

ฉบับนี้สงวนลิขสิทธิ์



สำนักหอสมุด



การปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข47 ให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง  
โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (ปีที่ 2)

รายงานฉบับสมบูรณ์



สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
รังสิต กรุงเทพฯ 15 ต.อ. 2564  
เลขที่หนังสือ 1039432  
วันที่รับหนังสือ

ว. ๑ SB  
609  
.ป5  
๑๖๗๙๓  
๒๕๖๒

คำรพ รัตน์สุต

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2562

## บทคัดย่อ

การสำรวจโรคขอบใบแห้งในแปลงนาข้าวเขตจังหวัดพิษณุโลก (อำเภอพรหมพิราม อำเภอบางระกำ อำเภอบางกระทุ่ม และอำเภอเมืองพิษณุโลก) และจังหวัดพิจิตร (อำเภอเมืองพิจิตร และอำเภอดงเจริญ) ช่วงฤดูฝน (เดือนมิถุนายน สิงหาคม และกันยายน 2559) พบการระบาดของโรคขอบใบแห้งในทุกพื้นที่ที่สำรวจ และสามารถแยกเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) บริสุทธิ์จากใบและเมล็ดข้าวที่มีอาการของโรคขอบใบแห้งจากพื้นที่ที่สำรวจได้ ซึ่งการทดสอบปลูกเชื้อบนข้าวพันธุ์ กข47 พบว่าเชื้อทุกไอโซเลตสามารถก่อโรคขอบใบแห้งได้ การตรวจสอบตัวแทนเชื้อ Xoo ที่แยกได้จำนวน 4 ไอโซเลต (Xoo16PK001 Xoo16PK002 Xoo16PT001.2 และ Xoo16PT005) ด้วยวิธี PCR โดยใช้ TXT marker และ Xoo4009 marker ได้ PCR product ที่จำเพาะและมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับเชื้อ Xoo ในฐานข้อมูล

การปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข47 (RD47) ให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งโดยการเพิ่มยีน *Xa21* ในข้าวพันธุ์ กข47 ใช้วิธีการผสมกลับ โดยในปีที่ 2 ได้ทำการผสมกลับ BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> (ที่ได้จากปีที่ 1) ไปยังพันธุ์ข้าว กข47 อีกจำนวน 3 ชั่วรุ่น จนได้ลูกผสมกลับรุ่น BC<sub>4</sub>F<sub>1</sub> ที่คัดเลือกไว้จำนวน 4 สายพันธุ์ ลูกผสมกลับรุ่น BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> ที่มีสภาพจีโนไทป์ heterozygous *Xa21* และลูกผสมกลับรุ่น BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> ที่มีสภาพจีโนไทป์ heterozygous *Xa21* สำหรับใช้ตรวจสอบการตอบสนองของยีน *Xa21* และ *OsPAL4* ต่อเชื้อ Xoo และทดสอบระดับความต้านทานโรคขอบใบแห้งตามลำดับ คัดเลือกได้ด้วย pTA248 marker

ระดับความต้านทานโรคขอบใบแห้งในข้าวลูกผสมกลับรุ่น BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> ที่มีสภาพจีโนไทป์ heterozygous *Xa21* เปรียบเทียบกับพันธุ์แม่ กข47 และพันธุ์พ่อ IRBB21 หลังปลูกเชื้อ Xoo ไอโซเลต Xoo16PK001 และ Xoo16PT001.2 พบว่าข้าวลูกผสมกลับรุ่น BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> ที่มีสภาพจีโนไทป์ heterozygous *Xa21* มีระดับความต้านทานเหมือนพันธุ์พ่อ IRBB21 แต่มากกว่าพันธุ์แม่ กข47 ที่อ่อนแอโดยสมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม ระดับความต้านทานยังจัดอยู่ในกลุ่มค่อนข้างอ่อนแอ

การแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน *Xa21* ในลูกผสมกลับรุ่น BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> ที่มีสภาพจีโนไทป์ heterozygous *Xa21* หลังปลูกเชื้อ Xoo ถูกยับยั้งภายใน 24 ชั่วโมง ขณะที่ยีน *Xa21* ใน IRBB21 ถูกชักนำให้แสดงออกภายใน 24 ชั่วโมงแรก ต่อเนื่องถึง 72 ชั่วโมง แต่การแสดงออกจะลดลงในวันที่ 7 หลังได้รับเชื้อ สำหรับยีน *OsPAL4* ไม่สามารถตรวจวัดการแสดงออกได้ในทุกตัวอย่างของ BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> ขณะที่ใน IRBB21 พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นต่อเนื่องหลัง 24 ชั่วโมงแรก ถึง 72 ชั่วโมง ก่อนลดลงในวันที่ 7 หลังได้รับเชื้อ เช่นเดียวกับการแสดงออกของยีน *Xa21* แต่ยีน *OsPAL4* มีอัตราการแสดงออกเพิ่มขึ้นช้ากว่ายีน *Xa21*

คำสำคัญ: ข้าว ยีนต้านทานโรค *Xa21* โรคขอบใบแห้ง

## Abstract

---

Bacterial Blight (BB) disease survey at rice paddy fields in Phitsanulok (Amphoe Phrom Phiram, Amphoe Bang Rakam, Amphoe Bang Krathum and Amphoe Mueang Phitsanulok) and Phichit (Amphoe Mueang Phichit and Amphoe Dong Charoen) provinces during a rainy season (June, August and September) in 2016 revealed outbreak of BB disease in all surveyed fields. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) was isolated from BB symptom-like leaves and seeds collected from the surveyed fields. All bacterial isolates were able to infect BB susceptible rice cultivar RD47 showing the BB symptom. Four *Xoo*-like isolates (*Xoo*16PK001, *Xoo*16PK002, *Xoo*16PT001.2 and *Xoo*16PT005) were identified as *Xoo* by TXT- and *Xoo*4009-marker based PCR. The PCR product sequences were identical to *Xoo* DNA sequences in Genbank database.

Improvement of rice RD47 to be resistant to BB by introgression of BB resistance *Xa21* gene from rice IRBB21 into rice RD47 was performed by backcross breeding method. We report here success of backcross breeding from BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> (derived from the first-year project) through BC<sub>4</sub>F<sub>1</sub>. Four BC<sub>4</sub>F<sub>1</sub> lines were selected for further research. BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> lines carrying heterozygous *Xa21* and BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> lines carrying homozygous *Xa21* for analyses of *Xa21* and *OsPAL4* responding to *Xoo* and BB resistance, respectively, were successfully selected using the pTA248 marker.

The levels of BB resistance in BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> lines carrying homozygous *Xa21* compared to the parents, RD47 and IRBB21, inoculated with *Xoo* isolates *Xoo*16PK001 and *Xoo*16PT001.2 revealed that BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> lines showed similar resistance level to IRBB21 but more resistant than the completely susceptible RD47 cultivar. However, the resistance level of BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> lines was still classified in the moderate susceptibility group.

Relative expression of *Xa21* in BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> lines carrying heterozygous *Xa21* inoculated with *Xoo* demonstrated that the *Xa21* was suppressed within 24 hours while the *Xa21* in IRBB21 was induced within 24 hours and gradually increased until 72 hours before decreased in day 7 after inoculation. Expression of *OsPAL4* was undetectable in all BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> samples whereas in IRBB21, the expression pattern of *OsPAL4* was similar to that of *Xa21* but slower increasing rate.

Keywords: Bacterial blight, Rice, *Xanthomonas oryzae*, *Xa21* gene



## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.อัจฉราพร ณ ลำปาง เนินพลับ เป็นอย่างสูงที่อนุเคราะห์เชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* รวมทั้งช่วยฝึกเทคนิคการวินิจฉัยโรคขอบใบแห้งและการแยกเชื้อบริสุทธิ์ ขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก ที่อนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าว กข47 และ IRBB21 สำหรับการวิจัย และขอขอบคุณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทำวิจัย

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2559 มหาวิทยาลัยนเรศวร



คำพร รัตนสุต  
หัวหน้าโครงการวิจัย  
2562

## สารบัญ

บทคัดย่อ .....	i
Abstract .....	ii
กิตติกรรมประกาศ .....	iii
สารบัญ .....	iv
<b>1. บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
1.2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	2
<b>2. ระเบียบวิธีวิจัย.....</b>	<b>5</b>
2.1 การสำรวจและการจำแนกเชื้อ <i>Xoo</i> .....	5
2.2 การประเมินระดับความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในข้าว.....	5
2.3 การสกัด genomic DNA (gDNA) จากใบข้าวด้วยวิธี LiCl miniprep.....	6
2.4 การตรวจสอบยีน <i>Xa21</i> ด้วยวิธี Direct PCR โดยใช้ Phire Plant Direct PCR Master Mix® (Thermo Scientific, EU).....	7
2.5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Real time RT-PCR.....	7
2.6 การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของ PCR product.....	8
2.7 การสร้างข้าวสายพันธุ์เสมือน กข47 ที่มียืนต้านทานโรคขอบใบแห้ง <i>Xa21</i> ด้วยวิธี backcross breeding.....	8
<b>3. ผลและอภิปรายผลการวิจัย .....</b>	<b>10</b>
3.1 การสำรวจโรคขอบใบแห้งในพื้นที่ปลูกข้าวจังหวัดพิษณุโลกและพิจิตร.....	10
3.2 การจำแนกเชื้อบริสุทธิ์สาเหตุโรคขอบใบแห้งจากพื้นที่สำรวจ.....	13
3.3 การตรวจสอบเชื้อ <i>Xoo</i> ที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค PCR.....	15
3.4 การตรวจสอบจีโนมไทป์ของยีน <i>Xa21</i> ในข้าวพันธุ์ กข47 และข้าวพันธุ์ IRBB21.....	19
3.5 การสร้างและคัดเลือกลูกผสมกลับ $BC_2F_1 - BC_4F_1$ .....	19
3.6 การทดสอบความต้านทานโรคขอบใบแห้งในลูกผสมกลับ $BC_3F_3$ .....	22

3.7 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>Xo21</i> และ <i>PAL</i> ในข้าวพันธุ์ IRBB21 และลูกผสมกลับ BC <sub>2</sub> F <sub>2</sub> ภายหลังปลูกเชื้อ <i>Xoo</i> โดย real time RT-PCR .....	25
4. สรุปผลการวิจัย .....	32
เอกสารอ้างอิง .....	34
ภาคผนวก .....	40



## 1. บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ข้าวพันธุ์ กข47 (หรือ RD47) เป็นข้าวเจ้าไม่ไวต่อช่วงแสงอายุ 104-107 วัน (หวานน้ำต้ม) และ 112 วัน (ปักดำ) เป็นพันธุ์ข้าวที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ขึ้นมาใหม่ และเป็นที่ยอมรับปลูกในเขตภาคเหนือตอนล่าง มีลักษณะกอดี ความสูง 90-100 เซนติเมตร ลำต้นแข็งแรง ใบสีเขียว มีอะไมโลส (Amylose) สูง (26.81%) ข้าวเมื่อหุงสุกมีลักษณะสีขาวนวลไม่เลื่อมมัน ค่อนข้างร่วนและแข็ง ผลผลิตเฉลี่ย 793 กิโลกรัมต่อไร่ ลักษณะเด่นของข้าวพันธุ์ กข47 คือสามารถให้ผลผลิตสูง มีเสถียรภาพดี ค่อนข้างต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ดีกว่าข้าวพันธุ์ RD41 และค่อนข้างต้านโรคไหม้ดีกว่าข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 คุณภาพเมล็ดทางกายภาพดีเป็นข้าวเจ้าเมล็ดยาวเรียวยาว ท้องไข่น้อย คุณภาพการสีดี เหมาะสำหรับปลูกในพื้นที่นาชลประทาน อย่างไรก็ตามข้าวพันธุ์ กข47 นับว่าเป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและโรคขอบใบแห้ง ซึ่งการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนในระดับสูงเกินไปจะยิ่งทำให้เกิดโรครุนแรง นอกจากนี้ยังค่อนข้างอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคไหม้ในภาคกลาง และเป็นพันธุ์ที่ไม่ทนต่ออากาศเย็น

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค ช่วยลดความเสียหายทางเศรษฐกิจทั้งทางตรงและทางอ้อม ทางตรงคือการลดค่าใช้จ่ายในการใช้สารเคมีกำจัดโรคพืชและความเสียหายของปริมาณผลผลิตข้าว ทางอ้อมคือการลดค่าใช้จ่ายด้านสาธารณสุข ก่อให้เกิดความปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้ผลิต ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมจากการลดการใช้สารเคมีกำจัดโรคขอบใบแห้ง วิธีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่งคือการเพิ่มยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งให้กับพันธุ์ข้าวดีที่อ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้งโดยการนำไปผสมกับพันธุ์ข้าวที่มียีนต้านทานโรคขอบใบแห้งแล้วผสมกลับไปยังพันธุ์ข้าวที่ต้องการปรับปรุงหลายๆ ตัวเพื่อดึงลักษณะของข้าวพันธุ์นั้นกลับมา อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวนี้ต้องทราบข้อมูลยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งก่อนซึ่งปัจจุบันมีการศึกษากลุ่มยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *Xa* จำนวนมากที่สามารถนำมาใช้เพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งได้ ยีนต้านทานโรคจำนวนมากได้รับมาจากพันธุ์ข้าวป่า ซึ่งพบว่ามีมากกว่า 30 ยีนที่มีคุณสมบัติในการต้านทานโรคและมีการคัดเลือกยีนที่โดดเด่นมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว ยีนต้านทานโรคขอบใบแห้งที่ออกฤทธิ์ในวงกว้าง (Broad spectrum) ถูกค้นพบในข้าวป่า *Oryza longistaminata* ได้แก่ยีน *Xa21* และมีการนำยีนนี้ใส่ข้าวปลูก *O. sativa* ได้ลูกผสมเป็นพันธุ์ IRBB21 ซึ่งสามารถต้านทานได้หลายสายเชื้อ (Race) ในกลุ่มของ *Xoo* ทั้งในอินเดียและฟิลิปปินส์

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข47 ให้ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง โดยจะศึกษากลไกของระบบป้องกันตัวระดับโมเลกุลของข้าว กข47 สายพันธุ์ปรับปรุงที่มียีน *Xa21* ต่อเชื้อสาเหตุของโรคขอบใบแห้ง (*Xoo*) ด้วย

## 1.2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคขอบใบแห้ง (Bacterial leaf blight หรือ Bacterial blight, BB) ในข้าวเกิดจากเชื้อสาเหตุ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) สร้างความเสียหายเป็นอันดับหนึ่งของโรคข้าวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย หากเชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายในระยะดอกบานจะทำให้ผลผลิตลดลงได้สูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และหากเชื้อเข้าทำลายในระยะแตกกอสูงสุดจะทำให้ผลผลิตลดลง 10-20 เปอร์เซ็นต์ โรคขอบใบแห้งพบครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่น เมื่อปี ค.ศ. 1884 และมีรายงานว่าในปี ค.ศ. 1960 พบการระบาดของโรคไปในแหล่งปลูกทั่วทวีปเอเชีย ได้แก่ ประเทศฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย อินเดีย ศรีลังกา สาธารณรัฐประชาชนจีน ไต้หวัน เกาหลี ไทย และเวียดนาม และยังพบการแพร่กระจายของโรคไปยังพื้นที่อื่นทั่วโลก โรคขอบใบแห้งพบที่ประเทศไทยครั้งแรกในปี ค.ศ. 1963 (Eamchit, 1982) โดยพบการระบาดรุนแรงและทำความเสียหายในแหล่งปลูกข้าวที่สำคัญทุกภาคของประเทศไทย ทั้งในนาข้าวและนาชลประทานในเขตภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ โรคนี้เป็นได้ตั้งแต่ระยะกล้า แตกกอ จนถึงออกรวง โดยเข้าไปตามบาดแผลหรือช่องเปิดตามธรรมชาติ (Mew, 1987) ก่อนนำไปปักดำจะมีจุดเล็ก ๆ ลักษณะขี้ที่ขอบใบของใบล่าง ต่อมาประมาณ 7-10 วัน จุดขี้นี้จะขยายกลายเป็นทางสีเหลืองยาวตามใบข้าว ใบที่เป็นโรคจะแห้งเร็ว และสีเขียวจะจางลงเป็นสีเทา อาการในระยะปักดำจะแสดงหลังปักดำแล้วหนึ่งเดือนถึงเดือนครึ่ง ใบที่เป็นโรคขอบใบจะมีรอยขีดขี้ ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ที่แผลมีหยดน้ำสีครีมขนาดเล็กเท่าหัวเข็มหมุด (Bacterial ooze) ต่อมาจะกลายเป็นสีน้ำตาลและหลุดไปตามลม น้ำหรือฝน ซึ่งจะทำให้โรคสามารถระบาดต่อไปได้ โรคนี้เกิดกับข้าวทุกระยะการเจริญเติบโตโดยเฉพาะระยะแตกกอเต็มที่ ข้าวที่เป็นโรคจะทำให้ผลผลิตลดลง เมล็ดลีบ น้ำหนักเบา คุณภาพเมล็ดไม่ได้มาตรฐาน และเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำ (Ou, 1985) ผลจะขยายไปตามความยาวของใบ บางครั้งขยายเข้าไปข้างในตามความกว้างของใบ ขอบแผลมีลักษณะเป็นขอบลายหยัก แผลนี้เมื่อนานไปจะเปลี่ยนเป็นสีเทา ใบที่เป็นโรค ขอบใบจะแห้งและม้วนตามความยาว ในบางกรณีที่เชื้อมีปริมาณสูงเข้าทำลายทำให้ท่อน้ำท่ออาหารอุดตัน ต้นข้าวทั้งต้นจะเหี่ยวเฉาและตายโดยรวดเร็วเรียกอาการของโรคนี้ว่า ครีเสก (Kresek)

