รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ความแตกต่างทางพันธุกรรมและการระบุเครื่องหมายโมเลกุลของความต้านทานโรคโคนเน่าของแก่นตะวัน

Genetic variability and identification of molecular markers for stem rot resistance in *Helianthus tuberosus* L.

โดย

ปรียา พวงสำลี หวังสมนึก

ดลรัชต์ สุดหล้า

ตนุภัทร มอญขาม

เบญจวรรณ รัตวัตร์

พินิจ หวังสมนึก

สนั่น จอกลอย

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป

ประจำปีงบประมาณ 2554

บทคัดย่อ

ความสามารถในการต้านทานโรคพืชเป็นลักษณะทางพันธุกรรมที่นำไปใช้ร่วมกับวิธีอื่นๆ เพื่อการควบคุมโรคพืช โรคโคนเน่าซึ่งเกิดจากเชื้อ *Sclerotium rolfsii* ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตของแก่นตะวันอย่างมาก รายงานการศึกษาความสามารถในการต้านทานโรคของแก่นตะวันยังมีอยู่น้อยมาก ในการวิจัยนี้ได้ตรวจสอบความแปรผันของยีนต้านทานโรคในสายพันธุ์ต่างๆ ของแก่นตะวันที่มีความสามารถในการต้านทานโรคโคนเน่าได้ในระดับที่ต่างกันจากแหล่งกำเนิดใน 6 ประเทศ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคในแก่นตะวันร่วมกับไพรเมอร์แบบสุ่ม เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายโมเลกุล Target Region Amplification Polymorphism (TRAP) พบว่าแก่นตะวันสายพันธุ์ที่ศึกษา มีความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคที่แตกต่างกัน เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนต้านทานโรคจำนวน 16 ยีน ในเนื้อเยื่อใบ ปล้อง ราก และลำต้นสะสมอาหารของแก่นตะวัน และวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อใบของแก่นตะวันอายุ 22 วัน ที่ได้รับเชื้อ *S. rolfsii* บริเวณลำต้น ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยพบว่ามียีนที่มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นและลดลงจำนวน 4 และ 9 ยีน ตามลำดับ ความเข้าใจพื้นฐานในระดับโมเลกุลของพืชที่ต้านทานโรครวมถึงการตอบสนองต่อเชื้อจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์และการจัดการในอนาคต

คำสำคัญ: แก่นตะวัน เครื่องหมายโมเลกุล TRAP แหล่งเชื้อพันธุกรรม ยีนต้านทานโรค การแสดงออกของยีน

Abstract

Genetic resistance is an important component of integrated strategies, using to control problematic diseases in Plants. Stem rot disease caused by *Sclerotium rolfsii* which survives in soil is responsible for serious losses in Jerusalem artichoke yield. Little effort has been made to characterize disease resistance in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). This study was carried out to detect genetic variation in the resistance genes of several Jerusalem artichoke accessions with varying level of disease resistance originated from 6 countries. Nine fixed primers derived from specific R-genes from Jerusalem artichoke in combination with 10 arbitrary primers were used to amplify Target Region Amplification Polymorphism (TRAP) markers. The result showed that, there are genetically difference based on R-gene of Jerusalem artichoke accessions. The expression of 16 disease resistance genes in leaf, internode, root and tuber tissue were verified. These genes were further investigated for the differential gene expression using real-time PCR. Four of them were up-regulated while the other 9 genes were down-regulated in leaf tissue of 22-day-old plants infected with *S. rolfsii*. Understanding the molecular bases of this plant resistance and defense responses is required for future management. The findings will be useful for further breeding and germplasm innovation programs.

