การตรวจหายีน homolog ของยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Bph14*) ในข้าวพื้นเมือง ข้าวปลูก และข้าวป่าของไทย

วันวิสาข์ ประสิทธิ์ธัญกิจ[1], คำรพ รัตนสุต[1], เนริสา คุณประทุม[2] และกวี สุจิปุลิ[1*]

Identification of Homolog of a Brown Planthopper Gene, *Bph14* in Native, Cultivated, Wild Thai Rice

Wanwisa Prasittanyakit[1], Kumrop Ratanasut[1], Narisa Kunpratum[2] and Kawee Sujipuri[1*]

[1]ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

[2]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

[1]Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000

[2]Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand 65000

[*] Corresponding author. E-mail address: kawees@nu.ac.th

บทคัดย่อ

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นแมลงศัตรูพืชชนิดหนึ่งที่เข้าทำลายผลผลิตข้าวในทวีปเอเชีย และประเทศไทย ดังนั้นการปลูกข้าวสายพันธุ์ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นแนวทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ และลดปัญหาสิ่งแวดล้อม จากการเข้าทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในข้าว ปัจจุบันพบว่ามียีนจำนวน 21 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานเพลี้ยกระโดดน้ำตาล ซึ่งถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวกันอย่างแพร่หลาย การวิจัยครั้งนี้มีจุดมุงหมายเพื่อตรวจสอบ conserved (CC-NB-LRR) domains ของยีน *Bph14* (FJ941067.1) ในข้าวพื้นเมือง ข้าวปลูก และข้าวป่าของไทย จำนวน 37 สายพันธุ์ ทำการทดลองโดยนำลำดับเบสของยีน *Bph14* มาออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะสำหรับใช้ตรวจสอบบริเวณ conserved (CC-NB-LRR) domains โดยใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ ผลการทดลองพบว่าข้าวทั้ง 37 สายพันธุ์ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 267 และ 344bp สำหรับ CC- และ NB-domain ซึ่งบ่งชี้ว่าข้าวทุกพันธุ์อาจมี CC- และ NB-domain อยู่ในส่วนของจีโนม นอกจากนี้ผลการทดลองพบอีกว่า ข้าวสายพันธุ์ Swarnalata และ *Oryza rufipogon* GS.NO. 15157 ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 945 สำหรับ LRR-domain ซึ่งบ่งชี้ว่าข้าว 2 สายพันธุ์อาจมี LRR-domain อยู่ในส่วนของจีโนม จากนั้นทำการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับเบส โดยตัดชิ้นส่วนของ PCR product จากข้าวสายพันธุ์ดังกล่าว แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสำเร็จ จากนั้นส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับเบส ผลการทดลองพบว่า สายพันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษามีค่าความเหมือนของลำดับเบสอยู่ในช่วง 93-95 91-98 และ 67.26-84.7% เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับลำดับเบสที่บริเวณ CC- NB- and LRR domains ของยีน *Bph14* ตามลำดับ

คำสำคัญ: ข้าว เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

Abstract

The brown planthopper (BPH) is one of the major serious insect pests of many rice productions in Asia and Thailand. Growing the BPH-resistant rice varieties is the most effective and environment-friendly strategy for protecting the rice crop from BPH. Nowadays, more than 21 BPH-resistant genes have been reported and utilized in rice breeding programs. Here, the aim of this study is to determine the present of *Bph14*-homolog gene in native-, cultivated-, wild-, Thai rice (37 varieties). Three conserved (CC-NB-LRR) domains in cds of *Bph14* gene sequence (accession number: FJ941067.1) had been designed the specific primers to identify of these domains in these rice varieties by using PCR technique. Results showed that the right DNA bands of CC- and NB-domains were expected to be approximately 267bp and 344 bp respectively in all 37 rice varieties. Moreover, two of these rice verities (Swarnalata and *Oryza rufipogon* GS.NO. 15157) gave the right DNA bands of LRR-domain which was expected to be approximately 945bp. The areas of the gel track corresponding to these sizes were excised, and the DNA fragments in the gel were purified with QIAquick Gel Extraction Kit Protocol, and then purified-DNA

fragments were sequenced. The results found that nucleotide sequences of CC-and NB-domains gave 93-95, 91-98 and 67.26-84.7% percentage of homologies with corresponding regions in CC-, NB- and LRR domains of *Bph14* gene respectively.

Keywords: *Oryza sativa* L., brown planthopper, *Bph14* gene

บทนำ

ข้าว (*Oryza sativa* L.) เป็นพืชอาหารหลักของประชากรโลก โดยเฉพาะประเทศไทยที่นิยมปลูกข้าวอย่างแพร่หลายเพื่อบริโภคทั้งในประเทศ และส่งออก โดยตั้งแต่เดือนมกราคม-ตุลาคม 2557 มีมูลค่าการส่งออกข้าวประมาณ 8.8 ล้านตัน ซึ่งเพิ่มจากปี 2556 ประมาณ 27.4% (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2557) อย่างไรก็ตามผลผลิตของข้าวต่อหน่วยพื้นที่ปลูกมีปริมาณลดลง อาจมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม การเข้าทำลายของโรคระบาด และแมลงศัตรูพืช เช่น เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown planthopper; BPH) เข้าทำลายทั้งข้าวป่า และข้าวปลูก โดยการเจาะดูดน้ำเลี้ยงบริเวณโคนต้น ตั้งแต่ระยะต้นกล้า จนถึงระยะออกรวง (พุติพงษ์ เพ็งฤกษ์ และคนอื่นๆ, 2554, น. 27-37) มีผลต่อการเจริญเติบโตของข้าว และทำให้เกิดอาการไหม้ "hopperburn" (Watanabe, & Kitagawa, 2000, pp. 1192-1198) นอกจากนี้ยังเป็นพาหะของเชื้อไวรัสโรคเขียวเตี้ย (grassy stunt) และโรคใบหงิก (ragged stunt) มาสู่ข้าว (Renganayaki, et al., 2002, pp. 2112-2117) โดยทั่วไปการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ใช้สารเคมีในการกำจัด ซึ่งต้องใช้แรงงานจำมาก เสียค่าใช้จ่ายสูง และยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เป็นอันตรายต่อมนุษย์ นอกจากนี้การใช้สารเคมีได้ลดศัตรูธรรมชาติของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีความต้านทานสารเคมี ดังนั้นเพื่อเป็นการลดการใช้สารเคมี ลดปัญหาสิ่งแวดล้อม มีแนวทางการแก้ไขที่จะส่งผลเสียน้อยที่สุดที่จะใช้ได้คือ การปรับปรุงให้ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

