อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการ

การตรวจหายีน Bph14 และ homologues ที่ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ในข้าวพันธุ์ป่าและพันธุ์พื้นเมือง

โดย

ดร. เนริสา คุณประทุม

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน ๑๒ มี.ค. ๒๕๕๗
เลขทะเบียน ๑. ๒๖๘๖๙๕๓
เลขเรียกหนังสือ ๑ QH 369 .5 ๒๖๗๒.๑ ๒๕๕๗

ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจาก

งบประมาณรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2556

มหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้คณะผู้วิจัยต้องขอขอบคุณมหาวิทยาลัยนเรศวรที่ได้อนุเคราะห์งบประมาณรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2556 สัญญาเลขที่ *R2556C065* และขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตรที่อนุเคราะห์พันธุ์ข้าวสำหรับการทำวิจัย ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจ นักวิจัย หรือเป็นข้อมูลพื้นฐานให้กับนักปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2557

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	5
บทที่ 4 ผลการทดลอง	12
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	26
เอกสารอ้างอิง	28

บทที่ 1

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจหลักที่สำคัญของประเทศไทย โดยมีการปลูกข้าวทั้งเพื่อบริโภคเองภายในประเทศและส่งออกนำรายได้อย่างมหาศาลในแต่ละปี แม้ว่าไทยจะเป็นผู้ส่งออกข้าวรายใหญ่ที่สุดของโลกแต่ข้าวไทยกำลังประสบปัญหาด้านการสูญเสียผลผลิตข้าวเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศโลกทั้งภาวะภัยแล้ง น้ำท่วม การระบาดของโรคและแมลงที่เข้าทำลายข้าว เช่น ในปี 2553 ประเทศไทยประสบปัญหาในเรื่องการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลอย่างรุนแรงโดยเฉพาะในเขตภาคเหนือตอนล่างที่ได้รับความเสียหายจากการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลนับแสนไร่ ทำให้มีผลกระทบโดยตรงต่อผลผลิตข้าวอย่างมาก นอกจากนี้การระบาดของโรคและแมลงในข้าวยังทำให้มีการใช้สารเคมีในการกำจัดและป้องกันโรคและแมลงเพิ่มขึ้นซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมและสุขภาพของทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค ต้นทุนการผลิตที่เพิ่มขึ้น รวมถึงการดื้อยาของแมลงที่จะยิ่งส่งเสริมให้เกิดการระบาดรุนแรงมากขึ้นได้ในอนาคต (Hao et al., 2008; Rahman et al., 2009) การปรับปรุงพันธุ์ข้าวเพื่อให้ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจึงมีความจำเป็นเร่งด่วนที่ต้องรีบดำเนินการเพื่อลดและป้องกันการสูญเสียผลผลิตข้าว ปัจจุบันความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพระดับโมเลกุลทำให้สามารถศึกษากลไกการทำงานของยีนที่ควบคุมลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต รวมทั้งยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคและแมลงในพืช ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในการปรับปรุงพันธุ์พืชสมัยใหม่ อย่างไรก็ตามก่อนที่จะทำการศึกษากลไกการทำงานของยีน มีความจำเป็นที่จะต้องทำการวิจัยเบื้องต้นโดยการสืบค้นและตรวจหายีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการก่อน เช่น มีรายงานว่าความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลนั้นถูกควบคุมด้วยยีนคู่เดียว (*Bph* genes) ปัจจุบันมีการค้นพบ *Bph* genes จำนวน 22 ยีน ที่พบทั้งในข้าวพันธุ์พื้นเมือง (wild rice species) และข้าวพันธุ์ปลูก (cultivated rice species) (Yadavalli et al, 2010; Mai et al., 2012) แต่มีเพียงยีน *bph14-1* (accession no FJ941067) และ *bph14-2* (accession no FJ941068) เท่านั้นที่ทราบลำดับเบส (accession number FJ941067 จากฐานข้อมูล NCBI) นอกจากนี้มีรายงานว่า *bph14* มีความสามารถต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้หลายชีวชนิด (biotype) และยีน *Bph14* ยังมีประสิทธิภาพสูงในการแสดงออกสูงในข้าวต่างสายพันธุ์ที่มีฐานพันธุ์กรรมแตกต่างกัน (Du et al., 2009; Mai et al., 2012) ดังนั้นยีน *Bph14* น่าจะเป็นยีนหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงข้าวไทยให้ได้สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล อย่างไรก็ตามงานวิจัยเริ่มต้นที่จำเป็นต้องทำอย่างยิ่งคือการตรวจหายีนที่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสี

น้ำตาลที่มีอยู่ในพันธุ์ข้าวไทย (ทั้งพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ปลูก) เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อค้นหาและตรวจสอบยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Bph14* และ homologues ของยีนนี้ใน ข้าวป่าและข้าวพันธุ์พื้นเมืองไทยสำหรับใช้เป็นแหล่งยีนในการสร้างพันธุ์ข้าวต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown planthopper; BPH: *Nilaparvata lugens*) เป็นแมลง ที่จำเพาะต่อข้าว (rice-specific herbivore) โดยดูดกินน้ำเลี้ยงจากท่อลำเลียงอาหารของข้าว การเข้าทำลายอย่างหนักของ BPH ทำให้ข้าวเกิดอาการแห้งตาย (hopper-burn) ข้าวปลูก (cultivated rice) โดยทั่วไปอ่อนแอต่อ BPH อย่างไรก็ตามมีรายงานการพบความต้านทานต่อ BPH เป็นครั้งแรกในข้าวพันธุ์ Mudgo (Pathak et al., 1969) และมีการค้นคว้าวิจัยหาเครื่องหมายโมเลกุลและยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทาน BPH มาอย่างต่อเนื่อง ปัจจุบันมีรายงานการศึกษายีนต้านทาน BPH (BPH-resistance gene, *Bph*) แล้ว 21 ตำแหน่ง (loci) ซึ่งกระจายอยู่บนโครโมโซมต่างๆ (Hu et al., in press; Suh et al., 2011; Yadavalli V. et al., 2011) โดย 11 ตำแหน่งเป็นยีนที่ได้มาจากข้าวป่า 4 ชนิด (Rahman et al., 2009; Yadavalli V. et al., 2011) ได้แก่ *Oryza australiensis* (*Bph10, Bph18*), *O. eichingeri* (*Bph13*), *O. latifolia* (*Bph12*), *O. minuta* (*Bph20, Bph21*) และ *O. officinalis* (*bph11, bph12, Bph13, Bph14, Bph15*) โดยมี 10 ยีนจาก 21 ยีน ได้แก่ *Bph1 bph2 Bph3 Bph9 Bph14 Bph15 Bph18 bph19 Bph20* และ *Bph21* ที่มีการจัดทำ DNA marker สำหรับใช้ในการคัดเลือกข้าวต้านทาน BPH โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วย (marker-assisted selection; MAS) (Suh et al., 2011) ยีนต้านทาน BPH มีทั้งที่อยู่ในรูปของยีนเด่น (dominant gene) และยีนด้อย (recessive gene) และมีคุณสมบัติต้านทานต่อ BPH ชีวชนิดที่แตกต่างกันไป แม้ว่าจะมีการจำแนกยีนต้านทาน BPH มาแล้วมากกว่า 20 ตำแหน่ง แต่ส่วนใหญ่เป็นการหา DNA marker เพื่อใช้ร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐาน (conventional breeding) ในการสร้างพันธุ์ข้าวต้านทาน BPH โดยมีเพียง *Bph14* ยีนเดียวเท่านั้นที่ได้รับการโคลนและตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอของยีนที่ครอบคลุมส่วน coding sequence ครบสมบูรณ์โดย Du et al. (2009) ซึ่งพบว่ายีน *Bph14* สร้างโปรตีนที่มีโครงสร้างเป็นแบบ coiled-coil - nucleotide-binding - leucine-rich repeat (CC-NB-LRR) โครงสร้างดังกล่าวนี้เหมือนกับโปรตีนที่สร้างมาจากยีนต้านทานโรคพืช (R-gene) ในการศึกษาบทบาทหน้าที่ของยีน *Bph14* Du et al. (2009) รายงานว่ายีน *Bph14* แสดงออกบริเวณ vascular bundle ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ BPH ดูดกินน้ำเลี้ยงข้าว ผลการแสดงออกของยีน *Bph14* ทำให้ข้าวต้านทาน BPH ทั้งในระยะกล้าและระยะโตเต็มที่ นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของยีน *Bph14* ทำให้เกิดการกระตุ้น salicylic acid signaling pathway นำไปสู่การสร้างระบบป้องกันตัวเองของพืชเช่นเดียวกับยีนต้านทานโรคพืช การถ่ายยีน *Bph14* ให้ข้าวสายพันธุ์อ่อนแอต่อ BPH มี

ผลทำให้เกิดความต้านทานต่อ BPH ได้ ดังนั้นปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนต้านทาน BPH และชีวชนิดของ BPH น่าจะเป็นแบบเดียวกับ gene-for-gene interaction ของระบบความต้านทานโรคพืช

Khush et al. (1985) แบ่งประชากร BPH ในประเทศต่างๆ ตามปฏิกิริยาที่แตกต่างกันเป็น 4 ชีวชนิด (biotype) ได้แก่ BPH ชีวชนิดที่ 1 ประชากรมีต้นกำเนิดอยู่แถบเอเชียตะวันออกและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ BPH ชีวชนิดที่ 2 มีต้นกำเนิดอยู่ที่ประเทศฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย และเวียดนาม และเป็นชีวชนิดหลักในประเทศเหล่านี้ BPH ชีวชนิดที่ 3 เป็นชนิดที่เกิดขึ้นในห้องปฏิบัติการที่ the International Rice Research Institute (IRRI) และในประเทศญี่ปุ่น และ BPH ชีวชนิดที่ 4 พบเฉพาะที่เอเชียใต้เท่านั้น ในทศวรรษที่ 1970 ประชากร BPH ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เปลี่ยนจาก BPH ชีวชนิดที่ 1 เป็นชีวชนิดที่ 2 และปัจจุบันพบว่าเป็นคอมเพล็กซ์ของ BPH ชีวชนิดที่ 2 และ 3 (อ้างใน Rahman et al., 2009) ขณะที่ Chelliah and Bharathi (1993) แบ่ง BPH เป็น 5 ชีวชนิด พุฒิพงษ์และคณะ (2554) ศึกษาชีวชนิดของ BPH ใน 4 จังหวัดเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดพิษณุโลก ตาก อุตรดิตถ์ และเพชรบูรณ์ พบว่ามี BPH 3 ชีวชนิดได้แก่ ชีวชนิดที่ 2 3 และ 4 ตามการแบ่งแบบของ Khush et al. (1985) แต่ไม่พบชีวชนิดที่ 1

