

รหัสโครงการ SUT3-302-48-36-36



## รายงานการวิจัย

การปรับปรุงพันธุ์องุ่น (*Vitis* spp.) ให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง  
(Breeding grapevine (*Vitis* spp.) for downy mildew resistance)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลการวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



## รายงานการวิจัย

# การปรับปรุงพันธุ์องุ่น (*Vitis* spp.) ให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง Breeding grapevine (*Vitis* spp.) for downy mildew resistance

### คณะผู้วิจัย

#### หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. ปิยะดา ตันตสวัสดิ์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

#### ผู้ร่วมวิจัย

1. ดร. โสภณ วงศ์แก้ว
2. น.ส. ศิระประภา มหานิล
3. นายธงชัย ประจงใจ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2548-2550

ผลการวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2553

## กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี งบประมาณ พ.ศ. 2548-2550 คณะวิจัยใคร่ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ไพศาล เหล่าสุวรรณ ที่ให้คำปรึกษาด้านการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีดั้งเดิม Prof. Bruce Reisch มหาวิทยาลัย Cornell ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ให้ความอนุเคราะห์พันธุ์ด้านทาน ให้สถานที่ดำเนินการทดลองบางส่วน และให้คำปรึกษา ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด ที่ให้คำปรึกษาด้านพันธุ์ การปลูกและดูแลรักษาอุ่น ดร. อัจฉรย์ สุขธำรง ที่ให้คำปรึกษาด้านวัสดุปลูกอุ่น และขอบคุณ ผศ.ดร. จิตติพร มะณีโกวา ที่ให้ข้อมูลอันเป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์ข้อมูล นอกจากนี้คณะวิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำฟาร์มมหาวิทยาลัย เทคโนโลยีสุรนารีและศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาการวิจัย รวมทั้งนักศึกษาบัณฑิตและผู้ช่วยวิจัยหลายท่านที่ช่วยจัดเตรียมรายงานการวิจัยฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

## บทคัดย่อ

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

พันธุ์อ่อนแอต่อโรคที่เป็น *V. vinifera* 3 พันธุ์ (Black Queen, Carolina Black Rose and Italia) วิเคราะห์ความต้านทานโรคน้ำค้างโดยใช้ลูกผสม 85 ต้น พบว่าวาเรียนซ์ของสมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (general combining ability; gca) ของพันธุ์พ่อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่วาเรียนซ์ของสมรรถนะการรวมตัวทั่วไปของพันธุ์แม่และสมรรถนะการรวมตัวจำเพาะ (specific combining ability; sca) ไม่แตกต่างทางสถิติ ซึ่งให้เห็นว่าการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของโรคน้ำค้างส่วนใหญ่เป็นการแสดงออกของยีนในแบบบวก (additive gene action) มากกว่าแบบที่ไม่ใช่แบบบวก (non-additive gene action) ค่าประมาณอัตราพันธุกรรมแบบแคบ (narrow sense heritability) ของความต้านทานโรคน้ำค้างในประชากรนี้มีค่าเท่ากับ 55.6 เปอร์เซนต์ กลุ่มผสม Carolina Black Rose x NY65.0550.04 ให้ผลของสมรรถนะการรวมตัวจำเพาะที่มีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และให้ลูกผสมที่มีสัดส่วนต้านทานสูงสุด (75.0%) จึงจัดเป็นกลุ่มผสมที่เหมาะสมและสมควรใช้ในการปรับปรุงพันธุ์องุ่นเพื่อต้านทานโรคในอนาคต จากลูกผสมจำนวนทั้งหมด 101 ต้นของ 13 กลุ่มผสมระหว่างสายพันธุ์ต้านทานโรคน้ำค้างและพันธุ์อ่อนแอ พบ 13 ลูกผสมที่มีความต้านทานมากต่อโรคน้ำค้างจากการทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ ย้ายต้นลูกผสมเหล่านี้พร้อมพันธุ์พ่อแม่ออกปลูกในสภาพไร่เพื่อประเมินการเจริญเติบโตทางลำต้น คุณภาพผล ผลผลิต และความต้านทานโรคน้ำค้างในโครงการปรับปรุงพันธุ์ระยะที่สองต่อไป

## ABSTRACT

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

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

## สารบัญ

หน้า

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



## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

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

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลน RGAs จาก genomic DNA.....	9
2	ไพรเมอร์ที่จำเพาะ อุณหภูมิ annealing และขนาดของ PCR products ของ เครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาจาก RGAs.....	11
3	ผลการตรวจหาความคล้ายของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ <i>Vitis</i> RGAs เปรียบเทียบกับลำดับของยีนหรือโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้ โปรแกรมการวิเคราะห์ BLASTn และ BLASTx.....	28
4	จำนวนซ่อที่ผสมติดจากองุ่น 9 คู่ผสม.....	41
5	ค่า mean square จากการวิเคราะห์ว่าเรียงซ่งของการเกิดโรคราน้ำค้าง.....	42
6	การประเมินโรคราน้ำค้างของพันธุ์พ่อแม่โดยวิธีตัดใบมาวิเคราะห์.....	44
7	ระดับคะแนนความต้านทานโรคราน้ำค้างของลูกผสม F <sub>1</sub> จาก 9 คู่ผสม.....	44
8	ค่า mean square จากการวิเคราะห์ว่าเรียงซ่งสำหรับปฏิบัติการเกิดโรครา- น้ำค้างในองุ่น.....	45
9	ค่าเฉลี่ยของปฏิบัติการเกิดโรค.....	47
10	ผลของการประเมินสมรรถนะการรวมตัวทั่วไปและการรวมตัวจำเพาะ.....	47
11	ระดับความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในองุ่นลูกผสมโดยการให้คะแนนจำนวน สปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.....	48

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	RGAs (A) โมเดลโครงสร้างของยีนต้านทานชนิด NBS-LRR; (B) ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของงุ่น <i>V. cinerea</i> B9 ด้วยไพรเมอร์ P-loop/GLPLAL-1 .....20
2	การเลือกโคลนที่มีขนาดแถบดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> ที่เหมาะสม.....21
3	Multiple alignments จากการวิเคราะห์กรดอะมิโน (translated) ของโคลนตัวแทน RGA 22 โคลน ซึ่งแยกจาก <i>V. vinifera</i> 5 โคลน <i>V. cinerea</i> 8 โคลน และ <i>V. hybrid</i> 9 โคลน เปรียบเทียบกับโปรตีนต้านทานที่ทราบแน่ชัด 5 โปรตีน โดยใช้โปรแกรม MEGA4 .....34
4	Phylogram ซึ่งสร้างโดยอาศัยข้อมูลที่ได้จาก sequence alignment ของกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Clustal W.....35
5	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของงุ่นลูกผสม Horizon × Illinois 547-1 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย rgVcin125.....36
6	รูปแบบแถบดีเอ็นเอของงุ่นลูกผสม Horizon × Illinois 547-1 จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย stkVa011.....37
7	งุ่น <i>V. vinifera</i> ที่ใช้เป็นพันธุ์แม่ในการวิเคราะห์ gca และ sca.....40
8	งุ่นลูกผสมที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อในการวิเคราะห์ gca และ sca.....40
9	ช่องุ่นทั้ง 9 คู่ผสม ประกอบด้วย.....41

# 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 และ ออสเตรเลีย ประเทศหลักในการผลิตองุ่นของโลก ได้แก่ อิตาลี ฝรั่งเศส สเปน ตุรกี สหรัฐอเมริกา และจีน จากความต้องการองุ่นในอุตสาหกรรมการผลิตไวน์ เหล้าบรันดี น้ำผลไม้ ลูกเกด และ รับประทานสด รวมถึงน้ำมันในเมล็ดองุ่นที่มีอยู่ 6-20% ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการรับประทาน ผลิตภัณฑ์ และใช้แทนเมล็ด linseed ได้ ทำให้ผลผลิตองุ่นรวมทั้งโลกในปี พ.ศ. 2552 สูงถึง 67,221,000 ตัน โดยประเทศที่มีผลผลิตองุ่นมากที่สุด คือ อิตาลี รองลงมาคือ จีน อเมริกา และฝรั่งเศส (Wikipedia, 2009)

องุ่นเป็นไม้ที่มีถิ่นกำเนิดในแถบอากาศอบอุ่น แต่สามารถเจริญได้ดีในเขตอากาศกึ่งร้อนถึง อากาศร้อน เช่นในประเทศไทย จากสถิติการปลูกองุ่นของกองแผนงาน กรมส่งเสริมการเกษตรในปี พ.ศ. 2542 พบว่าการปลูกองุ่นเพื่อเป็นการค้าในประเทศไทย มักจะปลูกในแถบที่ราบลุ่มภาคกลาง เป็นส่วนใหญ่ มีพื้นที่ปลูกมากกว่า 21,900 ไร่ และพื้นที่เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือกว่า 2,680 ไร่ (กองแผนงาน กรมส่งเสริมการเกษตร, 2542) ซึ่งจังหวัดที่มีการปลูกมาก ได้แก่ ราชบุรี สมุทรสาคร กาญจนบุรี นครปฐม นครราชสีมา และสระบุรี เป็นต้น (กิตติพงษ์ ตรีทรยานนท์, 2544) การปลูกองุ่น เพื่อการค้าเป็นที่นิยมและแพร่หลายอย่างรวดเร็วในประเทศไทย เนื่องจากองุ่นเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่มีราคาต่อหน่วยสูง เมื่อเปรียบเทียบกับผลไม้ชนิดอื่น ๆ และการที่องุ่นเป็นผลไม้ที่มีหลากหลาย สายพันธุ์ จึงสามารถคัดเลือกปลูกสายพันธุ์ที่เหมาะสม เพื่อการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลายชนิด นอกจากนี้การที่ประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ทำให้เกษตรกรสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิต ได้ 2-3 ครั้งต่อปี ในขณะที่ประเทศในเขตอากาศอบอุ่นจะเก็บผลผลิตได้เพียงปีละ 1 ครั้งเท่านั้น

แต่อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพในการผลิตองุ่นของประเทศไทยยังไม่ดีเท่าที่ควร คือ คุณภาพ ของผลไม้ และผลผลิตต่อไร่ต่ำ ประมาณ 300 - 1,000 กก./ไร่ ในขณะที่ผลผลิตเฉลี่ยของโลกสูงถึง 7,759 กก./ไร่ ทำให้ประเทศไทยต้องนำเข้าองุ่นผลสดในปี พ.ศ. 2552 ปริมาณ 42,607 ตัน คิดเป็น มูลค่า 1,944.4 ล้านบาท และในปี พ.ศ. 2553 นำเข้าองุ่นผลสดจากเดือนมกราคมถึงมิถุนายน ปริมาณ 8,985 ตัน คิดเป็นมูลค่า 488.1 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) ปัญหาที่มักพบในการ ผลิตองุ่นในประเทศไทย 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 หรือน้ำขมจากเชื้อ *Greeneria uvicola* (*Melanconium fuligineum*) (นิพนธ์ วิจารณ์, 2542; Visarathanonth, 1990)