ในปัจจุบันค้นพบยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล จำนวน 21 ยีน ในข้าวปลูก 11 ยีน และข้าวป่า 10 ยีน (Rahman, et al., 2009, pp. 1237-1246) โดยมีรายงานว่ายีน *Bph14* มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 3 ของข้าว *Oryza officinalis* สามารถต้านทานเพลี้ยกระโดดได้หลาย biotype (Huang, He, Shu, Li, & Zhang, 2001, pp. 929-934) และเป็นเพียงยีนเดียวที่ทราบลำดับเบสทั้งยีน จากการวิเคราะห์ลำดับเบสในโครงสร้างของยีน *Bph14* พบว่ามีตำแหน่งอนุรักษ์ (conserved) ของโปรตีนเป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันโรค 3 domains ได้แก่ coiled-coil (CC), nucleotide-binding (NB) และ leucine-rich-repeat (LRR) domain (Du, et al., 2009, pp. 22163-22168) ซึ่งบ่งชี้ว่ายีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลอาจมี domains ทั้ง 3 ดังกล่าวอย่างเช่นในข้าว *O. officinalis* (Huang, et al., 2001, pp. 929-934) IR35 และ B5 (Du, et al., 2009, pp. 22163-22168) Sin Duong Kien An และ Loc Nuoc (Mai, & Hong, 2012, pp. 1424-1433) สำหรับยีน *Bph14* เป็นยีนหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับนำมาปรับปรุงพันธุ์ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการค้นพบ ยีน *Bph14* ในสายพันธุ์ข้าวพื้นเมือง และข้าวปลูกของไทย ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อการตรวจหายีน *Bph14*-homolog ในข้าวพื้นเมือง ข้าวปลูก และข้าวป่าของไทย ซึ่งผลการวิจัยที่ได้อาจเป็นแนวทางในการป้องกันการเข้าทำลายของเพลี้ยกะโดดสีน้ำตาลในข้าว และได้ข้อมูลพื้นฐานของยีน *Bph14* homologues ในข้าวของไทย เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ปรับปรุงพันธุ์ข้าวต่อไป

วิธีการศึกษา

1. รวบรวมสายพันธุ์ข้าว

ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวพิษณุโลก และกรมวิชาการเกษตร โดยมีข้าวพื้นเมืองไทย ข้าวปลูก และข้าวป่า มีทั้งหมด 37 (หมายเลขในวงเล็บแสดงแทนพันธุ์ข้าว) สายพันธุ์มีดังต่อไปนี้ *Mudgo* (1), *ASD7*(2), *Rathu Heenati* (3), *Babawee* (4), *Swarnalata* (5), *ARC10550* (6), *T12* (7), *Chin*

Saba (8), *Pokkali* (9), *d IR65482-4-132-2-2* (10), ปกาอำปึล (11), เนียงกวง (12), มะลิ 105 (13), มะลิแดง (14), มันปู (15), หอมนิล (15), ข้าวชาวนาพันธุ์ใหม่ 1 (17), ข้าวพื้นเมืองสตูล (18), *Taichung Native 1* (19), *Oryza officinalis* (20), สุพรรณบุรี 90 (21), กข 31 (22), กข 21 (23), สุพรรณบุรี 60 (24), กข 23 (25), พิษณุโลก 2 (26), หอมพิษณุโลก 2 (27), ชัยนาท 2 (28), ชัยนาท 1 (29), *O. rufipogon* GS.NO.18887 (30), *O. nivara* GS.NO.18855 (31), *O. nivara* GS.NO.16190 (32), *O. rufipogon* GS.NO. 16184 (33), *O. rufipogon* GS.NO. 15157 (34), *O. officinalis* GS.NO.18859 (35), *O. nivara* GS.NO.18847 (36) และ *O. nivara GS.NO.18854* (37)

2. การออกแบบไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับยีน *Bph14* (accession number: FJ941067) ของข้าวจาก gene bank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) จากนั้นวิเคราะห์เกี่ยวข้องกับ CC, NB และ LRR เพื่อออกแบบไพรเมอร์ (ดังตารางที่1) สำหรับใช้ในการตรวจสอบข้าวพื้นเมือง ข้าวปลูก และข้าวป่าไทย

ตารางที่ 1 ลำดับเบส specific primer

Primer (bp)	Forward sequence (5′➢ 3′)	Reverse sequence (5′➢ 3′)	Fragment size
CC	CACTGCTGTCCATGGTGAA	CAAGGCCAAGGGGCACTAC	267
NB	TGCCAAGAAATGTTCTGGTTC	TTTCAGTGAGTTGGTGTCAAGG	334
LRR	AAATTCGTGGTTGTTCTGGT	CCTTGTAGGATCGTTACCGA	945

3. สกัดดีเอ็นเอ

เตรียมตัวอย่างต้นข้าวสกัดดีเอ็นเอ โดยทำการแช่เมล็ดข้าวในน้ำเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง จนเมล็ดข้าวเริ่มงอก ย้ายลงปลูกในกระถาง (เมล็ด/กระถาง) นำไปปลูกในโรงเรือนคณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร เมื่อต้นข้าวอายุ 2 สัปดาห์ จึงตัดใบอ่อนมาสกัด ดีเอ็นด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงมาจาก Doyle, & Doyle (1987, pp. 11-15)

