การใช้ Bulked Segregant Analysis เพื่อระบุเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD ที่มีตำแหน่งใกล้กับยีนควบคุมความต้านทานโรคยอดไหม้ในถั่วลิสง

Bulked Segregant Analysis for Identifing RAPD Marker Linked to Bud Necrosis Disease Resistance in Peanut *(Arachis hypogaea* L.*)*

นิภาพร สุธรรม[1] วิบูล เป็นสุข[2] สนั่น จอกลอย[1] และจิรวัฒน์ สนิทชน[1]

Nipaporn Sutam[1], Viboon Pensuk[2], Sanun Jogloy[1] and Jirawat Sanitchon[1]

Abstract

Peanut bud necrosis disease (PBND) is an important disease of peanut (*Arachis hypogaea* L.) Chemical control of the disease is costly. Development of PBNV resistant cultivars of peanut is an alternative for PBND management. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and bulk segregant analysis (BSA) were used in this study to identify molecular marker linked to PBND resistance in peanut. The segregating population in this study was F2-intercross constructed by crossing between the resistant line IC34 and the susceptible line KK60-1 (susceptible). The individual F2 plants were classified into two groups based on disease severity : PBND resistant bulk and PBND susceptible bulk. Eight plants of each group were selected for bulk segregant analysis. Disease severity of each plant was scored at 14, 21, and 28 days after PBNV inoculation. DNA of each plant was extracted. One hundred and forty of RAPD primers were used to screen DNA of the two parental lines and the two bulks. The primer OPG16 generated polymorphism between the two parental lines and the two bulks. The susceptible group showed 850 bp DNA band, whereas the resistant group did not show. Regression analysis revealed a significant relation between disease severity and DNA score (R2 = 0.914, b = 0.320), indicating that the $OPG16_{850}$ marker was linked to PBND resistance. This marker can be used for further PBND resistance breeding program as.

Key words : PBNV, RAPD, bulk segregant analysis

บทคัดย่อ

โรคยอดไหม้ในถั่วลิสง Peanut bud necrosis disease (PBND) เป็นโรคหนึ่งที่ทำความเสียหายต่อผลผลิตของถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.) การใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการควบคุมโรคนี้และยังช่วยลดต้นทุนการใช้สารเคมีอีกทางหนึ่งด้วย ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงให้ต้านทานต่อโรคยอดไหม้จึงมีความสำคัญ การทดลองนี้ได้นำเครื่องหมายโมเลกุลชนิด Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) มาใช้ศึกษาร่วมกับเทคนิค Bulk Segregant Analysis (BSA) เพื่อติดตามยีนที่

[1] ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

[1] Department of Plant Science and Agricultural Resources, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

[2] สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี จ.อุดรธานี

[2] Program in Plant Production Technology, Faculty of Technology, Udonthani Rajabhat University, Udonthani.

