ว.วิทย. มข. 45(3) 595-604 (2560) KKU Sci. J. 45(3) 595-604 (2017)

การพัฒนาสายพันธุ์ข้าวต้านทานโรคขอบใบแห้งโดยวิธีการผสมกลับและคัดเลือกด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

Development of Rice Lines for Bacterial Leaf Blight Resistance using Backcross Method and Marker-assisted Selection

กนกอร เยาว์ดำ[1*] ประภา ศรีพิจิตต์[1] ธานี ศรีวงศ์ชัย[1] และสุภาพร จันทร์บัวทอง[2]

[1]ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[2]ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี กองวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

[*]Corresponding Author, E-mail: kanokon_y@hotmail.com

บทคัดย่อ

โรคขอบใบแห้งในข้าวมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae (Xoo.)* สามารถเข้าทำลายได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าว ตั้งแต่ระยะกล้าถึงออกรวง ส่งผลให้ผลผลิตข้าวลดลงถึง 80 % การใช้พันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพที่สุดวิธีหนึ่ง แต่พันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคนี้มีจำนวนน้อย และไม่สามารถต้านทานโรคในแบบกว้างได้ เชื้อโรคขอบใบแห้งมีหลายสายพันธุ์จึงจำเป็นต้องปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อเชื้อสาเหตุหลายสายพันธุ์ภายในต้นเดียว การปรับปรุงพันธ์ข้าวต้านทานโรคขอบใบแห้งโดยผสมพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ RGDU07097-1-MAS-8-9-B-1 ที่มียีนต้านทาน *xa5* และ *Xa21* ใช้เป็นพันธุ์ให้ ผสมกับพันธุ์ CH1 ซึ่งมีลักษณะทรงต้นดีและให้ผลผลิตสูงเป็นพันธุ์รับ เพื่อสร้างลูกผสมรุ่น F_1 และผสมกลับกับพันธุ์รับเพื่อสร้างลูกผสมกลับรุ่น BC_1F_1 และ BC_2F_1 ตามลำดับ โดยการผสมกลับแต่ละรุ่นจะคัดเลือกต้นที่มียีน *xa5* และ *Xa21* และคัดเลือกต้นข้าวที่มีลักษณะพื้นฐานพันธุกรรมใกล้เคียงพันธุ์รับมากที่สุดด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ พบว่าต้น BC_2F_1 จำนวน 3 ต้นมี%พื้นฐานพันธุกรรมสูงสุด คือ 98.0 % 96.5% และ 92.5% ตามลำดับ จากนั้นปลูกต้น BC_2F_1 ปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อสร้างลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 และคัดเลือกที่มีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งโดยการปลูกเชื้อ พบว่าข้าวจำนวน 408 ต้นมีเพียง 9 ต้น ที่มีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในระดับต้านทาน ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพผลผลิตใกล้เคียงกับพันธุ์ CH1 และมีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง

ABSTRACT

Bacterial leaf blight (BLB) disease is caused by bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae (Xoo)*. Infection of this disease can occur at all stages of rice plants from seedling to heading. It can make yield loss up to 80%. The utilization of resistant varieties has been considered to be one of the most effective ways to control the disease. At present, there are few BLB resistant rice varieties and it cannot broad spectrum resistant to BLB strains. The resistant varieties having different BLB resistant genes are associated with the different strains of the pathogen. It is necessary to improve rice varieties for widely resistance to BLB stains. Rice improvement for BLB disease resistance was conducted by crossing between a line (RGDU07097-1-MAS-8-9-B-1) with BLB disease resistance used as donor parent and a variety (CH1) with good plant type used as recurrent parent to produce F_1 hybrids. The F_1 plants were backcrossed to recurrent parent for production of BC_1F_1 and BC_2F_1 progenies. Selection was done using DNA markers specific to *xa5* and *Xa21* genes controlling BLB disease resistance in each backcross generations. The highest percentage of recurrent parent, CH1, from BC_2F_1 progeny of the cross was selected with genetic background was 98%, 96.5% and 92.5%, respectively. The selected BC_2F_1 plants were self-pollinated to produce BC_2F_2 progenies. The BC_2F_2 progenies obtained were tested for disease resistance. The result showed 9 of 408 BC_2F_2 plants resistant to BLB disease. These lines can provide yield same as CH1 and BLB disease resisitance.

คำสำคัญ: การคัดเลือกโดยเครื่องหมายดีเอ็นเอ การผสมกลับ ข้าว โรคขอบใบแห้ง

Keywords: Marker-assisted selection, Backcross, Rice, Bacterial leaf blight disease.