ยีนต้านทานโรคขอบใบแห้ง (*Xa*) ที่ทำให้เกิดความต้านทานเชิงคุณภาพ (Qualitative resistance) เป็นยีนเดี่ยวหลักที่ทำให้เกิดความต้านทาน (Single major disease resistance gene) ต่อเชื้อ Xoo แบบจำเพาะต่อสายพันธุ์ (Pathogen race-specific) ปัจจุบันมีการจำแนกยีน *Xa* ในกลุ่มนี้แล้วไม่น้อยกว่า 37 ยีน (Hari et al. 2013; Kou and Wang 2013; Zhang and Wang 2013) ในธรรมชาติยีน *Xa* ส่วนใหญ่เป็นยีนเด่น (Dominant) ขณะที่ Kou and Wang (2013) รายงานว่ามียีน *Xa* ในธรรมชาติที่เป็นยีนด้อย (Recessive) อยู่ 14 ยีนจากที่มีรายงานยีน *Xa* ทั้งหมด 37 ยีนที่มีการศึกษา Zhang and Wang (2013) รายงานว่ามีเพียง 7 ยีนเท่านั้นที่ถูกโคลนแล้ว ได้แก่ *Xa1* (Dominant) *Xa3/Xa26* (Dominant) *xa5* (Recessive) *xa13* (Recessive) *Xa21* (Dominant) *xa25* (Recessive) และ *Xa27* (Dominant) ในบรรดา ยีนเหล่านี้ ยีน *Xa21* เป็นยีนต้านทานต่อเชื้อ Xoo ได้หลายสายพันธุ์ (Broad-spectrum resistance) (Song et al. 1995; Wang et al. 1996)



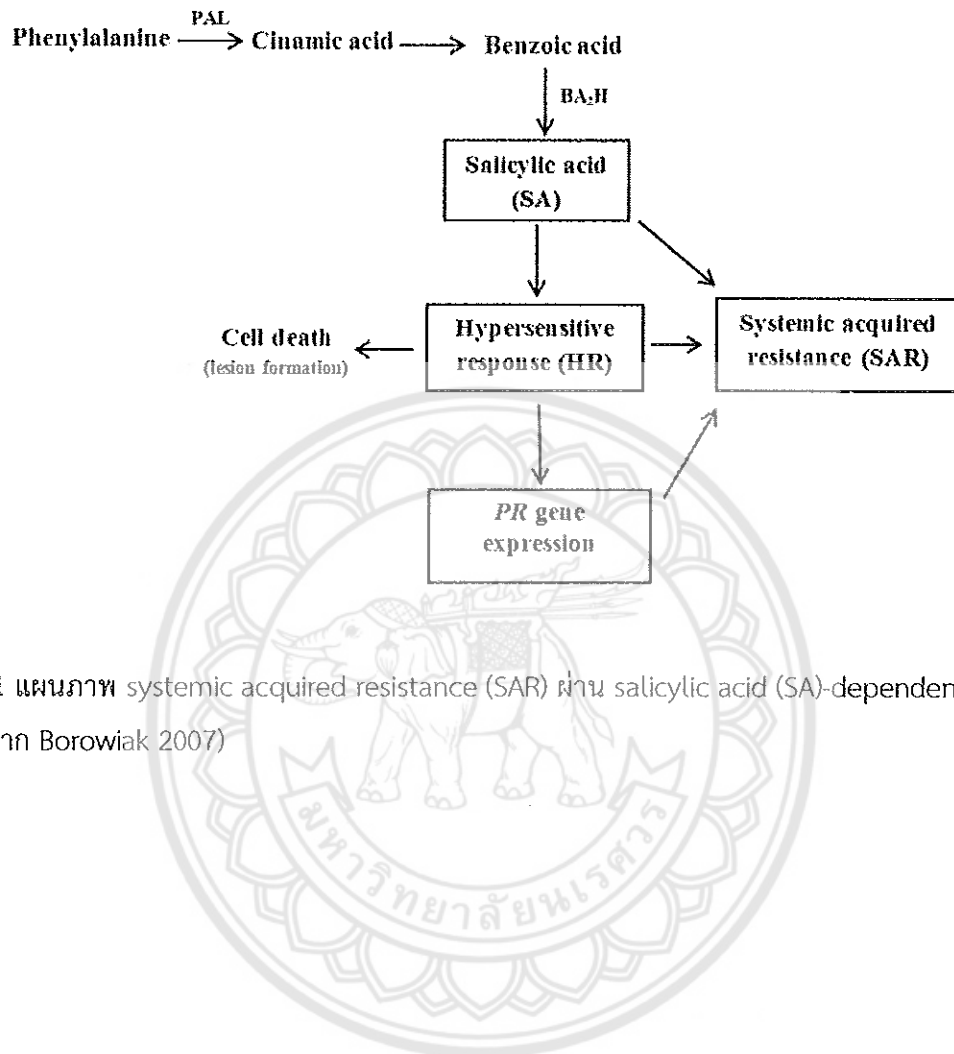
ยีน *Xa21* เป็นยีนที่สร้าง receptor kinase-like protein ที่โคลนได้จาก *Oryza longistaminata* (Song et al. 1995) และได้ประสบความสำเร็จในการถ่ายทอดยีน *Xa21* สู่อาวปลูกหลายสายพันธุ์ (Gopalakrishnan et al. 2008; Joseph et al. 2004; Pandey et al. 2013; Perumalsamy et al. 2010; Sundaram et al. 2008; Sundaram et al. 2009) และพ่อแม่พันธุ์ของข้าวลูกผสม (Basavaraj et al. 2010; Chen et al. 2001; Hari et al. 2011; Liyong et al. 2003) ทำให้ได้พันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง ข้าวพันธุ์ IRBB21 เป็นพันธุ์ข้าวที่พัฒนามาจากการถ่ายทอดยีน *Xa21* จาก *O. longistaminata* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ IR24 ซึ่งต้านทานต่อเชื้อ *Xoo* ทุกสายพันธุ์ในฟิลิปปินส์และอินเดีย (Luo et al. 2004)

เครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมติดอยู่กับยีน *Xa* ต่างๆ ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ช่วยในการคัดเลือктันข้าวต้านทานต่อเชื้อ *Xoo* จากการสร้างสายพันธุ์เสมือน (isogenic line) ด้วยวิธีผสมกลับ (Backcross) สำหรับยีน *Xa21* มีการใช้เครื่องหมายโมเลกุล PCR-based marker pTA248 สำหรับคัดเลือктันข้าวที่มียีน *Xa21* อยู่ โดย pTA248 สามารถจำแนกต้นข้าวที่เป็น Homozygous resistance Heterozygous resistance และ Homozygous susceptibility ออกจากกันได้ (Dokku et al. 2013; Hari et al. 2013; Luo et al. 2004; Ronald et al. 1992) นอกจากเครื่องหมายโมเลกุล pTA248 แล้ว เครื่องหมายโมเลกุล PCR-based marker *Xa21* ซึ่งออกแบบมาจากยีน *Xa21* โดยตรงสามารถใช้จำแนกต้นข้าวทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้เช่นเดียวกับ pTA248 (Luo et al. 2004)

การตอบสนองของพืชพันธุ์ต้านทานต่อการบุกรุกของเชื้อก่อโรคมักจะชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนกลุ่มต่างๆ ที่มีบทบาทในการป้องกันตัวเองของพืชนำไปสู่ความต้านทานต่อโรคทั้งระบบหรือทั้งต้นพืช กลุ่มยีนที่สร้าง Pathogenesis-related protein (PR) เป็นกลุ่มยีนสำคัญที่จะถูกชักนำให้แสดงออกในกลไกการป้องกันตัวเองของพืช ยีน *PR* จึงมักถูกใช้เป็นเครื่องหมายในการศึกษากลไกการป้องกันตัวเองของพืชที่จะนำไปสู่ความต้านทานต่อโรค สำหรับในข้าวมีการโคลนและศึกษายีนกลุ่มที่สร้าง PR protein แล้วหลายยีน เช่น *OsPR1a* *OsPR1b* *OsPR2* *OsPR3* *OsPR5* *OsPR10* และ *OsPR13* นอกจากยีน *PR* แล้ว ยีนกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง Phytoalexin ซึ่งเป็น Secondary metabolite ที่มีส่วนร่วมในระบบป้องกันตัวเองของพืชด้วย เช่น ยีนกลุ่ม Phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) และยีน Chalcone synthase (*CHS*) ในข้าวมีการโคลนยีนกลุ่ม *OsPAL* ได้แก่ *GP-1* *GP-28* และ *ZB8* และยีน *OsCHS* (Review in Jwa et al. 2006)

*PAL* เป็น key enzyme ใน Phenylpropanoid pathway ของพืชซึ่งผลิตสาร Phenolics Flavonoids Phytoalexins และ Lignin ที่มีส่วนช่วยให้ต้านทานโรค (Bowles 1990; Bate et al. 1994, Camera et al. 2004; Gao et al., 2012; Pellegrini, 1994; Rawal et al. 2013; Reichert et al. 2009; Vogt 2010) นอกจากนี้ *PAL* ยังเป็น key enzyme สำหรับชีวสังเคราะห์ Salicylic acid (*SA*) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชที่ต้องการเพื่อกระตุ้นการต้านทานโรคแบบ Systemic acquired resistance (*SAR*) (ภาพที่ 1.1) (Lee et al. 1995; Mauch-Mani and

Slusarenko 1996; Coquoz et al. 1998; Achnine et al. 2004; Beckers and Spoel 2006; Gruner et al. 2013; Roycewicz and Malamy et al. 2014)



ภาพที่ 1.1 แผนภาพ systemic acquired resistance (SAR) ผ่าน salicylic acid (SA)-dependent pathway (ดัดแปลงจาก Borowiak 2007)

## 2. ระเบียบวิธีวิจัย

### 2.1 การสำรวจและการจำแนกเชื้อ Xoo

สำรวจการเกิดโรคและความรุนแรงของโรคขอบใบแห้งที่เกิดจากการเข้าทำลายตามธรรมชาติ (Natural inoculation) ในข้าวระยะกล้า ระยะแตกกอ ระยะออกรวง ในพื้นที่จังหวัดพิษณุโลกและจังหวัดสุโขทัยแล้ว จำแนกเชื้อบริสุทธิ์สาเหตุโรคขอบใบแห้งจากพื้นที่สำรวจในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี dilution plate method โดยนำเมล็ดข้าวหรือใบข้าวที่ได้จากการสำรวจมาล้างทำความสะอาดในสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้น 10% และผสม Tween จำนวน 2 หยด นำมาเขย่าเป็นเวลา 10 นาที และล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อจำนวน 2 ครั้ง นานครั้งละ 10 นาที จากนั้นนำเมล็ดข้าวหรือใบข้าวมาบดในน้ำกลั่นอบฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร และคัดสารละลายจำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ทำการเจือจาง 10 100 1000 เท่าตามลำดับ จากนั้นคัดสารละลายของเมล็ดข้าวหรือใบข้าวจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย nutrient agar จำนวน 9 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากันและเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

### 2.2 การประเมินระดับความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งในข้าว

พิสูจน์การเป็นโรคและทดสอบระดับความรุนแรงของเชื้อแต่ละไอโซเลตด้วยวิธีการปลูกเชื้อลงบนข้าวพันธุ์ กข47 ในสภาพควบคุมในห้องปฏิบัติการหรือโรงเรือนทดลอง วางแผนการทดลองแบบ factorial in completely randomized design 2 ปัจจัย จำนวน 5 ซ้ำ โดยมีสายพันธุ์ข้าวเป็นปัจจัย A ซึ่งจะนำไปทดสอบกับเชื้อสาเหตุ โดยให้เชื้อเป็นปัจจัย B ซึ่งเป็นแบคทีเรียสาเหตุของโรค โดยมีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

- 1) เพาะเมล็ดข้าวในกระบะหลุมพลาสติกจำนวน 3 ต้นต่อหลุม จนกระทั่งต้นกล้ามีอายุ 30 วัน
- 2) เตรียมเชื้อ Xoo โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร nutrient agar (NA) ที่อุณหภูมิ 30°C และเลี้ยงขยายเชื้อในอาหารสูตร NA ที่อุณหภูมิ 30°C แล้วเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียในน้ำกลั่นปรับความเข้มข้นที่ค่า  $OD_{600} = 0.6$
- 3) ปลูกเชื้อ (inoculation) ด้วยวิธีการตัดใบ (Kauffman et al., 1973) และบ่มต้นกล้าที่ปลูกเชื้อแล้วไว้ในโรงเรือนที่มีความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ 75-90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาประมาณ 14-21 วัน
- 4) บันทึกระดับความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งหลังการปลูกเชื้อแล้ว 14-21 วัน โดยแบ่งระดับปฏิกริยาความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งที่ตัดแปลงจากมาตรฐานของ Standard Evaluation System (SES) ของสถาบันวิจัยข้าวนานาชาติ (International Rice Research Institute : IRRI) (IRRI 1996) โดยพิจารณาจากความยาวของแผลที่เกิดขึ้นบนใบ แบ่งเป็น 5 ระดับดังตารางที่ 2.1 นำข้อมูลไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ

(analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) และวิธี orthogonal comparison นำข้อมูลที่ได้ไปแปลผลเป็นปฏิกริยาการเกิดโรคขอบใบแห้ง และประเมินฐานความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง (Broad Resistance Spectrum: BRS) ตามวิธีการของ (Ahn 1994)

ตารางที่ 2.1 เกณฑ์การประเมินความรุนแรงของโรคขอบใบแห้งและระดับความต้านทานโรคของข้าวตามวิธี IRR1

ความรุนแรงของโรคขอบใบแห้ง			ระดับความต้านทานโรคของข้าว
ระดับ	สภาพแปลงทดลอง	สภาพโรงเรือน	
0	ใบข้าวปกติ	-	ระดับความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งสูง (Highly Resistance: HR)
1	ใบข้าวแสดงอาการโรคขอบใบแห้ง คิดเป็นร้อยละ 1-20 ของพื้นที่ใบ	0-5 cm	ระดับความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง (Resistance: R)
2	ใบข้าวแสดงอาการโรคขอบใบแห้ง คิดเป็นร้อยละ 21-40 ของพื้นที่ใบ	>5-10 cm	ระดับค่อนข้างต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง (Moderate Resistance: MR)
3	ใบข้าวแสดงอาการโรคขอบใบแห้ง คิดเป็นร้อยละ 41-60 ของพื้นที่ใบ	>10-15 cm	ระดับค่อนข้างอ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้ง (Moderate Susceptible: MS)
4	ใบข้าวแสดงอาการโรคขอบใบแห้ง คิดเป็นร้อยละ 61-80 ของพื้นที่ใบ	>15 cm	ระดับอ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้ง (Susceptible: S)
5	ใบข้าวแสดงอาการโรคขอบใบแห้ง คิดเป็นร้อยละ 81-100 ของพื้นที่ใบ		

### 2.3 การสกัด genomic DNA (gDNA) จากใบข้าวด้วยวิธี LiCl miniprep

บดตัวอย่างใบอ่อนข้าวน้ำหนัก 100-200 mg ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ใส่ใน 1.5 ml microtube เดิม TLES buffer (0.1 M Tris pH 8.0, 0.1 M LiCl, 10 mM EDTA, 1% SDS, 2% sodium sulfite) ปริมาตร 700 µl แล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex หรือ pipette เดิม phenol ปริมาตร 600 µl ผสมให้เข้ากันแล้วปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 10 นาที ตูดเฉพาะส่วนใสชั้นบนใส่ใน 1.5 ml microtube ใหม่ แล้วเติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตรเท่ากับน้ำใสที่ตูดออก (ประมาณ 600 µl) ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 8 นาที ตูดของเหลวส่วนใสชั้นบนใส่ใน 1.5 ml microtube ใหม่ และเติม isopropanol แชนเย็น 0.7 เท่าของปริมาตรตัวอย่าง เขย่ากลับขึ้นลงเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนโดยเติม 70% ethanol ลงไปปริมาตร 1 ml ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 5 นาที เท 70% ethanol ทิ้ง เปิดฝาทิ้งไว้ให้ ethanol ระเหยจนตะกอนดีเอ็นเอเกือบแห้ง (ประมาณ 5-10 นาที) แล้วใส่น้ำปลอดเชื้อหรือ TE buffer ที่ผสม RNase A (20 µg/ml) ลงไป 20 µl

