# การค้นหายีนต้านทานต่อโรคไหม้ในข้าว (*Pi-d2*) ของข้าวพันธุ์พื้นเมือง ในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ

# Screening landrace Thai rice in North and Northeast regions of Thailand for rice blast resistance gene, *Pi-d2*, with DNA marker

*อิงออน สีแก้ว (Eng - Orn Srikeaw)*[1]
*ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ (Chatchawan Jantasuriyarat)*[2*]
*สุรีพร เกตุงาม (Sureeporn Kate-ngam)*[3]

## บทคัดย่อ

โรคไหม้ของข้าว (rice blast) มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Magnaporthe grisea* เป็นปัญหาสำคัญปัญหาหนึ่งของการผลิตข้าวทั่วโลก การใช้พันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานถือเป็นวิธีการป้องกันที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสืบค้นหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย จำนวน 69 สายพันธุ์ ประกอบด้วยข้าวไร่ในเขตภาคเหนือจำนวน 24 พันธุ์และข้าวขึ้นน้ำนาสวน จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 45 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อยีนต้านทาน *Pi-d2* (*Pi-d2* Con2F/Con2R) ผลจากการตรวจสอบพบยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองทุกพันธุ์ ซึ่งในจำนวนนี้ 39 พันธุ์มีอัลลีลที่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* โดยพบในข้าวไร่พื้นเมืองจากภาคเหนือจำนวน 7 พันธุ์ และในข้าวขึ้นน้ำนาสวนจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 32 พันธุ์ ยืนยันผลการตรวจสอบโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีอัลลีลที่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* เปรียบเทียบกับพันธุ์ที่มีอัลลีลที่ไม่ต้านทานของยีน *Pi-d2* พบว่ามี single nucleotide polymorphism (SNP) A/G ในส่วน recognition site ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* โดยพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีอัลลีลที่ต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'- A*CGCGT-3' ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 700 และ 400 คู่เบส หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ *MluI* ส่วนในข้าวพันธุ์ที่มีอัลลีลที่ไม่ต้านทานของยีน *Pi-d2* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'- G*CGCGT-3' ซึ่งเอนไซม์ *MluI* ไม่สามารถตัดนิวคลีโอไทด์ในส่วนนี้ได้ จึงยังคงได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส

[1] *นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*
[2] *อาจารย์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*
[3] *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ ภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี*
[*] *Corresponding authors, e- mail: fscicwj@ku.ac.th*

## Abstract

Rice blast disease caused by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*, is one of the most devastating diseases in rice worldwide. Information on rice with disease resstance gene is important for rice cultivar development. In this study, 69 landrace Thai rice cultivars including 24 cultivars from the North and 45 cultivars from the Northeast regions of Thailand were collected for examination for the presence of gene *Pi-d2* by using one pair of *Pi-d2* specific primer (*Pi-d2* Con2F/Con2R). DNA from all Thai landrace rice cultivars can be amplified. The amplified DNA fragments can be classified into two alleles. 39 rice cultivars have the resistant *Pi-d2* allele of rice blast disease resistance gene, 7 cultivars from the North and 32 cultivars from the Northeast regions. The sequence comparison analysis between resistant and susceptible alleles from landrace Thai rice cultivars and Nipponbare, a susceptible check cultivar, showed a single nucleotide polymorphism (SNP) A/G presents in the recognition site of *MluI*. The resistant allele, allele R, has a 5'- A*CGCGT-3' sequence, the recognition site of *MluI*, therefore produces 700 and 400 bp after *MluI* digestion. While the susceptible allele, allele S, has 5'- G*CGCGT-3', which cannot be cut by *MluI* enzyme, so it remains to produce 1,100 bp after *MluI* digestion.