ควบคุมลักษณะต้านทานโรคยอดไหม้ในถั่วลิสง โดยการสร้างกลุ่มตัวแทนสองกลุ่มคือ กลุ่มที่มีลักษณะที่ต้านทานต่อโรคยอดไหม้จำนวน 8 ต้น และกลุ่มที่อ่อนแอต่อโรคยอดไหม้จำนวน 8 ต้น โดยคัดเลือกจากประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ที่ได้จากการผสมระหว่างถั่วลิสงพันธุ์ต้านทาน (IC34) และพันธุ์อ่อนแอ (KK 60-1) โดยอาศัยข้อมูลจากการประเมินความรุนแรงของการเกิดโรคจากการเข้าทำลายของเชื้อ PBNV เป็นรายต้นหลังทำการปลูกเชื้อ PBNV 14 21 และ 28 วัน จากนั้นสกัดดีเอ็นเอแล้วนำมาทดสอบกับไพรเมอร์จำนวน 140 ไพรเมอร์ เพื่อตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่และสองกลุ่มตัวแทน พบว่าไพรเมอร์ OPG16 ให้ความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพันธุ์พ่อแม่และสองกลุ่มตัวแทน โดยพันธุ์อ่อนแอกับกลุ่มตัวแทนที่อ่อนแอจะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 850 bp ในขณะที่พันธุ์ต้านทานกับกลุ่มตัวแทนที่ต้านทานต่อโรคยอดไหม้ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นนี้ และเมื่อนำไพรเมอร์ OPG16 มาทดสอบเป็นรายต้น ที่เป็นสมาชิกที่อยู่ในกลุ่มต้านทาน จำนวน 8 ต้นและกลุ่มอ่อนแอจำนวน 8 ต้น ซึ่งนำมาใช้สร้างกลุ่มต้านทานและอ่อนแอ พบว่า แถบดีเอ็นเอของแต่ละต้นที่นำมาสร้างกลุ่มตัวแทนก็มีความแตกต่างกัน โดยต้นที่อ่อนแอปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 850 bp ส่วนต้นที่ต้านทานไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอนี้ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงของการเกิดโรคและการปรากฏแถบดีเอ็นเอ พบว่า มีนัยสำคัญระหว่างสองลักษณะ โดยมีค่า R2 เท่ากับ 0.914 และ slope ของกราฟมีค่าเท่ากับ 0.320 จึงถือได้ว่าเครื่องหมายโมเลกุล $OPG16_{850}$ มีตำแหน่งใกล้กับตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคยอดไหม้บนโครโมโซมในถั่วลิสง เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวสามารถนำไปใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection) ซึ่งจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกในงานปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงต้านทานโรคยอดไหม้ต่อไปได้

คำสำคัญ : โรคยอดไหม้ อาร์เอพีดี

บทนำ

โรคยอดไหม้ในถั่วลิสง Peanut bud necrosis disease (PBND) เกิดจากเชื้อ Peanut bud necrosis tospovirus (PBNV) เป็นโรคที่ทำความเสียหายต่อผลผลิตของถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.) ในหลายประเทศ เช่น อินเดีย เนปาล และศรีลังกา (Reddy et al., 1995) ในประเทศไทยพบมีการระบาดของโรคยอดไหม้ตามแหล่งปลูกต่างๆและมักระบาดในฤดูแล้งบางพื้นที่ถั่วลิสงถูกทำลายถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (โสภณ, 2536) การใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยลดความเสียหายจากการเข้าทำลายของโรค ลดปัญหาการแพร่ระบาดของโรคยอดไหม้ นอกจากนี้ยังช่วยลดต้นทุนการผลิตเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่นๆ

การปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงเพื่อต้านทานต่อโรคยอดไหม้ ควรมีการประเมินความต้านทานของโรคที่แม่นยำ เพื่อที่จะสามารถจำแนกพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอได้อย่างชัดเจน ซึ่งช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคให้ก้าวหน้าเร็วยิ่งขึ้น ปัจจุบันได้มีการค้นพบเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมอยู่กับยีนที่ควบคุมหลายลักษณะและในพืชหลายชนิด จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการนำเอาเทคนิค Bulk Segregant Analysis (BSA) มาใช้ร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุลต่างๆ เช่น RAPD markers ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่รวดเร็วในการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลหรือ markers ที่วางอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคที่สำคัญ เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ช่วยในการคัดเลือกพันธุ์ได้อย่างแม่นยำ ต่อไปเครื่องหมายโมเลกุลจะมีความสำคัญต่องานปรับปรุงพันธุ์มากขึ้น

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีตำแหน่งใกล้กับความต้านทานต่อโรคยอดไหม้ในถั่วลิสง ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลนี้สามารถนำไปพัฒนาให้มีความจำเพาะมากขึ้นและสามารถนำไปช่วยคัดเลือกสายพันธุ์ต้านทานต่อโรคยอดไหม้ต่อไปได้

วิธีการศึกษา

พันธุ์และการสร้างประชากร

ในการทดลองครั้งนี้มีการนำถั่วลิสงลูกผสมชั่วที่ 2 ที่มาจากการผสมระหว่างพันธุ์ถั่วลิสงที่มีความต้านทานต่อโรคยอดไหม้ คือ IC34 (มโนชัย และคณะ, 2532; จุฑารัตน์, 2540) กับพันธุ์ที่อ่อนแอ คือ KK 60-