#### 2.4 การตรวจสอบยีน *Xa21* ด้วยวิธี Direct PCR โดยใช้ Phire Plant Direct PCR Master Mix® (Thermo Scientific, EU)

ตัดใบข้าวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 mm บดใน dilution buffer ปริมาตร 20  $\mu$ l แล้วใช้ 1  $\mu$ l สำหรับ PCR reaction ซึ่งประกอบด้วย H<sub>2</sub>O ปริมาตร 8  $\mu$ l 2X Phire Direct PCR master mix ปริมาตร 10  $\mu$ l forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น 7.5  $\mu$ M ใช้ pTA248 co-dominant marker (pTA248-F; 5'-AGACGCGGAAGGGTGGTCCCGGA-3' และ pTA248-R; 5'-AGACGCGGTGTAATCGAAAGATGAAA-3') และ *Xa21A* dominant marker (*Xa21A*-F; 5'-GGGAAGTGCCAACCATTGGTG-3' และ *Xa21A*-R; 5'-CCTCCATCAGTTCATGTAGAAG-3') สำหรับการตรวจสอบยีน *Xa21* โดยใช้ PCR condition ประกอบด้วย pre-denaturation ที่ 98°C นาน 5 นาที ตามด้วย denaturation 98°C นาน 5 วินาที annealing 60°C (สำหรับ pTA248) หรือ 63°C (สำหรับ *Xa21A*) นาน 10 วินาที และ extension 72°C นาน 22 วินาที จำนวน 40 รอบ ตรวจสอบผล PCR บน 1% agarose gel โดย pTA248 marker ซึ่งเป็นส่วนของดีเอ็นเอที่ไม่ใช่ส่วนของยีน *Xa21* แต่เชื่อมอยู่กับยีน *Xa21* จะให้ PCR product ขนาดประมาณ 730 bp และ 925 bp ในตัวอย่างข้าวที่ไม่มียีน *Xa21* (homozygous recessive, -/-) และที่มียีน *Xa21* (homozygous dominant, *Xa21/Xa21*) ตามลำดับ ขณะที่ตัวอย่างข้าวที่มียีน *Xa21* ในสภาพจีโนไทป์ heterozygous (*Xa21/-*) จะให้ PCR product ทั้งสองขนาด ส่วน *Xa21A* marker ซึ่งออกแบบมาจากยีน *Xa21* (GenBank no. U37133) จะให้ PCR product เดียวขนาด 1152 bp เฉพาะในข้าวที่มียีน *Xa21* ทั้งจีโนไทป์ที่เป็น homozygous (*Xa21/Xa21*) และ heterozygous (*Xa21/-*)

#### 2.5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Real time RT-PCR

สกัด Total RNA โดยใช้ total RNA extraction kit (RBC Bioscience, Taiwan) และกำจัด DNA โดยใช้ RQ1 RNase-Free DNase (Promega, USA) ก่อนทำ reverse transcription (RT) วัดความเข้มข้นและสัดส่วนค่าดูดกลืนแสง 260/280 ของ total RNA ด้วย Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, US) การสังเคราะห์ first-strand cDNA ใช้ Tetro cDNA Synthesis Kit (Bioline, US) และ qScript™ cDNA Synthesis Kit (Quanta BioSciences, US) ตามวิธีการแนะนำของบริษัท

Real time RT-PCR ใช้ชุด PerfeCTa® SYBR® Green FastMix, ROX™ (Quanta BioSciences, US) ตามคำแนะนำของบริษัท โดยใช้เครื่อง PCRmax Eco™ 48 Thermal Cyclers (PCRmax, UK) สำหรับ specific primer ที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของแต่ละยีนแสดงในตารางที่ 2.2 ส่วนผสมใน PCR reaction ปริมาตร 20  $\mu$ l ประกอบด้วย PerfeCTa SYBR Green FastMix, ROX (2X) 10  $\mu$ l forward primer และ reverse primer อย่างละ 10  $\mu$ M cDNA template 1  $\mu$ l และ RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ l สำหรับ PCR condition ประกอบด้วย pre-denaturation ที่ 95°C นาน 3 นาที ตามด้วย denaturation ที่ 95°C นาน 8 วินาที annealing ที่ 60°C นาน 10 วินาที และ extension ที่ 72°C นาน 20 วินาที จำนวน 40 รอบ แล้ววิเคราะห์

melting curve การปรับค่ามาตรฐาน (normalization) ข้อมูลใช้ *18s rRNA* เป็น reference gene (Jain et al., 2006) วิเคราะห์ระดับทรานสคริปต์ด้วยวิธี  $\Delta Ct$  จากค่าเฉลี่ยของตัวอย่าง 3 ซ้ำ (biological triplicates) และค่าความคลาดเคลื่อน

ตารางที่ 2.2 Specific primer ที่ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Xa21 OsPR1b OsPR10a* และ *PAL*

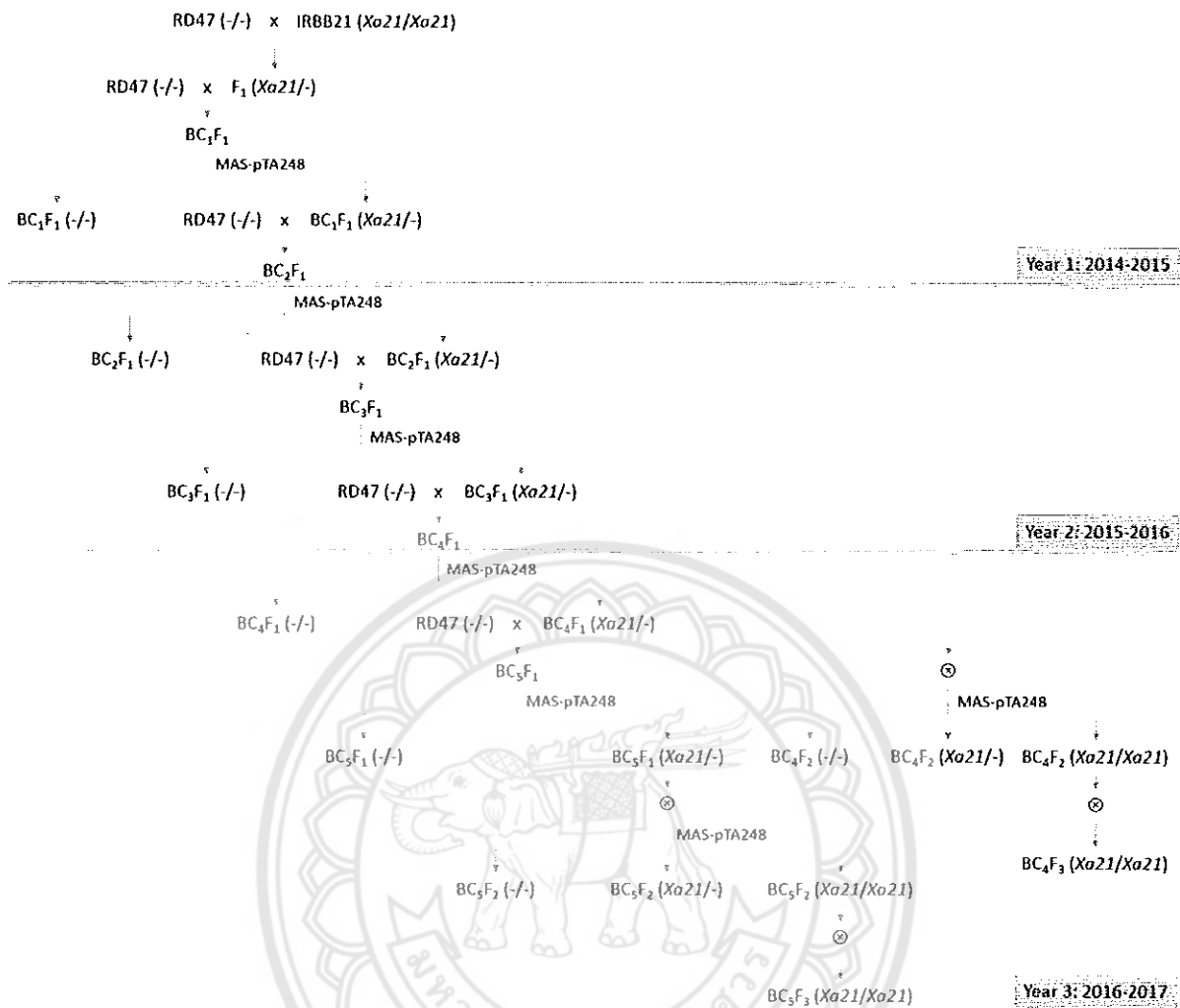
ยีน	Primer sequence	ขนาด PCR product	Reference
<i>Xa21</i>	Forward: 5'-CAGAGTATGGCGTTGGGCT-3' Reverse: 5'-CGGGTCTGAATGTAAGTCA-3'	114 bp	GenBank no. U37133
<i>PAL</i>	Forward: 5'-GCACATCTTGAGGGAAGCT-3' Reverse: 5'-GCGCGGATAACCTCAATTTG-3'	141 bp	Jain et al., 2006

## 2.6 การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของ PCR product

โคลน PCR product โดยใช้ pGEM-TEasy vector system (Promega, USA) แล้วส่งให้ 1st BASE Sequencing INT ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ส่วนการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ใช้โปรแกรม NCBI Blast และ Clustal Omega alignment

## 2.7 การสร้างข้าวสายพันธุ์เสมือน กข47 ที่มีถิ่นต้านทานโรคขอบใบแห้ง *Xa21* ด้วยวิธี backcross breeding

การถ่ายยีน *Xa21* ให้ข้าว กข47 ใช้ข้าวพันธุ์ IRBB21 ซึ่งมียีน *Xa21* ในสภาพจีโนไทป์ homozygous เป็นสายพันธุ์ผู้ให้ (สายพันธุ์พ่อ) สำหรับการสร้าง  $F_1$  แล้วผสมกลับ  $F_1$  ไปยัง กข47 จนได้  $BC_4F_1$  และ  $BC_5F_1$  แล้วจึงผสมตัวเอง 2 ครั้งจนได้  $BC_4F_3$  และ  $BC_5F_3$  ในสภาพจีโนไทป์ *Xa21* homozygous (ภาพที่ 2.1) การคัดเลือกลูกผสม  $F_1$  และลูกผสมกลับที่มียีน *Xa21* อยู่ในแต่ละชั่วจะใช้ pTA248 marker ในการตรวจสอบ



ภาพที่ 2.1 แผนผังการสร้างข้าวสายพันธุ์เสมือน กข47 ที่มีถิ่นต้านทานโรคขอบใบแห้ง Xa21 ด้วยวิธี backcross breeding โดยใช้ pTA248 marker ช่วยในการคัดเลือก (RD47 = กข47; MAS = Marker-assisted selection; ⊗ = การผสมตัวเอง (selfing))

### 3. ผลและอภิปรายผลการวิจัย

#### 3.1 การสำรวจโรคขอบใบแห้งในพื้นที่ปลูกข้าวจังหวัดพิษณุโลกและพิจิตร

ผลการสำรวจภาคสนามการเกิดโรคขอบใบแห้งที่เข้าทำลายข้าวในระยะกล้า ระยะแตกกอ ระยะออกรวง และระยะเก็บเกี่ยว ครั้งที่ 1 และ 2 ในพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 4 อำเภอ ได้แก่ อำเภอพรหมพิราม อำเภอบางระกำ อำเภอบางกระทุ่ม และอำเภอเมืองพิษณุโลก ในเดือนมิถุนายน และสิงหาคม 2559 จำนวนรวม 19 พื้นที่ (ตารางที่ 3.1 และ 3.2) และครั้งที่ 3 ในพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก จำนวน 1 อำเภอ ได้แก่ อำเภอพรหมพิราม และจังหวัดพิจิตร จำนวน 2 อำเภอ ได้แก่ อำเภอเมืองพิจิตร และอำเภอดงเจริญ ในเดือนกันยายน 2559 จำนวนรวม 11 พื้นที่ (ตารางที่ 3.3) พบการระบาดของโรคขอบใบแห้งในแปลงนาที่สำรวจ และได้ทำการเก็บตัวอย่างใบและเมล็ดจากต้นข้าวที่แสดงอาการโรคขอบใบแห้ง (ภาพที่ 3.1) มาแยกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อจำแนกเชื้อ *Xoo* สาเหตุโรคขอบใบแห้งในท้องปฏิบัติการ



ภาพที่ 3.1 ตัวอย่างอาการโรคขอบใบแห้งในข้าวระยะแตกกอ ตำบลตลุกเทียม อำเภอพรหมพิราม จังหวัดพิษณุโลก



ตารางที่ 3.1 พื้นที่สำรวจโรคขอบใบแห้งในข้าวช่วงเดือนมิถุนายน 2559

จุดที่	พื้นที่สำรวจโรคขอบใบแห้ง	พันธุ์ข้าว	ระยะเจริญเติบโตของข้าว	พิกัด	
				ละติจูด	ลองจิจูด
1	ตำบลวังน้ำคู้ อำเภอเมืองพิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก	กข41	ระยะแตกกอ	16.651189	100.282217
2	ตำบลบ้านไร่ อำเภอบางกระทุ่ม จังหวัดพิษณุโลก	กข61	ระยะเก็บเกี่ยว	16.630297	100.282566
3	ตำบลบางกระทุ่ม อำเภอบางกระทุ่ม จังหวัดพิษณุโลก	พิษณุโลก2	ระยะกล้า	16.583607	100.281134
4	ตำบลท่าตาล อำเภอบางกระทุ่ม จังหวัดพิษณุโลก	พิษณุโลก2	ระยะออกรวง	16.647413	100.309758
5	ตำบลท่าตาล อำเภอบางกระทุ่ม จังหวัดพิษณุโลก	พิษณุโลก2	ระยะแตกกอ	16.655615	100.327027
6	ตำบลบ้านไร่ อำเภอบางกระทุ่ม จังหวัดพิษณุโลก	อโต้98	ระยะออกรวง	16.63652	100.236198
7	ตำบลวังอิทก อำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก	พิษณุโลก2	ระยะแตกกอ	16.657483	100.217463
8	ตำบลจี่วงาม อำเภอเมืองพิษณุโลก จังหวัดพิษณุโลก	พิษณุโลก2	ระยะออกรวง	16.662255	100.229323

ตารางที่ 3.2 พื้นที่สำรวจโรคขอบใบแห้งในข้าวช่วงเดือนสิงหาคม 2559

จุดที่	พื้นที่สำรวจโรคขอบใบแห้ง	พันธุ์ข้าว	ระยะเจริญเติบโตของข้าว	พิกัด	
				ละติจูด	ลองจิจูด
1	ตำบลท่าช้าง อำเภอพรหมพิราม	พิษณุโลก2	ระยะออกรวง	16.949388	100.131613
2	บ้านคลองเมฆ ตำบลท่าช้าง อำเภอพรหมพิราม	กข41พวง	ระยะแตกกอ	16.957298	100.117316
3	ตำบลท่าช้าง อำเภอพรหมพิราม	กข29	ระยะออกรวง	16.972214	100.139384
4	ตำบลท่าช้าง อำเภอพรหมพิราม	พิษณุโลก2	ระยะออกรวง	16.958549	100.108477
5	บ้านแม่ระหัน ตำบลชุมแสงสงคราม อำเภอบางระกำ	พิษณุโลก2	ระยะกล้า	16.873856	100.133656
6	ตำบลบ้านกร่าง อำเภอเมืองพิษณุโลก	พิษณุโลก2	ระยะเก็บเกี่ยว	16.873079	100.139299
7	ตำบลบ้านกร่าง อำเภอเมืองพิษณุโลก	พิษณุโลก2	ระยะแตกกอ	16.864016	100.174306
8	บ้านบางแก้ว ตำบลท่านางงาม อำเภอบางระกำ	พิษณุโลก2	ระยะออกรวง	16.823606	100.135288
9	บ้านท่านางงาม ตำบลชุมแสงสงคราม อำเภอบางระกำ	กข51	ระยะแตกกอ	16.851562	100.099044
10	บ้านท่านางงาม ตำบลชุมแสงสงคราม อำเภอบางระกำ	กข61	ระยะออกรวง	16.851562	100.099044
11	บ้านท่านางงาม ตำบลชุมแสงสงคราม อำเภอบางระกำ	สุพรรณบุรี2	ระยะออกรวง	16.851562	100.099044

