การถ่ายทอดลักษณะความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งของข้าวที่ควบคุมโดยยีน xa5

Inheritance of Bacterial Leaf Blight Resistance Controlled by xa5 Gene in F_2 Rice Hybrid (IR24xIRBB5)

กาญจนา กล้าแข็ง นงรัตน์ นิลพาณิชย์

กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล , ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ , อมรา ทองปาน

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทคัดย่อ

การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งของข้าวได้กระทำภายในโรงเรือนปลูกข้าวของศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี ระหว่างเดือนมิถุนายน ถึง เดือนตุลาคม 2542 โดยการผสมระหว่างพันธุ์ข้าว IR24 และ IRBB5 จากนั้นจึงนำพันธุ์พ่อ IR24 พันธุ์แม่ IRBB5 ลูก F_1 และ F_2 ไปทดสอบความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง โดยวิธีการปลูกเชื้อที่ใบ ผลการทดลองพบว่า การกระจายตัวของกลุ่มที่ต้านทานโรคและกลุ่มที่ไม่ต้านทานโรคของลูก F_2 ไม่เป็นไปในอัตราส่วน 1:3 แสดงถึงความเป็นไปได้ว่าน่าจะมี modified genes เข้ามามีอิทธิพลร่วมกับการแสดงออกของยีนด้อยที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคขอบใบแห้งของข้าว

Abstract

Inheritance of Bacterial Leaf Blight Resistance Controlled by xa5 gene was conducted under the glasshouse conditions at Pathum Thani Rice Research Center during June and October 1999. The Parents IR24 and IRBB5 in addition to their F_1 and F_2 hybrids were leaf-infected with the bacterial suspension using the Clipping Method described by Coffman and Herrera (1980). The result revealed that the segregation into resistance and non-resistance groups of F_2 hybrids did not follw the 1:3 ratio, indicating that there were some modified genes involving the expression of xa5 gene.

1. คำนำ

โรคขอบใบแห้งของข้าวเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae, Xoo*) เริ่มปรากฏในแหล่งปลูกข้าวแถบเอเชียก่อนจากนั้นได้แพร่ระบาดไปทั่วโลก พบได้ในทุกระยะของการเจริญเติบโตของข้าว อาการของโรคในระยะปักดำถึงระยะออกรวงเริ่มจาก
ลักษณะช้ำเล็กๆ บริเวณใบล่างๆ ต่อมาจุดช้ำนี้จะขยายเป็นทางสีเหลืองไปตามใบข้าว ใบที่เป็นโรคจะแห้งตายเร็ว ในกรณีที่เชื้อมีปริมาณสูงเข้าทำลายต้นข้าว จะทำให้ท่อน้ำท่ออาหารอุดตัน ต้นข้าวทั้งต้นจะเหี่ยวเฉาและตายโดยรวดเร็ว [1] ในปี 1970 พันธุ์ข้าวลูกผสมในประเทศจีนได้รับความเสียหายจากการทำลายของโรคโดยมีผลต่อองค์ประกอบผลผลิตทั้งจำนวนต้นต่อรวง จำนวนเมล็ดดีและน้ำหนัก 1,000 เมล็ด ระดับของความเสียหายขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตและระดับความต้านทานของพืช ถ้าต้นข้าวอยู่ในระยะเริ่มตั้งท้องถึงระยะออกดอกจะมีผลต่อการพัฒนาของเมล็ดทำให้เมล็ดลีบเพิ่มขึ้นเปอร์เซ็นต์เมล็ดดีและน้ำหนัก 1,000 เมล็ดลดลง ถ้าต้นข้าวอยู่ในระยะออกรวงจะทำให้เปอร์เซ็นต์เมล็ดลีบสูง เมล็ดเหล่านี้เมื่อนำไปสีจะแตกหักได้ง่าย การทำลายของโรคนี้ในระดับปานกลางจะทำให้ผลผลิตลด

