SIRAPRAPA MAHANIL : INHERITANCE AND CLONING OF CANDIDATE RESISTANCE GENE ANALOGs (RGAs) FOR DOWNY MILDEW IN GRAPEVINE (*Vitis* spp.) THESIS ADVISOR : PROF. PAISAN LAOSUWAN, Ph.D. 246 PP.

NBS-LRR/DISEASE RESISTANCE/MARKER-ASSISTED SELECTION/GCA/SCA/ NC II

Downy mildew caused by *Plasmopara viticola* has been recognized as one of the major grape diseases worldwide including Thailand. The objectives of this study were to 1) clone and classify resistance gene analogs (RGAs) from two genotypes highly resistant to downy mildew, *Vitis cinerea* B9 and *V. rupestris* B38, and one moderately resistant genotype, *V. hybrid* 'Horizon' 2) identify candidate markers from RGAs that possibly link to resistance allele(s) in grape and 3) evaluate the inheritance of the disease and develop new table grape germplasm with resistance to downy mildew. This study was divided into two parts according to molecular and conventional breeding. The first part suggested that 19 RGA clones from P-loop/GLPLAL-1 primer pairs of three grape genotypes were similar to nucleotide sequences of RGAs from other grape genotypes and/or other plants. These RGA clones were divided into two groups based on amino acid sequences at N-terminus including, *Drosophila Toll* and mammalian *Interleukin-1 receptors* (TIR)-nucleotide binding site (NBS)-leucine-rich repeat (LRR) and non-TIR-NBS-LRR, as usually found in dicot plants. Seventeen out of 19 RGA clones were developed into simple sequence tag site (STS) markers. Those markers and 6 STS and 3 cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers previously developed from other grape species were used for segregation analysis. These molecular markers are

currently being investigated for their potential use in molecular breeding for downy mildew resistance. Nine hybridization crosses were made in year 2004 for the second part. Three resistant genotypes, NY 88.0517.01, NY 65.0550.04 and NY 65.0551.05, were used as male parents while three cultivars of *V. vinifera* L., Black Queen, Carolina Black Rose and Italia, were used as female parents. Eighty-three seedlings were obtained as potentially downy mildew resistance germplasm. The detached leaf assay indicated that 25.3% of the seedlings were highly resistant and resistant to downy mildew. The general combining ability (gca) and specific combining ability (sca) analysis were analyzed by North Carolina mating design II (NC II). The results suggested that additive gene action was primarily responsible for downy mildew resistance in this population. Similarly, the estimated heritability of downy mildew resistance was 60.91%, indicating that the additive gene action was prevalent over the non-additive gene action for downy mildew resistance character. The cross 'Carolina Black Rose x NY 65.0550.04', giving 75.0% resistant seedlings and highly significant sca effects (-1.09; $P < 0.01$), is strongly recommended for downy mildew resistance grape breeding programs in the future.

School of Crop Production Technology

Academic Year 2007

Student's Signature Sirapop Nonla

Advisor's Signature Kasem Laosuwan

Co-advisor's Signature Pinda Thipyapong

ศิระประภา มหานิล : การถ่ายทอดลักษณะ และการโคลนกลุ่มของยีนที่มีลำดับเบสคล้ายกับยีนต้านทานโรค (resistance gene analogs; RGAs) ราน้ำค้างในองุ่น (*Vitis* spp.) (INHERITANCE AND CLONING OF CANDIDATE RESISTANCE GENE ANALOGs (RGAs) FOR DOWNY MILDEW IN GRAPEVINE (*Vitis* spp.)) อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล เหล่าสุวรรณ, 246 หน้า