1 (Pensuk et al., 2002) มาใช้เพื่อติดตามยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคยอดไหม้ในถั่วลิสง โดยผสมถั่วลิสง 2 พันธุ์ดังกล่าวที่แปลงผสมพันธุ์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานีได้เมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 แล้วปลูกผสมตัวเองจนกระทั่งได้เมล็ดลูกผสมชั่วที่ 2 ซึ่งมีการกระจายตัวจำนวน 3 family รวมเมล็ด ทั้งหมดได้ 137 เมล็ด

การประเมินความต้านทานโรคยอดไหม้ของถั่วลิสง

นำเมล็ดพันธุ์พ่อแม่และลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 3 family ได้แก่ family ที่ 1 จำนวน 45 เมล็ด family ที่ 2 จำนวน 40 เมล็ด และ family ที่ 3 จำนวน 52 เมล็ด ตามลำดับ รวม 137 เมล็ด มาปลูกลงในกระถางโดยปลูก 3 ต้นต่อกระถาง เพื่อทดสอบและประเมินความต้านทานต่อโรคยอดไหม้ ในสภาพเรือนทดลองโดยปลูกเชื้อด้วยวิธีทาด้วยน้ำคั้น หลังปลูกถั่วลิสงพันธุ์พ่อแม่และลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 3 family และมีใบแท้โผล่ขึ้นมา 2 ใบ จะทำการปลูกเชื้อ PBNV ด้วยน้ำคั้น ซึ่งเตรียมได้โดยบดตัวอย่างในโกร่งแช่เย็นใช้ 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ที่เติม 0.2% 2-mercaptoethanol และ 1% celite เป็น inoculating buffer ในอัตราส่วนใบพืช 1 กรัม ต่อ buffer 10 มิลลิลิตร แล้วรองเอาเฉพาะน้ำคั้นทิ้งส่วนที่เป็นเศษพืช เก็บน้ำคั้นที่มีไวรัสที่ได้ไว้ในภาชนะที่แช่ในน้ำแข็งตลอดเวลาที่ทำการปลูกเชื้อ ใช้นิ้วจุ่มน้ำคั้นทาลงบนผิวใบอ่อนของถั่วลิสงอายุ 7-10 วัน โดยใช้น้ำคั้นประมาณ 200 µl/ต้น ก่อนการปลูกเชื้อต้องนำตัวอย่างไปไว้ที่ห้องมืดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังการปลูกเชื้อเก็บรักษาพืชไว้ในกรงที่กันแมลงได้ จากนั้นทำการประเมินระดับความรุนแรงของโรคจากการเข้าทำลายของเชื้อ PBNV หลังการปลูกเชื้อที่ 14, 21 และ 28 วันตามลำดับ โดยประเมินเป็นรายต้นจากทุกต้นในกลุ่มประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ใช้วิธีการประเมินของ Pensuk et al. (2002) โดยให้คะแนน 1-5 (Fig. 1)