4. PCR Amplification

ในปฏิกิริยา PCR ประกอบสาร ดังนี้ dNTP 2 μM, 10×ViA buffer, $MgCl_2$ 50 mM, *Tag* polymerase, primer forward 7.5 mM, primer reverse 7.5 mM และ DNA 50 ng/μl ภายใต้เงื่อนไข ดังนี้ denaturing ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 3 นาที แล้วทำ 35 รอบ ของ denaturing ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 30 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 20 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 60 วินาที และสุดท้ายทำขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที

เก็บ PCR product ที่ 4°C เพื่อนำไปวิเคราะห์ความเหมือนความแตกต่างกับ ยีน *Bph14* ด้วย 1% gel electrophoresis จากนั้น purified PCR products จากเจลโดยการใช้ชุด HiYield™ Gle/PCR DNA Fragments Extraction Kit(RBCBioscience) และวิเคราะห์ลำดับเบส โดยส่ง purified DNA ไปตรวจสอบที่ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

5. วิเคราะห์ความเหมือน และความแตกต่าง

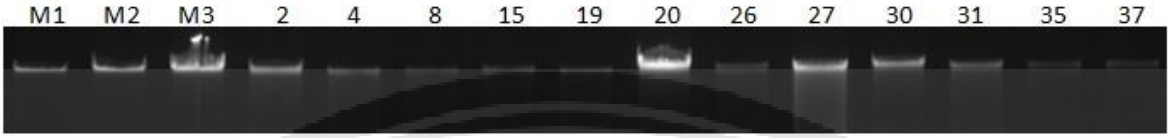
นำลำดับเบสที่ได้จากข้อ 4 มาตรวจสอบหายีน *Bph14* และ ยีน *Bph14* homologues โดยเทียบกับยีน *Bph14* (accession number: *Os03g0848700* หรือ FJ941067) โดยใช้โปรแกรม BLAST และ ClustalW2

ผลการศึกษา

การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

เพื่อตรวจสอบปริมาณ และคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างข้าว (สุ่มมา12 พันธุ์ จากข้าวทั้งหมดจำนวน 37 พันธุ์) พบว่าข้าวหมายเลข 4, 8, 15, 19, 26, 35 และ 37 มีความเข้มข้นประมาณ 25 ng/μl (เทียบกับความเข้มข้นของ λ DNA มาตรฐาน) ข้าวหมายเลข 2 และ 31 มีความเข้มข้นประมาณ 50 ng/μl ข้าวหมายเลข 27 และ 30 มีความเข้มข้นประมาณ

100 ng/µl และข้าวหมายเลข 20 มีความเข้มข้นมากกว่า 100 ng/µl (รูปที่ 1) การทดลองบ่งชี้ว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Doyle, & Doyle (1987, pp. 11-15) มีคุณภาพ และความบริสุทธิ์สูงตลอดจนมีปริมาณเพียงพอซึ่งสามารถนำไปใช้ในปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR)

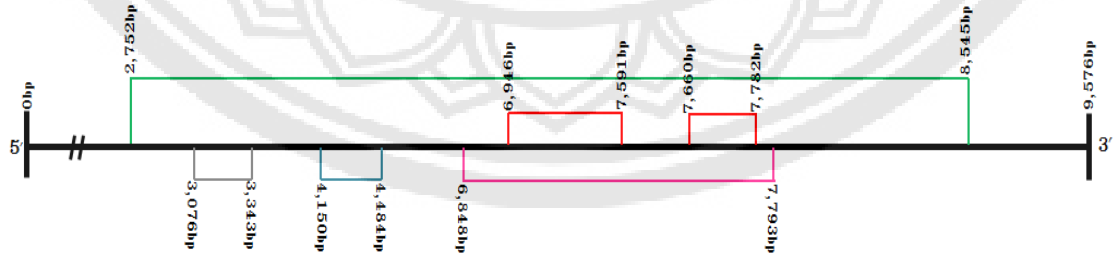


รูปที่ 1 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดจากใบอ่อนข้าว บน 1%agarose gel electrophoresis M1, M2 และ M3 แสดง λ DNA ที่มีความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ng/µl ตามลำดับ หมายเลข 2, 4, 8, 15, 19, 20, 26, 27, 30, 31, 35 และ 37 แทนตัวอย่างข้าวที่ใช้ในการศึกษา (ดูได้จากวิธีการที่ 2)

จากรายงานของ Du, et al. (2009, pp. 22163-22168) พบว่า ยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Bph14*) ในข้าวกลุ่ม *Oryza officinalis* ประกอบด้วยตำแหน่งอนุรักษ์ (conserved) 3 domains ได้แก่ coiled-coil (CC), nucleotide-binding (NB) และ leucine-rich-repeat (LRR) domain อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการค้นพบยีน *Bph14* ในข้าวกลุ่มอื่น (Tamura, et al., 2014, p. 5872) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมาย เพื่อศึกษาตรวจหา homologues ของยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Bph14* ในข้าวพื้นเมือง ข้าวปลูก และข้าวป่าไทย โดยทำการวิเคราะห์ 3 domains ได้แก่ CC-, NB- และ LRR- domain ซึ่งผลการทดลองมีดังนี้

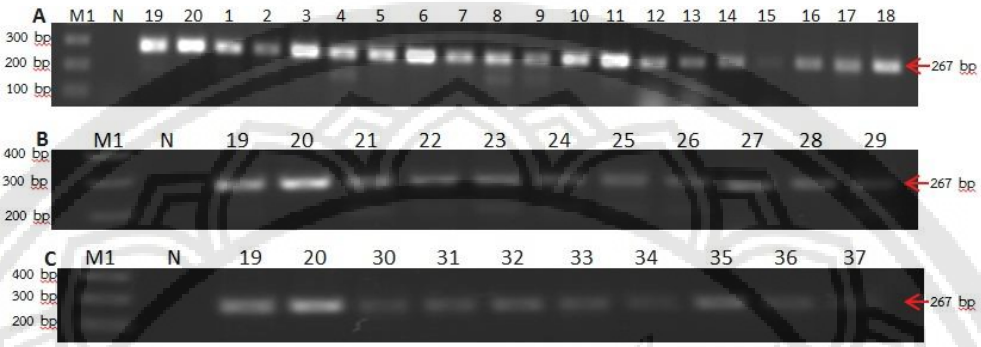
การทดสอบ CC-domain ของยีน *bph14* ในข้าวพื้นเมือง ข้าวปลูก และข้าวป่าของไทย โดยใช้เทคนิค PCR