ลง 10-20% แต่ถ้ามีการทำลายของโรคอย่างรุนแรงผลผลิตจะลดลงถึง 50% [1] สำหรับประเทศไทยก็ได้รับความเสียหายจากการระบาดของโรคนี้ในปี 1970 ด้วยเช่นกัน ซึ่งช่วงเวลานั้น คือปี พ.ศ. 2513 เกษตรกรยังไม่มีพันธุ์ต้านทาน กองการข้าวในขณะนั้นจึงได้พัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ต้านทานจนได้พันธุ์ กข 5 และ กข 7 ในปี พ.ศ. 2518 จากนั้นก็ได้พันธุ์ กข 21 และ กข 23 ในปี พ.ศ. 2524 [2] ถึงแม้ว่าขณะนี้จะมีพันธุ์ต้านทานให้เกษตรกรได้ใช้แล้ว แต่การระบาดของโรคนี้ก็ยังคงเกิดขึ้นได้อีก โดยเฉพาะในเขตภาคเหนือซึ่งประชากรนิยมบริโภคข้าวเหนียวและยังคงนิยมปลูกข้าวพันธุ์พื้นเมือง ได้แก่ พันธุ์เหนียวสันป่าตอง พันธุ์ กข 10 พันธุ์เหลืองประทิว 123 และพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งไม่ต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง ฉะนั้น จัดได้ว่าโรคนี้ยังคงมีบทบาทที่สำคัญในแหล่งที่มีการปลูกข้าวพันธุ์พื้นเมืองซึ่งไม่ต้านทานต่อโรคและอาณาเขตค่อนข้างกว้างขวาง วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อยืนยันว่าลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งของพันธุ์ NIL (IRBB5) เป็นยีนด้อย 1 คู่ เพื่อนำประชากรชั่วที่ 2 ที่ได้จากการทดสอบความต้านทานต่อโรคดังกล่าวไปตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่ใช้บ่งชี้ลักษณะต้านทานต่อโรคนี้ต่อไป

การถ่ายทอดลักษณะความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งของข้าว ที่ควบคุมโดยยีน xa5 นี้ได้ทดสอบความต้านทานต่อโรค 2 ครั้ง ครั้งแรก เพาะเมล็ดวันที่ 26 มิถุนายน 2542 ปลูกเชื้อวันที่ 29 กรกฎาคม 2542 และบันทึกผลวันที่ 11 สิงหาคม 2542 ครั้งที่สอง เพาะเมล็ดวันที่ 9 กันยายน 2542 ปลูกเชื้อวันที่ 4 ตุลาคม 2542 และบันทึกผลวันที่ 18 ตุลาคม 2542

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

2.1 อุปกรณ์

2.1.1 เมล็ดพันธุ์ข้าวที่มีลักษณะเป็น near isogenic line (NIL หรือ IRBB5) ในลักษณะต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งของข้าว (xa5) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. G.S. Khush แห่งสถาบันวิจัยข้าวระหว่างประเทศ (International Rice Research Institute, IRRI) ประเทศฟิลิปปินส์และเมล็ดพันธุ์ IR24 (GS.No.2704) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไม่ต้านทานต่อโรคดังกล่าว

2.1.2 เชื้อแบคทีเรีย (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae, Xoo*) ที่เป็นสาเหตุของโรคขอบใบแห้งของข้าว

2.2 วิธีการ

2.2.1 การเตรียมพืช ปลูกพันธุ์ NIL (IRBB5) และพันธุ์ IR24 ในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 18 นิ้ว ที่โรงเรือนศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี เพื่อผสมพันธุ์โดยวิธี cliping method [3] แล้วปลูกเมล็ดลูกผสมชั่วที่หนึ่ง (F_1) ดังกล่าวในโรงเรือนเพื่อให้ได้เมล็ดชั่วที่สอง (F_2) นำเมล็ดพันธุ์ข้าว พันธุ์พ่อ (P_1, IR24) พันธุ์แม่ (P_2, IRBB5) ลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) และลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) มาเพาะในจานเพาะที่รองด้วยกระดาษเพาะเติมน้ำกลั่นให้ชุ่ม ปิดฝาจานเพาะเพื่อรักษาระดับความชื้น คอยดูแลอย่าให้น้ำมากเกินไปเมล็ดจะเน่าได้ และถ้าน้ำน้อยเกินไปเมล็ดก็จะแห้งไม่งอก เพาะนาน 3 วัน เมล็ดข้าวที่ได้รับความชื้นพอเหมาะจะมีรากงอกยาวประมาณ 0.50-1.00 ซม. และมียอดอ่อนโผล่เป็นสีขาวๆ ยาวประมาณ 0.50 ซม. หรืออาจจะเป็นตุ่มเล็กๆ สีขาว