**คำสำคัญ:** ข้าวพันธุ์พื้นเมือง, โรคไหม้, ยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2*

**Keywords:** landrace Thai rice rareties, Rice blast disease, *Pi-d2* rice blast resistant gene

## บทนำ

โรคไหม้ของข้าว (rice blast) มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Magnaporthe grisea* โรคไหม้เป็นโรคที่มีการแพร่กระจายกว้างขวางไปทั่วโลก ประมาณ 85 ประเทศ โดยเชื้อโรคไหม้สามารถปรับตัวเข้าทำลายได้ในสภาพแวดล้อมต่างๆกัน จึงมีความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อโรคมาก วิธีการที่เหมาะสมที่สุดที่จะประสบความสำเร็จในการป้องกันการสูญเสียผลผลิตของข้าวคือการลดความเสี่ยงของการระบาดของโรค โดยการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีความต้านทานต่อโรค ในปัจจุบันได้มีการค้นพบยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวกว่า 60 ยีน ซึ่งกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมของข้าว แต่อย่างไรก็ตาม มียีนต้านทานโรคไหม้ในข้าวเพียง 10 ยีนเท่านั้น ที่ได้ทำการโคลนยีนและหาลำดับเบสเสร็จสมบูรณ์แล้ว คือ *Pi2*, *Pi9*, *Pi36*, *Pi37*, *Pi-b*, *Pi-d2*, *Pi-kh*, *Pi-ta*, *Piz* และ *Piz-t* (ชัชวาล และสุรีพร, 2552; Bryan et al., 2000; Chen et al., 2006; Lin et al., 2007; Qu et al., 2006; Sharma et al., 2005; Wang et al., 1999)

ข้าวสายพันธุ์ Digu ของประเทศจีน สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้สายพันธุ์ต่างๆ จำนวน 156 สายพันธุ์ จากประเทศจีนและประเทศญี่ปุ่น ดังนั้นจึงมีการนำข้าวพันธุ์Diguมาใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคไหม้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวในประเทศจีนอย่างกว้างขวาง (Chen et al., 2004) ข้าวสายพันธุ์ Digu มียีนต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้จำนวนสองยีนด้วยกันคือ ยีน*Pi-d(t)1* และยีน *Pi-d(t)2* (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น *Pi-d2*) โดยยีนทั้งสองมีความต้านทานต่อสายพันธุ์ของเชื้อรา *M. grisea* ที่แตกต่างกัน โดย *Pi-d(t)1* จะต้านทานต่อเชื้อรา *M. grisea* สายพันธุ์ ZB13 และ ยีนต้านทาน *Pi-d2* จะต้านทานต่อเชื้อรา *M. grisea* สายพันธุ์ ZB15 โดยยีนต้านทาน *Pi-d(t)1* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมข้าวคู่ที่ 2 และยีนต้านทาน *Pi-d2* มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมข้าวคู่ที่ 6 (Chen et al., 2006) ซึ่งต่อมายีนต้านทาน *Pi-d2* ได้ถูกโคลนเป็นผลสำเร็จในปี ค.ศ. 2006 โดย Chen และคณะ ยีนต้านทาน *Pi-d2* นี้มีโครงสร้างของโปรตีนที่แตกต่างจากยีนต้านทานตัวอื่นๆ คือ มีส่วนของน้ำตาลแมนโนส

ที่สามารถจับกับแลคตินได้อยู่ภายนอกเซลล์ (a bulb-type mannose specific binding lectin, B-lectin) และในส่วนภายในเซลล์มีโครงสร้าง serine-threonine kinase domain ซึ่งโปรตีนจากยีนต้านทาน *Pi-d2* นี้จะมีตำแหน่งอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยพันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้มียีนต้านทาน *Pi-d2* ที่แตกต่างจากพันธุ์ข้าวที่ไม่สามารถต้านทานเพียงแค่กรดอะมิโนหนึ่งตัวที่ตำแหน่ง 441 ของโปรตีนยีนต้านทานเท่านั้น โดยข้าวที่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้มีอัลลีลของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* ที่มีกรดอะมิโน ไอโซลิวซีน (isoleucine) ที่ตำแหน่ง 441 ส่วนข้าวที่ไม่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้มีอัลลีลของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* ที่มีกรดอะมิโน เมทไทโอนีน (methionine) ที่ตำแหน่ง 441ของโปรตีนต้านทาน (ชัชวาล และสุรีพร, 2552; Chen et.al., 2006)

