* ซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้สูญเสียผลผลิตข้าวทั่วโลก วิธีการที่เหมาะสมและประสบความสำเร็จในการป้องกันการสูญเสียผลผลิตจากโรคไหม้ คือ การลดความเสี่ยงของโรคระบาดโดยการปลูกข้าวสายพันธุ์ที่มียีนต้านทานโรค ยีน *Pi37* เป็นหนึ่งในยีนต้านทานโรคไหม้ซึ่งพบในข้าวพันธุ์ต้านทาน St. No. 1 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 1 มีความยาว 3,873 คู่เบส และแปลรหัสได้เป็นโปรตีนที่มีขนาด 1,291 กรดอะมิโน วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับแยกแอสลีสต้านทานกับแอสลีสไม่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างแอสลีสต้านทานในข้าวพันธุ์ St. No. 1 กับแอสลีสไม่ต้านทานในข้าวพันธุ์ปิพนบาเรย์พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันทั้งหมด 34 ตำแหน่ง ซึ่งมี 21 ตำแหน่งที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน และมี 10 ตำแหน่ง ที่ตรงกับตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ผู้วิจัยจึงออกแบบไพรเมอร์ที่ครอบคลุมนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 741 (SNP741) ซึ่งเป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *FokI* แล้วนำไปตรวจสอบข้าวพื้นเมืองไทยจำนวน 206 พันธุ์ พบว่ามีข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยจำนวน 146 พันธุ์ มีแอสลีสต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* คิดเป็นร้อยละ 70.87 ของข้าวที่ทดสอบทั้งหมด โดยพบแอสลีสต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ในข้าวพื้นเมืองส่วนใหญ่จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ข้อมูลที่ได้จากการทดลองใน

ครั้งนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อพัฒนาและปรับปรุงข้าวพันธุ์ต้านทานโรคไหม้ในอนาคต

คำสำคัญ : ยีนต้านทานโรคไหม้; โรคไหม้ในข้าว; เครื่องหมายดีเอ็นเอ; ข้าวพื้นเมือง

Abstract

Rice blast disease caused by a fungal pathogen, *Magnaporthe oryzae*, is one of the most devastating diseases in worldwide rice production. The most prudent and feasible strategy to manage this disease is using disease resistance rice varieties. The *Pi37* gene is one of blast resistance genes, presented in the rice cultivar St. No. 1. The *Pi37* is located on chromosome 1, with transcript length of 3,873 bp. The deduced *Pi37* open reading frame encodes a 1,291 residue polypeptide. The objective of this study was to develop the DNA markers to differentiate resistance and susceptible alleles of rice blast resistance gene, *Pi37*. Sequence of resistance allele from St. No. 1 was compared with sequence of susceptible allele of Nipponbare. Thirty-four polymorphic sites were identified; 21 polymorphic sites were missense mutations, whereas ten of them were at the recognition site of restriction enzymes including *FokI*. DNA markers were developed using nucleotide position SNP741 and used for screening rice blast resistance gene, *Pi37*, in Thai landrace rice varieties. From 206 landrace rice varieties, 146 varieties contained resistance allele (70.87 %). Most landrace rice from the Northeast of Thailand exhibited the *Pi37* resistance allele. The information obtained from this study was very useful for the identification of parental lines with rice blast resistance gene in rice breeding program.

Keywords: rice blast resistance gene; rice blast disease; DNA marker; landrace rice

1. คำนำ

ข้าวเป็นหนึ่งในอาหารหลักที่สำคัญของโลก ประชากรกว่าครึ่งบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก และปริมาณการบริโภคข้าวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในทุก ๆ ปี เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของประชากรโลก ส่งผลให้ข้าวเป็นที่ต้องการของตลาดโลกมากยิ่งขึ้น เช่นเดียวกับประเทศไทยซึ่งถือว่าข้าวเป็นอาหารหลักและเป็นอาชีพหลักของเกษตรกรไทย มีการส่งออกข้าวถึงร้อยละ 45 ส่งผลให้ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ค้าข้าวที่สำคัญของโลก แต่ผลผลิตเฉลี่ยของประเทศยังจัดอยู่ในเกณฑ์ต่ำ เนื่องมาจากประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกข้าวประมาณ 60 ล้านไร่ แต่มีพื้นที่เพียงร้อยละ 20 เท่านั้นที่เหมาะสมกับ