ตารางที่ 3.3 พื้นที่สำรวจโรคขอบใบแห้งในข้าวช่วงเดือนกันยายน 2559

จุดที่	พื้นที่สำรวจโรคขอบใบแห้ง	จังหวัด	รหัสไอโซเลต	พิกัด	
				ละติจูด	ลองจิจูด
1	ตำบลตลุกเทียม อำเภอพรหมพิราม	พิษณุโลก	Xoo16PK001	17.09500	99.997
2	ตำบลตลุกเทียม อำเภอพรหมพิราม	พิษณุโลก	Xoo16PK002	17.13500	99.992
3	ตำบลตลุกเทียม อำเภอพรหมพิราม	พิษณุโลก	Xoo16PK003	17.16909	100.0033
4	ตำบลตลุกเทียม อำเภอพรหมพิราม	พิษณุโลก	Xoo16PK004	17.17991	100.03371
5	ตำบลห้วยร่วม อำเภอดงเจริญ	พิจิตร	Xoo16PT001.1	15.94505	100.55321
6	ตำบลห้วยร่วม อำเภอดงเจริญ	พิจิตร	Xoo16PT001.2	15.94505	100.55321
7	ตำบลห้วยร่วม อำเภอดงเจริญ	พิจิตร	Xoo16PT002	15.94503	100.5544
8	ตำบลห้วยร่วม อำเภอดงเจริญ	พิจิตร	Xoo16PT003.1	15.93273	100.55435
9	ตำบลห้วยร่วม อำเภอดงเจริญ	พิจิตร	Xoo16PT003.2	15.94505	100.55321
10	ตำบลคลองคะเชนทร์ อำเภอเมืองพิจิตร	พิจิตร	Xoo16PT004	16.47300	100.26467
11	ตำบลห้วยร่วม อำเภอดงเจริญ	พิจิตร	Xoo16PT005	16.36612	100.36491

### 3.2 การจำแนกเชื้อบริสุทธิ์สาเหตุโรคขอบใบแห้งจากพื้นที่สำรวจ

ผลการนำตัวอย่างเมล็ดข้าวและใบจากต้นที่แสดงอาการโรคขอบใบแห้งที่เก็บจากการสำรวจในพื้นที่จังหวัดพิษณุโลกมาจำแนกด้วยวิธี dilution plate method ได้เชื้อโคลนีสีเหลืองซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อ Xoo สาเหตุโรคขอบใบแห้ง โดยสามารถแยกเชื้อ Xoo จากเมล็ดและใบข้าวที่เก็บสำรวจจากตำบลวังน้ำคู้ ตำบลบ้านไร่ ตำบลท่าตาล ตำบลวังวิหก ตำบลวังงาม ตำบลท่าช้าง ตำบลบ้านกร่าง และตำบลชุมแสงสงคราม (ตารางที่ 3.4-3.6) อย่างไรก็ตามเชื้อ Xoo ที่แยกได้นี้เป็นการจำแนกเชื้อจากลักษณะและสีของโคลนีเท่านั้น เมื่อทดสอบการก่อโรคในข้าวพันธุ์ กข47 โดยการปลูกเชื้อในสภาพโรงเรือน ผลการทดสอบพบว่าเชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่สามารถก่อโรคขอบใบแห้งในต้นพันธุ์ทดสอบได้

ตารางที่ 3.4 การแยกเชื้อโรคขอบใบแห้งจากเมล็ดและใบข้าวที่ได้จากการสำรวจเดือนมิถุนายน 2559

พื้นที่สำรวจ	แหล่งที่แยกเชื้อ	เชื้อ Xoo
จุดที่ 1 ตำบลวังน้ำคู้ อำเภอเมืองพิษณุโลก	ใบ	✓
จุดที่ 2 ตำบลบ้านไร่ อำเภอบางกระทุ่ม	ใบและเมล็ด	✓
จุดที่ 3 ตำบลบางกระทุ่ม อำเภอบางกระทุ่ม	ใบ	-
จุดที่ 4 ตำบลท่าตาล อำเภอบางกระทุ่ม	ใบและเมล็ด	-
จุดที่ 5 ตำบลท่าตาล อำเภอบางกระทุ่ม	ใบ	✓
จุดที่ 6 ตำบลบ้านไร่ อำเภอบางกระทุ่ม	ใบและเมล็ด	-
จุดที่ 7 ตำบลวังอิทก อำเภอบางระกำ	ใบ	✓
จุดที่ 8 ตำบลวังงาม อำเภอเมืองพิษณุโลก	ใบและเมล็ด	✓

ตารางที่ 3.5 การแยกเชื้อโรคขอบใบแห้งจากเมล็ดและใบข้าวที่ได้จากการสำรวจเดือนสิงหาคม 2559

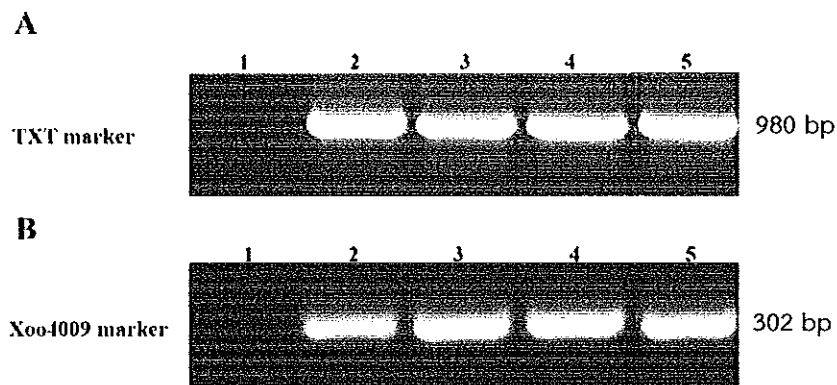
พื้นที่สำรวจ	แหล่งที่แยกเชื้อ	เชื้อ Xoo
จุดที่ 1 ตำบลท่าช้าง อำเภอพรหมพิราม	ใบและเมล็ด	✓
จุดที่ 2 บ้านคลองเมฆ ตำบลท่าช้าง อำเภอพรหมพิราม	ใบ	✓
จุดที่ 3 ตำบลท่าช้าง อำเภอพรหมพิราม	ใบและเมล็ด	✓
จุดที่ 4 ตำบลท่าช้าง อำเภอพรหมพิราม	ใบและเมล็ด	✓
จุดที่ 5 บ้านแม่ระหัน ตำบลชุมแสงสงคราม อำเภอบางระกำ	ใบ	-
จุดที่ 6 ตำบลบ้านกร่าง อำเภอเมืองพิษณุโลก	ใบและเมล็ด	✓
จุดที่ 7 ตำบลบ้านกร่าง อำเภอเมืองพิษณุโลก	ใบ	-
จุดที่ 8 บ้านบางแก้ว ตำบลท่านางงาม อำเภอบางระกำ	ใบและเมล็ด	-
จุดที่ 9 บ้านท่านางงาม ตำบลชุมแสงสงคราม อำเภอบางระกำ	ใบ	✓
จุดที่ 10 บ้านท่านางงาม ตำบลชุมแสงสงคราม อำเภอบางระกำ	ใบและเมล็ด	✓
จุดที่ 11 บ้านท่านางงาม ตำบลชุมแสงสงคราม อำเภอบางระกำ	ใบและเมล็ด	✓

ตารางที่ 3.6 การแยกเชื้อโรคขอบใบแห้งจากเมล็ดและใบข้าวที่ได้จากการสำรวจเดือนกันยายน 2559

พื้นที่สำรวจ	แหล่งที่แยกเชื้อ	เชื้อ Xoo
จุดที่ 1 ตำบลตลุกเทียม อำเภोधรหมพิราม	ใบ	✓
จุดที่ 2 ตำบลตลุกเทียม อำเภोधรหมพิราม	ใบ	✓
จุดที่ 3 ตำบลตลุกเทียม อำเภोधรหมพิราม	ใบ	✓
จุดที่ 4 ตำบลตลุกเทียม อำเภोधรหมพิราม	ใบ	-
จุดที่ 5 ตำบลห้วยร่วม อำเภอดงเจริญ	ใบ	✓
จุดที่ 6 ตำบลห้วยร่วม อำเภอดงเจริญ	ใบ	✓
จุดที่ 7 ตำบลห้วยร่วม อำเภอดงเจริญ	ใบ	✓
จุดที่ 8 ตำบลห้วยร่วม อำเภอดงเจริญ	ใบ	✓
จุดที่ 9 ตำบลห้วยร่วม อำเภอดงเจริญ	ใบ	✓
จุดที่ 10 ตำบลคลองคะเชนทร์ อำเภอเมืองพิจิตร	ใบ	✓
จุดที่ 11 ตำบลห้วยร่วม อำเภอดงเจริญ	ใบ	✓

### 3.3 การตรวจสอบเชื้อ Xoo ที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค PCR

แม้ว่าจะสามารถจำแนกเชื้อ Xoo จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เฉพาะต่อเชื้อ และตรวจสอบการก่อโรคบนข้าวสายพันธุ์อ่อนแอด้วยวิธีการปลูกเชื้อแบบ clipping อย่างไรก็ตาม เพื่อยืนยันพันธุกรรมของเชื้อที่แยกได้ว่าเป็นเชื้อ Xoo จึงตรวจสอบเชื้อ Xoo ที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะต่อเชื้อ Xoo จำนวน 2 คู่ ได้แก่ TXT (Sakhivel *et al.*, 2001) และ Xoo4009 (Lang *et al.*, 2010) ผลการตรวจสอบเชื้อ Xoo ไอโซเลตที่แยกได้จากแปลงนาจังหวัดพิษณุโลกและพิจิตร (Xoo16PK001 Xoo16PK002, Xoo16PT001.2 และ Xoo16PT005) พบว่า TXT ให้ PCR product ขนาด 980 bp และ Xoo4009 ให้ PCR product ขนาด 302 bp (ภาพที่ 3.2) เมื่อโคลนและตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 980-bp TXT PCR product และ 302-bp Xoo4009 PCR product จากไอโซเลต Xoo16PK001 (ภาพที่ 3.3) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 980-bp TXT PCR product มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Xoo และ *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc) 99 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 302-bp Xoo4009 PCR product มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Xoo 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบว่ามี ความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Xoc (ภาพที่ 3.4) ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่าเชื้อที่แยกได้เป็นเชื้อ Xoo และใช้เป็นมาตรฐานในการตรวจสอบเชื้อ Xoo สำหรับการทดสอบโรคขอบใบแห้งบนข้าวโดยวิธีการปลูกเชื้อ



ภาพที่ 3.2 การตรวจสอบเชื้อ *Xoo* ที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค PCR; (A) ตรวจสอบโดย primer TXT และ (B) ตรวจสอบโดย primer Xoo4009; Lane 1, Negative control; Lane 2, Xoo16PK001; Lane 3, Xoo16PK002; Lane 4; Xoo16PT001.2; Lane 5, Xoo16PT005



A

1 GTCAAGCCAACACTGTGTAACCAGGTTTTTCATAGGGCATTCATCGGCACGCGTTTTTCGCC  
 61 GAACATCACCTGGAAGCTTTGCAGAGCCGGTTTCCAGTGATGGATGGACCGCCAGTTCTT  
 121 CGATGCCTCGGCACGGCCAAAACAACGATTTGAGCGCCGAATCGTCGTTGGGGAAAAT  
 181 ACGCCGGTTGCGGGTGAGCTTGCGCATGACCATGTTCAACGATTCGATGGCATTGGTGGT  
 241 GTAGATCACCTTGCGGATCTGCGGCACGAACTGGAAGAACGGGATGATGTTGTCACAGTT  
 301 GCCCCGCCACAAGCGGACCACCGCACGGTATTTGTGCGCCCACTGCGTGTCCAGCGCCTC  
 361 CAGTTCCGCCGTCGCTTCTTCCGCGTGGCCGACTGATAGATGCGCTTGAGCGCAGCCAC  
 421 AACCGCCTTGCTGTTGTCTGTGTTGACGTAGCGCAGGCTGGCCCGCACAAATGCACAAT  
 481 GCACAGTTGCGTGAGCGTCTGCGGAAACACCGCTTGACACCGCTTCGGGCAGGCCCTTCAA  
 541 GCCATCCATGCAGGCGATGTAGATGTGCGGCACGCCGCGATGACGCAGTTCCGGTCAACAC  
 601 CGACAGCCAGTATTGGGCGCCCTCGTGTTCAGCCAACCACAGGCCAAGCACTTCCTTCTT  
 661 CCCGCGCAGGTTGACCCCCAGCACCACGTGCGCGGCCCTGTTGATGACCTGCTTGTGTG  
 721 CTGCACCTTACCACGATGCCGTCCAGCCACACGATCGGATAGATCGGCTCCAGCGGCCCT  
 781 CGATTGCCATGCCCGCGCTCCTCCAGCACCGCGTCCGTCACCTGTGCGATCAACGCATG  
 841 CGATATCTCCACCCATACAGTCCACCAGCGCAGACTCGATGTGCGCGTGGTCATGCC  
 901 GCGCGGTACAACGCCAGAATCTTCTCCTCCATCCCCGCCAGCCGCACCTGGCGCTTCTT  
 961 CACCAACTGTGGCGCGAACG

B

1 CCTTCATTTCCGTCGTATCCACGAATGGCTCCGGGCGCGCACGGAAGTCCCGACGAGG  
 61 GCAATAAGGAAGTCTGTCGTCGTCCGATCGAGAACCAGCGTGTGGTTCGCTATCGTGG  
 121 TCATCCGTTCGCTGGCATGCCTTTCATTGACGTGAATCTCTCGACGATTCAGTTCGATA  
 181 CCAGCCGTTCTACACAATGCAAGGTCGACACGGCGACACCCAGGACACCCGCTGGTCGA  
 241 ATGCCCTTACCACCCTCAACAACCAGAGCGGAAGGTTCCGGTGTGGTGGTTCTTCATGC  
 301 AT

ภาพที่ 3.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product จาก TXT marker และ Xoo4009 marker ที่ตรวจสอบในเชื้อ Xoo ไส้หลอด Xoo16PK001; (A) 980-bp TXT PCR product และ (B) 302-bp Xoo4009 PCR product

A

Sequences producing significant alignments:

Select All None Selected 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig1</a>	1760	15726	100%	0.0	99%	CP011579.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig2</a>	1760	15743	100%	0.0	99%	CP011577.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig3</a>	1760	19266	100%	0.0	99%	CP011575.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig4</a>	1760	21600	100%	0.0	99%	CP011574.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig5</a>	1760	19825	100%	0.0	99%	CP011571.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig6</a>	1760	16737	100%	0.0	99%	CP011570.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig7</a>	1760	19862	100%	0.0	99%	CP011567.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig8</a>	1760	19834	100%	0.0	99%	CP011565.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig9</a>	1760	1760	100%	0.0	99%	CP011563.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig10</a>	1755	15760	100%	0.0	99%	CP011562.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig11</a>	1755	15743	100%	0.0	99%	CP011561.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig12</a>	1755	15739	100%	0.0	99%	CP011560.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig13</a>	1755	19199	100%	0.0	99%	CP011557.2
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig14</a>	1755	1765	100%	0.0	99%	CP011557.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig15</a>	1755	15743	100%	0.0	99%	CP011556.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig16</a>	1749	2297	100%	0.0	95%	CP011555.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig17</a>	1749	2297	100%	0.0	95%	CP011554.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig18</a>	1749	15582	100%	0.0	95%	CP011553.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig19</a>	1744	2692	100%	0.0	95%	CP011552.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig20</a>	1744	2692	100%	0.0	95%	CP011552.2

B

Sequences producing significant alignments:

Select All None Selected 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig1</a>	558	558	100%	2e-155	100%	CP011574.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig2</a>	558	558	100%	2e-155	100%	CP011579.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig3</a>	558	558	100%	2e-155	100%	CP011576.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig4</a>	558	558	100%	2e-155	100%	CP011577.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig5</a>	558	558	100%	2e-155	100%	CP011576.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig6</a>	558	558	100%	2e-155	100%	CP011578.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig7</a>	558	558	100%	2e-155	100%	CP011574.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig8</a>	558	558	100%	2e-155	100%	CP011573.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig9</a>	558	558	100%	2e-155	100%	CP011570.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig10</a>	558	558	100%	2e-155	100%	CP011571.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig11</a>	558	558	100%	2e-155	100%	CP011572.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig12</a>	558	558	100%	2e-155	100%	CP011561.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig13</a>	558	558	100%	2e-155	100%	CP011570.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig14</a>	558	558	100%	2e-155	100%	CP011572.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig15</a>	558	558	100%	2e-155	100%	CP011561.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig16</a>	558	558	100%	2e-155	100%	CP011572.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig17</a>	558	558	100%	2e-155	100%	CP011572.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig18</a>	558	558	100%	2e-155	100%	CP011572.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig19</a>	558	558	100%	2e-155	100%	CP011572.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xanthomonas oryzae pv. oryzae strain FX0221, contig136 contig20</a>	558	558	100%	2e-155	100%	CP011572.1

ภาพที่ 3.4 ผล Blastn ของลำดับนิวคลีโอไทด์ 980-bp TXT PCR product และ 302-bp Xoo4009 PCR product; A, 980-bp TXT PCR product; B, 302-bp Xoo4009 PCR product



