บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

องุ่นเป็นพืชที่อยู่ในสกุล *Vitis* วงศ์ Vitaceae ซึ่งมีอยู่ประมาณ 11 สกุล และ 600 ชนิด สกุล *Vitis* เป็นสกุลเดียว ที่เป็นผลไม้รับประทานได้ องุ่นเป็นไม้เลื้อยประเภทยืนต้น มีมือจับเพื่อเกาะยึด (นันทกร บุญเกิด, 2543) มีการปลูกองุ่นอย่างกว้างขวางในแถบยุโรป อเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ และออสเตรเลีย ประเทศหลักในการผลิตองุ่นของโลก ได้แก่ อิตาลี ฝรั่งเศส สเปน ตุรกี สหรัฐอเมริกา และจีน จากความต้องการองุ่นในอุตสาหกรรมการผลิตไวน์ เหล้าบรั่นดี น้ำผลไม้ ลูกเกด และรับประทานสด รวมถึงน้ำมันในเมล็ดองุ่นที่มีอยู่ 6-20% ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการรับประทาน ผลิตสบู่ และใช้แทนเมล็ด linseed ได้ ทำให้ผลผลิตองุ่นรวมทั่วโลกในปี พ.ศ. 2552 สูงถึง 67,221,000 ตัน โดยประเทศที่มีผลผลิตองุ่นมากที่สุด คือ อิตาลี รองลงมาคือ จีน อเมริกา และฝรั่งเศส (Wikipedia, 2009)

องุ่นเป็นไม้ที่มีถิ่นกำเนิดในแถบอากาศอบอุ่น แต่สามารถเจริญได้ดีในเขตอากาศกึ่งร้อนถึงอากาศร้อน เช่นในประเทศไทย จากสถิติการปลูกองุ่นของกองแผนงาน กรมส่งเสริมการเกษตรในปี พ.ศ. 2542 พบว่าการปลูกองุ่นเพื่อเป็นการค้าในประเทศไทย มักจะปลูกในแถบที่ราบลุ่มภาคกลางเป็นส่วนใหญ่ มีพื้นที่ปลูกมากกว่า 21,900 ไร่ และพื้นที่เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือกว่า 2,680 ไร่ (กองแผนงาน กรมส่งเสริมการเกษตร, 2542) ซึ่งจังหวัดที่มีการปลูกมาก ได้แก่ ราชบุรี สมุทรสาคร กาญจนบุรี นครปฐม นครราชสีมา และสระบุรี เป็นต้น (กิตติพงศ์ ตรีตรุยานนท์, 2544) การปลูกองุ่นเพื่อการค้าเป็นที่นิยมและแพร่หลายอย่างรวดเร็วในประเทศไทย เนื่องจากองุ่นเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่มีราคาต่อหน่วยสูง เมื่อเปรียบเทียบกับผลไม้ชนิดอื่น ๆ และการที่องุ่นเป็นผลไม้ที่มีหลากหลายสายพันธุ์ จึงสามารถคัดเลือกปลูกสายพันธุ์ที่เหมาะสม เพื่อการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลายชนิด นอกจากนี้การที่ประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ทำให้เกษตรกรสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ 2-3 ครั้งต่อปี ในขณะที่ประเทศในเขตอากาศอบอุ่นจะเก็บผลผลิตได้เพียงปีละ 1 ครั้งเท่านั้น

แต่อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพในการผลิตองุ่นของประเทศไทยยังไม่ดีเท่าที่ควร คือ คุณภาพของผลไม่ดี และผลผลิตต่อไร่ต่ำ ประมาณ 300 - 1,000 กก./ไร่ ในขณะที่ผลผลิตเฉลี่ยของโลกสูงถึง 7,759 กก./ไร่ ทำให้ประเทศไทยต้องนำเข้าองุ่นผลสดในปี พ.ศ. 2552 ปริมาณ 42,607 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1,944.4 ล้านบาท และในปี พ.ศ .2553 นำเข้าองุ่นผลสดจากเดือนมกราคมถึงมิถุนายน ปริมาณ 8,985 ตัน คิดเป็นมูลค่า 488.1 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) ปัญหาที่มักพบในการผลิตองุ่นในประเทศไทย ได้แก่ สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่นในภาคเหนือมีอุณหภูมิต่ำทำให้

องุ่นมีการพักตัวเมื่อได้รับอากาศเย็น ดินปลูกไม่เหมาะสม ยกตัวอย่างเช่น ดินบนพื้นที่ราบสูงมีความเป็นกรดจัด หรือเป็นกรดรุนแรง (pH ประมาณ 4.3) ทำให้ต้นองุ่นมีการเจริญเติบโตไม่ดี และสภาพภูมิอากาศที่ร้อน และมีฝนตกชุกส่งเสริมให้มีการแพร่ระบาดของโรคอย่างรุนแรง โรคองุ่นที่สำคัญในประเทศไทย ได้แก่ โรคราน้ำค้างจากเชื้อ *Plasmopara viticola* โรคแอนแทรคโนส หรือ สแคบจากเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* โรคแอนแทรคโนสจากเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* และโรคกิ่งแห้ง หรือเน่าขมจากเชื้อ *Greeneria uvicola* (*Melanconium fuligeneum*) (นิพนธ์ วิสารทานนท์, 2542; Visarathanonth, 1990)

โรคราน้ำค้าง (downy mildew) ที่มีเชื้อสาเหตุคือ *Plasmopara viticola* เป็นปัญหาที่สำคัญต่อการผลิตองุ่นทั่วโลก การเข้าทำลายของโรคนี้ ก่อให้เกิดความเสียหายในระดับเศรษฐกิจทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ โดยโรคดังกล่าวจะเข้าทำลายใบ ช่อดอก กิ่งอ่อน และมือจับ ที่พบมากที่สุดคือบนใบ และช่อดอก อาการบนใบจะเห็นเป็นจุดสีเหลืองเล็ก ๆ และจะขยายโตขึ้น ที่ใต้ใบจะพบราสีขาวเหลืองเป็นกระจุก ใบที่ถูกทำลายมาก จะมีสีน้ำตาล และแห้งตายไปในที่สุด อาการบนช่อดอกพบในระยะดอกใกล้บาน พบแผลสีเขียวปนเหลือง และจะเห็นเชื้อราฟูขาวบนดอก เมื่ออาการรุนแรงจะเป็นสีน้ำตาลแก่ และแห้งตายติดกับเถา ไม่ร่วง จะเห็นเชื้อราสีขาวบนกิ่งอ่อนตามแนวยาวของกิ่ง ยอดชะงักการเจริญเติบโต (นันทกร บุญเกิด, 2543) ในสภาพที่เหมาะสมต่อการระบาดของโรค และไม่มีการใช้สารเคมีป้องกัน พบว่า โรคราน้ำค้างจะทำให้ผลผลิตลดลงถึง 50-75% (Agrios, 1997) และการเข้าทำลายของโรคราน้ำค้างในผลองุ่น ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในผลลดลง 50-75% เช่นเดียวกัน (Ash, 2000)

กลไกในการต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในองุ่น ขึ้นอยู่กับยีนใน 2 ระบบ ได้แก่ ยีนเดี่ยว (single gene) และ กลุ่มยีน (multiple genes) ยีนเดี่ยวควบคุม hypersensitive reaction ในเซลล์ปากใบขณะที่เชื้อโรคเข้าทำลาย ซึ่งโดยทั่วไปใน *V. vinifera* จะเป็น ยีนด้อย (homozygous recessive) และองุ่นสายพันธุ์ที่ต้านทานจะเป็นยีนเด่น (homologous dominant) ส่วนกลุ่มยีน (multiple genes) ทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญของไมซีเลียม (mycelium) ในพืชอาศัย (Reisch and Pratt, 1996) การปรับปรุงพันธุ์องุ่นให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างโดยวิธีดั้งเดิมได้เริ่มมากว่าครึ่งศตวรรษแล้ว โดยทั่วไปจะทำการผสมพันธุ์ระหว่าง European grape (*V. vinifera*) ที่มีคุณภาพดี เช่น ผลโต รสชาติหอมหวาน แต่อ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง กับ American grape เช่น *V. amurensis, V. vulpina, V. acerifolia* และ *V. riparia* ซึ่งเป็นองุ่นพันธุ์ป่าที่ต้านทานต่อโรคแต่มีคุณภาพต่ำ เช่น ผลเล็ก มีกรดสูง และรสชาติไม่เป็นที่ต้องการ เป็นต้น มีรายงานว่าลูกผสมข้ามสปีชีส์คู่แรกที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง เกิดจากการผสมระหว่าง French grape กับ American grape หรือเรียกว่า Franco-American hybrid ซึ่งลูกผสมที่ได้มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างสูง แต่คุณภาพในการผลิตไวน์ต่ำ (Boubals, 1998) และ Lu and Schell (2000) รายงานว่าลูกผสมในชั่วที่ 1 ระหว่าง *V. rotundifolia* × *V. vinifera* มีความ

ต้านทานต่อ Pierce's disease โรคแอนแทรคโนส และโรคราน้ำค้าง ดังนั้นเป้าหมายหลักประการหนึ่งของนักปรับปรุงพันธุ์องุ่น คือการพัฒนาสายพันธุ์องุ่นให้มีความต้านทานต่อโรค และที่สำคัญจะต้องมีคุณภาพสูง เป็นที่ต้องการของตลาด ซึ่งอาจจะต้องใช้เวลานานในการที่จะพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ลูกผสมที่มีคุณภาพดีอย่างแท้จริง

การป้องกันรักษาโรคราน้ำค้างทำได้โดยการฉีดพ่นสารเคมีกำจัดเชื้อราตลอดทั้งฤดูปลูก ทำให้เกษตรกรต้องเสียค่าใช้จ่ายจำนวนมากในการซื้อสารเคมีกำจัดเชื้อรา และแรงงานในการฉีดพ่นสารเคมี Emmet รายงานว่าในการผลิตองุ่นทั่วโลกต้องเสียค่าใช้จ่ายในการป้องกันกำจัดโรคราน้ำค้างสูงถึงประมาณ 320,000,000 บาทต่อปี (Bordelon, 2009) และถึงแม้ว่าการใช้วิธีการป้องกันแบบผสมผสาน (integrated controls) จะช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมี แต่ก็มีรายงานว่า มีเพียงไม่กี่ประเทศเท่านั้นที่สามารถปลูกองุ่นโดยไม่ใช้สารเคมีได้ คือ Sinkians ในทางตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศจีน ชิลี อาร์เจนตินา และ อิหร่าน เท่านั้น (Babadoost, 2001) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการปรับปรุงพันธุ์องุ่นให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง โดยใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้วิธีดั้งเดิม (conventional breeding) และหรือวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล (molecular breeding)

ปัจจุบันนี้ความรู้ และเทคนิควิธีการทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลได้มีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว จึงได้มีการนำเทคนิคเหล่านี้มาใช้ร่วมในโครงการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงและรวดเร็วขึ้น ทั้งวิธีการทางด้านพันธุวิศวกรรม และการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection; MAS) โดยเฉพาะในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อโรค การค้นพบยีนต้านทานโรค (disease resistance genes; R genes) ทำให้เกิดการพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อโรคอย่างรวดเร็ว มีการโคลนยีนต้านทานโรคจากพืชใบเลี้ยงคู่หลายสปีชีส์ เช่น ยีน *N* จากยาสูบ ยีน *L6* จากป่าน และ ยีน *RPS2* และ*RPM1* จาก Arabidopsis โดยพบว่ายีนต้านทานโรคมีความสามารถในการต้านทานต่อโรคได้อย่างกว้างขวางครอบคลุมโรคทั้งที่มีสาเหตุมาจาก เชื้อไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา และไส้เดือนฝอย โปรตีนที่เกิดจากกระบวนการลอกรหัส (transcription) และแปลรหัส (translation) ของยีนต้านทานโรค ส่วนใหญ่ประกอบด้วย 2 ส่วนหลักคือ nucleotide binding site (NBS) ในตำแหน่ง N-terminal และ lucine-rich repeats (LRRs) ในตำแหน่ง C-terminal โดย LRRs มีบทบาทในการกำหนดความต้านทานต่อโรคอย่างจำเพาะเจาะจง (Ellis et al., 2000) และ NBS แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ 1) leucine-zipper coiled-coil motif (CC) 2) *Drosophila Toll* and mammalian *Interleukin-1 receptors* (TIR) ซึ่งลำดับกรดอะมิโนของ NBS นี้ พบว่ามีส่วนที่อนุรักษ์เหมือนกัน (conserve) อยู่ถึง 7 domains ได้แก่ P-loop, GLPL motifs เป็นต้น (Donald et al., 2002)

ถึงแม้ว่าลำดับของกรดอะมิโนที่อนุรักษ์เหมือนกันในแต่ละยีนต้านทาน มีความคล้ายคลึงกันไม่มาก แต่ก็พบว่าเพียงพอที่จะใช้ในการโคลนยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายยีนต้านทาน (resistance gene analogs; RGAs) จากพืชหลากหลายสปีชีส์ได้ โดยการใช้ไพร์เมอร์ที่สร้างมาจาก

ลำดับกรดอะมิโนที่อนุรักษ์ (degenerate primers) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งวิธีดังกล่าวอาจทำให้ได้ RGAs ที่ตรงหรือใกล้เคียงกับตำแหน่งของยีนต้านทาน ตัวอย่างเช่น Yu et al. (1996) ใช้ degenerate primers ที่สร้างจากลำดับกรดอะมิโนที่อนุรักษ์ในยีน *N* และ *RPS2* เพื่อโคลนกลุ่มยีนต้านทานโรคจากถั่วเหลือง ดังนี้ *Rps1, Rps2, Rps3, rmd, Rsv1* และ *Rpv* นอกจากนี้พบว่า RFLP probes ที่พัฒนาจาก RGAs ในองุ่นมีการจับคู่ (hybridization) เฉพาะในองุ่นสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคราแป้งเท่านั้น แสดงให้เห็นว่า RGAs ที่โคลนมาจากองุ่นอาจใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคในองุ่นได้ (Gaspero and Cipriani, 2002) และเช่นเดียวกัน Donald et al. (2002) พบเครื่องหมาย RFLP ที่พัฒนาจาก RGAs จำนวน 3 เครื่องหมายที่อยู่ใกล้ชิด (link) กับยีนต้านทานโรคราแป้งซึ่งนำมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคนี้ได้

นอกจากนี้ในส้มพบเครื่องหมาย RFLP ที่พัฒนาจาก RGAs จำนวน 3 เครื่องหมายที่ link กับยีนต้านทาน citrus tristeza virus และ citrus nematode (Deng et al., 2000) และในมะเขือเทศพบ NBS sequence ที่มีตำแหน่งบนแผนที่พันธุศาสตร์ใกล้เคียง (co-mapping) กับหลายตำแหน่งในจีโนมที่มียีนต้านทานต่อโรคหลายชนิด ได้แก่ *Verticillium* wilt และ *Fusarium* (Pan et al., 2000) งานวิจัยเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าลำดับเบสของ NBS-LRR ที่ link หรือเป็นส่วนหนึ่งของยีนต้านทาน มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะนำมาใช้สร้างแผนที่พันธุศาสตร์ (genetic map) เพื่อโคลนยีนต้านทานโรคในพืช หรือใช้สำหรับคัดเลือกพันธุ์ได้ ดังนั้น โคลน RGAs ที่ได้อาจสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกพันธุ์องุ่นจากการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิมให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง และนำไปสู่การโคลนยีนต้านทานโรคราน้ำค้างเพื่อนำไปใช้ปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีพันธุวิศวกรรม ซึ่งอาจช่วยแก้ไขปัญหาในด้านคุณภาพของพันธุ์ที่ได้ โดยเฉพาะพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตไวน์ที่ต้องมีคุณภาพและคุณสมบัติจำเพาะ จึงให้ไวน์คุณภาพดี และสม่ำเสมอ ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์อย่างสูงในอุตสาหกรรมการผลิตองุ่นในประเทศไทย ทั้งนี้เพราะการใช้สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรค จะทำให้องุ่นมีคุณภาพสูง ผลผลิตสูง ลดค่าใช้จ่ายในการป้องกันและกำจัดโรค ลดผลกระทบของสารเคมีที่มีต่อสิ่งแวดล้อม และสุขภาพของผู้บริโภค โดยเฉพาะจะตอบสนองนโยบายของรัฐบาลในด้านความปลอดภัยทางอาหารเพื่อนำประเทศไทยสู่การเป็นครัวของโลก และยังอาจส่งผลให้รายได้ของเกษตรกรเพิ่มสูงขึ้นถึง 10% ต่อปี นอกจากนี้ยังสามารถนำเทคนิคเหล่านี้ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์องุ่นเพื่อให้ต้านทานต่อโรคอื่น หรือปรับปรุงพืชอื่นๆ ให้ต้านทานโรคต่อไปในอนาคต

การปรับปรุงพันธุ์องุ่นส่วนใหญ่มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาพันธุ์ให้ต้านทานโรค ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนต้านทาน ดังนั้นการศึกษาการแสดงออกของยีนจึงมีความสำคัญ Spraque and Tatum (1942) ได้พัฒนาวิธีการผสมพันธุ์พืชแบบพบกันหมด (diallel cross) เพื่อประเมิน

สมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (gca) และสมรรถนะการรวมตัวจำเพาะ (sca) ในข้าวโพด ซึ่งระบุ gca เป็นค่าเฉลี่ยของสายพันธุ์ในลูกผสม และ sca เป็นค่าความเบี่ยงเบนของลูกผสมที่ได้จากสมรรถภาพของสายพันธุ์ ต่อมา Hayman (1958) ได้พัฒนาโมเดลเพื่อแยกผลของยีนแบบบวก แบบข่ม และข่มข้ามคู่ออกจากกัน โดยโมเดลนี้ผลของยีนหลายยีนจะถูกเฉลี่ยให้เท่ากันโดยการคำนวณจากการแสดงออกในลูกผสม F_1, F_2, backcross และอื่น ๆ ของพืชผสมตัวเอง จากนั้น Gamble (1962) ใช้วิธีเดียวกันกับ Hayman (1958) เพื่อพัฒนาโมเดลสำหรับข้าวโพดซึ่งเป็นพืชผสมข้าม นอกจากนี้ Hayman (1954) และ Griffing (1956) ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนวิธีต่าง ๆ ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน วาเรียนซ์ gca อาจเป็นผลเนื่องจากยีนแบบบวก หรือปฏิกิริยาแบบบวก ขณะที่วาเรียนซ์ sca อาจเป็นผลเนื่องจากยีนแบบข่มหรือข่มข้ามคู่ นอกจากนี้ขนาดของวา-เรียนซ์ gca และ sca อาจเกิดจากอิทธิพลของหลายปัจจัย เช่น การกระจายตัวของยีน ผลของสิ่งแวดล้อม ผลทางพันธุกรรมที่ได้จากแม่ (Pswarayi, 1993; Dieters et al., 1995; King and Johnson, 1998) จากการสังเกตในข้าวโพดโดย Hallauer and Miranda (1988) พบว่าประชากรอาจมีการกระจายตัวของยีนแตกต่างกัน และระดับของการข่มและการข่มข้ามคู่ เป็นผลเนื่องมาจากอิทธิพลของ sca ดังนั้นผลของ gca และ sca จึงเป็นข้อมูลที่สำคัญในการเลือกพันธุ์พ่อแม่ที่ดีที่สุดในการปรับปรุงพันธุ์พืช (Dabholkar, 1992)

Comstock and Robinson (1948, 1952) พัฒนาแผนการผสมพันธุ์แบบ North Carolina Design I, II และ III ขึ้นเพื่อใช้ในการประเมินชนิดและความสัมพันธ์กันทางพันธุกรรมในประชากรที่เฉพาะเจาะจง เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้ อัตราพันธุกรรมจัดเป็นข้อมูลที่บ่งชี้ความแปรปรวนของลักษณะหรือการแสดงออกของลักษณะที่เกิดจากอิทธิพลของยีนเมื่อเปรียบเทียบกับอิทธิพลของยีนและสิ่งแวดล้อม โดยวัดจากค่าความแปรปรวนหรือวาเรียนซ์ อัตราพันธุกรรมอย่างแคบจะสามารถบ่งชี้ความแปรปรวนอันเนื่องมาจากอิทธิพลของยีนแบบบวกเทียบกับความแปรปรวนของยีนในรูปแบบอื่น ๆ ที่อาจเกิดขึ้น ได้แก่ ความแปรปรวนของยีนแบบข่ม แบบมีปฏิกิริยาร่วมระหว่างยีนแบบบวกและแบบข่ม หรือแบบข่มข้ามคู่ยีน และความปรวนแปรเนื่องจากสิ่งแวดล้อม โดยอัตราพันธุกรรมอย่างแคบที่มีค่าสูงจะบ่งชี้โอกาสหรือความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ โดยเฉพาะในพืชผสมตัวเอง ดังนั้นการศึกษาการแสดงออกของยีนจะช่วยเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ทราบรูปแบบการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้เกิดการแสดงออกตามที่ต้องการในแต่ละลักษณะ

สำหรับงานปรับปรุงพันธุ์องุ่นในประเทศไทยซึ่งยังไม่มีผู้ใดศึกษาอย่างจริงจังมาก่อน การศึกษาการแสดงออกของยีนต้านทานควบคู่ไปกับการโคลนยีนคล้ายยีนต้านทานและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับคัดเลือกยีนต้านทานจึงมีความสำคัญ และจะช่วยให้การปรับปรุงพันธุ์องุ่นมีประสิทธิภาพสูง และย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์ลง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อปรับปรุงพันธุ์องุ่นให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างโดยวิธีดั้งเดิม
2. เพื่อโคลนยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายยีนต้านทาน (resistance gene analogs; RGAs) จากองุ่นสายพันธุ์ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างและสายพันธุ์อ่อนแอ
3. เพื่อจำแนก RGAs โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (DNA sequence polymorphisms)
4. เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) สำหรับการคัดเลือกพันธุ์องุ่นให้ต้านทานโรคในอนาคต
5. เพื่อผลิตนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งจัดเป็นสาขาขาดแคลน

สมมติฐานการวิจัย

การปรับปรุงพันธุ์องุ่นสามารถทำได้โดยหลายวิธี ได้แก่ 1) วิธีดั้งเดิม (conventional breeding) 2) วิธีพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) 3) วิธีรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) 4) วิธีใช้ประโยชน์จาก somaclonal variation และการกลายพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิมใช้การผสมพันธุ์พ่อแม่ที่มีลักษณะส่งเสริมกัน เช่น นำพันธุ์ที่มีคุณภาพดี ให้ผลผลิตสูง แต่อ่อนแอต่อโรคมาผสมกับพันธุ์ต้านทานโรค แต่อาจมีคุณภาพไม่ดี หรือให้ผลผลิตต่ำ หลังจากนั้นทำการคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะตามที่ต้องการ คือ มีคุณภาพดี ให้ผลผลิตสูง และต้านทานโรค วิธีนี้ต้องใช้เวลานาน และจำเป็นต้องคัดเลือกลูกผสมเป็นจำนวนมาก เพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะตามต้องการ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีข้อดีคือ มีโอกาสได้พันธุ์ลูกผสมที่ดีกว่าพ่อแม่พันธุ์และมีลักษณะหลากหลายจาก genetic recombination ซึ่งสามารถใช้เป็นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ต่อเนื่องในอนาคต ในปัจจุบันมีการย่นระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีนี้ด้วยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะองุ่นเป็นพืชที่มีอายุยาว ต้องใช้เวลานานจึงสามารถคัดเลือกคุณภาพผลผลิตได้ และต้องใช้พื้นที่ตลอดจนต้นทุนในการปลูกและดูแลรักษาองุ่นพันธุ์ลูกผสมต่าง ๆ สูง ตัวอย่างเช่น Lodhi et al. (1995) ได้สร้างแผนที่พันธุศาสตร์จากเครื่องหมาย RAPD และ RFLP ขององุ่น ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์และโคลนยีนได้ และ Donald et al. (2002) พบเครื่องหมาย RFLP ที่พัฒนาจาก RGAs จำนวน 3 เครื่องหมาย ที่ link กับยีนต้านทานโรคราแป้ง ซึ่งนำมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคนี้ได้

สำหรับประเทศไทย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีมีความพร้อมในงานวิจัยด้านองุ่นสูง มีแปลงรวบรวมพันธุ์องุ่นจากนานาประเทศรวมมากกว่า 50 พันธุ์ ซึ่งเป็นแหล่งพันธุกรรมที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้เป็นอย่างดี แต่พันธุ์ส่วนใหญ่ที่มีอยู่ไม่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง หรือต้านทานในระดับต่ำ และยังไม่มีผู้ใดทำการปรับปรุงพันธุ์องุ่นโดยวิธีดั้งเดิมอย่างจริงจังมาก่อน โครงการวิจัยนี้จะ

นำพันธุ์ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในระดับสูงจากประเทศสหรัฐอเมริกามาทดสอบความต้านทานในประเทศไทย และใช้เป็นพ่อพันธุ์ในการผสมกับแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพดี และให้ผลผลิตสูงที่มีอยู่แล้ว เพื่อให้ได้ลูกผสมที่ต้านทานโรค และมีคุณภาพดี ให้ผลผลิตสูง นอกจากนี้จะพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อนำมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ให้ได้รวดเร็วและประหยัดต้นทุนมากขึ้นในอนาคต

