กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2548-2550 คณะวิจัยใคร่ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล เหล่าสุวรรณ ที่ให้คำปรึกษาด้านการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีดั้งเดิม Prof. Bruce Reisch มหาวิทยาลัย Cornell ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์ต้านทาน ให้สถานที่ดำเนินการทดลองบางส่วน และให้คำปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด ที่ให้คำปรึกษาด้านพันธุ์ การปลูกและดูแลรักษาองุ่น ดร. อัศจรรย์ สุขธำรง ที่ให้คำปรึกษาด้านวัสดุปลูกองุ่น และขอบคุณ ผศ.ดร. ฐิติพร มะชิโกวา ที่ให้ข้อมูลอันเป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์ข้อมูล นอกจากนี้คณะวิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาการวิจัย รวมทั้งนักศึกษาบัณฑิตและผู้ช่วยวิจัยหลายท่านที่ช่วยจัดเตรียมรายงานการวิจัยฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

บทคัดย่อ

การวิจัยเพื่อโคลนยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายยีนต้านทาน (resistance gene analogs; RGAs) จากองุ่น (*Vitis* spp.) ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคราน้ำค้าง (*Plasmopara viticola*) และปรับปรุงพันธุ์องุ่นรับประทานผลสดเพื่อให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างโดยวิธีดั้งเดิม ซึ่งดำเนินการในช่วงปี 2548-2550 มีดังต่อไปนี้ **(1) การโคลน RGAs จากองุ่น และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจาก RGAs** ราน้ำค้างเป็นโรคสำคัญโรคหนึ่งขององุ่นพันธุ์ที่ปลูกอย่างแพร่หลายในประเทศไทย มีการแสวงหายีนต้านทานโรคเพื่อนำมาใช้ในการพัฒนาพันธุ์ใหม่ที่มีระดับการต้านทานโรคสูงขึ้น เนื่องจากการใช้พันธุ์ต้านทานโรคมีข้อได้เปรียบกว่าการจัดการโรคด้วยสารเคมี งานวิจัยนี้โคลน RGAs ชนิด nucleotide-binding site (NBS)-leucine rich repeat (LRR) จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์จำเพาะต่อ P-loop และ GLPL ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ของ NBS ได้โคลน RGAs จำนวน 139 โคลนจากองุ่นพันธุ์ป่า *V. cinerea* B9 (48 โคลน) องุ่นลูกผสมที่ต้านทานต่อทั้งโรคราน้ำค้างและสแคบ NY88.0507.01 (42 โคลน) และองุ่นพันธุ์อ่อนแอ Black Queen (49 โคลน) จัดแบ่งกลุ่มโคลนเหล่านี้ได้ 22 กลุ่ม ตามความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 90% ขึ้นไป การวิเคราะห์ BLASTx ของโคลนตัวแทน 22 โคลน พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับโปรตีน NBS-LRR ที่ทราบแน่ชัด หรือโปรตีนที่คาดว่าเป็นโปรตีนต้านทาน การจัดเรียง (multiple alignment) RGA ตัวแทนเปรียบเทียบกับโปรตีนต้านทานที่ทราบแน่ชัด 5 โปรตีน พบ conserved P-loop, kinase-2, RNBS and GLPL motifs ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ของโปรตีน NBS-LRR RGAs 4 โคลนมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับโปรตีนต้านทานที่ทราบแน่ชัดอย่างน้อย 40% การวิเคราะห์ phylogenetic แสดง RGAs ตัวแทนจากทั้งสามจีโนไทป์กระจายตัวทั่วแผนภาพ phylogram บนแขนงหลักสองแขนง แยกเป็นโปรตีน NBS-LRR ชนิด TIR (*Drosophila Toll* and mammalian *Interleukin-1 Receptor*) หรือ non-TIR เครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาจาก *Vitis* RGAs 1 เครื่องหมายคือ rgVamu085 แสดงความหลากหลายของดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์พ่อแม่ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรค และมีสหสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับความต้านทานโรคราน้ำค้าง แม้ว่าจะพบ recombination ระหว่างเครื่องหมายนี้และยีนต้านทานโรคราน้ำค้างที่อาจจำกัดการใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์ แต่เครื่องหมายนี้อาจเป็นประโยชน์ต่อการกำหนดตำแหน่งยีนต้านทานโรคบนแผนที่พันธุศาสตร์เมื่อมีการพัฒนาเครื่องหมายใหม่เพิ่มเติมในอนาคต **(2) การถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคราน้ำค้าง และปรับปรุงพันธุ์องุ่นรับประทานผลสดเพื่อให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างโดยวิธีดั้งเดิม** ทำการผสมองุ่นจำนวน 9 คู่ผสม โดยผสมระหว่างสายพันธุ์พ่อที่ต้านทานโรคราน้ำค้าง 3 สายพันธุ์ (NY88.0517.01, NY65.0550.04 and NY65.0551.05) และ