การทดสอบ CC-domain ของยีน *Bph14* ในข้าวพื้นเมือง ข้าวปลูก และข้าวป่าของไทย โดยใช้เทคนิค PCR ทำการวิเคราะห์ตำแหน่งของ CC-domain ของยีน *Bph14* เพื่อใช้ทำนายผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ สำหรับปฏิกิริยา PCR สามารถทำได้โดยนำลำดับเบสของ CC-primer (Du, et al., 2009, pp. 22163-22168) ได้แก่ Forward primer (5′-CACTGCTGTCCATGGTGAA-3′) และ Reverse primer (5′-CAAGGCCAAGGGGCACTAC-3′) มา alignment เปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน *Bph14* (accession number: FJ941067) โดยโปรแกรม ClustalW2 ผลการตรวจสอบพบว่าลำดับเบสของ CC-domain มีความเหมือน 100% โดยมีตำแหน่งอยู่ในส่วนของยีน *Bph14* โดยมีลำดับเบสอนุรักษ์ที่ตำแหน่งระหว่าง 3,076-3,343bp (มีความยาว 276 bp) (รูปที่ 2) ซึ่งผลการวิเคราะห์นี้บ่งชี้ว่าการใช้เทคนิค PCR ร่วมกับ CC-primer สามารถนำมาใช้ตรวจสอบ CC-domain ในตัวอย่างข้าวที่ใช้ศึกษาได้ โดยถ้าข้าวพันธุ์ใดที่มี CC-domain ต้องให้ผล PCR product ที่มีขนาดเท่ากับ 276bp



รูปที่ 2 แผนที่แสดงตำแหน่งของลำดับเบสของ 3 domains ในยีน *Bph14* ที่มีขนาด 9,576bp ตัวยีนเริ่มตั้งแต่ตำแหน่ง 2,752-8,545bp ประกอบด้วย intron 2 ตำแหน่ง 6,946-7,591bp และ 7,660-7,782bp, CC-domain อยู่ที่ตำแหน่ง 3,076-3,343bp (ขนาด 267bp), NB domain อยู่ที่ตำแหน่ง 4,150-4,484bp (ขนาด 334bp), และ LRR domain อยู่ที่ตำแหน่ง 6,848-7,793bp (ขนาด 945bp) (—) แทนยีน *Bph14*, (—) แทนตำแหน่ง intron, (—) แทนตำแหน่ง CC domain, (—) แทนตำแหน่ง NB domain, (—) แทนตำแหน่ง LRR domain

เมื่อทำการตรวจสอบ CC-domain ในตัวอย่างข้าวพื้นเมือง ข้าวปลูก และข้าวป่าไทย จำนวน 37 พันธุ์ โดยใช้ CC-primer ในปฏิกิริยา PCR ผลการทดลองพบว่า ข้าวทั้ง 37 พันธุ์ ปรากฏแถบของ PCR Product มีขนาดประมาณ 267bp (รูปที่ 3) นั่นแสดงว่าข้าวทุกพันธุ์ที่ศึกษามี CC-domain อยู่ในส่วนของจีโนม ดังนั้นจึงควรทำการวิเคราะห์ความเหมือนความแตกต่างของลำดับเบสของ PCR product ต่อไป



รูปที่ 3 การทดสอบ CC-domain กับข้าวจำนวน 37 พันธุ์ Marker Gene Ruler DNA Ladder Mix(M1), Negative control (N) หมายเลขแทนตัวอย่างข้าวดูได้จาก (วิธีการที่ 2)

เพื่อวิเคราะห์ความเหมือนของ CC-domain ในข้าวพื้นเมือง ข้าวปลูก และข้าวป่าไทย (โดยเปรียบเทียบลำดับเบสกับ CC-domain ในยีน *Bph14*) ทำการทดลองโดยสุ่มตัวอย่างข้าวจำนวน 11 พันธุ์ จาก 37 พันธุ์ มาทำการ Purified PCR product โดยใช้ชุด HiYield™ Gle/PCR DNA Fragments Extraction Kit(RBCBioscience) แล้วส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำเบสที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จากนั้นนำลำดับเบสมาวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นความเหมือนของ CC-domain กับข้าวพันธุ์ต่าง ๆ เทียบกับลำดับเบสของ CC-domain ในยีน *Bph14* ด้วยโปรแกรม ClustalW2 ผลการวิเคราะห์พบว่า ข้าว 11 สายพันธุ์ที่สุ่มตัวอย่าง มีค่าความเหมือนของลำดับเบสอยู่ในช่วง 93-95% (ดังตารางที่ 2) ซึ่งบ่งชี้ว่ามีตำแหน่งอนุรักษ์ของ CC-domain อยู่ในข้าวทุกพันธุ์