ประเทศไทยนับว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพข้าวมากที่สุดประเทศหนึ่งของโลก การได้มาและการเก็บรักษายีนจากแหล่งพันธุกรรมข้าว ข้าวป่าและข้าวพันธุ์พื้นเมือง (landrace rice) ถือได้ว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการรักษาแหล่งพันธุกรรมข้าวที่สำคัญและถือเป็นการปกป้องและคุ้มครองผลประโยชน์ทางชีวภาพของประเทศ พันธุ์ข้าวพื้นเมืองเป็นพันธุ์ข้าวที่เกษตรกรมีการคัดเลือกและเก็บรักษาสืบทอดกันมาหลายชั่วอายุ มีลักษณะเด่นคือมีความสามารถในการต้านทานโรคและแมลงและ/หรือสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี อย่างไรก็ตามพันธุ์เหล่านี้มักจะให้ผลผลิตต่ำ ดังนั้นจึงมักถูกแทนที่ด้วยข้าวพันธุ์รับรองใหม่ๆ ที่มีการแนะนำส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกกันอย่างแพร่หลาย นับวันพันธุ์ข้าวพื้นเมืองซึ่งเป็นแหล่งพันธุกรรมของลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจโดยเฉพาะยีนที่ต้านทานโรคและแมลงเหล่านี้จะสูญหายไปอย่างต่อเนื่อง ส่งผลกระทบต่อแหล่งพันธุกรรมข้าว ในที่สุด วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาตรวจสอบการมียีน *Pi-d2*และรูปแบบของอัลลีลในข้าวพันธุ์พื้นเมืองพันธุ์ต่างๆที่เก็บตัวอย่างมาจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะกับยีนต้านทาน *Pi-d2* เพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มียีนต้านทาน *Pi-d2* ไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวต้านทานโรคไหม้ต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### ตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองและการสกัดดีเอ็นเอ

ข้าวพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 69 ตัวอย่าง ที่ใช้ศึกษาในการทดลองครั้งนี้ ได้มาจากพื้นที่ต่างๆ ในบริเวณภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และจากธนาคารเชื้อพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร โดยสามารถแบ่งออกเป็น ข้าวไร่จากภาคเหนือ จำนวน 24 พันธุ์และข้าวขึ้นน้ำนาสวนจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 45 พันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 1

นำตัวอย่างใบอ่อนข้าวอายุประมาณ 3-4 สัปดาห์มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี CTAB method ของ Doyle and Doyle (1990) ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ที่สกัดได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis แล้วเจือจาง ดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ต่อไป

### การตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2*

ดีเอ็นเอที่สกัดได้ถูกนำมาตรวจสอบหายีนต้านทานโรคไหม้ Pi-d2 ด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ เพื่อตรวจหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ดีเอ็นเอที่เฉพาะกับยีนต้านทาน Pi-d2 (*Pi-d2* Con2F/Con2R) F-5'-TTGGCTATCATAGGCGTCC-3' และ R- 5'-ATTTGAAGGCGTTTGCGTAGA-3' (Chen et al., 2006) ใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามด้วย 30 รอบ ของ Denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน

1 นาที และ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำ PCR products มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* เพื่อดูความแตกต่างระหว่างตัวอย่างข้าวที่มีอัลลีลของยีน *Pi-d2* ที่ต้านทานต่อโรคไหม้และพันธุ์ข้าวที่มีอัลลีลของยีน *Pi-d2* ที่ไม่ต้านทานโรคไหม้ ทำการทดลองซ้ำสองครั้งเพื่อความแม่นยำ จากนั้นแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดแล้วด้วย 2% agarose gel electrophoresis ทำการยืนยันผลโดยส่งตัวอย่างพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่ตรวจพบยีน *Pi-d2* ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 7 พันธุ์ คือ พันธุ์เหลืองลีซอ พันธุ์เหนียวบายสี พันธุ์ป่าเบาะ พันธุ์พวงเงิน พันธุ์ข้าวแดง (TRI8409149) พันธุ์ข้าวมันหมู และพันธุ์พญาชม เปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าวนิพปอนบาเรที่ใช้เป็นพันธุ์ตรวจสอบ (Macrogen Inc, Korea) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปทำการ alignment กับฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม nucleotide blast (BLASTN)

## ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการตรวจหายีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* ในข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่เก็บมาจาก ภาคเหนือ 24 พันธุ์ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 45 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าว *Pi-d2* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากข้าวพันธุ์พื้นเมืองได้ทั้ง 69 พันธุ์ โดยชิ้นดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* สามารถจำแนกรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นได้ 2 รูปแบบหรือ 2 อัลลีล คือ อัลลีล S ซึ่งมีแถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส เนื่องจากไม่มีตำแหน่ง recognition site ของเอ็นไซม์ *MluI* และอัลลีล R มีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 700 และ 400 คู่เบส หลังตัดด้วยเอนไซม์ *MluI* (รูปที่ 1) เนื่องจากมีตำแหน่ง recognition site ของเอนไซม์ MluI ข้าวพื้นเมืองที่เก็บรวบรวมมาจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีอัลลีลของยีนต้านทาน *Pi-d2* ที่ต้านทานโรคไหม้ในข้าวทั้งสิ้น 7 และ 32 พันธุ์ ตามลำดับ จากจำนวนพันธุ์ข้าว 24 พันธุ์ และ 45 พันธุ์ ดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 1

เมื่อสุ่มตัวอย่างพันธุ์ข้าวจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีอัลลีลต้านทานของยีน *Pi-d2* (พันธุ์เหลืองลีซอ พันธุ์เหนียวบายสี พันธุ์ป่าเบาะ และพันธุ์พวงเงิน) และที่มีอัลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d2* (พันธุ์ข้าวแดง (TRI8409149) พันธุ์ข้าวมันหมู และพันธุ์พญาชม) และพันธุ์นิพปอนบาเร ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีอัลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d2* เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าพันธุ์เหลืองลีซอ พันธุ์เหนียวบายสี พันธุ์ป่าเบาะ และพันธุ์พวงเงิน ซึ่งมีอัลลีลต้านทานของยีน *Pi-d2* ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 904, 900, 930 และ 900 เบส ตามลำดับ และพันธุ์ข้าวแดง (TRI8409149) พันธุ์ข้าวมันหมู พันธุ์พญาชม และพันธุ์นิพปอนบาเร ซึ่งมีอัลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d2* ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 900, 910, 890 และ 920 เบส ตามลำดับ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยทำ alignment กับฐานข้อมูล BLASTN (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) (รูปที่ 2) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pi-d2* ซึ่งเป็นส่วนของโปรตีน B-lectin receptor kinase โดยยีน *Pi-d2* นี้มีโครงสร้างของโปรตีนที่แตกต่างกันระหว่างข้าวที่สามารถต้านทานต่อเชื้อราโรคไหม้ที่มีอัลลีลต้านทานยีน *Pi-d2* กับข้าวที่มีอัลลีลไม่ต้านทานยีน *Pi-d2* ต่อเชื้อราโรคไหม้ ซึ่งข้าวที่ต้านทานโรคไหม้มีบริเวณที่เป็น substitution site ของกรดอะมิโนไอโซลิวซีน (isoleucine) ที่ตำแหน่ง 441ของโปรตีนยีนต้านทาน *Pi-d2* (Chen et al., 2006) ซึ่งสอดคล้องกันเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของอัลลีลต้านทานกับอัลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d2* พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน recognition site ของ *MluI* จำนวน 1 นิวคลีโอไทด์ โดยพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่มีอัลลีลของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-A*CGCGT-3' ดังนั้นเมื่อนำ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อยีนต้านทาน *Pi-d2* (*Pi-d2* Con2F/Con2R ) มาตัดด้วยเอนไซม์ MluI ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 700 และ 400 คู่เบส ส่วนในข้าวที่มีอัลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d2* และพันธุ์นิพปอนบาเรซึ่งเป็นพันธุ์ข้าว