วิธีพันธุวิศวกรรมใช้การถ่ายยีนต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ เช่น ยีนต้านทานโรคสู่พันธุ์ที่มีลักษณะอื่นๆ ดีเด่นอยู่แล้ว เช่น มีการถ่ายยีน grapevine fanleaf virus coat protein, chitinase, glucanase ฯลฯ เข้าสู่องุ่นเพื่อให้ได้พันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส และเชื้อรา (Kikkert et al., 2001) วิธีนี้จะได้พันธุ์ที่มีลักษณะต่าง ๆ เหมือนเดิม ยกเว้นลักษณะที่ถ่ายยีนเข้าไป จึงเหมาะสมสำหรับปรับปรุงพันธุ์องุ่นสำหรับผลิตไวน์ เพื่อให้ได้คุณภาพคงที่ อย่างไรก็ดีวิธีนี้มีข้อจำกัดที่ยีนซึ่งส่วนใหญ่จะได้รับการจดลิขสิทธิ์ไว้แล้ว โครงการวิจัยนี้อาจได้มาซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลที่ link หรือเป็นส่วนหนึ่งของยีนต้านทานโรคราน้ำค้าง ซึ่งสามารถนำมาใช้โคลนยีนต้านทานโรคนี้ได้ในอนาคตเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

1. องุ่น (*Vitis vinifera*) พันธุ์ Carolina Black Rose, Black Queen, Italia และพันธุ์ต้านทานจำนวน 3 สายพันธุ์ จาก Cornell University ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. ทำการปลูก และผสมพันธุ์องุ่นภายในฟาร์มมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
3. ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการปรับปรุงพันธุ์พืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อโคลน RGAs และประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้าง

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป โดยได้โคลน RGAs ที่อาจ link หรือเป็นส่วนหนึ่งของยีนต้านทานโรคราน้ำค้างในองุ่น ซึ่งสามารถนำไปใช้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์องุ่นให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง โดยวิธี MAS หรือใช้ในการโคลนยีนต้านทานโรคราน้ำค้างโดยอาศัยแผนที่เป็นหลัก (map-based cloning) ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีพันธุวิศวกรรมในงานวิจัยระยะต่อไป
2. นำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์ ได้องุ่นสายพันธุ์ใหม่ที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง และอาจมีคุณภาพดีเหมาะสมต่อการบริโภคผลสด ซึ่งสามารถนำมาขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้ปริมาณมาก สำหรับเผยแพร่แก่เกษตรกรในอนาคต หรืออาจได้สายพันธุ์ต้านทานโรคราน้ำค้างที่ยังมีคุณภาพหรือผลผลิตไม่สูงพอ สำหรับใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

3. เพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตองุ่นในประเทศไทย ลดการใช้สารปราบศัตรูพืชที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม และลดต้นทุนการผลิต
4. เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย เกษตรกรผู้ปลูกองุ่นได้รายได้เพิ่มขึ้นจากการปลูกองุ่น เป็นการแก้ปัญหาความยากจน และมีสุขภาพดีขึ้นจากการลดการใช้สารเคมีป้องกันและกำจัดโรคพืช นอกจากนี้ผู้บริโภคยังมีสุขภาพดีขึ้นจากการบริโภคองุ่นที่มีสารเคมีตกค้างน้อยลง และอาจได้บริโภคองุ่นคุณภาพดีที่มีราคาต่ำลงด้วย
5. ได้นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาซึ่งมีความรู้และประสบการณ์ทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีดั้งเดิมและการประยุกต์ใช้เทคนิคด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีดั้งเดิมในปัจจุบันจัดเป็นสาขาขาดแคลน
6. ได้ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการอย่างน้อย 2 เรื่อง

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยในโครงการวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ 1) การโคลนยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายยีนต้านทาน (resistance gene analogs; RGAs) ในองุ่น และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจาก RGAs 2) การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะ (inheritance) และการปรับปรุงพันธุ์องุ่นโดยวิธีดั้งเดิม

1. การโคลน RGAs ในองุ่น และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจาก RGAs

1.1 การโคลนและหาลำดับเบสของ RGAs

1.1.1 สกัดดีเอ็นเอจากองุ่นสายพันธุ์ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง 2 สายพันธุ์ คือ NY 88.0507.01 และ *V. cinerea* B9 และองุ่นพันธุ์อ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง 1 พันธุ์ คือ Black Queen โดยวิธีการของ Lodhi et al. (1994)

1.1.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ชนิด degenerate ที่จำเพาะเจาะจงกับลำดับเบสบนยีน NBS-LRR (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลน RGAs จาก genomic DNA

ชื่อ	ทิศทาง	ได้จากยีน	ลำดับเบส (5' ⟶ 3')	อ้างอิง
1. P-loop	Sense	*N*, *RPS2*, *L6*	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC	ดัดแปลงจาก Hunger et al. (2003)
GLPLAL-1	Antisense	*N*, *RPS2*, *RPM1*, *L6*	IAGIGCIAGIGGIAGICC	ดัดแปลงจาก Hunger et al. (2003)
2. P-loop	Sense	*N*, *RPS2*, *L6*	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC	ดัดแปลงจาก Hunger et al. (2003)
Rev-loop	Antisense	*N*, *RPS2*, *L6*	GTIGTITTICCIACICCICC	ดัดแปลงจาก Hunger et al. (2003)

1.1.3 นำท่อนดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR (PCR products) มาแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้า (อิเล็กโตรโฟรีซิส) บน 0.8 % agarose gel

1.1.4 ทำการสกัดชิ้นดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการออกจากเจล โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)

1.1.5 นำชิ้นดีเอ็นเอ (จาก 1.1.4) ต่อเข้ากับเวคเตอร์ (vector) pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) และทำการถ่ายฝากลงในเซลล์ผู้รับ *Escherichia coli*

1.1.6 คัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม โดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีน β-galactosidase บนอาหารคัดเลือกที่ทาด้วย 2% (w/v) X-gal และ 100 mM isopropyl β-

D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ถ้าเป็นพลาสมิดลูกผสมโคโลนีจะเป็นสีขาว ในขณะที่โคโลนีที่มีพลาสมิดเดิมจะมีสีฟ้า

1.1.7 เลือกพลาสมิดลูกผสม เพื่อนำมาตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิดด้วยวิธี PCR

1.1.8 สกัดดีเอ็นเอของพลาสมิดที่มีท่อนดีเอ็นเอแทรกอยู่จากเซลล์แบคทีเรีย

1.1.9 นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 1.1.8 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI เพื่อคัดเลือกโคลน RGAs ที่มีดีเอ็นเอขนาดเหมาะสม

1.1.10 หาลำดับเบสของ RGAs โดย Macrogen Inc. (Seoul, Korea)

1.1.11 นำลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากลำดับเบสในข้อ 1.1.10 มาเปรียบเทียบความเหมือน (similarity) ระหว่างแต่ละ RGA และเปรียบเทียบกับยีนต้านทานโรคต่าง ๆ ของพืชชนิดต่าง ๆ ที่ได้มีรายงานไว้ใน GenBank โดยใช้ nucleotide-nucleotide basic local alignment search tool (BLASTn) และ protein data base (BLASTx) หรือ protein blast (BLASTp) algorithms (www. cbi.nlm.nih.gov/BLAST)

1.2 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจาก RGAs (RGA-STS markers)

จาก RGAs ที่ได้ นำลำดับเบสของ RGA ที่เกี่ยวข้องมาใช้ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR เพื่อให้ได้แถบดีเอ็นเอรูปแบบที่ต่างกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ เช่น การมี/ไม่มี ท่อนดีเอ็นเอ หรือได้ท่อนดีเอ็นเอขนาดต่างกันเมื่อนำมาทำ agarose gel electrophoresis ถ้ายังไม่สามารถแยกความแตกต่างของ PCR products ได้ นำ PCR products มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ เพื่อหาเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตัดแล้วให้รูปแบบท่อนดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทาน และพันธุ์อ่อนแอ เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมาย cleaved amplified polymorphism sequences (CAPS) หรือ single strand conformation polymorphism (SSCP) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.2.1 สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนขององุ่นลูกผสม Horizon × Ill. 547-1 โดยวิธีการของ Owens (2003)

1.2.1.1 บดเนื้อเยื่อ 1.5 g ในไนโตรเจนเหลว ใส่ในหลอดขนาด 1.5 mL แล้วเติม cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) extraction buffer (3% (w/v) CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.1 M Tris HCl, pH 8.0, 2% (w/v) polyvinylpolypyrrolidone และ 0.2% (v/v) ß-mercaptoethanol) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°ซ นาน 30 นาที

1.2.1.2 เติม 24:1 chloroform:isoamyl alcohol ปริมาตร 1 เท่า กลับหลอดไปมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5635 ×g นาน 15 นาที

1.2.1.3 ใช้ปิเปตดูดน้ำใสใส่หลอดใหม่ แล้วเติม 5 M NaCl ปริมาตร 0.5 เท่า จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 1 เท่า นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20°ซ นาน 20 นาที

1.2.1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5635 ×g นาน 15 นาที เทน้ำใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 %และ 95 %ethanol

1.2.1.5 ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิ 37°ซ แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย ddH_20 ปริมาตร 200 µL หลังจากนั้นเติม RNase A ความเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 20 µL แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 30 นาที วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ 260 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer

1.2.2 ใช้โปรแกรม Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_www.cgi) ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับโคลน *Vitis* RGAs (ตารางที่ 2) และสั่งสังเคราะห์ไพร-เมอร์ที่พัฒนาโดย Di Gaspero and Cipriani (2003) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่จำเพาะ อุณหภูมิ annealing และขนาดของ PCR products ของเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาจาก RGAs

ชื่อ [a]	**Forward primer (5'—3')** **Reverse primer (5'—3')**	**อุณหภูมิ annealing**	**ขนาด**	**เอนไซม์**	**ท่อนดีเอ็นเอจากการตัด** [b]
rgVcin109	GGAAGACGACAATTGCCAAA GCATCGACTCCAAGCACAT	56	358	*Alu* I	84,274
rgVcin111	ATGGTGTCATGAAGGGAAAAA AGACCAAACCAACCATGCTC	57	164	*Xba* I	31,133
rgVcin123	GATGGGATGGAGTCAAAGGA CACTCACTCCATGGCACATT	58	217	*aTaq* I	43,174
rgVcin125	GTCCAGGAAACCGTTCTCAA CCTTGGTCCGAAACAAAGAA	54	304	*Hinf* I	144,160
rgVcin127	GATGGGATGGAGTCAAAGGA GGGGAGGCCTTTAGCATAAT	54	352	*Mnl* I	134,218
rgVcin139	TGACGTGGATGATTTGATGC GGGGAGGCCTTTAGCATAAT	58	259	*Alu* I	62,197

[a] ตั้งชื่อไพรเมอร์จากชื่อของ RGAs

[b] ขนาดท่อนดีเอ็นเอ (bp) ที่คาดว่าได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

[c] เครื่องหมายที่พัฒนาโดย Di Gaspero and Cipriani (2003)

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่จำเพาะ อุณหภูมิ annealing และขนาดของ PCR products ของเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาจาก RGAs (ต่อ)

ชื่อ [a]	**Forward primer (5'—3')** **Reverse primer (5'—3')**	**อุณหภูมิ annealing**	**ขนาด**	**เอนไซม์**	**ท่อนดีเอ็นเอจากการตัด** [b]
rgVcin165	CATGGTATCCTGAGGGGAAA GGAGGCCATCAGCATAATCT	58	361	*Mae* II	163,198
rgVrip064 [c]	GACTACTATTGCCAAGGCTGTTT AATCTACTGCTTGGTAGGAGAG	58	467	*Eco*RI	
rgVrip145 [c]	GCCAGACTTGCTTATAACGATGA CGCACTTTTCCACAATCTTCTT	58	475	*Alu* I	
rgVrip158 [c]	CCAGTTGATATATACAGGGACGATG GATCCTTGTATCAAGCAATCTCA	58	463	*Mnl* I	
rgVamu085 [c]	GACGACCCTCTTGACCAGGAT TGAGAATTTATAGTGTCTTCTCCTACA	58	435	*Sau* 3AI	
rgVamu092 [c]	AACTCACATCAATTTGAGAGTAGAATC TGATTTGAGAGGTCAACATAGTCA	58	431	*Alu* I	
rgVamu100 [c]	CATCAATATGATGGTAGTAGCTTTCTT GAGCTTAGACACCTCTTTATCACACT	58	164		
rgVamu111 [c]	ACCAGAGAGTGGTGGGACAC CCTTTTATCTTGTAAATACTGCCTGA	58	194		
stkVa011 [c]	GAAGGCACTTTGAGCAATGG AACCATTCGGGAGCCAAG	57	479	*Eco*RV	
GLPL6-1 [c]	GCATATGCTACAAACTCCATTCA CAATTTCTTCTAGTTCTGGGATG	58	206	*Hinf* I	

[a] ตั้งชื่อไพรเมอร์จากชื่อของ RGAs

[b] ขนาดท่อนดีเอ็นเอ (bp) ที่คาดว่าได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

[c] เครื่องหมายที่พัฒนาโดย Di Gaspero and Cipriani (2003)

1.2.3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสารละลาย ปริมาตรรวม 20 µL ซึ่งประกอบด้วย 1× PCR buffer, 0.1 mM dNTPs, 2.5 mM $MgCl_2$, 2 µM ของแต่ละไพรเมอร์, 30 ng DNA และ 1 unit *Taq* DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA) โดยใช้โปรแกรม (1) 94°ซ นาน 1 นาที (2) 92°ซ นาน 50 วินาที, 46 - 58°ซ นาน 50 วินาที, 72°ซ นาน 1 นาที จำนวน 25 รอบ และ (3) 72°ซ นาน 10 นาที

1.2.4 เลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตัดท่อนดีเอ็นเอจากข้อ 1.2.3 ได้ขนาดไม่เกิน 200 bp โดยใช้โปรแกรม Sequencher 4.2 (Genecodes Corp., Ann Arbor, MI, USA; ตารางที่ 2) ตัดดี-เอ็นเอปริมาณ 0.2 μg ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 unit แล้วบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์นั้น นาน 3 ชั่วโมง

1.2.5 วิเคราะห์ CAPS ด้วย 2% (w/v) agarose gel และย้อมด้วย SYBR Green

1.2.6 วิเคราะห์ SSCP โดยการใช้ polyacrylamide gels (8% (v/v) Acrylamide/Bis, 2% (v/v) glycerol, 1× TBE, 0.10% (v/v) TEMED and 0.01% (w/v) ammonium persulfate)

1.2.6.1 Pre-run polyacrylamide gel ที่ 200 V, 10 W อุณหภูมิ 4°ซ นาน 15 นาที

1.2.6.2 เตรียมตัวอย่างโดยเติม 3X SSCP loading dye (95% (v/v) formamide, 0.05% (w/v) xylene cyanol, 0.05% (w/v) bromophenol blue และ 20 mM EDTA, pH 8.0) ลงในตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 μL ทำให้ตัวอย่างเสียสภาพที่อุณหภูมิ 95°ซ นาน 5 นาที แล้วรีบแช่ในน้ำแข็งทันที

1.2.6.3 อิเล็กโตรโฟรีซิสตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 200-230 V, 0.06 A, 12-13 W อุณหภูมิ 4°ซ

1.2.6.4 ย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต ตรึงเจลด้วย 10% (v/v) acetic acid นาน 30 นาที แล้วล้างด้วย ddH_2O 2 ครั้ง นาน 5 นาที จากนั้นย้อมด้วย 0.2% (w/v) silver nitrate ($AgNO_3$) นาน 30 นาที แล้วล้างด้วย ddH_2O 2 ครั้ง นาน 5 นาที ย้อมเจลด้วย developer solution (1.5% (w/v) sodium hydroxide (NaOH) และ 1% (v/v) formaldehyde (นาน 30 นาที แล้วตรึงเจลด้วย 10% (v/v) acetic acid

1.2.7 วิเคราะห์สถิติทดสอบการกระจายตัวของเครื่องหมาย และหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายและยีนต้านทานโรคราน้ำค้างโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SAS 9.1.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)

2. การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะ (inheritance) และการปรับปรุงพันธุ์องุ่นโดยวิธีดั้งเดิม

2.1 การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้านทานโรคราน้ำค้าง

2.1.1 การผลิตลูกผสม

2.1.1.1 ใช้แผนการผสมพันธุ์แบบ North Carolina Design II ซึ่งเป็นแผนการผสมพันธุ์ ที่ผสมระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ครบทุกชุด ซึ่งอาจเรียกว่า การผสมแบบแฟกตอเรียล (factorial) ในการผสมจะแยกพืชออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งคือ พันธุ์แม่ (*V. vinifera*) ให้ผลผลิตสูงแต่อ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ Black Queen, Carolina Black Rose และ Italia กลุ่มสอง คือ พันธุ์พ่อ เป็นพันธุ์ต้านทานราน้ำค้าง จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ NY 88.0517.01, NY 65.0550.04 และ NY 65.0551.05 ซึ่งได้จากการพัฒนาสายพันธุ์โดยการประเมินโรคในสภาพไร่ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2535-2543 ที่ New York State Agricultural Experiment Station (NYSAES) มหาวิทยาลัย Cornell ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยนำพันธุ์พ่อแต่ละพันธุ์ผสมกับพันธุ์แม่ทุกพันธุ์ ดังนั้นจึงมีจำนวนลูกผสม F_1 ที่ใช้ทดลอง 9 คู่ผสม

2.1.1.2 ในปี พ.ศ. 2546 เก็บละอองเกสรตัวผู้จาก NYSAES ที่มหาวิทยาลัย Cornell โดยเก็บช่อดอกที่บานอย่างน้อย 60 %ใส่ในถุงกระดาษ ใช้ตะแกรงโลหะกรองเกสรตัวผู้ และทำให้แห้งด้วยเครื่องดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน เก็บละอองเกสรตัวผู้ในหลอดที่ใส่สารดูดความชื้นไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ จนกว่าจะนำมาใช้

2.1.1.3 ทดสอบการมีชีวิตของละอองเกสรตัวผู้ก่อนนำไปผสมกับดอกตัวเมียในปี พ.ศ. 2547 ด้วยวิธีประยุกต์จาก Mulugeta et al. (1994) โดยการนำเกสรตัวผู้และ negative control มาวางบนแผ่นสไลด์ แล้วหยดสีย้อม1, 2, 3-triphenyl tetrazolium chloride (TTC; 1.0% (w/v) ใน 50% (w/v) sucrose) จำนวน 3 หยด ทิ้งไว้นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตความมีชีวิตของละอองเกสรตัวผู้ โดยการนับจำนวนละอองเกสรสีชมพูหรือสีดำแดงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า โดย 40-50 %ของละอองเกสรตัวผู้จากพันธุ์พ่อแต่ละพันธุ์ที่ย้อมติดสีชมพู หรือดำแดงด้วย TTC บ่งชี้ความมีชีวิต 40-50% การเตรียม negative control ใช้ละอองเกสรตัวผู้มาทำให้ตายด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 70°ซ นาน 48 ชั่วโมง ละอองเกสรที่ตายจะไม่ติดสี

2.1.1.4 ผลิตองุ่นลูกผสมจำนวน 9 คู่ผสม ในปี พ.ศ. 2547 ที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ตามวิธีการของ Reisch and Pratt (1996) โดยการตอนดอกตัวผู้และคลุมช่อดอกด้วยกระดาษทิ้งไว้ข้ามคืน ป้ายละอองเกสรตัวผู้บนช่อดอก

เกสรตัวเมียที่ตอนไว้ด้วยพู่กันอย่างเบามือ และคลุมด้วยกระดาษจนกระทั่งติดผล หลังจากการผสมเกสร 4 สัปดาห์ จึงดึงถุงออก และเขียนชื่อติดไว้

2.1.1.5 ฉีดพ่นสารเคมี Bordeaux mixture (cupric sulphate และ bisdithio carbamate) อัตรา 3 กรัมต่อลิตร ทุก ๆ สัปดาห์เพื่อป้องกันโรค

2.1.1.6 เก็บผลอ่อนที่สุกแก่เต็มที่ แยกเมล็ดออกจากผลแล้วทำความสะอาด จากนั้นผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ก่อนเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ

2.1.1.7 แช่เมล็ด F_1 ด้วย gibberellic acid (GA) แล้ววางในกล่องพลาสติกที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 90 %ข้ามคืนก่อนแช่ใน 1.5 %(w/v) hydrogen peroxide (H_2O_2) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง

2.1.1.8 ล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง และ 70 %(v/v) ethanol 1 ครั้ง จากนั้นแช่เมล็ดในสารละลาย GA ความเข้มข้น 1,000 ppm นาน 24 ชั่วโมง

2.1.1.9 ล้างเมล็ดด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง และทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วเก็บในที่เย็น (pre-chilled) ที่อุณหภูมิ 5°ซ นาน 21 วัน

2.1.1.10 ทำการเพาะเมล็ดในกระบะทราย เมล็ดจะงอกภายใน 6 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายต้นกล้ามาปลูกในกระถาง 6 นิ้ว ที่ใส่พีทมอส ดิน ขี้เถ้าแกลบ เพอร์ไลท์ เวอมิคูไลท์ และทราย อัตราส่วน 1: 1: 1/2: 1: 3/4 และใส่ปุ๋ยเคมี สูตร 46-0-0 อัตรา 1 กรัม/กระถาง

2.1.1.11 ปลูกอ่อนลูกผสม F_1 จำนวน 120 ต้น ในโรงเรือนเพาะชำ และบำรุงด้วยปุ๋ยคอก และปุ๋ยทางใบ สูตร 11-8-6 อัตรา 10 มิลลิกรัม/ลิตร ทุก ๆ 2 สัปดาห์ ฉีดพ่นสารเคมี mancozeb (manganese ethylenebis [dithiocarbamate]) อัตรา 2 กรัม/ลิตร ทุก ๆ เดือน เพื่อป้องกันโรคราน้ำค้าง และ triadimefon (1-(4-chlorophenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl) butanone) อัตรา 0.6 กรัม/ลิตร ทุก ๆ 2 สัปดาห์เพื่อป้องกันโรคราสนิม

2.1.2 การประเมินความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง

2.1.2.1 การเตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบ

2.1.2.1.1 เก็บใบอ่อนพันธุ์อ่อนแอที่เป็นโรคราน้ำค้างจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.1.2.1.2 พ่นน้ำกลั่นลงบนผิวใบอ่อนที่ติดเชื้อจนกระทั่งชื้นและบ่มที่อุณหภูมิ 22°ซ ข้ามคืน

2.1.2.1.3 ล้างสปอร์ราน้ำค้างจากใบแล้วเก็บในขวดสเปรย์

2.1.2.1.4 นับจำนวนของสปอร์ด้วย haemacytometer เจือจางให้ได้ความเข้มข้น

10^5 สปอร์/มิลลิลิตร

2.1.2.2 การประเมินความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในองุ่นลูกผสม F_1 และพันธุ์พ่อแม่ โดยวิธี detached leaf ในปี พ.ศ. 2549 โดยสุ่มตัวอย่างจาก 5 หรือ 6 ต้น

2.1.2.2.1 เก็บใบข้อที่ 4, 5, 6 และ 7 จากองุ่นลูกผสม F_1

2.1.2.2.2 พ่นสปอร์ราน้ำค้างบริเวณใต้ใบองุ่น และวางบนกระดาษกรองที่ชื้นใน Petri dish และพ่นน้ำกลั่นบนใบที่ใช้เป็น negative control

2.1.2.2.3 บ่มที่อุณหภูมิ 22°ซ ให้แสงสว่าง 18 ชั่วโมง/วัน นาน 7 วัน จากนั้นจึงประเมินระดับความต้านทาน

2.1.2.2.4 ล้างสปอร์จากใบที่ปลูกเชื้อ โดยใส่ใบในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่า 3 นาที

2.1.2.2.5 ใช้ปิเปตดูดสปอร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เพื่อคำนวณหาจำนวนสปอร์ทั้งหมดต่อพื้นที่ใบ วัดความยาวและความกว้างของใบที่ถูกปลูกเชื้อ และคำนวณพื้นที่ใบ (กว้าง × ยาว)

2.1.2.2.6 หาพื้นที่ใบจริง โดยทำการสุ่มใบองุ่นลูกผสมจำนวน 10 ใบ แล้ววัดโดยใช้เครื่องวัดพื้นที่ใบ (leaf area meter) คำนวณสมการเส้นตรง regression ระหว่างพื้นที่ใบที่วัดและพื้นที่ใบจริง

2.1.2.2.7 ปรับจำนวนสปอร์ทั้งหมดต่อใบเป็นจำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม .จากสูตร

$$\text{จำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร .ซม.} = \frac{(\text{จำนวนสปอร์} \times \text{พื้นที่ใบ 25 ตร .ซม.})}{\text{พื้นที่ใบจริง}}$$

2.1.2.2.8 ประเมินระดับความต้านทานโดยการให้คะแนนดังนี้

0 = 0 – 5 สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม. หมายถึงต้านทานมาก

1 = > 5 – 10 สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม. หมายถึงต้านทาน

2 = >10 – 15 สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม. หมายถึงต้านทานปานกลาง

3 = >15 – 25 สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม. หมายถึงอ่อนแอปานกลาง

4 = >25 – 40 สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม. หมายถึงอ่อนแอ

5 = >40 สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม. หมายถึงอ่อนแอมาก

2.1.3 การวิเคราะห์สมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (gca) และสมรรถนะการรวมตัวจำเพาะ (sca)

2.1.3.1 ปรับข้อมูลการประเมินระดับความต้านทานโรคจากข้อ 2.1.2 โดยใช้สมการ $X' = (X+1)^{1/2}$

2.1.3.2 วิเคราะห์สมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (gca) และสมรรถนะการรวมตัวจำเพาะ (sca) โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD):