บทนำ

โรคขอบใบแห้งมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae (Xoo.)* ก่อให้เกิดโรคที่สำคัญในข้าว (*Oryza sativa*) โรคขอบใบแห้งระบาดหนักในสภาพพื้นที่นาชลประทานและนาน้ำฝนทั่วโลก (Mew, 1987) มีรายงานพบการระบาดของโรคขอบใบแห้งครั้งแรกช่วงปี พ.ศ. 2427-2453 ในพื้นที่ปลูกข้าวจังหวัดฟูกุโอกะ ประเทศญี่ปุ่น (Ou, 1985) จากนั้นได้มีการศึกษาโรคนี้เป็นต้นมา และมีรายงานการระบาดของโรคขอบใบแห้งในพื้นที่ปลูกข้าวในประเทศไทยที่จังหวัดปทุมธานีเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2506 (Eamchit and Mew, 1982) เชื้อขอบใบแห้งสามารถเข้าทำลายได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าวตั้งแต่ระยะกล้าถึงระยะออกรวง ทำให้ต้นข้าวเหี่ยวเน่าและตาย อาการเหล่านี้มักพบในระยะกล้า ส่งผลให้ผลผลิตข้าวลดลงถึง 80 % ความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้นเมื่อใส่ปุ๋ยบำรุงต้นข้าว และเชื้อโรคสามารถแพร่กระจายได้ดีในเขตชลประทาน และเมื่อเชื้อปนเปื้อนในน้ำ จะสามารถมีชีวิตอยู่ได้ประมาณ 15 วัน (Ou, 1985) ข้าวที่เป็นโรคขอบใบแห้ง ในพื้นที่ที่การระบาดไม่รุนแรง ผลผลิตข้าวจะลดลงประมาณ 20-30 % แต่ในบางพื้นที่มีการระบาดรุนแรง ผลผลิตข้าวจะ

ลดลงมาก 80-100 % (Mew, 1987) ปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงของโรค ได้แก่ ระยะการเจริญเติบโตของต้นข้าว สภาพภูมิประเทศของพื้นที่ปลูกข้าว ฤดูกาลปลูกข้าว และชนิดของเชื้อโรคที่เข้าทำลายต้นข้าว (pathogen) (Ou, 1985)

การควบคุมการระบาดของโรคขอบใบแห้งนั้นมีหลายวิธี เช่น เขตกรรม การใช้สารเคมี การใช้วิธีการทางชีวภาพ การพยากรณ์โรคล่วงหน้า และการใช้พันธุ์ต้านทานต่อโรค ซึ่งวิธีการใช้พันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งถือเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด (Niño-Lui et al., 2006) ในปัจจุบันพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคนี้มีจำนวนน้อย และพันธุ์ที่มีอยู่ไม่สามารถต้านทานโรคในแบบกว้างได้ เนื่องจากเชื้อโรคขอบใบแห้งมีหลายสายพันธุ์จึงมีความจำเป็นที่จะต้องปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคจากเชื้อสาเหตุหลายสายพันธุ์ภายในต้นเดียว (Vera-Cruz and Mew, 1989) จากการศึกษายีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งที่พบทั้งในข้าวปลูกและข้าวป่านั้น มีมากกว่า 30 ยีน (Rao et al., 2002) โดยยีน *xa5* และ *X21* นั้น ถือเป็นยีนหลักที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคขอบใบแห้งในภูมิภาคนี้ ยีน *xa5* เป็นยีนด้อย (Murty and Khush, 1997) อยู่บริเวณปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมที่ 5 (Blair and McCouch, 1997) และมีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในพื้นที่แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงเหนือ (Adhikari et al., 1995) ส่วนยีน *Xa21* เป็นยีนที่ถูกโคลนได้สำเร็จเป็นยีนแรกจาก *O. longistaminata* และถูกถ่ายยีนเข้าสู่ *O. sativa* (Khush et al., 1989)

ในการศึกษาครั้งนี้ จึงได้พัฒนาพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะทรงต้นที่ดีและผลผลิตสูงให้มีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง โดยถ่ายยีน *xa5* และ *Xa21* ด้วยวิธีการผสมกลับร่วมกับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจสอบยีน และคัดเลือกต้นข้าวที่มียีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง เพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวที่มีลักษณะคงเดิมแต่เพิ่มลักษณะความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง ซึ่งจะสามารถลดการระบาดของโรคขอบใบแห้งได้

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วัสดุและอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัย

1.1 พันธุ์ข้าว

ข้าวพันธุ์ CH1 ใช้เป็นพันธุ์รับได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้าวพันธุ์ RGDU07097-1-MAS-8-9-B-1 ใช้เป็นพันธุ์ให้ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (Korinsak, 2009)

ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และTN1 ใช้เป็นพันธุ์อ่อนแอมาตรฐานการทดสอบปฏิกิริยาความรุนแรงของโรคขอบใบแห้ง

1.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับคัดเลือกต้นข้าวที่มียีน *xa5* และ *Xa21* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ STS (Sequence-Tagged Sites) ด้วยไพรเมอร์ PAxa5 เพื่อคัดเลือกยีน *xa5* (Iyer and McCouch, 2004) และไพรเมอร์ PB7-8 เพื่อคัดเลือกยีน *Xa21* (Chun-wongse et al., 1993) (ตารางที่ 1)

เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับคัดเลือกพื้นฐานทางพันธุกรรม (genetic background) ในประชากรแต่ละรุ่นหลังการผสมกลับ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ SSR (Simple Sequence Repeat) จำนวน 230 primers ที่กระจายอยู่ทั่วทั้ง 12 โครโมโซมของข้าว (McCouch et al., 2002)

1.3 เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ที่เป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้งของข้าวในเขตภาคกลาง จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Xoo.PTT001 ซึ่งระบาดรุนแรงในเขตภาคกลาง Xoo.PSL010 และ Xoo.STI003 ซึ่งระบาดรุนแรงในเขตภาคเหนือตอนล่าง เพื่อทดสอบความต้านทานโรคขอบใบแห้งในการคัดเลือกพันธุ์ข้าว

ตารางที่ 1 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับคัดเลือกยีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง *xa5* และ*Xa21*

No.	Primer	DNA sequences
1.	PAxa5 F1	5’ggCCACCTTCgAgCTCTACC3’
2.	PAxa5 F2	5’gCTCgCCATTCAAgTTCTTgTC3’
3.	PAxa5 R1	5’CAgATACCTTATCAAACTgCTC3’
4.	PAxa5 R2	5’CAACATTgCAACTCCTgTATAAg3’
5.	PB7-8 7F	5’AgACgCggAAgggTggTTCCCggA3’
6.	PB7-8 8R	5’AgACgCggTAATCgAAgATgAAA3’

2. การผสมพันธุ์ข้าว

2.1 ปลูกข้าวพันธุ์ RGDU07097-1-MAS-8-9-B-1 และข้าวพันธุ์ CH1 ในกระถางดินเผา ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 นิ้ว โดยปลูก 4 ต้นต่อกระถาง และปลูกซ้ำ 4 กระถางต่อพันธุ์ ดูแลจนต้นข้าวออกดอกพร้อมผสม

2.2 เมื่อข้าวออกดอกในระยะก่อนดอกบานจึงกำจัดเกสรตัวผู้ (emasculation) ด้วยวิธีการอบไอน้ำร้อน 45 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที (hot-air method) ในต้นข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์รับ แล้วจึงนำเกสรตัวผู้จากข้าวที่ใช้เป็นพันธุ์ให้มาผสม

2.3 คลุมช่อดอกที่ได้รับการผสมด้วยถุงกระดาษไขขนาดกว้าง 8 เซนติเมตร ยาว 23 เซนติเมตร คลุมไว้ประมาณ 3 วันจึงเปิดถุงออก หลังจากนั้นประมาณ 28 ถึง 30 วัน เก็บเมล็ดลูกผสมรุ่น F_1 แล้วนำไปอบในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วันเพื่อทำลายการพักตัวของเมล็ด (กองขยายพันธุ์พืช, 2543)

2.4 นำเมล็ดลูกผสมรุ่น F_1 มาปลูกและผสมกลับกับพันธุ์ CH1 ซึ่งเป็นพันธุ์รับ 2 ครั้ง จะได้เมล็ดลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_1

2.5 ปลูกเมล็ดลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_1 ปล่อยให้ผสมตัวเอง จนได้เมล็ดลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2

3. การคัดเลือกด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

3.1 ตัดใบข้าวอายุประมาณ 25-30 วัน จากต้นข้าวแต่ละรุ่นที่ต้องการคัดเลือกต้นที่มียีน *xa5* และ *Xa21* มาเจาะใบข้าว ด้วยปากกา จำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงใน PCR plate

3.2 เตรียม PCR cocktail ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง ดังนี้

H_2O	3.8	ไมโครลิตร
master mix	5	ไมโครลิตร
primer	1	ไมโครลิตร
(ความเข้นข้ม 0.5-1 ไมโครโมล)		
Taq DNA polymerase	0.2	ไมโครลิตร
(ความเข้มข้น 0.5 ยูนิต)		

3.3 เติม PCR cocktail ลงใน PCR plate ที่มีชิ้นใบข้าว หลุมละ 10 ไมโครลิตร ปิด หลอดทดลองด้วยซิลิโคน (เมื่อเติม PCR cocktail ดีเอ็นเอจะถูกสกัดออกมาจากใบข้าวประมาณ 1 ไมโครกรัม)