ในการนำเมล็ดไปปลูกทำได้โดยใช้กระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 นิ้ว บรรจุดินขุยไผ่ที่ร่อนด้วยตะแกรงเพื่อกำจัดเศษหินกรวด และดินหยาบออก ผสมปุ๋ยสูตร 16-20-0 อัตราส่วนปุ๋ยต่อดินเท่ากับ 60 กรัมต่อ 25 กิโลกรัม แช่น้ำค้างคืนก่อนเพาะเมล็ดข้าว เพื่อให้ดินอุ้มน้ำได้ดี ใช้ปากคีบคีบเมล็ดที่เพาะแล้วจิ้มลงดินในกระถางๆ ละ 6-7 เมล็ด ปิดกระถางด้วยตะแกรงตาข่ายเพื่อป้องกันหนูกัดกินเมล็ดแล้วคลุมด้วยพลาสติก เพื่อรักษาระดับความชื้นซึ่งในระยะนี้เมล็ดข้าวยังไม่ต้องการแสงแดดในการงอก หลังจากนั้น 4 วันเปิดพลาสติกและตะแกรงที่คลุมออก แล้วเริ่มให้น้ำตามปกติ หากมีการสูญเสียต้นข้าว ก็จะทำการปลูกซ่อมต้นข้าวที่ไม่งอก เพื่อให้มีต้นข้าวครบตามจำนวนที่ต้องการ และมีขนาดของการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน

2.2.2 การเตรียมเชื้อและการปลูกเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรีย (*Xanthomons oryzae* pv.*oryzae, Xoo*) No.8207 จาก stock นำมาเลี้ยงในหลอดบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ (slant agar) บ่มนาน 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 °C เติมน้ำกลั่นในหลอดที่ได้ ใช้เข็ม (loop) เขี่ยเชื้อแบคทีเรียให้กระจายตัวในน้ำกลั่นแล้วเทรวมกันในบีกเกอร์ นำเชื้อในน้ำกลั่นดังกล่าวมาทำให้มีความเข้มข้น 10^9 colony forming unit (cfu)/ml ด้วยน้ำกลั่น

สำหรับการปลูกเชื้อแบคทีเรีย ใช้วิธี clipping technique (Kauffman และคณะ, 1973) โดยใช้กรรไกรจุ่มน้ำเชื้อแบคทีเรียที่ได้เตรียมไว้ ตัดปลายใบของต้นข้าวที่มีอายุ 4

สัปดาห์ตัดประมาณ 1 ซม จากปลายใบทุก ๆ ต้น ๆ ละ 2-3 ใบ โดยใบล่าง ๆ (ใบแก่) และใบแรก ๆ (ใบอ่อนเกินไป) จะไม่ตัด ตรวจสอบผลของโรคดังกล่าวได้ที่ระยะ 14 วันหลังจากการปลูกเชื้อ โดยให้คะแนนของความต้านทานต่อโรคตามระบบ Standard Evaluation System for Rice [4] ของสถาบันวิจัยข้าวระหว่างประเทศโดยถ้าพื้นที่ใบที่เหลือจากการตัดถูกทำลายไม่เกิน 12% จัดเป็นต้นที่มีความต้านทาน และถ้าถูกทำลายเกิน 12% ขึ้นไปจัดเป็นต้นที่ไม่ต้านทาน

2.3 การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ประชากร F_2 ที่ได้จากการทดสอบโรค โดยการใช้ Chi-square test ดังนี้

$$\chi^2 = \sum_{I=1}^{m} \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

โดยให้ m = จำนวนต้นข้าวที่ใช้ในการทดลอง

O_i = จำนวนที่สังเกตได้สำหรับค่าในจำแนก i

E_i = จำนวนที่คาดหมายตามสมมติฐานสำหรับจำแนก i

i = 1, 2, ... m จำแนกในข้อมูลนั้น

3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลของการทดสอบความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งของข้าวในประชากร P_1(IR24), P_2(IRBB5), F_1(IR24/IRBB5) และ F_2(IR24/IRBB5) ครั้งที่ 1 แสดงในตารางที่ 1 ซึ่ง P_1(IR24) แสดงลักษณะไม่ต้านทาน P_2(IRBB5) แสดงลักษณะต้านทาน ส่วน F_1(IR24/IRBB5) จำนวนทั้งหมด 19 ต้น แสดงลักษณะต้านทาน 3 ต้นแสดงลักษณะไม่ต้านทาน 16 ต้น ในขณะที่ F_2 (IR24/IRBB5) จำนวนทั้งหมด 413 ต้น แสดงลักษณะต้านทาน 55 ต้นและแสดงลักษณะไม่ต้านทาน 358 ต้น การกระจายของประชากร F_2 (รูปที่ 1) จะสามารถแบ่งแยกประชากรดังกล่าวได้เป็น 2 กลุ่มอย่างเด่นชัด คือ ต้านทานและไม่ต้านทาน ที่ระดับความต้านทาน 4.5