พันธุ์อ่อนแอต่อโรคที่เป็น *V. vinifera* 3 พันธุ์ (Black Queen, Carolina Black Rose and Italia) วิเคราะห์ความต้านทานโรคราน้ำค้างโดยใช้ลูกผสม 85 ต้น พบว่าวาเรียนซ์ของสมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (general combining ability; gca) ของพันธุ์พ่อแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่วาเรียนซ์ของสมรรถนะการรวมตัวทั่วไปของพันธุ์แม่และสมรรถนะการรวมตัวจำเพาะ (specific combining ability; sca)ไม่แตกต่างทางสถิติ ชี้ให้เห็นว่าการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของโรคราน้ำค้างส่วนใหญ่เป็นการแสดงออกของยีนในแบบบวก (additive gene action) มากกว่าแบบที่ไม่ใช่แบบบวก (non-additive gene action) ค่าประมาณอัตราพันธุกรรมแบบแคบ (narrow sense heritability) ของความต้านทานโรคราน้ำค้างในประชากรนี้มีค่าเท่ากับ 55.6 เปอร์เซ็นต์ คู่ผสม Carolina Black Rose x NY65.0550.04 ให้ผลของสมรรถนะการรวมตัวจำเพาะที่มีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และให้ลูกผสมที่มีสัดส่วนต้นต้านทานสูงสุด (75.0%) จึงจัดเป็นคู่ผสมที่เหมาะสมและสมควรใช้ในการปรับปรุงพันธุ์องุ่นเพื่อต้านทานโรคในอนาคต จากลูกผสมจำนวนทั้งหมด 101 ต้นของ 13 คู่ผสมระหว่างสายพันธุ์ต้านทานโรคราน้ำค้างและพันธุ์อ่อนแอ พบ 13 ลูกผสมที่มีความต้านทานมากต่อโรคราน้ำค้างจากการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ ย้ายต้นลูกผสมเหล่านี้พร้อมพันธุ์พ่อแม่ออกปลูกในสภาพไร่เพื่อประเมินการเจริญเติบโตทางลำต้น คุณภาพผล ผลผลิต และความต้านทานโรคราน้ำค้างในโครงการปรับปรุงพันธุ์ระยะที่สองต่อไป

ABSTRACT

The followings were the research conducted during 2004 to 2007 to clone resistance gene analogs (RGAs) from grape (*Vitis* spp.), study inheritance of downy mildew (*Plasmopara viticola*) resistance and improve table grape for downy mildew resistance by conventional breeding. **(i) Isolation of resistance gene analogs from grape and development of molecular markers from RGAs.** Downy mildew is one of the major diseases of grape cultivars grown in Thailand. Due to the advantages over disease management by fungicidal application, disease resistance genes have been sought after with the ultimate goal of developing new cultivars with improved disease resistance levels. In this study, nucleotide-binding site (NBS)-leucine rich repeat (LRR) class of resistance gene analogs (RGAs) were cloned by PCR amplification using degenerate primers specific to P-loop and GLPL, conserved regions of NBS. One hundred and thirty nine clones containing putative RGA sequences were obtained from a wild species *V. cinerea* 'B9' (48 clones), a hybrid resistant to both downy mildew and scab 'NY88.0507.01' (42 clones) and a susceptible cultivar 'Black Queen'(49 clones). These cloned sequences were subdivided into 22 groups based on their nucleotide sequence similarity of 90% or greater. BLASTx of twenty two selected clones showed the highest amino acid sequence similarity with known NBS-LRR proteins or putative resistance (R) protein candidates. Multiple alignment of these representative RGAs with 5 known R proteins revealed conserved P-loop, kinase-2, RNBS and GLPL motifs which are typical components of the NBS-LRR proteins. Four RGAs had at least 40% identity with known R proteins. Phylogenetic analysis demonstrated that the representative RGAs from all three genotypes dispersed along the phylogram on the two major branches of either TIR (*Drosophila Toll* and mammalian *Interleukin-1 Receptor*) or non-TIR type of the NBS-LRR proteins. One of the molecular markers developed from *Vitis* RGAs, rgVamu085, exhibited DNA polymorphism between resistance and susceptible parents and had significant correlation with downy mildew resistance. Although recombination was found between this marker and downy mildew resistance gene that might limit its use in marker-assisted selection (MAS), it may be useful in the future mapping attempt when more new markers are developed. **(ii) Inheritance of downy mildew resistance and improvement of grape for downy mildew resistance by conventional breeding.** Nine factorial crosses were made between three