### 3.4 การตรวจสอบจีโนไทป์ของยีน *Xa21* ในข้าวพันธุ์ กข47 และข้าวพันธุ์ IRBB21

การตรวจสอบข้าวพันธุ์ กข47 ต้นที่ใช้เป็นพันธุ์ผู้รับและข้าวพันธุ์ IRBB21 ต้นที่ใช้เป็นพันธุ์ผู้ให้ด้วย pTA248 marker โดยวิธี Direct PCR พบว่าข้าวพันธุ์ กข47 ให้ PCR product เดียวขนาดประมาณ 720 bp ขณะที่ข้าวพันธุ์ IRBB21 ให้ PCR product เดียวขนาดประมาณ 925 bp (ภาพที่ 3.5A) ส่วนการตรวจสอบโดยใช้ Xa21A marker ให้ PCR product เดียวขนาดประมาณ 1152 bp เฉพาะในตัวอย่างข้าวพันธุ์ IRBB21 (ภาพที่ 3.5B) ผลที่ได้แสดงว่าข้าวพันธุ์ กข47 ไม่มียีน *Xa21* อยู่ โดยจีโนไทป์ของยีน *Xa21* อยู่ในสภาพ homozygous recessive (-/-) ขณะที่ข้าวพันธุ์ IRBB21 มีจีโนไทป์ของยีน *Xa21* อยู่ในสภาพ homozygous (*Xa21/Xa21*) การตรวจสอบด้วย Xa21A marker ยืนยันได้ว่าในข้าวพันธุ์ กข47 ไม่มียีน *Xa21* อยู่ขณะที่ข้าวพันธุ์ IRBB21 มียีน *Xa21* อยู่จริง ทั้งนี้ได้ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ขนาด 1152 bp แล้วพบว่าเป็นชิ้นส่วนของยีน *Xa21* (รายงานฉบับสมบูรณ์ (ปีที่ 1), 2558)

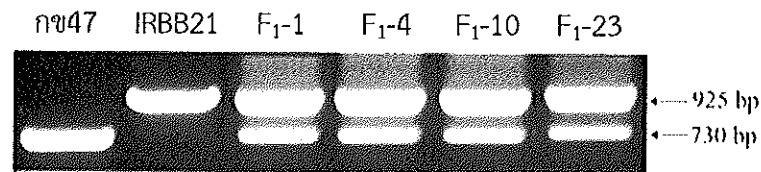


ภาพที่ 3.5 การตรวจสอบจีโนไทป์ของยีน *Xa21* ในข้าวพันธุ์ กข47 และข้าวพันธุ์ IRBB21 โดยวิธี Direct PCR; A, ตรวจสอบโดยใช้ pTA248 marker; B, ตรวจสอบโดยใช้ Xa21A marker

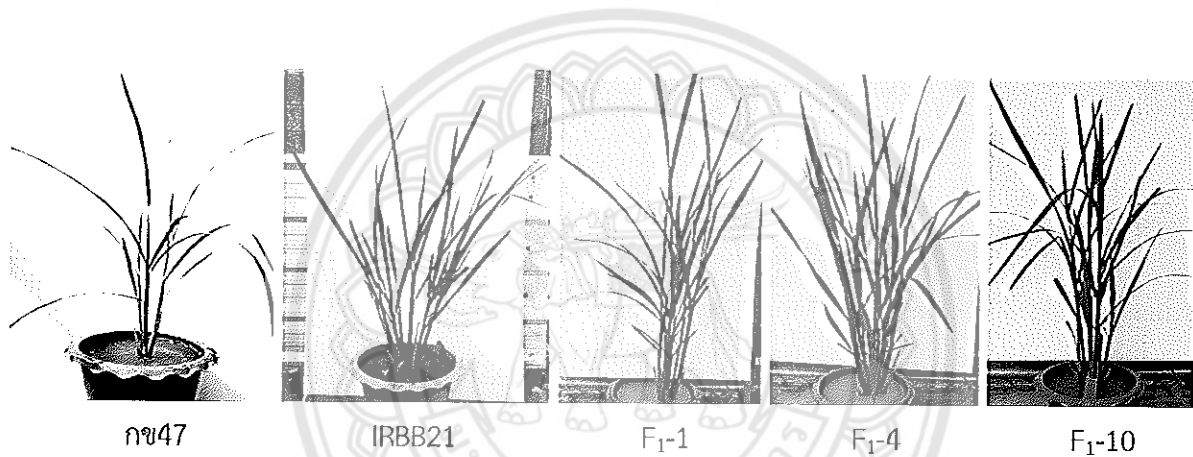
### 3.5 การสร้างและคัดเลือกลูกผสมกลับ $BC_2F_1 - BC_4F_1$

ผสมเกสรข้าวพันธุ์ กข47 (พันธุ์แม่) และข้าวพันธุ์ IRBB21 (พันธุ์พ่อ) ต้นที่ตรวจสอบจีโนไทป์ของยีน *Xa21* แล้วจำนวน 100 ดอก ตัดเมล็ดจำนวน 55 เมล็ด หลังจากเพาะเมล็ดและตรวจสอบต้นกล้าด้วย pTA248 marker พบว่าเป็นต้นลูกผสม  $F_1$  ที่ให้รูปแบบ PCR product จำนวน 2 แถบขนาด 730 bp และ 925 bp เพียง 8 ต้น แสดงว่าเมล็ดที่ได้ส่วนใหญ่มาจากการผสมตัวเองของข้าวพันธุ์ กข47 อย่างไรก็ตามลูกผสม  $F_1$  ที่ได้เป็นไปตามทฤษฎี monohybrid cross ซึ่งผลจากการผสมกันระหว่างพ่อแม่ที่เป็น homozygous recessive (-/-) กับ homozygous dominant (*Xa21/Xa21*) จะให้ลูกผสม  $F_1$  ทั้งหมดมีจีโนไทป์เป็น heterozygous (*Xa21/-*) สุ่มเลือกต้นลูกผสม  $F_1$  4 ต้นจาก 8 ต้น (ภาพที่ 3.6) มาเพื่อใช้ในการสร้างลูกผสมกลับ  $BC_1F_1$  โดยพบว่าที่อายุ 120 วัน ต้นลูกผสม  $F_1$  ทั้ง 4 ต้นมีความสูงเฉลี่ย 116.8 เซนติเมตรซึ่งสูงกว่าพันธุ์แม่ กข47 (90-100 เซนติเมตร) และพันธุ์พ่อ IRBB21 (80 เซนติเมตร) ส่วนอายุการออกดอกประมาณ 80-90 วัน ซึ่งจะช้ากว่าพันธุ์แม่ กข47 (ประมาณ

70-80 วัน) แต่ใกล้เคียงกับพันธุ์พ่อ IRBB21 (ประมาณ 80-85 วัน) และลักษณะกอของลูกผสม  $F_1$  คล้ายกับพันธุ์พ่อ IRBB21 (ภาพที่ 3.7)



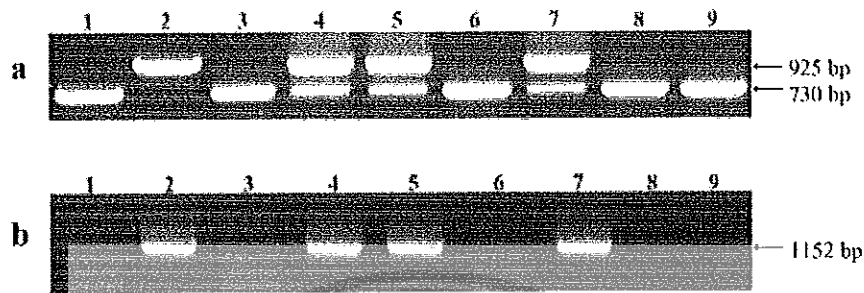
ภาพที่ 3.6 การตรวจสอบจีโนไทป์ของยีน *Xa21* ในลูกผสม  $F_1$  ด้วยวิธี Direct PCR โดยใช้ pTA248 marker



ภาพที่ 3.7 ลักษณะกอของข้าวพันธุ์ กข47 ข้าวพันธุ์ IRBB21 และลูกผสม  $F_1$  อายุ 80 วันปลูกในสภาพโรงเรือน

ผลการผสมกลับข้าวพันธุ์ กข47 กับข้าวลูกผสม  $F_1$  ทั้ง 4 สายพันธุ์เพื่อสร้างลูกผสมกลับ  $BC_1F_1$  ได้เมล็ดจากการผสมกลับสายพันธุ์  $F_1-1/BC_1$  จำนวน 45 เมล็ด  $F_1-4/BC_1$  จำนวน 63 เมล็ด  $F_1-10/BC_1$  จำนวน 86 เมล็ด และ  $F_1-23/BC_1$  จำนวน 12 เมล็ด แล้วทำการคัดเลือกต้น  $BC_1$  ที่มียีน *Xa21* ( $Xa21/-$ ) จากลูกผสมกลับเหล่านี้ด้วยวิธี Direct PCR โดยใช้ pTA248 marker และยืนยันการคงอยู่ของยีน *Xa21* โดยใช้ Xa21A marker ผลการตรวจสอบพบว่าต้น  $BC_1F_1$  ทุกต้นที่ให้ผล positive กับ pTA248 marker ให้ผล positive กับ Xa21A marker ด้วยเช่นกัน (ภาพที่ 3.8) และได้คัดเลือกลูกผสมกลับรุ่นที่ 1 ( $BC_1F_1$ ) ที่มียีน *Xa21* ( $Xa21/-$ ) จาก  $F_1-1/BC_1$  มาจำนวน 2 สายพันธุ์  $F_1-4/BC_1$  จำนวน 4 สายพันธุ์ และ  $F_1-10/BC_1$  จำนวน 9 สายพันธุ์ สำหรับใช้สร้างลูกผสมกลับ  $BC_2F_1$  โดยคัดเลือกลูกผสมกลับ  $BC_2F_1$  ที่มียีน *Xa21* ( $Xa21/-$ ) จากต้น  $F_1-1/BC_1-2$  (line  $BC_1F_1-1-2$ ) สำหรับใช้สร้างลูกผสมกลับ  $BC_3F_1$  แล้วคัดเลือกลูกผสมกลับ  $BC_3F_1$  ที่มียีน *Xa21* ( $Xa21/-$ ) จากต้น  $F_1-1/BC_1-2/BC_2-2$  (line  $BC_2F_1-1-2-2$ ) และ  $F_1-1/BC_1-2/BC_2-5$  (line  $BC_2F_1-1-2-5$ ) สำหรับใช้สร้างลูกผสมกลับ  $BC_4F_1$  แล้วคัดเลือกลูกผสมกลับ  $BC_4F_1$  ที่มียีน *Xa21* ( $Xa21/-$ ) จากต้น  $F_1-1/BC_1-2/BC_2-2/BC_3-12$  (line  $BC_3F_1-1-2-2-$

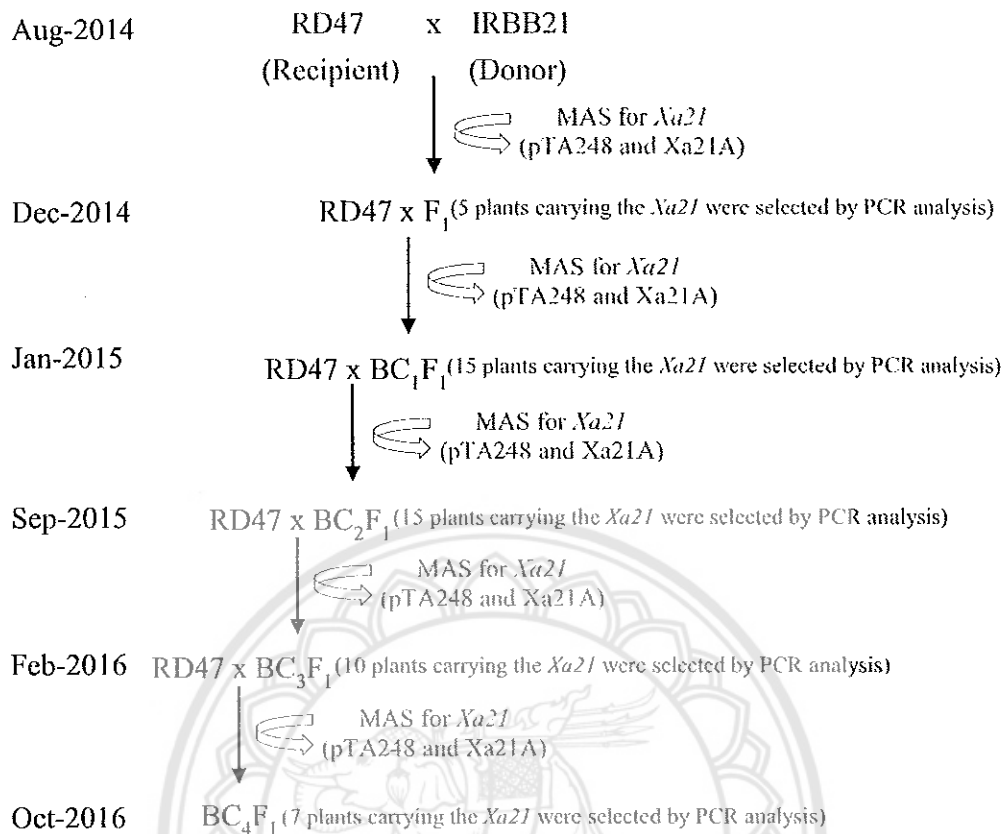
12) และต้น F<sub>1</sub>-1/BC<sub>1</sub>-2/BC<sub>2</sub>-5/BC<sub>3</sub>-14 (line BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>-1-2-5-14) ซึ่งมีลักษณะต้นพันธุ์ (plant type) ใกล้เคียงกับพันธุ์ กข47 สำหรับใช้สร้างลูกผสมกลับ BC<sub>5</sub>F<sub>1</sub> ต่อไป ตารางที่ 3.7 และภาพที่ 3.9 แสดงภาพรวมของการปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข47 โดยการถ่ายยีน *Xa21* จากข้าวพันธุ์ IRBB21 ผ่านการผสมข้ามและการผสมกลับจนได้ BC<sub>4</sub>F<sub>1</sub>



ภาพที่ 3.8 ตัวอย่างการตรวจสอบจีโนไทป์ของยีน *Xa21* ด้วยวิธี Direct PCR ในลูกผสมกลับ BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>; a, ตรวจสอบโดยใช้ pTA248 marker; b, ตรวจสอบโดยใช้ Xa21A marker; 1, กข47; 2, IRBB21; 3-9, BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> candidates

ตารางที่ 3.7 ภาพรวมการตรวจสอบและคัดเลือกในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข47 โดยการถ่ายยีน *Xa21* จากข้าวพันธุ์ IRBB21 ผ่านการผสมข้ามและการผสมกลับจนได้ลูกผสมกลับ BC<sub>4</sub>F<sub>1</sub>

ชั่วรุ่น	เมล็ดลูกผสม		การตรวจสอบยีน <i>Xa21</i>		จำนวนต้นที่ใช้ ในโปรแกรม ปรับปรุงพันธุ์
	จำนวนเมล็ด ทั้งหมด	จำนวนเมล็ด ที่ปลูก	จำนวนต้น	จำนวนต้น	
			ที่ตรวจสอบ	ที่มียีน	
F <sub>1</sub>	30	30	30	5	4
BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub>	208	68	68	15	4
BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub>	50	50	50	15	4
BC <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	43	43	32	10	2
BC <sub>4</sub> F <sub>1</sub>	30	30	22	7	4



ภาพที่ 3.9 ภาพรวมของการปรับปรุงพันธุ์ข้าว กข47 โดยการถ่ายยีน *Xa21* จากข้าวพันธุ์ IRBB21 ผ่านการผสมข้ามและการผสมกลับจนได้ BC<sub>4</sub>F<sub>1</sub>