สงกรานต์ (2532) รายงานพบพันธุ์ข้าวป่าในประเทศไทย 6 พันธุ์ (ณ เวลาที่สำรวจ 2525-2531) ได้แก่ *O. rufipogon O. nivara O. fatua O. officinalis O. ridleyi* และ *O. granulata* โดยข้าวป่า 3 ชนิดแรกพบมากทั่วทุกภาค ส่วน 3 ชนิดหลังพบบางแห่งและเป็นหมันสูงจึงอยู่ระยะใกล้สูญพันธุ์ สมศักดิ์และคณะ (2548) ทดสอบความต้านทาน BPH ชีวชนิดจากจังหวัดชัยนาทในข้าวป่าพันธุ์ *O. rufipogon* (17 accessions) *O. officinalis* (2 accessions) และข้าววัชพืช (41 accessions) พบว่าข้าวป่าพันธุ์ *O. rufipogon* และข้าววัชพืชต้านทานต่อ BPH ชีวชนิดที่ทดสอบ 8 accessions (47%) และ 15 accessions (37%) ตามลำดับ ขณะที่ข้าวป่าพันธุ์ *O. officinalis* ต้านทานทั้ง 2 accessions ที่มาจากจังหวัดสุโขทัยและสระบุรี ข้าวปลูกในปัจจุบันเป็นข้าวพันธุ์ *O. sativa* ซึ่งเป็นข้าวที่มีจีโนมชุด AA เหมือนกับข้าวป่าพันธุ์ *O. rufipogon* และ *O. nivara* ขณะที่ข้าวป่าพันธุ์ *O. officinalis* มีจีโนมชุด CC (Khush et al., 2001)

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

ในงานวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อตรวจหายีน *Bph14* และ homologues ที่ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในข้าวพันธุ์ป่าและพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งมีขั้นตอนการปฏิบัติในการทดลอง ดังนี้

3.1 เตรียมต้นข้าวสำหรับการทดลอง (Preparation of plant material)

รวมรวมสายข้าวพันธุ์พันธุ์ป่าและพันธุ์พื้นเมือง โดยขอความอนุเคราะห์จาก ศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวพิษณุโลก และกรมวิชาการเกษตร ซึ่งสายพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ Mudgo, ASD7, Rathu Heenati, Babawee, ARC10550, Swarnalata, T12, Chin Saba, Pokkali, IR65482-4-132-2-2, Taichung Native 1 (TN1), *Oryza latifolic* 18803, *Oryza rufipogon* 15187, *Oryza nivara* Bamgla dest 18852, *Oryza officinalis* Philippines 18857, และ *Oryza glumeepatula* 18772

นำเมล็ดข้าวแช่ในน้ำเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง แล้วย้ายเมล็ดไปใส่ในผ้าขาวบางที่เปียกโดยห่อทิ้งไว้นาน 48 ชั่วโมง จนเมล็ดข้าวเริ่มงอก จึงทำการย้ายลงปลูกในกระถาง (เมล็ดต่อกระถาง) ในโรงเรือนคณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปฏิบัติดูแลโดยรดน้ำ 2-3 ครั้งต่อสัปดาห์ ใส่ปุ๋ยสูตร 16-16-16 ทุก 30 วัน จากนั้นเก็บใบอ่อนไปใช้ไว้ที่อุณหภูมิ –80°C เพื่อสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธีของ Doyle (1987)

เมื่อต้นข้าวดอก (ใช้เวลาประมาณ 90-120 วัน) ปล่อยให้ติดเมล็ด และเก็บเมล็ดเพื่อใช้ศึกษาต่อไป

3.2 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ (Method of DNA extraction)

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบสดของข้าวในระดับเล็กดัดแปลงมาจากวิธีของ Doyle (1987)

เก็บตัวอย่างใบข้าวที่ยังไม่โตเต็มที่ (ระยะประมาณ 3 ใบ) ล้างใบด้วยน้ำเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน ซับน้ำให้แห้ง ตัดใบข้าวขนาด 2 x 2 เซนติเมตร (50 มิลลิกรัม) ให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในโกร่งขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร ที่มีสารละลาย CTAB ซึ่งอุ่น 65°C ก่อนใช้ จำนวน 2 มิลลิลิตร บดตัวอย่างให้ละเอียด ดูดสารละลายที่มีเนื้อเยื่อข้าวโดยใช้ไมโครทิปตัดปลาย 700 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มตัวอย่างไว้ที่ 65°C เป็นเวลา 30 นาที, เขย่าตัวอย่างไปมาทุกๆ 10 นาที เติมสารละลาย chloroform : phenol (24:1) 700 ไมโครลิตร ปิดฝาหลอดให้แน่น เขย่าอย่าง แรงประมาณ 2-3 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 13,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที, ดูดส่วนใส (ด้านบน) ใส่หลอดทดลองใหม่ เติม isopropanol 700 ไมโครลิตร ลงในส่วนใส เขย่าเบาๆ ประมาณ 30 วินาที ปั่นตกตะกอน 13,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที, เทสารละลายทิ้ง (ดีเอ็นเอจะตกตะกอน

อยู่ที่ก้นหลอด) ตากตะกอนดีเอ็นเอไว้ให้แห้ง เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลาย 80% ethanol 1000 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ อาจใช้การดีดหลอดเบาๆ เพื่อให้ ตะกอนดีเอ็นเอหลุดออกจากก้นหลอด ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ปั่นตกตะกอนที่ 13,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายทิ้ง ตากตะกอนให้แห้งประมาณ 5 นาที เติมสารละลาย RNaseA 30 ไมโครลิตร, รอจนดีเอ็นเอละลายหมด (อาจใช้การดีดหลอดเบาๆ) เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4°C หรือ -20°C เมื่อต้องการเก็บรักษาไว้นาน

3.3 การออกแบบ primerห สำหรับตรวจสอบยีน *bph14* โดยเทคนิค PCR

(Primer designs for determination of *bph14* gene using PCR technique)

การออกแบบไพร์เมอร์ สำหรับตรวจสอบ ยีน *bph14* มีขั้นตอนดังนี้

1) สืบค้นข้อมูลลำดับเบสของยีน *bph14* (accession number : *Os03g0848700* หรือ FJ941067) จาก GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/)

2) จากนั้นทำการออกแบบ specific primers ที่มีความจำเพาะสำหรับการตรวจสอบ *gusA* ของ pCAMBIA1304 โดยใช้โปรแกรม Primer3 and BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) ซึ่งการทดลองนี้ทำการออกแบบไพรเมอร์ 12 คู่ ดังแสดงในตาราง ที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับการตรวจสอบยีน *bph14*

primer	Forward (5'→3')	Expected size of PCR product(bp)
Bph14 (FJ941067)	F: AAATTCGTGGTTGTTCTGGT	
	R: ttcatccttcttgtagcagc	
Bph-M1 (FJ941067)	F: ATGGCGGAGCTAATGGCCACCA	1500
	R: AGAGTTCTTTATATCATGGAACTCA	
Bph-M2(FJ941067)	GATCATGAGATTGACGTGGAAA	1550
Bph-M3(FJ941067)	R: AAGTCACTTAGCTTTGGTG	1035
	F: AGTCGATGGAACTCCAAGGG	
Bph-M4(FJ941067)	R: GATGAGTATGCTTGAGGCCC	921
	F: AATCTTGCTTAGGAGAGCTCGC	
	R: CTACTTCAAGCACATCAGC	
PR1b (U89895)	F: ggcaacttcgtcggacaga	120
	R: ccgtggacctgtttacattttca	
BPH-actin1 (AM931964)	F: accggtatcgtgcttgactc	151
	R: accacgctcagtgaggatct	
CC domain	F: cactgctgtccatggtgaa	243
	R: gtagtgccccttggccttg	
NB domain	F: tgccaagaaatgttctggttc	334
	R: ccttgacaccaactcactgaaa	
LRR-1	F: AAATTCGTGGTTGTTCTGGT	945
	R: ccttgacaccaactcactgaaa	
LRR-2	F: AAATTCGTGGTTGTTCTGGT	945
	R: TCGGTAACGATCCTACAAGG	

3) clone bph14 เข้าสู่ pGEM-T (บ. ดีเคเอสเอช ประเทศไทย) เพื่อใช้เป็น positive control ซึ่งรายละเอียดของลำดับเบส แสดงได้ดังนี้

5′ UTR
TCACAATCCGAGCTTACGTGGTGGAATCGCTATCGCCACCTCTCGGAAGATTATTGTACTTTGCCTTGCC
TACTTCTTGAGTCCGATCAAACACATCCATCATGCATCTGTTTGTACTTGCATTCAGCCAAACACTTCCA
GTTTAACTCCGTCCGCAAGTCAATACTTGCATTCAATTTCCATTTCCTACAAAAGCAGCTGCTCAGACTC
TTGCCTTCTCCACCCAGCAATCGTGTTTCCTTCCCTGTATCCTGCGCGTGTGTTCTTAGCTGCTCTAGGG
GATCCTTCCA
ATGGCGGAGCTAATGGCCACCATGGTGGTCGGGCCACTGCTGTCCATGGTGAAGGACAAGGCCTCCAGCT
ACCTCCTGGAGCAGTACAAGGTGATGGAGGGCATGGAGGAGCAGCACGAGATCCTCAAACGCAAGCTGCC