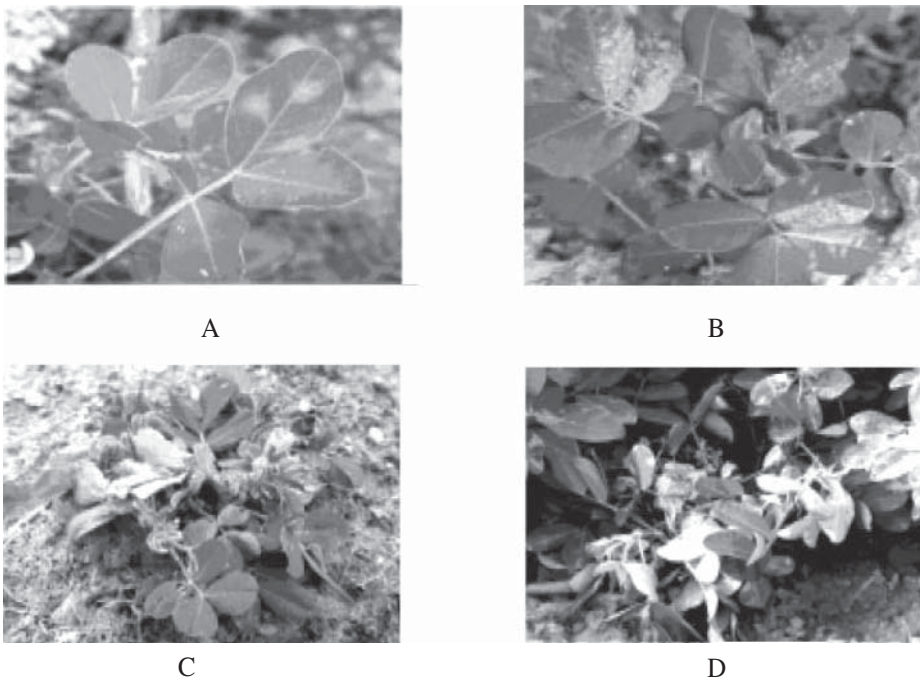

Fig. 1. Symptoms for bud necrosis caused by PBNV in peanut used for disease scores.
A = disease score 2, no systemic symptom, spots on some leaves; B = disease score 3, systemic symptoms, top chlorosis but no stunting; C = disease score 4, systemic symptoms, strong leaf distortion, stunt; and D = disease score 5, plants showing severe necrosis and stunting. [Note: Photograph for disease score 1 (no symptom) was not shown]

การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนตามวิธีของ Dellaporta et al. (1983) อ้างใน Lambrides et al. (2000) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ ดีเอ็นเอจากการวัดค่า OD ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วปรับระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

การคัดเลือกไพรเมอร์เพื่อใช้ตรวจสอบลักษณะต้านทานโดยเทคนิค RAPD- PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพันธุ์พ่อแม่คือ IC34 และ KK 60-1 มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้เทคนิค RAPD-PCR เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมจากไพรเมอร์ จำนวน 7 ชุด ได้แก่ OPA OPB OPC OPE OPF OPG และ OPY แต่ละชุดประกอบด้วยไพรเมอร์ 20ไพรเมอร์ จึงใช้ทั้งหมด 140 ไพรเมอร์ แต่ละไพรเมอร์มีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ เทคนิค RAPD-PCR มีองค์ประกอบของปฏิกิริยา (reaction mixture) ซึ่งมีปริมาตร 20 µl ประกอบด้วย 20 ng DNA template 1X PCR buffer 3 mM MgCl2 0.2 mM dNTP mix 0.2 µM primer และ 1.25 Unit *Taq*-Polymerase เริ่มด้วยอุณหภูมิก่อนปฏิกิริยา PCR 95 ˚ซ. เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นเป็นปฏิกิริยา PCR จำนวน 45 รอบ ประกอบด้วยขั้นตอน denaturation ด้วยอุณหภูมิ 95 ˚ซ. เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน annealing อุณหภูมิที่ใช้ประมาณ 36-44 ˚ซ. เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอน extension ใช้อุณหภูมิ 72 ˚ซ. เป็นเวลา 1 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ทำ final extension ด้วยอุณหภูมิ 72 ˚ซ. เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นนำเอา PCR product มาตรวจสอบ ผล ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส (Electrophoresis techniques) โดยใช้อะกาโรสเจล (agarose gel) ที่มีความเข้มข้น 2 % เป็นตัวกลางในการแยก ใช้ความต่างศักย์ 75 โวลต์ เป็นเวลา 150 นาที ในบัฟเฟอร์ชนิด TBE และย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide ตรวจสอบแบบแผนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสง UV เพื่อคัดเลือก primer ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทาน และอ่อนแอ

การตรวจสอบลูกผสมชั่วที่ 2 ด้วยเครื่องหมาย RAPD ร่วมกับวิธี Bulk segregant analysis

การระบุเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 โดยการสร้างกลุ่มตัวแทนของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 สองกลุ่มคือ กลุ่มต้านทานจำนวน 8 ต้นและกลุ่มอ่อนแอจำนวน 8 ต้นเช่นกัน โดยสร้างกลุ่มตัวแทนได้จากผลการประเมินความรุนแรงของโรคยอดไหม้ดังรายละเอียดข้อ 2.2 โดยคัดเลือกสายพันธุ์ (ต้น) จากประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ต้นที่ไม่เป็นโรค (ค่าคะแนนการเกิดโรคเท่ากับ 1) จำนวน 8 ต้น (สายพันธุ์) เพื่อเป็นตัวแทนของกลุ่มต้านทาน และต้นที่เกิดอาการยอดไหม้รุนแรงจำนวน 8 ต้น (สายพันธุ์) สกัดดีเอ็นเอจากทุกต้นที่คัดเลือก แล้วนำดีเอ็นเอทั้ง 8 ต้นรวมเข้าด้วยกัน ด้วยปริมาณดีเอ็นเอที่เท่ากัน จะได้กลุ่มดีเอ็นเอต้านทาน (resistant bulk) และกลุ่มดีเอ็นเออ่อนแอ (susceptible bulk) จากนั้นนำดีเอ็นเอทั้ง 2 กลุ่มมาทดสอบกับไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพันธุ์พ่อแม่ (พันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ) ที่คัดเลือกไว้จากข้อ 2.4 โดยเทคนิค RAPD-PCR (Michelmore et al., 1991) แล้วคัดเลือกเครื่องหมาย RAPD ที่ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่คล้ายกับให้ความแตกต่างที่เกิดกับพันธุ์พ่อแม่ จากนั้นนำเครื่องหมาย RAPD ที่คัดเลือกได้ ไปทดสอบกับดีเอ็นเอของแต่ละต้นที่นำมาสร้างกลุ่มตัวแทน เพื่อตรวจสอบว่าแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ-แม่ยังคงให้ความแตกต่างระหว่างสองกลุ่มของดีเอ็นเอ (resistant bulk และ susceptible bulk) อีกทั้งยังคงให้ความแตกต่างในแต่ละต้นที่นำมาสร้างกลุ่มตัวแทน

การวิเคราะห์ข้อมูล

ตรวจสอบว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่มีตำแหน่งใกล้กับยีนที่ควบคุมความต้านทานโรคยอดไหม้ โดยการวิเคราะห์สมการถดถอย (simple regression) โดยใช้ข้อมูลสองกลุ่มคือ ใช้ข้อมูลที่อ่านผลจากแผ่นเจลเป็นตัวแปรอิสระและข้อมูลระดับความรุนแรงของการเกิดโรคของทั้ง 16 ต้นเป็นตัวแปรตาม แล้วตรวจสอบสมการ $y = a + bx$

ผลและวิจารณ์

การประเมินความต้านทานโรคยอดไหม้ของถั่วลิสงและการสร้างกลุ่มตัวแทน

จากการประเมินความรุนแรงของการเกิดโรคยอดไหม้ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 และพันธุ์พ่อแม่ โดยประเมินที่ 14 21 และ 28 วันหลังปลูกเชื้อ พบว่าถั่วลิสงพันธุ์ IC34 ไม่เกิดโรค และพันธุ์ KK 60-1 เกิดโรคโดยมีระดับคะแนนความรุนแรงเท่ากับ 3-5 ลูกผสมชั่วที่ 2 มีคะแนนการเกิดโรคตั้งแต่ 2 ถึง 5 และสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ไม่เป็นโรคและกลุ่มที่เป็นโรค โดยมีระดับคะแนนความรุนแรงของโรคแตกต่างกันชัดเจน จากนั้นเลือกต้นที่นำมาเป็นตัวแทนของกลุ่มต้านทานจำนวน 8 ต้น โดยมีระดับคะแนนความรุนแรงของการเกิดโรคยอดไหม้เท่ากับ 1 และต้นที่นำมาเป็นตัวแทนของกลุ่มอ่อนแอจำนวน 8 ต้น แต่ละต้นมีระดับคะแนนความรุนแรงของการเกิดโรคเป็น 4 4 3 5 3 4 4 และ 4 ตามลำดับ