$X_{ij} = m + A_{i(j)} + e_{ij}$

เมื่อ X_{ij} = ค่าสังเกตจากทรีตเทนต์ที่ i, ซ้ำที่ j เมื่อ j = 1,…,r

m = grand mean

$A_{i(j)}$ = อิทธิพลเนื่องจากทรีตเมนต์ที่ i เมื่อ i = 1,…,t

e_{ij} = error

อิทธิพลของแต่ละปัจจัย สามารถเขียนเป็นโมเดล:

$A_{ij} = A_i + B_j + A \text{ vs } B$

เมื่อ A = อิทธิพลเนื่องจากพันธุ์พ่อแม่

B = อิทธิพลเนื่องจากสายพันธุ์ลูกผสม

A vs B = อิทธิพลเนื่องจากเฮตเทอโรซีสของสายพันธุ์ลูกผสม

วิเคราะห์สมรรถนะการรวมตัวทั่วไปขององุ่นลูกผสม:

$B_{ij} = G_i + G_j + S_{ij}$

เมื่อ B_{ij} = ผลของการผสมข้ามระหว่างพันธุ์แม่ที่ j และพันธุ์พ่อที่ i

G_i = ค่าเฉลี่ยของลูกผสมระหว่างพันธุ์พ่อที่ i เมื่อ i = 1, 2,…, m; m = 3

G_j = ค่าเฉลี่ยของลูกผสมระหว่างพันธุ์แม่ที่ j เมื่อ j = 1, 2,…, f; f = 3

S_{ij} = sca ของพันธุ์พ่อที่ i กับพันธุ์แม่ที่ j

สามารถนำค่าเฉลี่ยมาคำนวณค่า gca ได้ผลดังนี้

$G_i = \overline{X}_{i.} - \overline{X}_{..}$

$G_j = \overline{X}_{.j} - \overline{X}_{..}$

และสามารถคำนวณหาค่า sca ดังนี้

$S_{ij} = \overline{X}_{ij} - \overline{X}_{i.} - \overline{X}_{.j} + \overline{X}_{..}$

การประเมินระดับความสำคัญของ gca และ sca ให้เปรียบเทียบกับความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย ดังนี้

$S_{\bar{x}} = [MSE*(1/2(1/n))]^{1/2}$

เมื่อ MSE ได้จากการวิเคราะห์วาเรียนซ์ และ n เป็นจำนวนซ้ำ

จากผลการวิเคราะห์ Expected mean squares สามารถแสดงวาเรียนซ์การรวมตัวดังนี้

$\sigma^2_m = \sigma^2_{gca\ (male)} = 1/4\ \sigma^2_A$

$\sigma^2_f = \sigma^2_{gca\ (female)} = 1/4\ \sigma^2_A$

$$\sigma^2_{mf} = \sigma^2_{sca} = 1/4\,\sigma^2_D$$

เมื่อ $\sigma^2_A = 2(\sigma^2_m + \sigma^2_f)$

และวิเคราะห์หาอัตราพันธุกรรมอย่างแคบ ตามสมการดังนี้

$$\text{Heritability (\%)} = [\sigma^2_A / (\sigma^2_A + \sigma^2_D + \sigma^2_E)] \times 100$$

2.2 การปรับปรุงพันธุ์องุ่นโดยวิธีดั้งเดิม

2.2.1 นำเข้าองุ่นสายพันธุ์ต้านทานโรคราน้ำค้าง และราแป้งจาก Grapevine germplasm มหาวิทยาลัย Cornell ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Bruce Reisch

2.2.2 ทำการคัดสรร (screen) สายพันธุ์ที่ได้ในข้อ 2.2.1 ร่วมกับพันธุ์ที่มีคุณภาพดีซึ่งรวบรวมอยู่ ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เพื่อประเมินระดับความต้านทานโรคและความจำเพาะต่อสายพันธุ์เชื้อโรคที่มีอยู่ในประเทศไทย

2.2.3 คัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคที่เหมาะสม และทำการผสมกับพันธุ์คุณภาพดี แต่อ่อนแอต่อโรค ได้แก่ พันธุ์ Carolina Black Rose, Black Queen, Italia และ Early Muscat

2.2.4 นำเมล็ดลูกผสมที่ได้มาปลูก และทดสอบความต้านทานโรคในห้องปฏิบัติการ คัดเลือกเฉพาะต้นที่มีความต้านทานในระดับสูง

2.2.5 นำตา/ยอดจากต้นลูกผสมที่คัดเลือกไว้ไปติด/เสียบบนต้นตอ ซึ่งเจริญเติบโตได้ดี และต้านทานโรค หรือตอนกิ่งต้นลูกผสม

หมายเหตุ: โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการต่อเนื่องที่ต้องใช้เวลานานหลายปี ซึ่งงานวิจัยระยะนี้เป็นจุดเริ่มต้นของการปรับปรุงพันธุ์องุ่น ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งใช้เทคนิคด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล และ การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิม หลังงานวิจัยระยะนี้จบสิ้น เครื่องหมายที่ได้จะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการปรับปรุงพันธุ์ในระยะต่อไป โดยจะช่วยลดปริมาณลูกผสมที่ต้องคัดเลือกในแต่ละรอบลง ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในระยะยาว โดยเฉพาะองุ่นเป็นพืชอายุยาวที่ต้องใช้พื้นที่ และค่าใช้จ่ายในการปลูกดูแลรักษาสูง นอกจากนี้ RGAs ที่โคลนได้อาจเกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคอื่น ๆ เช่น สแคบ ฯลฯ ด้วย ซึ่งสามารถศึกษาความสัมพันธ์ และพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลได้โดยวิธีเดียวกัน หรือพัฒนาไปพร้อม ๆ กัน

บทที่ 3
ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล ส่วนที่ 1

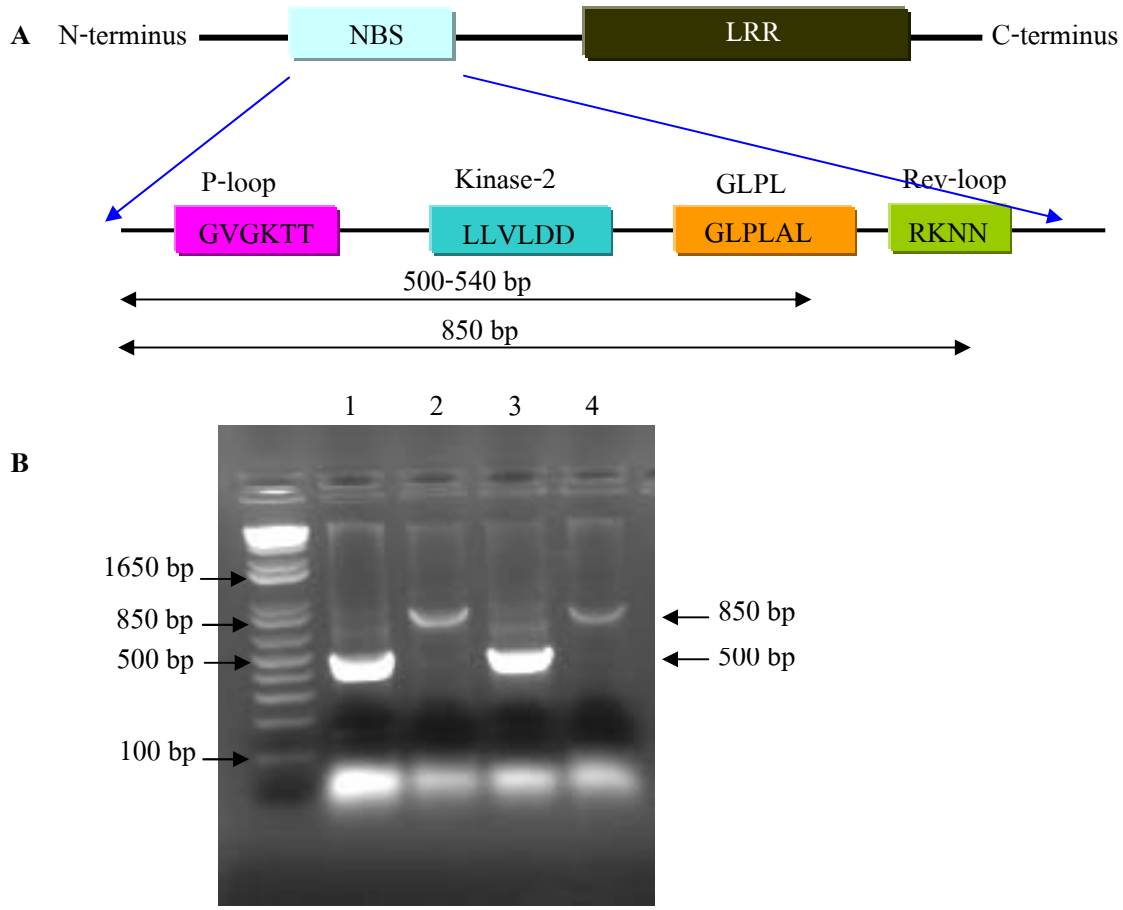
การโคลนยีนคล้ายยีนต้านทาน (resistance gene analogs; RGAs) ในองุ่น และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจาก RGAs

การโคลน RGAs

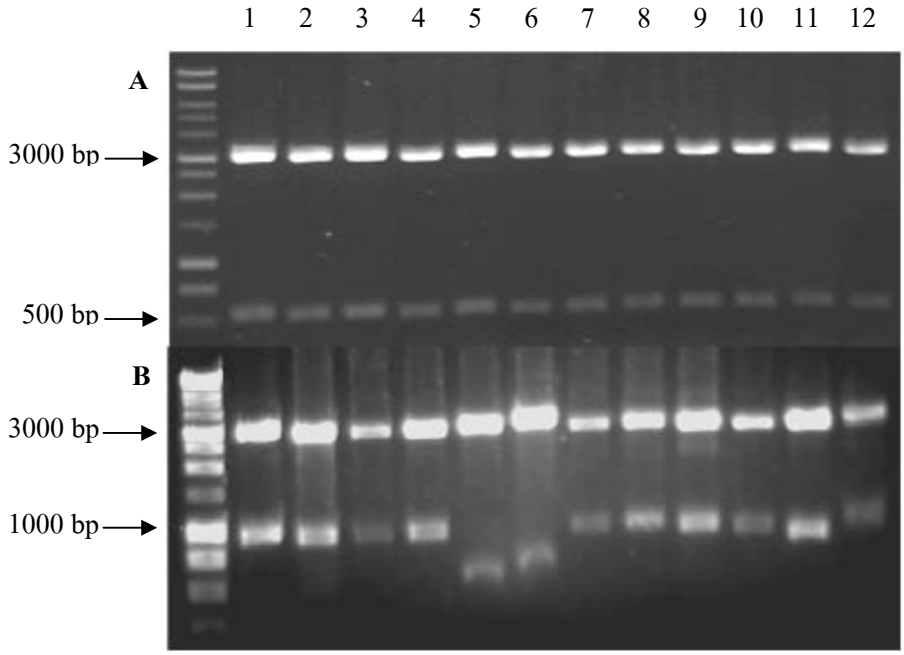
ใช้ไพรเมอร์ P-loop/GLPLAL-1 และ P-loop/Rev-loop เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากองุ่นพันธุ์ป่า *V. cinerea* B9 ซึ่งเป็นจีโนไทป์ที่ต้านทานโรคราน้ำค้าง ได้ท่อนดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR (PCR products) ขนาด 500 bp และ 850 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 1) นำ PCR products มาต่อกับเวคเตอร์ pGEM-T Easy คัดเลือกโคลนที่มีท่อนดีเอ็นเอขนาดเหมาะสม (ภาพที่ 2) ได้ 100 โคลน (48 โคลนจากไพร-เมอร์ P-loop/GLPLAL-1 และ 52 โคลนจาก P-loop/Rev-loop) นำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์และชัดเจนจาก 78 โคลน (ทั้ง 48 โคลน จากไพรเมอร์ P-loop/GLPAL-1 และ 30 โคลนจากไพรเมอร์ P-loop/Rev-loop) นำโคลนทั้งหมดมาจัดกลุ่ม โดยใช้ระดับความเหมือน(similarity) มากกว่าหรือเท่ากับ 90% เป็นเกณฑ์ พบว่าโคลนจากไพรเมอร์ P-loop/GLPAL-1 แบ่งเป็นกลุ่มได้ 8 กลุ่ม ในขณะที่โคลนจากไพรเมอร์ P-loop/Rev-loop แบ่งเป็นกลุ่มได้ 4 กลุ่ม

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RGAs ที่โคลนได้จากไพรเมอร์ P-loop/GLPLAL-1 มีการอนุรักษ์เหมือนกัน (conserved) สูงที่ NBS domain ไพรเมอร์คู่นี้จึงมีประสิทธิภาพสูงกว่าไพรเมอร์ P-loop/Rev-loop ดังนั้นจึงใช้เฉพาะไพรเมอร์ P-loop/GLPLAL-1 เท่านั้นในการโคลน RGAs จากองุ่นลูกผสม *V.* hybrid NY 88.0507.01 ที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างและสแคบ และองุ่น *V. vinifera* พันธุ์ Black Queen ที่อ่อนแอต่อโรค

เมื่อใช้ไพรเมอร์ P-loop/GLPLAL-1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขององุ่นลูกผสมต้านทานโรครา-น้ำค้างและสแคบ *V.* hybrid NY88.0507.01 ซึ่งเป็นลูกผสม NY 66.0795.01 X MI#2 ที่มีองุ่นพันธุ์ป่า *V. rupestris*, *V. cinerea*, *V. labrusca*, *V. riparia* และ/หรือ *V. lincecumii* ซึ่งมียีนต้านทานโรคในประวัติพันธุ์ (pedigree) และพันธุ์อ่อนแอ *V. vinifera* Black Queen พบว่าได้ท่อนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 bp เช่นเดียวกัน (ไม่แสดงข้อมูล) ได้จำนวนโคลน RGAs ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์สมบูรณ์และชัดเจนทั้งสิ้น 91 โคลน (จาก NY 88.0507.01 จำนวน 42 โคลน และจาก Black Queen จำนวน 49 โคลน)



ภาพที่ 1 RGAs (A) โมเดลโครงสร้างของยีนต้านทานชนิด NBS-LRR; (B) ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขององุ่น *V. cinerea* B9 ด้วยไพรเมอร์ P-loop/GLPLAL-1 (ตัวอย่างที่ 1 และ 3) มีขนาด 500 bp และที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ P-loop/Rev-loop (ตัวอย่างที่ 2 และ 4) มีขนาด 850 bp ช่องซ้าย ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder)



ภาพที่ 2 การเลือกโคโลนีที่มีขนาดแถบดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI ที่เหมาะสม ช่องซ้ายดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder); (A) ไพรเมอร์ P-loop/GLPLAL-1 ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 500 bp; (B) ไพรเมอร์ P-loop/Rev-loop ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 850 bp ยกเว้นช่อง 5 และ 6

การวิเคราะห์ลำดับเบสของโคลน RGAs

การวิเคราะห์ BLASTn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 8 จาก 12 กลุ่มขององุ่น *V. cinerea* B9 (ตั้งชื่อเป็น rgVcin) มีความคล้ายคลึงกับ RGAs ใน GenBank (ตารางที่ 3) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกับ RGAs ทั้ง 8 กลุ่มนี้ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ P-loop/GLPLAL-1 ส่วนโคลน RGAs 4 กลุ่มจากไพรเมอร์ P-loop/Rev-loop ไม่เหมือนกับโคลนใดใน GenBank โดยพบว่าทั้ง 8 โคลนคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในโครโมโซม (genomic sequence) ของ *V. vinifera* หรือ RGAs จากองุ่น *V. amurensis*, *V. aestivalis* (Di Gaspero and Cipriani, 2003; Jaillon et al., 2007) โดยมีค่า E-value ใกล้เคียง 0

ในทำนองเดียวกัน การวิเคราะห์ BLASTx พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ 10 จาก 12 กลุ่มขององุ่น *V. cinerea* B9 มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน NBS-LRR หรือโปรตีนที่คาดว่าจะเป็นโปรตีนต้านทาน (resistant protein candidates)ใน GenBank (ตารางที่ 3) ซึ่งลำดับกรดอะมิโนของโคลน RGAs ส่วนใหญ่คล้ายกับโปรตีนต้านทานจากองุ่น *V.* spp. ได้แก่ *V. amurensis*, *V. aestivalis* และ *V. vinifera* (ตารางที่ 1)

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากองุ่น *V. cinerea* B9 ที่ได้จากไพรเมอร์ P-loop/GLPLAL-1 และที่ได้จากไพรเมอร์ P-loop/Rev-loop พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากไพรเมอร์

P-loop/Rev-loop ให้เปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ RGAs ที่ทราบลำดับเบสใน GenBank ต่ำ ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ P-loop/GLPLAL-1 มีประสิทธิภาพในการโคลน RGAs จากองุ่นสูงกว่าไพรเมอร์ P-loop/Rev-loop

การตรวจหาความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RGAs จาก NY88.0507.01 (ตั้งชื่อเป็น rgVhybNY507) 42 โคลน และ RGAs จาก Black Queen (ตั้งชื่อเป็น rgVvinBQ) 49 โคลนกับนิวคลีโอไทด์ที่จัดเก็บอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn พบว่า 84 โคลนมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสูงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในโครโมโซมขององุ่นตระกูล *Vitis* หรือ RGAs/ ยีน P-loop NTPase จากองุ่น *V. amurensis*, *V. aestivalis, V. rupestris* และ *V. riparia* (เปอร์เซ็นต์ความเหมือน 81-99%) (Di Gaspero and Cipriani, 2002, 2003; Jaillon et al., 2007; Mahanil et al., 2007) โดยการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า ผู้ทดลองสามารถโคลนยีนที่คาดว่าจะกำหนดการสร้างโปรตีน RGAs ได้จากทั้งองุ่นพันธุ์ป่าที่ต้านทานโรค องุ่นพันธุ์ลูกผสมที่ต้านทานโรค และองุ่นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค โดยองุ่นลูกผสม NY88.0507.01 นั้น เป็นพันธุ์ที่คาดว่ามียีนต้านทานที่หลากหลาย เนื่องจากเป็นลูกผสมที่มีองุ่นพันธุ์ป่าหลายสปีชีส์ เช่น *V. rupestris*, *V. cinerea*, *V. labrusca*, *V. riparia* และหรือ *V. lincecumii* เป็นพ่อแม่พันธุ์ในประวัติพันธุ์ (จากการปรึกษาเป็นการส่วนตัวกับ B.I. Reisch) ส่วนโคลน RGAs อีก 7 โคลนไม่มีความคล้ายคลึงของนิวคลีโอไทด์กับยีนใด ๆ นอกจากนี้เมื่อทำการสืบค้นหาความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนซึ่งถอดรหัสจากยีนที่โคลนได้เทียบกับโปรตีนที่ถูกบันทึกไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTx และ BLASTp ตามลำดับ พบว่า มีโคลนจำนวน 84 โคลน ที่มีความคล้ายคลึงปานกลางถึงมาก (เปอร์เซ็นต์ความเหมือน 46-100%) กับโปรตีน NBS-LRR โปรตีนที่คาดว่าจะเป็นโปรตีนต้านทาน หรือเอนไซม์ P-loop NTPase นอกจากนี้ยังพบว่าโคลนเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนต้านทานในพืชหลากหลายชนิด อาทิเช่น แอปเปิ้ล (*Malus*) กุหลาบ (*Rosa*) ทานตะวัน (*Hellianthus*) ไม้สกุลหยาง (*Populus*) ถั่ว chickpea (*Cicer*) ละหุ่ง (*Ricinus*) และ โกโก้ (*Theobroma*) (เปอร์เซ็นต์ความเหมือน 45-57%)

นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนซึ่งถอดรหัสจากโคลนจำนวน 7 โคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งไม่มีความคล้ายคลึงกับยีนใด ๆ ที่อยู่ในฐานข้อมูล พบว่า 33-64 เปอร์เซ็นต์ของลำดับกรดอะมิโนของโคลนเหล่านี้ มีความเหมือนกับโปรตีนที่คาดว่าจะเป็น NBS-LRR ที่มาจากองุ่น *V. vinifera* และโปรตีนต้านทานจากแอปเปิ้ล กุหลาบ ไม้สกุลหยาง โกโก้ และพืชตระกูลถั่วลิสง (*Arachis*) ซึ่งจากข้อมูลข้างต้น ชี้ให้เห็นว่า ทั้ง 91 ยีนที่โคลนได้จาก NY88.0507.01 และ Black Queen น่าจะเป็น RGAs

เมื่อทำการจัดกลุ่มของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่โคลนได้ โดยจัดโคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันมากกว่าหรือเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์อยู่ในกลุ่มเดียวกัน พบว่าแบ่งลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวนทั้ง 91 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้เป็น 14 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสมาชิกตั้งแต่ 1 ถึง 38 ลำดับ

นิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 3) และพบว่า สมาชิกที่อยู่ภายในกลุ่มเดียวกันมีความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนตั้งแต่ 61-100 เปอร์เซ็นต์ โดยที่สามกลุ่มใหญ่ประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 13, 27 และ 38 โคลนจากทั้ง NY88.0507.01 และ Black Queen และอีก 11 กลุ่มประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 1-2 โคลน (7 กลุ่มได้มาจาก NY88.0507.01 และ 4 กลุ่มได้มาจาก Black Queen) จากนั้นจึงคัดเลือกโคลนหนึ่งโคลนเป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มเพื่อใช้ในการตรวจสืบค้นหาความคล้ายคลึงกันเปรียบเทียบกับยีนหรือโปรตีนที่จัดเก็บอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank และพบว่าโคลนที่เลือกมานั้น มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ ไม่มีความคล้ายคลึงกับยีนใด ๆ ไปจนกระทั่ง มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งมีความคล้ายคลึงระหว่าง 81-99 % กับยีนบนโครโมโซมขององุ่นในตระกูล *Vitis* หรือยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่คาดว่าจะเป็นโปรตีนต้านทาน หรือ เอนไซม์ P-loop NTPase (ตารางที่ 3) ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโคลนตัวแทนพบว่า โคลน rgVhybNY507_29, 80, 101 และ rgVvinBQ_46 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด (มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนมากกว่า 90%) กับโปรตีนที่คาดว่าจะเป็น NBS-LRR โปรตีนต้านทาน หรือเอนไซม์ P-loop NTPase ซึ่งได้จากองุ่น *V. vinfera*, *V. riparia*, *V. aestavalis* และ *V. amurensis* และมีลำดับกรดอะมิโนประมาณ 49-57% ที่คล้ายคลึงกับโปรตีนที่คาดว่าจะเป็นโปรตีนต้านทานจาก *Malus pruniforalia*, *Populus trichocarpa* และ *Helianthus annuus* ในทางตรงกันข้าม พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของโคลน rgVhybNY507_13, 15, 27 และ rgVvinBQ_53, 102 และ 106 นั้นมีความคล้ายคลึงที่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NBS-LRR โปรตีนที่คาดว่าจะเป็นโปรตีนต้านทาน หรือ เอนไซม์ P-loop NTPase จากองุ่นในตระกูล *Vitis* สปีชีส์ต่าง ๆ ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าว อาจจะเกิดจากการกลายพันธุ์ในหลายตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่โคลนได้ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่ามี RGA บางโคลนที่มีลำดับของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงปานกลางกับโปรตีนต้านทานที่มาจากพืชชนิดอื่น ๆ ตัวอย่างเช่น โคลน rgVhybNY507_27 ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายคลึงกับ *Arachis hypogaea* และ *M. prunifolia* ประมาณ 48-50 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ค้นพบโคลนใหม่จำนวน 3 โคลน ดังนี้ ประการแรก โคลน rgVhybNY507_22 และ rgVhybNY507_23 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เหมือนกับยีนใดในฐานข้อมูลของ GenBank แต่มีลำดับของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนที่คาดว่าจะเป็น NBS-LRR ขององุ่น *V. vinifera* และ *V. amurensis* ประมาณ 47-61 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังพบว่าลำดับกรดอะมิโนของโคลน rgVhybNY507_22 ยังมีความคล้ายคลึงกับโปรตีนต้านทานชนิด NBS-LRR ซึ่งมาจากลูกผสมของกุหลาบ 46 % อีกด้วย ประการที่สอง โคลน rgVhybNY507_90 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เกือบเหมือนกับยีนในโครโมโซมขององุ่น *V. vinifera* แต่กลับมีลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสได้จากโคลนดังกล่าวคล้ายคลึงกับโปรตีนที่คาดว่าจะเป็นโปรตีน NBS-LRR จากองุ่น *V. vinifera* ประมาณ 51-55 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น นอกจากนี้ลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสได้ของโคลน rgVhybNY507_90 นี้

ยังมีความคล้ายคลึงกับโปรตีนต้านทานชนิด NBS-LRR ที่มาจาก *Cicer arietinum* และ *Ricinus communis* 45-47 เปอร์เซ็นต์อีกด้วย

การวิเคราะห์ NBS-LRR domain และ การวิเคราะห์ phylogenetic ของ RGAs และโปรตีนต้านทานซึ่งทราบแน่ชัด