โรคราน้ำค้างที่เกิดจากเชื้อ *Plasmopara viticola* เป็นโรคที่มีความสำคัญขององุ่น ทั่วโลก รวมถึงประเทศไทยด้วย วัตถุประสงค์สำหรับการศึกษานี้เพื่อ 1) โคลน และจัดกลุ่มของกลุ่มยีนที่มีลำดับเบสคล้ายกับยีนต้านทานโรค (resistance gene analogs; RGAs) จากองุ่นจีโนไทป์ที่มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างสูง ได้แก่ *Vitis cinerea* B9, *V. rupestris* B38 และจีโนไทป์ที่มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในระดับปานกลาง คือ *V. hybrid* 'Horizon' 2) เพื่อทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนามาจาก RGAs ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะวางอยู่ใกล้ชิดกับอัลลีลที่ทำหน้าที่ในการต้านทานโรคในองุ่น 3) เพื่อทดสอบสมรรถนะการรวมตัวของยีนที่ควบคุมการต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง และพัฒนาเชื้อพันธุกรรมที่มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในองุ่นรับประทานผลสด การศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล (molecular breeding) และการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีทั่วไป (conventional breeding) การโคลน RGAs โดยใช้ไพรเมอร์ P-loop/GLPLAL-1 จากองุ่นทั้ง 3 จีโนไทป์ในการศึกษาส่วนแรกได้ RGAs จำนวน 19 โคลน และโคลนเหล่านี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกับ RGAs ขององุ่นจีโนไทป์อื่น และ/หรือในพืชอื่น ในการจำแนกชนิดของ RGAs ที่โคลนได้พบว่า สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลำดับกรดอะมิโนที่ N-terminus ซึ่งเป็นลักษณะที่พบโดยทั่วไปในพืชใบเลี้ยงคู่ ได้แก่ *Drosophila Toll* and mammalian *Interleukin-1 receptors* (TIR)-nucleotide binding site (NBS)-leucine-rich repeat (LRR) และ non-TIR-NBS-LRR สำหรับการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด simple sequence tag site (STS) สามารถพัฒนาได้ทั้งหมด 17 เครื่องหมายโมเลกุลจาก RGAs จำนวน 19 โคลน ได้มีการทดสอบการกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 17 เครื่องหมายนี้ ร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้มีการพัฒนามาจาก RGAs ขององุ่นจีโนไทป์อื่นก่อนหน้านี้ ได้แก่ STS จำนวน 6 เครื่องหมายโมเลกุล และ cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) จำนวน 3 เครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้อยู่ในระหว่างการทดสอบหาความเป็นไปได้ที่จะนำมาใช้ร่วมกับการปรับปรุงพันธุ์ให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในองุ่น การทดลองส่วนที่ 2 ได้มีการผสมองุ่นจำนวน 9 คู่ผสมในปี พ.ศ. 2547 โดยผสมระหว่างสายพันธุ์พ่อ 3 จีโนไทป์ได้แก่ NY 88.0517.01, NY 65.0550.04 และ NY 65.0551.05 และ สายพันธุ์แม่ที่เป็น *V. vinifera* L. 3 พันธุ์ได้แก่ Black Queen, Carolina Black Rose และ Italia การประเมินโรคในสภาพใบตัด (detached leaf assay) ของลูกผสมจำนวนทั้งหมด 83 ต้น พบว่าลูกผสมเหล่านี้มีศักยภาพในการเป็นแหล่งพันธุกรรมที่มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง โดยลูกผสมจำนวน 25.3

เปอร์เซ็นต์ มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในระดับสูง และสูงมาก ทำการทดสอบสมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (general combining ability; gca) และสมรรถนะการรวมตัวจำเพาะ (specific combining ability; sca) โดยใช้แผนการผสมพันธุ์แบบ North Carolina mating design II (NC II) ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าการตอบสนองส่วนใหญ่ต่อการเข้าทำลายของโรคราน้ำค้างในประชากรกลุ่มนี้เป็นการแสดงออกของยีนในแบบบวก (additive gene action) เช่นเดียวกับมีค่าประมาณอัตราพันธุกรรม (heritability) เท่ากับ 60.91 เปอร์เซ็นต์ ชี้ให้เห็นว่ายีนที่ควบคุมการต้านทานโรคราน้ำค้างในองุ่นมีการแสดงออกเป็นแบบบวกมากกว่าการแสดงออกของยีนในแบบที่ไม่ใช่แบบบวก (non-additive gene action) คู่ผสม Carolina Black Rose x NY 65.0550.04 ให้ลูกผสมที่มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างสูงถึง 75.0 เปอร์เซ็นต์ และให้ค่าสมรรถนะการรวมตัวจำเพาะที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (-1.09; $P < 0.01$) จัดว่าเป็นคู่ผสมที่มีความเหมาะสมที่สุดสำหรับใช้ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์องุ่นให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างต่อไป

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____