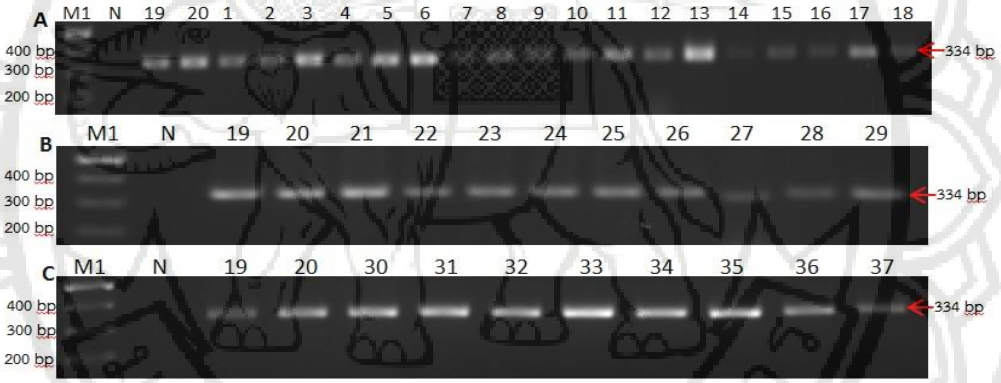
ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสใน CC-domain ของข้าว 11 สายพันธุ์ที่สุ่มมาศึกษา (โดยเทียบกับ CC-domain ของยีน *Bph14*)

ลำดับ	หมายเลขพันธุ์ข้าว	รายชื่อพันธุ์ข้าว	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน
1	19	Taichung Native 1 (TN1)	95
2	20	*Oryza officinalis*	95
3	4	Babawee	94
4	8	Chin Saba	95
5	26	พิษณุโลก 2	95
6	27	หอมพิษณุโลก 2	93
7	30	*O. rufipogon* GS.NO.18887	94
8	31	*O. nivara* GS.NO.18855	93
9	35	*O. officinalis* GS.NO.18859	95
10	15	หอมนิล (สุรินทร์)	93
11	18	ข้าวพื้นเมืองสตูล	95

การทดสอบ NB-domain ของยีน *bph14* ในข้าวพื้นเมือง ข้าวปลูก และข้าวป่าของไทย โดยใช้เทคนิค PCR

ทำการวิเคราะห์ตำแหน่งของ NB-domain ของยีน *Bph14* เพื่อใช้ทำนายผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ สำหรับปฏิกิริยา PCR สามารถทำได้โดยนำลำดับเบสของ NB-primer (Du, et al., 2009, pp. 22163-22168) ได้แก่ Forward primer (5′-TGCCAAGAAATGTTCTGGTTC-3′) และ Reverse primer (5′-TTTCAGTGAGTTGGTGTCAAGG-3′) มา alignment เปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน *Bph14* โดยโปรแกรม ClustalW2 ผลการตรวจสอบ พบว่า ลำดับเบสของ NB-domain มีความเหมือน 100% โดยมีลำดับเบสอนุรักษ์ที่ตำแหน่งระหว่าง 4,150-4,484bp (มีความยาว 334bp) (รูปที่ 2) ซึ่งผลการวิเคราะห์นี้บ่งชี้ว่าการใช้เทคนิค PCR ร่วมกับ NB-primer สามารถนำมาใช้ตรวจสอบ NB-domain ในตัวอย่างข้าวที่ใช้ศึกษาได้ โดยถ้าข้าวพันธุ์ใดที่มี NB-domain ต้องให้ผล PCR product ที่มีขนาดเท่ากับ 334bp

ทำการตรวจสอบ NB-domain ในตัวอย่างข้าวพื้นเมือง ข้าวปลูก และข้าวป่าไทย จำนวน 37 พันธุ์ มาทดสอบโดยใช้ NB-primer ในปฏิกิริยา PCR ผลการทดลองพบว่า ข้าวทั้ง 37 พันธุ์ ปรากฏแถบของ PCR Product มีขนาดประมาณ 334bp (รูปที่ 4) นั่นแสดงว่าข้าวทุกพันธุ์มี NB-domain อยู่ในส่วนของจีโนม จึงควรวิเคราะห์ความเหมือนความแตกต่างของลำดับเบสของ PCR product ต่อไป



รูปที่ 4 การทดสอบ NB-domain กับข้าวจำนวน 37 พันธุ์ Marker Gene Ruler DNA Ladder Mix (M1),Negative control (N) หมายเลขแทนตัวอย่างข้าวดูได้จาก (วิธีการที่ 2)

เพื่อวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับเบสใน NB-domain ของข้าวพื้นเมือง ข้าวปลูก และข้าวป่าไทย (โดยเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ NB-domain ในยีน *Bph14*) จึงทำการทดลองโดยสุ่มตัวอย่างข้าวจำนวน 8 พันธุ์ จาก 37 พันธุ์ มาทำการ Purified PCR product โดยใช้ชุด HiYield™ Gle/PCR DNA Fragments Extraction Kit(RBCBioscience) แล้วส่งไปวิเคราะห์ลำเบส ที่คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จากนั้นทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบเปอร์เซ็นความเหมือนของลำดับเบสใน NB-domain ของตัวอย่างข้าวที่ศึกษา กับ NB-domain ในยีน *Bph14* ด้วยโปรแกรม ClustalW2 ผลการวิเคราะห์ พบว่าจากข้าว 8 สายพันธุ์ที่สุ่มตัวอย่างมาศึกษา มีค่าความเหมือนอยู่ในช่วง 91-98% (ดังตารางที่ 3) ซึ่งบ่งชี้ว่าในมีตำแหน่งอนุรักษ์ของ NB-domain อยู่ในตัวอย่างพันธุ์ข้าว

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสใน NB-domain ของข้าว 8 สายพันธุ์ที่สุ่มมาศึกษา (โดยเทียบกับ NB-domain ของยีน *Bph14*)