พืชตอบสนองต่อเชื้อโรคโดยตรงหรือโดยอ้อมผ่านปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนต้านทานของพืชกับยีน avr ของเชื้อโรค (Van der Biezen and Jones, 1998; Dangl and Jones, 2001; Luderer and Joosten, 2001) โดยพบว่า LRR และ TIR/non-TIR domains มีบทบาทในการจดจำเชื้อโรคและส่งสัญญาณ ดังนั้นความจำเพาะระหว่าง LRR domain และ avr product ของเชื้อโรคชนิดใหม่ ๆ จึงมีความสำคัญต่อการต้านทานของพืช (Zhou et al., 2004) กลไกซึ่งได้แก่ การแตกหักของโครโมโซม การเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม การเพิ่มจำนวนยีนและมีลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนไป unequal crossing over, gene conversion และ diversifying selection ทำให้เกิดความหลากหลายใน LRR และ TIR/non-TIR domains ซึ่งก่อให้เกิดความจำเพาะต่อเชื้อชนิดใหม่ได้ (Michelmore and Meyers, 1998; Ellis et al., 2000; Richter and Ronald, 2000; Young, 2000) โปรตีน NBS-LRR เป็นกลุ่มของโปรตีนต้านทานที่ใหญ่ที่สุด พบว่าโปรตีนต้านทานซึ่งเป็นที่รู้จักอย่างน้อย 40 โปรตีนจากพืชหลากหลายชนิดจัดเป็นโปรตีน NBS-LRR (Qu et al., 2006) LRR domain ประกอบด้วย leucine และกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำเรียงตัวซ้ำกันประมาณ 25-38 กรดอะมิโน (Dixon et al., 1998) ในพืช LRR domain ทำหน้าที่และมีบทบาทสำคัญในการส่งสัญญาณการต้านทาน (Parker et al., 1997; Aarts et al., 1998; Falk et al., 1999) โดย LRR domain มีความหลากหลายและมีความจำเพาะต่อ avr product ของแต่ละเชื้อ และเป็นสื่อกลางระหว่าง N-terminal signaling domain (TIR และ/หรือ non-TIR) กับ avr product ทำให้เกิดการส่งสัญญาณไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านทานอื่น ๆ (Yu et al., 1996; Koop and Modzihitov, 1999; Feys and Parker, 2000)

N-terminal domain แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือโปรตีน TIR และ non-TIR โดยโปรตีน TIR พบมากในพืชใบเลี้ยงคู่และเกี่ยวเนื่องกับโปรตีนในวิถีการส่งสัญญาณ (signal transduction pathways) (Meyers et al., 1999; Goff et al., 2002) ใน *Arabidopsis* พบว่า 63 % ของโปรตีน NBS-LRR เป็นโปรตีนกลุ่ม TIR ส่วนโปรตีน non-TIR-NBS-LRR ประกอบด้วย CC motif ซึ่งในพืชพบจำนวนน้อยกว่ากลุ่ม TIR และไม่พบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Meyers et al., 2003) โดย CC motif มีหน้าที่ในการส่งสัญญาณปลายทาง (downstream signaling; Lupas, 1996; Century et al., 1997; Parker et al., 1997) โปรตีน non-TIR-NBS-LRR และ TIR-NBS-LRR แตกต่างกันในการตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุโรค โดย TIR ตอบสนองผ่าน *eds-1* dependent pathway ในขณะที่โปรตีน non-TIR

บางชนิดตอบสนองผ่าน *ard-1* pathway (Aarts et al., 1998) ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า amino-terminal TIR หรือ CC motifs มีบทบาทในวิถีการส่งสัญญาณแตกต่างกัน 2 วิถี

การจัดเรียง (alignment) ลำดับกรดอะมิโนของโคลน RGA ตัวแทน 22 โคลน เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนเฉพาะส่วนที่เป็น NBS domain ของโปรตีนต้านทานที่ได้รับการตรวจพิสูจน์เป็นอย่างดีแล้ว พบว่าโปรตีนของโคลน RGA ตัวแทน ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโนที่มีลักษณะอนุรักษ์ในบริเวณที่เป็น P-loop, RNBS-A, Kinase-2, RNBS-B, RNBS-C และ GLPL motifs ซึ่งเป็นลักษณะบ่งบอกของโปรตีน RGAs ลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสพันธุกรรมจากโคลน RGAs ทั้ง 8 กลุ่มซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *V. cinerea* ด้วยไพรเมอร์ P-loop/GLPLAL-1 มี P-loop and GLPL motifs ทุกโคลน นอกจากนี้ยังพบ RNBS-A, kinase-2, RNBS-B and RNBS-C motifs ปรากฏในโคลน RGAs ทั้งหมดด้วย (ภาพที่ 3) และเมื่อทำการศึกษาลำดับกรดอะมิโนในส่วนที่เป็น motifs ของ RGAs ใน NY88.0507.01 และ Black Queen พบว่า มีโคลนจำนวน 59 โคลนที่มีลำดับกรดอะมิโนในบริเวณที่เป็น P-loop และ GLPL motifs ที่อนุรักษ์เหมือนกันมาก (33 โคลนมาจากองุ่นลูกผสมต้านทานโรค NY88.0507.01 และ 26 โคลนมาจากองุ่นพันธุ์อ่อนแอ Black Queen) ส่วนโคลนที่เหลือจำนวน 32 โคลน มีลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ P-loop และ/หรือ GLPL motifs ที่ปรับเปลี่ยนไป (โดย 9 โคลนมาจากองุ่นลูกผสมต้านทานโรค NY88.0507.01 และ 23 โคลนมาจากองุ่นพันธุ์อ่อนแอ Black Queen) ในจำนวน 32 โคลนนี้มี 23 โคลนที่มีลำดับกรดอะมิโน ในบริเวณ P-loop motif เป็น GGGEDD (ซึ่งลำดับกรดอะมิโนโดยทั่วไปของ P-loop คือ GXXXXGKS/T โดยที่ X คือกรดอะมิโนใด ๆ) จากการสืบค้น พบ GGGEDD motif นี้ในโปรตีนขององุ่น *V. vinifera* และโปรตีนที่คล้ายกับ cadherin เอนไซม์ในตระกูลนิวคลีเอส/ฟอสฟาเทส (nuclease/phosphatase) หรือโปรตีนไคเนส (protein kinase) ที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ

กรดอะมิโนใน conserved motif ของ NBS domain สามารถทำนายโครงสร้างที่ N-terminal domain ได้ Meyers et al. (2003) รายงานว่ากรดอะมิโน trytophan (W) หรือ aspartic acid (D) ใน kinase-2 motif มีความสัมพันธ์อย่างมากกับชนิดของโปรตีนใน N-terminal domain (Meyers et al., 1999) โดยสามารถจำแนกลำดับกรดอะมิโนใน kinase-2 motif เป็น TIR หรือ non-TIR ได้ถูกต้อง 90% การมีกรดอะมิโน tryptophan ใน kinase-2 motif บ่งชี้การเป็นโปรตีน non-TIR ตัวอย่างเช่น RPS2, RPS5, I2 และ Xa1 ในทางตรงกันข้าม L6 และ M จากป่าน และ N จากยาสูบ ซึ่งมีกรด aspartic ใน kinase-2 motifs เป็นโปรตีนชนิด TIR (ภาพที่ 3) ลำดับกรดอะมิโนของ kinase-2 motifs จำแนก *Vitis* RGAs ในการทดลองนี้เป็น TIR และ non-TIR ดังนี้ rgVcin125, rgVcin152, rgVhybNY507_29, rgVhybNY507_90, rgVhybNY507_101, rgVhybNY507_13, rgVvinBQ_47 และ rgVvinBQ_53 จัดอยู่ในกลุ่ม non-TIR เช่นเดียวกับ RPS2 และ RPS5 ในขณะที่ rgVcin109, rgVcin139, rgVcin165, rgVhybNY507_23, rgVhybNY507_15, rgVhybNY507_80, rgVvinBQ_102

และ rgVvinBQ_46 จัดอยู่ในกลุ่ม TIR เช่นเดียวกับ RPS4, L6 และ N (ภาพที่ 3) อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถจัด rgVcin111, rgVcin123, rgVcin127, rgVhybNY507_22, rgVhybNY507_27 และ rgVhybBQ_106 เป็นกลุ่ม TIR หรือ non-TIR ได้ จึงใช้การวิเคราะห์ phylogenetic โดยอาศัยลำดับกรดอะมิโนในการจัดกลุ่ม ผลการศึกษาแสดงไว้ในภาพที่ 4 โดยพบว่า โปรตีนที่ใช้ในการศึกษาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่หนึ่ง ประกอบด้วย โปรตีนตัวแทนที่โคลนจากองุ่นในตระกูล *Vitis* จำนวน 13 โคลน จัดกลุ่มร่วมกับโปรตีน NBS-LRR ซึ่งทราบแน่ชัดว่าเป็นชนิด TIR ได้แก่ โปรตีน RPS4 จาก *Arabidopsis* โปรตีน L6 จากป่าน และโปรตีน N จากยาสูบ กลุ่มที่สอง ประกอบด้วยโปรตีนตัวแทนที่โคลนจากองุ่นที่เหลืออีก 9 โคลน จัดกลุ่มร่วมกับโปรตีน RPS2 และ RPS5 จาก *Arabidopsis* ที่ทราบแน่ชัดว่าเป็นโปรตีนต้านทาน NBS-LRR ชนิด non-TIR rgVhybNY507_27, rgVvinBQ_106, rgVcin111, rgVcin123 และ rgVcin127 ซึ่งไม่สามารถจัดกลุ่มได้ก่อนหน้านี้ได้รับการจัดให้อยู่ในแขนงของแผนภาพร่วมกับโปรตีนที่เป็นชนิด TIR ส่วน rgVhybNY507_22 ได้รับการจัดให้อยู่ในกลุ่มของโปรตีนที่เป็นชนิด non-TIR ดังนั้น การวิเคราะห์ดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า โคลน RGA ตัวแทนดังกล่าว น่าจะเป็นโปรตีนต้านทานชนิด TIR และ non-TIR ตามลำดับ

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนระหว่างโปรตีนตัวแทนที่ศึกษา พบว่าโปรตีนของโคลนตัวแทน rgVcin165 มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับโคลนตัวแทน rgVvinBQ_46 มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง 89% และคู่ของโปรตีนที่มีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนต่ำที่สุด ได้แก่คู่ของ rgVhybNY507_22 และ rgVvinBQ_53 และคู่ของ rgVhybNY507_22 และ rgVvinBQ_106 โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันเพียง 5% เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนระหว่างโปรตีนของโคลน RGA ตัวแทนกับโปรตีนต้านทานที่ทราบแน่ชัด พบว่าบางโคลนมีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนกับโปรตีนต้านทานที่ทราบแน่ชัดในระดับปานกลาง โดยพบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนจากโคลน RGA หลายโคลนมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของ L6 และ N เช่น ลำดับกรดอะมิโนของ rgVvinBQ_46, rgVhybNY507_80, rgVcin109, rgVcin139 และ rgVcin165 มีความคล้ายคลึงกับของ L6 และ N ประมาณ 41-43%, 37-48%, 37-47%, 39-46% และ 45-40% ตามลำดับ ในขณะเดียวกัน พบว่า rgVcin127 มีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกับ N ประมาณ 43% นอกจากนี้พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโคลน rgVhybNY507_29, rgVvinBQ_47 และ rgVcin125 มีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของ RPS5 ประมาณ 47-48% และ rgVcin125 ยังมีความคล้ายคลึงกับ RPS2 ประมาณ 41% ด้วย (ไม่แสดงข้อมูล)

การพบการกระจายตัวของโปรตีน RGA ตัวแทนที่โคลนได้จากองุ่นพันธุ์ป่า องุ่นลูกผสมสายพันธุ์ต้านทานโรค และพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคทั่วทั้งแผนภาพ phylogram ชี้ให้เห็นว่า โปรตีนเหล่านี้อาจจะเป็นโปรตีนที่คล้ายกัน (paralogues) หรืออาจจะเป็นคู่ของอัลลีลที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่ทำงานได้/ทำงานไม่ได้ซึ่งเกิดจากความผันแปรของยีน ในทางตรงกันข้าม โปรตีนเหล่านี้อาจไม่

เกี่ยวข้องหรือไม่ได้เป็นโปรตีนต้านทานโรคราน้ำค้างและสแคบแต่อย่างใด หรืออาจเป็นไปได้ว่าบางโปรตีนในกลุ่มนี้ไม่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค แต่อาจจะเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่อื่น อาทิ เช่น เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (signal transduction) ดังที่กล่าวไว้โดย Meyers et al. (2003) ดังนั้น การศึกษานี้นับว่าเป็นหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่า การโคลนยีนที่กำหนดการสร้าง RGAs นั้นสามารถทำได้ทั้งในอุ่นที่ต้านทานหรืออ่อนแอต่อโรค แต่อย่างไรก็ดี จำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไปในอนาคต โดยมุ่งเป้าไปที่การนำองค์ความรู้ที่ได้นี้ไปใช้ประโยชน์ในการที่จะโคลนยีนต้านทานชนิดใหม่ ๆ การกำหนดตำแหน่งยีนต้านทานบนแผนที่ รวมไปถึงการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อนำไปสู่การคัดเลือกพันธุ์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล เพื่อให้ได้อุ่นที่มีความต้านทานโรคในระดับที่พึงพอใจ

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

โคลนตัวแทน	GenBank accessions ซึ่งมีความคล้ายคลึงสูงสุด								
	จำนวน/กลุ่ม	นิวคลีโอไทด์ (BLASTn)	Score (bit)	E -value*	Identity/ coverage (%)	โปรตีน (BLASTx)	Score (bit)	E -value*	Identity/ coverage (%)
***V. cinerea* B9**									
rgVcin109 (DQ885292)	3	*V. vinifera* contig VV78X069020.20, whole genome shotgun sequence AM478696.2	752	0.0	94/92	Resistance protein candidate [*V. amurensis*] AAR08831.1	266	4e-70	84/97
rgVcin111 (DQ885293)	5	*V. amurensis* isolate rgVamu092 resistance protein candidate gene, partial cds AY427123.1	754	0.0	93/95	Resistance protein candidate [*V. amurensis*] AAR08817.1	214	1e-69	85/94
rgVcin123 (DQ885294)	6	*V. aestivalis* clone pSCA-C2 resistance protein analog gene, partial cds FJ795341.1	874	0.0	97/95	Resistance protein analog [*V. aestivalis*] ACN91228.1	214	3e-54	76/95
rgVcin125 (DQ885295)	4	*V. amurensis* isolate rgVamu151 resistance protein candidate gene, partial cds AY427133.1	889	0.0	98/97	Resistance protein candidate [*V. amurensis*] AAR08840.1	306	6e-82	95/97
rgVcin127 (DQ885296)	13	*V. aestivalis* clone pSCA-C2 resistance protein analog gene, partial cds FJ795341.1	867	0.0	96/94	Resistance protein analog [*V. aestivalis*] ACN91228.1	236	7e-61	92/87

* Expected value (E-value) หมายถึงจำนวนคู่เหมือน (matches) ที่คาดว่าได้จากความบังเอิญเท่านั้น ยิ่ง E-value มีค่าน้อย ยิ่งสนับสนุนการจับคู่เหมือน

ตารางที่ 3 ผลการตรวจหาความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ *Vitis* RGAs เปรียบเทียบกับลำดับของยีนหรือโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ BLASTn และ BLASTx (ต่อ)

โคลนตัวแทน	GenBank accessions ซึ่งมีความคล้ายคลึงสูงสุด								
	จำนวน/กลุ่ม	นิวคลีโอไทด์ (BLASTn)	Score (bit)	E -value*	Identity/ coverage (%)	โปรตีน (BLASTx)	Score (bit)	E -value*	Identity/ coverage (%)
rgVcin139 (DQ885297)	6	*V. amurensis* isolate rgVamu053 resistance protein candidate gene, partial cds AY427102.1	859	0.0	97/94	Resistance protein candidate [*V. amurensis*] AAR08814.1	273	5e-72	95/94
rgVcin152 (DQ885298)	8	*V. vinifera*, whole genome shotgun sequence, contig VV78X005680.17, clone ENTAV 115	774	0.0	94/92	Unnamed NBS-LRR protein candidate [*V. vinifera*] CBI15532.3	141	3e-32	55/82
						Leucine-rich repeat containing protein, putative [*Ricinus communis*] XP_002529624.1	131	3e-29	47/82
rgVcin165 (DQ885299)	3	*V. vinifera* contig VV78X110871.5, whole genome shotgun sequence AM457506.2	780	0.0	94/95	Unnamed NBS-LRR protein candidate [*V. vinifera*] CBI33320.3	318	2e-85	94/98
						Resistance protein candidate [*V. amurensis*] AAR08818.1	295	2e-78	88/96
rgVcin209	4	No significant similarity found							
rgVcin210	6	No significant similarity found							
rgVcin254	13	No significant similarity found							
rgVcin269	7	No significant similarity found							

* Expected value (E-value) หมายถึงจำนวนคู่เหมือน (matches) ที่คาดว่าได้จากความบังเอิญเท่านั้น ยิ่ง E-value มีค่าน้อย ยิ่งสนับสนุนการจับคู่เหมือน

ตารางที่ 3 ผลการตรวจหาความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ *Vitis* RGAs เปรียบเทียบกับลำดับของยีนหรือโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ BLASTn และ BLASTx (ต่อ)

โคลนตัวแทน	GenBank accessions ซึ่งมีความคล้ายคลึงสูงสุด								
	จำนวน/กลุ่ม	นิวคลีโอไทด์ (BLASTn)	Score (bit)	E -value*	Identity/ coverage (%)	โปรตีน (BLASTx)	Score (bit)	E -value*	Identity/ coverage (%)
***V.* hybrid NY88.0507.01**									
rgVhybNY507_13 (HM773001)	1	No significant similarity found				Unnamed NBS-LRR protein candidate [*V. vinifera*] CBI17900.1	54	3e-13	50/62
rgVhybNY507_15 (HM773002)	1	No significant similarity found				Resistance protein candidate [*V. amurensis*] AAR08818.1	81	7e-14	53/38
rgVhybNY507_22 (HM773004)	2	No significant similarity found				Unnamed NBS-LRR protein candidate [*V. vinifera*] CBI17900.1	56	2e-10	61/78
						Putative LZ-NBS-LRR resistance protein [Rosa hybrid cultivar] CAJ27150.1	30	0.0	46/67
rgVhybNY507_23 (HM773005)	1	No significant similarity found				Resistance protein candidate [*V. amurensis*] AAR08818.1	126	9e-30	53/86
rgVhybNY507_27 (HM773007)	1	No significant similarity found				P-loop NTPase [*V. aestivalis*] CN91228.1	48	4e-04	58/24
						Resistance protein PLTR [*A. hypogaea*] AAX81243.1	39.7	0.13	48/21
						Putative disease resistance gene analog NBS-LRR [*M. prunifolia*] AAM77260.1	39.3	0.17	50/20

* Expected value (E-value) หมายถึงจำนวนคู่เหมือน (matches) ที่คาดว่าได้จากความบังเอิญเท่านั้น ยิ่ง E-value มีค่าน้อย ยิ่งสนับสนุนการจับคู่เหมือน

ตารางที่ 3 ผลการตรวจหาความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ *Vitis* RGAs เปรียบเทียบกับลำดับของยีนหรือโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ BLASTn และ BLASTx (ต่อ)

โคลนตัวแทน	GenBank accessions ซึ่งมีความคล้ายคลึงสูงสุด								
	จำนวน/กลุ่ม	นิวคลีโอไทด์ (BLASTn)	Score (bit)	E -value*	Identity/ coverage (%)	โปรตีน (BLASTx)	Score (bit)	E -value*	Identity/ coverage (%)
rgVhybNY507_29 (EU822228.1)	27	*V. vinifera* contig V78X162558.4, whole genome shotgun sequence AM475374.1	904	0.0	99/97	P-loop NTPase [*V. aestivalis*] ACN91226.1	318	1e-85	92/98
rgVhybNY507_80 (EU822262.1)	2	*V. aestivalis* clone pSCA-C2 P-loop NTPase gene, partial cds FJ795341.1	909	0.0	99/98	P-loop NTPase [*V. aestivalis*] CN91228.1	308	1e-82	99/98
						TIR-NBS-LRR resistance protein [*P. trichocapa*] XP_0022300210.1	177	3e-43	57/98
rgVhybNY507_90 (EU822270.1)	1	*V. vinifera* contig VV78X247338.6, whole genome shotgun sequence AM483751.1	883	0.0	98/96	Unnamed NBS-LRR protein candidate [*V. vinifera*] CBI40355.1	154	5e-36	55/97
						NBS-LRR disease resistance protein [*C. arietinum*] ABB85178.1	142	1e-32	45/98
						Putative disease resistance protein RPH8A [*R. communis*] XP_002535012.1	139	1e-31	47/97

* Expected value (E-value) หมายถึงจำนวนคู่เหมือน (matches) ที่คาดว่าได้จากความบังเอิญเท่านั้น ยิ่ง E-value มีค่าน้อย ยิ่งสนับสนุนการจับคู่เหมือน

ตารางที่ 3 ผลการตรวจหาความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ *Vitis* RGAs เปรียบเทียบกับลำดับของยีนหรือโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ BLASTn และ BLASTx (ต่อ)

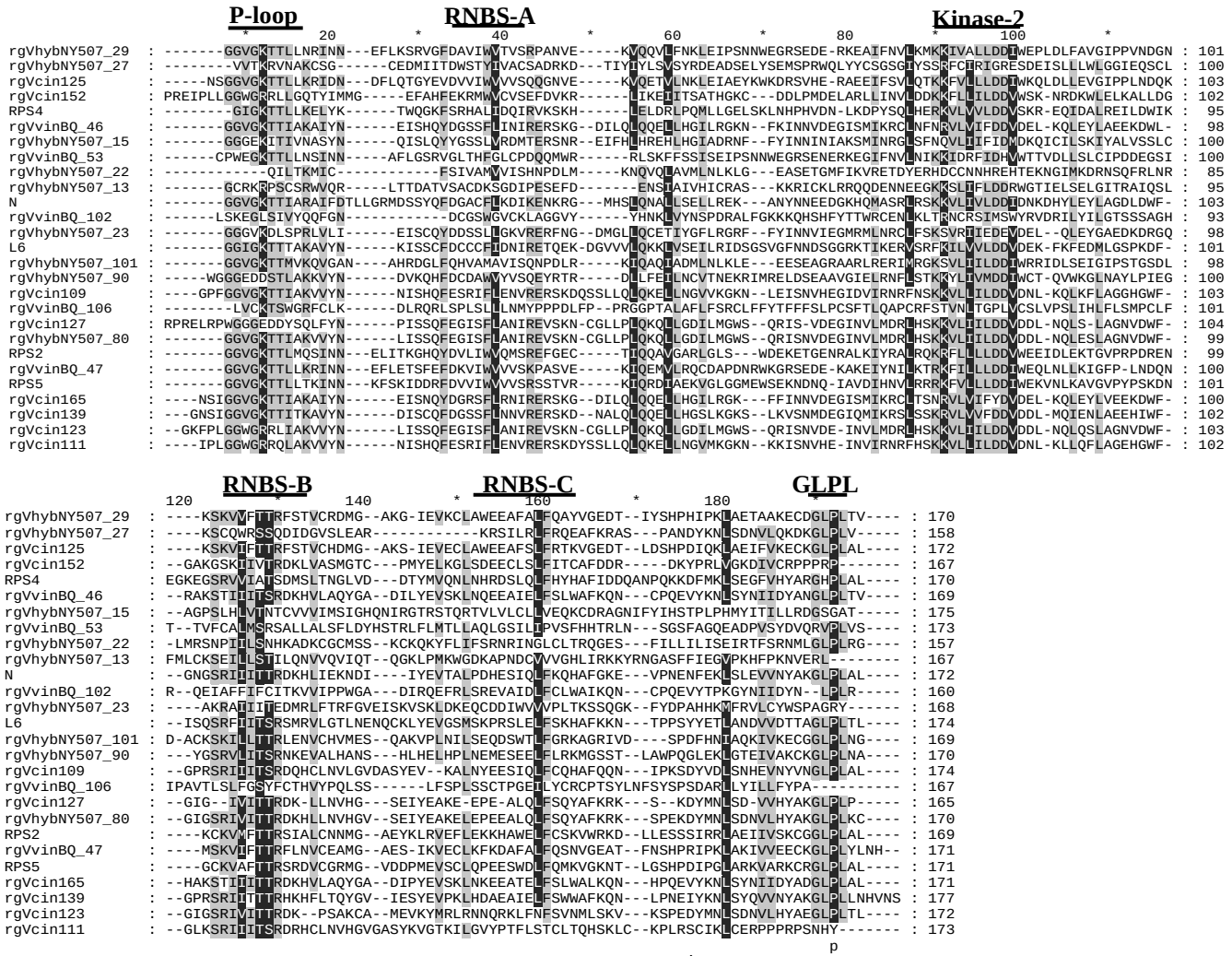
โคลนตัวแทน	GenBank accessions ซึ่งมีความคล้ายคลึงสูงสุด								
	จำนวน/กลุ่ม	นิวคลีโอไทด์ (BLASTn)	Score (bit)	E -value*	Identity/ coverage (%)	โปรตีน (BLASTx)	Score (bit)	E -value*	Identity/ coverage (%)
rgVhybNY507_101 (EU822276.1)	13	*V. rupestris* clone rgVrup119 putative RGA gene, partial sequence ABB85178.1	900	0.0	99/98	Unnamed NBS-LRR protein candidate [*V. vinifera*]CBI17900.1	298	1e-79	98/98
						Putative disease resistance gene analog NBS-LRR [*M. prunifolia*] AAM77267.1	139	1e-31	49/98
						NBS-LRR resistance like protein RGC402 [*H. annuus*] ABQ57715.1	136	1e-30	51/98
Cultivar 'Black Queen'									
rgVvinBQ_46 (EU822245.1)	38	*V. vinifera* contig VV78X110871.5, whole genome shotgun sequence AM436038.2	870	0.0	98/97	Unnamed NBS-LRR protein candidate [*V. vinifera*] CBI33323.1	318	1e-85	94/99
						Resistance protein candidate [*V. amurensis*] AAR08818.1	289	9e-77	88/98
rgVvinBQ_47 (EU822246.1)	1	*V. amurensis* isolate rgVamu084 resistance protein candidate pseudogene, partial sequence AY427079.1	870	0.0	97/98	Resistance protein candidate [*V. amurensis*] AAR08840.1	226	1e-57	64/98