Keywords: Jerusalem artichoke, TRAP, germplasm, disease resistance gene, gene expression

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการ “**ความแตกต่างทางพันธุกรรมและการระบุเครื่องหมายโมเลกุลของความต้านทานโรคโคนเน่าของแก่นตะวัน**” ประจำปีงบประมาณ 2554

คณะผู้วิจัย

พฤศจิกายน 2555

สารบัญ (Table of contents)

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		จ
สารบัญภาพ		ฉ
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ		ซ
บทที่ 1	บทนำ	1
บทที่ 2	การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3	วิธีการดำเนินการวิจัย	8
บทที่ 4	ผลการวิจัย	16
บทที่ 5	สรุปผลการศึกษาและอภิปรายผล	47
บทที่ 6	บรรณานุกรม	49

สารบัญตาราง (List of tables)

		หน้า
ตารางที่ 3.1	สายพันธุ์ของแก่นตะวันที่ใช้ในงานวิจัย	8
ตารางที่ 3.2	สายพันธุ์แก่นตะวันในแต่ละชุดดีเอ็นเอรวม	11
ตารางที่ 3.3	ไพรเมอร์แบบสุ่มออกแบบโดย Ziqin et al. (2009) จำนวน 10 ชนิด	11
ตารางที่ 3.4	ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนต้านทานโรคในแก่นตะวัน จำนวน 9 ชนิด ที่ใช้ในปฏิกิริยา TRAP-PCRs	11
ตารางที่ 3.5	ยีนต้านทานโรคในแก่นตะวันที่ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนและการคัดแยกเครื่องหมายโมเลกุล SSR	15
ตารางที่ 4.1	แสดงปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดจากใบของแก่นตะวันสายพันธุ์ JA 102 และเมล็ดแก่นตะวันสายพันธุ์ CN52867 X JA6	17
ตารางที่ 4.2	สายพันธุ์ของแก่นตะวันที่มีความสามารถในการต้านทานโรคโคนเน่าได้ต่างกัน	18
ตารางที่ 4.3	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร อัตราส่วน A_{260}/ A_{280} และปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบแก่นตะวัน	19
ตารางที่ 4.4	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแก่นตะวัน 9 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค TRAP-PCR จำนวน 16 คู่	21
ตารางที่ 4.5	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของแก่นตะวัน 13 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค TRAP-PCR จำนวน 8 คู่	21
ตารางที่ 4.6	การประเมินแถบของแก่นตะวัน 13 สายพันธุ์ ที่ได้จากการใช้เทคนิค TRAP-PCR	34
ตารางที่ 4.7	ค่า similarity matrix จากค่าสัมประสิทธิ์ของ Jaccard ของแก่นตะวัน 13 สายพันธุ์ จากการศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุล TRAP	35
ตารางที่ 4.8	การประเมินแถบของแก่นตะวัน 9 สายพันธุ์ ที่ได้จากการใช้เทคนิค TRAP-PCR	36
ตารางที่ 4.9	ค่า similarity matrix จากค่าสัมประสิทธิ์ของ Jaccard ของแก่นตะวัน 9 สายพันธุ์ จากการศึกษาด้วยเครื่องหมายโมเลกุล TRAP	37
ตารางที่ 4.10	การแสดงออกของยีนต้านทานโรคในแต่ละเนื้อเยื่อของแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL246	39
ตารางที่ 4.11	ระดับการแสดงออกของยีนต้านทานโรคของแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL246 ในเนื้อเยื่อใบเมื่อแก่นตะวันได้รับเชื้อและไม่ได้รับเชื้อ *S. rolfsii* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	42
ตารางที่ 4.12	แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จากส่วนของยีนต้านทานโรคในแก่นตะวันแต่ละสายพันธุ์	45

สารบัญภาพ (List of illustrations)