3.4 นำ PCR plate เข้าเครื่อง PCR ตามโปรแกรมที่ตั้งไว้ ดังนี้

PAxa5 สำหรับตรวจสอบยีน *xa5*

Preheat lid	98°C 5 นาที 1 รอบ	
Denaturation	98 °C 5 วินาที	29 รอบ
Annealing	55 °C 5 วินาที	
Extention	72 °C 20 วินาที	
Final extention	72 °C 1 นาที 1 รอบ	
Hold	4 °C	

PB7-8 สำหรับตรวจสอบยีน *Xa21*

Preheat lid	98 °C 5 นาที 1 รอบ	
Denaturation	98 °C 5 วินาที	29 รอบ
Annealing	60 °C 5 วินาที	
Extention	72 °C 20 วินาที	
Final extention	72 °C 1 นาที 1 รอบ	
Hold	4 °C	

จากนั้นตรวจสอบแถบ DNA ด้วย 1.5 % agarose gel ที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย MaestroSafe™ Nucleic Acid Stains

3.5 ในกรณีที่คัดเลือก genetic background ของต้นข้าวแต่ละรุ่นหลังการผสมกลับ ตรวจสอบแถบ DNA ด้วย polyacrylamide gel electrophoresis (Raymond and Weintraub, 1959)

4. การทดสอบปฏิกิริยาความรุนแรงของโรคขอบใบแห้งด้วยสารละลาย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

4.1 เพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวรุ่น BC_2F_2 ในจานเพาะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร รองด้วยกระดาษเพาะเติมน้ำกลั่นให้ชุ่ม ปิดฝาจานเพาะเพื่อรักษาระดับความชื้น ดูแลอย่าให้น้ำมากเกินไป เพื่อป้องกันเมล็ดเน่า

4.2 เพาะเมล็ดพันธุ์ข้าวทิ้งไว้ในสภาพมืดประมาณ 3 วัน เมล็ดข้าวจะมีรากงอกออกมาประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร และมียอดอ่อนสีขาวโผล่ออกมาประมาณ 0.5 เซนติเมตร หรืออาจจะเป็นตุ่มเล็กๆ สีขาว

4.3 นำเมล็ดไปปลูกโดยใช้ปากคีบคีบเมล็ดวางลงบนดินในกะบะเพาะกล้า 1 ต้นต่อหลุม ปิดถาดด้วยตะแกรงตาข่าย เพื่อป้องกันหนูกัดกินเมล็ดแล้วคลุมด้วยพลาสติก เพื่อรักษาระดับความชื้น ในระยะนี้เมล็ดข้าวไม่ต้องการแสงแดดในการงอก หลังจากนั้น 4 วัน เปิดพลาสติกและตะแกรงที่คลุมออก แล้วเริ่มให้น้ำตามปกติ

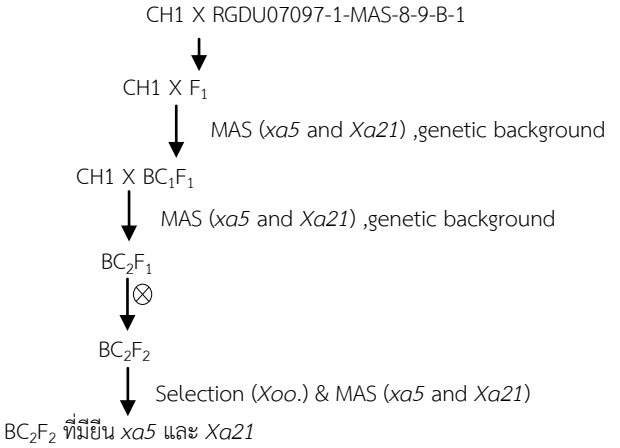
4.4 เมื่อข้าวอายุได้ประมาณ 25 วัน (หรือมีใบประมาณ 4 ถึง 5 ใบ) ปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* ด้วยวิธี clipping technique ของ Kauffman et al. (1973) โดยใช้กรรไกรจุ่มสารละลายแบคทีเรีย ตัดปลายใบของต้นข้าวยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ทุกๆ ต้น ต้นละ 2-3 ใบ เลือกตัดใบที่อยู่ส่วนกลาง โดยไม่ตัดใบล่างๆ (ใบแก่) และใบยอด (อายุน้อยเกินไป) ตรวจสอบปฏิกิริยาการเกิดโรค 14 วันหลังการปลูกเชื้อ เปรียบเทียบกับพันธุ์รับ พันธุ์ให้ และพันธุ์อ่อนแอมาตรฐาน จำนวน 2 พันธุ์ คือ TN1 และขาวดอกมะลิ 105 โดยให้คะแนนปฏิกิริยาความรุนแรงของโรคตามระบบ SES (Standard Evaluation System) ของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (IRRI, 1996)