การปลูกข้าว (เอี่ยม, 2538) เพราะดินส่วนใหญ่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศเป็นดินเค็ม นอกจากนี้ข้าวที่ปลูกในประเทศไทยส่วนใหญ่จะเป็นข้าวพันธุ์ที่รัฐบาลส่งเสริม เช่น พันธุ์ กข 6 และ ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งข้าวทั้ง 2 พันธุ์ เป็นข้าวที่มีคุณภาพดี เมล็ดข้าวมีสีขาว หุงขึ้นหม้อ มีกลิ่นหอม อ่อนนุ่ม แต่ทนทานต่อสภาพความเค็มได้ปานกลาง และอ่อนแอต่อราสาเหตุโรคไหม้ (กฤตกิตติศักดิ์, 2554) ซึ่งโรคไหม้ในข้าวมีสาเหตุมาจากรา *Magnaporthe oryzae* โดยเชื้อโรคไหม้มีความสามารถในการปรับตัวสูง จึงมีความหลากหลายของสายพันธุ์มาก ดังนั้นวิธีที่เหมาะสมในการป้องกันการสูญเสียผลผลิตข้าวจากโรคไหม้ คือ การลดความเสี่ยงของ

การเกิดโรคโดยการใช้พันธุ์ข้าวที่มียืนต้นทานโรค ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพของข้าวมากที่สุดประเทศหนึ่งของโลก ข้าวพื้นเมืองถือได้ว่าเป็นแหล่งพันธุกรรมที่มีความสำคัญอย่างมากต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานต่อโรคและสภาวะแวดล้อม เพราะพันธุ์ข้าวพื้นเมืองเป็นพันธุ์ข้าวที่เกษตรกรได้คัดเลือกและเก็บรักษาสืบทอดกันมาหลายชั่วอายุ ซึ่งผ่านการคัดเลือกโดยมนุษย์และธรรมชาติร่วมกัน จึงมีลักษณะเด่น คือ มีความสามารถในการต้านทานโรคและแมลง มีความสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี อย่างไรก็ตาม ข้าวพันธุ์พื้นเมืองมักให้ผลผลิตต่ำ ดังนั้นจึงถูกแทนที่ด้วยข้าวพันธุ์สูงเสริมได้ง่าย จึงมีแนวโน้มว่าจะค่อย ๆ สูญหายไปทีละเล็กละน้อย

ยืนต้นทานโรคไหม้ *Pi37* พบในข้าวสายพันธุ์ St. No. 1 แปรหลัสดักรดอะมิโนจำนวน 1,290 กรดอะมิโน มีความสามารถในการต้านทานราโรคไหม้สายพันธุ์ในประเทศญี่ปุ่นและจีนได้ดี จึงเป็นที่สนใจของคณะผู้วิจัยที่จะนำยีนนี้มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประเทศไทย ดังนั้นการมีข้อมูลของยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวพื้นเมืองของไทยจึงเป็นข้อมูลที่สำคัญที่จำเป็น เพื่อใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวที่จะนำมาใช้เป็นพ่อหรือแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป เพื่อที่จะสามารถตรวจสอบข้อมูลการมีอยู่ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ในข้าวพื้นเมืองของไทย โดยการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้แยกความแตกต่างระหว่างแอลลีลต้านทานกับแอลลีลอ่อนแอได้ จึงเป็นเครื่องมือที่สำคัญอย่างยิ่ง เครื่องหมายดีเอ็นเอถือเป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพในการใช้คัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมบางอย่างที่ต้องการ ซึ่งส่วนใหญ่มักจะใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชและพันธุ์สัตว์ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการคัดเลือก (marker-assisted selection) ปรับปรุงพันธุ์ข้าวนั้น สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์แบบ

ดั้งเดิม (conventional breeding) โดยใช้ประโยชน์จากข้อมูลการวางตำแหน่งของยีนบนแผนที่จีโนมข้าว โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีการวางบนตำแหน่งยีนโดยตรงหรืออยู่ใกล้ชิดกับบริเวณยีนที่ต้องการ (tightly linked markers) จะนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพืชที่มียืนต้นที่ต้องการ โดยไม่ต้องรอจนกว่าพืชจะโตและแสดงลักษณะนั้นออกมา ทั้งนี้การคัดเลือกด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นการคัดเลือกโดยตรงที่จีโนมไม่พบสภาพแวดล้อม ไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของเครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถใช้ตรวจสอบได้ในทุกระยะเวลาของการเจริญเติบโต ทำให้ลดระยะเวลา ลดค่าใช้จ่าย โดยสามารถทดแทนการทดสอบโรคในสภาพจริงได้ (อิงออน, 2553) วัตถุประสงค์ในการวิจัยครั้งนี้ คือ การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถจำแนกระหว่างแอลลีลต้านทานกับแอลลีลอ่อนแอของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* และใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวในการตรวจสอบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองของไทย เพื่อนำผลที่ได้จากการศึกษานี้ไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของประเทศต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างข้าว