### 3.6 การทดสอบความต้านทานโรคขอบใบแห้งในลูกผสมกลับ BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub>

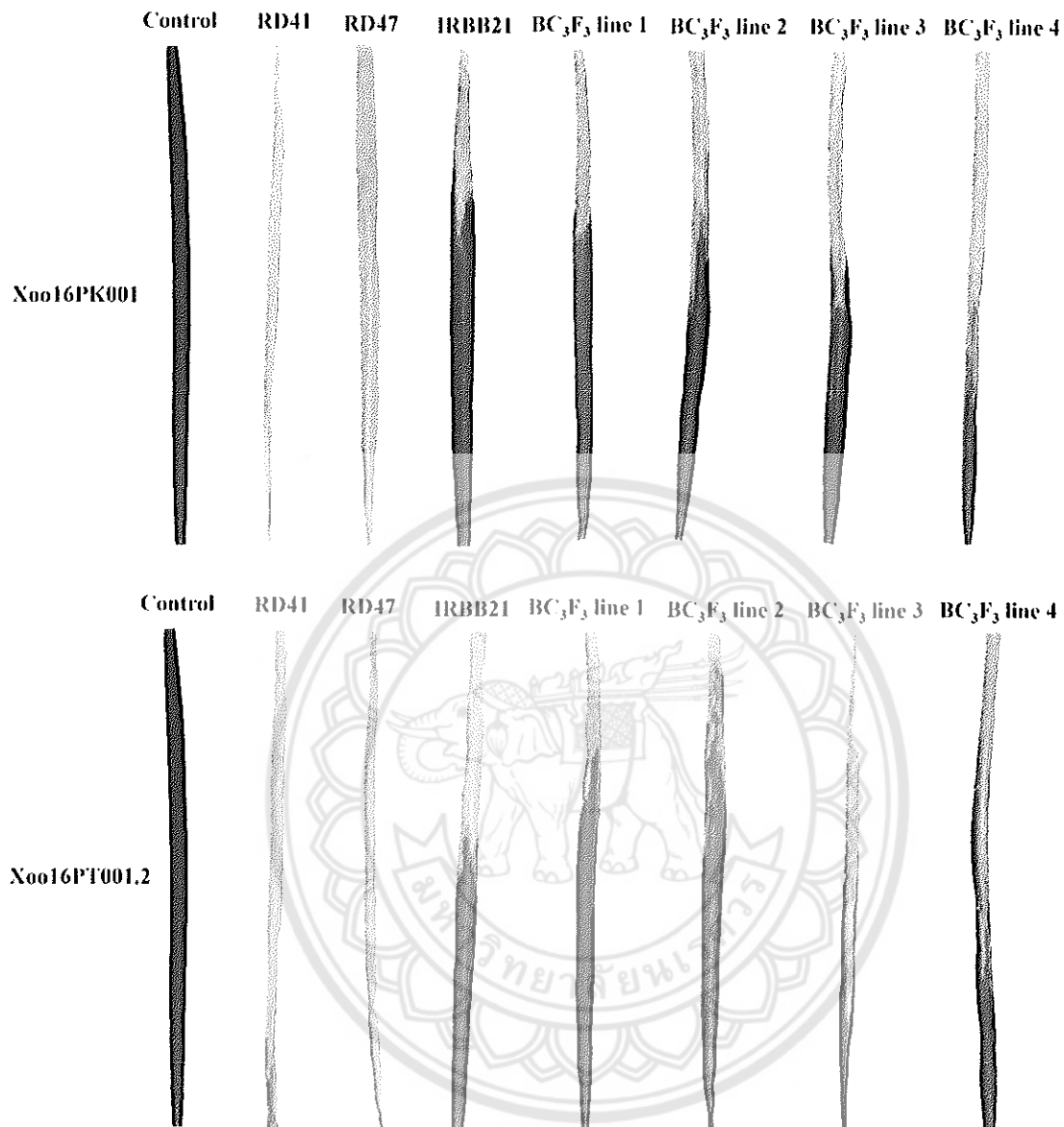
สร้างลูกผสมกลับ BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> โดยการผสมตัวเองลูกผสมกลับ BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>-1-2-2-12 และ BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>-1-2-2-13 แล้วคัดเลือกต้น BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> line B (BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-1-2-2-12.B) และ line C (BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>-1-2-2-13.C) ที่มีสภาพจีโนไทป์ของยีน *Xa21* เป็น homozygous (*Xa21/Xa21*) โดยเครื่องหมายโมเลกุล pTA248 แล้วปล่อยให้ผสมตัวเองเป็นลูกผสมกลับ BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> ซึ่งมีสภาพจีโนไทป์เป็น homozygous *Xa21* การทดสอบระดับความต้านทานโรคขอบใบแห้งในลูกผสมกลับ BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> โดยการปลูกเชื้อ Xoo ไอโซเลต Xoo16PK001 และ Xoo16PT001.2 ด้วยวิธี clipping ในสภาพโรงเรือน และวัดความยาวแผลที่เกิดขึ้น 21 วันหลังการให้เชื้อ พบว่า ลูกผสมกลับ BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> มีระดับความต้านทานดีกว่าพันธุ์แม่ กข47 ในระดับใกล้เคียงกับพันธุ์พ่อ IRBB21 อย่างไรก็ตามผลความยาวของบาดแผลยังจัดอยู่ในระดับค่อนข้างอ่อนแอดตามเกณฑ์ของ IRRI (ตารางที่ 3.8 และภาพที่ 3.10) ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่ายีน *Xa21* สามารถเพิ่มความต้านทานให้ข้าวพันธุ์ กข47 แต่ยังไม่สามารถทำให้เกิดความต้านทานโดยสมบูรณ์

ตารางที่ 3.8 ความยาวของบาดแผล (LL) และการประเมินระดับความต้านทานต่อเชื้อ *Xoo* ไอโซเลต Xoo16PK001 และ Xoo16PT001.2 ของข้าวพันธุ์ IRBB21 กข47 และลูกผสมกลับ BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> ตามวิธีของ IRRI

Rice cultivar	Control (Water)	Xoo16PK001		Xoo16PT001.2	
		LL (cm)	Score	LL (cm)	Score
IRBB21	0.27a ± 0.95	10.11e ± 0.91	MS	13.15c ± 0.84	MS
RD47	0.90a ± 0.11	25.56a ± 0.95	S	22.86a ± 0.80	S
BC <sub>3</sub> F <sub>3</sub> -1-2-2-12.B.1	0.61a ± 0.15	10.88e ± 0.82	MS	12.91c ± 0.82	MS
BC <sub>3</sub> F <sub>3</sub> -1-2-2-12.B.2	0.32a ± 0.16	13.89d ± 0.79	MS	11.23c ± 0.91	MS
BC <sub>3</sub> F <sub>3</sub> -1-2-2-13.C.3	0.13a ± 0.15	17.17c ± 0.88	S	18.80b ± 1.29	S
BC <sub>3</sub> F <sub>3</sub> -1-2-2-13.C.4	0.14a ± 0.23	20.18b ± 0.96	S	18.52b ± 0.85	S

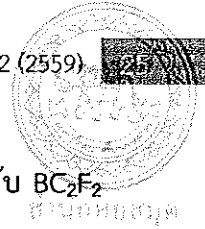
ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย ของความยาวบาดแผลจากใบ 30 ใบของข้าวแต่ละพันธุ์ที่ทดสอบ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติตามวิธี Duncan's New Multiple-Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p = 0.05$ )





ภาพที่ 3.10 ตัวอย่างบาดแผลโรคขอบใบแห้งบนใบข้าวของข้าวพันธุ์ กข41 (null-*Xa21*) กข47 (null-*Xa21*) IRBB21 (homozygous *Xa21*) และ BC<sub>3</sub>F<sub>3</sub> (homozygous *Xa21*) หลังปลูกเชื้อ Xoo16PK001 และ Xoo16PT001.2 เป็นเวลา 21 วัน

1039432



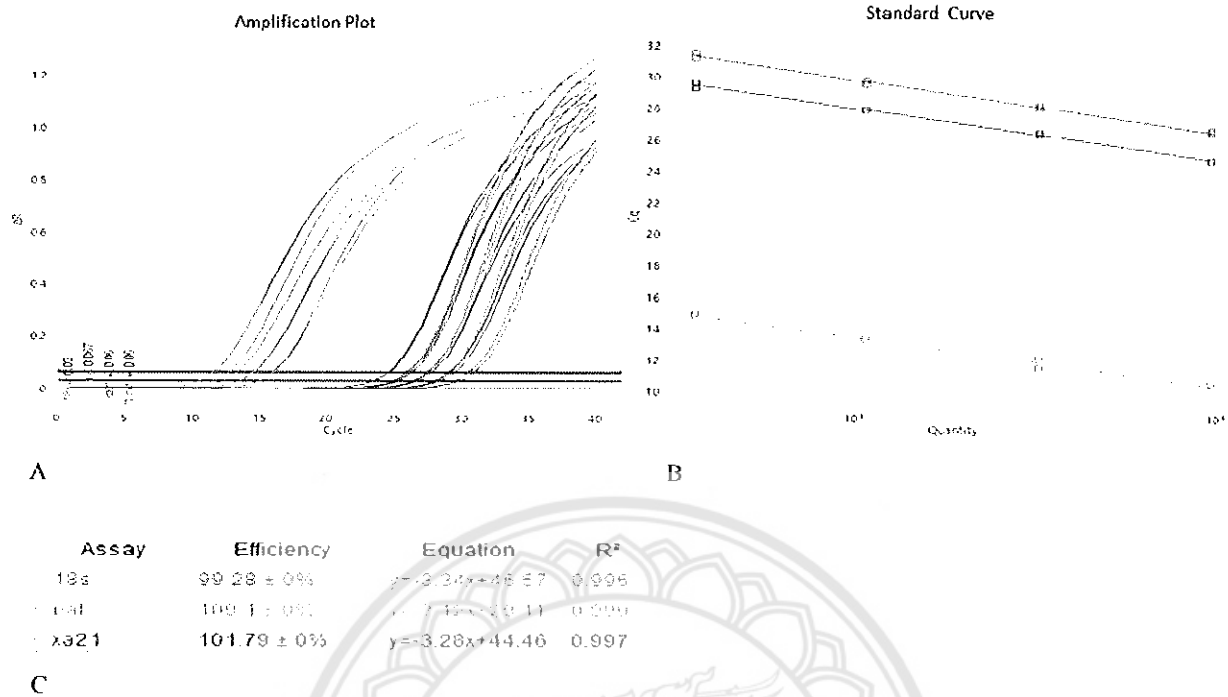
### 3.7 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Xa21* และ *PAL* ในข้าวพันธุ์ IRBB21 และลูกผสมกลับ BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> ภายหลังปลูกเชื้อ *Xoo* โดย real time RT-PCR

ทำการคัดเลือกลูกผสมกลับ BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> ที่มีสภาพจีโนไทป์แบบ heterozygous-*Xa21* โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล pTA248 ที่ได้จากการผสมตัวเองของต้น BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>-1-2-2 สำหรับใช้ตรวจสอบการตอบสนองของยีน *Xa21* และ *PAL* ต่อเชื้อ *Xoo* เปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อ IRBB21 โดยใช้ยีน *18s rRNA* เป็นยีนอ้างอิง (reference gene)

ในการหาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วย real time RT-PCR ใช้ cDNA แม่แบบที่เจือจาง 4 เท่า (4-fold serial dilution) จากตัวอย่างพันธุ์พ่อ IRBB21 และลูกผสมกลับ BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>-1-2-2.heterozygous-*Xa21* สำหรับตรวจสอบประสิทธิภาพของปฏิกิริยา และสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยพล็อตกราฟค่า log ของปริมาณแอมพลิจูดเริ่มต้นต่อค่า C<sub>t</sub> ที่ได้ระหว่างการเพิ่มจำนวนของแต่ละความเข้มข้น (ภาพที่ 3.11) ค่า coefficient of determination (R<sup>2</sup>) ของ linear regression line และ amplification efficiency (E) สำหรับยีน *18s rRNA* *PAL* และ *Xa21* ที่วิเคราะห์ได้ แสดงให้เห็นว่า ปฏิกิริยา real time RT-PCR อยู่ในสถานะที่เหมาะสม โดยมีค่า R<sup>2</sup> > 0.980 และ E = 90-110 % (ภาพที่ 3.12C) (Ish-Shalom and Lichter, 2010; Freeman, 2013; Wagner, 2013)

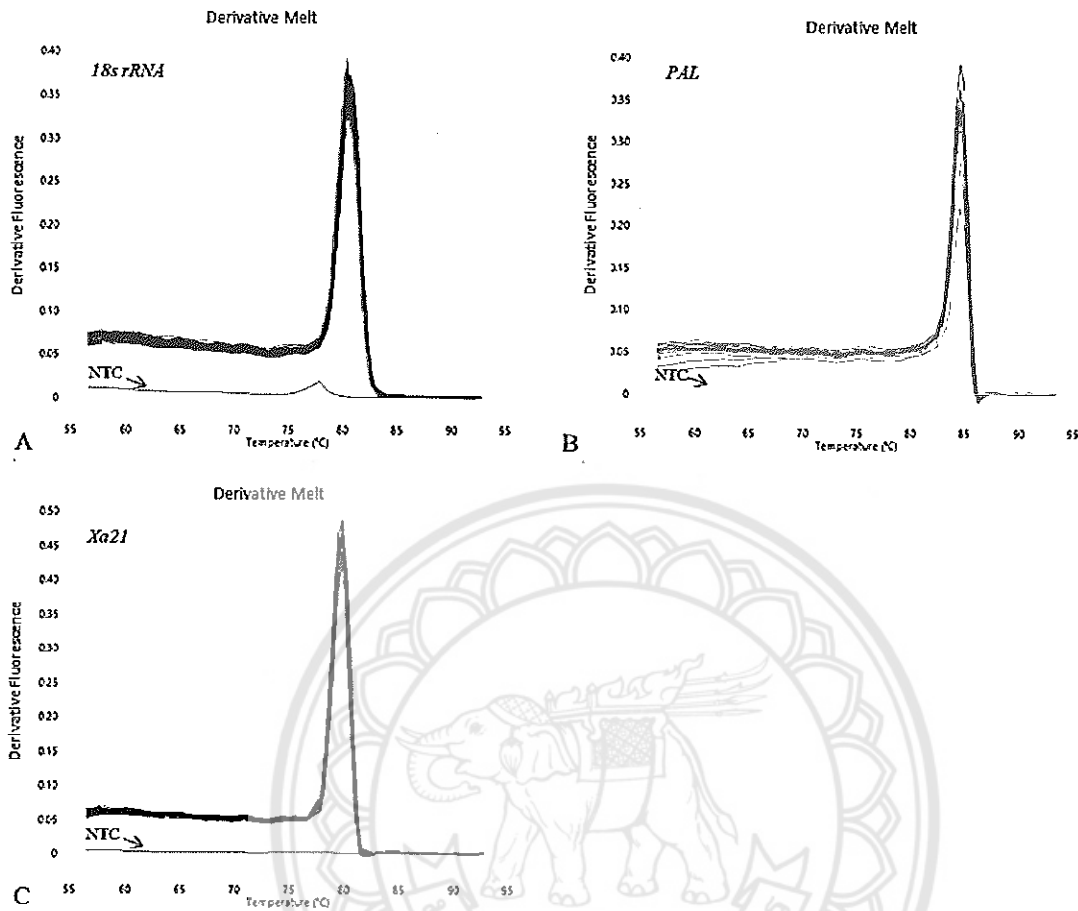
ในการตรวจสอบการตอบสนองของยีน *Xa21* และ *PAL* ต่อเชื้อ *Xoo* ทำการปลูกเชื้อ *Xoo* สายพันธุ์ PLS'008 บนใบของต้นข้าวพันธุ์ IRBB21 และลูกผสมกลับ BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>-1-2-2.heterozygous-*Xa21* ในระยะ 6 ใบ (6-leaf stage) อายุประมาณ 55-60 วัน โดยวิธีการตัดใบ หรือ clipping method (Kauffman, et al., 1973) วิเคราะห์ปริมาณ RNA ของยีน *Xa21* และ *PAL* ที่เวลา 0 24 48 และ 72 ชั่วโมง และ 7 วัน หลังการปลูกเชื้อ โดยใช้การตัดใบด้วยกรรไกรปลอดเชื้อเป็นชุดควบคุม การทำ real time RT-PCR ใช้ cDNA ของแต่ละตัวอย่าง ทำ 3 ซ้ำ โดยชุดควบคุมเป็นปฏิกิริยาที่ไม่มีดีเอ็นเอแอมพลิจูด วิเคราะห์ melting-curve หลังการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ 45 รอบ ค่าเฉลี่ย C<sub>t</sub> ของยีนอ้างอิง *18s rRNA* ใช้เปรียบเทียบอัตราการแสดงออกของยีน *Xa21* และ *PAL* ในชุดตัวอย่าง ผลการตรวจสอบ melting-curve ของทั้ง 3 ยีน ได้กราฟยอดเดียว (single peak) แสดงว่าไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะสูงและให้ PCR product เพียงชนิดเดียว (ภาพที่ 3.12)

2564  
SB  
609  
.R5  
จชชก  
2562



ตารางที่ 3.11 กราฟมาตรฐานสำหรับประเมินสถานะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา real time RT-PCR โดยการเจือจาง เหมเพลท 4 เท่า (4-fold dilutions) (A) Amplification curves of the dilution series (B) Standard curve with the Ct plotted against the log of the starting quantity of templates for each dilution (C) % efficiency for each primer





ภาพที่ 3.12 ความจำเพาะของผลผลิต real time RT-PCR สำหรับ 3 ยีน จากการทำ 3 ซ้ำ พร้อมกับชุดควบคุม (no template control, NTC) (A) Melting curve of *18s rRNA*, (B) Melting curve of *PAL*, (C) Melting curve of *Xa21*

### การแสดงผลของยีน *Xa21*

การตรวจสอบการแสดงผลของยีน *Xa21* ในต้น  $BC_2F_2$ -1-2-2.heterozygous-*Xa21* และ IRBB21 หลังปลูกเชื้อ *Xoo* นาน 24 48 72 ชั่วโมง และ 7 วัน พบว่า ผลที่ได้จากแต่ละซ้ำของตัวอย่างมีความแตกต่างกันภายในซ้ำ (ภาคผนวก 1) ค่าเฉลี่ยของยีน *Xa21* ในต้น  $BC_2F_2$ -1-2-2.heterozygous-*Xa21* แสดงแนวโน้มของการถูกยับยั้งการแสดงผลภายใน 24 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ และไม่พบแนวโน้มการถูกชักนำให้แสดงออกใน 3 และ 7 วันหลังปลูกเชื้อ ขณะที่ยีน *Xa21* ในต้น IRBB21 ถูกชักนำให้แสดงออกช่วง 48-72 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ อย่างไรก็ตาม การแสดงผลลดลงภายใน 7 วัน (ตารางที่ 3.7 และภาพที่ 3.13) การติดตามการแสดงผลของยีน *Xa21* ในช่วง 7 วันหลังการปลูกเชื้อ แสดงให้เห็นรูปแบบการแสดงผลที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์ IRBB21 ซึ่งเป็นผู้ให้ยีน *Xa21*