4.5 วิธีการประเมินอาการของโรค จะให้คะแนนเป็น 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ตามลำดับความเสียหายของโรคคิดจาก%พื้นที่บนใบที่เกิดโรค โดย 1 เป็น highly resistant ส่วน 9 เป็น highly susceptible แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เกณฑ์มาตรฐานในการประเมินปฏิกิริยาความรุนแรงของโรคขอบใบแห้ง (SES : Standard Evaluation System) (IRRI 1996)

BB Score (Greenhouse test)	Percent lesion area
1	0-3
2	4-6
3	7-12
4	13-25
5	26-50
6	51-75
7	76-87
8	88-94
9	95-100

สรุปขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย



ผลการวิจัย

1. การคัดเลือกต้นข้าวที่มียีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง

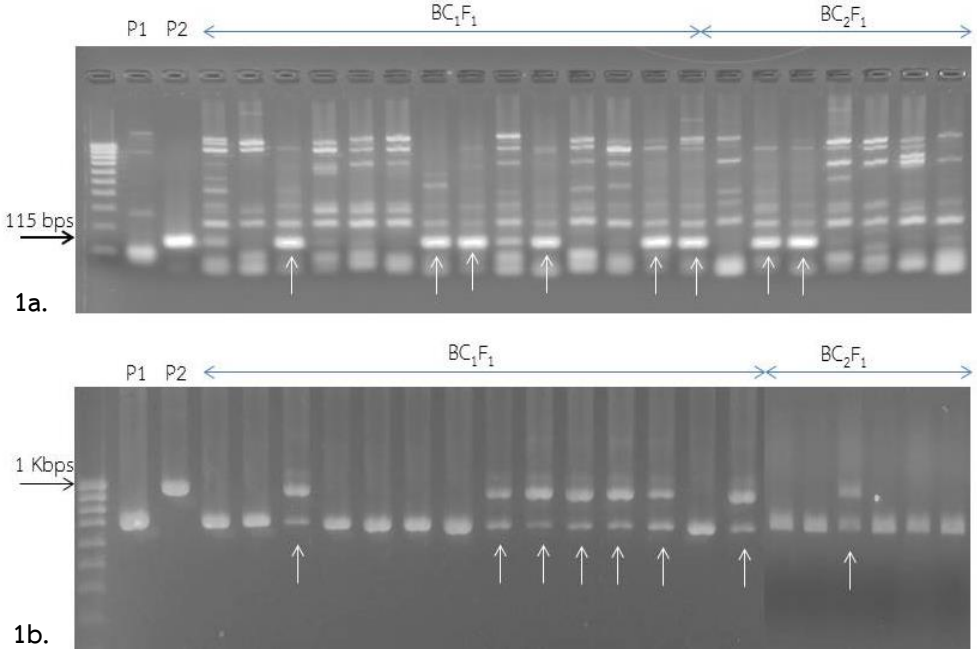
การคัดเลือกต้นข้าวที่มียีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง เริ่มคัดเลือกตั้งแต่ประชากรรุ่น BC_1F_1 (CH1//CH1/RGDU07097-1-MAS-8-9-B-1) และ BC_2F_1(CH1///CH1//CH1/RGDU 07097-1-MAS-8-9-B-1) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล 2 ตัว คือ *xa5* และ *Xa21* ประชากรแต่ละรุ่นที่มียีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ *xa5* และ *Xa21* บนเจล ต้นที่มียีน *xa5* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 115 bp และต้นที่มียีน *Xa21* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1 kbp (รูปที่ 1)

ในประชากรรุ่น BC_1F_1 ปลูกต้นข้าวจำนวน 75 ต้น คัดเลือกต้นheterozygousที่มียีน *xa5* และ *Xa21* ได้ จำนวน 28 ต้น เมื่อผสมกลับกับ CH1 ได้เมล็ดรุ่น BC_2F_1 นำมาปลูก 95 ต้น และคัดเลือกต้น

heterozygousที่มียีน *xa5* และ *Xa21* ได้ จำนวน 4 ต้น จากนั้นปล่อยให้ข้าวผสมตัวเอง ได้เมล็ดรุ่น BC_2F_2 จึงทดสอบปฏิกิริยาความรุนแรงของโรคขอบใบแห้งด้วยเชื้อ *Xoo*.