AGCCATCCTCGACGTCATCGCCGACGCCGAGGAGCAGGCGGCTAAACACAGGGAAGGGGTGAAAGCATGG
CTCGAGGCGCTCCGGAAGGTGGCCTACCAGGCCAATGACGTCTTCGACGAGTTCAAGTACGAGGCACTCC
GCCGCAAGGCCAAGGGGCACTACAAGATGCTCAGCAGCATGGTTGTAATCAAGCTCATTCCTACTCACAA
CCGTATTCTGTTCAGTTATAGGATGGGCAACAAGCTCAGGATGATTCTGAATGCCATTGAAGTTCTAATT
GAAGAGATGAATGCCTTTAGGTTTAAATTCCGACCAGAGCCACCAATGTCGTCCATGAAATGGAGGAAGA
CAGATTCTAAAATCTCCGACCTTTCTTTGGACATTGCCAACAACTCAAGAAAGGAAGATAAACAGGAGAT
TGTCAGCAGATTGCTTGTTCCAGCCAGCGAAGGGGATCTCACTGTTCTTCCCATTGTAGGAATGGGGGGG
ATGGGCAAGACCACCTTAGCGCAGCTCATTTACAATGACCCTGACATTCAGAAGCATTTCCAGTTGCTGC
TCTGGGTGTGTGTTTCCGACAACTTCGATGTGGATTTGCTGGCTAAAAGCATAGTTGAAGCAGCTCGCAA
ACAGAAGAATGATAACAGTGGAAGTACTAACAAGTCACCATTGGATGAACTTAAAGAAGTTGTGAGTGGG
CAGAGGTACCTCCTCGTTTTGGATGATGTCTGGAACCGTGATGCTCGTAAGTGGGAAGCGCTCAAGTCCT
ACCTTCAGCACGGTGGCAGCGGTAGCTCAGTTTTGACAACAACTCGTGATCAAGAAGTGGCTCAAGTGAT
GGCTCCAGCTCAAAAACCTTATGATCTCAAGAGACTGAAGGAAAGCTTCATAGAGGAAATTATCAGGACA
AGTGCTTTCAGTTCACAACAAGAAAGGCCTCCTGAGCTTCTCAAAATGGTTGGTGATATTGCCAAGAAAT
GTTCTGGTTCCCCTTTAGCTGCAACAGCATTGGGCTCTACACTGCGTACGAAGACCACCAAGAAAGAATG
GGAGGCTATATTAAGCAGAAGCACAATTTGCGATGAGGAAAATGGAATTTTACCAATACTCAAGCTCAGT
TACAATTGCTTGCCATCATATATGCGGCAATGCTTTTCCTTTTGTGCAATTTTCCCCAAGGATCATGAGA
TTGACGTGGAAATGCTGATCCAGTTATGGATGGCCAATGGTTTTATCCCAGAGCAACAAGGAGAGTGCCC
TGAAATCATTGGTAAAAGAATTTTCAGTCAGTTGGTGTCAAGGTCATTTTTTCAGGATGCGAAAGGGATC
CCGTTTGAGTTCCATGATATAAAGAACTCTAAGATTACTTGTAAGATCCATGACCTTATGCATGATGTTG
CACAATCCTCCATGGGAAAAGAATGCGCTGCTATAGATACAGAAGTTAGTAAAAGTGAGGATTTTCCTTA
TTCTGCTCGCCATCTATTTTTGTCAGGTGATAGACCAGAAGCTATTCGGACTCCTTCCCCAGAGAAAGGA
TATCCAGGTATCCAAACATTAATATGTTCACGTTTCAAATATTTGCAGAATGTATCAAAATACAGGTCAT
TGCGAGTATTAACAACGATGTGGGAAGGTTCATTCCTGATACCAAAATATCATCATCACCTGAGGTATCT
TGATCTCTCAGAAAGTGAAATTAAAGCACTTCCTGAAGACATAAGCATCCTATATCATTTGCAAACATTG
AACCTTTCCCGTTGTTTATCTCTCCGTCGACTTCCAAAGGGAATGAAGTACATGACCGCCCTCCGTCACT
TGTACACTCACGGATGTTGGAGTTTAGGAAGCATGCCTCCTGACCTCGGACACCTCACTTGCCTACAGAC
GCTTACATGCTTTGTAGCCGGTACTTGCTCTGGCTGCAGTGATTTGGGAGAGCTGCGGCAGTTGGACCTT
GGTGGTCGACTAGAGCTAAGAAAACTGGAAAATGTGACAAAAGCTGATGCAAAAGCAGCAAATCTCGGAA
AGAAGGAAAAACTGACCAAATTGACCTTAATATGGACTGATCAGGAGTACAAGGAGGCACAGAGTAATAA
TCATAAAGAGGTGCTGGAAGGTCTCACGCCTCACGAGGGGCTCAAGGTTCTGAGTATATATCACTGTGGG
AGCAGTACATGTCCAACTTGGATGAATAAACTGCGGGACATGGTGGGGCTTGAGTTAAATGGTTGCAAAA
ATCTCGAGAAGCTTCCTCCGTTGTGGCAGCTACCGGCTCTACAAGTTCTTTGCCTGGAAGGACTGGGTAG
TTTAAATTGCTTGTTCAACTGTGACACACACACACCCTTCACATTTTGCAGACTGAAGGAGCTAACCTTG
TCTGATATGACAAATTTTGAGACATGGTGGGACACAAATGAGGTACAAGGAGAAGAGCTGATGTTTCCTG
AGGTTGAAAAGCTGTCAATCGAAAGTTGCCATAGGCTAACTGCCTTGCCAAAAGCATCAAATGCGATTTC
AGAATCGTCCGGCGAAGTTAGCACCGTGTGTCGTTCTGCATTTCCAGCATTGAAGGAAATGAAATTATAT
GATTTGCGTATCTTTCAGAAATGGGAGGCAGTCGATGGAACTCCAAGGGAGGAGGCAACATTTCCTCAGC
TTGACAAATTAGAAATCAGACAGTGCCCAGAGCTGACTACTCTACCTGAAGCACCAAAGCTAAGTGACTT
AGAGATATCTAAAGGCAATCAACAAATATCCCTACAGGCAGCCAGCAGACATATTACTTCATTGTCCAGT
CTCGTTCTGCATTTGTCCACTGATGACACAGAAACAGCATCGGTGGCCAAGCAACAAGATTCGAGTGATT
TGGTGATTGAGGATGAGAAATGGAGTCATAAATCTCCCCTGGAACTTATGGTCTTGAGTCGGTGCAACCT
TTTATTCTCTCACCCAAGTGCACTGGCTCTGTGGACATGTTTTGCTCAGCTCCTAGATCTGAAAATTCGG
TATGTTGATGCGCTTGTCAGCTGGCCAGAAGAGGTGTTCCAGGGCTTAGTTTCCTTGAGGAAGTTAGAGA
TTTCTGTATGCGAGAATCTGACAGGACACACACAAGCTCGTGGGCAATCTACACCCGCACCAAGTGAACT
CCTGCCACGTTTGGAGTCCCTAGAGATAACGTGTTGTGATTCTATTGTGGAGGTCCCCAATCTACCGGCG
TCTCTCAAGCTATTAGAAATTAGGGGGTGCCCCGGCCTGGAGTCCATCGTATTCAATCAGCAGCAGGATA
GGACGATGTTGGTGAGTGCAGAAAGCTTTGCAGAGCAGGATAAGTCATCGTTAATATCAGGGTCCACAAG
CGAGACCAACGATCACGTCCTTCCACGCCTAGAATCTCTTGTAATAAATTGGTGCGATCGTTTGGAGGTT
CTCCATCTTCCTCCGTCCATCAAGAAATTGGGTATTTATAGCTGTGAAAAACTTCGGTCCCTCTCAGTAA

AGCTGGATGCCGTTCGAGAATTAAGTATCAGACATTGCGGGAGCTTGAAATCACTGGAATCTTGCTTAGG
AGAGCTCGCGTCGCTGCAACAACTCAAACTTTTTGATTGCAAGAGCCTGGAATCCTTGCCGAAGGGGCCT
CAAGCATACTCATCTCTTACATCTCTTGAAATTCGTGGTTGTTCTGGTATAAAGGTGCTTCCACCGAGCC
TACAGCAACGTCTGGATGACATCGAGGACAAAGAACTAGATGCCTGCTATGAAGAGGCAGAAGCAGAACC
AAAGTCTCGTCATCGTCAATCTGCAATCAGTAGGCTGATGTGCTTGAAGTAG
CAGTTTCA
GGACCAGATGAGAGTTGTCATCATGGATCGTTACCGAATCTGCAATTGTTGGGTTATTAATTGTGTGGTT
GTATCTCATGGTAGAATGTATTACCTACCTACCCTTTCTCAAGATAAACTCCAGTAAAGTCGATCGTCTG
GTTGGTGTGAGCTGCTACAAGAAGGATGAAGCCGATGATCCCAAGGCCTTGACTTTAAGCTAGTCCCAGG
TTGTAAGCTGAAGAACAACATACTGGAGCTTAAACTGCTTCACTCTTTTTTTATCCTTTTCCTTTTCTTG
TGAACTGTGATGTGTTTGATCTCGTTCATGCTCCATCATAAGAGAATCACAGCTAGCACTTCCATTTCAA
TGATGTTTTTCCTAACATGACATGACTGCAGAGGATACTTGTGATTGATCAACAACATTTTGCAGCAACG
TTCTCTCCCGATAACGCTGCAATGGAATTGATCAATTGGTGTTCCTACTTATTGGAATGAATTTCCCATT
GTGGAATAAAATGGAAAGATTGGTACAATCTGCTGAAAAATGAACTGTCGTTACTCAAGTTGAAACATGT
GTCATGTGTGTAACTATCAGAATTGTTCTCGACAAAATCGTTGGGACTTGCAAGGTAAAAAAAAAAAATT
CCTCAGCTCTGTAAATGCTATTGCTGAACTAAAGTTCAGAAAGCTATAGTGCCGAAAGATCTCAGATGGC
CTACTGCAACAAAATTCAGTACAAATGCAAAACAATGTAACATTACGTGGCCCAGCCCATCATGGTAAGC
CCATACTGTATGCGCTGC

3′ UTR

CC-F	CACTGCTGTCCATGGTGAA	5′ cactgctgtccatggtgaa
CC-R	CAAGGCCAAGGGGCACTAC	5′ gtagtgccccttggccttg
NB-F	TGCCAAGAAATGTTCTGGTTCC	5′ tgccaagaaatgttctggttc
NB-R	TTTCAGTGAGTTGGTGTCAAGG	5′ ccttgacaccaactcactgaaa
LRR2-F	*AAATTCGTGGTTGTTCTGGT*	*5′ aaattcgtggttgttctggt*
LRR3-R	GCTGCTACAAGAAGGATGAA	5′ tcggtaacgatcctacaagg
Bph14-R	GATCGTTACCGA	5′ ttcatccttcttgtagcagc

Intron Exon

3.4 การทำ PCR (PCR reaction)

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากข้าวแต่ละสายพันธุ์ (ข้อ 1) มาทำการทดสอบด้วยไพร์เมอร์ทั้ง 12 คู่ (ตารางที่ 3.1) มาทำการเพิ่มชิ้นส่วนขนาดของดีเอ็นเอโดยมีขั้นตอนดังนี้

1) เตรียม PCR reaction ซึ่งประกอบด้วย primer dNTP 2μM, 10×ViA buffer, $MgCl_2$1.5mM, และ *Tag* polymerase

2) เติม 10mM primer forward ปริมาตร 1μl, 10mM primer reverse ปริมาตร 1μl, 50ng/μlDNA ปริมาตร 1μl จากนั้นกลับหลอดไปมาให้สารผสมเข้ากัน

3) นำ PCR reaction ไปเข้าเครื่อง PCR โดยภายใต้เงื่อนไข denaturing ที่อุณหภูมิ 92^{0}C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำ 35 รอบ denaturing ที่อุณหภูมิ 92^{0}C นาน 30 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 55^{0}C นาน 30 วินาที, และ extension ที่อุณหภูมิ 72^{0}C เป็นเวลา 60 วินาที สุดท้ายทำขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72^{0}C เป็นเวลา5นาที

เก็บ PCR product ที่ 4°C หรือ -20°C รอนำไปวิเคราะห์ด้วย Gel electrophoresis ต่อไป

3.5 ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี gel electrophoresis (1% agarose gel)