และลูกผสมกลับ BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>-1-2-2.heterozygous-Xa21 อาจบ่งชี้ได้ว่าองค์ประกอบทางพันธุกรรม (genetic background) ที่ต่างกันของ IRBB21 และ BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>-1-2-2.heterozygous-Xa21 มีผลต่อการแสดงออกของยีน Xa21 ภายหลังจากได้รับเชื้อ Xoo ทั้งนี้ Century et al. (1999) ได้รายงานไว้ว่าการแสดงออกของยีน Xa21 ไม่ขึ้นกับระยะการพัฒนาระยะการเกิดบาดแผล หรือการติดเชื้อ Xoo และไม่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคขอบใบแห้งผ่าน Xa21 จึงได้ให้ข้อเสนอไว้ว่าความต้านทานผ่าน Xa21 น่าจะถูกควบคุมหลังการถอดรหัส (post-transcription) หรือโดยปัจจัยอื่น Jiang et al. (2013) รายงานว่า XA21 binding protein 25 (XB25) ซึ่งอยู่ในกลุ่ม plant-specific ankyrin-repeat (PANK) family จำเป็นต่อการคงความต้านทานโรคขอบใบแห้งผ่าน Xa21 และไม่นานมานี้ Vo et al. (2018) เสนอแนะว่า OsWRKY67 เป็นปัจจัยหนึ่งที่ควบคุมความต้านทานโรคขอบใบแห้งผ่าน Xa21

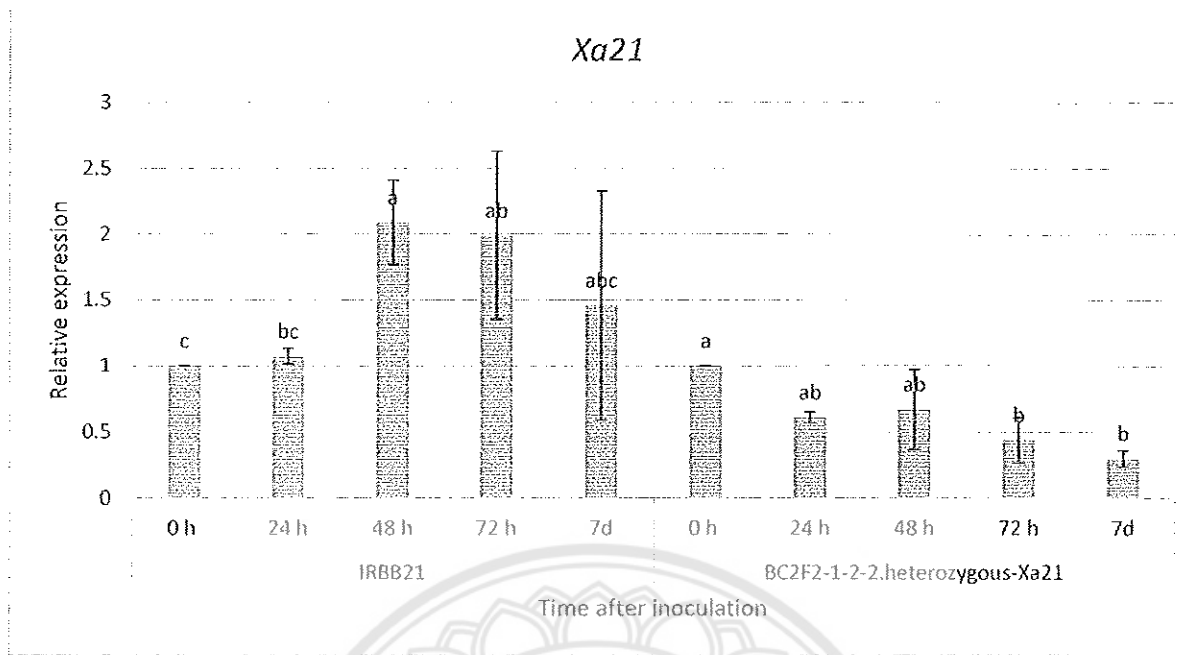
#### การแสดงออกของยีน *OsPAL4*

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *OsPAL4* ในต้น BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>-1-2-2.heterozygous-Xa21 ไม่สามารถตรวจวัดการแสดงออกได้ตั้งแต่ที่เวลา 0 ชั่วโมง หลังการปลูกเชื้อ Xoo แม้จะทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทั้งนี้ น่าจะเกิดความผิดพลาดในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของการทดลอง ขณะที่ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *OsPAL4* ในต้น IRBB21 พบว่า ค่าเฉลี่ยแสดงว่ายีน *OsPAL4* ถูกชักนำให้แสดงออกภายใน 24 ชั่วโมงแรก และค่อยเพิ่มขึ้นจนถึง 72 ชั่วโมง หลังการปลูกเชื้อ อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของยีนลดลงในวันที่ 7 หลังการปลูกเชื้อ (ตารางที่ 3.9 และภาพที่ 3.14) แต่การแสดงออกไม่ต่างกันทางสถิติในแต่ละเวลาที่ตรวจสอบ เนื่องจากค่าความเบี่ยงเบนสูง อันเกิดจากความแปรปรวนของข้อมูลจากตัวอย่าง 3 ซ้ำ (ภาคผนวก 2) เมื่อพิจารณาแต่ละซ้ำ พบว่า มีเพียงซ้ำเดียวจาก 3 ซ้ำที่มีการชักนำการแสดงออก ขณะที่อีก 2 ซ้ำ การแสดงออกถูกยับยั้ง อย่างไรก็ตามรูปแบบการแสดงออกของทั้ง 3 ซ้ำ มีทิศทางเหมือนกันคือ การแสดงออกเพิ่มขึ้นต่อเนื่องจาก 24 ชั่วโมง และสูงสุดที่ 72 ชั่วโมง หากเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีน *Xa21* และ *OsPAL4* ในต้น IRBB21 จะเห็นว่า *Xa21* ถูกชักนำให้มีการแสดงออกก่อน *OsPAL4* ซึ่งสอดคล้องกับความเข้าใจที่มาก่อนหน้านี้ว่า *Xa21* เป็น receptor-like protein kinase ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณ (receptor) บริเวณผิวเซลล์ที่จดจำ avirulent effector หรือ ligand ของเชื้อ Xoo (Song et al., 1995) แล้วไปกระตุ้น intracellular kinase ที่ทำให้เกิดระบบการป้องกันตัวเอง ขณะที่ยีน *PAL* ในข้าวจะถูกกระตุ้นระหว่างที่ระบบป้องกันตัวเองถูกชักนำหลังการจดจำระหว่างยีนต้านทานโรค (resistance (R) gene) กับ effector (reviewed in Tonnessen et al., 2015)

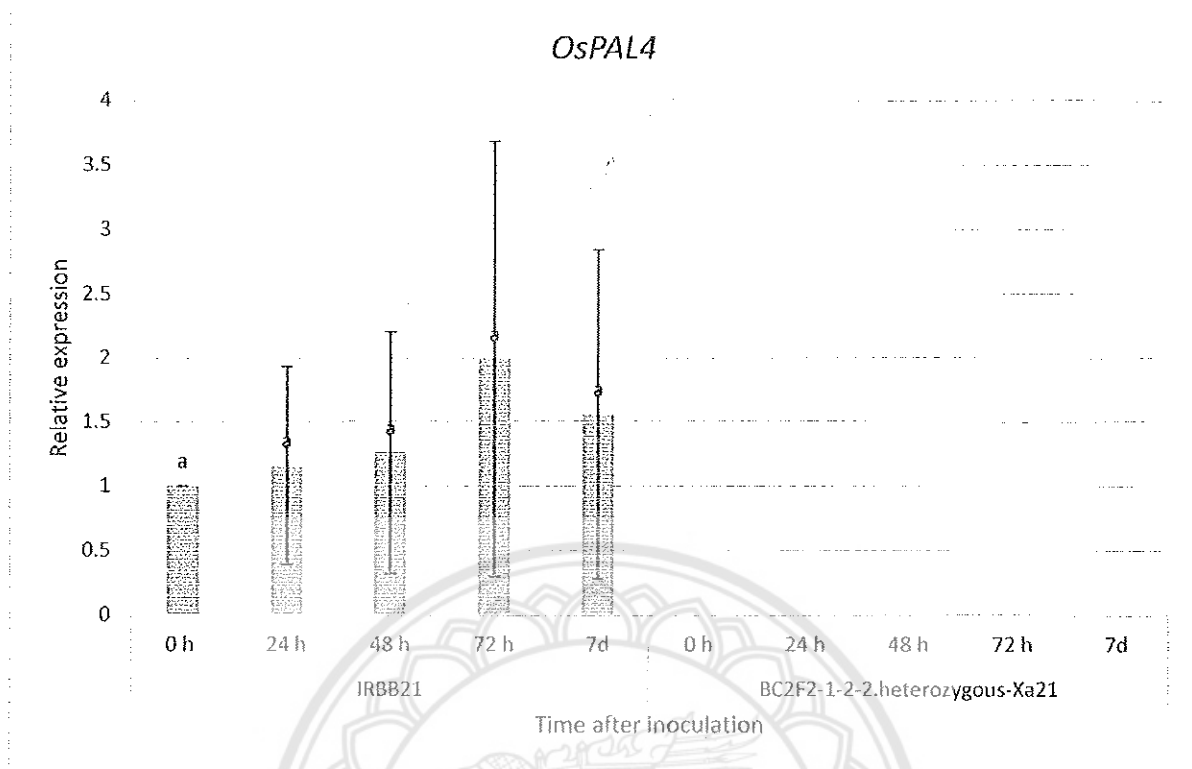
ตารางที่ 3.9 ระดับการแสดงออกสัมพัทธ์ (relative expression) ของยีน *Xa21* และ *OsPAL4* ในข้าวพันธุ์ IRBB21 และลูกผสมกลับ BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>-1-2-2.heterozygous-*Xa21* หลังปลูกเชื้อ *Xoo*

Plant	Time after inoculation	Relative expression	
		<i>Xa21</i>	<i>OsPAL4</i>
IRBB21	0 h	1.00c ±0.00	1.00a ±0.00
	24 h	1.07bc ±0.06	1.16a ±0.77
	48 h	2.09a ±0.32	1.26a ±0.94
	72 h	1.99ab ±0.64	1.99a ±1.69
	7 d	1.46abc ±0.87	1.56a ±1.28
BC <sub>2</sub> F <sub>2</sub>	0 h	1.00a ±0.00	n/a
	24 h	0.61ab ±0.04	n/a
	48 h	0.67ab ±0.30	n/a
	72 h	0.44b ±0.17	n/a
	7 d	0.30b ±0.06	n/a

ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งของแต่ละกลุ่ม (IRBB21 หรือ BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>) ที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติตามวิธี Duncan's New Multiple-Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p = 0.05$ ) n/a = not applicable



ภาพที่ 3.13 ระดับการแสดงออกสัมพัทธ์ (relative expression) ของยีน *Xa21* ในข้าวพันธุ์ IRBB21 และลูกผสมกลับ BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>-1-2-2.heterozygous-*Xa21* หลังปลูกเชื้อ *Xoo* ที่เวลาต่าง ๆ ระดับการแสดงออกคำนวณโดยการเปรียบเทียบกับ การแสดงออกที่เวลา 0 ชั่วโมง ซึ่งให้มีค่าเท่ากับ 1 การแสดงออกที่เวลาอื่น ๆ จะคำนวณเป็นจำนวนเท่าที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงของเวลา 0 ชั่วโมง ข้อมูลใช้การแสดงออกของยีน *18S rRNA* ในการปรับค่ามาตรฐาน (normalization) ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=3)



ภาพที่ 3.14 ระดับการแสดงออกสัมพัทธ์ (relative expression) ของยีน *OsPAL4* ในข้าวพันธุ์ IRBB21 และ ลูกผสมกลับ BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>-1-2-2.heterozygous-Xa21 หลังปลูกเชื้อ *Xoo* ที่เวลาต่าง ๆ ระดับการแสดงออกคำนวณ โดยการเปรียบเทียบกับ การแสดงออกที่เวลา 0 ชั่วโมง ซึ่งให้มีค่าเท่ากับ 1 การแสดงออกที่เวลาอื่น ๆ จะคำนวณ เป็นจำนวนเท่าที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงของเวลา 0 ชั่วโมง ข้อมูลใช้การแสดงออกของยีน *18S rRNA* ในการปรับค่า มาตรฐาน (normalization) ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (n=3)

## 4. สรุปผลการวิจัย

### 4.1 การสำรวจโรคขอบใบแห้งและจำแนกเชื้อ *Xoo*

การสำรวจโรคขอบใบแห้งในแปลงนาข้าวช่วงต้นฤดูฝน (มิถุนายน และ สิงหาคม 2559) ในจังหวัด พิษณุโลก อำเภอเมืองพิษณุโลก อำเภอบางระกำ อำเภอบางกระทุ่ม และอำเภอพรหมพิราม และช่วงฤดูฝน (กันยายน 2559) ในจังหวัดพิษณุโลก อำเภอพรหมพิราม และจังหวัดพิจิตร อำเภอเมืองพิจิตร และอำเภอดงเจริญ พบข้าวที่ปลูกมีอาการของโรคขอบใบแห้ง และสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์จากใบและเมล็ดข้าวจากพื้นที่สำรวจได้ โดยเชื้อที่แยกได้มีลักษณะโคโลนีสีเหลืองเหมือนโคโลนีของเชื้อ *Xoo* และเมื่อทำการทดสอบปลูกเชื้อบนข้าวพันธุ์ กข47 พบว่าเชื้อทุกไอโซเลตสามารถก่อโรคขอบใบแห้งได้ แสดงว่ามีการระบาดของโรคขอบใบแห้งในทุกพื้นที่ ที่สำรวจ

### 4.2 การตรวจสอบเชื้อ *Xoo* ที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค PCR

การใช้ TXT marker และ Xoo4009 marker ตรวจสอบเชื้อ *Xoo* ที่แยกได้จากพื้นที่จังหวัดพิษณุโลก และจังหวัดพิจิตร ในปี 2559 ด้วยเทคนิค PCR สามารถให้ PCR product ที่จำเพาะ ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ เหมือนกับของ *Xoo* ในฐานข้อมูล GenBank จึงสามารถใช้ marker นี้ในการตรวจสอบเพื่อยืนยันเชื้อ *Xoo* ได้ และใช้เป็นไอโซเลตสำหรับทดสอบความต้านทานโรคขอบใบแห้ง

### 4.3 การปรับปรุงพันธุ์ข้าวสายพันธุ์เสมือน กข47 ให้มียืนต้านทานโรคขอบใบแห้ง *Xa21*

การดำเนินการในปีที่ 2 ได้สร้างลูกผสมกลับรุ่น  $BC_2F_1$ - $BC_4F_1$  ต่อจาก  $BC_1F_1$  ที่ได้จากปีที่ 1 และสร้าง ลูกผสมกลับรุ่น  $BC_2F_2$  สำหรับตรวจสอบการตอบสนองของยืน *Xa21* และ *OsPAL4* ต่อเชื้อ *Xoo* ที่แยกจากแปลง นาจังหวัดพิษณุโลกและจังหวัดพิจิตร และสร้างลูกผสมกลับรุ่น  $BC_3F_3$  สำหรับทดสอบระดับความต้านทานโรค ขอบใบแห้ง

### 4.3 การทดสอบความต้านทานโรคขอบใบแห้งในข้าวลูกผสมกลับรุ่น $BC_3F_3$

การทดสอบระดับความต้านทานโรคขอบใบแห้งในข้าวลูกผสมกลับรุ่น  $F_1$  เปรียบเทียบกับพันธุ์แม่ กข47 และพันธุ์พ่อ IRBB21 โดยใช้เชื้อ *Xoo* ไอโซเลต Xoo16PK001 และ Xoo16PT001.2 ที่แยกจากจังหวัดพิษณุโลก และจังหวัดพิจิตร พบว่าข้าวลูกผสมกลับ  $BC_3F_3$  มีระดับความต้านทานในระดับเดียวกับพันธุ์ IRBB21 ซึ่งมากกว่า พันธุ์แม่ กข47 ที่อ่อนแอต่อโรคมก อย่างไรก็ตาม แม้ว่าระดับความต้านทานของข้าวลูกผสมกลับ  $BC_3F_3$  จะ เพิ่มขึ้นจากพันธุ์แม่ กข47 แต่ยังคงจัดอยู่ในกลุ่มค่อนข้างอ่อนแอ (MS) และกลุ่มอ่อนแอ (S)

#### 4.4 การตอบสนองของยีน *Xa21* และ *OsPAL4* ต่อเชื้อ *Xoo* ในข้าวลูกผสมกลับรุ่น $BC_2F_2$

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Xa21* และยีน *OsPAL4* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการป้องกันตัวของข้าว ในข้าวลูกผสมกลับรุ่น  $BC_2F_2$  ที่มีสภาพจีโนไทป์ heterozygous *Xa21* และพันธุ์พ่อ IRBB21 ที่ปลูกเชื้อ *Xoo* พบว่ายีน *Xa21* ใน  $BC_2F_2$  ถูกยับยั้งภายใน 24 ชั่วโมง ขณะที่ใน IRBB21 ยีน *Xa21* ถูกชักนำให้แสดงออกต่อเนื่องจาก 24 ชั่วโมงแรก ถึง 72 ชั่วโมง หลังได้รับเชื้อ และการแสดงออกลดลงใน 7 วัน หลังได้รับเชื้อ สำหรับยีน *OsPAL4* ไม่สามารถตรวจวัดการแสดงออกได้ในทุกตัวอย่างของ  $BC_2F_2$  ขณะที่ใน IRBB21 พบการแสดงออกถูกชักนำให้เพิ่มขึ้นต่อเนื่องตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรก ถึง 72 ชั่วโมง ก่อนลดลงในวันที่ 7 หลังได้รับเชื้อ เช่นเดียวกับการแสดงออกของยีน *Xa21* แต่ยีน *OsPAL4* มีอัตราการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกช้ากว่ายีน *Xa21*



## เอกสารอ้างอิง

---

Achnine L, Blancaflor EB, Rasmussen S, Dixon RA (2004) Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *The Plant Cell* 16(11): 3098-3109.