ที่ไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 5'- G*CGCGT-3' ซึ่งทำให้เอนไซม์ *MluI* ไม่สามารถตัดได้ ยังคงได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส ข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีอัลลีลของยีน *Pi-d2* ที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคไหม้นี้ สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่มียีนต้านทานเชื้อราโรคไหม้และทดสอบยืนยันความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ของข้าวที่พบในประเทศไทย ก่อนที่จะนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคไหม้ต่อไป

## สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจพันธุกรรมข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 69 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* พบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองของไทยจำนวน 39 พันธุ์ มีอัลลีลของยีนที่ต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* ซึ่งยืนยันการมีอัลลีลยีนต้านทานโรคไหม้ดังกล่าวโดยการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Pi-d2* ในฐานข้อมูล NCBI

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างข้าวที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทุนสนับสนุนบางส่วนจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และทุนสนับสนุนบางส่วนจาก โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี รหัสโครงการ MRG- WI1515S059

## เอกสารอ้างอิง

ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ และ สุรีพร เกตุงาม. 2552. โรคไหม้ในข้าวและสถานการณ์ปัจจุบันของงานวิจัยด้านยีนต้านทานโรคไหม้ในข้าว. **แก่นเกษตร** 37: 69-78.

Bryan, G.T., Wu, K.S., Farrall, L., Jia, Y., Hershy, H.P., Mcadams, S.A., Faulk, K.N., Donaldson, G.K., Tarchini, R. and Valent, B. 2000. A single amino acid difference distinguishes resistance and susceptible alleles of the rice blast resistance gene Pi-ta. **Plant Cell** 12: 2033-2045.

Chen, X.W., Li, S.G., Xu, J.C., Zhai, W.X., Ling, Z.Z., Ma, B.T., Wang, Y.P., Wang W.M., Cao, G., Ma, Y.Q., Shang, J.J., Zhao, X.F., Zhou, K.D. and Zhu, L.H. 2004. Identification of two blast resistance genes in a rice variety, Digu. **Phytopathology.** 152: 77-85.

Chen, X.W., Shang, J.J., Chen, D.X., Lei, C.L., Zou, Y., Zhai, W.X., Liu, G.Z., Xu, J., Ling, Z.Z., Cao, G., Ma, B., Wang Y., Zhao, x., Li, S. and Zhu, L. 2006. A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. **The Plant Journal** 46: 794-804.

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

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.

Qu, S.H., Liu, G.F., Zhou, B., Bellizzi, M., Zeng, L.R., Dai, L.Y., 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.

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. **Molecular Genetics and Genomics** 274: 569-578.

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 Journal** 19: 55-64.

**ตารางที่ 1.** รายชื่อข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ใช้ในการทดลองและรูปแบบอัลลีลยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* หลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* ที่พบในตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย 69 พันธุ์