โรคราน้ำค้าง (downy mildew) ที่มีเชื้อสาเหตุคือ *Plasmopara viticola* เป็นปัญหาที่สำคัญต่อการผลิตองุ่นทั่วโลก การเข้าทำลายของโรคนี้ ก่อให้เกิดความเสียหายในระดับเศรษฐกิจทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ โดยโรคดังกล่าวจะเข้าทำลายใบ ช่อดอก กิ่งอ่อน และมือจับ ที่พบมากที่สุดคือบนใบ และช่อดอก อาการบนใบจะเห็นเป็นจุดสีเหลืองเล็ก ๆ และจะขยายโตขึ้น ที่ได้ใบจะพบราสีขาวเหลืองเป็นกระจุก ใบที่ถูกทำลายมาก จะมีสีน้ำตาล และแห้งตายไปในที่สุด อาการบนช่อดอกพบในระยะดอกใกล้บาน พบผลสีเขียวปนเหลือง และจะเห็นเชื้อราฟูขาวบนดอก เมื่ออาการรุนแรงจะเป็นสีน้ำตาลแก่ และแห้งตายติดกับเถา ไม้ร่วง จะเห็นเชื้อราสีขาวบนกิ่งอ่อนตามแนวยาวของกิ่ง ยอดช่อดอกเจริญเติบโต (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 ในเซลล์ปากใบ ขณะที่เชื้อโรคเข้าทำลาย ซึ่งโดยทั่วไปใน *V. vinifera* จะเป็น ยีนด้อย (homozygous recessive) และองุ่นสายพันธุ์ที่ต้านทานจะเป็นยีนเด่น (homologous dominant) ส่วนกลุ่มยีน (multiple genes) ทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญของไมซีเลียม (mycelium) ในพืชอาศัย (Reisch and Pratt, 1996) การปรับปรุงพันธุ์องุ่นให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างโดยวิธีดั้งเดิมได้เริ่มมากกว่าครึ่งศตวรรษแล้ว 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

ด้านทานต่อ Pierce's disease โรคแอนแทรกโนส และโรคราน้ำค้าง ดังนั้นเป้าหมายหลักประการหนึ่งของนักปรับปรุงพันธุ์องุ่น คือการพัฒนาสายพันธุ์องุ่นให้มีความต้านทานต่อโรค และที่สำคัญจะต้องมีคุณภาพสูง เป็นที่ต้องการของตลาด ซึ่งอาจจะต้องใช้เวลาในการที่จะพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ลูกผสมที่มีคุณภาพคืออย่างแท้จริง

การป้องกันรักษาโรคราน้ำค้างทำได้โดยการฉีดพ่นสารเคมีกำจัดเชื้อราตลอดทั้งฤดูปลูก ทำให้เกษตรกรต้องเสียค่าใช้จ่ายจำนวนมากในการซื้อสารเคมีกำจัดเชื้อรา และแรงงานในการฉีดพ่นสารเคมี Emmet รายงานว่าในการผลิตองุ่นทั่วโลกต้องเสียค่าใช้จ่ายในการป้องกันกำจัดโรคราน้ำค้างสูงถึงประมาณ 320,000,000 บาทต่อปี (Bordelon, 2009) และถึงแม้ว่าการใช้วิธีการป้องกันแบบผสมผสาน (integrated controls) จะช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมี แต่ก็มีรายงานว่า มีเพียงไม่กี่ประเทศเท่านั้นที่สามารถปลูกองุ่นโดยไม่ใช้สารเคมีได้ คือ Sinkians ในทางตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศจีน ซิลิอาร์เจนตินา 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) ทำให้เกิดการพัฒนารูปแบบการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อโรคอย่างรวดเร็ว มีการโคลนยีนต้านทานโรคจากพืชใบเลี้ยงคู่หลายสปีชีส์ เช่น ยีน *N* จากยาสูบ ยีน *L6* จากป่าน และ ยีน *RPS2* และ *RPM1* จาก *Arabidopsis* โดยพบว่ายีนต้านทานโรคมีความสามารถในการต้านทานต่อโรคได้อย่างกว้างขวางครอบคลุมโรคทั้งที่มีสาเหตุมาจาก เชื้อไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา และไส้เดือนฝอย โปรตีนที่เกิดจากกระบวนการถอดรหัส (transcription) และแปลรหัส (translation) ของยีนต้านทานโรค ส่วนใหญ่ประกอบด้วย 2 ส่วนหลักคือ nucleotide binding site (NBS) ในตำแหน่ง N-terminal และ leucine-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 โดยการใช้ไพรเมอร์ที่สร้างมาจาก

ลำดับกรดอะมิโนที่อนุรักษ (degenerate primers) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งวิธีดังกล่าวอาจทำให้ได้ RGAs ที่ตรงหรือใกล้เคียงกับตำแหน่งของยีนต้านทาน ตัวอย่างเช่น Yu et al. (1996) ใช้ degenerate primers ที่สร้างจากลำดับกรดอะมิโนที่อนุรักษในยีน *N* และ *RPS2* เพื่อโคลนกลุ่มยีนต้านทานโรคจากถั่วเหลือง ดังนี้ *Rps1*, *Rps2*, *Rps3*, *rmd*, *Rsv1* และ *Rpv* นอกจากนี้พบว่า RFLP probes ที่พัฒนาจาก RGAs ในองุ่นมีการจับคู่ (hybridization) เฉพาะในองุ่น สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคราแป้งเท่านั้น แสดงให้เห็นว่า RGAs ที่โคลนมาจากองุ่นอาจใช้เป็น เครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคในองุ่นได้ (Gaspero and Cipriani, 2002) และเช่นเดียวกัน Donald et al. (2002) พบเครื่องหมาย RFLP ที่พัฒนาจาก RGAs จำนวน 3 เครื่องหมายที่อยู่ใกล้ชิด (link) กับยีนต้านทานโรคราแป้งซึ่งนำมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทาน โรคนี้ได้

นอกจากนี้ในสัมพบเครื่องหมาย RFLP ที่พัฒนาจาก RGAs จำนวน 3 เครื่องหมายที่ link กับ ยีนต้านทาน citrus tristeza virus และ citrus nematode (Deng et al., 2000) และในมะเขือเทศพบ NBS sequence ที่มีตำแหน่งบนแผนที่พันธุศาสตร์ใกล้เคียง (co-mapping) กับหลายตำแหน่งในจีโนมที่มี ยีนต้านทานต่อโรคหลายชนิด ได้แก่ *Verticillium* wilt และ *Fusarium* (Pan et al., 2000) งานวิจัย เหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าลำดับเบสของ NBS-LRR ที่ link หรือเป็นส่วนหนึ่งของยีนต้านทาน มี ประสิทธิภาพเพียงพอที่จะนำมาใช้สร้างแผนที่พันธุศาสตร์ (genetic map) เพื่อโคลนยีนต้านทานโรค ในพืช หรือใช้สำหรับคัดเลือกพันธุ์ได้ ดังนั้น โคลน RGAs ที่ได้ อาจสามารถใช้เป็นเครื่องหมาย โมเลกุลเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกพันธุ์องุ่นจากการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีดั้งเดิมให้ ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง และนำไปสู่การโคลนยีนต้านทานโรคราน้ำค้างเพื่อนำไปใช้ปรับปรุงพันธุ์ โดยวิธีพันธุวิศวกรรม ซึ่งอาจช่วยแก้ไขปัญหาด้านคุณภาพของพันธุ์ที่ได้ โดยเฉพาะพันธุ์ที่ใช้ใน การผลิตไวน์ที่ต้องมีคุณภาพและคุณสมบัติจำเพาะ จึงให้ไวน์คุณภาพดี และสม่ำเสมอ ซึ่งจะ ก่อให้เกิดประโยชน์อย่างสูงในอุตสาหกรรมการผลิตองุ่นในประเทศไทย ทั้งนี้เพราะการใช้สายพันธุ์ ที่ต้านทานต่อโรค จะทำให้องุ่นมีคุณภาพสูง ผลผลิตสูง ลดค่าใช้จ่ายในการป้องกันและกำจัดโรค ลด ผลกระทบของสารเคมีที่มีต่อสิ่งแวดล้อม และสุขภาพของผู้บริโภค โดยเฉพาะจะตอบสนองนโยบาย ของรัฐบาลในด้านความปลอดภัยทางอาหารเพื่อนำประเทศไทยสู่การเป็นครัวของโลก และยังสามารถ ส่งผลให้รายได้ของเกษตรกรเพิ่มสูงขึ้นถึง 10% ต่อปี นอกจากนี้ยังสามารถนำเทคนิคเหล่านี้ไปใช้ใน การปรับปรุงพันธุ์องุ่นเพื่อให้ต้านทานต่อโรคอื่น หรือปรับปรุงพืชอื่นๆ ให้ต้านทานโรคต่อไปใน อนาคต

การปรับปรุงพันธุ์องุ่นส่วนใหญ่มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาพันธุ์ให้ต้านทานโรค ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การแสดงออกของยีนต้านทาน ดังนั้นการศึกษาการแสดงออกของยีนจึงมีความสำคัญ Sprague 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 นอกจากนี้ขนาดของวาเรียนซ์ 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 และความแปรปรวนเนื่องมาจากสิ่งแวดล้อม โดยอัตราพันธุกรรมอย่างแคบที่มีค่าสูงจะบ่งชี้โอกาสหรือความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์ โดยเฉพาะในพืชผสมตัวเอง ดังนั้นการศึกษาการแสดงออกของยีนจะช่วยเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ทราบรูปแบบการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้เกิดการแสดงออกตามที่ต้องการในแต่ละลักษณะ

สำหรับงานปรับปรุงพันธุ์องุ่นในประเทศไทยซึ่งยังไม่มีผู้ใดศึกษาอย่างจริงจังมาก่อน การศึกษาการแสดงออกของยีนด้านทานควบคุมไปกับการโคลนยีนคล้ายยีนด้านทานและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับคัดเลือกยีนด้านทานจึงมีความสำคัญ 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 แต่อ่อนแอต่อโรครมาผสมกับพันธุ์ต้านทานโรค แต่อาจมีคุณภาพไม่ดี หรือให้ผลผลิตต่ำ หลังจากนั้นทำการคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะตามที่ต้องการ คือ มีคุณภาพดี ให้ผลผลิตสูง และต้านทานโรค วิธีนี้ต้องใช้เวลาานาน และจำเป็นต้องคัดเลือกลูกผสมเป็นจำนวนมาก เพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะตามต้องการ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อดีคือ มีโอกาสได้พันธุ์ลูกผสมที่ดีกว่าพ่อแม่พันธุ์และมีลักษณะหลากหลายจาก genetic recombination ซึ่งสามารถใช้เป็นพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ต่อเนื่องในอนาคต ในปัจจุบันมีการย่นระยะเวลาการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีนี้ด้วยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะองุ่นเป็นพืชที่มีอายุยาว ต้องใช้เวลาานานจึงสามารถคัดเลือกคุณภาพผลผลิตได้ และต้องใช้เวลาที่ตลอดจนต้นทุนในการปลูกและดูแลรักษาของพันธุ์ลูกผสมต่าง 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 กับยีนต้านทาน โรคราแป้ง ซึ่งนำมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคนี้ได้

สำหรับประเทศไทย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีมีความพร้อมในงานวิจัยด้านองุ่นสูง มีแปลงรวบรวมพันธุ์องุ่นจากนานาประเทศรวมมากกว่า 50 พันธุ์ ซึ่งเป็นแหล่งพันธุกรรมที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้เป็นอย่างดี แต่พันธุ์ส่วนใหญ่ที่มีอยู่ไม่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง หรือต้านทานในระดับต่ำ และยังไม่มีการปรับปรุงพันธุ์องุ่นโดยวิธีดั้งเดิมอย่างจริงจังมาก่อน โครงการวิจัยนี้จะ

นำพันธุ์ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในระดับสูงจากประเทศสหรัฐอเมริกามาทดสอบความต้านทานในประเทศไทย และใช้เป็นพ่อพันธุ์ในการผสมกับแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพดี และให้ผลผลิตสูงที่มีอยู่แล้ว เพื่อให้ได้ลูกผสมที่ต้านทานโรค และมีคุณภาพดี ให้ผลผลิตสูง นอกจากนี้จะพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อนำมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ให้ได้รวดเร็วและประหยัดต้นทุนมากขึ้นในอนาคต