1) เตรียม 1 % (w/v) ของ agarose โดยชั่ง agarose 0.4 กรัมใส่ Flask ขนาด 250 ml แล้วเติม 1x TAE buffer 40 ml ลงไปใน Flask เขย่าให้ agarose กระจายในสารละลาย 1xTAE นำเข้า microwave ที่ความร้อนสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที นำ Flask ออก เขย่าแรงๆ (ระวังสารละลายหก) โดยการเหวี่ยง Flask แนวหนีศูนย์กลาง เพื่อให้ agarose ละลายให้หมด (หากยังละลายไม่หมดให้นำเข้า microwave อีกครั้งใช้ความร้อนสูงสุดเป็นระยะสั้นๆ โดยนำออกมาเขย่าทุกๆ 5-10 วินาที) ทิ้ง Flask ไว้ที่อุณหภูมิห้องจนสารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิต่ำกว่า 65 °C (เขย่าเป็นครั้งคราวเพื่อไม่ให้วุ้นนอนก้น) ระหว่างที่รอวุ้นเย็น ให้เตรียมถาด (Tray) ที่จะทำใช้สำหรับทำการ gel electrophoresis เมื่อวุ้นเย็นลงที่อุณหภูมิต่ำกว่า 55-60 °C เทวุ้นลงไปในถาดที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15-20 นาที รอให้เจลแข็งตัว DNA

2) เติม 6x DNA loading buffer 1 µl ลงใน PCR product 5 µl ขณะเดียวกันเตรียมดีเอ็นเอเครื่องหมายคือ 1kb plus ladder (50ng/µg) 1µl ผสมน้ำ 4 µl แล้วเติม 6x DNA loading buffer 1 µl

3) ทำสารละลายผสมในข้อ 2 หยอดลงเจล (ข้อ1) การหยอดให้เรียงลำดับดังนี้ 1 kb plus ladder หยอดที่หลุมแรก แล้วตามด้วยผลผลิต PCR ตามลำดับ จากนั้นเปิด power supply โดยตั้งกระแสไฟฟ้าที่ 100 Volts ใช้เวลาในการ run gun gel 40-60 นาที ครบเวลาให้ปิด power supply เปิดฝา chamber นำเจลไปย้อมในสารละลาย 1xTAE ผสมเอธิเดียมโบรไมด์ และทำการตรวจสอบแถบ DNA ในเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel electrophoresis) จากนั้นตัดเจลบริเวณแถบ DNA ที่สนใจบนเครื่อง UV transluminator

3.6 การวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอบนแผ่นเจล

นำภาพมาทำการวิเคราะห์ดูความเหมือนแล้วความต่างของแถบ PCR product ที่ปรากฏบนแผ่นเจลล แล้วบันทึกข้อมูล

3.7 สถานที่ทำการทดลอง

1) ห้องปฏิบัติการ และโรงเรือนปลูกพืชทดลอง ของภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

2) ห้องปฏิบัติการ ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

3.8 ระยะเวลาทำการวิจัย

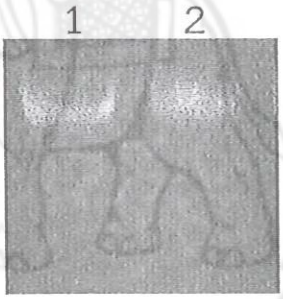
ตั้งแต่ 1 มกราคม 2556 - 30 กันยายน 2557 รวมทั้งสิ้น 19 เดือน

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างข้าว

เพื่อตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างข้าว ทำการทดลองโดยส่นำใบอ่อนของต้นกล้าข้าว (สุ่มพันธุ์ *oryza officinalis* และ Taichung Native1) มาทำการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) (ดูวิธีการทดลองที่ 3.1) จากนั้นนำดีเอ็นเอ (1 µl) มาตรวจสอบคุณภาพโดยวิธี 1.2% agarose gel electrophoresis ผลการทดลอง พบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้คมชัด ไม่มีรอยเปื้อน (ภาพที่ 4.1) ซึ่งบ่งชี้ว่าดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดีและปริมาณสูง สามารถนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนการ polymerase chain reaction (PCR)



ภาพที่ 4.1 การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดจากใบอ่อนข้าวสายพันธุ์ *oryza officinalis* (lane 1) และ Taichung Native1 (lane 2) บน 1.2% agarose gel electrophoresis

4.2 การโคลนและการออกแบบไพร์เมอร์ของ bph14 เพื่อใช้ในปฏิกิริยา PCR

นำข้อมูลลำดับเบสของยีน *bph14* (accession number : *Os03g0848700* หรือ FJ941067) จาก GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) แล้วทำการออกแบบ specific primers ที่มีความจำเพาะสำหรับการตรวจสอบ *bph14* โดยใช้โปรแกรม Primer3 and BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) (ภาพที่ 4.2) ผลการออกแบบไพร์เมอร์ทำให้ทราบตำแหน่งของคู่ไพร์เมอร์และสามารถบอกขนาดของ PCR product จากคู่ไพร์เมอร์ต่างๆ คือ primer-CC, NB,

LRR, และ bph14 ให้ PCR product ขนาด 243, 334, 945 และ 145 bp ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังได้นำลำดับเบสดังกล่าวโคลนเข้าไปใน pGEM-T vector เพื่อใช้เป็น positive control ในการทดลองตอนต่อไป

5′ UTR

TCACAATCCGAGCTTACGTGGTGGAATCGCTATCGCCACCTCTCGGAAGATTATTGTACTTTGCCTTGCC
TACTTCTTGAGTCCGATCAAACACATCCATCATGCATCTGTTTGTACTTGCATTCAGCCAAACACTTCCA
GTTTAACTCCGTCCGCAAGTCAATACTTGCATTCAATTTCCATTTCCTACAAAAGCAGCTGCTCAGACTC
TTGCCTTCTCCACCCAGCAATCGTGTTTCCTTCCCTGTATCCTGCGCGTGTGTTCTTAGCTGCTCTAGGG
GATCCTTCCA
ATGGCGGAGCTAATGGCCACCATGGTGGTCGGGCCACTGCTGTCCATGGTGAAGGACAAGGCCTCCAGCT