การคัดเลือกไพรเมอร์เพื่อใช้ตรวจสอบลักษณะต้านทาน

จากการศึกษาไพรเมอร์รวม 140 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างถั่วลิสงพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอคือ ไพรเมอร์ OPG16 (5'AGC GTC CTC C3') เท่านั้น โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาด 850 คู่เบสในพันธุ์อ่อนแอ KK 60-1 แต่ไม่พบในพันธุ์ต้านทาน IC34 (Fig. 1) และไพรเมอร์อื่นๆที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ที่กล่าวถึงข้างต้นไม่แสดงความแตกต่างระหว่างถั่วลิสงพันธุ์ต้านทานต่อโรคยอดไหม้ (พันธุ์ IC34) และพันธุ์อ่อนแอต่อโรคยอดไหม้ (พันธุ์ KK 60-1) เนื่องจากพันธุ์ที่นำมาทดสอบมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมค่อนข้างมากเมื่อทดสอบกับไพรเมอร์ จึงพบว่าส่วนใหญ่ไม่แสดงความแตกต่าง (monomorphism)

การตรวจสอบลูกผสมชั่วที่ 2 จากเครื่องหมาย RAPD ร่วมกับวิธี Bulk segregant analysis

หลังจากที่พบไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่แล้ว จากนั้นนำ bulked DNA ทั้งสองกลุ่มมาตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ OPG16 ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ พบว่า bulked DNA กลุ่มต้านทานไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอและ bulked DNA กลุ่มอ่อนแอปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 850 bp ซึ่งสอดคล้องกับผลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในพันธุ์พ่อแม่ที่เป็นพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (Fig. 2)

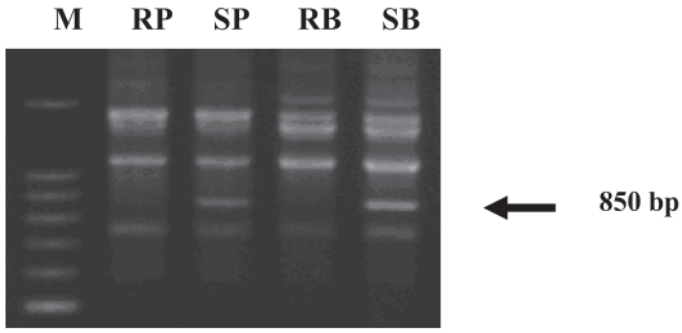

Fig. 2 The PCR products obtained from OPG-16 primer. Lanes are as follows : M = 100 bp marker, RP = resistant parent (IC34), SP = susceptible parent (KK60-1), RB = resistant bulk, SB = susceptible bulk.

การตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย RAPD กับความต้านทานต่อโรคยอดไหม้