วิธีพันธุวิศวกรรมใช้การถ่ายยีนต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ เช่น ยีนต้านทานโรคสู่พันธุ์ที่มีลักษณะอื่นๆ ที่เด่นอยู่แล้ว เช่น มีการถ่ายยีน grapevine fanleaf virus coat protein, chitinase, glucanase ฯลฯ เข้าสู่องุ่นเพื่อให้ได้พันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส และเชื้อรา (Kikkert et al., 2001) วิธีนี้จะได้พันธุ์ที่มีลักษณะต่าง ๆ เหมือนเดิม ยกเว้นลักษณะที่ถ่ายยีนเข้าไป จึงเหมาะสมสำหรับปรับปรุงพันธุ์องุ่นสำหรับผลิตไวน์ เพื่อให้ได้คุณภาพคงที่ อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัดที่ยีนซึ่งส่วนใหญ่จะได้รับการจดลิขสิทธิ์ไว้แล้ว 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. ให้นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาซึ่งมีความรู้และประสบการณ์ทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีดั้งเดิมและการประยุกต์ใช้เทคนิคด้านชีววิทยาระดับโมเลกุล ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีดั้งเดิมในปัจจุบันจัดเป็นสาขาขาดแคลน
6. ได้ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการอย่างน้อย 2 เรื่อง

## บทที่ 2

### วิธีดำเนินการวิจัย

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

#### 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 โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด degenerate ที่จำเพาะเจาะจงกับลำดับเบสบนยีน NBS-LRR (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลน RGAs จาก genomic DNA

ชื่อ	ทิศทาง	ได้จากยีน	ลำดับเบส (5' → 3')	อ้างอิง
1. P-loop	Sense	<i>N, RPS2, L6</i>	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC	คัดแปลงจาก Hunger et al. (2003)
GLPLAL-1	Antisense	<i>N, RPS2, RPM1, L6</i>	IAGIGCIAGIGGIAGICC	คัดแปลงจาก Hunger et al. (2003)
2. P-loop	Sense	<i>N, RPS2, L6</i>	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC	คัดแปลงจาก Hunger et al. (2003)
Rev-loop	Antisense	<i>N, RPS2, L6</i>	GTIGTITTICCIACICCICC	คัดแปลงจาก 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) ต่อเข้ากับเวกเตอร์ (vector) pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) และทำการถ่ายฝากลงในเซลล์ผู้รับ *Escherichia coli*
- 1.1.6 คัดเลือกเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสม โดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีน  $\beta$ -galactosidase บนอาหารคัดเลือกที่ทาด้วย 2% (w/v) X-gal และ 100 mM isopropyl  $\beta$ -

D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ถ้าเป็นพลาสมิดลูกผสมโคโลนี่จะเป็นสีขาว ในขณะที่โคโลนี่ที่มีพลาสมิดเดิมจะมีสีฟ้า

- 1.1.7 เลือกพลาสมิดลูกผสม เพื่อนำมาตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในพลาสมิดด้วยวิธี PCR
- 1.1.8 สกัดดีเอ็นเอของพลาสมิดที่มีท่อนดีเอ็นเอแทรกอยู่จากเซลล์แบคทีเรีย
- 1.1.9 นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 1.1.8 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เพื่อคัดเลือกโคลน RGAs ที่มีดีเอ็นเอขนาดเหมาะสม
- 1.1.10 หาลำดับเบสของ RGAs โดย MacroGen Inc. (Seoul, Korea)
- 1.1.11 นำลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากลำดับเบสในข้อ 1.1.10 มาเปรียบเทียบกับความเหมือน (similarity) ระหว่างแต่ละ RGA และเปรียบเทียบกับยีนด้านทานโรคต่าง 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.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST))

## 1.2 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจาก RGAs (RGA-STS markers)

จาก RGAs ที่ได้ นำลำดับเบสของ RGA ที่เกี่ยวข้องมาใช้ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR เพื่อให้ได้แถบดีเอ็นเอรูปแบบที่ต่างกันระหว่างพันธุ์ด้านทานและอ่อนแอ เช่น การมี/ไม่มี ท่อนดีเอ็นเอ หรือได้ท่อนดีเอ็นเอขนาดต่างกันเมื่อนำมาทำ agarose gel electrophoresis ถ้ายังไม่สามารถแยกความแตกต่างของ PCR products ได้ นำ PCR products มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ เพื่อหาเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตัดแล้วให้รูปแบบท่อนดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างพันธุ์ด้านทาน 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) polyvinylpyrrolidone และ 0.2% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol) จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 60°C 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 ใช้ปิเปตดูดน้ำใส่ใส่หลอดใหม่ แล้วเติม 5 M NaCl ปริมาตร 0.5 เท่า จากนั้น ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 1 เท่า นำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20°C นาน 20 นาที
- 1.2.1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5635 ×g นาน 15 นาที เทน้ำใส่ทิ้ง แล้วล้างตะกอน ดีเอ็นเอด้วย 70 % และ 95 % ethanol
- 1.2.1.5 ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิ 37°C แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย ddH<sub>2</sub>O ปริมาตร 200 µL หลังจากนั้นเติม RNase A ความเข้มข้น 1 mg/mL ปริมาตร 20 µL แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที วัดความเข้มข้น ของดีเอ็นเอที่ 260 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer
- 1.2.2 ใช้โปรแกรม Primer 3 ([http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_www.cgi)) ออกแบบ ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับโคลน *Vitis* RGAs (ตารางที่ 2) และตั้งสภาวะที่ไพรเมอร์ที่พัฒนาโดย Di Gaspero and Cipriani (2003) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่จำเพาะ อุณหภูมิ annealing และขนาดของ PCR products ของเครื่องหมาย โมเลกุลที่พัฒนาจาก RGAs

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

<sup>a</sup> ตั้งชื่อไพรเมอร์จากชื่อของ RGAs

<sup>b</sup> ขนาดก่อนดีเอ็นเอ (bp) ที่คาดว่าจะได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

<sup>c</sup> เครื่องหมายที่พัฒนาโดย Di Gaspero and Cipriani (2003)

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

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

<sup>a</sup> ตั้งชื่อไพรเมอร์จากชื่อของ RGAs

<sup>b</sup> ขนาดท่อนดีเอ็นเอ (bp) ที่คาดว่าจะได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

<sup>c</sup> เครื่องหมายที่พัฒนาโดย Di Gaspero and Cipriani (2003)

1.2.3 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสารละลาย ปริมาตรรวม 20  $\mu$ L ซึ่งประกอบด้วย 1 $\times$  PCR buffer, 0.1 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ M ของแต่ละไพรเมอร์, 30 ng DNA และ 1 unit *Taq* DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA) โดยใช้โปรแกรม (1) 94 $^{\circ}$ C นาน 1 นาที (2) 92 $^{\circ}$ C นาน 50 วินาที, 46 - 58 $^{\circ}$ C นาน 50 วินาที, 72 $^{\circ}$ C นาน 1 นาที จำนวน 25 รอบ และ (3) 72 $^{\circ}$ C นาน 10 นาที

- 1.2.4 เลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตัดก่อนดีเอ็นเอจากข้อ 1.2.3 ได้ขนาดไม่เกิน 200 bp โดยใช้โปรแกรม Sequencher 4.2 (Genecodes Corp., Ann Arbor, MI, USA; ตารางที่ 2) ตัดดีเอ็นเอปริมาณ 0.2  $\mu\text{g}$  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 $\times$  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 $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{L}$  ทำให้ตัวอย่างเสียสภาพที่อุณหภูมิ 95 $^{\circ}\text{C}$  นาน 5 นาที แล้วรีบแช่ในน้ำแข็งทันที
- 1.2.6.3 อิเล็กโทรโฟเรซิสตัวอย่างดีเอ็นเอที่ 200-230 V, 0.06 A, 12-13 W อุณหภูมิ 4 $^{\circ}\text{C}$
- 1.2.6.4 ย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต ตรึงเจลด้วย 10% (v/v) acetic acid นาน 30 นาที แล้วล้างด้วย ddH<sub>2</sub>O 2 ครั้ง นาน 5 นาที จากนั้นย้อมด้วย 0.2% (w/v) silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) นาน 30 นาที แล้วล้างด้วย ddH<sub>2</sub>O 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 และหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายและยีนตำแหน่งโครโมโซมโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SAS 9.1.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)



## 2. การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะ (inheritance) และการปรับปรุงพันธุ์องุ่นโดยวิธีดั้งเดิม

### 2.1 การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะด้านทานโรคราน้ำค้าง

#### 2.1.1 การผลิตลูกผสม

2.1.1.1 ใช้แผนการผสมพันธุ์แบบ North Carolina Design II ซึ่งเป็นแผนการผสมพันธุ์ที่ผสมระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ครบทุกชุด ซึ่งอาจเรียกว่า การผสมแบบแฟกตอเรียล (factorial) ในการผสมจะแยกพืชออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งคือ พันธุ์แม่ (*V. vinifera*) ให้ผลผลิตสูงแต่อ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ Black Queen, Carolina Black Rose และ Italia กลุ่มสองคือ พันธุ์พ่อ เป็นพันธุ์ด้านทานน้ำค้าง 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 % ใ้ในถุงกระดาษ ใช้ตะแกรงโลหะกรองเกสรตัวผู้ และทำให้แห้งด้วยเครื่องดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้องข้ามคืน เก็บละอองเกสรตัวผู้ในหลอดที่ใส่สารดูดความชื้นไว้ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำมาใช้

2.1.1.3 ทดสอบการมีชีวิตของละอองเกสรตัวผู้ก่อนนำไปผสมกับดอกตัวเมียในปี พ.ศ. 2547 ด้วยวิธีประยุกต์จาก Mulugeta et al. (1994) โดยการนำเกสรตัวผู้และ negative control มาวางบนแผ่นสไลด์ แล้วหยดลิซียม 1, 2, 3-triphenyl tetrazolium chloride (TTC; 1.0% (w/v) ใน 50% (w/v) sucrose) จำนวน 3 หยด ทิ้งไว้ในาน 3 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตความมีชีวิตของละอองเกสรตัวผู้ โดยการนับจำนวนละอองเกสรสีชมพูหรือสีดำแดงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า โดย 40-50 % ของละอองเกสรตัวผู้จากพันธุ์พ่อแต่ละพันธุ์ที่ย้อมติดสีชมพู หรือดำแดงด้วย TTC บ่งชี้ความมีชีวิต 40-50% การเตรียม negative control ใช้ละอองเกสรตัวผู้มาทำให้ตายด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ  $70^{\circ}\text{C}$  นาน 48 ชั่วโมง ละอองเกสรที่ตายจะไม่ติดสี

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

เกษตรกรที่ตอนไว้ด้วยพู่กันอย่างเบามือ 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 เก็บผลงุ่นที่สุกแก่เต็มที่ แยกเมล็ดออกจากผลแล้วทำความสะอาด จากนั้นผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ก่อนเก็บที่อุณหภูมิ 4°C
- 2.1.1.7 แช่เมล็ด F<sub>1</sub> ด้วย gibberellic acid (GA) แล้ววางในกล่องพลาสติกที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 90 %ข้ามคืนก่อนแช่ใน 1.5 % (w/v) hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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°C นาน 21 วัน
- 2.1.1.10 ทำการเพาะเมล็ดในกระบะทราย เมล็ดจะงอกภายใน 6 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายต้นกล้ามาปลูกในกระถาง 6 นิ้ว ที่ใส่พีทมอส ดิน ขี้เถ้าเกลบ เพอร์ไลท์ เวอร์มิคูไลท์ และทราย อัตราส่วน 1: 1: 1/2: 1: 3/4 และใส่ปุ๋ยเคมี สูตร 46-0-0 อัตรา 1 กรัม/กระถาง
- 2.1.1.11 ปลูกงุ่นลูกผสม F<sub>1</sub> 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 เก็บใบองุ่นพันธุ์อ่อนแอที่เป็นโรคราน้ำค้างจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
    - 2.1.2.1.2 พ่นน้ำกลั่นลงบนผิวใบองุ่นที่ติดเชื้อจนกระทั่งขึ้นและบ่มที่อุณหภูมิ 22°Cข้ามคืน
    - 2.1.2.1.3 ล้างสปอร์ราน้ำค้างจากใบแล้วเก็บในขวดสเปรย์
    - 2.1.2.1.4 นับจำนวนของสปอร์ด้วย haemocytometer เพื่อหาให้ความเข้มข้น