ACCTCCTGGAGCAGTACAAGGTGATGGAGGGCATGGAGGAGCAGCACGAGATCCTCAAACGCAAGCTGCC

AGCCATCCTCGACGTCATCGCCGACGCCGAGGAGCAGGCGGCTAAACACAGGGAAGGGGTGAAAGCATGG

CTCGAGGCGCTCCGGAAGGTGGCCTACCAGGCCAATGACGTCTTCGACGAGTTCAAGTACGAGGCACTCC

GCCGCAAGGCCAAGGGGCACTACAAGATGCTCAGCAGCATGGTTGTAATCAAGCTCATTCCTACTCACAA

CCGTATTCTGTTCAGTTATAGGATGGGCAACAAGCTCAGGATGATTCTGAATGCCATTGAAGTTCTAATT

GAAGAGATGAATGCCTTTAGGTTTAAATTCCGACCAGAGCCACCAATGTCGTCCATGAAATGGAGGAAGA

CAGATTCTAAAATCTCCGACCTTTCTTTGGACATTGCCAACAACTCAAGAAAGGAAGATAAACAGGAGAT

TGTCAGCAGATTGCTTGTTCCAGCCAGCGAAGGGGATCTCACTGTTCTTCCCATTGTAGGAATGGGGGGG

ATGGGCAAGACCACCTTAGCGCAGCTCATTTACAATGACCCTGACATTCAGAAGCATTTCCAGTTGCTGC

TCTGGGTGTGTGTTTCCGACAACTTCGATGTGGATTTGCTGGCTAAAAGCATAGTTGAAGCAGCTCGCAA

ACAGAAGAATGATAACAGTGGAAGTACTAACAAGTCACCATTGGATGAACTTAAAGAAGTTGTGAGTGGG

CAGAGGTACCTCCTCGTTTTGGATGATGTCTGGAACCGTGATGCTCGTAAGTGGGAAGCGCTCAAGTCCT

ACCTTCAGCACGGTGGCAGCGGTAGCTCAGTTTTGACAACAACTCGTGATCAAGAAGTGGCTCAAGTGAT

GGCTCCAGCTCAAAAACCTTATGATCTCAAGAGACTGAAGGAAAGCTTCATAGAGGAAATTATCAGGACA

AGTGCTTTCAGTTCACAACAAGAAAGGCCTCCTGAGCTTCTCAAAATGGTTGGTGATATTGCCAAGAAAT

GTTCTGGTTCCCCTTTAGCTGCAACAGCATTGGGCTCTACACTGCGTACGAAGACCACCAAGAAAGAATG

GGAGGCTATATTAAGCAGAAGCACAATTTGCGATGAGGAAAATGGAATTTTACCAATACTCAAGCTCAGT

TACAATTGCTTGCCATCATATATGCGGCAATGCTTTTCCTTTTGTGCAATTTTCCCCAAGGATCATGAGA

TTGACGTGGAAATGCTGATCCAGTTATGGATGGCCAATGGTTTTATCCCAGAGCAACAAGGAGAGTGCCC

TGAAATCATTGGTAAAAGAATTTTCAGTGAGTTGGTGTCAAGGTCATTTTTTCAGGATGCGAAAGGGATC

CCGTTTGAGTTCCATGATATAAAGAACTCTAAGATTACTTGTAAGATCCATGACCTTATGCATGATGTTG

CACAATCCTCCATGGGAAAAGAATGCGCTGCTATAGATACAGAAGTTAGTAAAAGTGAGGATTTTCCTTA

TTCTGCTCGCCATCTATTTTTGTCAGGTGATAGACCAGAAGCTATTCGGACTCCTTCCCCAGAGAAAGGA

TATCCAGGTATCCAAACATTAATATGTTCACGTTTCAAATATTTGCAGAATGTATCAAAATACAGGTCAT

TGCGAGTATTAACAACGATGTGGGAAGGTTCATTCCTGATACCAAAATATCATCATCACCTGAGGTATCT

TGATCTCTCAGAAAGTGAAATTAAAGCACTTCCTGAAGACATAAGCATCCTATATCATTTGCAAACATTG

AACCTTTCCCGTTGTTTATCTCTCCGTCGACTTCCAAAGGGAATGAAGTACATGACCGCCCTCCGTCACT

TGTACACTCACGGATGTTGGAGTTTAGGAAGCATGCCTCCTGACCTCGGACACCTCACTTGCCTACAGAC

GCTTACATGCTTTGTAGCCGGTACTTGCTCTGGCTGCAGTGATTTGGGAGAGCTGCGGCAGTTGGACCTT

GGTGGTCGACTAGAGCTAAGAAAACTGGAAAATGTGACAAAAGCTGATGCAAAAGCAGCAAATCTCGGAA

AGAAGGAAAAACTGACCAAATTGACCTTAATATGGACTGATCAGGAGTACAAGGAGGCACAGAGTAATAA

TCATAAAGAGGTGCTGGAAGGTCTCACGCCTCACGAGGGGCTCAAGGTTCTGAGTATATATCACTGTGGG

AGCAGTACATGTCCAACTTGGATGAATAAACTGCGGGACATGGTGGGGCTTGAGTTAAATGGTTGCAAAA

ATCTCGAGAAGCTTCCTCCGTTGTGGCAGCTACCGGCTCTACAAGTTCTTTGCCTGGAAGGACTGGGTAG

TTTAAATTGCTTGTTCAACTGTGACACACACACCCTTCACATTTTGCAGACTGAAGGAGCTAACCTTG

TCTGATATGACAAATTTTGAGACATGGTGGGACACAAATGAGGTACAAGGAGAAGAGCTGATGTTTCCTG

AGGTTGAAAAGCTGTCAATCGAAAGTTGCCATAGGCTAACTGCCTTGCCAAAAGCATCAAATGCGATTTC

AGAATCGTCCGGCGAAGTTAGCACCGTGTGTCGTTCTGCATTTCCAGCATTGAAGGAAATGAAATTATAT

GATTTGCGTATCTTTCAGAAATGGGAGGCAGTCGATGGAACTCCAAGGGAGGAGGCAACATTTCCTCAGC

TTGACAAATTAGAAATCAGACAGTGCCCAGAGCTGACTACTCTACCTGAAGCACCAAAGCTAAGTGACTT

AGAGATATCTAAAGGCAATCAACAAATATCCCTACAGGCAGCCAGCAGACATATTACTTCATTGTCCAGT

CTCGTTCTGCATTTGTCCACTGATGACACAGAAACAGCATCGGTGGCCAAGCAACAAGATTCGAGTGATT

TGGTGATTGAGGATGAGAAATGGAGTCATAAATCTCCCCTGGAACTTATGGTCTTGAGTCGGTGCAACCT

TTTATTCTCTCACCCAAGTGCACTGGCTCTGTGGACATGTTTTGCTCAGCTCCTAGATCTGAAAATTCGG

TATGTTGATGCGCTTGTCAGCTGGCCAGAAGAGGTGTTCCAGGGCTTAGTTTCCTTGAGGAAGTTAGAGA

TTTCTGTATGCGAGAATCTGACAGGACACACACAAGCTCGTGGGCAATCTACACCCGCACCAAGTGAACT

CCTGCCACGTTTGGAGTCCCTAGAGATAACGTGTTGTGATTCTATTGTGGAGGTCCCCAATCTACCGGCG

TCTCTCAAGCTATTAGAAATTAGGGGGTGCCCCGGCCTGGAGTCCATCGTATTCAATCAGCAGCAGGATA

GGACGATGTTGGTGAGTGCAGAAAGCTTTGCAGAGCAGGATAAGTCATCGTTAATATCAGGGTCCACAAG

CGAGACCAACGATCACGTCCTTCCACGCCTAGAATCTCTTGTAATAAATTGGTGCGATCGTTTGGAGGTT

CTCCATCTTCCTCCGTCCATCAAGAAATTGGGTATTTATAGCTGTGAAAAACTTCGGTCCCTCTCAGTAA

AGCTGGATGCCGTTCGAGAATTAAGTATCAGACATTGCGGGAGCTTGAAATCACTGGAATCTTGCTTAGG

AGAGCTCGCGTCGCTGCAACAACTCAAACTTTTTGATTGCAAGAGCCTGGAATCCTTGCCGAAGGGGCCT

CAAGCATACTCATCTCTTACATCTCTTGAAATTCGTGGTTGTTCTGGTATAAAGGTGCTTCCACCGAGCC

TACAGCAACGTCTGGATGACATCGAGGACAAAGAACTAGATGCCTGCTATGAAGAGGCAGAAGCAGAACC

AAAGTCTCGTCATCGTCAATCTGCAATCAGTAGGCTGATGTGCTTGAAGTAG

3′ UTR

CAGTTTCA
GGACCAGATGAGAGTTGTCATCATGGATCGTTACCGAATCTGCAATTGTTGGGTTATTAATTGTGTGGTT
GTATCTCATGGTAGAATGTATTACCTACCTACCCTTTCTCAAGATAAACTCCAGTAAAGTCGATCGTCTG
GTTGGTGTGAGCTGCTACAAGAAGGATGAAGCCGATGATCCCAAGGCCTTGACTTTAAGCTAGTCCCAGG
TTGTAAGCTGAAGAACAACATACTGGAGCTTAAACTGCTTCACTCTTTTTTTATCCTTTTCCTTTTCTTG
TGAACTGTGATGTGTTTGATCTCGTTCATGCTCCATCATAAGAGAATCACAGCTAGCACTTCCATTTCAA
TGATGTTTTTCCTAACATGACATGACTGCAGAGGATACTTGTGATTGATCAACAACATTTTGCAGCAACG
TTCTCTCCCGATAACGCTGCAATGGAATTGATCAATTGGTGTTCCTACTTATTGGAATGAATTTCCCATT
GTGGAATAAAATGGAAAGATTGGTACAATCTGCTGAAAAATGAACTGTCGTTACTCAAGTTGAAACATGT
GTCATGTGTGTAACTATCAGAATTGTTCTCGACAAAATCGTTGGGACTTGCAAGGTAAAAAAAAAAAATT
CCTCAGCTCTGTAAATGCTATTGCTGAACTAAAGTTCAGAAAGCTATAGTGCCGAAAGATCTCAGATGGC
CTACTGCAACAAAATTCAGTACAAATGCAAAACAATGTAACATTACGTGGCCCAGCCCATCATGGTAAGC
CCATACTGTATGCGCTGC

CC-F	CACTGCTGTCCATGGTGAA	5′cactgctgtccatggtgaa
CC-R	CAAGGCCAAGGGGCACTAC	5′gtagtgccccttggccttg
NB-F	TGCCAAGAAATGTTCTGGTTCC	5′tgccaagaaatgttctggttc
NB-R	TTTCAGTGAGTTGGTGTCAAGG	5′ccttgacaccaactcactgaaa
LRR2-F	*AAATTCGTGGTTGTTCTGGT*	*5′aaattcgtggttgttctggt*
LRR3-R	GCTGCTACAAGAAGGATGAA	5′tcggtaacgatcctacaagg
Bph14-R	TCTTCGTAGGATCGTTACCGA	5′ttcatccttcttgtagcagc
	Intron Exon	

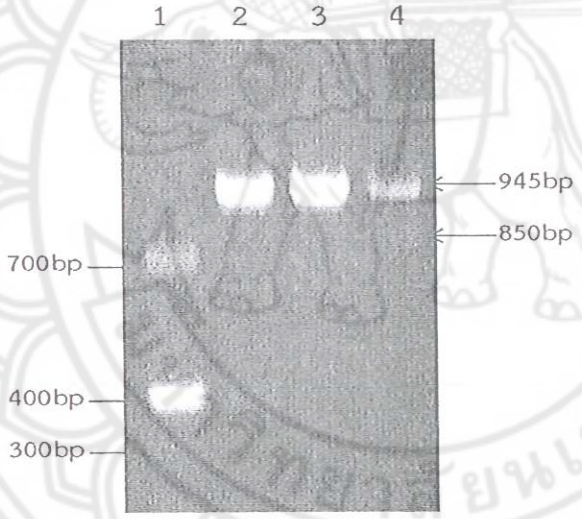
ภาพที่ 4.2 การวิเคราะห์ลำดับเบสของ *bph14* (accession number : *Os03g0848700* หรือ FJ941067) เพื่อใช้สำหรับการออกแบบไพร์เมอร์ CC, NB, LRR, และ bph14

4.3 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับคู่ไพร์เมอร์ LRR โดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

เพื่อทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR (ดูวิธีการทดลอง 3.4) จึงทำการทดลองโดยเปรียบเทียบ Gradient PCR ของ annealing temperature ที่ 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้ตัวอย่างข้าวพันธุ์ Taichung Native1 (TN1) ทำการเตรียมปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลอง (25µl) ซึ่งประกอบด้วย (50ng/µl)gDNA (DNA template) 1µl, 10mM LRR1-forward primer (5'AAATTCGTGGTTGTTCTGGT3') 1µl, 10mM LRR1-reverse primer (5'TCGGTAACGATCCTACAAGG3') 1 µl, Go-*Taq* DNA polymerase 12.5µl, และ Dnase free water 9.5µl จากนั้นนำใส่ในเครื่อง PCR

device โดยใช้สภาวะดังนี้ denature ที่ 92°C นาน 3 นาที จากนั้นทำ 35 รอบของสภาวะ denature ที่ 92°C นาน 30 วินาที, annealing ที่ 45, 50, 55 หรือ 60°C นาน 20 วินาที, extension ที่ 72°C นาน 60 วินาที ขั้นตอนสุดท้ายใช้ final extension ที่ 42°C นาน 5 นาที

นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพโดยวิธี gel electrophoresis (ดูวิธีการทดลอง 3.5) ผลการการทดลองพบว่า annealing temperature ที่ 50, และ 55 เหมาะสมสำหรับการเกิด PCR product ขนาด 945bp ในตัวอย่างใบข้าวพันธุ์ Taichung Native1 (TN1) ขณะที่ annealing temperature ที่ 45, หรือ 60°C ปรากฏแถบที่ไม่ไม่มีความจำเพาะ ในตัวอย่างข้าวพันธุ์ TN1 คือมีแถบดีเอ็นเอ ขนาด 945bp และ 800bp (ภาพที่ 4.3) ผลการทดลองบ่งชี้ว่า annealing temperature ที่ 45 หรือ 60°C อาจทำให้เกิด polymorphic DNA bands ได้สูง ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถหา *bph14* homology



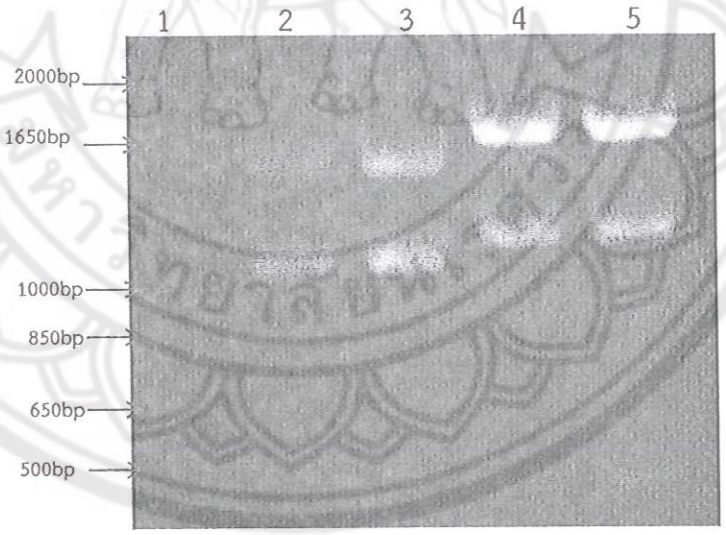
ภาพที่ 4.3 การทดสอบ primer LRR ด้วยสภาวะ annealing temperature ที่ 45, 50, 55 และ 60°C ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มชิ้นส่วนที่เอ็นเอของตัวอย่างข้าวพันธุ์ Taichung Native1 (TN1) โดยใช้วิธี Gradient PCR

Lane 1-4 represent PCR products, amplified from genomic DNA of Taichung Native1 using different annealing temperatures at 45, 50, 55 and 60°C repectively.