ผลของการวิเคราะห์ด้วย X^2-test เพื่อพิสูจน์การกระจายตัวของกลุ่มต้านทานและไม่ต้านทานโรคว่าเป็น 1:3 ตามกฎของเมนเดลหรือไม่ โดยใช้ประชากร F_2 ได้ค่า X^2-test 1:3 = 30.060 ซึ่งมีค่า P ที่ df = 1 ที่ระดับ 0.01 = 6.63 และ 0.005 =7.88

ผลของการทดสอบความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งของข้าวในประชากร P_1(IR24), P_2(IRBB5), F_1(IR24/IRBB5) และ F_2 (IR24/IRBB5) ครั้งที่ 2 แสดงในตารางที่ 2 ซึ่ง P_1(IR24) แสดงลักษณะไม่ต้านทาน P_2(IRBB5) แสดงลักษณะต้านทาน ส่วน F_1 (IR24/IRBB5) จำนวนทั้งหมด 16 ต้น แสดงลักษณะไม่ต้านทานทั้งหมด ในขณะที่ F_2(IR24/IRBB5) จำนวนทั้งหมด 422 ต้น แสดงลักษณะต้านทาน 72 ต้นและแสดงลักษณะไม่ต้านทาน 350 ต้น การกระจายของประชากร F_2 (รูปที่ 2) จะสามารถแบ่งแยกประชากรดังกล่าวได้เป็น 2 กลุ่มอย่างเด่นชัด คือ ต้านทานและไม่ต้านทาน ที่ระดับความต้านทาน 3.0 เป็นพวกที่ต้านทานนอกจากนั้นเป็นพวกที่ไม่ต้านทาน

ผลของการวิเคราะห์ด้วย X^2-test ตามกฎของเมนเดลโดยใช้ประชากร F_2 ได้ค่า X^2-test 1:3 = 13.843 ซึ่งมีค่า P ที่ df = 1 ที่ระดับ 0.01 = 6.63 และ 0.005 =7.88

การที่ F_1 บางต้นในการทดสอบความต้านทานต่อโรคดังกล่าวครั้งที่ 1 แสดงลักษณะต้านทาน อาจมีสาเหตุมาจากประชากร P_1(IR24) ที่ใช้ไม่สม่ำเสมอ และประชากร P_2(IRBB5) แสดงลักษณะของการเป็น near isogenic line ไม่คงที่ ทั้ง ๆ ที่ควรจะแสดงลักษณะไม่ต้านทานทั้งหมด เนื่องจากยีน *xa5* เป็นยีนด้อย 1 คู่ (5, 6, 7)

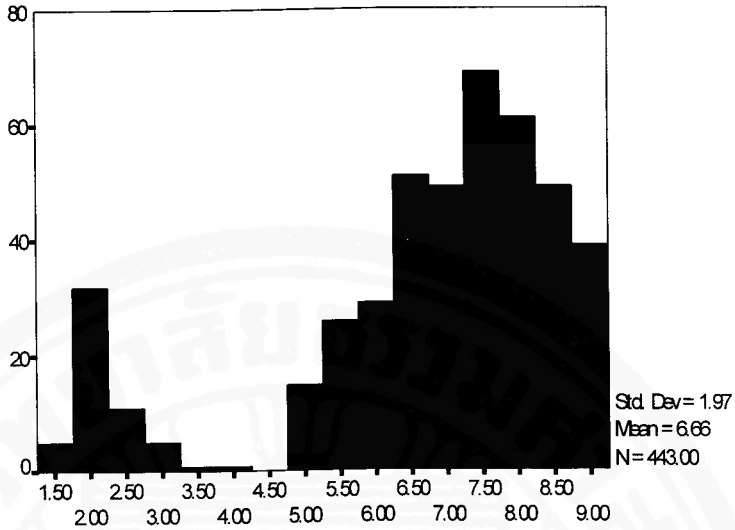
ประชากร F_2 มีอัตราส่วนของพวกต้านทานต่อไม่ต้านทาน ในการทดสอบความต้านทานต่อโรคในครั้งแรกและในครั้งที่สอง ไม่สอดคล้องกับอัตราส่วนการกระจายตัวของ F_2 ที่ควบคุมด้วยยีนด้อย 1 คู่ แสดงว่าน่าจะมาจากมี modified gene บางตัวของ F_2 ที่ได้รับมาจาก F_1

ตารางที่ 1 การวิเคราะห์ประชากร F_2 ที่ได้จากการทดสอบโรคขอบใบแห้งที่ระยะเวลา 14 วันหลังจากการปลูกเชื้อ เพื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานต่อโรคดังกล่าว (การทดลองที่ 1)