ตัวอย่างข้าวจำนวน 206 พันธุ์ แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ตามแหล่งที่มาและประเภทของข้าว ได้แก่ ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ จำนวน 24 พันธุ์ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 40 พันธุ์ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 97 พันธุ์ และข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 45 พันธุ์ โดยได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างใบข้าว 206 พันธุ์มาสกัดดีเอ็นเอ

โดยใช้วิธี CTAB (Lodhi *et al.*, 1994) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1 % หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำเป็นสารละลายความเข้มข้น 50 ng/μl เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่อไป

2.3 การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถจำแนกต่อแอลลีลต้านทานกับแอลลีลอ่อนแอของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ของข้าวพันธุ์ St. No. 1 จากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) และจาก genome sequence ของข้าวนิปปอนบาระ (พันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลอ่อนแอ) (<http://schatzlab.cshl.edu/data/rice>) ทำ blastn และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าวทั้ง 2 พันธุ์ด้วยโปรแกรม BioEdit เพื่อหาตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน (single nucleotide polymorphisms, SNPs) แล้วคัดเลือกเฉพาะตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลง จากนั้นหาเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตรงตำแหน่งที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันและกรดอะมิโนเปลี่ยนเพื่อใช้ในการจำแนกระหว่างแอลลีลต้านทานกับแอลลีลอ่อนแอ โดยออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม NEBcutter จากบริเวณอนุรักษ์ของยีนที่ครอบคลุมตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ที่คัดเลือกไว้เพื่อให้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากทั้งข้าวที่มีแอลลีลต้านทานและแอลลีลอ่อนแอ แล้วใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะในการจำแนกแอลลีล

2.4 การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ก่อนหน้านี้ (forward primer: 5'-TGCCGCCAAGAGTATTTGGT-3' และ reverse primer:

5'-AGGGCACTCTCCATTGTG-3') โดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีส่วนประกอบของสารเคมี ได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 50 ng/μl 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ความเข้มข้น 2 μM ชนิดละ 2 ไมโครลิตร 0.2 mM dNTP mix 0.2 ไมโครลิตร 10X buffer A 2 ไมโครลิตร และ 50 mM MgCl₂ 0.6 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยใช้ Taq DNA polymerase 0.3 ยูนิต (Vivantis, USA) โดยใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีอุณหภูมิดังนี้ pre-denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ อุณหภูมิ denature 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ annealing 53 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และอุณหภูมิ long extension 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ นำผลผลิตที่ได้มาตรวจสอบโดยนำมาแยกขนาดใน 1 % agarose gel electrophoresis ใน 0.5X TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 30 นาที แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที ดูภายใต้แสง UV บันทึกภาพ จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *FokI* โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ยูนิต 3X buffer 3 ไมโครลิตร และ ultrapure water 16 ไมโครลิตร บ่มในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 60 นาที และอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาตรวจสอบผลโดยนำมาแยกขนาดใน 2 % agarose gel electrophoresis ใน 0.5X TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 75 โวลต์ เป็นเวลานาน 40 นาที แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที ดูภายใต้แสง UV บันทึกภาพ

```

Query: 481   gctggaatagtccttgaggggtccagtggtaccaacaattgtgttctctgtagtgacatcg 540
           |||
Sbjct: 13105 gctggaatagtccttgaggggtccagtggtaccaacaattgtgttctctgtagtgacatcg 13164

Query: 541   ctattgccgccaagagtatttgggtcgcaacatggatcgcgatcgcataatacatcttctt 600
           |||
Sbjct: 13165 ctattgccgccaagagtatttgggtcgcaacatggatcgcgatcgcataatacatcttctt 13224

Query: 601   actaagccaatggctactggttctagctcagtcggctactctggtttggccattgttgca 660
           |||
Sbjct: 13225 actaagccaatggctactggttctagctcagtcggctactctggtttggccattgttgca 13284

Query: 661   catggaggagcaggaaaatccaccttagcacaatgtgtttacaatgacaagagggacaaa 720
           |||
Sbjct: 13285 catggaggagcaggaaaatccaccttagcacaatgtgtttacaatgacaagagggacaaa 13344

Query: 721   gaacattttgacgtcaggattggggtctgcatctcacgcaaacttgatgttcacgcgat 780
           |||
Sbjct: 13345 gaacattttgacgtcaggattggggtctgcatctcacgcaaacttgatgttcacgcgat 13404

Query: 781   acacgtgagattatcgagtcagcaacaaatggagagtgcctcgtgtggacaatcttgat 840
           |||
Sbjct: 13405 acacgtgagattatcgagtcagcaacaaatggagagtgcctcgtgtggacaatcttgat 13464

Query: 841   actctccagtcgagattgaaggacataatgcaaaaatcagagaaattcctgcttgtgttg 900
           |||
Sbjct: 13465 actctccagtcgagattgaaggacataatgcaaaaatcagagaaattcctgcttgtgttg 13524