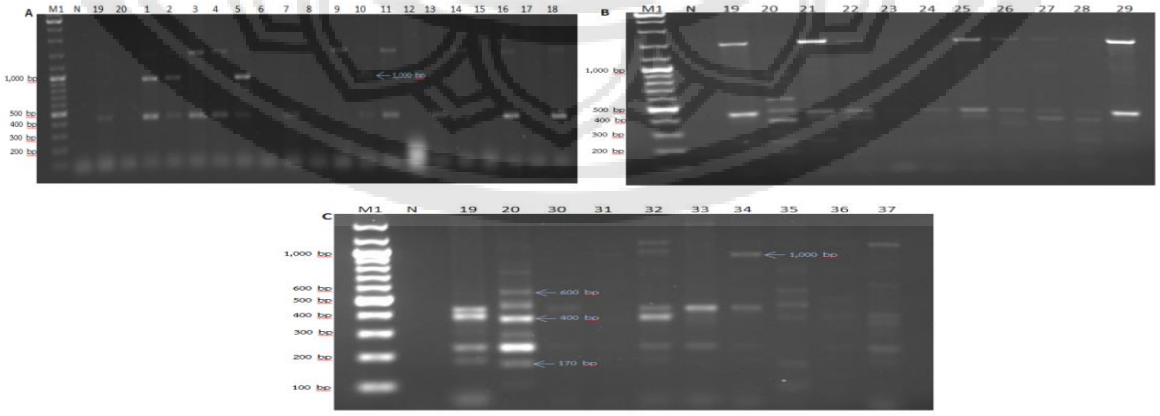
ลำดับ	หมายเลขพันธุ์ข้าว	รายชื่อพันธุ์ข้าว	เปอร์เซ็นความเหมือน
1	19	Taichung Native 1 (TN1)	94
2	20	*Oryza officinalis*	98
3	4	Babawee	94
4	8	Chin Saba	93
5	30	*O. rufipogon* GS.NO.18887	94
6	35	*O. officinalis* GS.NO.18859	97
7	15	หอมนิล (สุรินทร์)	91
8	18	ข้าวพื้นเมืองสตูล	94

การทดสอบ LRR domain ของยีน *bph14* ในข้าวพื้นเมือง ข้าวปลูก และข้าวป่าไทย โดยใช้เทคนิค PCR

ทำการวิเคราะห์ตำแหน่งของ LRR-domain ของยีน *Bph14* เพื่อใช้ทำนายผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ สำหรับปฏิกิริยา PCR สามารถทำได้โดยนำลำดับเบสของ LRR-primer (Du, et al., 2009, pp. 22163-22168) ได้แก่ Forward primer (5′- AAATTCGTGGTTGTTCTGGT-3′) และ Reverse primer (5′-CCTTGTAGGATCGTTACCGA-3′) มา alignment เปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน *Bph14* โดยโปรแกรม ClustalW2 ผลการตรวจสอบ พบว่า ลำดับเบสของ LRR-domain มีความเหมือน 100% โดยมีลำดับเบสอนุรักษ์ที่ตำแหน่งระหว่าง 6,848-7,793bp (มีความยาว 945bp) (รูปที่ 2) ซึ่งผลการวิเคราะห์นี้บ่งชี้ว่าการใช้เทคนิค PCR ร่วมกับ LRR-primer สามารถนำมาใช้ตรวจสอบ LRR-domain ในตัวอย่างข้าวที่ใช้ศึกษาได้ โดยถ้าข้าวพันธุ์ใดที่มี LRR-domain ต้องให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดเท่ากับ 945bp

เมื่อทำการตรวจสอบ LRR-domain ในตัวอย่างข้าวพื้นเมือง ข้าวปลูก และข้าวป่าไทย จำนวน 37 พันธุ์ โดยใช้ LRR-primer ในปฏิกิริยา PCR ผลการทดลองพบว่า ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดแตกต่างกันในสายพันธุ์ข้าวที่ใช้ศึกษา โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดใกล้เคียงกับ LRR-domain ที่คาดการณ์ คือ ประมาณ 1,000bp ซึ่งพบในข้าวสายพันธุ์ที่ 1, 2, 5, 10 และ 34 (รูปที่ 5) นั่นแสดงว่าข้าวบางพันธุ์เท่านั้นที่อาจมี LRR-domain จึงควรวิเคราะห์ความเหมือนความแตกต่างของลำดับเบส ของ PCR product ต่อไป

นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบอีกว่า การตรวจสอบ LRR-domain ในข้าวพันธุ์ต้านทาน (*O.officinalis*, หมายเลข 20) และพันธุ์ไม่ต้านทาน (*Taichung Native 1*, หมายเลข 19) (รูปที่ 5) ให้ผลผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่แตกต่างกัน คือ ขนาด 170, 400 และ 600bp ในพันธุ์ต้านทาน แต่ไม่พบในพันธุ์อ่อนแอ ดังนั้นจึงควรวิเคราะห์ความเหมือนความแตกต่างของลำดับเบส ของ PCR product ต่อไป



รูปที่ 5 การทดสอบ LRR domain กับข้าวจำนวน 37 พันธุ์ Marker Gene Ruler DNA Ladder Mix(M1), Negative control (N) หมายเลขแทนตัวอย่างข้าวดูได้จาก (วิธีการที่ 2)

เพื่อวิเคราะห์ความเหมือนของ LRR-domain ในข้าวพื้นเมือง ข้าวปลูก และข้าวป่าไทย (โดยเปรียบเทียบลำดับเบสกับ LRR-domain ในยีน *Bph14*) ทำการทดลองโดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาด 1,000bp จากตัวอย่างอย่างข้าวหมายเลข 1, 2, 5, 10 และ 34 แล้วนำมา Purified PCR product โดยใช้ชุด HiYield™ Gle/PCR DNA Fragments Extraction Kit(RBCBioscience) จากนั้นส่งไปวิเคราะห์ลำเบสที่ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จากนั้นทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบเปอร์เซ็นความเหมือนของลำดับเบสใน LRR-domain ของตัวอย่างข้าวที่ศึกษา กับ LRR-domain ในยีน *bph14* ด้วยโปรแกรม ClustalW2 ผลการวิเคราะห์ พบว่าจากข้าว 5 สายพันธุ์ที่สุ่มตัวอย่างมาศึกษา โดยมีเพียงข้าวหมายเลขที่ 5 และ 34 เท่านั้นที่ได้ข้อมูลของลำดับเบสเพื่อวิเคราะห์ค่าความเหมือน (ส่วนหมายเลขที่ 1, 2, และ 10 พบว่าการอ่านข้อมูลลำดับเบสไม่สมบูรณ์) ซึ่งผลพบว่าอยู่ในช่วง 67.26-78.65% (ดังตารางที่ 4) ซึ่งบ่งชี้ว่าในมีตำแหน่งอนุรักษ์ของ LRR domain อยู่ในตัวอย่างพันธุ์ข้าว

นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับเบสของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ขนาด 170, 400 และ 600bp ในพันธุ์ต้านทาน (20) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ LRR-domain ในยีน *Bph14* อยู่ในช่วง 75.1-84.7% (ดังตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสใน LRR-domain ของข้าว 3 สายพันธุ์ที่ สุ่มมาศึกษา (โดยเทียบกับ LRR-domain ของยีน *Bph14*)

ลำดับ	หมายเลขพันธุ์ข้าว	รายชื่อพันธุ์ข้าว	เปอร์เซ็นความเหมือน
1	5	*Swarnalata*	67.26
2	34	*Oryza rufipogon* GS.NO.15157	78.65
3	20_{170**}	*O.officinalis*	84.7
4	20_{400**}	*O.officinalis*	81.1
5	20_{600**}	*O.officinalis*	75.1

$_{170**}$ แทนขนาดของ PCR product ขนาดประมาณ 170bp, $_{400**}$ แทนขนาดของ PCR product ขนาดประมาณ 400bp, $_{600**}$ แทนขนาดของ PCR product ขนาดประมาณ 600bp

อภิปรายผลการศึกษา

จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว ด้วยวิธีดัดแปลงจาก Doyle, & Doyle (1987, pp. 11-15) โดยไม่เติม 2-β-mercaptoethanol ผลการทดลองพบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพสูงและมีปริมาณเพียงพอสำหรับใช้ในงานพีซีอาร์ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากคุณสมบัติของ 2% CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) เหมาะสมในการกำจัดสารโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในใบข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังมีรายงานการใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดย CTAB ได้ผลดีในกล้วยไม้สกุลช้าง (ธนากร วงษศา, อภินันท์ ลิ้มมงคล และอนุพันธ์ กงบังเกิด, 2008, น. 165-175) และ ข้าวโพด (วันชัย เย็นเพชร, ชบา จำปาทอง, และศานนท์ สุขสถาน, 2010, น. 360-366) ผลการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าวิธีดัดแปลงจาก Doyle, & Doyle (1987, pp. 11-15) เป็นวิธีหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว เนื่องจากให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพสูง ที่ง่ายรวดเร็ว ราคาไม่แพง และปลอดภัยจากสารเคมีโดยเฉพาะ 2-β-mercaptoethanol ที่เป็นอันตรายต่อทางเดินหายใจและผิวหนัง (Chevron Phillips Chemical Company LP, 2014)

จากการตรวจสอบ homologues ของยีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (ยีน *Bph14*) ในข้าวพื้นเมืองไทย ข้าวปลูก และข้าวป่า จำนวน 37 สายพันธุ์ โดยทำการตรวจสอบ 3 conserved domains ยีน *Bph14* ได้แก่ coiled-coil (CC), nucleotide-binding (NB) และ leucine-rich-repeat (LRR) domains ด้วยเทคนิค PCR และ DNA sequencing ผลทดลองพบว่า ในจีโนมของข้าวทุกสายพันธุ์ที่ใช้ศึกษา ประกอบด้วย CC- และ

NB-domain โดยมีความเหมือนของลำดับเบสสูงประมาณ 91-98% (เทียบกับ CC- และ NB-domain ใน *Bph14*, FJ941067) ซึ่งบ่งชี้ว่าในข้าวพันธุ์ที่ศึกษาอาจมียีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคและแมลง (อาจไม่ใช่หรือไม่ใช่ยีน *Bph14*) ทั้งนี้เนื่องจาก CC-NB-domain เป็นบริเวณอนุรักษ์ที่พบในส่วนของยีนจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคและแมลง (Takken, & Tameling, 2009, pp. 744-746) เช่น พบในข้าวบางสายพันธุ์ของ *Oryza rufipogon*, *Oryza japonica*, และ *Oryza indica* (Du, et al., 2009, pp. 22163-22168) และข้าวเวียดนามสายพันธุ์ *Oryza sativa* (Sai Duong Kien An และ Loc Nuoc) (Mai, & Hong, 2012, pp. 1424-1433) เป็นต้น

เพื่อยืนยันความเป็น homologues ของยีน *Bph14* จึงทำการตรวจสอบ LRR-domain ในข้าวทั้ง 37 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค PCR พบว่ามีเพียง 5 สายพันธุ์เท่านั้นที่มี LRR-domain อยู่ในจีโนม ซึ่งอาจบ่งชี้ได้ว่าข้าวทั้ง 5 สายพันธุ์อาจมียีน *Bph14* หรือ *Bph14*-homologues จึงทำการตรวจสอบโดยการวิเคราะห์ลำดับเบส ผลการทดลองพบว่า มีความเหมือนของลำดับเบสเพียง 67.26-78.65% (เทียบกับ LRR-domain ใน *Bph14* FJ941067) ซึ่งผลบ่งชี้ได้เพียงว่ายีนดังกล่าวที่พบในข้าวสายพันธุ์ดังกล่าวอาจเป็นเพียง *Bph14*-homologues เนื่องจากมีค่าความเหมือนของลำดับเบสน้อยกว่า 90% ถึงแม้ว่า LRR-domain เป็นตำแหน่ง conserved domain ในยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคและแมลง (Takken, & Tameling, 2009, pp. 744-746) แต่ก็มีความหลายลายและมีความจำเพาะในแต่ละยีน เช่น ใน *Bph14 พบว่า* LRR-domain มีกรดอะมิโนแตกต่างจากยีนเด่น *Bph* หรือ ยีนด้อย *bph* อื่นๆ ประมาณ 54 ตัว และมีตำแหน่งกรดอะมิโนขาดหายไป 2 ตัว (Du, et al., 2009, pp. 22163-22168) ทำให้ LRR-domain อาจเป็นตัวกำหนดความจำเพาะในการต้านทานต่อชนิดของโรค เช่น ใน flax (Martin, Bogdanove, & Sessa, 2003, pp. 23-61)