4.4 การทดสอบ primer LRR กับตัวอย่างข้าว *Oryza officinalis* และ Taichung Native1 (TN1) ด้วยวิธี PCR โดยใช้ annealing temperature ที่ 45 องศาเซลเซียส

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.3 แตกต่างกันโดยในปฏิกิริยา PCR ใช้ annealing temperature ที่ 45°C และใช้ข้าว 2 สายพันธุ์คือ Taichung Native1 (TN1) และ *Oryza officinalis*

ผลการทดลองพบว่า annealing temperature 45 องศาเซลเซียส ของข้าวพันธุ์ Taichung Native1 (TN1) ปรากฏแถบของ PCR Product มีขนาดประมาณ 750, 1100 และ1500 bp และข้าวพันธุ์ *Oryza officinalis* ปรากฏแถบของ PCR Product มีขนาดประมาณ 500, 940, 1200 และ1650 bp ดังนั้น PCR Product ที่ได้จากข้าวพันธุ์ *Oryza officinalis* ที่มีขนาดประมาณ 940 bp จึงมีความใกล้เคียงกับขนาดของยีน *bph14* -LRR ซึ่งมีขนาด 945 bp (ภาพที่ 4.4) ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่า *Bph14* –LRR อาจมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ซึ่งควรทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันระหว่างข้าวสองสายพันธุ์จากนั้นทำการวิเคราะห์กับ *bph14* (accession number : *Os03g0848700* หรือ FJ941067)



ภาพที่ 4.4 การทดสอบ Primer LRR สำหรับยีน *Bph14* – LRR ที่ annealing temperature 45 องศาเซลเซียส Lane 1: Marker 1kb plus ladder

Lane 2-3: Taichung Native1 (TN1)

Lane 4-5: *Oryza officinalis*

4.5 : การทดสอบ Primer CC และ Primer NB สำหรับยีน *Bph14* – NB และ *Bph14* – CC ของตัวอย่างใบข้าวพันธุ์ *Oryza officinalis* และ Taichung Native1 (TN1) โดยวิธี Gradient PCR

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.3 (ใช้ Gradient PCR ของ annealing temperature ที่ 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส) แตกต่างกันตรงที่ใช้ตัวอย่างข้าว 2 สายพันธุ์ *Oryza officinalis* และ Taichung Native1 (TN1) และใช้ Primer สำหรับยีน *Bph14*–CC และ *Bph14*–NB ซึ่งลำดับเบส Primer CC-F (5'CACTGCTGTCCATGGTGAA3'), Primer CC-R (5'GTAGTGCCCCTTGGCCTTG3') และ Primer NB-F (5'TGCCAAGAAATGTTCTGGTTC3'), Primer NB-R (5'CCTTTGACACCAACTCACTGAAA3')

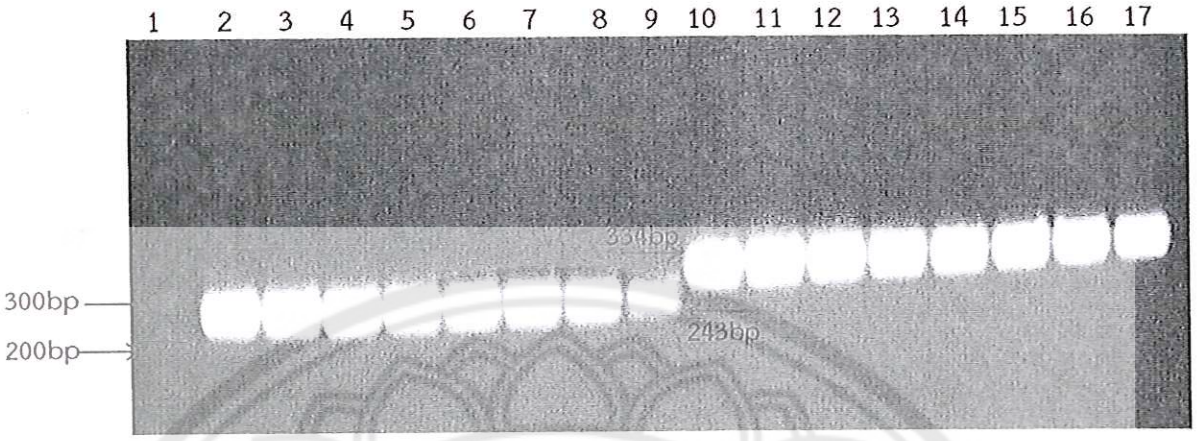
พบว่า ในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ annealing temperature 45, 50, 55 และ60 องศาเซลเซียส ร่วมกับ *Bph14*–CC ในข้าวพันธุ์ *Oryza officinalis* และ Taichung Native1 (TN1) ให้ PCR product เพียงขนาด คือ 243 bp (ภาพที่ 4.5)

ในทำนองเดียวกัน ในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ annealing temperature 45, 50, 55 และ60 องศาเซลเซียส ร่วมกับ *Bph14*–NB ในข้าวพันธุ์ *Oryza officinalis* และ Taichung Native1 (TN1) ให้ PCR product เพียงขนาด คือ 334 bp (ภาพที่ 4.5)

4.6 การทดสอบ Primer CC สำหรับยีน *Bph14*-CC ที่ annealing temperature 45 องศาเซลเซียส ในข้าวปลูก

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.5 โดยเลือกใช้ annealing temperature ที่ 45 องศาเซลเซียส) สำหรับ Primer CC เพื่อทำการตรวจสอบยีน *Bph14*–CC ในตัวอย่างข้าว 11 สายพันธุ์ ได้แก่ *Oryza officinalis*, Taichung Native1 (TN1), และข้าวปลูก 9 สายพันธุ์ ได้แก่ สุพรรณบุรี90, กข31, กข21, สุพรรณบุรี 60, กข23, พิษณุโลก2, หอมพิษณุโลก2, ชัยนาท2 และชัยนาท1

ผลการทดลองพบว่า annealing temperature 45 องศาเซลเซียส ของข้าวทั้ง 11 พันธุ์ ปรากฏแถบของ PCR Product มีขนาดประมาณ 243 bp (ภาพที่ 4.6) นั่นแสดงว่าข้าวทุกพันธุ์มียีน *Bph14*–CC



ภาพที่ 4.5 การทดสอบ Primer CC และ Primer NB สำหรับยีน *Bph14*-CC และ *Bph14*-NB โดยวิธี temperature gradient PCR

Lane 1: Marker (1kb plus ladder)

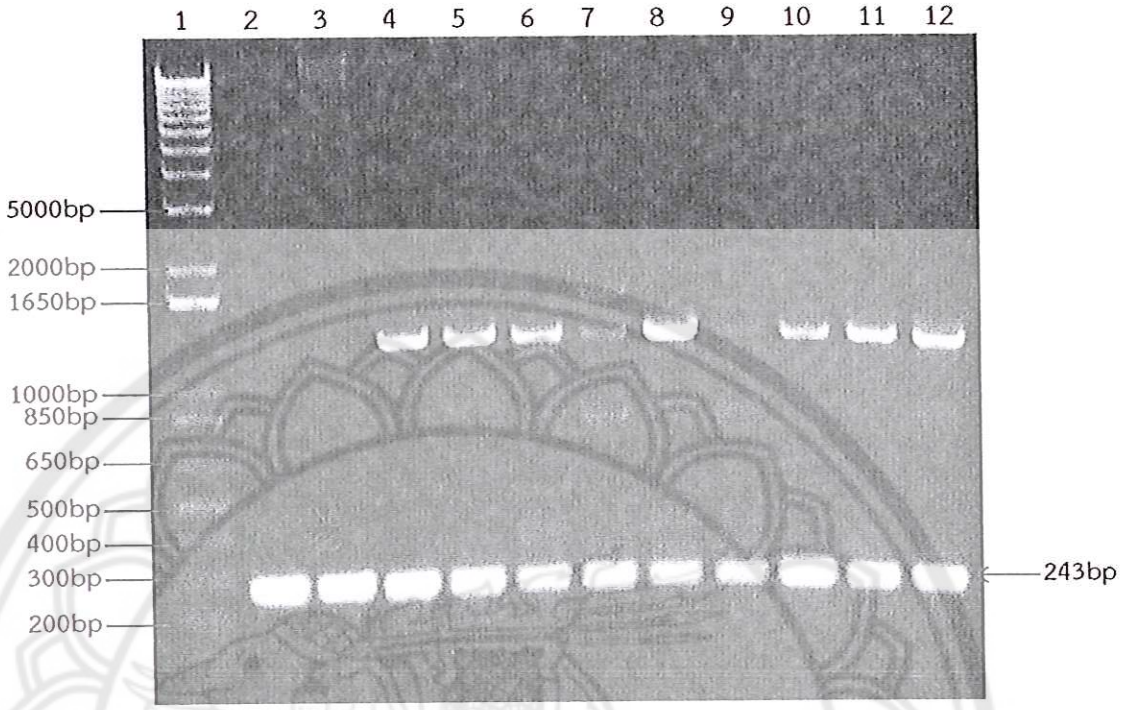
Lane 2-5: Primer CC ข้าวพันธุ์ *Oryza officinalis* ที่อุณหภูมิ 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Lane 6-9: Primer CC ข้าวพันธุ์ Taichung Native1 (TN1) ที่อุณหภูมิ 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Lane 10-13: Primer NB ข้าวพันธุ์ *Oryza officinalis* ที่อุณหภูมิ 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Lane 14-17: Primer NB ข้าวพันธุ์ Taichung Native1 (TN1) ที่อุณหภูมิ 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบว่า ในข้าวปลูกพันธุ์ สุพรรณบุรี90, กข31, กข21, สุพรรณบุรี60, กข23, พิษณุโลก2, หอมพิษณุโลก2, ชัยนาท2 และชัยนาท1 ยังปรากฏแถบของ PCR Product มีขนาดประมาณ 1400 bp (ภาพที่ 4.6) ส่วนข้าวพันธุ์ Taichung Native1 (TN1) ปรากฏแถบของ PCR Product มีขนาดประมาณ 400, และ 450 bp ที่แตกต่างจากข้าวพันธุ์อื่น (ภาพที่ 4.6) และข้าวพันธุ์ กข21 ปรากฏแถบของ PCR Product มีขนาดประมาณ 400, 700 และ1400 bp ที่แตกต่างจากข้าวพันธุ์อื่น (ภาพที่ 4.6) นี่แสดงให้เห็นว่าข้าวแต่ละพันธุ์มีความหลากหลายของจำนวนชุดของ *Bph14*-CC บนตำแหน่งต่างๆ ของดีเอ็นเอ