* Expected value (E-value) หมายถึงจำนวนคู่เหมือน (matches) ที่คาดว่าได้จากความบังเอิญเท่านั้น ยิ่ง E-value มีค่าน้อย ยิ่งสนับสนุนการจับคู่เหมือน

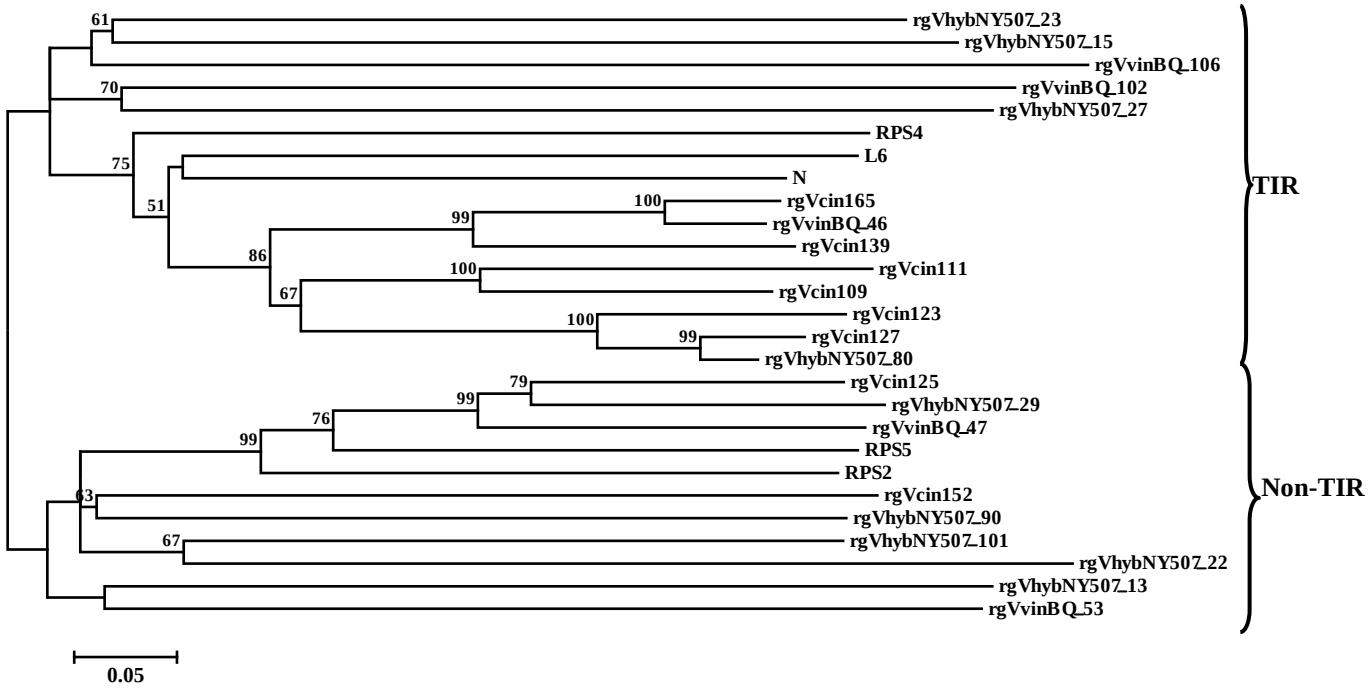
ตารางที่ 3 ผลการตรวจหาความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ *Vitis* RGAs เปรียบเทียบกับลำดับของยีนหรือโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ BLASTn และ BLASTx (ต่อ)

โคลนตัวแทน	GenBank accessions ซึ่งมีความคล้ายคลึงสูงสุด								
	จำนวน/กลุ่ม	นิวคลีโอไทด์ (BLASTn)	Score (bit)	E -value*	Identity/ coverage (%)	โปรตีน (BLASTx)	Score (bit)	E -value*	Identity/ coverage (%)
rgVvinBQ_53 (HM773013)	1	*V. vinifera* contig VV78X195949.3, whole genome shotgun sequence AM489403.2	296	1e-76	87/35	Resistance protein candidate [*V. riparia*] AAR08879.1	86	3e-15	46/41
rgVvinBQ_102 (HM773017)	1	*V. vinifera* contig VV78X148054.15, whole genome shotgun sequence AM463019.2	119	2e-23	81/27	Unnamed NBS-LRR protein candidate [*V. vinifera*] CBI33323.1	70	7e-11	61/33
						Resistance protein candidate [*V. amurensis*] AAR08818.1	59	2e-07	52/33
rgVvinBQ_106 (HM773018)	1	*V. vinifera* contig VV78X148054.15, whole genome shotgun sequence AM463019.2	66	2e-07	86/11	No significant similarity found			

* Expected value (E-value) หมายถึงจำนวนคู่เหมือน (matches) ที่คาดว่าได้จากความบังเอิญเท่านั้น ยิ่ง E-value มีค่าน้อย ยิ่งสนับสนุนการจับคู่เหมือน



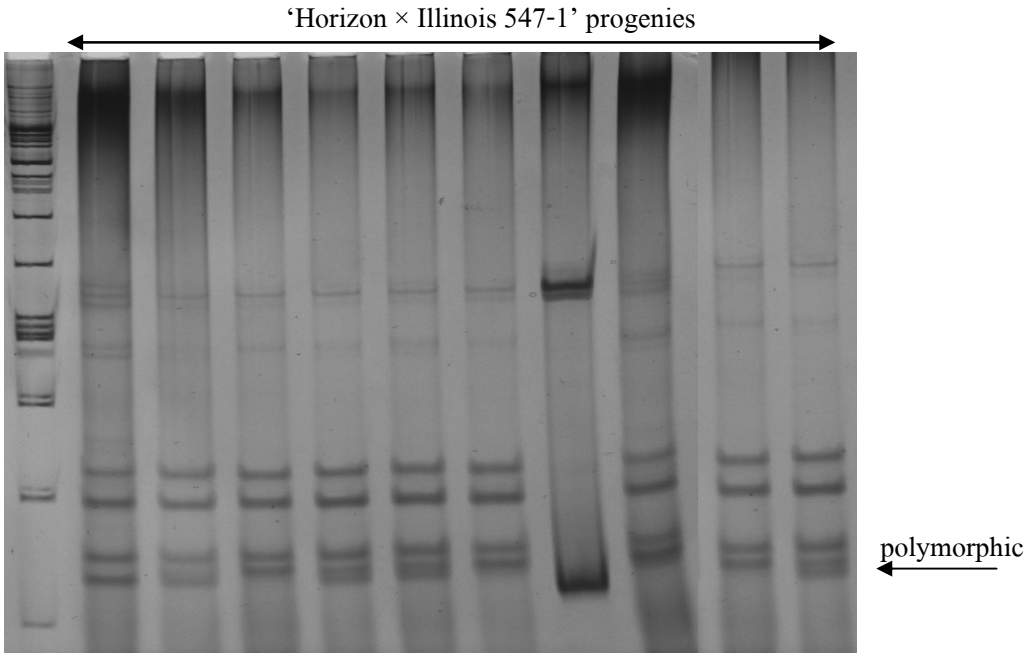
ภาพที่ 3 Multiple alignments จากการวิเคราะห์กรดอะมิโน (translated) ของโคลนตัวแทน RGA 22 โคลน ซึ่งแยกจาก *V. vinifera* 5 โคลน *V. cinerea* 8 โคลน และ *V.* hybrid 9 โคลน เปรียบเทียบกับโปรตีนต้านทานที่ทราบแน่ชัด 5 โปรตีน โดยใช้โปรแกรม MEGA4 แสดงกรดอะมิโนซึ่งมีลักษณะอนุรักษ์ด้วยกล่องสีดำและเทา ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้คือ D (aspartic acid) และ W (tryptophan) ใน kinase-2 motif ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะจำเพาะของโปรตีนในกลุ่ม TIR และ non-TIR ตามลำดับ โดยระบุชื่อของ NBS domain motifs ไว้ด้านบนของลำดับกรดอะมิโน



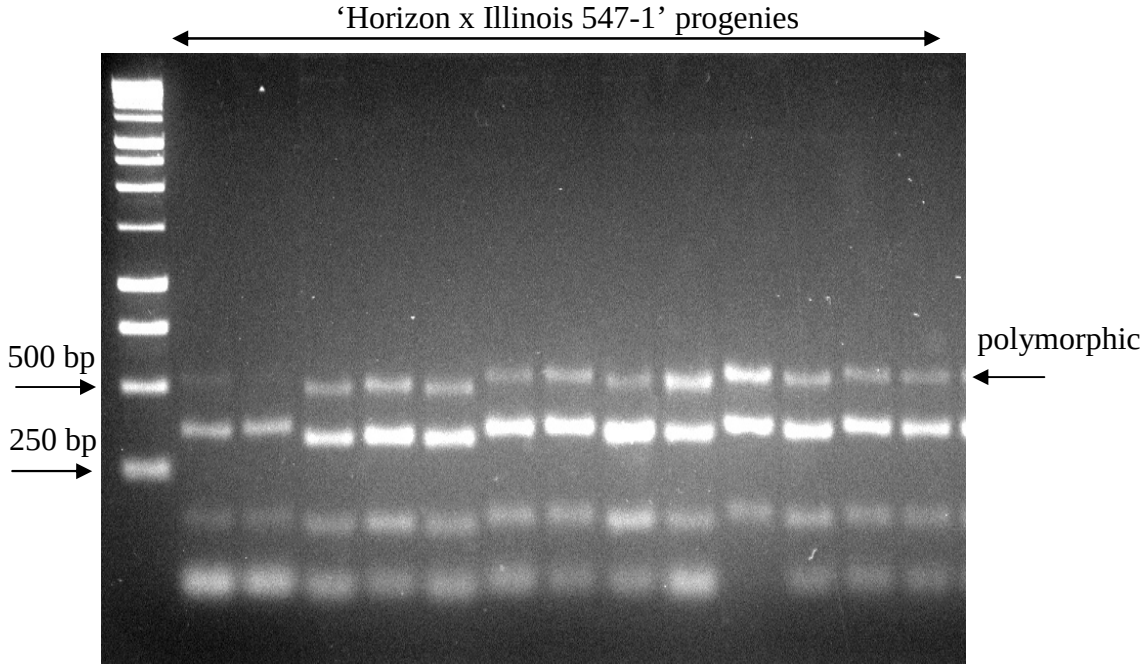
ภาพที่ 4 Phylogram ซึ่งสร้างโดยอาศัยข้อมูลที่ได้จาก sequence alignment ของกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Clustal W แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง RGA ซึ่งโคลนมาจาก *V. vinifera* (rgVvin), *V. cinerea* (rgVcin) และ *V.* hybrid (rgVhyb) เปรียบเทียบกับโปรตีนต้านทานที่ทราบแน่ชัดว่าเป็น NBS-LRR ชนิด TIR (RPS4, L6 และ N) หรือเป็นชนิด non-TIR (RPS2 และ RPS5) โดยระบุค่า Bootstrap ไว้ที่แขนงของแผนภาพ

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจาก RGAs

ทำการพัฒนาเครื่องหมาย STS จาก RGAs ที่โคลนด้วยไพรเมอร์ P-loop/ GLPLAL-1 จากองุ่นพันธุ์ป่า *V. cinerea* B9 จำนวน 8 เครื่องหมาย คือ rgVcin109, rgVcin111, rgVcin123, rgVcin125, rgVcin127, rgVcin139, rgVcin152, rgVcin165 เมื่อนำเครื่องหมายดังกล่าวมาทดสอบกับองุ่นพันธุ์ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง Illinois 547-1 พันธุ์อ่อนแอ Horizon และลูกผสมระหว่างพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ พบว่าเครื่องหมาย rgVcin 152 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในองุ่นดังกล่าวได้ จึงได้เครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ขององุ่นจำนวน 7 เครื่องหมาย (ภาพที่ 5-6) นอกจากนี้ยังใช้เครื่องหมาย STS ซึ่งพัฒนาโดย Di Gaspero and Cipriani (2003) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RGAs ที่โคลนจาก *V. amurensis* และ *V. riparia* จำนวน 9 เครื่องหมาย คือ rgVrip064, rgVrip145, rgVrip158, rgVamu085, rgVamu092, rgVamu100, rgVamu111, stkVa011 และ GLPL6-1 ในการทดสอบด้วย



ภาพที่ 5 รูปแบบแถบดีเอ็นเอขององุ่นลูกผสม Horizon × Illinois 547-1 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย rgVcin125



ภาพที่ 6 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของอุ่นลูกผสม Horizon × Illinois 547-1 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย stkVa011

จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของเครื่องหมาย พบว่า 5 เครื่องหมาย ได้แก่ rgVcin125, rgVcin127, rgVcin139, rgVamu085 และ GLPL6-1 ปรากฏแถบดีเอ็นเอในพันธุ์ต้านทาน แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอในพันธุ์อ่อนแอ ส่วนเครื่องหมายที่เหลืออาจปรากฏแถบดีเอ็นเอในทั้งพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ หรือไม่ปรากฏแถบในทั้งสองพันธุ์

การใช้ chi-square goodness-of-fit เพื่อทดสอบเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างในลูกผสมระหว่างพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ พบว่า rgVcin125, rgVcin127, rgVcin139 และ GLPL6-1 มีการกระจายตัว 1:1 แสดงว่าเครื่องหมายเหล่านี้ได้จากตำแหน่งในพันธุ์พ่อแม่ที่อยู่ในสภาพพันธุ์ทาง (heterozygous) หนึ่งพันธุ์ และในสภาพพันธุ์แท้ที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (homozygous null) ในอีกพันธุ์ ส่วน rgVcin109, rgVcin111, rgVcin123, rgVrip064, rgVrip145, rgVamu092 และ stkVa011 มีการกระจายตัว 3:1 แสดงว่าเครื่องหมายเหล่านี้สะท้อนถึงการเป็นพันธุ์ทางที่ตำแหน่งนั้นในพันธุ์พ่อแม่ทั้งสองพันธุ์ ส่วน rgVcin165, rgVrip158, rgVamu085, rgVamu100, rgVamu111 กระจายตัวแบบบิดเบือน (distort) ไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล

พบสหสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญระหว่างเครื่องหมาย rgVcin165, rgVamu085 และ stkVa011 กับจำนวนสปอร์ (ดัชนีของความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ r = 0.151, -0.173 และ 0.152 ($p < 0.05$) ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม rgVcin165 และ rgVamu085 มีการกระจายตัวบิดเบือน ในขณะที่ rgVcin165 และ stkVa011 ปรากฏแถบดีเอ็นเอในทั้งพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ ทำให้การหาความสัมพันธ์ระหว่างแถบดีเอ็นเอ และอัลลีลต้านทานหรืออัลลีลอ่อนแอทำได้ยาก

สำหรับ rgVamu085 ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอเฉพาะในพันธุ์ต้านทาน พบว่าในกลุ่มลูกผสมต้านทานต่อโรครา-น้ำค้าง 58 ต้น ซึ่งคาดว่าควรมีแถบดีเอ็นเอ มีเพียง 15.5% เท่านั้นที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ชี้ให้เห็นว่าเครื่องหมายนี้อาจอยู่ใน linkage group เดียวกับอัลลีลต้านทาน แต่อาจไม่ได้อยู่ใกล้ชิดมาก (tightly linked) แม้ว่าเครื่องหมายดังกล่าวจะอยู่ห่างจากยีนต้านทานเกิน 5 cM ซึ่งจำกัดการใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์ แต่อาจเป็นประโยชน์ในการกำหนดตำแหน่งยีนต้านทานในแผนที่ยีน เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มขึ้นในอนาคต นอกจากนี้ในอนาคตจะมีการพัฒนาเครื่องหมาย RGA-STS และเครื่องหมายชนิดอื่นเพิ่มเติมเพื่อหาเครื่องหมายที่ link กับยีนต้านทานโรคราน้ำค้างอย่างใกล้ชิด และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ได้

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล ส่วนที่ 2

การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะ และการปรับปรุงพันธุ์องุ่นโดยวิธีดั้งเดิม

การผลิตลูกผสม

ผลิตลูกผสม F_1 โดยใช้แผนการผสมพันธุ์แบบ North Carolina Design II ใช้พันธุ์แม่ซึ่งเป็นองุ่นรับประทานผลสด *V. vinifera* ที่มีคุณภาพผลดีแต่อ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ Black Queen, Carolina Black Rose และ Italia (ภาพที่ 7) พันธุ์พ่อซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทาน จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ NY 88.0517.01(Joannes Seyve 23.416 × (*V. rupestris* × *V. cinerea*)), NY 65.0550.04 ((Jaeger 70 (*V. rupestris* × *V. lincecumii*) × Victoria's Choice) × (Seyve Villard 23-18 selfed)) และ NY 65.0551.05 ((Jaeger 70 (*V. rupestris* × *V. lincecumii*) × Victoria's Choice) × Lady Patricia (S.14664 × S.V. 20-365)) ซึ่งต้านทานต่อโรคราน้ำค้างและราแป้ง จากการประเมินที่สถานีทดลองทางการเกษตร New York State Agricultural Experiment Station (NYSAES) มหาวิทยาลัย Cornell ประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นเวลาหลายปี จีโนไทป์เหล่านี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมขององุ่นอเมริกันหลายสปีชีส์ เช่น *V. cinerea*, *V. rupestris* และ *V. lincecumii* ในประวัติพันธุ์ (ภาพที่ 8) เมื่อผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่แบบครบทุกชุด ขนาด 3 × 3 ชุด โดยผสมกับพันธุ์แม่ พันธุ์ละ 15 ช่อ รวม 45 ช่อ ที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในปี พ.ศ. 2547 ตามวิธีของ Reisch and Pratt (1996) พบว่าติดผลทั้งหมด 36 ช่อ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การติดผล 50-70 % ยกเว้นลูกผสมของ Italia ติดผลเพียง 5-10% (ตารางที่ 4; ภาพที่ 9) นำต้นองุ่นลูกผสม F_1 ทั้งหมด 85 ต้น (เป็นลูกผสมของ Black Queen, Carolina Black Rose และ Italia จำนวน 39, 31 และ 15 ต้น ตามลำดับ (ที่รอดชีวิตและสมบูรณ์แข็งแรง อายุ 6 เดือน) และต้นพันธุ์พ่อและแม่มาใช้ในการประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้าง พบว่าลูกผสมที่มีองุ่นพันธุ์ Black Queen เป็นพันธุ์แม่มีการเจริญเติบโตทางลำต้นดีและสมบูรณ์แข็งแรงเช่นเดียวกับพันธุ์ Black Queen ส่วนลูกผสมของพันธุ์ Carolina Black Rose มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง ขนาดเมล็ดเท่ากับลูกผสมของพันธุ์ Black Queen อย่างไรก็ตาม การเจริญเติบโตทางลำต้นด้อยกว่าลูกผสมของพันธุ์ Black Queen ส่วนลูกผสมจาก Italia ผสมกับพันธุ์พ่อทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ NY 88.0517.01, NY 65.0550.04 และ NY 65.0551.05 มีเปอร์เซ็นต์การติดผลต่ำ เปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดต่ำ และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นกล้าต่ำ (40.6%, 25.0 % และ 10.0 % ตามลำดับ)

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

A) Black Queen: ผลสีม่วงเข้ม ช่อผลขนาดใหญ่ ผลยาวรีขนาดใหญ่ เปลือกบาง เจริญเติบโตรวดเร็ว แข็งแรง และให้ผลผลิตสูง อ่อนแอต่อโรคราน้ำค้างมาก

B) Carolina Black Rose: ผลสีม่วง ช่อผลขนาดปานกลาง ผลขนาดใหญ่ เปลือกบาง เนื้อแน่นและเนียน เจริญเติบโตรวดเร็ว แข็งแรงมาก อ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง

C) Italia: ผลสีเหลืองด้าน ช่อผลขนาดปานกลาง ผลขนาดใหญ่ เปลือกหนา เนื้อแน่น เจริญเติบโตรวดเร็ว แข็งแรง และให้ผลผลิตสูง อ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง

ภาพที่ 8 องุ่นลูกผสมที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อในการวิเคราะห์ gca และ sca

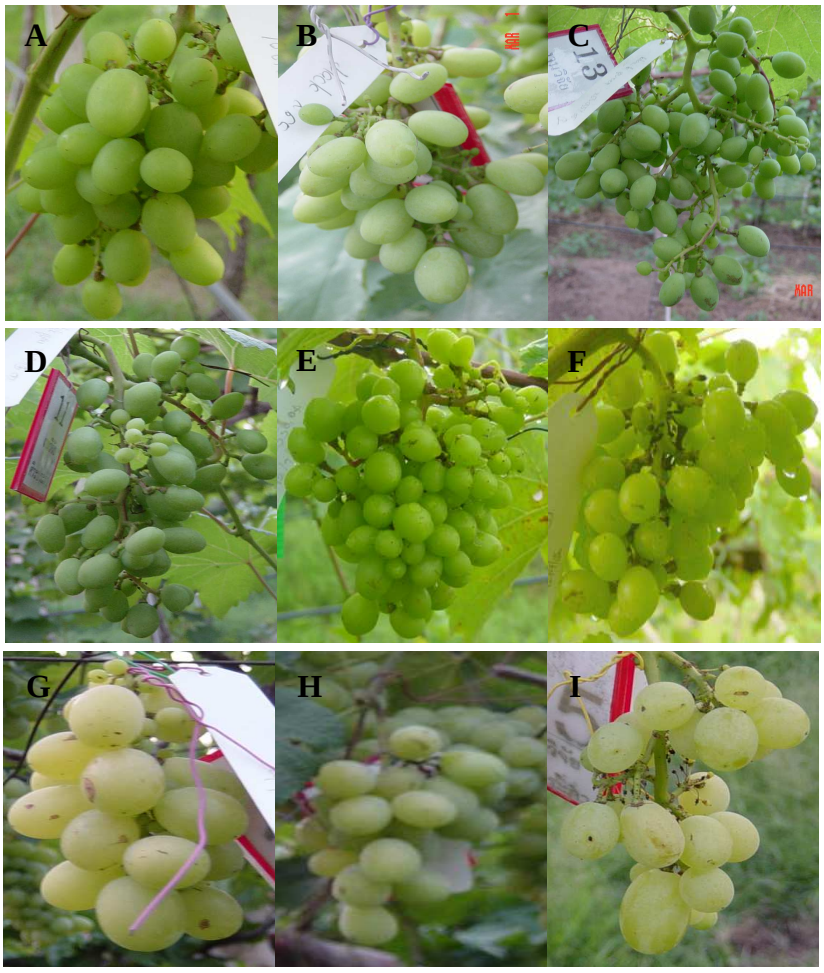
A) NY 88.0517.07: ผลสีม่วง ช่อผลขนาดใหญ่ค่อนข้างหลวม ผลขนาดเล็ก สุกแก่ช้า มีกรดสูง เจริญเติบโตรวดเร็ว แข็งแรง และให้ผลผลิตสูง ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างและราแป้งดีมาก

B) NY 65.0550.04: ผลสีม่วง ช่อผลขนาดใหญ่ ผลขนาดปานกลาง รสชาติปานกลาง เจริญเติบโตรวดเร็ว แข็งแรงปานกลาง และให้ผลผลิตค่อนข้างสูง ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างและราแป้งดีเยี่ยม

C) NY 65.0551.05: ผลสีขาว ช่อผลขนาดใหญ่ ผลขนาดใหญ่ปานกลาง รสชาติปานกลาง มักไม่ค่อยสะสมน้ำตาล เจริญเติบโตและ แข็งแรงปานกลาง และให้ผลผลิตปานกลาง ต้านทานต่อโรคราแป้งบนผล แต่อาจอ่อนแอต่อโรคราแป้งบนใบ

ตารางที่ 4 จำนวนช่อที่ผสมติดจากองุ่น 9 คู่ผสม

พันธุ์พ่อ / พันธุ์แม่	NY 88.0517.01	NY 65.0550.04	NY 65.0551.05
Black Queen	5	5	5
Carolina Black Rose	5	5	4
Italia	2	3	2



ภาพที่ 9 ช่อองุ่นทั้ง 9 คู่ผสม ประกอบด้วย

A) Black Queen × NY 88.0517.01; B) Black Queen × NY 65.0550.04

C) Black Queen × NY 65.0551.05; D) Carolina Black Rose × NY 88.0517.01

E) Carolina Black Rose × NY 65.0550.04; F) Carolina Black Rose × NY 65.0551.05

G) Italia × NY 88.0517.01; H) Italia × NY 65.0550.04; I) Italia × NY 65.0551.05

การประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้าง

วิเคราะห์วาเรียนซ์และ mean square จากข้อมูลพันธุ์พ่อแม่และลูกผสม F_1 (ตารางที่ 5) พบว่าค่าเฉลี่ยการเกิดโรคระหว่างจีโนไทป์องุ่นทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อพิจารณาระหว่างองุ่นลูกผสม F_1 กับพันธุ์พ่อแม่ พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) แสดงว่าลูกผสมบางต้นมีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างสูงกว่าพันธุ์พ่อแม่ และเมื่อพิจารณาระหว่างจีโนไทป์ในกลุ่มพันธุ์พ่อแม่และระหว่างจีโนไทป์ในกลุ่มลูกผสม F_1 พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) ซึ่งบ่งชี้ว่าในแต่ละกลุ่มประชากรมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง

ตารางที่ 5 ค่า mean square จากการวิเคราะห์วาเรียนซ์ของการเกิดโรคราน้ำค้าง

Sources	**df**	**SS**	**MS**	**F (test)**
Treatments	14	13.90	0.99	6.21 **
Parents vs hybrids	1	1.21	1.21	7.56 **
Parents	5	7.24	1.45	9.05 **
Hybrids	8	5.45	0.68	4.26 **
Error	102	16.28	0.16	
Total	116	30.18		
CV (%)	21.06%			