10<sup>5</sup> สปอร์/มิลลิลิตร

2.1.2.2 การประเมินความต้านทานต่อโรคน้ำค้างในองุ่นลูกผสม F<sub>1</sub> 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<sub>1</sub>

2.1.2.2.2 พันสปอร์น้ำค้างบริเวณใต้ใบองุ่น และวางบนกระดาษกรองที่ขึ้นใน Petri dish และพ่นน้ำกลั่นบนใบที่ใช้เป็น negative control

2.1.2.2.3 บ่มที่อุณหภูมิ 22°C 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  $X_{ij}$  = ค่าสังเกตจากทรีตเมนต์ที่  $i$ , ซ้ำที่  $j$  เมื่อ  $j = 1, \dots, r$   
 $m$  = grand mean  
 $A_{i(j)}$  = อิทธิพลเนื่องจากทรีตเมนต์ที่  $i$  เมื่อ  $i = 1, \dots, t$   
 $e_{ij}$  = error

อิทธิพลของแต่ละปัจจัย สามารถเขียนเป็นโมเดล:

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

เมื่อ  $A$  = อิทธิพลเนื่องจากพันธุ์พ่อแม่  
 $B$  = อิทธิพลเนื่องจากสายพันธุ์ลูกผสม  
 $A \text{ vs } B$  = อิทธิพลเนื่องจากสเตทอโรซีซของสายพันธุ์ลูกผสม

วิเคราะห์สมรรถนะการรวมตัวทั่วไปขององุ่นลูกผสม:

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

เมื่อ  $B_{ij}$  = ผลของการผสมข้ามระหว่างพันธุ์แม่ที่  $j$  และพันธุ์พ่อที่  $i$   
 $G_i$  = ค่าเฉลี่ยของลูกผสมระหว่างพันธุ์พ่อที่  $i$  เมื่อ  $i = 1, 2, \dots, m; m = 3$   
 $G_j$  = ค่าเฉลี่ยของลูกผสมระหว่างพันธุ์แม่ที่  $j$  เมื่อ  $j = 1, 2, \dots, f; f = 3$   
 $S_{ij}$  = sca ของพันธุ์พ่อที่  $i$  กับพันธุ์แม่ที่  $j$

สามารถนำค่าเฉลี่ยมาคำนวณค่า gca ได้ผลดังนี้

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

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

และสามารถคำนวณหาค่า sca ดังนี้

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

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

$$\sigma_m^2 = \sigma_{gca \text{ (male)}}^2 = 1/4 \sigma_A^2$$

$$\sigma_f^2 = \sigma_{gca \text{ (female)}}^2 = 1/4 \sigma_A^2$$

$$\sigma_{mf}^2 = \sigma_{sca}^2 = 1/4 \sigma_D^2$$

เมื่อ  $\sigma_A^2 = 2(\sigma_m^2 + \sigma_p^2)$

และวิเคราะห์หาอัตราพันธุกรรมอย่างแคบ ตามสมการดังนี้

$$\text{Heritability (\%)} = [\sigma_A^2 / (\sigma_A^2 + \sigma_D^2 + \sigma_E^2)] \times 100$$

## 2.2 การปรับปรุงพันธุ์องุ่นโดยวิธีดั้งเดิม

- 2.2.1 นำเข้าองุ่นสายพันธุ์ด้านทานโรคน้ำค้าง 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 คัดเลือกพันธุ์ด้านทานโรคที่เหมาะสม 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 หรือตอกิ่งต้นลูกผสม

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

## บทที่ 3

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล ส่วนที่ 1

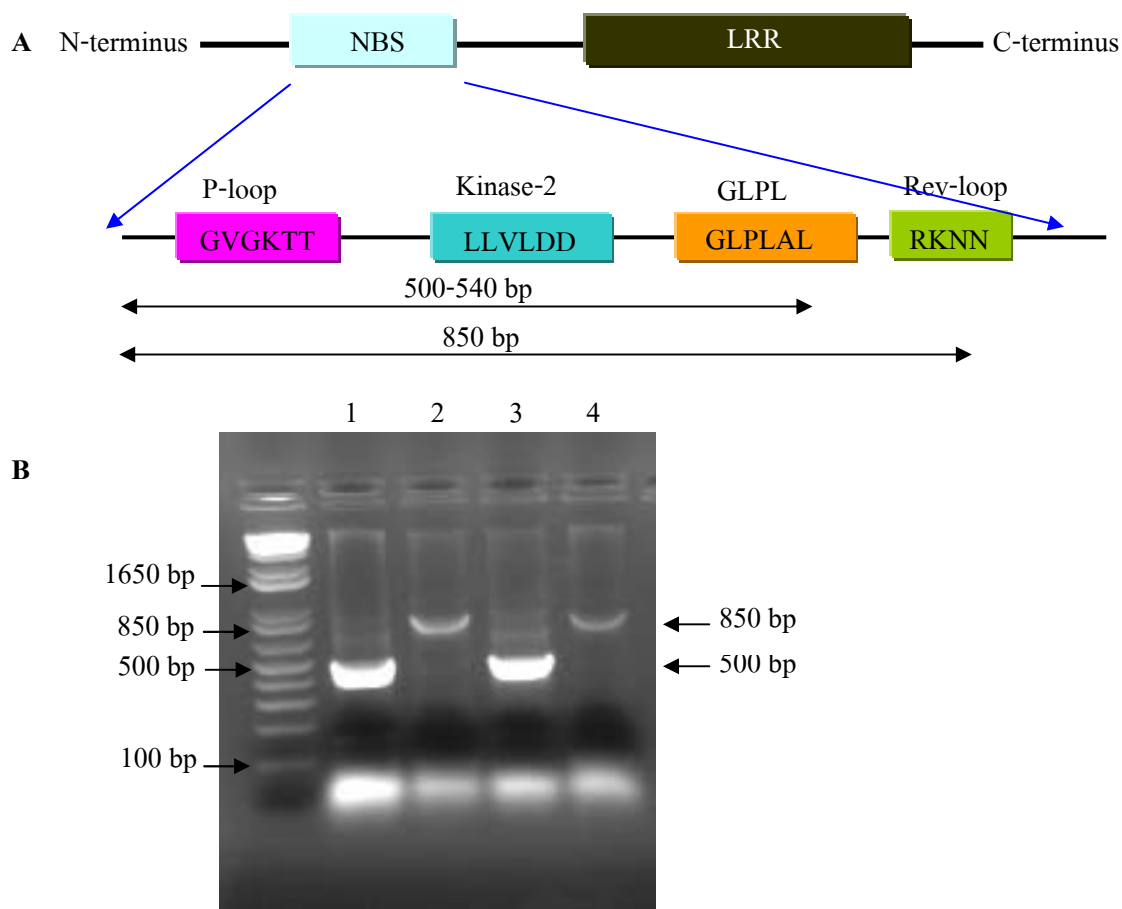
การโคลนยีนคล้ายยีนต้านทาน (resistance gene analogs; RGAs) ในองุ่น และการพัฒนา  
เครื่องหมายโมเลกุลจาก RGAs

#### การโคลน RGAs

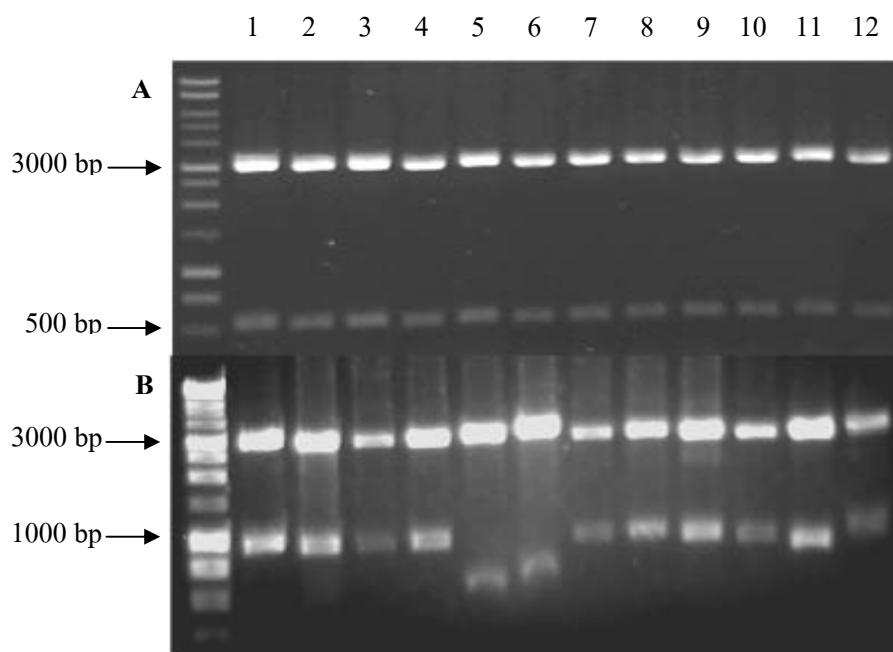
ใช้ไพรเมอร์ P-loop/GLPLAL-1 และ P-loop/Rev-loop เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากองุ่นพันธุ์ป่า *V. cinerea* B9 ซึ่งเป็นจีโนมไทป์ที่ต้านทานโรคราน้ำค้าง ได้ที่อนติเจนจากปฏิกิริยา PCR (PCR products) ขนาด 500 bp และ 850 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 1) นำ PCR products มาต่อกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy คัดเลือกโคลนที่มีที่อนติเจนขนาดเหมาะสม (ภาพที่ 2) ได้ 100 โคลน (48 โคลนจากไพรเมอร์ 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 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขององุ่นลูกผสมต้านทานโรคราน้ำค้างและสแคบ *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. linccumii* ซึ่งมียีนต้านทานโรคในประวัติพันธุ์ (pedigree) และพันธุ์อ่อนแอ *V. vinifera* Black Queen พบว่าได้ที่อนติเจนขนาดประมาณ 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) ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของงู่น *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** การเลือกโคลนที่มีขนาดแถบดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ที่เหมาะสม ช่องซ้าย ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb ladder); (A) ไพรมอร์ P-loop/GLPLAL-1 ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 500 bp; (B) ไพรมอร์ 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 กลุ่มนี้ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรมอร์ P-loop/GLPLAL-1 ส่วนโคลน RGAs 4 กลุ่มจากไพรมอร์ 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 หรือโปรตีนที่คาดว่าจะจะเป็นโปรตีนต้านทาน (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 ที่ได้จากไพรมอร์ P-loop/GLPLAL-1 และที่ได้จากไพรมอร์ P-loop/Rev-loop พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากไพรมอร์



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 เป็นพันธุ์ที่คาดว่าจะมียีนต้านทานที่หลากหลาย 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 โปรตีนที่คาดว่าจะจะเป็นโปรตีนต้านทาน หรือเอนไซม์ P-loop NTPase นอกจากนี้ยังพบว่า โคลนเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนต้านทานในพืชหลากหลายชนิด อาทิเช่น แอปเปิ้ล (*Malus*) กุหลาบ (*Rosa*) ทานตะวัน (*Helianthus*) ไม้สกุลหยาบ (*Populus*) ถั่ว chickpea (*Cicer*) ละหุ่ง (*Ricinus*) และ โกโก้ (*Theobroma*) (เปอร์เซ็นต์ความเหมือน 45-57%)