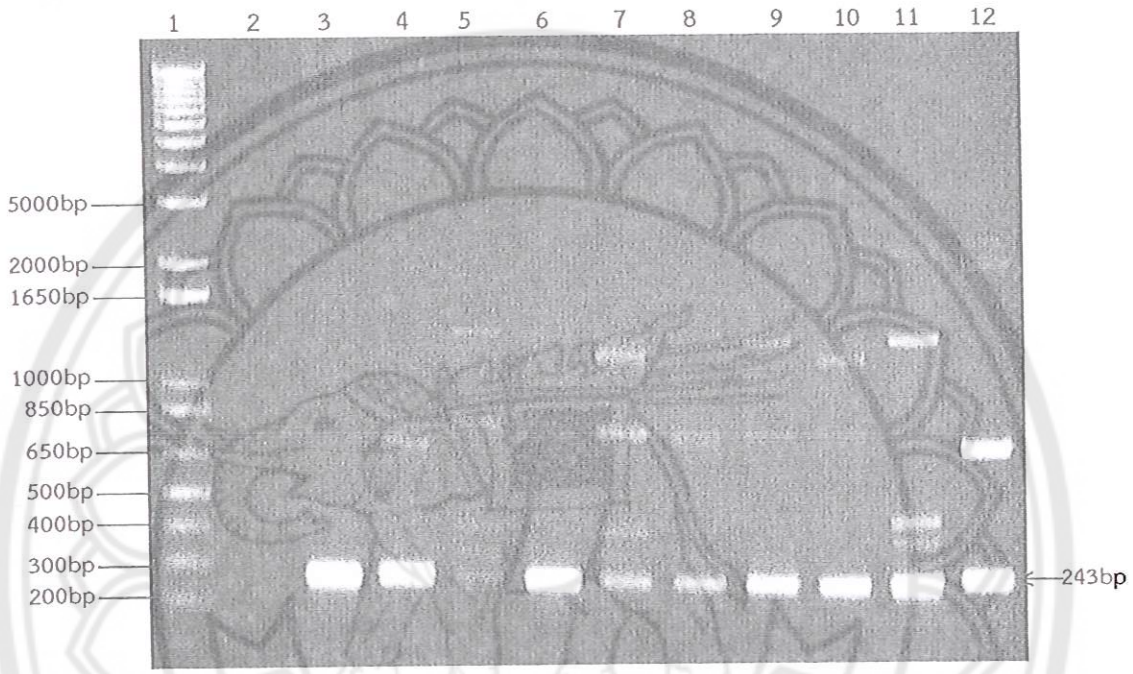
ภาพที่ 4.6 การทดสอบ Primer cc สำหรับยีน *Bph14*-cc ที่ annealing temperature 45 องศาเซลเซียส กับข้าวจำนวน 11 สายพันธุ์ ได้แก่ Taichung Native (lane2), *Oryza officianlis* (lane3), สุพรรณบุรี 90 (lane4), กข 31 (lane5), กข 21 (lane6), สุพรรณบุรี 60 (lane7), กข 23 (lane8), พิษณุโลก 2 (lane9), หอมพิษณุโลก 2 (lane10), ชัยนาท 2 (lane11), และ ชัยนาท 1 (lane12) ส่วน Lane 1 คือ Marker 1 kb plus ladder

4.7 การทดสอบ Primer cc สำหรับยีน *Bph14*-cc ในข้าวป่า

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.6 โดยเลือกใช้ annealing temperature ที่ 45 องศาเซลเซียส) สำหรับ Primer CC เพื่อทำการตรวจสอบยีน *Bph14*-CC ในตัวอย่างข้าว 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Oryza officinalis*, Taichung Native1 (TN1), *O. rufipogon* GS.NO.18887, *O. nivara* GS.NO.18855, *O. nivara* GS.NO.16190, *O. rufipogon* GS.NO. 16184, *O. rufipogon* GS.NO. 15157, *O. officinalis* GS.NO.18859, *O. nivara* GS.NO.18847 และ *O. nivara* GS.NO.18854

ผลการทดลองพบว่า annealing temperature 45 องศาเซลเซียส ของข้าวทั้ง 10 พันธุ์ ปรากฏแถบของ PCR Product มีขนาดประมาณ 243 bp (ภาพที่ 4.7) นั่นแสดงว่าข้าวทุกพันธุ์มียีน *Bph14*-CC

นอกจากนี้ยังพบว่า ในข้าวป่ามีความหลากหลายของจำนวนชุดของ *Bph14*-CC บนตำแหน่งต่างๆ ของดีเอ็นเอ โดยผลการวิเคราะห์ PCR products พบว่า มีขนาดของดีเอ็นเอ ตั้งแต่ 243-1900 bp (ภาพที่ 4.7) ซึ่งควรนำ PCR products มาทำการวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อหา *Bph14*-CC homolog ต่อไป

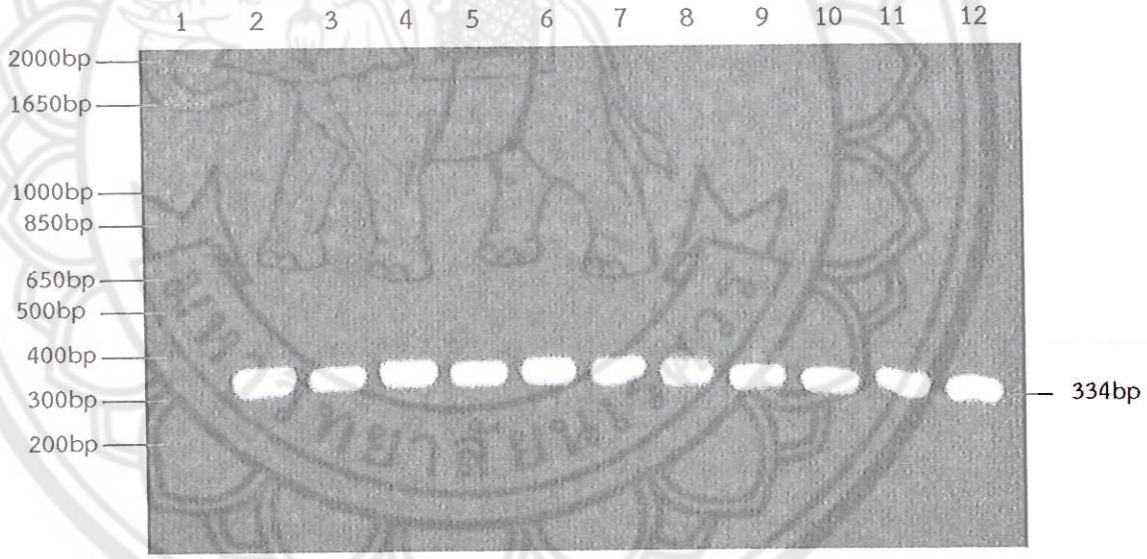


ภาพที่ 4.7 การทดสอบ Primer สำหรับยีน *Bph14*-cc ที่ annealing temperature 45 องศาเซลเซียส กับข้าวจำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ Taichung Native1 (lane3), *Oryza officianlis* (lane4), *O. rufipogon* GS.NO.18887 (lane5), *O. nivara* GS.NO.18855 (lane6), *O. nivara* GS.NO.16190 (lane7), *O. rufipogon* GS.NO.16184 (lane8), *O. rufipogon* GS.NO.15157 (lane9), *O. officinalis* GS.NO.18859 (lane10), *O. nivara* GS.NO.18847 (lane11), และ *O. nivara* GS.NO.18854 (lane12), ส่วน lane 1 คือ Marker 1 kb plus ladder และ lane2 คือ negative control

4.8 การทดสอบ Primer NB สำหรับยีน *Bph14*-NB ที่ annealing temperature 45 องศาเซลเซียส ของตัวอย่างใบข้าวปลูก

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.5 **โดยเลือกใช้** annealing temperature **ที่** 45 **องศา** เซลเซียส) แต่เปลี่ยนเป็นใช้ Primer NB เพื่อทำการตรวจสอบยีน *Bph14*-NB ในตัวอย่างข้าว 11 สายพันธุ์ **ได้แก่** *Oryza officinalis*, Taichung Native1 (TN1), และข้าวปลูก 9 สายพันธุ์ ได้แก่ สุพรรณบุรี90, กข31, **กข21,** สุพรรณบุรี60, กข23, พิษณุโลก2, หอมพิษณุโลก2, ชัยนาท2 และชัยนาท1

ผลการทดลองพบว่า annealing temperature 45 องศาเซลเซียส ของข้าวปลูกทั้ง 11 พันธุ์ ปรา**กฏแถบ** ของ PCR Product มีเพียงขนาดประมาณ 334bp (ภาพที่ 4.8) นั่นแสดงว่าข้าวทุกพันธุ์มียีน *Bph14*-NB **เพียง 1** ชุด บ่งชี้ว่าข้าวปลูกไม่มีความหลากหลายของ domain ในยีน *Bph14*-NB



ภาพที่ 4.8 การทดสอบ Primer nb สำหรับยีน *Bph14*-nb ที่ annealing temperature 45 องศาเซลเซียส กับข้าวจำนวน 11 สายพันธุ์ ได้แก่ Taichung Native (lane2), *Oryza officianlis* (lane3), สุพรรณบุรี 90 (lane4), กข 31 (lane5), กข 21 (lane6), สุพรรณบุรี 60 (lane7), กข 23 (lane8), พิษณุโลก 2 (lane9), หอมพิษณุโลก 2 (lane10), ชัยนาท 2 (lane11), และ ชัยนาท 1 (lane12) ส่วน Lane 1 คือ Marker 1 kb plus ladder

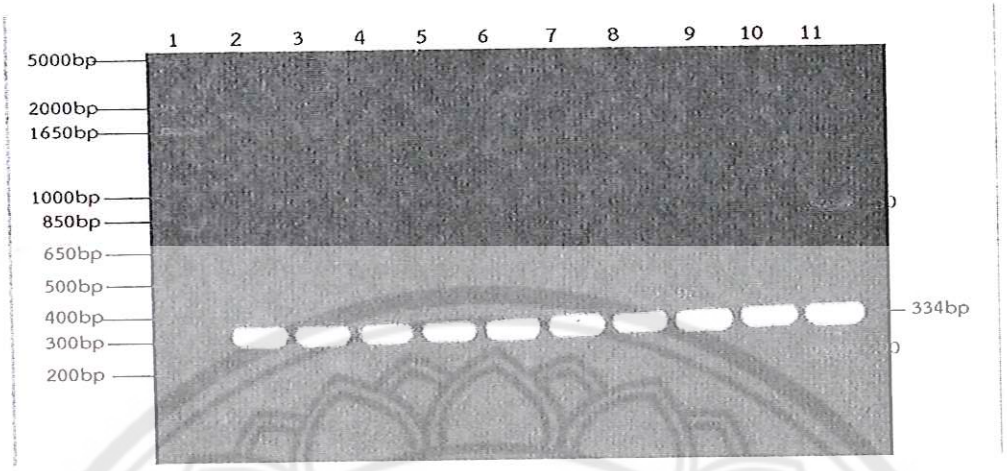
4.9 การทดสอบ Primer nb สำหรับยีน *Bph14*- nb ในข้าวป่า