		หน้า
ภาพที่ 4.1	แสดงอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซิสจากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบและเมล็ดแก่นตะวันด้วย	17
ภาพที่ 4.2	จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบแก่นตะวัน 13 สายพันธุ์	19
ภาพที่ 4.3	แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ 60 ชนิด ที่ใช้ดีเอ็นเอรวมของแก่นตะวันทั้ง 2 ชุด ด้วยเทคนิค TRAP-PCR	22
ภาพที่ 4.4	แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์จากไพรเมอร์ 60 ชนิด ที่ใช้ดีเอ็นเอรวมของแก่นตะวันทั้ง 2 ชุด (ตารางที่ 3.2) ด้วยเทคนิค TRAP-PCR	23
ภาพที่ 4.5	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแก่นตะวัน 13 สายพันธุ์ โดยเทคนิค TRAP-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ A: HEL436736(F)/BG92(R) และ B: WNKK(F)/ODD4(R)	26
ภาพที่ 4.6	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแก่นตะวัน 13 สายพันธุ์ โดยเทคนิค TRAP-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ A: WTNP(F)/ODD20(R) และ B: HEL440001(F)/BG66(R)	27
ภาพที่ 4.7	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแก่นตะวัน 13 สายพันธุ์ โดยเทคนิค TRAP-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ A: CAN(F)/BG23(R) และ B: HEL455346(F)/FC1(R)	28
ภาพที่ 4.8	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแก่นตะวัน 13 สายพันธุ์ โดยเทคนิค TRAP-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ A: HEL446443(F)- BG23(R) และ B: NLA(F) - BG39(R)	29
ภาพที่ 4.9	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแก่นตะวัน 9 สายพันธุ์ โดยเทคนิค TRAP-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ A: HEL449466(F)/FC1(R), HEL449466(F)/BG23(R) และ B: HEL449466(F)/ODD20 (R), HEL449466(F)/ODD4(R)	30
ภาพที่ 4.10	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอแก่นตะวัน 9 สายพันธุ์ โดยเทคนิค TRAP-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ A: HEL449466(F)/BG56 , HEL449466(F)/BG68(R) และ B: HEL449466(F)/BG92(R), HEL449466(F)/BG66(R)	31
ภาพที่ 4.1	**A** เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแก่นตะวันจำนวน 13 สายพันธุ์ **B** แสดงการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของแก่นตะวันจำนวน 13 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค TRAP-PCR	32
ภาพที่ 4.12	**A** เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแก่นตะวันจำนวน 9 สายพันธุ์ **B** แสดงการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของแก่นตะวันจำนวน 9 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค TRAP-PCR	33

สารบัญภาพ (List of illustrations) (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 4.13	ตัวอย่างการแสดงออกของยีนต้านทานโรคในเนื้อเยื่อใบของแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL246 HEL436736 (A), HEL440001 (B), HEL446443 (C), HEL447036 (D) และ HEL448441	40
ภาพที่ 4.14	ตัวอย่างการแสดงออกของยีนต้านทานโรคในเนื้อเยื่อใบของแก่นตะวันสายพันธุ์ HEL246 HEL444841 (E), HEL449110 (F), HEL449466 (G) และ HEL450929 (H)	41
ภาพที่ 4.15	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากแก่นตะวัน 8 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์ (A) HEL436736 (B) HEL440001 (C) HEL440872 (D) HEL444841 (E) HEL446443 (F) HEL447036 (G) HEL449110 (H) HEL449466	43
ภาพที่ 4.16	ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากแก่นตะวัน 8 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค SSR โดยใช้ไพรเมอร์ (I) HEL450929 (J) HEL451666 (K) HEL453765 (L) HEL454403 (M) HEL455346 (N) HEL457326 (O) HEL465866 (P) HEL471160	44

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

µM	ไมโครโมลาร์
pmole	พิโคโมล
°C	องศาเซลเซียส
A_{260}	การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร
A_{280}	การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
T	Total number of PCR fragments
P	Polymorphic fragments
%P	Polymorphic percentage
PIC	Polymorphic information content
Tm	melting temperature
Ta	annealing temperature
bp	คู่เบส
PCR	Polymerase Chain Reaction
DNA	Deoxyribonucleic acid
UPGMA	Unweighted pair-group method with arithmetic average
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
SSR	Simple sequence repeat
ISSR	Inter simple sequence repeat
SRAP	Sequence related amplified polymorphism