```

รูปที่ 1 ผลที่ได้จากการ blastn และ alignment nucleotide sequence ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ของข้าวพันธุ์ St. No. 1 และ genome sequence ของข้าว Nipponbare (susceptible variety) (บริเวณสีเหลืองคือบริเวณของไพรเมอร์; สีแดง คือ ตำแหน่ง SNPs; บริเวณที่เส้นนอนใต้อักษรสีดำ คือ ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *FokI*; เส้นตั้งตรงสีดำ คือ ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *FokI*)

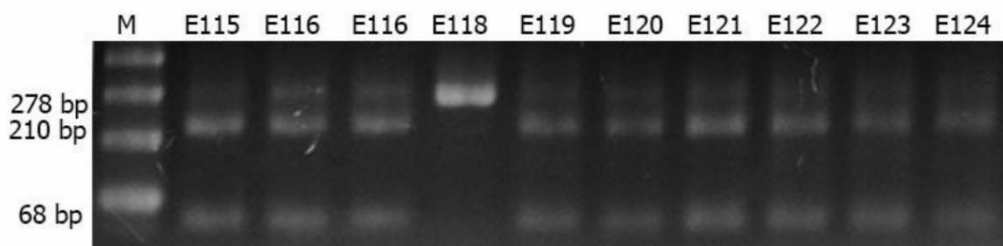
3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ของข้าวพันธุ์ St. No. 1 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากพันธุ์ข้าวnipponbare ที่มีแอลลีลอ่อนแอด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่ามีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน หรือ SNPs จำนวน 34 ตำแหน่ง โดยในจำนวนนี้มี 21 ตำแหน่งที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน และพบว่ามี 10 ตำแหน่งอยู่ในตำแหน่งจดจำของ

เอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างแอลลีลต้านทานกับแอลลีลอ่อนแอได้ (รูปที่ 1) โดยผู้วิจัยได้คัดเลือก SNPs ตำแหน่งที่ 741 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ให้การดอะมิโนเปลี่ยนแปลงจากการดอะมิโนเมไทโอนีน (M) ในข้าวพันธุ์ St. No. 1 เป็นกรดอะมิโน ไอโซลิวซีน (I) ในข้าวnipponbare ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Lin และคณะ (2007) ที่พบว่าบริเวณดังกล่าวเป็นตำแหน่งจดจำของ

เอนไซม์ตัดจำเพาะ *FokI* ไพรเมอร์ถูกออกแบบในบริเวณอนุรักษ์ของยีนเพื่อให้ครอบคลุมบริเวณดังกล่าว โดยขึ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จะมีขนาดเท่ากับ 278 คู่เบส จากนั้นใช้ไพรเมอร์ตรวจสอบยีนต้านทานโรคลำไ้ *Pi37* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 202 ตัวอย่างจากทั้งหมด 206 ตัวอย่าง มีขนาดของแถบดีเอ็นเอถูกต้องตามขนาดที่ได้คาดไว้ และเมื่อนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *FokI* พบว่าตัวอย่างพันธุ์ข้าวที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคลำไ้ *Pi37* จะสามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *FokI* ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอ 2