2. การคัดเลือกลักษณะพื้นฐานทางพันธุกรรมของประชากร

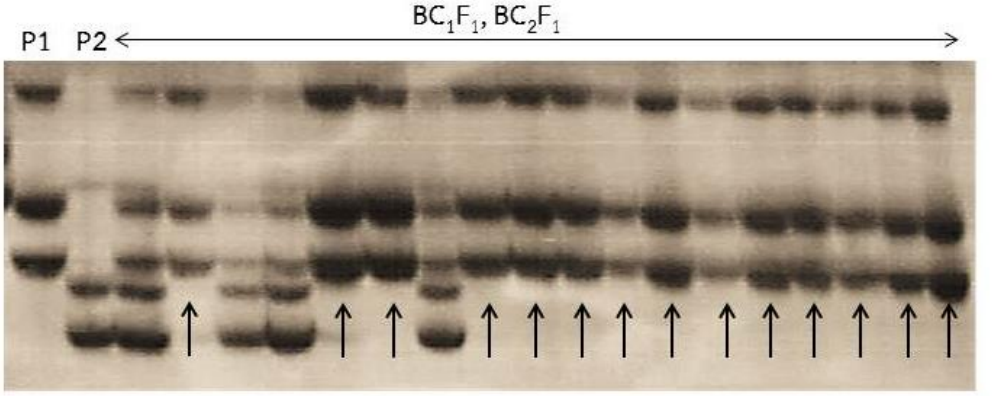
หลังจากคัดเลือกต้นข้าวที่มียีน *xa5* และ *Xa21* จากลูกผสมแต่ละรุ่นแล้ว นำต้นที่มียีนต้านทานโรคขอบใบแห้งมาคัดลักษณะพื้นฐานทางพันธุกรรมที่มีความใกล้เคียงกับ CH1 ซึ่งเป็นพันธุ์รับมากที่สุด โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 230 ไพรเมอร์ ที่ครอบคลุมยีนทั้ง 12 โครโมโซมของข้าว โดยคัดเลือกเฉพาะไพรเมอร์ที่มีความแตกต่างของแถบ DNA เมื่อเปรียบเทียบในพันธุ์รับและพันธุ์ให้ จำนวน 44 เครื่องหมายมาตรวจสอบในลูกผสมกลับรุ่น BC_1F_1 และ BC_2F_1 ดังนี้ (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 a. แถบดีเอ็นเอขนาด 115 bp ในการคัดเลือกต้นข้าวรุ่น BC_1F_1 และ BC_2F_1 ที่มียีน *xa5* (ไพรเมอร์ : PAxa5, P1= CH1, P2=RGDU07097-1-MAS-8-9-B-1, ลูกศรชี้ลักษณะที่คัดเลือก)
b. แถบดีเอ็นเอขนาด 1 kbp ในการคัดเลือกต้นข้าวรุ่น BC_1F_1 และ BC_2F_1 ที่มียีน *Xa21* (ไพรเมอร์ : PB7-8, P1= CH1, P2=RGDU07097-1-MAS-8-9-B-1, ลูกศรชี้ลักษณะที่คัดเลือก)

ลูกผสมกลับรุ่น BC_1F_1 มีค่าเฉลี่ยพื้นฐานพันธุกรรม 75% จากประชากรทั้งหมด 28 ต้นพบว่ามี 4 ต้น มีลักษณะพื้นฐานทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงพันธุ์รับสูงที่สุดคือ 79.5% 81.0% 87.0% และ 88.0% ตามลำดับ นำลูกผสมกลับรุ่น BC_1F_1 ทั้ง 4 ต้น มาผสมกลับกับพันธุ์รับ จนได้เมล็ดลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_1

จากนั้นนำเมล็ดลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_1 มีค่าเฉลี่ยพื้นฐานพันธุกรรม 87.5% มาปลูกคัดเลือกยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งแล้ว นำมาคัดลักษณะพื้นฐานทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงพันธุ์รับ พบว่ามีลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_1 จำนวน 3 ต้น มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงพันธุ์รับสูงที่สุด 92.5% 96.5% และ 98.0% ตามลำดับนำมาทดสอบความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งด้วยการปลูกเชื้อ *Xoo.*



รูปที่ 2 การคัดเลือกลักษณะพื้นฐานพันธุกรรมของประชากรรุ่น BC_1F_1 และBC_2F_1 ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ (P1= CH1, P2=RGDU07097-1-MAS-8-9-B-1, ลูกศร แสดงลักษณะที่คัดเลือก)