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.7 โดยเลือกใช้ annealing temperature ที่ 45 องศาเซลเซียส) แต่เปลี่ยนเป็นใช้ Primer NB เพื่อทำการตรวจสอบยีน *Bph14*–NB ในตัวอย่างข้าว 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Oryza officinalis*, Taichung Native1 (TN1), *O. rufipogon* GS.NO.18887, *O. nivara* GS.NO.18855, *O. nivara* GS.NO.16190, *O. rufipogon* GS.NO. 16184, *O. rufipogon* GS.NO. 15157, *O. officinalis* GS.NO.18859, *O. nivara* GS.NO.18847 และ *O. nivara* GS.NO.18854

ผลการทดลองพบว่า annealing temperature 45 องศาเซลเซียส ของข้าวป่าทั้ง 10 พันธุ์ ปรากฏแถบของ PCR Product มีเพียงขนาดประมาณ 334bp (ภาพที่ 4.9)

นอกจากนี้ยังพบว่า ในข้าวป่ามีความหลากหลายของจำนวนชุดของ *Bph14*–NB บนตำแหน่งต่างๆ ของดีเอ็นเอ โดยผลการวิเคราะห์ PCR products พบว่า PCR products ขนาดประมาณ 200 bp พบในข้าวพันธุ์ *O. nivara* GS.NO.18854 (ภาพที่ 4.9), PCR products ขนาดประมาณ 500 bp พบในข้าวพันธุ์ *O. rufipogon* GS.NO. 15157 (ภาพที่ 4.9), PCR products ขนาดประมาณ 850 bp พบในข้าวพันธุ์ *Oryza officianlis, O. nivara* GS.NO.18855, *O. officinalis* GS.NO.18859, และ *O. nivara* GS.NO.18854 (ภาพที่ 4.9) และ พบ PCR products ขนาดประมาณ 1200 bp พบในข้าวพันธุ์ *O. nivara* GS.NO.18847 (ภาพที่ 4.9) ซึ่งควรนำ PCR products มาทำการวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อหา *Bph14*–NB homolog ต่อไป

สำนักหอสมุด
๑๒ มี.ค. ๒๕๕๘
i.1686953
๑ QH 367 .5 ท๗๙๒๕ ๒๕๕๗



ภาพที่ 4.9 การทดสอบ Primer สำหรับยีน *Bph14*-nb ที่ annealing temperature 45 องศาเซลเซียส กับข้าวจำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ Taichung Native1 (lane2), *Oryza officianlis* (lane3), *O. rufipogon* GS.NO.18887 (lane4), *O. nivara* GS.NO.18855 (lane5), *O. nivara* GS.NO.16190 (lane6), *O. rufipogon* GS.NO.16184 (lane7), *O. rufipogon* GS.NO.15157 (lane8), *O. officinalis* GS.NO.18859 (lane9), *O. nivara* GS.NO.18847 (lane10), และ *O. nivara* GS.NO.18854 (lane11), ส่วน lane 1 คือ Marker 1 kb plus ladder

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. จากการทดสอบ CC-domain ที่เป็นส่วนหนึ่งของ *bph14* ในตัวอย่างข้าว 11 สายพันธุ์ ได้แก่ *Oryza officinalis*, Taichung Native1 (TN1), และข้าวปลูก 9 สายพันธุ์ ได้แก่ สุพรรณบุรี90, กข31, กข21, สุพรรณบุรี 60, กข23, พิษณุโลก2, หอมพิษณุโลก2, ชัยนาท2 และชัยนาท1 พบว่าข้าวทุกสายพันธุ์ประกับด้วยส่วนของ CC-domain เนื่องจาก PCR product ที่ได้จากการใช้ primer *bph14*–CC มีขนาดเท่ากับ 243 bp ซึ่งเป็นขนาดที่พบใน *bph14* ของข้าวพันธุ์ *Oryza officinalis*

นอกจากนี้การทำ PCR โดยใช้ primer *bph14*–CC ยังพบ PCR product ขนาด 400, 450, 700 และ 1400 bp ในข้าวปลูกหลายสายพันธุ์ ทำให้คาดการณ์ได้ว่า CC-domain อาจพบได้ในหลายยีน ที่อยู่บนดีเอ็นเอของข้าวปลูก ดังนั้นควรทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของ PCR product ขนาดต่างๆดังกล่าว เพื่อทำนาย *bph14*–CC homolog

2. จากการทดสอบ CC-domain ที่เป็นส่วนหนึ่งของ *bph14* ในตัวอย่างข้าว 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Oryza officinalis*, Taichung Native1 (TN1), *O. rufipogon* GS.NO.18887, *O. nivara* GS.NO.18855, *O. nivara* GS.NO.16190, *O. rufipogon* GS.NO. 16184, *O. rufipogon* GS.NO. 15157, *O. officinalis* GS.NO.18859, *O. nivara* GS.NO.18847 และ *O. nivara* GS.NO.18854 ผลการวิเคราะห์ PCR products พบว่า มีขนาดของดีเอ็นเอ ตั้งแต่ 243-1900 bp (ภาพที่ 4.7) ซึ่งควรนำ PCR products มาทำการวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อหา *Bph14*–CC homolog ต่อไป

3. จากการทดสอบ NB-domain ที่เป็นส่วนหนึ่งของ *bph14* ในตัวอย่างข้าว 11 สายพันธุ์ ได้แก่ *Oryza officinalis*, Taichung Native1 (TN1), และข้าวปลูก 9 สายพันธุ์ ได้แก่ สุพรรณบุรี90, กข31, กข21, สุพรรณบุรี 60, กข23, พิษณุโลก2, หอมพิษณุโลก2, ชัยนาท2 และชัยนาท1 พบว่าข้าวทุกสายพันธุ์ประกับด้วยส่วนของ NB-domain เนื่องจาก PCR product ที่ได้จากการใช้ primer *bph14*–NB มีเพียงขนาดเดียวคือเท่ากับ 334bp ซึ่งเป็นขนาดที่พบใน *bph14* ของข้าวพันธุ์ *Oryza officinalis* นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่า ข้าวปลูกทุกพันธุ์ที่ศึกษามียีน *Bph14*–NB เพียง 1 ชุด และไม่มีความหลากหลายของ NB-domain

4. จากการทดสอบ NB-domain ที่เป็นส่วนหนึ่งของ *bph14* ในตัวอย่างข้าว 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Oryza officinalis*, Taichung Native1 (TN1), *O. rufipogon* GS.NO.18887, *O. nivara* GS.NO.18855, *O. nivara*

GS.NO.16190, *O. rufipogon* GS.NO. 16184, *O. rufipogon* GS.NO. 15157, *O. officinalis* GS.NO.18859, *O. nivara* GS.NO.18847 และ *O. nivara* GS.NO.18854 ผลการวิเคราะห์ PCR products ในข้าวป่าที่ศึกษา พบว่า มี NB-domain ของ *bph14* gene เนื่องจากให้ขนาด PCR product เท่ากับ 334bp

นอกจากนี้ยังพบว่าในข้าวป่ามีความหลากหลายของจำนวนชุดของ *Bph14*–NB ซึ่งอาจเป็น *Bph14*–NB homolog บนตำแหน่งต่างๆ ของดีเอ็นเอ โดยผลการวิเคราะห์ PCR products พบว่า PCR products ขนาดประมาณ 200, 500 และ 1200 bp ซึ่งควรนำ PCR products มาทำการวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อหา *Bph14*–NB homolog ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

พุฒิพงษ์ เพ็งฤกษ์ วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ ไสว บูรณพานิชพันธุ์ จิราพร กุลสาริร เจตน์ คชฤกษ์ สุรเดช ปา ละ วิสุทธิ์ และภมร ปัตตาวะตัง (2554). ความหลากหลายทางชีวชนิดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในภาคเหนือตอนล่างของไทย. วารสารเกษตร 27(1): 27-37.

สงกรานต์ จิตรากร (2532). ทรัพยากรเชื้อพันธุ์ข้าวป่าในประเทศไทย. วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 7 ฉบับที่ 1.

สมศักดิ์ สมานวงศ์ สมชาย ธนสินชยกุล ศิริพรรณ ตันตาคม และสงกรานต์ จิตรากร (2548). ความต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens* Stål) จากข้าวป่าและข้าววัชพืชในประเทศไทย. การประชุมวิชาการ "ข้าววัชพืช" 21 ตุลาคม 2548. หน้า 137-143.

Du, B., Zhang, W., Liu, B., Hu, J., Wei, Z., Shi, Z., He, R., Zhu, L., Chen, R., Han, B. and He, G. (2009). Identification and characterization of *Bph14*, a gene conferring resistance to brown planthopper in rice. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 22163-22168.

Hu, J., Li, X., Wu, C., Yang, C., Hua, H., Gao, G., Xiao, J. and He, Y. Pyramiding and evaluation of the brown planthopper resistance genes *Bph14* and *Bph15* in hybrid rice. Molecular Breeding (in press).

Khush, G.S., D.S. Brar & B. Hardy, 2001. Rice genetics from Mendel to functional genomics. Rice Genet IV: pp 3–25.

Khush, G., Karim, A. and Angeles, E. (1985). Genetics of resistance of rice cultivar ARC10550 to Bangladesh brown planthopper biotype. Journal of Genetics 64: 121-125.

Mai, P.H.T., and Hong, H.T.K. (2012). *Bph14* gene determining brown-planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) resistance in rice varieties (*Oryza sativa* L.). Annals of Biological Research 3 (3):1424-1433.

Pathak, M. D., Cheng, C. H. and Fortuno, M. E. (1969). Resistance to *Nephotettix impicticeps* and *Nilaparvata lugens* in varieties of rice. Nature 223: 502-504.

Rahman, M., Jiang, W., Chu, S., Qiao, Y., Ham, T. H., Woo, M. O., Lee, J., Khanam, M., Chin, J. H., Jeung, J. U., Brar, D., Jena, K. and Koh, H. J. (2009). High-resolution mapping of two rice brown planthopper resistance genes, *Bph20(t)* and *Bph21(t)*, originating from *Oryza minuta*. Theoretical and Applied Genetics 119: 1237-1246.

Suh, J. P., Yang, S. J., Jeung, J. U., Pamplona, A., Kim, J. J., Lee, J. H., Hong, H. C., Yang, C. I., Kim, Y. G. and Jena, K. K. (2011). Development of elite breeding lines conferring *Bph18* gene-derived resistance to brown planthopper (BPH) by marker-assisted selection and genome-wide background analysis in japonica rice (*Oryza sativa* L.). Field Crops Research 120: 215-222.

Yadavalli V., Narwane G. P., Nagarajan P. and Bharathi M. (2011). Identification of coupling- and repulsion-phase markers in rice for brown planthopper resistance genes using F_2S of IR 50 x CO 46. J. of Plant Breed. Crop Sci. 3: 1-7.