** $p < 0.01$

ระหว่างพันธุ์แม่ พบว่า Black Queen เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอมากที่สุด จำนวนของสปอร์ราน้ำค้างในองุ่นพันธุ์ Black Queen สูงถึง 178.5 สปอร์/พื้นที่ใบ 25 ตร.ซม. (ระดับคะแนน 4.15) ขณะที่จำนวนสปอร์สูงสุดที่พบในองุ่นพันธุ์ Carolina Black Rose (ระดับคะแนน 3.64) และ Italia (ระดับคะแนน 3.87) คิดเป็น 86.3 และ 90.0 สปอร์/พื้นที่ใบ 25 ตร.ซม. ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ซึ่งการประเมินโรคราน้ำค้างด้วยวิธีตัดใบมาวิเคราะห์ (detached leaf) ให้ผลสัมพันธ์กับในสภาพไร่ โดยพบว่าองุ่นพันธุ์ Black Queen อ่อนแอมากที่สุด (ไม่แสดงผลการทดลอง) ในทำนองเดียวกัน Brown et al. (1999a) ประเมินโรคราน้ำค้างด้วยวิธีตัดใบมาวิเคราะห์ ประเมินในสภาพโรงเรือน และในสภาพไร่พบว่ามีความสัมพันธ์กันสูง นอกจากนี้ Eibach et al. (1989) รายงานว่าการประเมินโรคโดยวิธีตัดใบมาวิเคราะห์ และวิธีประเมินในสภาพไร่มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.98$) ซึ่งการประเมินโรคโดยใช้วิธีตัดใบมาวิเคราะห์นี้เหมาะสมกับการประเมินโรคราน้ำค้างในลูกผสมจำนวนมาก (Brown et al., 1999b)

ระหว่างพันธุ์พ่อ พบว่าองุ่นสายพันธุ์ NY 88.0517.01 (ระดับคะแนน 0.48) และ NY 65.0551.05 (ระดับคะแนน 0.46) แสดงความต้านทานโรคราน้ำค้างสูงกว่าองุ่นสายพันธุ์ NY 65.0550.04 (ระดับคะแนน 0.96) (ตารางที่ 6) ซึ่งคู่ผสมเดี่ยวระหว่าง NY 65.0550.04 และ Carolina Black Rose แสดงคะแนนความต้านทานโรคราน้ำค้างสูงที่สุด แม้ว่า NY 65.0550.04 ไม่แสดงความต้านทานสูง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสมรรถนะของการรวมตัวจำเพาะ

องุ่นลูกผสม F_1 ของคู่ผสมระหว่างพันธุ์ต้านทานกับพันธุ์อ่อนแอ แสดงระดับความต้านทานจากต้านทานมาก (ระดับคะแนน = 0) จนถึงอ่อนแอมาก (ระดับคะแนน = 5) ซึ่งระดับความต้านทานโรคราน้ำค้างของลูกผสม F_1 สามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม คือ ต้านทาน (ระดับคะแนน = 0 และ 1); ปานกลาง (ระดับคะแนน = 2 และ 3) และอ่อนแอ (ระดับคะแนน = 4 และ 5) พบว่าองุ่นลูกผสม F_1 ส่วนใหญ่อ่อนแอ (52.9%) พบลูกผสมที่ต้านทาน 28.2% และปานกลาง 18.8% (ตารางที่ 7)

คู่ผสม Black Queen × NY 65.0550.04, Black Queen × NY 65.0551.05, Carolina Black Rose × NY 65.0551.05, Italia × NY 88.0517.01, Italia × NY 65.0550.04 และ Italia × NY 65.0551.05 ให้จำนวนต้นที่ต้านทานต่ำ 5.3-33.3 % และพบจำนวนต้นอย่างน้อยครึ่งหนึ่งจากคู่ผสมทั้งหมด แสดงความอ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง แสดงว่ายีนควบคุมความต้านทานโรคราน้ำค้างในองุ่นพันธุ์พ่อแม่อยู่ในสภาพพันธุ์ทาง นอกจากนี้ รูปแบบการกระจายตัวของยีนบ่งชี้ว่ามียีนอย่างน้อย 2 ยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคราน้ำค้างในประชากรนี้ ซึ่งการศึกษาในอนาคตจำเป็นต้องศึกษาในประชากรที่ใหญ่ เพื่อประเมินจำนวนยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคราน้ำค้างได้อย่างถูกต้อง

คู่ผสมระหว่างองุ่นสายพันธุ์ NY 65.0551.05 กับ Black Queen หรือ Carolina Black Rose ให้จำนวนต้นที่ต้านทานต่ำ 5.3% และ 7.7% ตามลำดับ และให้จำนวนต้นที่อ่อนแอสูงที่สุด 79.0% และ 84.6 % ตามลำดับ ในทางตรงกันข้าม คู่ผสม Carolina Black Rose × NY 65.0550.04 ให้จำนวนต้นที่ต้านทานมากที่สุด (75.0%) และจำนวนต้นที่อ่อนแอน้อยที่สุด (12.5%) แสดงให้เห็นว่าคู่ผสม Carolina Black Rose × NY 65.0550.04 เป็นคู่ผสมที่ดีที่สุดสำหรับใช้ผลิตลูกผสมที่มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในโครงการปรับปรุงพันธุ์องุ่น

ตารางที่ 6 การประเมินโรคราน้ำค้างของพันธุ์พ่อแม่โดยวิธีตัดใบมาวิเคราะห์

จีโนไทป์	โรคราน้ำค้าง (ระดับคะแนน)[a]	ฟีโนไทป์
Black Queen	4.15	อ่อนแอมาก
Carolina Black Rose	3.64	อ่อนแอ
Italia	3.87	อ่อนแอ
NY 88.0517.01	0.48	ต้านทานมาก
NY 65.0550.04	0.96	ต้านทาน
NY 65.0551.05	0.46	ต้านทานมาก

[a] ระดับคะแนน: 0 = 0-5 สปอร์/พื้นที่ใบ 25 ตร.ซม.; 1 = > 5-10 สปอร์/พื้นที่ 25 ตร.ซม.; 2 = >10-15 สปอร์/พื้นที่ใบ 25 ตร .ซม.; 3 = >15-25 สปอร์/พื้นที่ใบ 25 ตร.ซม.; 4 = >25-40 สปอร์/พื้นที่ใบ 25 ตร.ซม.; 5 = >40 สปอร์/พื้นที่ใบ 25 ตร.ซม.

ตารางที่ 7 ระดับคะแนนความต้านทานโรคราน้ำค้างของลูกผสม F_1 จาก 9 คู่ผสม

คู่ผสม	การประเมินโรค (จำนวนต้น (เปอร์เซ็นต์))[a]		
	ต้านทาน (คะแนน = 0,1)	ปานกลาง (คะแนน = 2,3)	อ่อนแอ (คะแนน = 4,5)
Black Queen × NY 88.0517.01	4 (28.6%)	5 (35.7%)	5 (35.7%)
Black Queen × NY 65.0550.04	1 (16.7%)	2 (33.3%)	3 (50.0%)
Black Queen × NY 65.0551.05	1 (5.3%)	3 (15.8%)	15 (78.9%)
Carolina Black Rose × NY 88.0517.01	4 (40.0%)	-	6 (60.0%)
Carolina Black Rose × NY 65.0550.04	6 (75.0%)	1 (12.5%)	1 (12.5%)
Carolina Black Rose × NY 65.0551.05	1 (7.7%)	1 (7.7%)	11 (84.6%)
Italia × NY 88.0517.01	1 (25.0%)	3 (75.0%)	-
Italia × NY 65.0550.04	2 (28.6%)	1 (14.3%)	4 (57.1%)
Italia × NY 65.0551.05	1 (25.0%)	1 (25.0%)	2 (50.0%)
รวม	21 (28.2%)	17 (18.8%)	47 (52.9%)

[a] ระดับคะแนน: 0 = 0-5 สปอร์/พื้นที่ใบ 25 ตร.ซม.; 1 = > 5-10 สปอร์/พื้นที่ 25 ตร.ซม.; 2 = >10-15 สปอร์/พื้นที่ใบ 25 ตร .ซม.; 3 = >15-25 สปอร์/พื้นที่ใบ 25 ตร.ซม.; 4 = >25-40 สปอร์/พื้นที่ใบ 25 ตร.ซม.; 5 = >40 สปอร์/พื้นที่ใบ 25 ตร.ซม.

การวิเคราะห์สมรรถนะการรวมตัว

การวิเคราะห์สมรรถนะการรวมตัวโดยพิจารณาจากค่า mean square เพื่อประเมินสมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (gca) และสมรรถนะการรวมตัวจำเพาะ (sca) พบว่า องุ่นลูกผสมแต่ละคู่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$; ตารางที่ 8) โดยค่า mean square ของ gca พันธุ์พ่อกว้างกว่าพันธุ์แม่ บ่งชี้ว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์พ่อสูง ดังนั้นจึงคาดว่าพันธุ์พ่อเป็นจีโนไทป์ที่มียีนต้านทานโรคราน้ำค้างอยู่ ในขณะที่พันธุ์แม่เป็นพันธุ์ที่มียีนอ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง และพบว่า วาเรียนซ์ของ gca ของพันธุ์พ่อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) ส่วนวาเรียนซ์ของ gca ของพันธุ์แม่ไม่แตกต่างกัน และปฏิกิริยาระหว่างพันธุ์พ่อและแม่ซึ่งประเมินโดยวาเรียนซ์ของ sca พบว่า ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) บ่งชี้ว่าผลของยีนแบบบวกสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์องุ่นให้ต้านทานโรคราน้ำค้างในประชากรนี้

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า mean square ของ gca และ sca คือ 13.6:1, 4.3:1 และ 0.3:1 สำหรับ gca (male): gca(female), gca (male): sca และ gca (female): sca ตามลำดับ ชี้ให้เห็นว่าพันธุ์พ่อที่ใช้ในการทดลองให้ผลของยีนแบบบวกสูงกว่าพันธุ์แม่ อัตราพันธุกรรมอย่างแคบสำหรับความต้านทานโรคราน้ำค้างในประชากรนี้ มีค่า 55.6% ซึ่งเป็นผลมาจากยีนแบบบวกมากกว่ายีนที่ไม่เป็นแบบบวก อย่างไรก็ตามพบว่าผลของยีนที่ไม่เป็นแบบบวกและอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมมีค่าค่อนข้างสูงในการทดลองนี้ ซึ่งแตกต่างจากค่าอัตราพันธุกรรมอย่างแคบสำหรับความต้านทานโรคราน้ำค้างที่รายงานโดย Brown et al. (1999b) (88.0%) ทั้งนี้อาจเนื่องจากพันธุ์ต้านทานโรคที่ใช้ศึกษาต่างกัน จึงอาจมียีนต้านทานที่ต่างกัน หรือสภาพแวดล้อมในการทดลองต่างกัน

ตารางที่ 8 ค่า mean square จากการวิเคราะห์วาเรียนซ์สำหรับปฏิกิริยาการเกิดโรคราน้ำค้างในองุ่น

Sources	**df**	**SS**	**MS**	**F (test)**
Hybrids	8	5.45	0.68	3.37 **
gca (female)	2	0.26	0.13	0.64 ns
gca (male)	2	3.53	1.77	8.74 **
sca	4	1.66	0.42	2.05 ns
Error	76	15.36	0.20	
Total	84	20.81		
CV (%)		18.09		

ns = $p > 0.05$; ** $p < 0.01$

ค่า mean square ของ gca ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เกิดจากผลของ gca และ sca ที่คำนวณจากค่าเฉลี่ยของปฏิกิริยาการเกิดโรคในพันธุ์พ่อแม่แต่ละพันธุ์ แสดงในตารางที่ 9 และ 10 ระดับคะแนนการเกิดโรคราน้ำค้าง เท่ากับ 0 แสดงว่าต้านทานมาก และ 5 แสดงว่าอ่อนแอมาก ดังนั้น ค่าติดลบของ gca และ sca คือ ความต้านทาน ส่วนค่าบวก คือ อ่อนแอ พบว่าองุ่นสายพันธุ์ NY 65.0551.05 แสดงค่า gca เป็นบวกจึงไม่ควรเลือกใช้ ส่วนองุ่นสายพันธุ์ NY 88.0517.01 และ NY 65.0550.04 มีค่า gca ติดลบ (-0.46 และ -0.37 ตามลำดับ) แสดงว่าจีโนไทป์เหล่านี้อาจเป็นพันธุ์พ่อแม่ที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์องุ่นให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง ในทางตรงกันข้าม ผลของ gca ในองุ่นพันธุ์แม่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และพบว่าองุ่นพันธุ์ Black Queen มีความอ่อนแอต่อโรคราน้ำค้างมากที่สุดโดยแสดงค่า gca เป็นบวก ขณะที่องุ่นพันธุ์ Carolina Black Rose และ Italia แสดงค่า gca เป็นลบ ดังนั้นองุ่นพันธุ์ Black Queen ไม่ควรใช้ในการผสมข้าม (ตารางที่ 10)

ผลการวิเคราะห์ sca พบว่า 2 คู่ผสมจากทั้งหมด 9 คู่ผสม แสดงค่า sca เป็นลบ ได้แก่ Carolina Black Rose × NY 65.0550.04 (-1.14; $p < 0.01$) และ Italia × NY 65.0551.05 (-0.73; $p < 0.01$) (ตารางที่ 10) ทั้งสองคู่ผสมนี้ให้ลูกผสม F_1 ที่มีระดับความต้านทานโรคราน้ำค้างสูง ควรเลือกเป็นคู่ผสมที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์องุ่นให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในอนาคต อย่างไรก็ตาม คู่ผสมของ Italia ให้เปอร์เซ็นต์การผสมติด และเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดต่ำ การรอดชีวิตของต้นกล้าต่ำ และเจริญเติบโตทางลำต้นช้า ดังนั้นจึงไม่แนะนำคู่ผสม Italia × NY 65.0551.05 สำหรับโครงการปรับปรุงพันธุ์องุ่นให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในอนาคต ในทางตรงกันข้าม องุ่นพันธุ์ Carolina Black Rose เป็นพันธุ์แม่ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด เนื่องจากลูกผสมของพันธุ์นี้มีเปอร์เซ็นต์การผสมติด การงอกของเมล็ด การรอดชีวิตของต้นกล้าค่อนข้างสูง และเจริญเติบโตทางลำต้นได้ดี ดังนั้นจึงแนะนำว่าคู่ผสม Carolina Black Rose × NY 65.0550.04 เหมาะสมที่สุดในการพัฒนาพันธุ์/สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง และมีคุณภาพของผลสูง

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยของปฏิกิริยาการเกิดโรค

พันธุ์พ่อ	พันธุ์แม่			ค่าเฉลี่ย
	Black Queen	Carolina Black Rose	Italia	
NY88.0517.01	2.51	2.96	2.05	2.51
NY65.0550.04	2.95	1.35	3.51	2.60
NY65.0551.05	4.23	4.26	2.95	3.81
ค่าเฉลี่ย	3.23	2.86	2.84	2.97

[a] ระดับคะแนน: 0 = 0-5 สปอร์/พื้นที่ใบ 25 ตร.ซม.; 1 = > 5-10 สปอร์/พื้นที่ 25 ตร.ซม.; 2 = >10-15 สปอร์/พื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.; 3 = >15-25 สปอร์/พื้นที่ใบ 25 ตร.ซม.; 4 = >25-40 สปอร์/พื้นที่ใบ 25 ตร.ซม.; 5 = >40 สปอร์/พื้นที่ใบ 25 ตร.ซม.

ตารางที่ 10 ผลของการประเมินสมรรถนะการรวมตัวทั่วไปและการรวมตัวจำเพาะ

	sca			**gca (male)**
	Black Queen	**Carolina Black Rose**	**Italia**	
NY88.0517.01	-0.26	0.56	-0.33	-0.46 *
NY65.0550.04	0.09	-1.14 **	1.04	-0.37 *
NY65.0551.05	0.16	0.56	-0.73 **	0.84
gca (female)	0.26	-0.11	-0.13	

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

การปรับปรุงพันธุ์องุ่นโดยวิธีดั้งเดิม

นอกจากลูกผสมจากคู่ผสมที่ใช้ในการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะ 9 คู่ผสมที่กล่าวมาแล้ว ยังทำการผสมเพิ่มอีก 4 คู่ผสม ได้แก่ Carolina Black Rose x Wilcox 321, Black Queen x Wilcox, Early Muscat x NY65.0551.05 และ Early Muscat x NY88.0517.01 ได้ลูกผสมรวม 101 ต้น จาก 12 คู่ผสม ในจำนวนนี้เป็นลูกผสมที่มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในระดับต้านทานมากจำนวน 13 ต้น (ตารางที่ 11) อย่างไรก็ตาม การประเมินโรคราน้ำค้างด้วยวิธีตัดใบมาวิเคราะห์อาจให้ผลต่างจากในสภาพไร่ จึงทำการติดตา หรือตอนกิ่งลูกผสมเหล่านี้ แล้วนำออกปลูกในสภาพไร่ เพื่อประเมินโรคราน้ำค้างและโรคอื่น ๆ ในสภาพไร่เป็นเวลาหลายปี และประเมินการเจริญเติบโต คุณภาพผล และผลผลิตในโครงการปรับปรุงพันธุ์ระยะที่สองต่อไป

ตารางที่ 11 ระดับความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในองุ่นลูกผสมโดยการให้คะแนนจำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.

คู่ผสม	ลูกผสม	คะแนนจำนวนสปอร์	ระดับความต้านทานโรค
	SUT0401.06	4.67[1/]	อ่อนแอมาก
	SUT0401.07	5.00	อ่อนแอมาก
	SUT0401.08	3.67	อ่อนแอ
	SUT0401.09	4.75	อ่อนแอมาก
	SUT0401.13	1.50	ต้านทาน
	SUT0401.15	2.00	ต้านทานปานกลาง
Black Queen x	SUT0401.19	2.75	ต้านทานปานกลาง
NY88.0517.01	SUT0401.20	0.67	ต้านทาน
	SUT0401.24	0.00	ต้านทานมาก
	SUT0401.27	1.75	ต้านทานปานกลาง
	SUT0401.29	2.33	ต้านทานปานกลาง
	SUT0401.30	4.67	อ่อนแอมาก
	SUT0401.32	1.00	ต้านทาน
	SUT0401.33	0.00	ต้านทานมาก
	SUT0402.01	4.67	อ่อนแอมาก
	SUT0402.06	3.67	อ่อนแอ
Black Queen x	SUT0402.08	1.50	ต้านทานปานกลาง
NY65.0550.04	SUT0402.14	3.00	อ่อนแอปานกลาง
	SUT0402.30	4.00	อ่อนแอ
	SUT0402.54	0.75	ต้านทาน
Carolina Black Rose x	SUT0403.03	3.75	อ่อนแอปานกลาง
Wilcox 321	SUT0403.09	0.00	ต้านทานมาก

[1/]คะแนนจำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.

0	= 0 – 5	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	ต้านทานมาก
1	= >5 – 10	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	ต้านทาน
2	= >10 – 15	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	ต้านทานปานกลาง
3	= >15 – 25	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	อ่อนแอปานกลาง
4	= >25 – 40	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	อ่อนแอ
5	= >40	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	อ่อนแอมาก

ตารางที่ 11 ระดับความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในองุ่นลูกผสมโดยการให้คะแนนจำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม. (ต่อ)

คู่ผสม	ลูกผสม	คะแนนจำนวนสปอร์	ระดับความต้านทานโรค
	SUT0404.02	5.00	อ่อนแอมาก
	SUT0404.03	4.50	อ่อนแอมาก
	SUT0404.08	0.25	ต้านทานมาก
	SUT0404.11	0.00	ต้านทานมาก
Calorina Black Rose x	SUT0404.12	0.50	ต้านทาน
NY88.0517.01	SUT0404.14	5.00	อ่อนแอมาก
	SUT0404.15	5.00	อ่อนแอมาก
	SUT0404.20	4.33	อ่อนแอ
	SUT0404.36	0.00	ต้านทานมาก
	SUT0404.40	5.00	อ่อนแอมาก
	SUT0405.02	1.00	ต้านทาน
	SUT0405.03	0.67	ต้านทาน
	SUT0405.05	4.67	อ่อนแอมาก
Calorina Black Rose x	SUT0405.13	0.50	ต้านทาน
NY65.0550.04	SUT0405.14	1.25	ต้านทาน
	SUT0405.15	2.00	ต้านทานปานกลาง
	SUT0405.17	0.33	ต้านทานมาก
	SUT0405.19	0.33	ต้านทานมาก
	SUT0406.01	4.75	อ่อนแอมาก
	SUT0406.02	5.00	อ่อนแอมาก
	SUT0406.04	4.33	อ่อนแอ
	SUT0406.05	5.00	อ่อนแอมาก
	SUT0406.07	3.00	อ่อนแอปานกลาง
	SUT0406.08	5.00	อ่อนแอมาก
Calorina Black Rose x	SUT0406.09	4.67	อ่อนแอมาก
NY65.0551.05	SUT0406.18	4.50	อ่อนแอมาก
	SUT0406.20	4.25	อ่อนแอ
	SUT0406.21	4.75	อ่อนแอมาก
	SUT0406.22	0.25	ต้านทานมาก
	SUT0406.27	4.67	อ่อนแอ
	SUT0406.29	5.00	อ่อนแอมาก

[1/]คะแนนจำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.

0	= 0 – 5	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	ต้านทานมาก
1	= >5 – 10	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	ต้านทาน
2	= >10 – 15	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	ต้านทานปานกลาง
3	= >15 – 25	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	อ่อนแอปานกลาง
4	= >25 – 40	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	อ่อนแอ
5	= >40	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	อ่อนแอมาก

ตารางที่ 11 ระดับความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในองุ่นลูกผสมโดยการให้คะแนนจำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม. (ต่อ)

คู่ผสม	ลูกผสม	คะแนนจำนวนสปอร์	ระดับความต้านทานโรค
Italia x NY88.0517.01	SUT0407.03	0.67	ต้านทาน
	SUT0407.06	2.33	ต้านทานปานกลาง
	SUT0407.14	2.67	ต้านทานปานกลาง
	SUT0407.17	2.50	ต้านทานปานกลาง
Italia x NY65.0550.04	SUT0408.01	5.00	อ่อนแอมาก
	SUT0408.02	5.00	อ่อนแอมาก
	SUT0408.06	4.75	อ่อนแอมาก
	SUT0408.10	5.00	อ่อนแอมาก
	SUT0408.12	0.75	ต้านทาน
	SUT0408.15	1.25	ต้านทาน
	SUT0408.18	2.67	ต้านทานปานกลาง
Italia x NY65.0551.05	SUT0409.03	0.67	ต้านทาน
	SUT0409.04	4.50	อ่อนแอมาก
	SUT0409.06	4.25	อ่อนแอ
	SUT0409.21	2.25	ต้านทานปานกลาง
Black Queen x NY65.0550.04	SUT0410.01	4.67	อ่อนแอมาก
	SUT0410.06	3.67	อ่อนแอ
	SUT0410.08	1.50	ต้านทานปานกลาง
	SUT0410.14	3.00	อ่อนแอปานกลาง
	SUT0410.30	4.00	อ่อนแอ
	SUT0410.54	0.75	ต้านทาน
Black Queen x Wilcox	SUT0411.01	5.00	อ่อนแอมาก
	SUT0411.04	4.50	อ่อนแอมาก
	SUT0411.06	4.67	อ่อนแอมาก
	SUT0411.07	4.75	อ่อนแอมาก
	SUT0411.12	4.50	อ่อนแอมาก
	SUT0411.20	4.67	อ่อนแอมาก
	SUT0411.22	4.67	อ่อนแอมาก
	SUT0411.27	0.00	ต้านทานมาก
	SUT0411.31	5.00	อ่อนแอมาก
	SUT0411.35	1.50	ต้านทาน

[1/] คะแนนจำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.

0	= 0 – 5	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	ต้านทานมาก
1	= >5 – 10	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	ต้านทาน
2	= >10 – 15	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	ต้านทานปานกลาง
3	= >15 – 25	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	อ่อนแอปานกลาง
4	= >25 – 40	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	อ่อนแอ
5	= >40	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	อ่อนแอมาก

ตารางที่ 11 ระดับความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในองุ่นลูกผสมโดยการให้คะแนนจำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม. (ต่อ)

คู่ผสม	ลูกผสม	คะแนนจำนวนสปอร์	ระดับความต้านทานโรค
Black Queen x Wilcox	SUT0411.37	3.75	อ่อนแอปานกลาง
	SUT0411.39	5.00	อ่อนแอมาก
	SUT0411.43	4.50	อ่อนแอ
	SUT0411.45	3.00	อ่อนแอปานกลาง
	SUT0411.46	5.00	อ่อนแอมาก
	SUT0411.50	5.00	อ่อนแอมาก
	SUT0411.52	5.00	อ่อนแอมาก
	SUT0411.56	2.67	ต้านทานปานกลาง
	SUT0411.57	3.33	อ่อนแอปานกลาง
Early Muscat x NY65.0551.05	SUT0412.01	2.67	ต้านทานปานกลาง
	SUT0412.05	0.00	ต้านทานมาก
	SUT0412.09	4.25	อ่อนแอ
	SUT0412.15	4.33	อ่อนแอ
	SUT0412.16	0.25	ต้านทานมาก
	SUT0412.17	0.75	ต้านทานมาก
	SUT0412.18	5.00	อ่อนแอมาก
Early Muscat x NY88.0517.01	SUT0413.18	5.00	อ่อนแอมาก

[1/]คะแนนจำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.