นอกจากนี้เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนซึ่งถอดรหัสจากโคลนจำนวน 7 โคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งไม่มีความคล้ายคลึงกับยีนใด ๆ ที่อยู่ในฐานข้อมูล พบว่า 33-64 เปอร์เซ็นต์ของลำดับกรดอะมิโนของโคลนเหล่านี้ มีความเหมือนกับโปรตีนที่คาดว่าจะจะเป็น NBS-LRR ที่มาจากองุ่น *V. vinifera* และโปรตีนต้านทานจากแอปเปิ้ล กุหลาบ ไม้สกุลหยาบ 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) จากนั้นจึงคัดเลือกโคลนหนึ่งโคลนเป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มเพื่อใช้ในการตรวจสอบค้นหาความคล้ายคลึงกันเปรียบเทียบกับยีนหรือโปรตีนที่จัดเก็บอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank และพบว่าโคลนที่เลือกมานั้น มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ ไม่มีความคล้ายคลึงกับยีนใด ๆ ไปจนกระทั่ง มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งมีความคล้ายคลึงระหว่าง 81-99 % กับยีนบนโครโมโซมขององุ่นในตระกูล *Vitis* หรือยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่คาดว่าจะจะเป็นโปรตีนด้านทาน หรือ เอนไซม์ P-loop NTPase (ตารางที่ 3) ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโคลนตัวแทนพบว่า โคลน rgVhybNY507\_29, 80, 101 และ rgVvinBQ\_46 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด (มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนมากกว่า 90%) กับโปรตีนที่คาดว่าจะจะเป็น NBS-LRR โปรตีนด้านทาน หรือเอนไซม์ P-loop NTPase ซึ่งได้จากองุ่น *V. vinifera*, *V. riparia*, *V. aestivalis* และ *V. amurensis* และมีลำดับกรดอะมิโนประมาณ 49-57% ที่คล้ายคลึงกับโปรตีนที่คาดว่าจะจะเป็นโปรตีนด้านทานจาก *Malus prunifolia*, *Populus trichocarpa* และ *Helianthus annuus* ในทางตรงกันข้าม พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของโคลน rgVhybNY507\_13, 15, 27 และ rgVvinBQ\_53, 102 และ 106 นั้นมีความคล้ายคลึงที่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NBS-LRR โปรตีนที่คาดว่าจะจะเป็นโปรตีนด้านทาน หรือ เอนไซม์ P-loop NTPase จากองุ่นในตระกูล *Vitis* สปีชีส์ต่าง ๆ ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าว อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ในหลายตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่โคลนได้ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่ามี RGA บางโคลนที่มีลำดับของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงปานกลางกับโปรตีนด้านทานที่มาจากพืชชนิดอื่น 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 แต่มีลำดับของกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนที่คาดว่าจะจะเป็น NBS-LRR ขององุ่น *V. vinifera* และ *V. amurensis* ประมาณ 47-61 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังพบว่าลำดับกรดอะมิโนของโคลน rgVhybNY507\_22 ยังมีความคล้ายคลึงกับโปรตีนด้านทานชนิด NBS-LRR ซึ่งมาจากลูกผสมของกุหลาบ 46 % อีกด้วย ประการที่สอง โคลน rgVhybNY507\_90 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เกือบเหมือนกับยีนในโครโมโซมขององุ่น *V. vinifera* แต่กลับมีลำดับกรดอะมิโนที่ถอดรหัสได้จากโคลนดังกล่าวคล้ายคลึงกับโปรตีนที่คาดว่าจะจะเป็นโปรตีน 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 และการวิเคราะห์ 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 Modzhitov, 1999; Feys and Parker, 2000)

N-terminal domain แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือโปรตีน TIR และ non-TIR โดยโปรตีน TIR พบมากในพืชใบเลี้ยงคู่และเกี่ยวข้องกับโปรตีนในวิถีการส่งสัญญาณ (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 วิธี

การจัดเรียง (alignment) ลำดับกรดอะมิโนของโคลน RGA ตัวแทน 22 โคลน เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนเฉพาะส่วนที่เป็น NBS domain ของโปรตีนด้านทานที่ได้รับการตรวจสอบเป็นอย่างดีแล้ว 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 พบว่ามีโคลนจำนวน 59 โคลนที่มีลำดับกรดอะมิโนในบริเวณที่เป็น P-loop และ GLPL motifs ที่อนุรักษ์เหมือนกันมาก (33 โคลนมาจากองุ่นลูกผสมด้านทานโรค NY88.0507.01 และ 26 โคลนมาจากองุ่นพันธุ์อ่อนแอ Black Queen) ส่วนโคลนที่เหลือจำนวน 32 โคลน มีลำดับกรดอะมิโนในบริเวณ P-loop และ/หรือ GLPL motifs ที่ปรับเปลี่ยนไป (โดย 9 โคลนมาจากองุ่นลูกผสมด้านทานโรค 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 tryptophan (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 ประกอบด้วย โปรตีนตัวแทนที่โคลนจากองุ่นที่เหลืออีก 9 โคลน จัดกลุ่มร่วมกับโปรตีน RPS2 และ RPS5 จาก *Arabidopsis* ที่ทราบแน่ชัดว่าเป็นโปรตีนด้านทาน 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 น่าจะเป็นโปรตีนด้านทานชนิด 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 ตัวแทนกับโปรตีนด้านทานที่ทราบแน่ชัด พบว่าบางโคลนมีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนกับโปรตีนด้านทานที่ทราบแน่ชัดในระดับปานกลาง 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 ในขณะที่พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนที่เหมือนกับ 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 องุ่นลูกผสมสายพันธุ์ด้านทานโรค และพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคทั่วทั้งแผนภาพ phylogram ชี้ให้เห็นว่า โปรตีนเหล่านี้ อาจจะเป็นโปรตีนที่คล้ายกัน (paralogues) หรืออาจจะเป็นคู่ของอัลลีลที่กำหนดการสร้างโปรตีนที่ทำงานได้/ทำงานไม่ได้ซึ่งเกิดจากความผันแปรของยีน ในทางตรงกันข้าม โปรตีนเหล่านี้ อาจไม่

เกี่ยวข้องหรือไม่ได้เป็นโปรตีนต้านทานโรคราน้ำค้างและสแคบแต่อย่างใด หรืออาจเป็นไปได้ว่าบางโปรตีนในกลุ่มนี้ไม่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค แต่อาจจะเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่อื่น อาทิ เช่น เกี่ยวข้องกับกลไกการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (signal transduction) ดังที่กล่าวไว้โดย Meyers et al. (2003) ดังนั้น การศึกษานี้ นับว่าเป็นหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่า การโคลนยีนที่กำหนดการสร้าง RGA's นั้นสามารถทำได้ทั้งในอณูที่ต้านทานหรืออ่อนแอต่อโรค แต่อย่างไรก็ดี จำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไปในอนาคต โดยมุ่งเป้าไปที่การนำองค์ความรู้ที่ได้นี้ไปใช้ประโยชน์ในการที่จะโคลนยีนต้านทานชนิดใหม่ ๆ การกำหนดตำแหน่งยีนต้านทานบนแผนที่ รวมไปถึงการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อนำไปสู่การคัดเลือกพันธุ์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล เพื่อให้ได้อณูที่มีความต้านทานโรคในระดับที่พึงพอใจ

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

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

\* Expected value (E-value) หมายถึงจำนวนคู่เหมือน (matches) ที่คาดว่าจะได้จากความบังเอิญเท่านั้น ซึ่ง E-value มีค่าน้อยยิ่งสนับสนุนการจับคู่เหมือน

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

โคลนตัวแทน	จำนวน/ กลุ่ม	นิวคลีโอไทด์ (BLASTn)	GenBank accessions ซึ่งมีความคล้ายคลึงสูงสุด						
			Score (bit)	E -value*	Identity/ coverage (%)	โปรตีน (BLASTx)	Score (bit)	E -value*	Identity/ coverage (%)
rgVcin139 (DQ885297)	6	<i>V. amurensis</i> isolate rgVamu053 resistance protein candidate gene, partial cds AY427102.1	859	0.0	97/94	Resistance protein candidate [ <i>V. amurensis</i> ] AAR08814.1	273	5e-72	95/94
rgVcin152 (DQ885298)	8	<i>V. vinifera</i> , whole genome shotgun sequence, contig VV78X005680.17, clone ENTAV 115	774	0.0	94/92	Unnamed NBS-LRR protein candidate [ <i>V.</i> <i>vinifera</i> ] CBI15532.3 Leucine-rich repeat containing protein, putative [ <i>Ricinus communis</i> ] XP_002529624.1	141 131	3e-32 3e-29	55/82 47/82
rgVcin165 (DQ885299)	3	<i>V. vinifera</i> contig VV78X110871.5, whole genome shotgun sequence AM457506.2	780	0.0	94/95	Unnamed NBS-LRR protein candidate [ <i>V.</i> <i>vinifera</i> ] CBI33320.3 Resistance protein candidate [ <i>V. amurensis</i> ] AAR08818.1	318 295	2e-85 2e-78	94/98 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) ที่คาดว่าจะได้จากความบังเอิญเท่านั้น ยิ่ง E-value มีค่าน้อย ยิ่งสนับสนุนการจับคู่เหมือน



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

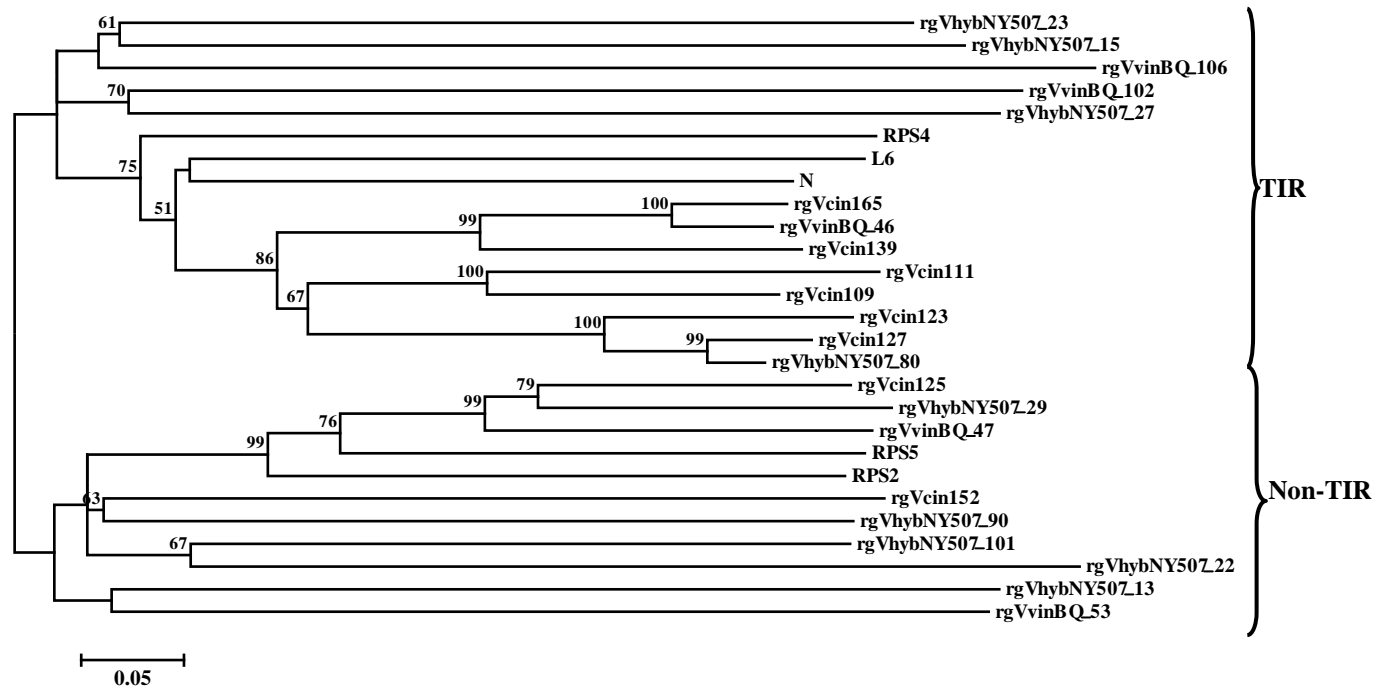
\* Expected value (E-value) หมายถึงจำนวนคู่เหมือน (matches) ที่คาดว่าจะได้จากความบังเอิญเท่านั้น ยิ่ง E-value มีค่าน้อย ยิ่งสนับสนุนการจับคู่เหมือน