Ahn SW (1994) International collaboration on breeding for resistance to rice blast. In: Zeigler RS, Leong SA, Teng PS (eds) *Rice Blast Disease*. CABI and International Rice Research Institute, Wallingford, UK, pp 137–153.

Basavaraj SH, Singh V, Singh A, Singh A, Singh A, Anand D, Yadav S, Ellur R, Singh D, Gopala Krishnan S, Nagarajan M, Mohapatra T, Prabhu KV, Singh A (2010) Marker-assisted improvement of bacterial blight resistance in parental lines of Pusa RH10, a superfine grain aromatic rice hybrid. *Molecular Breeding* 26 (2):293-305.

Bate NJ, Orr J, Ni W, Meroni A, Nadler-Hassar T, Doerner PW, Dixon RA, Lamb CJ, Elkind Y (1994) Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate determining step in natural product synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 7608-7612.

Beckers GJM, Spoel SH (2006) Fine-tuning plant defence signalling: salicylate versus jasmonate. *Plant Biology* 8: 1–10.

Bowles DJ (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Annual Review of Biochemistry* 59; 873-907.

Camera SL, Gouzerh G, Dhondt S, Hoffmann L, Fritig B, Legrand M, Heitz T (2004) Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunological Reviews* 198; 267–284.

Century KS, Lagman RA, Adkisson M, Morlan J, Tobias R, Schwartz K, Smith A, Love J, Ronald PC, Whalen MC (1999) Short communication: developmental control of *Xa21*-mediated disease resistance in rice. *Plant Journal* 20(2): 231-236.



Chen S, Xu CG, Lin XH, Zhang Q (2001) Improving bacterial blight resistance of '6078', an elite restorer line of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection. *Plant Breeding* 120 (2):133-137.

Coquoz JL, Buchala A, MeÅtraux JP (1998) The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. *Plant Physiology* 117: 1095-1101.

Dokku P, Das KM, Rao GJN (2013) Pyramiding of four resistance genes of bacterial blight in Tapaswini, an elite rice cultivar, through marker-assisted selection. *Euphytica* 192 (1):87-96.

Duan C, Yu J, Bai J, Zhu Z, Wang X (2014) Induced defense responses in rice plants against small brown planthopper infestation. *The Crop journal* 2(1): 55-62.

Eamchit S, Mew TW (1982) Comparison of virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* in Thailand and the Philippines. *Plant Disease* 66 (7): 556-559.

Gao ZM, Wang XC, Peng ZH, Zheng B, Liu Q (2012) Characterization and primary functional analysis of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Phyllostachys edulis*. *Plant Cell Reports* 31(7): 1345-1356.

Gopalakrishnan S, Sharma RK, Anand Rajkumar K, Joseph M, Singh VP, Singh AK, Bhat KV, Singh NK, Mohapatra T (2008) Integrating marker assisted background analysis with foreground selection for identification of superior bacterial blight resistant recombinants in Basmati rice. *Plant Breeding* 127 (2):131-139.

Gruner DS, Mooney KA (2013) Green grass and high tides: grazing lawns in terrestrial and aquatic ecosystems. *Oikos Journal* 122: 313-316.

Hari Y, Srinivasarao K, Viraktamath BC, Hari Prasad AS, Laha GS, I. Ahmed M, Natarajkumar P, Sujatha K, Srinivas Prasad M, Pandey M, Ramesha MS, Neeraja CN, Balachandran SM, S. Rani N, Kemparaju B, Madhan Mohan K, Sama VSAK, Shaik H, Balachiranjeevi C, Pranathi K, Ashok Reddy G, Madhav MS, Sundaram RM (2013) Marker-assisted introgression of bacterial blight and blast resistance into IR 58025B, an elite maintainer line of rice. *Plant Breeding* 132 (6): 586-594.

Hari Y, Srinivasarao K, Viraktamath BC, Hariprasad AS, Laha GS, Ahmed MI, Natarajkumar P, Ramesha MS, Neeraja CN, Balachandran SM, Rani NS, Balaji Suresh P, Sujatha K, Pandey M, Ashok Reddy G, Madhav MS, Sundaram RM (2011) Marker-assisted improvement of a stable restorer line, KMR-3R and its derived hybrid KRH2 for bacterial blight resistance and grain quality. *Plant Breeding* 130 (6):608-616.

IRRI (1996) Standard evaluation system for rice. INGER. Genetic Resources Center, International Rice Research Institute., P.O. Box 933, 1099 Manila, Philippines

Jain M, Tyagi AK, Khurana JP (2006) Molecular characterization and differential expression of cytokinin-responsive type-A response regulators in rice (*Oryza sativa*). *Plant Biology* 6(1): 1-11.

Jiang Y, Chen X, Ding X, Wang Y, Chen Q, Song W (2013) The XA21 binding protein XB25 is required for maintaining XA21-mediated disease resistance. *Plant Journal* 73: 814-823.

Joseph M, Gopalakrishnan S, Sharma RK, Singh VP, Singh AK, Singh NK, Mohapatra T (2004) Combining bacterial blight resistance and Basmati quality characteristics by phenotypic and molecular marker-assisted selection in rice. *Molecular Breeding* 13 (4):377-387.

Jwa NS, Agrawal GK, Tamogami S, Yonekura M, Han O, Iwahashi H, Rakwal R (2006) Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry* 44 (5-6):261-273.

Kauffman HE, Reddy APK, Hsieh SPY, Merca SD (1973) An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. *Plant Disease Reports* 57:537-541.

Kou, Y, Wang S (2013) Bacterial blight resistance in rice. *Genomics Applications in Plant Breeding*. R. Varshney and R. Tuberosa, Wiley-Blackwell Press.

Lang JM, Hamilton JP, Diaz MGQ, Van Sluys MA, Burgos MRG, Vera Cruz CM, ..., Leach JE (2010) Genomics-based diagnostic marker development for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola*. *Plant Disease* 94(3): 311-319.

Lee KH, Qi GH, Sim JS (1995) Metabolizable energy and amino acid availability of full-fat seeds, meals, and oils of flax and canola. *Poultry Science* 74 (8): 1341-1348.

Liyong C, Jie-yun Z, Shou-jiang Y, Xiao-deng Z, Kang-le Z, Shi-hua C (2003) Hybrid rice resistant to bacterial leaf blight developed by marker assisted selection. *Rice Science* 11:68-70.

Luo YC, Wang SH, Li CQ, Wu S, Wang DZ, Du SY (2004) Improvement of resistance to bacterial blight by marker-assisted selection in a wide compatibility restorer line of hybrid rice. *Rice Science* 11:231-237.

Mauch-Mani B, Slusarenko A (1996) Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* (8): 203-212.

Mew TW (1987). Current status and future prospects of research on bacterial blight of rice. *Annual Review of Phytopathology* 25: 359-382.

Ou SH (1985) *Rice diseases*. IRRI.

Pandey M, Shobha Rani N, Sundaram RM, Laha GS, Madhav MS, Srinivasa Rao K, Sudharshan I, Hari Y, Varaprasad GS, Subba Rao LV, Suneetha K, Sivaranjani AKP, Viraktamath BC (2013) Improvement of two traditional Basmati rice varieties for bacterial blight resistance and plant stature through morphological and marker-assisted selection. *Molecular Breeding* 31 (1):239-246.

Pellegrini L, Rohfritsch O, Fritig B, Legrand M (1994) Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco. *Plant Physiology* 106: 877-886.

Perumalsamy S, Bharani M, Sudha M, Nagarajan P, Arul L, Saraswathi R, Balasubramanian P, Ramalingam J (2010) Functional marker-assisted selection for bacterial leaf blight resistance genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Breeding* 129 (4):400-406.

Ponciano G, Yoshikawa M, Lee JL, Ronald PC, Whalen MC (2007) Pathogenesis-related gene expression in rice is correlated with developmentally controlled *Xa21*-mediated resistance against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69:131-139.

Rawal HC, Singh NK, Sharma TR (2013) Conservation, divergence, and genome-wide distribution of *PAL* and *POX A* gene families in plants. *International Journal of Genomics* 678969, 10.

Reichert JM, Suzuki LEAS, Reinert DJ, Horn R, Håkansson I (2009) Reference bulk density and critical degree-of-compactness for no-till crop production in subtropical highly weathered soils. *Soil and Tillage Research* 102: 242–254.

Ronald PC, Albano B, Tabien R, Abenes L, Wu K-s, McCouch S, Tanksley SD (1992) Genetic and physical analysis of the rice bacterial blight disease resistance locus, *Xa21*. *Molecular and General Genetics* MGG 236 (1):113-120.

Roycewicz PS, Malamy JE (2014) Cell wall properties play an important role in the emergence of lateral root primordia from the parent root. *Journal of Experimental Botany* 65(8): 2057-2069.

Sakthivel N, Mortensen C, Mathur S (2001) Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56(3-4): 435-441.

Song WY, Wang GL, Chen LL, Kim HS, Pi LY, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai WX, Zhu LH, Fauquet C, Ronald P (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* 270 (5243):1804-1806.

Sundaram RM, Vishnupriya MR, Laha GS, Rani NS, Rao PS, Balachandran SM, Reddy GA, Sarma NP, Sonti RV (2009) Introduction of bacterial blight resistance into Triguna, a high yielding, mid-early duration rice variety. *Biotechnology Journal* 4 (3):400-407.

Sundaram R, Vishnupriya M, Biradar S, Laha G, Reddy G, Rani NS, Sarma N, Sonti R (2008) Marker assisted introgression of bacterial blight resistance in Samba Mahsuri, an elite indica rice variety. *Euphytica* 160 (3):411-422.

Swings J, Van Den Mooter M, Vauterin L, Hoste B, Gillis M, Mew TW, Kersters K (1990) Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) of rice as pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40 (3):309-311.

Vo K, Kim CY, Hoang TV, Lee SK, Shirsekar G, Seo YS, Lee SW, Wang GL, ..., Jeon JS (2018). OsWRKY67 Plays a Positive Role in Basal and XA21-Mediated Resistance in Rice. *Frontiers in plant science* 8: 2220.

Vogt T (2010) Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant* 3: 2-20.

Wang GL, Song WY, Ruan DL, Sideris S, Ronald PC (1996) The cloned gene, *Xa21*, confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates in transgenic plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9 (9):850-855.

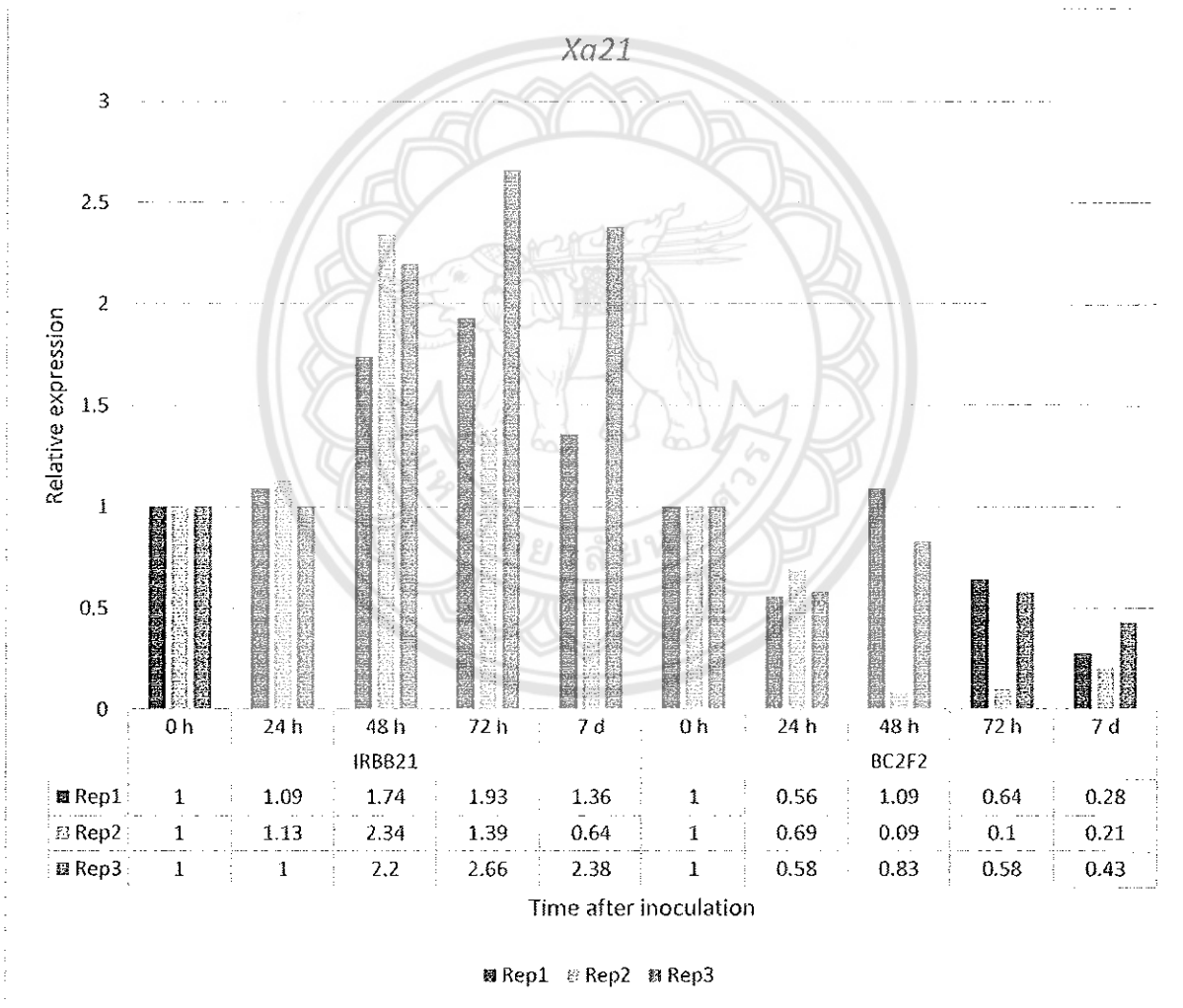
Zhang H, Wang S (2013) Rice versus *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: a unique pathosystem. *Current Opinion in Plant Biology* 16 (2):188-195.



## ภาคผนวก

### ภาคผนวก 1

การแสดงออกของยีน *Xa21* ในแต่ละซ้ำ (3 ซ้ำ) ของข้าวพันธุ์ IRBB21 และลูกผสมกลับรุ่น BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> หลังได้รับเชื้อ *Xoo* ที่เวลาต่างกัน ระดับการแสดงออกคำนวณโดยการเปรียบเทียบกับ การแสดงออกที่เวลา 0 ชั่วโมงของ IRBB21 ซึ่งให้มีค่าเท่ากับ 1 การแสดงออกของตัวอย่างอื่น ๆ จะคำนวณเป็นจำนวนเท่าที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงของเวลา 0 ชั่วโมง ใน IRBB21 แต่ละซ้ำ ข้อมูลที่ได้ใช้การแสดงออกของยีน *18S rRNA* ในการปรับค่ามาตรฐาน (normalization)



ภาคผนวก 2

การแสดงออกของยีน *OsPAL4* ในแต่ละซ้ำ (3 ซ้ำ) ของข้าวพันธุ์ IRBB21 และลูกผสมกลับรุ่น BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> หลังได้รับเชื้อ *Xoo* ที่เวลาต่างกัน ระดับการแสดงออกคำนวณโดยการเปรียบเทียบกับการแสดงออกที่เวลา 0 ชั่วโมงของ IRBB21 ซึ่งให้ค่าเท่ากับ 1 การแสดงออกของตัวอย่างอื่น ๆ จะคำนวณเป็นจำนวนเท่าที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงของเวลา 0 ชั่วโมง ใน IRBB21 แต่ละซ้ำ ข้อมูลที่ได้ใช้การแสดงออกของยีน *18S rRNA* ในการปรับค่ามาตรฐาน (normalization)