0	= 0 – 5	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	ต้านทานมาก
1	= >5 – 10	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	ต้านทาน
2	= >10 – 15	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	ต้านทานปานกลาง
3	= >15 – 25	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	อ่อนแอปานกลาง
4	= >25 – 40	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	อ่อนแอ
5	= >40	สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.	อ่อนแอมาก

บทที่ 5
บทสรุป

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ราน้ำค้างอาจทำให้ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตองุ่นเสียหายโดยเฉพาะในองุ่นพันธุ์อ่อนแอ (*V. vinifera*) ซึ่งปลูกอย่างแพร่หลายในประเทศไทยเนื่องจากคุณภาพและผลผลิตสูง การปรับปรุงพันธุ์องุ่นให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างอาจทำได้โดยการถ่ายทอดยีนต้านทานโรคจากองุ่นพันธุ์ป่าสปีชีส์ต่าง ๆ ที่มีแหล่งกำเนิดในอเมริกาหรือเอเชียโดยการผสมพันธุ์ ซึ่งอาจต้องใช้เวลานาน ดังนั้นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์ได้ เครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนามาจากยีนต้านทานโรค หรือยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายยีนต้านทาน (resistance gene analogs; RGAs) มีโอกาสสูงที่จะอยู่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรคชนิดต่าง ๆ และมีศักยภาพสูงในการนำมาใช้คัดเลือกพันธุ์ งานวิจัยนี้ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณอนุรักษ์ของยีนต้านทานโรคเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก 1) พันธุ์ป่าที่ต้านทานโรคราน้ำค้าง *V. cinerea* 2) ลูกผสมที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างและสแคบ ที่พัฒนาขึ้น ณ มหาวิทยาลัย Cornell, USA จากการผสมระหว่าง *V. vinifera* และองุ่นพันธุ์ป่าหลายสปีชีส์ *V.* hybrid NY88.0507.01 3) พันธุ์อ่อนแอต่อโรคทุกชนิด *V. vinifera* Black Queen พบว่าได้โคลน RGAs ที่มี conserved P-loop, RNBS-A, Kinase-2, RNBS-B, RNBS-C และ/หรือ GLPL motifs ซึ่งเป็นลักษณะบ่งบอกของโปรตีน RGAs จากองุ่นทั้งสามจีโนไทป์รวม 139 โคลน (48 โคลนจาก *V. cinerea* B9, 42 โคลนจาก *V.* hybrid NY88.0507.01 และ 49 โคลนจาก *V. vinifera* Black Queen) นำมาจัดกลุ่มโดยอาศัยความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ 22 กลุ่ม ตัวแทนจากแต่ละกลุ่มมีความคล้ายคลึงต่ำถึงสูง เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NBS-LRR โปรตีนที่คาดว่าจะเป็นโปรตีนต้านทาน หรือ เอนไซม์ P-loop NTPase จากองุ่นในตระกูล *Vitis* สปีชีส์ต่าง ๆ นอกจากนี้ ยังพบว่าโคลนเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนต้านทานในพืชหลากหลายชนิด อาทิเช่น แอป-เปิ้ล (*Malus*) กุหลาบ (*Rosa*) ทานตะวัน (*Hellianthus*) ไม้สกุล หยาง (*Populus*) ถั่ว chickpea (*Cicer*) ละหุ่ง (*Ricinus*) และ โกโก้ (*Theobroma*) ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ค้นพบโคลนใหม่จำนวน 3 โคลน คือ rgVhybNY507_22, rgVhybNY507_23 และ rgVhybNY 507_90 ซึ่งมีลำดับนิวคลี-โอไทด์และกรดอะมิโนแตกต่างจาก RGAs ที่มีรายงานใน GenBank

โปรตีนตัวแทนที่โคลนจากองุ่น 22 โคลนแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่หนึ่งประกอบด้วย โปรตีนตัวแทนจำนวน 13 โคลน จัดกลุ่มร่วมกับโปรตีน NBS-LRR ซึ่งทราบแน่ชัดว่าเป็นชนิด TIR กลุ่มที่สอง ประกอบด้วยโปรตีนตัวแทนที่โคลนจากองุ่นที่เหลืออีก 9 โคลน จัด

กลุ่มร่วมกับโปรตีนที่ทราบแน่ชัดว่าเป็นโปรตีนต้านทาน NBS-LRR ชนิด non-TIR การกระจายตัวของโปรตีน RGA ตัวแทนที่โคลนได้จากองุ่นพันธุ์ป่า องุ่นลูกผสมสายพันธุ์ต้านทานโรค และพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคทั่วทั้งแผนภาพ phylogram ชี้ให้เห็นว่า โปรตีนเหล่านี้อาจจะเป็นโปรตีนที่คล้ายกัน (paralogues) หรืออาจจะเป็นคู่ของอัลลีลที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่ทำงานได้/ทำงานไม่ได้ซึ่งเกิดจากความผันแปรของยีน ในทางตรงกันข้าม โปรตีนเหล่านี้อาจไม่เกี่ยวข้องหรือไม่ได้เป็นโปรตีนต้านทานโรคราน้ำค้างและสแคบแต่อย่างใด หรืออาจเป็นไปได้ว่า บางโปรตีนในกลุ่มนี้ไม่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค แต่อาจจะเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่อื่น

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับคัดเลือกยีนต้านทานโรคราน้ำค้าง พบเครื่องหมาย rgVamu085 ซึ่งให้ความหลากหลายระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ มีสหสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับความต้านทานโรคราน้ำค้าง อาจอยู่ใน linkage group เดียวกับอัลลีลต้านทาน แต่ไม่ได้อยู่ใกล้ชิดมาก เครื่องหมายดังกล่าวอาจเป็นประโยชน์ในการกำหนดตำแหน่งยีนต้านทานในแผนที่ยีนเมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มขึ้นในอนาคต ควรมีการพัฒนาเครื่องหมาย RGA-STS และเครื่องหมายชนิดอื่นเพิ่มเติมเพื่อหาเครื่องหมายที่ link กับยีนต้านทานโรคราน้ำค้างอย่างใกล้ชิด และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ได้

การวิเคราะห์สมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (gca) และสมรรถนะการรวมตัวจำเพาะ (sca) บ่งชี้ว่าผลของยีนแบบบวกสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์องุ่นให้ต้านทานโรคราน้ำค้างในประชากรนี้ พันธุ์พ่อที่ใช้ในการทดลองให้ผลของยีนแบบบวกสูงกว่าพันธุ์แม่ อัตราพันธุกรรมอย่างแคบสำหรับความต้านทานโรคราน้ำค้างมีค่า 55.6% ซึ่งเป็นผลมาจากยีนแบบบวกมากกว่ายีนที่ไม่เป็นแบบบวก อย่างไรก็ตามพบว่าผลของยีนที่ไม่เป็นแบบบวกและอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมมีค่าค่อนข้างสูง

องุ่นพันธุ์ Carolina Black Rose เป็นพันธุ์แม่ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด เนื่องจากลูกผสมของพันธุ์นี้มีเปอร์เซ็นต์การผสมติด การงอกของเมล็ด การรอดชีวิตของต้นกล้าค่อนข้างสูง เจริญเติบโตทางลำต้นได้ดี และให้สัดส่วนลูกผสมที่ต้านทานโรคราน้ำค้างสูงกว่าพันธุ์แม่อื่น และคู่ผสมระหว่าง Carolina Black Rose × NY 65.0550.04 เหมาะสมที่สุดในการพัฒนาพันธุ์/สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง และมีคุณภาพของผลสูง

จากองุ่นลูกผสมระหว่างสายพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอจำนวน 13 คู่ผสม พบว่าได้ลูกผสมที่มีระดับความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างมากจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีตัดใบจำนวน 13 ลูกผสม นำลูกผสมที่มีความต้านทานโรคราน้ำค้างในระดับต่าง ๆ รวมทั้งพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่มาติดตาบนต้นตอ หรือตอนกิ่ง แล้วนำออกปลูกทดสอบในสภาพไร่ เพื่อประเมินความต้านทานในสภาพไร่ การเจริญเติบโตทางลำต้น คุณภาพผล และผลผลิตในโครงการปรับปรุงพันธุ์ระยะที่สองต่อไป

บรรณานุกรม

กองแผนงาน กรมส่งเสริมการเกษตร. (2542). การถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตองุ่นพันธุ์ดีเพื่อการค้า [ออนไลน์]. ได้มาจาก: http://pirun.ku.ac.th/~rdgkpt/grape-news-trainning46.html

กิตติพงศ์ ตรีตรุยานนท์. (2544). การตัดแต่งกิ่งองุ่น. ภูมิปัญญาชาวบ้าน. วารสาร ส.ก.ว. ปีที่ 8. ฉบับที่ 1. หน้า 35.

นันทกร บุญเกิด. (2543). คู่มือการปลูกองุ่น. ประวัติและโรคองุ่น. เทคโนธานี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. หน้า 8.

นิพนธ์ วิสารทานนท์. (2542). โรคไม้ผลเขตกึ่งร้อน. เจ ฟิล์มโปรเซส. หน้า 144.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2553). สถิติส่งออก-นำเข้าสินค้าที่สำคัญของไทย) ออนไลน์ .(ได้มาจาก: http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/ import_result.php

Aarts, M.G.M., te Lintel Hekkert, B., Holub, E.B., Beynon, J.L., Stiekema, W.J. and Pereira, A. (1998). Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Plant-Microbe Interact. 11: 251-258.

Agrios, G.N. (1997). Plant Pathology. New York. Academic Press Limited. pp. 315-320.

Ash, G. (2000). Downy mildew of grape (Online). Available URL: http://www.aspnet.org/education/LessonsPlantPath/grapdowny/top.htm.

Babadoost, M. (2001). Downy Mildew of Grape (Online). Available URL: http://ipm.illinois.edu/diseases/series700/rpd705/index.html.

Baker, B., Zambryski, P., Stazkawicz, B. and Dinesh-Kumar, S.P. (1997). Signaling in plant-microbe interactions. Science 276: 726-733.

Bordelon, B. (2009). Pest control in grapes (Online). Available URL: http://www.btny.purdue.edu/Pubs/PPP/PPP-102.pdf.

Boubals, D. (1998). Grapevine genetics and breeding facing the challenges of the 3rd millennium. Proceeding of the 7th international symposium on grapevine genetic and breeding. Montpellier, France. pp. 25-27.

Brown, M.V., Moore, J.N. and McNew, R.W. (1999b). Comparison of leaf disk, greenhouse, and field screening procedures for evaluation of grape seedling for downy mildew resistance. Hort. Sci. 34: 331-333.

Brown, M.V., Moore, J.N., McNew, R.W. and Fenn, P. (1999a). Inheritance of downy mildew resistance in table grapes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 124: 262-267.

Century, K.S., Shapiro, A.D., Repetti, P.P., Dahlbeck, D., Holub E. and Staskawicz, B.J. (1997). *NDR1*, a pathogen-induced component required for *Arabidopsis* disease resistance. Science 278:1963-1965.

Comstock, R.E. and Robinson, H.F. (1948). The components of genetic variance in populations of biparental progenies and their use in estimating average degree of dominance. Biometrics**.** 4: 254-266.

Comstock, R.E. and Robinson, H.F. (1952). Estimation of average dominance of genes. In G.W. Gowen (ed.). Heterosis. Iowa: Iowa State College.

Dabholkar, A.R. (1992). Elements of Biometrical Genetics. New Delhi: Ashok Kumar Mittal Concept.

Dangl, J.L. and Jones, J.D.G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature 411: 826-833.

Deng, Z., Huang, S., Ling, P., Chen, C., Yu, C., Weber, C.A., Moore, G.A. and Gmitter, J.F. (2000). Cloning and characterization of the NBS-LRR class resistance-gene candidate sequence in citrus. Theor. Appl. Genet. 101: 814-822.

Di Gaspero, G. and Cipriani, G. (2002). Resistance gene analogs are candidate markers for disease-resistance genes in grape (*Vitis* spp.). Theor. Appl. Genet. 106: 163-172.

Di Gaspero, G. and Cipriani, G. (2003). Nucleotide binding site/leucine-rich repeats, Pto-like and receptor-like kinases related to disease resistance in grapevine. Mol. Gen. Genomics 269: 612-623.

Di Gaspero, G., Cipriani, G., Adam-Blondon, A.F. and Testolin, R. (2007). Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420microsatellite markers and 82 markers for R-gene candidates. Theor. Appl. Genet. 114: 1249-1263.

Dieters, M.J., White,T.L. and Hodge, G.R. (1995). Genetic parameters estimates for volume from full-sib tests of slash pine (*Pinus elliottii*). Can. J. For. Res. 25: 1397-1408.

Dixon, M.S., Hatzixanthis, K., Jones, D.A., Harrison, K. and Jones, J.D.G. (1998). The tomato *Cf-5* disease resistance gene and six homologs show pronounced allelic variation in leucine-rich repeat copy number. Plant Cell 10: 1915-1925.

Donald, T.M., Pellerone, F., Adam-Blondon, A.F., Bouquet, A., Thomas, M.R. and Dry, I.B. (2002). Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus ingrapevine. Theor. Appl. Genet. 104: 610-618.

Eibach, R., Diehl, H. and Alleweldt, G. (1989). Untersuchungen zur vererbung von resistenzeigens chaften bei reben gegen *Oidium tuckeri*, *Plasmopara viticola* und *Botrytis cinerea*. Vitis. 28: 209-228. Quoted in B.I. Reisch and C. Pratt. (1996). Fruit Breeding, Volume II: Vine and Small Fruit Crops. New York: John Wiley and Sons.

Ellis, J., Dodds, P. and Pryor, T. (2000). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. Plant Bio. 3: 278-284.

Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.N., Jones, J.D.G., Daniels, M.J. and Parker, J.E. (1999). *EDS1*, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 3292-3297.

Feys, B.J. and Parker, J.E. (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. Trends Genet. 16: 449-455.

Gamble, E.E. (1962). Gene effects in corn (*Zea mays* L.). I. Separation and relative importance of gene effects for yield. Can. J. Plant Sci. 42: 339-348.

Gaspero, G.D. and Cipriani, G. (2002). Resistance gene analogs are candidate markers for disease-resistance genes in grape (*Vitis spp*.). Theor. Appl. Genet. 106: 163-172.

Gedil, M.A., Slabaugh, M.B., Berry, S., Johnson, R., Michelmore, R., Miller, J., Gulya,T. and Knapp, S.J. (2001). Candidate disease resistance genes in sunflower cloned using conserved nucleotide-binding site motifs: genetic mapping and linkage to the downy mildew resistance gene *PI*1. Genome 44: 205-212.

Goff, S.A., Ricke, D. and Lan, T.H. (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). Science 296:92-100.

Griffing, B. (1956). Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. Aust. J. Biol. Sci. 9: 463-493.

Hallauer, A.R. and Miranda, J.B. (1988). Quantitative Genetics in Maize Breeding. Iowa: Iowa State University Ames Press.

Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D. (1997). Plant disease resistance genes. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 48: 575-607.

Hayman, B.I. (1954). The theory and analysis of diallel-cross. Genetics. 39: 789-809.

Hayman, B.I. (1958). The separation of epistatic from additive and dominance variation in generation means. Heredity. 12: 371-390.

Jaillon, O., Aury, J.M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., Vezzi, A., Legeai, F., Hugueney, P., Dasilva, C., Horner, D., Mica, E., Jublot, D., Poulain, J., Bruyère, C., Billault, A., Segurens, B., Gouyvenoux, M., Ugarte, E., Cattonaro, F., Anthouard, V., Vico, V., Del Fabbro, C., Alaux, M., Di Gaspero, G., Dumas, V., Felice, N., Paillard, S., Juman, I., Moroldo, M., Scalabrin, S., Canaguier, A., Le Clainche, I., Malacrida, G., Durand, E., Pesole, G., Laucou, V., Chatelet, P., Merdinoglu, D., Delledonne, M., Pezzotti, M., Lecharny, A., Scarpelli, C., Artiguenave, F., Pè, M.E., Valle, G., Morgante, M., Caboche, M., Adam-Blondon, A.F., Weissenbach, J., Quétier, F. and Wincker, P., (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. Nature 449: 463-467.

Kikkert, J.R., Thomas, M.R. and Reisch, B.I. (2001). Grapevine genetic engineering. Roubelakis-Angelakis, K.A. (ed.) Molecular Biology & Biotechnology of the grapevine. Netherlands.Kluwer Academic Publishers. pp. 393-410.

King, J.N. and Johnson, G.R. (1998). Analysis of disconnected diallel mating design II results from a third generation progeny test of the New Zealand radiata pine improvement programme. Silvae. Genet. 47: 80-87.

Koop, E.B. and Modzihitov, R. (1999). The Toll-receptor family and control of innate immunity. Curr. Opin. Immunol. 11: 13-18.

Lodhi, M.A., Daly, M.J., Ye, G.N., Weeden, N.F. and Reisch, B.I. (1995). A molecular marker based inkage map of Vitis. Genome. 38: 786-794.

Lodhi, M.A., Ye, G., Weeden, N.F. and Reisch, B.I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cutivars, Vitis species and Ampelopsis. Plant Molecular Biology Reporter. 12(1): 6-13.

Lu, J. and Schell, L. (2000). Interspecific hybridization between *Vitis rotundifolig* and *Vitis vinifera* and evaluation of the hybrids. Proceeding of the 7th international symposium on grapevine genetic and breeding. Montpellier, France. pp. 479-486.

Luderer, R. and Joosten, M.H.A.J. (2001). Avirulence proteins of plant pathogens: determinants of victory and defeat. Mol. Plant Pathol. 2: 355-364.

Lupas, A. (1996). Coiled colis: New structures and new functions. Trends Biochem. Sci. 21: 375-382.

Mahanil, S., Reisch, B.I., Owens, C.L., Thipyapong, P. and Laosuwan, P. (2007). Resistance Gene Analogs from *Vitis cinerea*, *Vitis rupestris*, and *Vitis* Hybrid Horizon. Am. J. Enol. Vitic. 58: 484-493.

Meyers, B.C., Dickerman, A.W., Michelmore, R.W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B.W. and Young, N.D. (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. Plant J. 20: 317-332.

Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H. and Michelmore, R.W. (2003). Genome- wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. Plant Cell 15: 809-834.

Michelmore, R. (1996). Flood warning – resistance genes unleashed. Nature Genet. 14: 376-378.

Michelmore, R.W. and Meyers, B.C. (1998). Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. Genome Res. 8: 1113-1130.

Mulugeta, D., Maxwell, B.D., Fay, P.K. and Dyer, W.E. (1994). Kochia (*Kochia scoparia*) pollen dispersion, viability and germination. Weed Sci. 42: 548-522.

Owens, C.L. (2003). SNP detection and genotyping in *Vitis*. Acta. Hort. 603: 139-140.

Pan, Q.L., Wendel, J. and Fluhr, R. (2000). Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. J. Mol. Evol. 50: 203-213.

Parker, J.E., Coleman, M., Szabo, V., Frost, L., Schmidet, R., Biezen, E.V.D., Moores, T., Dean, C. and Jones, J.D.G. (1997). The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene *RPP5* shares similarity to the Toll and Interleukin-1 receptors with *N* and *L6*. Plant Cell 9: 879-894.

Pswarayi, I.Z. (1993). Genetic parameters and selection indices for a population of *Pinus elliottii* Engelm. var *elliottii*. PhD thesis, Linacre College, Oxford University, Oxford.

Qu, S., Liu, G., Zhou, B., Bellizzi, M., Zeng, L., Dai, L., Han, B. and Wang, G. (2006). The broad-spectrum blast resistance gene *Pi9* encodes a nucleotide-binding site-luecine-rich repeat protein and is a member of a multigene family in rice. Genetics 172: 1901-1914.

Reisch, B.I. and Pratt, C. (1996). Fruit Breeding, Volumn II : Vine and small fruits crops. New York: John Wiley and Son, Inc. pp. 297-369.

Richter, T.E. and Ronald, P.C. (2000). The evolution of disease resistance genes. Plant Mol. Biol. 42: 195-204.

Spraque, G.E. and Tatum, L.A. (1942). General vs specific combining ability in single cross of corn. J. Amer. Soc. Agron. 34: 923-932.

Van der Biezen, E.A. and Jones, J.D.G. (1998). Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept. Trends Biochem. Sci. 23: 454-456.

Visarathanonth, N. (1990). A survey of some temperate fruit diseases in Thailand. Third International Workshop on Temperate Zone Fruits in the Tropics and Subtropics. Acta Hort. (ISHS) 279: 609-618

Wikipedia. (2009). Grape (Online). Available URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Grape.

Young, N.D. (2000). The genetic architecture of resistance. Curr. Opin. Plant Biol. 3:285-290.

Yu, Y.G., Buss, G.R. and Maroof, M.A. (1996). Isolation of superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. Proc. atl.Acad. Sci. USA. 93: 11751-11756.

Zhou, T., Wang, Y., Chen, J.Q., Araki, H., Ping, Z., Jiang, K., Shen, J. and Tian, D. (2004). Genome-wide identification of NBS genes in *japonica* rice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS-LRR genes. Mol. Gen. Genomics 271: 402-415.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

Manuscript 1

Scientia Horticulturae, in press

Isolation of resistance gene analogs from grapevine resistant and susceptible to downy mildew and anthracnose

W. Seehalak[a], S. Moonsom[a], P. Metheenukul[b], P. Tantasawat[a,*]

[a] *School of Crop Production Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand*
[b] *Faculty of Veterinary Technology, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand*

* Corresponding author. Tel.: +66 44 223378; fax: +66 44 224281. *E-mail address:* piyada@sut.ac.th (P. Tantasawat).

ABSTRACT

Downy mildew and anthracnose are major diseases of the grapevine (*Vitis* spp.) 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. Ninety-one clones containing putative RGA sequences were obtained from a downy mildew and anthracnose resistance hybrid 'NY88.0507.01' and a susceptible cultivar 'Black Queen'. These cloned sequences were subdivided into 14 groups based on their nucleotide sequence similarity of 90% or greater. BLASTx of fourteen 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 both resistance and susceptible grapevines 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.

Keywords: anthracnose, downy mildew, resistance gene analogs, NBS-LRR, *Vitis* spp.

Abbreviations: CC, coiled-coil; LRR, leucine-rich repeat; NBS, nucleotide-binding site; PCR, polymerase chain reaction; R, resistance; RGA, resistance gene analog; RNBS, resistance nucleotide binding site; TIR, *Drosophila Toll* and mammalian *Interleukin-1 Receptor*

1. Introduction

Grapevine (*Vitis* spp.) is one of the most economically important fruit crops worldwide. However, cultivation of grapevine in tropical regions is still limited due to its high susceptibility to several diseases. In Thailand, downy mildew (caused by *Plasmopara viticola*) and anthracnose (caused by *Sphaceloma ampelinum*) are 2 major diseases. Management of these diseases is mostly based on application of commercial fungicides that is costly and causes an inverse impact on environment.

To achieve sustainable grapevine production, cultivars resistant to multiple diseases are highly desirable, which may be obtained by manipulating disease resistance (R) gene(s) or activating plants own defense systems. Interaction between an R gene product and a pathogen avirulence factor triggers signaling pathways downstream and subsequently activates plant defense (Hammond-Kosack and Jones, 1996). Sequence analysis suggests that the majority of R proteins contain nucleotide-binding site (NBS) and leucine-rich repeat (LRR) domains (Flor, 1971; McHale et al., 2006). At the N-terminus, NBS domain carries conserved and short motifs annotated as P-loop, kinase-2, resistance nucleotide binding site (RNBS) and hydrophobic GLPL (Meyers et al., 1999). Based on the RNBS motif, the NBS-LRR proteins together with human apoptotic protease-activating factor-1/ *Caenorhabditis elegans* homolog CED-4 (NB-ARC) are classified as members of the P-loop NTPase superfamily (Leipe et al., 2004). The LRR domain of NBS-LRR proteins carries either a motif which is homologous to *Drosophila Toll* and mammalian *Interleukin-1 Receptor* (TIR), or a coiled-coil (CC) or a leucine zipper motif (non-TIR; Pan et al., 2000). As implicated by its family, the N-terminal NBS domain is involved in nucleotide binding and signal transduction (Takken et al., 2006), whereas the LRR domain seems to be responsible for pathogen-recognition specificity (Martin et al., 2003). With an ultimate goal to develop new cultivar(s) with strong resistance to disease(s), novel resistance gene analogs (RGAs) have been identified from a broad range of plant species using degenerate primers designed from the conserved motifs within the NBS domain (McDowell and Woffenden, 2003; Soriano et al., 2005; Mahanil et al., 2007). In grape genome, 341 NBS genes (84 CC-NBS-LRR and 37 TIR-NBS-LRR genes) were found (Velasco et al., 2007). RGAs corresponding to functional R genes have been confirmed, and several RGAs were mapped to clusters of or closely linked to functionally known R genes (Donald et al., 2002; Shen et al., 2002; Van der Linden et al., 2004; Welter et al., 2007; Hvarleva et al., 2009).

In this study, we have cloned grapevine RGAs from genomic DNA of a downy mildew and anthracnose resistance hybrid ‘NY88.0507.01’ and a susceptible cultivar ‘Black Queen’. Our results showed that highly homologous and novel RGAs were identified from both resistance and susceptible genotypes. The RGAs could be a source for resistance gene analysis and perhaps for further development of molecular markers for mapping, cloning and selecting of resistance genes to downy mildew and anthracnose.

2. Materials and methods

2.1 Plant materials and genomic DNA extraction

Genomic DNA of a downy mildew and anthracnose resistance *Vitis* hybrid ‘NY88.0507.01’ (a ’66.0795.01’ x ‘MI#2’ cross) and a *V. vinifera* susceptible cultivar ‘Black Queen’ was used as a template for polymerase chain reaction (PCR) amplification of RGAs. The DNA was extracted from

1 g of young leaves using a modified cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method (3% (w/v) CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.1 M Tris HCl, pH 8.0, 2% (w/v) polyvinylpolypyrrolidone and 0.2% (v/v) β-mercaptoethanol). The resultant DNA pellet was dissolved in sterile water and DNA concentrations were determined using spectrophotometry.