	<u>P-loop</u>	<u>RNBS-A</u>	<u>Kinase-2</u>		
	20	40	60	80	
	*	*	*	*	
rgVhybNY507_29	GGVGRKTTLLNRINN	EFLKSRVGFDAVITWVSRPANVE	KVQQVFNKLEIPSNWEGRSEDE	RKEAIFNVLKMKRIVALLDL	WEPLDLFVAVGIPPVNDGN
rgVhybNY507_27	VTRRVNAKCSG	CEDMIITDWSTYVACSDARRK	TIYHYLSVSRDEADSLYSEMSR	WQLYYCSGSGYSSRFCTR	RIGRESDEISLLLWGGIEQSCL
rgVcin125	NSGGVGRKTTLLKRIND	DFLQTYEVVDVWVWVQGNVVE	KVQETVSNKLEIAEYKWKDRSV	HE-RAEETVSVLQTKRFFVLDL	HWKLDLLEVGIPLPLNDQK
rgVcin152	PREIPLLGGWRRLLGQTYIMMG	EFAHPEKRMVWVCSFDFVKR	LLKHEITTSATHGKC	DDLPMDELARLLINVD	DDKRFLLDLDVWSK-NRDKWLEL
RPS4	GIGKTTLLKELYK	TWQGFPSRHALLDQIRVSKSH	LELDRLPQMLGELSKLNHPVDN	LKDPYSQHEHREKVLVLDL	WSKR-EQIDALREILDWIK
rgVvinBQ_46	GGVGRKTTIAKATYN	EISHQYDGSSEFINIRERSKG	DILQOQEBLHGILLRQGN	FKINNVDIGISMKRCR	TSNFVLFVFDVDEL-KOLEYLA
rgVhybNY507_15	GGGKTTIVNASYN	QISLOQYGSLLRDMTERSNR	EIPFHREHLHGADRNF	FYINNINIAKSMINRG	SPNOVLFHFDMDKQICILSK
rgVvinBQ_53	CPWEGKTTLLNSINN	AFLGSRVGLTHFLGLCPDQMW	RLSKFFSSTISEIPSNWEGRSE	NERKEGIFNVNLIKIDRFIDH	WTTVDLLSLCIPDDEGSI
rgVhybNY507_22	QILTKMIC	FSIVAMVVISHPNDLM	KNVQCVAVMLNKLKG	EASETGFMFKVRETDYERH	DDCCNNHREHTEKNGIMKDR
rgVhybNY507_13	GCRKRPSCSRWVQR	LTTDATVSACDKSGDIPSEFD	ENSHAIVHICRAS	KKRICLRRQDENNEEGKSL	FLDDRWTIELESELGITRAIQSL
N	GGVGRKTTIARAFD	LTLLGRMDSSYQDGCAGFK	KIKENKRG	MHSQNALHSELLEK	ANYNNEEDGKHQMASR
rgVvinBQ_102	LSKEGLSIVYQQFGN	DCSGVGVCKLAGGVY	YHNKIVYNSPDRLAFGKKQ	QSHFYTTWRCE	NKLTENCRSIMS
rgVhybNY507_23	GGVGRKTTIARAFD	LTLLGRMDSSYQDGCAGFK	KIKENKRG	MHSQNALHSELLEK	ANYNNEEDGKHQMASR
L6	GIGKTTIAKAVYN	KISSCFDCCCFDNIRETQEK	DGVVVQKKEIVSEILR	IDSQSVGFNDSGGRKT	IKERVSRKILVLDL
rgVhybNY507_101	GGVGRKTTMVKOVGAN	AHRDGLFQHVAMAVISQNPDL	R	KIQACADMLNKLKE	ESEAGRAARLRERIR
rgVhybNY507_90	WGGEDDSTLAKKVYN	DVKQHFDCAWYVVSQYRTR	D	LFEBLNCVTNEKIR	IMRELDSEAAVGIENRNF
rgVcin109	GGVGRKTTIAKAVYN	NISHQFESRIFFENVRERSK	DQSSLLQKKE	LNGVVGKGN	LEISNVHGEDIVIRNR
rgVvinBQ_106	LVQTSWGRFCLK	DLRQLSPSLFLNMYPPDLFP	PRGGPTALAFVSRCL	FFTFPLP	CFSTVNI
rgVcin127	RPRELPRWGGEDDYQLFY	PISSQFEGISFANIREVSKN	CGLLPLQKQL	LDGDLMGWS	QRIS-VDBGINVIMDR
rgVhybNY507_80	GGVGRKTTIAKAVYN	LISSQFEGISFANIREVSKN	CGLLPLQKQL	LDGDLMGWS	QRISNVHGEDIVIRNR
RPS2	GGVGRKTTMQSINN	ELITKHQYDVLVWQMSRFEGEC	T	QQAGARGLGS	WDEKETGENRALKIYRA
rgVvinBQ_47	GGVGRKTTLLKRINN	EFLETSFEFDKVIWVVSQYRTR	D	LFEBLNCVTNEKIR	IMRELDSEAAVGIENRNF
RPS5	GGVGRKTTLLTKINN	KFSKIDDRFDVWVWVSSSTV	R	QRDRAEKVGLGMEWSEK	NDNQ-IAVDLHVREKRFV
rgVcin165	NSIGGVGRKTTIAKATYN	EISNQYDGSSEFINIRERSKG	DILQOQEBLHGILLRQGN	FKINNVDIGISMKRCR	TSNFVLFVFDVDEL-KOLEYLA
rgVcin139	GNSIGGVGRKTTIAKAVYN	DISCFDGSSEFINVRERSK	NALQOQEBLHGSLKGS	LKVSNMDEGIQMIKRS	SSSKVLFVFDVDEL-MQIENLA
rgVcin123	GKFFLLGGWRRLIAKAVYN	LISSQFEGISFANIREVSKN	CGLLPLQKQL	LDGDLMGWS	QRISNVHGEDIVIRNR
rgVcin111	IPLGGWRRLIAKAVYN	NISHQFESRIFFENVRERSK	DQSSLLQKKE	LNGVVGKGN	LEISNVHGEDIVIRNR

	<u>RNBS-B</u>	<u>RNBS-C</u>	<u>GLPL</u>	
	120	140	160	180
	*	*	*	*
rgVhybNY507_29	KSKVFTTRFSTVCRDMG	AKG-IEVKCLAWEEAFAF	QAYVGEDT	IYSHPHIKAEATAAKECDGLP
rgVhybNY507_27	KSCQWRSSQDIDGVSLEAR	KRSILRFRQEAFFKRAS	PANDYKMSDNVLQKDKGLP	
rgVcin125	KSKVFTTRFSTVCHDMG	AKS-IEVECLAWEEAFAF	FRTRKVGEDT	LDSHPDIQKDAEIVFVKECKGLP
rgVcin152	GAKGSKITVVRDKLWASMGTC	PMYELKGLSDSEELCS	FIITCAFDDR	DKYPRIVYKGDIVCRPPPRE
RPS4	EGKEGSRVVIATSDMSLTNGLVD	DTYMVQNLNHRDLSLQ	FHYHAFIDQANPKDKFMK	SEGFVHYARGHGLP
rgVvinBQ_46	RAKSTIITTRDKHVLQAYGA	DILYEVSKLNQEEAIE	PSLWAFKQN	CPQEVYKMSYNIIDYADGLP
rgVhybNY507_15	AGPSLHVLNTVCVVIMSIGHQNI	RGRTRSTQRTVLVLC	VEQKCDRAGNIFYIHSTPL	PHMYITILLRDGSGAT
rgVvinBQ_53	T-TVFCALMRSALLALSFLDYH	STRFLPLMTLQAQLGSL	IPVSPHHTRLN	SGSFAGQEADPVSYDQVPL
rgVhybNY507_22	LMRSNFIITLNSHKADKCGMSS	KCKQKYFLFSRNR	INGLCLTRQGES	FILLILISEIRTFSRNMLGLP
rgVhybNY507_13	FMLCKSEITLSILQNVQVIQT	QGLPKMKGDKAPNDQ	VVGHILIRKRYRNGASF	IEGVPKHPKKNVREL
N	GNGSRIITTRDKHILKDKND	IYEVTALEPDHESI	QKQAHAFGKE	VPNENFEKLSLEVVNYAKGLP
rgVvinBQ_102	QETIAFFIFCITKVVIPWGA	DIRQEFRLSREVAID	EFLCWLAIKQN	CPQEVYTPKGYNIIDYAD
rgVhybNY507_23	AKRAFIITEDMRLEFRFVGE	ISKVSKLDKQCCDIWV	VPLTKSSQGK	FYDPAHKKRFRVLCYWPAGRY
L6	ISQSRFITTRSRMRVLGTLN	EQCKLYEVGSMSPRSL	EFSKHAFFKN	TPPSYETLANDVDTTAGLPLT
rgVhybNY507_101	ACKSKITLITRLENVCHVMES	QAKVPLNILESQDSWT	FRGRKAGRIVD	SPDFHNAQKIVKECGGLPLNG
rgVhybNY507_90	YGSRVITTRSRNKEVALHANS	HLHELHPLNEMESSE	EFLRKMGSST	LAWPQGLEKGTETIVAKCKGLP
rgVcin109	GPRSRIITTRDQHCLNVLGVD	ASYEV-KALNVEESI	QFCQAHAFQON	IPKSDYVDSNHEVNYVNGLPL
rgVvinBQ_106	IPAVTSLFSGSYFCTHVYPQLSS	LFSPLSLCTPGELLY	CRCPSTYLNFSYSPSDAR	LVIILLFYPA
rgVcin127	GIG-IVITTRDK-LLNVHG	SEIYEAKE-EPE-ALQ	FSQYAFKRR	S-KDYMMSD-VVHYAKGLPDP
rgVhybNY507_80	GIGSRIITTRDKHLLNVHGV	SEIYEAKELEPEEALQ	FSQYAFKRR	SPEDKYMMSDNVLYHYAKGLPKC
RPS2	KCKVFTTRSRIALCNMGM	ABYKLRVFELEKHAWE	FCSKVWRKD	LLESSSIRRAEITVSKCGGLPL
rgVvinBQ_47	MSKVITTRFLNVCEAMG	AES-IKVECLKFKDAFA	FQSNVGEAT	FNSHPRIPKIAKIVVEECKGLP
RPS5	GCKVAFTRSRDVCGRMG	VDDPMEVSLQPEESWD	FQMKVGNK	LGSHDIPGARKVARKCRGLP
rgVcin165	HAKSTIITTRDKHVLQAYGA	DIPYEVSKLNKEEATE	PSLWALKQN	HPQEVYKMSYNIIDYADGLP
rgVcin139	GPRSRIITTRDKHFLTYQGV	IESYEVKLNHDAEATE	PSWAFKQN	LPNEIYKMSYQVVNYAKGLP
rgVcin123	GIGSRIITTRDK-PSAKCA	MEVKYMLRNNQRKLFNF	SVNMLSKV	KSPEDYMSDNVLYHYAKGLP
rgVcin111	GLKSRIITTRDRHCLNVHGV	ASVYKVTGKIVGVPTFL	STCLTQHSKLC	KPLRSCIRLCEP