downy mildew resistant grape genotypes (NY88.0517.01, NY65.0550.04 and NY65.0551.05; male parents) and three susceptible cultivars of *Vitis vinifera* L. (Black Queen, Carolina Black Rose and Italia; female parents). Eighty-five seedlings were evaluated for downy mildew resistance. The General Combining Ability (gca) variance among male parents was significant while the variance of gca in females and Specific Combining Ability (sca) variance were not significant, indicating the prevalence of additive over non-additive gene actions. The estimated narrow sense heritability of downy mildew resistance was 55.6%. The 'Carolina Black Rose x NY65.0550.04' cross with a significant sca effect and the highest proportion of resistant seedlings (75.0%) is recommended for future use. From a total of 101 progenies of 13 crosses between downy mildew resistance and susceptible parents, thirteen were found to be highly resistance to downy mildew based on detached leaf laboratory test. These hybrids were transferred to field along with their respective parents for future evaluation of the vegetative growth, fruit quality, yield and downy mildew resistance in the second phase of breeding program.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญภาพ ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 6
สมมติฐานการวิจัย 6
ขอบเขตของการวิจัย 7
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 7
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย
ส่วนที่ 1 การโคลน RGAs ในองุ่น และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจาก RGAs 9
ส่วนที่ 2 การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะ (inheritance) และการปรับปรุงพันธุ์องุ่นโดยวิธีดั้งเดิม 14
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล ส่วนที่ 1
การโคลนยีนคล้ายยีนต้านทาน (resistance gene analogs; RGAs) ในองุ่นและการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจาก RGAs 19
การโคลน RGAs 19
การวิเคราะห์ลำดับเบสของโคลน RGAs 21
การวิเคราะห์ NBS-LRR domain และ การวิเคราะห์ phylogenetic ของ RGAs และโปรตีนต้านทานซึ่งทราบแน่ชัด 24
การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจาก RGAs 36

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล ส่วนที่ 2
การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะ (inheritance) และการปรับปรุงพันธุ์องุ่นโดยวิธีดั้งเดิม 39
การผลิตลูกผสม 39
การประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้าง 42
การวิเคราะห์สมรรถนะการรวมตัว 45
การปรับปรุงพันธุ์องุ่นโดยวิธีดั้งเดิม 47
บทที่ 5 บทสรุป
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 52
บรรณานุกรม 54
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก Manuscript 1 61
ภาคผนวก ข Manuscript 2 71
ประวัติผู้วิจัย 82

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลน RGAs จาก genomic DNA 9

2 ไพรเมอร์ที่จำเพาะ อุณหภูมิ annealing และขนาดของ PCR products ของเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาจาก RGAs 11

3 ผลการตรวจหาความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ *Vitis* RGAs เปรียบเทียบกับลำดับของยีนหรือโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ BLASTn และ BLASTx 28

4 จำนวนช่อที่ผสมติดจากองุ่น 9 คู่ผสม 41

5 ค่า mean square จากการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของการเกิดโรคราน้ำค้าง 42

6 การประเมินโรคราน้ำค้างของพันธุ์พ่อแม่โดยวิธีตัดใบมาวิเคราะห์ 44

7 ระดับคะแนนความต้านทานโรคราน้ำค้างของลูกผสม F_1 จาก 9 คู่ผสม 44

8 ค่า mean square จากการวิเคราะห์วาเรียนซ์สำหรับปฏิกิริยาการเกิดโรคราน้ำค้างในองุ่น 45

9 ค่าเฉลี่ยของปฏิกิริยาการเกิดโรค 47

10 ผลของการประเมินสมรรถนะการรวมตัวทั่วไปและการรวมตัวจำเพาะ 47

11 ระดับความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในองุ่นลูกผสมโดยการให้คะแนนจำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม. 48

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 RGAs (A) โมเดลโครงสร้างของยีนต้านทานชนิด NBS-LRR; (B) ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขององุ่น *V. cinerea* B9 ด้วยไพรเมอร์ P-loop/GLPLAL-1 20

2 การเลือกโคโลนีที่มีขนาดแถบดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI ที่เหมาะสม 21

3 Multiple alignments จากการวิเคราะห์กรดอะมิโน (translated) ของโคลนตัวแทน RGA 22 โคลน ซึ่งแยกจาก *V. vinifera* 5 โคลน *V. cinerea* 8 โคลน และ *V.* hybrid 9 โคลน เปรียบเทียบกับโปรตีนต้านทานที่ทราบแน่ชัด 5 โปรตีน โดยใช้โปรแกรม MEGA4 34

4 Phylogram ซึ่งสร้างโดยอาศัยข้อมูลที่ได้จาก sequence alignment ของกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Clustal W 35

5 รูปแบบแถบดีเอ็นเอขององุ่นลูกผสม Horizon × Illinois 547-1 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย rgVcin125 36

6 รูปแบบแถบดีเอ็นเอขององุ่นลูกผสม Horizon × Illinois 547-1 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย stkVa011 37

7 องุ่น *V. vinifera* ที่ใช้เป็นพันธุ์แม่ในการวิเคราะห์ gca และ sca 40

8 องุ่นลูกผสมที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อในการวิเคราะห์ gca และ sca 40

9 ช่ออุ่นทั้ง 9 คู่ผสม ประกอบด้วย 41