2.2 PCR amplification of NBS-LRR genes

Two degenerate oligonucleotide primers, P-loop (5′-GGIGGIGTIGGIAAIACIAC-3′) and GLPLAL-1 (5′-IAGIGCIAGIGGIAGICC-3′), which were modified from Hunger et al. (2003) and designed from the most conserved P-loop and GLPL motifs in the NBS domain of *N*, *RPS2*, *L6* and *N*, *RPS2*, *RPM1* and *L6* resistance genes, were used. A PCR reaction was performed in a total volume of 20 μl (1x buffer, 0.1 mM dNTPs, 2.5 mM $MgCl_2$, 16 pmol of each primer and 1 unit of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)), following cycling condition of an initial denaturation at 95 °C for 4 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 45 sec, 50 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were electrophoresed on 0.8 % agarose gel. The fragments of expected size were excised and gel-purified using QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA).

2.3 Cloning and sequence analysis

The PCR products were cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA) and transformed into competent *Escherichia coli*, following the manufacturer's instructions. Upon selection with the medium spread with 2% (w/v) X-gal and 100 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, plasmids with inserted DNA from single white colonies were analyzed by *Eco*RI digestion to determine the size of inserted DNA fragments. DNA sequencing was performed by Macrogen Inc. (Seoul, Korea). Clones were classified using the Sequencher 4.6 software. Sequence identification of clones was performed against known RGAs and R proteins deposited in GenBank using Nucleotide-Nucleotide Basic local alignment search tool (BLASTn) and translated query vs. protein data base (BLASTx) or protein blast (BLASTp) algorithms (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), respectively. Nucleotide sequences of cloned RGAs were translated into amino acid sequences by translation software (http://www.expasy.ch/doc.html). Cluster analysis (based on ClustalW) and construction of phylogenetic tree (Neighbor-joining method) of representative RGAs were carried out against known sequences of TIR-NBS-LRR proteins (RPS4; NP_199338.1, L6; AAD25968.1 and N; BAD12594.1) and non-TIR-NBS-LRR proteins (RPS2; ABN54584.1 and RPS5; NP_199338.1) using MEGA version 4 (Tamura et al., 2007), respectively. The reliability of the cluster was checked by bootstrap analysis of 1000 replicates.

3. Results and discussion

3.1 Isolation of resistance gene analogs from resistance and susceptible grapevines

Targeted PCR amplification of *Vitis* genomic DNA with P-loop/ GLPLAL-1 primer pair gave a single expected fragment of *ca.* 540 bp (data not shown). Ninety-one complete nucleotide sequences were obtained from 42 clones of the resistance hybrid 'NY88.0507.01' (designated rgVhybNY507) and 49 clones of the susceptible cultivar 'Black Queen' (designated rgVvinBQ). BLASTn showed that 84 of these nucleotide sequences shared a high homology (identity 81-99%) to *Vitis* genomic sequences (supported by E-value closed to 0) or putative RGA/ P-loop NTPase genes previously identified from *V. aestivalis* (rgVhybNY507_11 and 80), *V. amurensis* (rgVhybNY507_28, 32 and rgVvinBQ_47), *V. rupestris* (rgVhybNY507_5, 17, 25, 33, 75, 76, 101 and rgVvinBQ_40, 73, 103, 104) and *V. riparia* (rgVvinBQ_35 and 37) (Di Gaspero and Cipriani, 2002; Di Gaspero and Cipriani, 2003; Jaillon et al., 2007; Mahanil et al., 2007). In addition to the resistance hybrid 'NY88.0507.01' which is expected to have a variety of R genes from its progenitors (*V. rupestris*, *V. cinerea*, *V. labrusca*, *V. riparia* and/or *V. lincecumii*; Reisch, B.I., personal communication), our results showed that putative RGAs were also obtained from the susceptible cultivar. The seven remaining clones had no significant similarity to a GeneBank accession. BLASTx together with BLASTp showed that translated amino acids of 84 sequences belonged to P-loop NTPase superfamily that had moderate to high homology (46-100%) to NBS-LRR proteins, R protein candidates or P-loop NTPases of *V*. spp. and had 45-57% identity to putative R proteins derived from various plant species including *Malus*, *Rosa*, *Helianthus*, *Populus*, *Cicer*, *Ricinus* and *Theobroma* spp. In addition, amino acid sequences translated from the 7-unknown nucleotide sequences shared between 33% and 64% identity (E-value closed to 0) to putative NBS-LRR proteins of *V. vinifera* and putative R proteins from *Malus*, *Rosa*, *Populus*, *Theobroma* and *Arachis* spp. Fifty-nine sequences (33 from 'NY88.0507.01' and 26 from 'Black Queen') exhibited highly conserved p-loop and GLPL motifs. Interestingly, the GLPL and/or p-loop motifs of 32 clones (9 from 'NY88.0507.01' and 23 from 'Black Queen') were modified. Among these, 23 clones (3 from 'NY88.0507.01' and 20 from 'Black Queen') possessed GGGEDD motif similar to protein of *V. vinifera*, and cadherin-like, nuclease/ phosphatase family protein or protein kinase of other organisms. Altogether, the above results suggested that all 91 sequences would perhaps be RGA candidates.

Cluster analysis via MEGA4 software classified 91-RGA sequences into 14 groups using a 90% nucleotide identity threshold value. The number of sequences in each RGA group ranged from 1 to 38, and the amino acid identities for members of a given group ranged between 61% and 100%. Three major groups consisting of 13, 27 and 38 clones from both 'NY88.0507.01' and 'Black Queen', 7 groups consisting of 1-2 'NY88.0507.01' clones, and 4 groups consisting of 1 'Black Queen' clone were found (Table 1). One representative member of each group was selected to perform a homology search against GenBank accessions. These representative clones displayed high diversity in both nucleotide

and amino acid sequences. Their nucleotide sequence similarity ranged from 'no significant similarity was found' to 81- 99% identity to *Vitis* genomic sequences or putative RGA/ P-loop NTPase genes (Table 1). The translated amino acid sequences of the representative clones rgVhybNY507_29, 80, 101, and rgVvinBQ_46 exhibited a close relationship (> 90%) to the putative NBS-LRR proteins, R protein candidates or P-loop NTPases from *V. vinifera*, *V. riparia*, *V. aestavalis*, *V. amurensis*, and shared about 49-57% sequence similarity with the putative R proteins from *Malus prunifolia*, *Populus trichocarpa* and *Helianthus annuus.* In contrast, the clones rgVhybNY507_13, 15, 27, and rgVvinBQ_53, 102 and 106 displayed no or low to moderate degree in their amino acid homology together with sequence coverage with NBS-LRR proteins, R protein candidates or P-loop NTPases from *V.* spp. This phenomenon is possibly due to multiple mutations introduced into their nucleotide sequences. However, some of these RGAs showed moderate sequence similarity with R proteins from other plant species. For example, rgVhybNY507_27 had 48-50% identity with *Arachis hypogaea* and *M. prunifolia*. In addition, three novel *Vitis* clones have been revealed by this study. Firstly, clones rgVNY507_22 and rgVhybNY507_23, which exhibited no nucleotide sequence similarity, shared only 47-61% amino acid similarity with putative NBS-LRR proteins of *V. vinifera* and *V. amurensis*. Moreover, rgVhybNY507_22 also showed 46% identity with NBS-LRR R protein from *Rosa* hybrid. Secondly, although nucleotide sequence of rgVhybNY507_90 was mostly similar to *V. vinifera* genomic sequence, translated amino acid sequence showed only 51-55% identity with putative NBS-LRR proteins of *V. vinifera*, and shared 45-47% identity with NBS-LRR R proteins of *Cicer arietinum* and *Ricinus communis.*

3.2 Comparative and phylogenetic analysis of resistance gene analogs and known resistance proteins

Amino acid alignment of the fourteen *Vitis* representative RGAs together with NBS domain of 5 well-characterized R proteins revealed the presence of conserved P-loop, RNBS-A, kinase-2, RNBS-B, RNBS-C and GLPL motifs which are features of RGAs as well as NB-ARC members (Fig. 1). The alignment showed also an aspartic acid (D) or a tryptophan (W) residue at the end of kinase-2 motif which is a typical characteristic of TIR and non-TIR of the NBS-LRR R proteins, respectively. Based on this criterion, most of the representative *Vitis* RGAs and known R proteins were classified into TIR and non-TIR subclasses. However, rgVhybNY507_22, 27 and rgVvinBQ_106 could be grouped as neither TIR nor non-TIR. A phylogenetic analysis was therefore conducted based upon the amino acid sequences. The resulting tree in Fig. 2 consisted of two major branches: one consisting of 7 *Vitis* RGAs clustered with 3 known TIR-NBS-LRRs (*Arabidopsis* RPS4, flax L6 and tobacco N) and the other consisting of the remaining 7 *Vitis* RGAs clustered with 2 non-TIR-NBS-LRRs (*Arabidopsis* RPS2 and RPS5). The highest similarity was detected between rgVhybNY507_29 and rgVvinBQ_47 (58%) and the lowest between rgVhybNY507_13 and rgVhybNY507_15 (4%), and between rgVhybNY507_27 and rgVvinBQ_106 (4%). Moderate homology was found between four RGAs and known R proteins. The levels of identity of

rgVvinBQ_46 to L6 and N ranged from 41-43%. Similarly, rgVhybNY507_80 had 37-48% identity with L6 and N. In addition, rgVhybNY507_29 and rgVvinBQ_47 showed 47-48% similarity with RBS5. Notably, the unclassified rgVhybNY507_27 and rgVvinBQ_106 were found in the major branch of TIR, whereas the rgVhybNY507_22 was clustered along with non-TIR members, suggesting that these RGAs were likely to be members of TIR and non-TIR, respectively. It should be noted that RGAs from both resistance hybrid and susceptible cultivar were randomly distributed along the phylogram, suggesting that they may be putative paralogues or pairs of functional/non-functional allelic variants. A high level of allelic variation at NBS-LRR genes has previously been observed between susceptible and resistance grapevines (Di Gaspero et al., 2007). Otherwise, these putative RGAs might not be linked to or be candidates of downy mildew and anthracnose resistance genes. It is possible that some of these NBS-related genes evolved to confer other functions than disease resistance *i.e.* other signal transduction pathways as mentioned by Meyers et al. (2003). This study therefore showed evidence that RGAs can be obtained from both resistance and susceptible grapevines. However, their usefulness in the cloning of unknown R genes, mapping and developing markers for marker-assisted selection programs to achieve grapevine genotypes with desirable resistance levels remains to be determined.

Acknowledgements

The authors wish to express their gratitude to Prof. Bruce I. Reisch for providing the downy mildew and anthracnose resistance hybrid 'NY88.0507.01'. This work was financially supported by a grant from Suranaree University of Technology, Thailand. We thank Mr. Peter Bint for proofreading the manuscript.

References

Donald, T.M., Pellerone, F., Adam-Blondon, A.-F., Bouquet, A., Thomas, M.R., Dry, I.B., 2002. Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. Theor. Appl. Genet. 104, 610-618.

Di Gaspero, G., Cipriani, G., 2002. Resistance gene analogs are candidate markers for disease-resistance genes in grape (*Vitis* spp.). Theor. Appl. Genet. 106, 163-172.

Di Gaspero, G., Cipriani, G., 2003. Nucleotide binding site/ leucine-rich repeats, Pto-like and receptor-like kinases related to disease resistance in grapevine. Mol. Gen. Genomics 269, 612-623.

Di Gaspero, G., Cipriani, G., Adam-Blondon, A.-F., Testolin, R., 2007. Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420 microsatellite markers and 82 markers for *R*-gene candidates. Theor. Appl. Genet. 114, 1249-1263.

Flor, H.H., 1971. Current status of the gene-for-gene concept. Annu. Rev. Phytopathol. 9, 275-296.

Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D., 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. Plant Cell 8, 1773-1791.

Hunger, S., Di Gaspero, G., Mohring, S., Bellin, D., Schafer-Pregl, R., Borchardt, D.C., Durel, C.E., Werber, M., Weisshaar, B., Salamini, F., Schneider, K., 2003. Isolation and linkage analysis of expressed disease-resistance gene analogues of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Genome 46, 70-82.

Hvarleva, Tz., Bakalova, A., Rusanov, K., Diakova, G., Ilieva, I., Atanassov, A., Atanassov, I., 2009. Toward marker assisted selection for fungal disease resistance in grapevine. Biotechnol. & Biotechnol. EQ. 23, 1431-1435.

Jaillon, O., et al., 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. Nature 449, 463-467.

Leipe, D.D., Koonin, E.V., Aravind, L., 2004. STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. J. Mol. Biol. 343, 1-28.

Mahanil, S., Reisch, B.I., Owens, C.L., Thipyapong, P., Laosuwan, P., 2007. Resistance Gene Analogs from *Vitis cinerea*, *Vitis rupestris*, and *Vitis* Hybrid Horizon. Am. J. Enol. Vitic. 58, 484-493.

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

McDowell, J.M., Woffenden, B.J., 2003. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. Trends Biotechnol. 21, 178-183.

McHale, L., Tan, X., Koehl, P., Michelmore, R.W., 2006. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. Genome Biol. 7, 212.

Meyers, B.C., Dickerman, A.W., Michelmore, R.W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B.W., Young, N.D., 1999. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. Plant J. 20, 317-332.

Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., Michelmore, R.W., 2003. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. Plant Cell 15, 809-834.

Pan, Q., Wendel, J., Fluhr, R., 2000. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. J. Mol. Evol. 50, 203-213.

Shen, K.A., Chin, D.B., Arroyo-Garcia, R., Ochoa, O.E., Lavelle, D.O., Wroblewski, T., Meyers, B.C., Michelmore, R.W., 2002. Dm3 is one member of a large constitutively expressed family of nucleotide binding site-leucine-rich repeat encoding genes. Mol. Plant Microbe Interact. 15, 251-261.

Soriano, J.M., Vilanova, S., Romero, C., Llacer, G., Badenes, M.L., 2005. Characterization and mapping of NBS-LRR resistance gene analogs in apricot (*Prunus armeniaca* L.). Theor. Appl. Genet. 110, 980-989.

Takken, F.L., Albrecht, M., Tameling, W.I., 2006. Resistance proteins: molecular switches of plant defence. Curr. Opin. Plant Biol. 9, 383-390.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24, 1596-1599.

Van der Linden, C.G., Wouters, D.C.A.E., Mihalka, V., Kochieva, E.Z., Smulders, M.J.M., Vosman, B., 2004. Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. Theor. Appl. Genet. 109, 384-393.

Welter, L.J., Göktürk-Baydar, N., Akkurt, M., Maul, E., Eibach, R., Töpfer, R., Zyprian, E.M., 2007. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Mol. Breeding 20, 359-374.

Figure captions

Fig. 1. Multiple alignments (performed by ClustalW) of translated amino acids of 14 representative *Vitis* RGAs and 5 known R proteins. Conserved amino acids are highlighted with boxes. The underlined aspartic acid (D) and tryptophan (W) are typical characteristics of TIR and non-TIR proteins, respectively. Motifs of the NBS domain are indicated at the top of the sequences.

Fig. 2. The neighbor-joining tree constructed based upon Clustal W amino acid sequence alignments represents the relationship of 14 representative *Vitis* RGAs, 3-known TIR and 2 known non-TIR subclasses of NBS-LRR R proteins. Bootstrap values are given at the branch points.

Table 1. Results of similarity search between *Vitis* RGA nucleotide/amino acid sequences and GenBank accessions using BLASTn and BLASTx, respectively.

Representative clones	Clone numbers/ group	GenBank accessions with the highest sequence similarity							
		Nucleotides	Score (bit)	E –value[1/]	Identity/ coverage (%)	Proteins	Score (bit)	E –value[1/]	Identity/ coverage (%)
Hybrid 'NY88.0507.01'									
rgVhybNY507_13 (HM773001)	1	No significant similarity found				Unnamed NBS-LRR protein candidate [*V. vinifera*] CBI17900.1	54	3e-13	50/62
rgVhybNY507_15 (HM773002)	1	No significant similarity found				Resistance protein candidate [*V. amurensis*] AAR08818.1	81	7e-14	53/38
rgVhybNY507_22 (HM773004)	2	No significant similarity found				Unnamed NBS-LRR protein candidate [*V. vinifera*] CBI17900.1	56	2e-10	61/78
						Putative LZ-NBS-LRR resistance protein [Rosa hybrid cultivar] CAJ27150.1	30	0.0	46/67
rgVhybNY507_23 (HM773005)	1	No significant similarity found				Resistance protein candidate [*V. amurensis*] AAR08818.1	126	9e-30	53/86
rgVhybNY507_27 (HM773007)	1	No significant similarity found				P-loop NTPase [*V. aestivalis*] ACN91228.1	48	4e-04	58/24
						Resistance protein PLTR [*A. hypogaea*] AAX81243.1	39.7	0.13	48/21
						Putative disease resistance gene analog NBS-LRR [*M. prunifolia*] AAM77260.1	39.3	0.17	50/20
rgVhybNY507_29 (EU822228.1)	27	*V. vinifera* contig VV78X162558.4, whole genome shotgun sequence AM475374.1	904	0.0	99/97	P-loop NTPase [*V. aestivalis*] ACN91226.1	318	1e-85	92/98
rgVhybNY507_80 (EU822262.1)	2	*V. aestivalis* clone pSCA-C2 P-loop NTPase gene, partial cds FJ795341.1	909	0.0	99/98	P-loop NTPase [*V. aestivalis*] ACN91228.1	308	1e-82	99/98
						TIR-NBS-LRR resistance protein [*P. trichocapa*] XP_0022300210.1	177	3e-43	57/98
rgVhybNY507_90 (EU822270.1)	1	*V. vinifera* contig VV78X247338.6, whole genome shotgun sequence AM483751.1	883	0.0	98/96	Unnamed NBS-LRR protein candidate [*V. vinifera*] CBI40355.1	154	5e-36	55/97
						NBS-LRR disease resistance protein [*C. arietinum*] ABB85178.1	142	1e-32	45/98
						Putative disease resistance protein RPH8A [*R. communis*] XP_002535012.1	139	1e-31	47/97
rgVhybNY507_101 (EU822276.1)	13	*V. rupestris* clone rgVrup119 putative RGA gene, partial sequence ABB85178.1	900	0.0	99/98	Unnamed NBS-LRR protein candidate [*V. vinifera*] CBI17900.1	298	1e-79	98/98
						Putative disease resistance gene analog NBS-LRR [*M. prunifolia*] AAM77267.1	139	1e-31	49/98
						NBS-LRR resistance like protein RGC402 [*H. annuus*] ABQ57715.1	136	1e-30	51/98
Cultivar 'Black Queen'									
rgVvinBQ_46 (EU822245.1)	38	*V. vinifera* contig VV78X110871.5, whole genome shotgun sequence AM436038.2	870	0.0	98/97	Unnamed NBS-LRR protein candidate [*V. vinifera*] CBI33323.1	318	1e-85	94/99
						Resistance protein candidate [*V. amurensis*] AAR08818.1	289	9e-77	88/98
rgVvinBQ_47 (EU822246.1)	1	*V. amurensis* isolate rgVamu084 resistance protein candidate pseudogene, partial sequence AY427079.1	870	0.0	97/98	Resistance protein candidate [*V. amurensis*] AAR08840.1	226	1e-57	64/98
rgVvinBQ_53 (HM773013)	1	*V. vinifera* contig VV78X195949.3, whole genome shotgun sequence AM489403.2	296	1e-76	87/35	Resistance protein candidate [*V. riparia*] AAR08879.1	86	3e-15	46/41
rgVvinBQ_102 (HM773017)	1	*V. vinifera* contig VV78X148054.15, whole genome shotgun sequence AM463019.2	119	2e-23	81/27	Unnamed NBS-LRR protein candidate [*V. vinifera*] CBI33323.1	70	7e-11	61/33
						Resistance protein candidate [*V. amurensis*] AAR08818.1	59	2e-07	52/33
rgVvinBQ_106 (HM773018)	1	*V. vinifera* contig VV78X148054.15, whole genome shotgun sequence AM463019.2	66	2e-07	86/11	No significant similarity found			

[1/]Expected value (E-value) refers to the number of matches expected by chance alone. The lower the E-value, the more strongly supported the match.

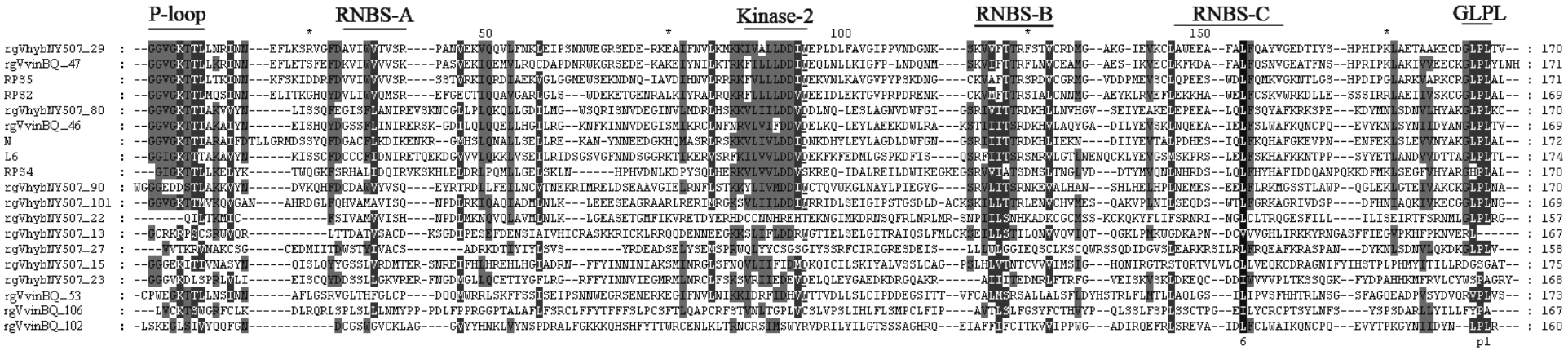

P-loop
RNBS-A
Kinase-2
RNBS-B
RNBS-C
GLPL
rgVhybNY507_29
rgVvinBQ_47
RPS5
RPS2
rgVhybNY507_80
rgVhybNY507_90
rgVhybNY507_101
rgVhybNY507_23
rgVvinBQ_106
rgVhybNY507_27
rgVvinBQ_102
rgVhybNY507_15
rgVhybNY507_22
rgVhybNY507_13
rgVvinBQ_53
rgVvinBQ_46
N
L6
rgVhybNY507_123
rgVhybNY507_127
rgVvinBQ_123
rgVhybNY507_122
rgVvinBQ_122

Fig. 1

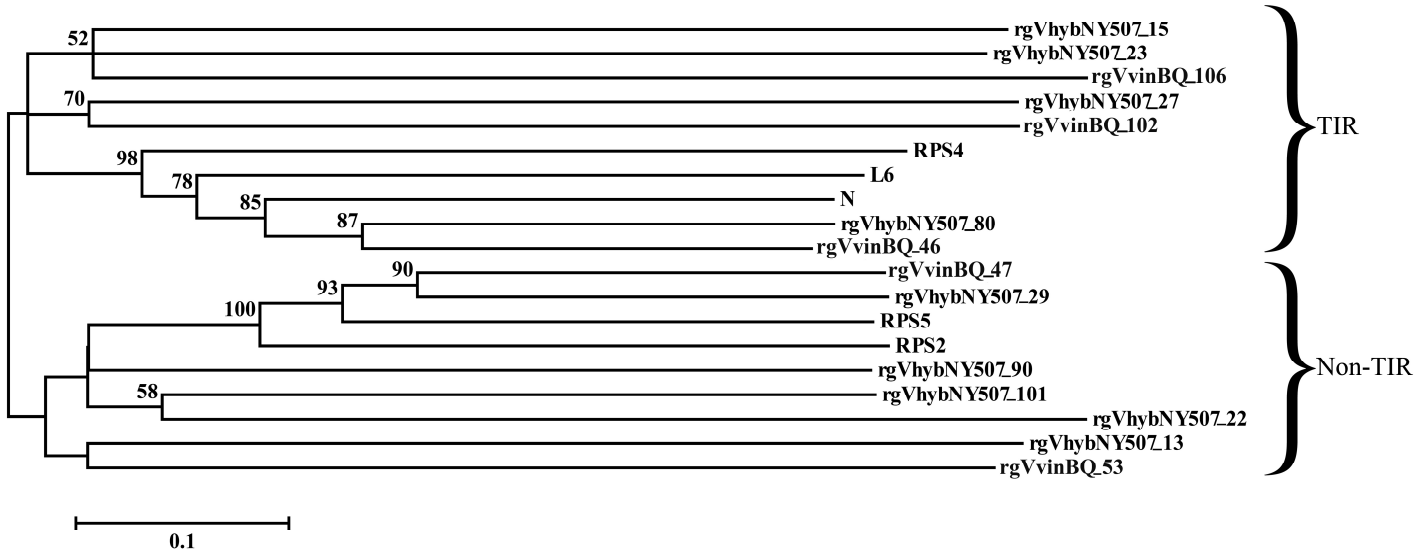

rgVhybNY507_15
rgVhybNY507_23
rgVvinBQ_106
rgVhybNY507_27
rgVvinBQ_102
RPS4
L6
N
rgVhybNY507_80
rgVvinBQ_46
rgVvinBQ_47
rgVhybNY507_29
RPS5
RPS2
rgVhybNY507_90
rgVhybNY507_101
rgVhybNY507_22
rgVhybNY507_13
rgVvinBQ_53
52
70
98
78
85
87
90
93
100
58
TIR
Non-TIR
0.1

Fig. 2

ภาคผนวก ข

Manuscript 2