อย่างไรก็ตามผลจากการวิจัยครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานของข้าวบางสายพันธุ์ที่อาจมียีนต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล แบบ *Bph14*-homologues หรืออาจเป็นยีนตัวใหม่ ดังนั้นควรทำการตรวจสอบ โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งหมดของยีน จากนั้นควรทำการศึกษาหน้าที่การทำงานของยีนในการตอบสนองความต้านทานเพลี้กระโดดสีน้ำตาลต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวพิษณุโลก และสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จังหวัดปทุมธานี ที่อนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ปี 2556 และงบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปี 2556 และภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการดำเนินการวิจัย ทำให้การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ธนากร วงษศา, อภินันท์ ลิ้มมงคล, และอนุพันธ์ กงบังเกิด. (2008). การเปรียบเทียบวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลช้าง. *วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวร*, *5*(2), 165-175.

พุฒิพงษ์ เพ็งฤกษ์, วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ, ไสว บูรณพานิชพันธุ์, จิราพร กุลสาริน, เจตน์ คชฤกษ์, สุรเดช ปาละวิสุทธิ์, และคนอื่นๆ. (2554). ความหลากหลายทางชีวชนิดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย. *วารสารเกษตร*, *27*(1), 27-37.

วันชัย เย็นเพชร, ชบา จำปาทอง, และศานนท์ สุขสถาน. (2010). การสกัดดีเอ็นเอจากข้าวโพดในระดับเล็กสำหรับทำพีซีอาร์ ในการ *ประชุมเชิงปฏิบัติการโครงการวิจัยแม่บทข้าวโพดและข้าวฟ่าง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เรื่องการเพิ่มผลผลิตข้าวโพดและข้าวฟ่างเพื่อพัฒนาคุณภาพชีวิตและสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน ครั้งที่ 4* (น. 360-366). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. (2557). ค้นเมื่อ 20 พฤศจิกายน 2557, จาก http://www.thairiceiceexporters.or.th

Chevron Phillips Chemical Company LP. (2014). 2-Mercaptoethanol (BME) [Pamphlet]. N.P.: Chevron Phillips Chemical Company.

Doyle, J. J., & Doyle, L. J. (1987). A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull*, 19, 11-15.

Du, B., Zhang, W., Liu, B., Hu, J., Wei, Z., & Shi, Z., et al. (2009). Identification and characterization of *Bph14*, a gene conferring resistance to brown planthopper in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 22163-22168.

Huang, Z., He, G., Shu, L., Li, X., & Zhang, Q. (2001). Identification and mapping of two brown planthopper resistance genes in rice. *Theor Appl Genet*, 102, 929-934.

Mai, P. T. T., & Hong, H. T. K. (2012). *Bph*14 gene determining brown-planthopper *(Nilaparvata lugens Stal)* resistance in rice varieties *(Oryza sativa L.)*. *Annals of Biological Research*, *3*(Suppl. 3), 1424-1433.

Martin, G. B., Bogdanove, A. J., & Sessa, G. (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu Rev Plant Biol*, 54, 23-61.

Rahman, M. L., Jiang, W., Chu, S. H., Qiao, Y., Ham, T. H., & Woo, M. O., et al. (2009). High-resolution mapping of two rice brown planthopper resistance genes, *Bph20(t)* and *Bph21(t)*. *Oryza minuta*. *Theor Appl Genet*, 119, 1237-1246.

Renganayaki, K., Fritz, A. K., Sadasivam, S., Pammi, S., Harrington, S. E., & McCouch, S. R., et al. (2002). Mapping and Progress toward Map-Based Cloning of Brown Planthopper Biotype-4 Resistance Gene Introgressed from *Oryza officinalis* into Cultivated Rice, *O. sativa*. *Crop Sci*, 42, 2112-2117.

Takken, F. L. W., & Tameling, W. I. L. (2009). To nibble at plant resistance proteins. *Science*, 324, 744-746.

Tamura, Y., Hattori, M., Yoshioka, H., Yoshioka, M., Takahashi, A., & Wu, J., et al. (2014). Map-based Cloning and Characterization of a Brown Planthopper Resistance Gene BPH26 from *Oryza sativa* L. ssp. Indica Cultivar ADR52. *Scientific Reports*, 4, 5872. doi: 10.1038/srep.05872

Watanabe, T., & Kitagawa, H. (2000). Photosynthesis and translocation of assimilates in rice plants following phloem feeding by planthopper Nilaparvata lugens (Homoptera: Delphacidae). *J. Ecol. Entomol*, *93* (Suppl. 4), 1192-1198.

Translated Thai Reference

Phangrerk, P., Pongprasert, W., Buranapanichpan, S., Kulsarin, J., Kotcharerk, J., & Palawisut, S., et al. (2011). Biotype Diversity of Brown Planthopper in Lower Northern Thailand. *Journal of Agriculture*, *27*(1), 27-37. [in Thai]

Thai Rice Exporters Association. Export Statistics. Retrieved November 20, 2014, from http://www.thairiceexporters.or.th/ [in Thai]

Wongsa, T., Limmongkon, A,. & Kongbangkerd, A. (2008). Optimization Methods for DNA Extraction from *Rhynchostylis* sp.. *Naresuan University Journal*, *5*(2), 165-175. [in Thai]

Yenpetch, W., Jampatong, C., & Suksatan, S. (2010). Maize DNA preparation in small-scale for PCR. In Proceedings of the 4th Workshop of Corn and Sorghum Research Project of Kasetsart University: Corn and sorghum yield increasing to improve the quality of life and environmental sustainability, Bangkok (Thailand), pp. 360-366. Bangkok: Kasetsart University. [in Thai]