การคัดเลือกถั่วลิสงลูกผสมชั่วที่ 2 โดยใช้ผลการประเมินความต้านทานต่อโรคยอดไหม้ (คะแนน 1-5) ภายหลังการปลูกเชื้อแล้ว นำมาสร้างเป็นกลุ่มตัวแทน 2 กลุ่มคือ กลุ่มต้านทานจำนวน 8 ต้นนั้น แต่ละต้นมีระดับคะแนนความรุนแรงของการเกิดโรคยอดไหม้เท่ากับ 1 และกลุ่มอ่อนแอจำนวน 8 ต้น แต่ละต้นมีระดับคะแนนความรุนแรงของการเกิดโรคเป็น 4 4 3 5 3 4 4 และ 4 ตามลำดับ เมื่อนำดีเอ็นเอของแต่ละต้นที่เป็นสมาชิกในกลุ่มตัวแทนทั้งสองกลุ่มไปตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ OPG16 เพื่อดูการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ โดยถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอให้คะแนนเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้เท่ากับ 0 พบว่าต้นถั่วลิสงที่ไม่เป็นโรคและได้รับการจำแนกเป็นต้นต้านทานทุกต้นจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย ส่วนถั่วลิสงที่เกิดโรคและได้รับการจำแนกเป็นลักษณะอ่อนแอ ทุกต้นจะปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย (Fig. 3) เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์รีเกรสชั่นเพื่อการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของข้อมูลด้านดีเอ็นเอต่อความต้านทานโรคยอดไหม้ ผลการทดสอบให้ค่า R2 เท่ากับ 0.914 และ slope ของกราฟความสัมพันธ์มีค่าเท่ากับ 0.320 แสดงว่าความต้านทานของโรคเปลี่ยนแปลงไปตามความแตกต่างของการปรากฏแถบดีเอ็นเออย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุล $OPG16_{850}$ มีตำแหน่งที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีนควบคุมความต้านทานโรคยอดไหม้ จนสามารถถ่ายทอดไปด้วยกันตามกฎของการถ่ายทอดพันธุกรรมจากชั่วรุ่นพ่อแม่ ไปจนกระทั่งถึงลูกผสมชั่วที่ 2 ได้ ดังนั้น เครื่องหมายโมเลกุลนี้น่าจะสามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะต่อความต้านทานโรคยอดไหม้ต่อไป เนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD สามารถพัฒนาต่อไปเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะได้ เช่น SCAR marker ในมะเขือเทศที่จำเพาะต่อยีนควบคุมความต้านทานโรค Tomato mosaic virus (Dax et al., 1998) และ SCAR marker ในถั่วเหลือง ซึ่งจำเพาะต่อยีนควบคุมความต้านทานโรค soybean mosaic virus (Zheng et al., 2003) นอกจากนี้เครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ยังสามารถนำไปช่วยงานปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ถั่วลิสงเพื่อความต้านทานโรคดังกล่าวต่อไปได้ แต่อย่างไรก็ตาม ความต้านทานโรคยอดไหม้ อาจถูกควบคุมด้วยยีนอีกหลายคู่ จึงควรมีการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มเติม เพื่อให้ได้เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับใช้ในงานคัดเลือกพันธุ์ให้ได้ยีนควบคุมความต้านทานสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

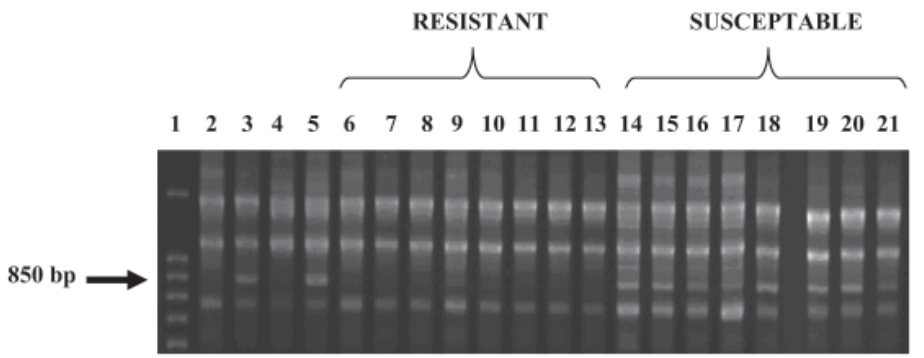

Fig. 3 Electrophoretic analysis of DNA amplification products using primer OPG16. Lanes are as follows : lane 1 = 100 bp marker, lane 2 = resistant parent , lane 3 = susceptible parent, lane 4 = resistant bulk, lane 5 = susceptible bulk, lane 6-13 = individual line of resistant bulk, and lane 14-21 = individual line of susceptible bulk.