แถบ ขนาด 210 และ 68 คู่เบส จำนวนทั้งสิ้น 146 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่มีแอลลีลอ่อนแอของยีนต้านทานโรคลำไ้ *Pi37* ไม่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ มีจำนวน 56 ตัวอย่าง (รูปที่ 2) โดยพบว่าข้าวพื้นเมืองส่วนใหญ่จากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคลำไ้ *Pi37* (84 %) ส่วนข้าวพื้นเมืองจากภาคใต้ส่วนใหญ่มีแอลลีลอ่อนแอ (75 %) ดังตารางที่ 1 ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าข้าวพื้นเมืองของไทยเป็นแหล่งของพันธุกรรมที่มีความสำคัญมากซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งของยีนต้านทานในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวได้



รูปที่ 2 ผลจากการตรวจสอบโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *FokI* โดยในพันธุ์ที่มีอัลลีลยีนต้านทานโรคลำไ้ *Pi37* จะให้แถบขนาด 210 และ 68 คู่เบส

ตารางที่ 1 จำนวนพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่ตรวจสอบและผลการตรวจสอบแอลลีลของยีนต้านทานโรคลำไ้ *Pi37*

พันธุ์ข้าว	จำนวนพันธุ์ที่ตรวจสอบ	จำนวนพันธุ์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลีลต้านทาน	จำนวนพันธุ์ที่มีแอลลีลอ่อนแอ
ข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ	24	22	21	1
ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคใต้	40	40	10	30
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	142	140	115	25
- ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	97	95	74	21
- ข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	45	45	41	4
รวม	206	202	146	56

4. สรุป

การวิจัยครั้งนี้ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถใช้จำแนกแอสลิตด้านทานกับแอลลีลอ่อนแอของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* และตรวจสอบข้าวพื้นเมืองของไทยจำนวน 202 พันธุ์ จาก 206 พันธุ์ พบว่ามีการกระจายตัวของแอลลีลต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง โดยข้าวไร่พื้นเมืองภาคเหนือ ข้าวนาสวนพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และข้าวขึ้นน้ำพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนใหญ่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* ส่วนข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้มีเพียงจำนวนน้อยที่มีแอลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi37* จากข้อมูลดังกล่าว สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวของประเทศไทยให้ต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ได้ในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทูสนับสนุนการวิจัย จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (KURDI)

6. รายการอ้างอิง

กฤตกิตติศักดิ์ ไพรัตน์จิต, อิงออน สีแก้ว, ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์, ธาณี ศรีวงศ์ชัย และสุริพร เกตุงาม, 2554, การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi9*, *Pi36*, *Piqm(t)* ในข้าวพื้นเมืองไทย โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ, Thai J. Genet. 4(1): 52-62.
 ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ และสุริพร เกตุงาม, 2552, โรคไหม้ในข้าวและสถานการณ์ปัจจุบันของงานวิจัยด้านยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าว, แก่น

เกษตร, 37(1): 69-78.

อิงออน สีแก้ว, ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ และสุริพร เกตุงาม, 2553, การค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ในข้าว (*Pi-d2*) ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ, KKU Res. J. 15(2): 123-131.

เอี่ยม ทองดี, 2538, ข้าว : วัฒนธรรมและการเปลี่ยนแปลง, มติชน, กรุงเทพฯ.

Chen, S., Wang, L., Que, Z.Q., Pan, R.Q. and Pan, Q.H., 2005, Genetic and physical mapping of *Pi37(t)*, a new gene conferring resistance to rice blast in the famous cultivar St. No. 1, Theor. Appl. Genet. 111: 1563-1570.

Disthaporn, S. 1994, Current rice blast epidemics and their management in Thailand, pp. 333-442 In: R.S. Zeigler, S.A. Leong, and P.S. Teng (eds) Rice Blast Disease. CAB Int., Wallingford, U.K.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1990, Isolation of plant DNA from tissue, Focus, 12: 13-15.

Lin, F., Chen, S., Que, Z.Q., Wang, L., Lui, X.Q. and Pan, Q.H., 2007, The blast resistance gene *Pi37* encodes an NBS-LRR protein and is member of a resistance gene cluster on rice chromosome 1, Genetics 177: 1871-1880.

Lodhi, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F. and Reisch, B.I., 1994, A simple and efficient method DNA extraction from grapevine cultivars and vitis species, Plant Mol. Biol. Rep. 12: 6-13.