| ชื่อพันธุ์ | แหล่งที่มา | รูปแบบอัลลีล *Pi-d2** | ชื่อพันธุ์ | แหล่งที่มา | รูปแบบอัลลีล *Pi-d2** |
|---|---|---|---|---|---|
| 1.งอเพื่อน | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | S | 27. พวงมาลัย 35-10-8 | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 2.ดยาหลี่ | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | S | 28.โพฉลอง 31-34-20 | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 3.จะชิ | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | R | 29.จำปาจีน 84-8-16 | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | S |
| 4.ปือก่อ | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | S | 30.จำปาจีน 84-8-22 | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | S |
| 5.ปือเกษตร | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | S | 31.สว่างอารมณ์ 84-4-118 | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | S |
| 6.เหนียวแสงมูเวอ | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | S | 32.ข้าวเบาที่หนึ่ง 95-1-80 | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 7.กะเหรี่ยงขาว | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | R | 33.ไข่แมงดา 59-2-73 | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 8.เหลืองหอม | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | S | 34.ลอยใหญ่ 62-40-140 | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 9.จะนอไหน | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | S | 35.เม็ดเล็กหนัก | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 10.เหลืองหอมแดง | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | S | 36.พญาชม | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | S |
| 11.ลายซาน | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | S | 37.เขียว | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | S |
| 12.ปีอิ แม่ละ | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | S | 38.ขาวปราจีน | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | S |
| 13.ห้วยแล้ง | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | R | 39.เจ๊กกระโดด | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 14.ปีอิ ซูแม่ฟาง | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | S | 40.รวงเดียว | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 15. ข้าวกอแผ่ | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | R | 41.เจ้าลอย | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 16.บือขอพอ | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | S | 42.เหลืองกล้วย | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 17.ปีอิ พะโด่ | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | S | 43.คุณแม่ | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 18.เหลืองลีซอ | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | R | 44.ขาวยายคลี่ | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 19.ข้าวแดง (TRI 8409149) | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | S | 45.ขาวเสมอ | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 20.ข้าวมันหมู | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | S | 46.เหลืองพวงทอง | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 21.ป่าเบาะ | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | R | 47.เหลืองอนันต์ | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 22.ตอซึจ่า | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | S | 48.ขาวลี้ | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 23.งอเซระ | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | R | 49.ขาวตาหยัด | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 24.เหนียวกล่ำหอม แสงลีซอ | ข้าวพื้นเมืองจากภาคเหนือ | S | 50.นางเขียว | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 25.พวงทอง | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R | 51.ลอยสายบัว | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 26.พวงมาลัย 31-5-6 | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R | 52.นางเขียว | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |

**ตารางที่ 1.** รายชื่อข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ใช้ในการทดลองและรูปแบบอัลลีลยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* หลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *MluI* ที่พบในตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทย 69 พันธุ์

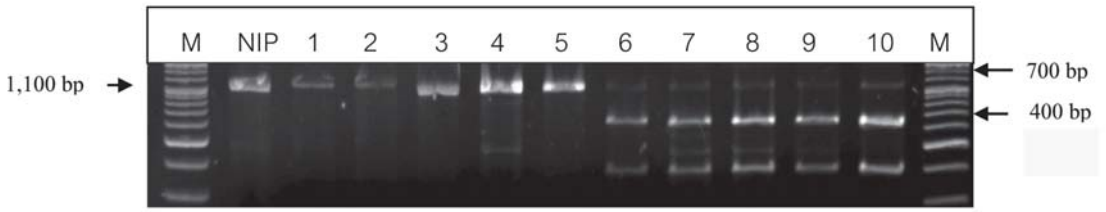
| ชื่อพันธุ์ | แหล่งที่มา | รูปแบบอัลลีล *Pi-d2** | ชื่อพันธุ์ | แหล่งที่มา | รูปแบบอัลลีล *Pi-d2** |
|---|---|---|---|---|---|
| 53. นางเขียว | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R | 62.ทานตะวัน | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 54.เกวียนหัก | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R | 63.ขาวเศรษฐี | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | S |
| 55.ขาวโพธิ์ | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R | 64.สามรวง | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | S |
| 56.สามพราน | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | S | 65.หอมทุ่ง | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | S |
| 57.เหนียวบายสี | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R | 66.หอมทุ่ง | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | S |
| 58.เหลืองบังใบ | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | S | 67.ไอ้โหม่ง | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | S |
| 59.ขาวนครไชยศรี | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R | 68.พวงหนัก | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 60.เจ้าลอย | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R | 69.พวงเงิน | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R |
| 61.ข้าวลอย | ข้าวพื้นเมืองภาคอีสาน | R | | | |

**หมายเหตุ**
* S = มีอัลลีลที่ไม่ต้านทานเชื้อราโรคไหม้ ไม่สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ MluI
R = มีอัลลีลที่ต้านทานเชื้อราโรคไหม้ สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ด้วยเอนไซม์ MluI