3. การทดสอบปฏิกิริยาความรุนแรงของโรคขอบใบแห้งด้วยการปลูกเชื้อ *Xoo.*

หลังการปลูกเชื้อ *Xoo*. จำนวน 3 สายพันธุ์ในลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 เป็นเวลา 14 วัน พันธุ์ข้าวที่ใช้ทดสอบจะแสดงอาการของโรคขอบใบแห้ง โดยสังเกตจากข้าวพันธุ์อ่อนแอมาตรฐานจะแสดงอาการของโรคขอบใบแห้งรุนแรงที่ระดับคะแนน 5 -7 โดยพิจารณาจากพื้นที่ใบที่ถูกทำลายเป็นหลัก พบว่า

สายพันธุ์ข้าวทดสอบรุ่น BC_2F_2 จำนวนทั้งสิ้น 403 ต้น มีปฏิกิริยาระดับต้านทาน (R) 9 ต้น ต้นที่ค่อนข้างต้านทาน (MR) จำนวน 80 ต้น ต้นที่ค่อนข้างอ่อนแอ (MS) จำนวน 113 ต้น ต้นที่อ่อนแอถึงอ่อนแอมาก (S-HS) จำนวน 201 ต้น ข้าวพันธุ์เปรียบเทียบพันธุ์ CH1 (พันธุ์รับ) มีปฏิกิริยาระดับอ่อนแอ (S) พันธุ์ RGDU07097-1-MAS-8-9-B-1 (พันธุ์ให้) มีปฏิกิริยาระดับต้านทาน (R) พันธุ์ TN1 และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีปฏิกิริยาอ่อนแอมาก (HS)

เมื่อพิจารณาต้นข้าวทดสอบรุ่น BC_2F_2 จำนวน 9 ต้นที่อยู่ในระดับต้านทาน พบว่า 7 ต้นมีปฏิกิริยาระดับต้านทานต่อเชื้อ *Xoo*. สายพันธุ์ XooPTT001 และจำนวน 2 ต้นมีปฏิกิริยาระดับต้านทานต่อเชื้อ *Xoo*. สายพันธุ์ XooPSL010 สำหรับเชื้อ *Xoo*. สายพันธุ์ XooSTI003 นั้น ไม่พบต้นข้าวที่มีปฏิกิริยาที่ระดับต้านทาน จากนั้นนำใบข้าวจากทั้ง 9 ต้นที่ต้านทานต่อเชื้อ *Xoo.* มาตรวจหายีน *xa5* และ *Xa21* พบว่าทุกต้นมียีนต้านทานทั้ง 2 ชนิด

สรุปและวิจารณ์

จากการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อต้านทานโรคขอบใบแห้งด้วยวิธีผสมกลับร่วมกับการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอนั้น ลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_1 จากคู่ผสม CH1/RGDU07097-1-MAS-8-9-B-1 ทั้ง 3 ต้นมียีน *xa5* และ *Xa21* ที่ควบคุมความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง และมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับ

พันธุ์รับมากกว่า 87.5% เท่ากับ 92.5%, 96.5% และ 98.0๔ ตามลำดับ ทำให้สามารถย่นระยะเวลาในการผสมกลับได้อีก 1-2 รุ่น เมื่อพิจารณา%ความใกล้เคียงของลักษณะทางพันธุกรรมเปรียบเทียบกับพันธุ์รับพบว่าเทียบเท่ากับการผสมกลับถึงรุ่น BC_3F_1 (93.75%) ถึง BC_4F_1 (96.875%) ดังนั้นการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวจึงเป็นวิธีที่สามารถปรับปรุงพันธุ์ข้าวตามวัตถุประสงค์และช่วยย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ได้

มีงานวิจัยอื่นๆที่ประสบความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ Pradhan et al. (2015) ได้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวน้ำลึก jalmagna ให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งแบบกว้างโดยการปิรามิดยีน *xa5*, *xa13* และ *Xa21* ด้วยวิธีผสมกลับและคัดเลือกด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอพร้อมทั้งคัดเลือกพื้นฐานพันธุกรรมของแต่ละรุ่นเพื่อย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวจนได้สายพันธุ์ข้าวรุ่น BC_3F_1 ที่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งและมีลักษณะทางการเกษตรเหมือนพันธุ์เดิม ที่มีพื้นฐานพันธุกรรมประมาณ 97 % Manoharan et al. (2010) ได้ปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่มีผลผลิตสูง ให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งแบบกว้างด้วยการปิรามิดยีน *xa5*, *xa13* และ *Xa21* และคัดเลือกด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอและคัดเลือกด้วยเชื้อที่ระบาดในท้องถิ่น จนได้ลูกผสมรุ่น F_3 ที่มีความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในแบบกว้างได้ แสดงให้เห็นว่าวิธีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

สำหรับการทดสอบปฏิกิริยาการเกิดโรคขอบใบแห้งในลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 ด้วยเชื้อ *Xoo*. สายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในเขตภาคกลางและภาคเหนือตอนล่างนั้น ลูกผสมกลับรุ่น BC_2F_2 ต้นที่มียีน *xa5* และ *Xa21* มีความสามารถในการต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งได้เป็นอย่างดี เนื่องจากมีปฏิกิริยาระดับต้านทาน (R) ซึ่งสามารถสนับสนุนให้เกษตรกรนำไปปลูกในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคขอบใบแห้งได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี กรมการข้าว ที่สนับสนุนสถานที่ในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กองขยายพันธุ์พืช. (2543). กฎการทดสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์สากล. กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ. 340 หน้า.