สรุป

การหาตำแหน่งยีนต้านทานโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD ร่วมกับเทคนิค bulk segregant analysis เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมอยู่กับความต้านทานต่อโรคยอดไหม้ในถั่วลิสง จากการคัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 140ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์เพียง 1 ชนิดคือ OPG16 (5' AGCG TCCTCC 3') ที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพันธุ์ต้านทานและกลุ่มตัวแทนที่ต้านทาน (resistant bulk) ซึ่งจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ส่วนพันธุ์อ่อนแอและกลุ่มตัวแทนที่อ่อนแอ (susceptable bulk) จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 850 bp ตามลำดับ และเมื่อใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวทดสอบกับดีเอ็นเอเป็นรายต้น (individual) ที่นำมาใช้สร้างสองกลุ่มตัวแทน พบว่ากลุ่มที่ได้รับการจำแนกเป็นต้นที่ต้านทานจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอและกลุ่มได้รับการจำแนกเป็นต้นที่อ่อนแอจะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 850 bp และเมื่อทำการวิเคราะห์รีเกรสชั่นระหว่างการเกิดโรคกับการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ พบว่า ทั้งสองลักษณะมีความสัมพันธ์กันโดยมีค่า R^2 = 0.914 และ slope ของกราฟมีนัยสำคัญ คือ มีค่าเท่ากับ 0.320 แสดงว่าเครื่องหมายโมเลกุล $OPG16_{850}$ ดังกล่าวมีตำแหน่งที่อยู่ใกล้กับยีนควบคุมความต้านทานโรคยอดไหม้บนโครโมโซม ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลที่พบนี้สามารถพัฒนาไปเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะ (specific marker) ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection) ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงให้ต้านทานต่อโรคยอดไหม้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ได้สนับสนุนเงินวิจัยครั้งนี้ ภายใต้โครงการวิจัยประเภทเงินอุดหนุนทั่วไป ปีงบประมาณ 2548

เอกสารอ้างอิง

จุฑารัตน์ เชื้อพงษ์. 2540. การคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วลิสงที่ต้านทาน ต่อโรคยอดไหม้ที่เกิดจากเชื้อ Peanut Bud Necrosis Virus (PBNV). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาโรคพืช บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มโนชัย กีรติกสิกร สังวร มวลทอง และ ปรีชา สิงหา. 2532. การประเมินสายพันธุ์ถั่วลิงสงที่ต้านทานต่อแมลงที่ทำลายใบและฝัก. **ใน** รายงานการสัมมนาถั่วลิสงแห่งชาติ ครั้งที่ 8. 3-5 พฤษภาคม 2532. หน้า 224-233. ณ โรงแรมไหมไทย จังหวัดร้อยเอ็ด.

โสภณ วงศ์แก้ว.2536. โรคไวรัสของถั่วลิสงในประเทศไทย. กลุ่มพืชน้ำมัน. กองส่งเสริมพืชไร่นา. กรมส่งเสริมการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Dax, E., O. Livneh, E. Aliskevicius, O. Edelbaum, N. Kedar, N. Gavish, J. Milo F.Geffen, A. Blumenthal, H.D. Rabinowich and I. Sela. 1998. A SCAR marker linked to the ToMV resistance gene, Tm22, in tomato. Euphytica 101:73-77.

Lambrides, C.J., R.J.Lamn, I.D. Godwin, J. manner and B.C. Imrie. 2000. Two genetic linkage maps of mungbean using RFLP and RAPD markers. Australian Jonrnal of Agricultural. Research. 51:415-425.

Michelmore, R.W., I. Paran and J.D. Kelly. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregant population. Proceedings of National Academy of Science 88: 9828-9832.

Pensuk, V., N. Daengpuang, S. Wongkaew, S. Jogloy and A. Patanothai. 2002. Evaluation of screening procedures to identify peanut resistance to peanut bud necrosis virus (PBNV). Peanut Science 29:47-51.

Reddy, D.V.R., A.A.M. Buiel, T. Satyanarayana, S.L. Dwivedi, A.S. Reddy, A.S. Ratna, K.Vijaya Lakshmi, G.V. Ranga Rao, R.A. Naidu and J.A. Wightman. 1995. Peanut bud necrosis disease : In Recent Studies on Peanut Bud Necrosis Disease : Proceeding of metting, 20 Mar. 1995, ICRISAT Asia Center, India. pp. 3-7. A.A.M Buiel et. al. (eds.) Patancheru, India : ICRISAT ; and Wageningen, The Netherlands : Agricultural University of Wageningen.

Zheng, C., R. Chang, L. Qiu, P. Chen, X. Wu and S. Chen. 2003. Identification and characterization of a RAPD/SCAR marker linked to a resistance gene for soybean mosaic virus in soybean. Euphytica 132:199-210.