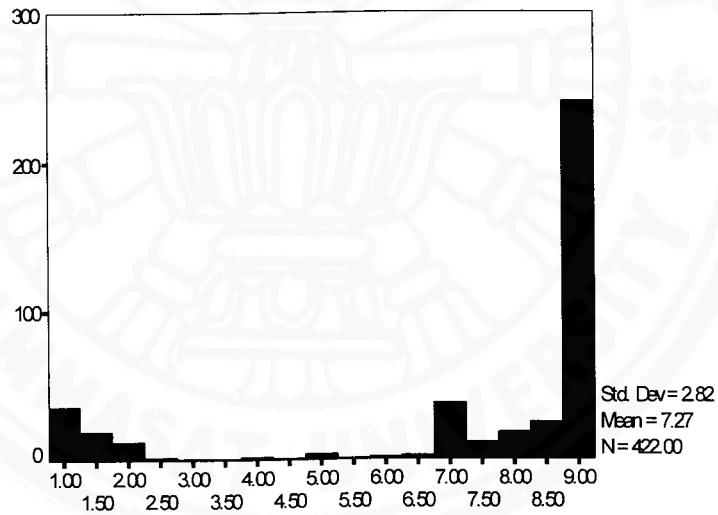
พันธุ์ข้าว/คู่ผสม	จำนวนต้น	จำนวนต้นข้าว		X^2-test	P-value
		ต้านทาน	ไม่ต้านทาน	1:3=30.060	
P_1(IR24)	28	-	28		df=1
P_2(IRBB5)	33	33	-		0.01=6.63
F_1(IR24/IRBB5)	19	3	16		0.005=7.88
F_2(IR24/IRBB5)	413	55	358		

ตารางที่ 2 การวิเคราะห์ประชากร F_2 ที่ได้จากการทดสอบโรคขอบใบแห้งที่ระยะเวลา 14 วัน หลังจากการปลูกเชื้อ เพื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานต่อโรคดังกล่าว (การทดลองที่ 2)

พันธุ์ข้าว/คู่ผสม	จำนวนต้น	จำนวนต้นข้าว		X^2-test	P-value
		ต้านทาน	ไม่ต้านทาน	1:3=13.843	
P_1(IR24)	30	-	30		df=1
P_2(IRBB5)	19	19	-		0.01=6.63
F_1(IR24/IRBB5)	16	-	16		0.005=7.88
F_2(IR24/IRBB5)	422	72	350		



รูปที่ 1 การกระจายของประชากร F_2 ที่ได้จากการทดสอบความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งของข้าว ครั้งที่ 1



รูปที่ 2 การกระจายของประชากร F_2 ที่ได้จากการทดสอบความต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งของข้าว ครั้งที่ 2

4. สรุปผลการทดลอง

การกระจายตัวของลูก F_2 ในกลุ่มต้านทานโรคและกลุ่มไม่ต้านทานโรคไม่เป็นไปในอัตราส่วน 1:3 ทั้งนี้น่าจะเป็นเพราะมี modified genes เข้ามามีส่วนร่วมกับยีนด้อยที่ควบคุมความต้านทานโรค

5. เอกสารอ้างอิง

[1] Mew, T.W., An Overview of the World Bacterial Blight Situation, pp.7-12, *In* Bacterial Blight of Rice, International Rice Research Institute, Manila, Philippine, 1989.

[2] ประพาส วีระแพทย์, การบำรุงพันธุ์ข้าวให้ต้านทานโรคและแมลง, น.71-84, ใน ความก้าวหน้าของการปรับปรุงพันธุ์พืช ของกรมวิชาการเกษตร, วันที่ 4-8 ตุลาคม 2525, กรมวิชาการเกษตร,กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ 2525.

[3] Coffman, W.R. and R.M. Herrera, Rice, pp.511-521, *In* Hybridization of Crop Plants. Madison, Wisconsin, 1980.

[4] IRRI, Standard Evaluation System for Rice, IRRI, 1980.

[5] Petpisit, V., G.S. Khush and H.E. Kauffman. Inheritance of Resistance to Bacterial Blight in Rice, Crop Sci. 17:551-554, 1977.

[6] Librojo, V., H.E. Kauffman and G.S. Khush, Genetic Analysis of Bacterial Blight Resistance in Four Varieties of Rice, SABROA J. 8:105-110, 1976.

[7] Singh, R.J., G.S. Khush and T.W. Mew, A New Gene for Resistance to Bacterial Blight in Rice. Crop Sci. 23:558-560, 1983.