Adhikari, T.B., Vera Cruz, C.M., Zhang, Q., Nelson, R.J., Skinner, D.Z., Mew, T.W. and Leach, J.E. (1995). Genetic diversity of *Xanthomo nas oryzae* pv. *oryzae* in Asia. Appl. Envi. Microb. 61(3): 966-971.

Blair, M.W. and McCouch, S.R. (1997). Microsatellite and sequence tagged site markers diagnostic for the rice bacterial leaf blight resistance gene *xa-5*. Theor. App.l Genet. 252: 597-607.

Chun-wongse, J., Martin, G., Tanksley, S. (1993). Pre-germination genotypic screening using PCR amplification of half-seeds. Theor. Appl. Genet. 86: 694-698.

Eamchit, S. and Mew, T.W. (1982). Comparison of virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* in Thailand and the Philippines. Plant Dis. 66: 556-559.

IRRI. (1996). Standard Evaluation System for Rice 4th edition. IRRI, Los baños, Philippines. pp. 21.

Iyer, A.S. and McCouch, S.R. (2004). The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. Mol. Plant-Microbe Interact. 17: 1348–1354.

Kauffman, H.E., Reddy, A.P., Hsieh, K.S.P.Y. and Merca, S.D. (1973). An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. Plant Dis. Rep. 57: 537-541.

Khush, G.S., Mackill, D.J. and Sidhu, G.S. (1989). Breeding rice for resistance to bacterial blight. *In* Bacterial Blight of Rice. Los baños, Phillipines: IRRI. pp. 207-217.

Korinsak, S. (2009). Marker-assisted pyramiding bacterial blight resistance genes (*xa5*, *Xa21*, *xa33(t)*, *Xa34(t)* and *qBB11*) in rice. master's thesis, Kasetsart University. Bangkok. 133 p.

Manoharan, B., Nagarajan, P., Rabindran R. and Ramalingam, J. (2010). Bacterial leaf blight resistance genes (*Xa21*, *xa13* and *xa5*) pyramiding through molecular marker assisted selection into rice cultivars. Arch. Phytopathology Plant Protect. 43(10): 1032-1043·

McCouch, S.R., Teytelman, L., Xu, Y., Lobos, K.B., Clare, K., Walton, M., Fu, B., Maghirang, R., Li, Z., Xing, Y., Zhang, Q., Kono, I., Yano, M., Fjellstrom, R., DeClerck, G., Schneider, D., Cartinhour, S., Ware, D. and Stein, L. (2002). Development and Mapping of 2240 New SSR Markers for Rice (*Oryza sativa* L.). DNA Research 9: 199–207.

Mew, T.W. (1987). Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice. Annu. Rev. Phytopathol. 25: 359-382.

Murty, V.V.S. and Khush, G.S. (1972). Studies on the inheritance of resistance to bacterial blight in rice varieties. *In* Rice Breeding. Los baños, Phillipines: IRRI. pp. 301-305.

Niño-Lui, D.O., Ronald, P.C. and Bogdanove, A.J. (2006). Pathogen profile *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. Mol. Plant Pathol. 7(5): 303-324.

Ou, S.H. (1985). Rice disease (2nd ed.). Kew: Commonwealth Mycology Institute. pp. 61-95.

Pradhan, S.K., Nayak, D.K., Mohanty, S., Behera, L., Barik, S.R., Pandit, E., Lenka, S. and Anandan, A. (2015). Pyramiding of three bacterial blight resistance genes for broad-spectrum resistance in deepwater rice variety, Jalmagna. Rice 8: 19.

Rao, K.K., Lakshminarasu, M. and Jena, K.K. (2002). DNA markers and marker-assisted breeding for durable resistance to bacterial blight disease in rice. Biotech Methods and Advances 20: 33-47.

Raymond, S. and Weintraub, L. (1959). Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. Science 130(3377): 711.

Vera-Cruz, C.M. and Mew, T.W. (1989). How variable is *Xanthomonas campestris* pv. *Oryzae*. *In* Bacterial Blight of Rice. Los baños, Phillipines: IRRI. pp. 153-166.

❑❑❑❑❑