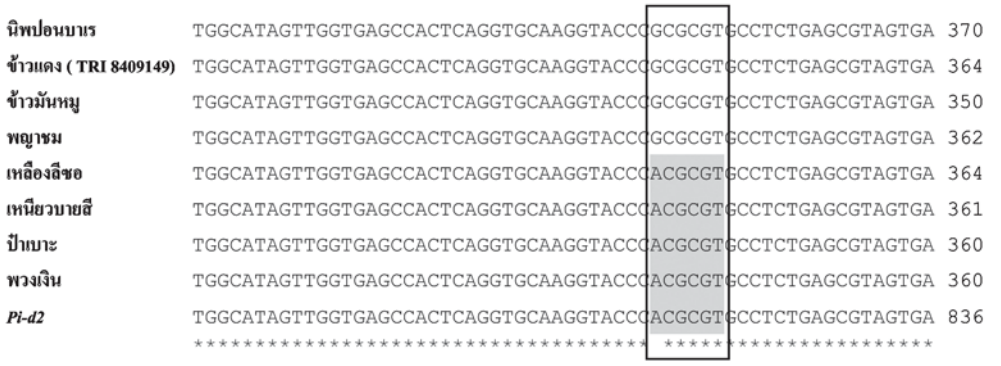
**ตารางที่ 2.** การกระจายตัวของอัลลีลของยีน *Pi-d2*ในข้าวพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 69 พันธุ์ จากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2*

| ข้าวพื้นเมือง | จำนวนพันธุ์ที่ตรวจสอบ | จำนวนพันธุ์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ | จำนวนพันธุ์ที่มีอัลลีล S* (1,100 bp) | จำนวนพันธุ์ที่มีอัลลีล R** (700 bp และ 400bp) |
|---|---|---|---|---|
| ข้าวพื้นเมืองภาคเหนือ | 24 | 24 | 17 | 7 |
| ข้าวพื้นเมืองตะวันออกเฉียงเหนือ | 45 | 45 | 13 | 32 |
| **รวม** | **69** | **69** | **30** | **39** |

**หมายเหตุ** * อัลลีล S ของยีน *Pi-d2* ที่ไม่ต้านทานต่อโรคไหม้ คือมีแถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส ที่จำเพาะกับยีน *Pi-d2* ที่ไม่มีตำแหน่งของการตัดด้วยเอนไซม์ *MluI*
** อัลลีล R ของยีน *Pi-d2* ที่ต้านทานต่อโรคไหม้ คือมีแถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส ที่มีตำแหน่งของการตัดด้วยเอนไซม์ *MluI* อยู่ภายในทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 700 และ 400 คู่เบส




**รูปที่ 1.** ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์พื้นเมืองพันธุ์ต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ ที่จำเพาะกับยีน *Pi-d2* (*Pi-d2* Con2F/Con2R) หลังตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ $Mlu_I$ M = Gene Ruler ™ DNA Ladder Mix, NIP = ข้าวพันธุ์ Nipponbare, Lane 1-5 เป็นตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีอัลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d2* คือพันธุ์ข้าวแดง (TRI 8409149) พันธุ์ข้าวมันหมู พันธุ์พญาชม และพันธุ์สามรวง ตามลำดับ Lane 6-10 เป็นตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีอัลลีลต้านทานของยีน *Pi-d2* คือ พันธุ์เหลืองลีซอ พันธุ์เหนียวบายสี พันธุ์ป่าเบาะ พันธุ์พวงเงิน และพันธุ์พวกหนัก ตามลำดับ




**รูปที่ 2.** แผนภาพแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่ได้จากการทำ sequence alignments ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีอัลลีลต้านทานของยีนต้านทานโรคไหม้ *Pi-d2* กับตัวอย่างข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีอัลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d2* เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ *Pi-d2* ที่มีรายงาน กรอบสี่เหลี่ยมแสดง A/G SNP site ในตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MluI*

ข้าวพันธุ์ที่มีอัลลีลต้านทานของยีน *Pi-d2*: พันธุ์เหลืองลีซอ พันธุ์เหนียวบายสี พันธุ์ป่าเบาะ และพันธุ์พวงเงิน
ข้าวพันธุ์ที่มีอัลลีลไม่ต้านทานของยีน *Pi-d2*: นิพปอนบาเร พันธุ์ข้าวแดง (TRI 8409149) พันธุ์ข้าวมันหมู และพันธุ์พญาชม