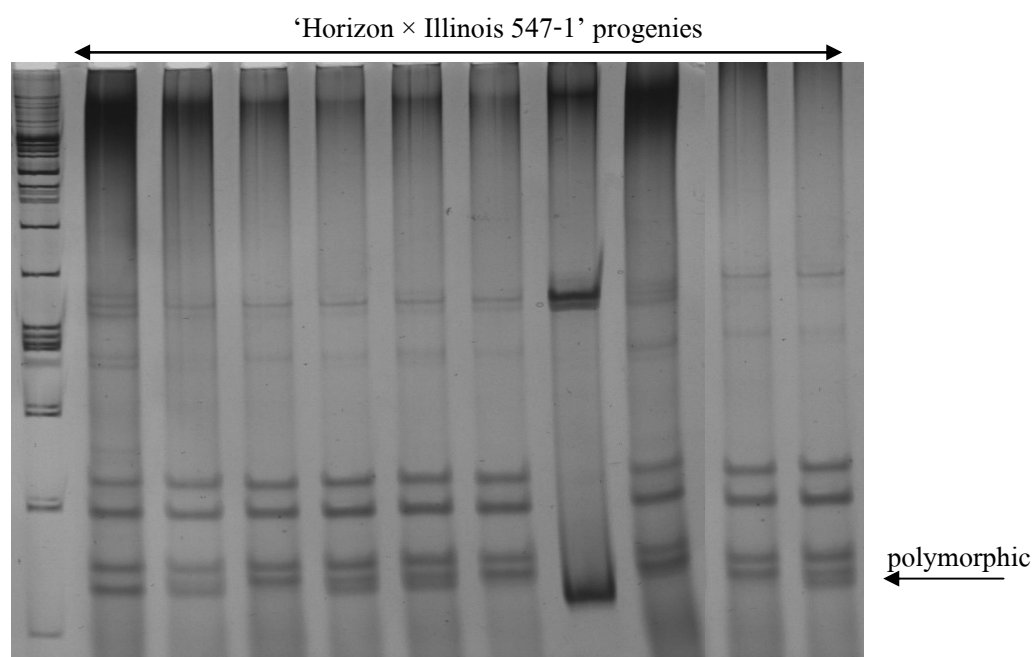
ภาพที่ 3 Multiple alignments จากการวิเคราะห์กรดอะมิโน (translated) ของ โคลนตัวแทน RGA 22 โคลน ซึ่งแยกจาก *V. vinifera* 5 โคลน *V. cinerea* 8 โคลน และ *V. hybrid* 9 โคลน เปรียบเทียบกับโปรตีนด้านทานที่ทราบแน่ชัด 5 โปรตีน โดยใช้โปรแกรม MEGA4 แสดงกรดอะมิโนซึ่งมีลักษณะอนุรักษ์ด้วยกล่องสีดำและเทา ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้คือ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



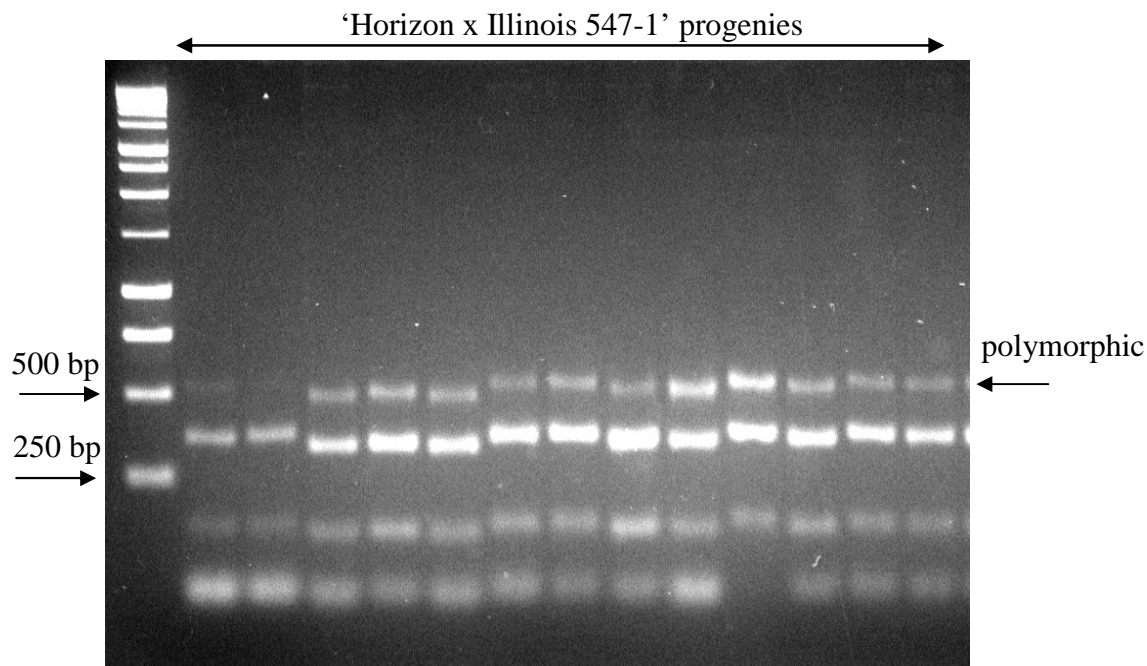
ภาพที่ 4 Phylogram ซึ่งสร้างโดยอาศัยข้อมูลที่ได้จาก sequence alignment ของกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Clustal W แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง RGA ซึ่งโคลนมาจาก *V. vinifera* (rgVvin), *V. cinerea* (rgVcin) และ *V. hybrid* (rgVhyb) เปรียบเทียบกับ โปรตีนด้านทานที่ทราบแน่ชัดว่าเป็น NBS-LRR ชนิด TIR (RPS4, L6 และ N)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

### การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจาก RGAs

ทำการพัฒนาเครื่องหมาย STS จาก RGAs ที่โคลนด้วยไพรเมอร์ P-loop/ GLPLAL-1 จาก อนุพันธุ์ป่า *V. cinerea* B9 จำนวน 8 เครื่องหมาย คือ rgVcin109, rgVcin111, rgVcin123, rgVcin125, rgVcin127, rgVcin139, rgVcin152, rgVcin165 เมื่อนำเครื่องหมายดังกล่าวมาทดสอบกับอนุพันธุ์ด้านทานต่อโรคราน้ำค้าง Illinois 547-1 พันธุ์อ่อนแอ Horizon และลูกผสมระหว่างพันธุ์ด้านทานและพันธุ์อ่อนแอ พบว่าเครื่องหมาย rgVcin 152 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในอนุพันธุ์ดังกล่าวได้ จึงได้เครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างระหว่างจีโนมไทป์ของอนุพันธุ์จำนวน 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 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของอนุพันธุ์ลูกผสม Horizon x Illinois 547-1 จากการวิเคราะห์ด้วย เครื่องหมาย rgVcin125



ภาพที่ 6 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของรุ่นลูกผสม Horizon × Illinois 547-1 จากการวิเคราะห์ด้วย เครื่องหมาย stkVa011

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

การใช้ chi-square goodness-of-fit เพื่อทดสอบเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างในลูกผสมระหว่างพันธุ์ด้านทานและพันธุ์อ่อนแอ 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 ปรากฏแถบดีเอ็นเอในทั้งพันธุ์ด้านทานและอ่อนแอ ทำให้การหาความสัมพันธ์ระหว่างแถบดีเอ็นเอ และอัลลีลด้านทานหรืออัลลีลอ่อนแอทำได้ยาก



สำหรับ rgVamu085 ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอเฉพาะในพันธุ์ด้านทาน พบว่าในกลุ่มลูกผสมด้านทานต่อโรคราน้ำค้าง 58 ต้น ซึ่งคาดว่าควรมีแถบดีเอ็นเอ มีเพียง 15.5% เท่านั้นที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ซึ่งให้เห็นว่าเครื่องหมายนี้อาจอยู่ใน linkage group เดียวกับอัลลีลด้านทาน แต่อาจไม่ได้อยู่ใกล้ชิดมาก (tightly linked) แม้ว่าเครื่องหมายดังกล่าวจะอยู่ห่างจากยีนด้านทานเกิน 5 cM ซึ่งจำกัดการใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์ แต่อาจเป็นประโยชน์ในการกำหนดตำแหน่งยีนด้านทานในแผนที่ยีน เมื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มขึ้นในอนาคต นอกจากนี้ในอนาคตจะมีการพัฒนาเครื่องหมาย RGA-STS และเครื่องหมายชนิดอื่นเพิ่มเติมเพื่อหาเครื่องหมายที่ link กับยีนด้านทาน โรคราน้ำค้างอย่างใกล้ชิด 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  $\times$  (*V. rupestris*  $\times$  *V. cinerea*)), NY 65.0550.04 ((Jaeger 70 (*V. rupestris*  $\times$  *V. linsecumii*)  $\times$  Victoria's Choice)  $\times$  (Seyve Villard 23-18 selfed)) และ NY 65.0551.05 ((Jaeger 70 (*V. rupestris*  $\times$  *V. linsecumii*)  $\times$  Victoria's Choice)  $\times$  Lady Patricia (S.14664  $\times$  S.V. 20-365)) ซึ่งต้านทานต่อโรคราน้ำค้างและราแป้ง จากการประเมินที่สถานีทดลองทางการเกษตร New York State Agricultural Experiment Station (NYSAES) มหาวิทยาลัย Cornell ประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นเวลาหลายปี จีโนไทป์เหล่านี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมขององุ่นอเมริกันหลายสปีชีส์ เช่น *V. cinerea*, *V. rupestris* และ *V. linsecumii* ในประวัติพันธุ์ (ภาพที่ 8) เมื่อผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่แบบครบทุกชุด ขนาด 3  $\times$  3 ชุด โดยผสมกับพันธุ์แม่ พันธุ์ละ 15 ซ่อ รวม 45 ซ่อ ที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในปี พ.ศ. 2547 ตามวิธีของ Reisch and Pratt (1996) พบว่าติดผลทั้งหมด 36 ซ่อ 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) และต้นพันธุ์พ่อและแม่มาใช้ในการประเมินความต้านทานโรคราน้ำค้างพบว่าลูกผสมที่มีองุ่นพันธุ์ Black Queen เป็นพันธุ์แม่มีการเจริญเติบโตทางลำต้นดีและสมบูรณ์แข็งแรงเช่นเดียวกับพันธุ์ Black Queen ส่วนลูกผสมของพันธุ์ Carolina Black Rose มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงขนาดเมล็ดเท่ากับลูกผสมของพันธุ์ 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 เนื้อแน่นและเหนียว เจริญเติบโตรวดเร็ว แข็งแรงมาก อ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง
- C) Italia: ผลสีเหลืองด้าน ช่อผลขนาดปานกลาง ผลขนาดใหญ่ เปลือกหนา เนื้อแน่น เจริญเติบโตรวดเร็ว แข็งแรง และให้ผลผลิตสูง อ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง

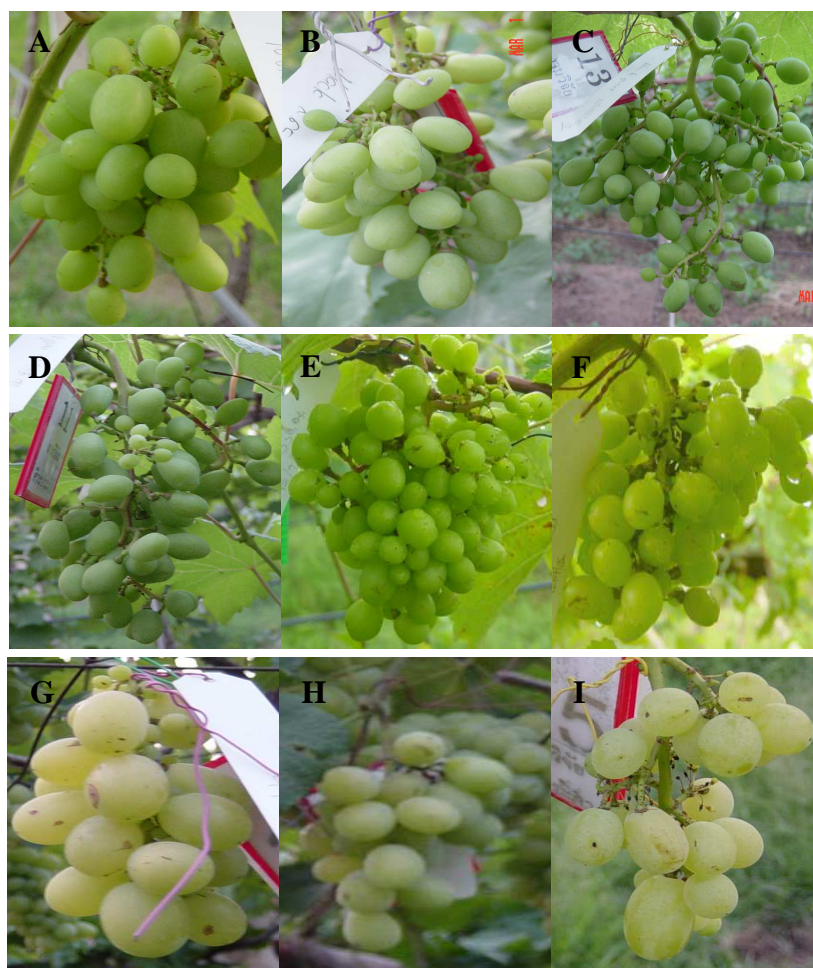


ภาพที่ 8 องุ่นลูกผสมที่ใช้เป็นพันธุ์พ่อในการวิเคราะห์ gca และ sca

- A) NY 88.0517.07: ผลสีม่วง ช่อผลขนาดใหญ่ค่อนข้างกลม 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 ผลขนาดใหญ่มากปานกลาง รสชาติปานกลาง มักไม่ค่อยสะสมน้ำตาล เจริญเติบโตและ แข็งแรงปานกลาง และให้ผลผลิตปานกลาง ต้านทานต่อโรคราแป้งบนผล แต่อาจอ่อนแอต่อโรคราแป้งบนใบ

ตารางที่ 4 จำนวนช่อที่ผสมติดจากงุ่น 9 คู่ผสม

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



ภาพที่ 9 ช่องุ่นทั้ง 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

วิเคราะห์ห่าเวียนซ์และ mean square จากข้อมูลพันธุ์พ่อแม่และลูกผสม  $F_1$  (ตารางที่ 5) พบว่าค่าเฉลี่ยการเกิดโรคระหว่างจีโนไทป์อ่อนทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) เมื่อพิจารณาระหว่างอ่อนลูกผสม  $F_1$  กับพันธุ์พ่อแม่ พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) แสดงว่าลูกผสมบางต้นมีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างสูงกว่าพันธุ์พ่อแม่ และเมื่อพิจารณาระหว่างจีโนไทป์ในกลุ่มพันธุ์พ่อแม่และระหว่างจีโนไทป์ในกลุ่มลูกผสม  $F_1$  พบว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ซึ่งบ่งชี้ว่าในแต่ละกลุ่มประชากรมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง

ตารางที่ 5 ค่า mean square จากการวิเคราะห์ห่าเวียนซ์ของการเกิดโรคราน้ำค้าง

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 จำนวนของสปอร์ราน้ำค้างในอ่อนพันธุ์ Black Queen สูงถึง 178.5 สปอร์/พื้นที่ใบ 25 ตร.ซม. (ระดับคะแนน 4.15) ขณะที่จำนวนสปอร์สูงสุดที่พบในอ่อนพันธุ์ 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 โดยพบว่าอ่อนพันธุ์ 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 พบว่าอุณหภูมิสายพันธุ์ NY 88.0517.01 (ระดับคะแนน 0.48) และ NY 65.0551.05 (ระดับคะแนน 0.46) แสดงความต้านทานโรคราน้ำค้างสูงกว่าอุณหภูมิสายพันธุ์ NY 65.0550.04 (ระดับคะแนน 0.96) (ตารางที่ 6) ซึ่งกลุ่มสมเดี่ยวยระหว่าง NY 65.0550.04 และ Carolina Black Rose แสดงคะแนนความต้านทานโรคราน้ำค้างสูงที่สุด แม้ว่า NY 65.0550.04 ไม่แสดงความต้านทานสูง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสมรรถนะของการรวมตัวจำเพาะ

อุณหภูมิผสม  $F_1$  ของกลุ่มสมระหว่างพันธุ์ต้านทานกับพันธุ์อ่อนแอ แสดงระดับความต้านทานจากต้านทานมาก (ระดับคะแนน = 0) จนถึงอ่อนแอกว่า (ระดับคะแนน = 5) ซึ่งระดับความต้านทานโรคราน้ำค้างของลูกผสม  $F_1$  สามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม คือ ต้านทาน (ระดับคะแนน = 0 และ 1); ปานกลาง (ระดับคะแนน = 2 และ 3) และอ่อนแอ (ระดับคะแนน = 4 และ 5) พบว่าอุณหภูมิผสม  $F_1$  ส่วนใหญ่อ่อนแอ (52.9%) พบลูกผสมที่ต้านทาน 28.2% และปานกลาง 18.8% (ตารางที่ 7)

กลุ่มสม Black Queen  $\times$  NY 65.0550.04, Black Queen  $\times$  NY 65.0551.05, Carolina Black Rose  $\times$  NY 65.0551.05, Italia  $\times$  NY 88.0517.01, Italia  $\times$  NY 65.0550.04 และ Italia  $\times$  NY 65.0551.05 ให้จำนวนต้นที่ต้านทานต่ำ 5.3-33.3 % และพบจำนวนต้นอย่างน้อยครั้งหนึ่งจากกลุ่มสมทั้งหมด แสดงความอ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง แสดงว่ายีนควบคุมความต้านทานโรคราน้ำค้างในอุณหภูมิผสมแม่อยู่ในสภาพพันธุ์ทาง นอกจากนี้ รูปแบบการกระจายตัวของยีนบ่งชี้ว่ามียีนอย่างน้อย 2 ยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคราน้ำค้างในประชากรนี้ ซึ่งการศึกษาในอนาคตจำเป็นต้องศึกษาในประชากรที่ใหญ่ เพื่อประเมินจำนวนยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคราน้ำค้างได้อย่างถูกต้อง

กลุ่มสมระหว่างอุณหภูมิสายพันธุ์ 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 กลุ่มสม Carolina Black Rose  $\times$  NY 65.0550.04 ให้จำนวนต้นที่ต้านทานมากที่สุด (75.0%) และจำนวนต้นที่อ่อนแอน้อยที่สุด (12.5%) แสดงให้เห็นว่ากลุ่มสม Carolina Black Rose  $\times$  NY 65.0550.04 เป็นกลุ่มสมที่ดีที่สุดสำหรับใช้ผลิตลูกผสมที่มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในโครงการปรับปรุงพันธุ์อุณหภูมิ

ตารางที่ 6 การประเมินโรคราน้ำค้างของพันธุ์พ่อแม่โดยวิธีตัดใบมาวิเคราะห์

จีโนไทป์	โรคราน้ำค้าง (ระดับคะแนน) <sup>a</sup>	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

<sup>a</sup> 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<sub>1</sub> จาก 9 คู่ผสม

คู่ผสม	การประเมินโรค (จำนวนต้น (เปอร์เซ็นต์)) <sup>a</sup>		
	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%)

<sup>a</sup> 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 อนุกรมผสมแต่ละคู่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $p < 0.01$ ; ตารางที่ 8) โดยค่า mean square ของ gca พันธุ์พ่อกว้างกว่าพันธุ์แม่ บ่งชี้ว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์พ่อสูง ดังนั้นจึงคาดว่าพันธุ์พ่อเป็นจีโนไทป์ที่มีฮีนด้านทานโรคราน้ำค้างอยู่ในขณะที่พันธุ์แม่เป็นพันธุ์ที่มีฮีนอ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง และพบว่า วาเรียนซ์ของ gca ของพันธุ์พ่อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) ส่วนวาเรียนซ์ของ gca ของพันธุ์แม่ไม่แตกต่างกัน และปฏิกริยาระหว่างพันธุ์พ่อและแม่ซึ่งประเมินโดยวาเรียนซ์ของ sca พบว่า ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) บ่งชี้ว่าผลของฮีนแบบบวกสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์อนุกรมให้ต้านทานโรคราน้ำค้างในประชากรนี้

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 ซึ่งให้เห็นว่าพันธุ์พ่อที่ใช้ในการทดลองให้ผลของฮีนแบบบวกสูงกว่าพันธุ์แม่ อัตราพันธุกรรมอย่างแคบสำหรับความต้านทานโรคราน้ำค้างในประชากรนี้มีค่า 55.6% ซึ่งเป็นผลมาจากฮีนแบบบวกมากกว่าฮีนที่ไม่เป็นแบบบวก อย่างไรก็ตามพบว่าผลของฮีนที่ไม่เป็นแบบบวกและอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมมีค่าค่อนข้างสูงในการทดลองนี้ ซึ่งแตกต่างจากค่าอัตราพันธุกรรมอย่างแคบสำหรับความต้านทานโรคราน้ำค้างที่รายงานโดย Brown et al. (1999b) (88.0%) ทั้งนี้อาจเนื่องจากพันธุ์ต้านทานโรคที่ใช้ศึกษาต่างกัน จึงอาจมีฮีนต้านทานที่ต่างกัน หรือสภาพแวดล้อมในการทดลองต่างกัน

ตารางที่ 8 ค่า mean square จากการวิเคราะห์วาเรียนซ์สำหรับปฏิกริยาการเกิดโรคราน้ำค้างในอนุกรม

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 ที่คำนวณจากค่าเฉลี่ยของปฏิกริยาการเกิดโรคในพันธุ์พ่อแม่แต่ละพันธุ์ แสดงในตารางที่ 9 และ 10 ระดับคะแนนการเกิดโรคราน้ำค้าง เท่ากับ 0 แสดงว่าต้านทานมาก และ 5 แสดงว่าอ่อนแอมาก ดังนั้น ค่าคิดลบของ gca และ sca คือ ความต้านทาน ส่วนค่าบวก คือ อ่อนแอ พบว่าอุณหภูมิสายพันธุ์ NY 65.0551.05 แสดงค่า gca เป็นบวกจึงไม่ควรเลือกใช้ ส่วนอุณหภูมิสายพันธุ์ NY 88.0517.01 และ NY 65.0550.04 มีค่า gca คิดลบ (-0.46 และ -0.37 ตามลำดับ) แสดงว่าจีโนไทป์เหล่านี้อาจเป็นพันธุ์พ่อแม่ที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์อุณหภูมิให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง ในทางตรงกันข้าม ผลของ gca ในอุณหภูมิแม่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และพบว่าอุณหภูมิสายพันธุ์ Black Queen มีความอ่อนแอต่อโรคราน้ำค้างมากที่สุด โดยแสดงค่า gca เป็นบวก ขณะที่อุณหภูมิสายพันธุ์ Carolina Black Rose และ Italia แสดงค่า gca เป็นลบ ดังนั้นอุณหภูมิสายพันธุ์ Black Queen ไม่ควรใช้ในการผสมข้าม (ตารางที่ 10)

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

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยของปฏิบัติการการเกิดโรค

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

<sup>a</sup> 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

นอกจากลูกผสมจากกลุ่มผสมที่ใช้ในการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะ 9 กลุ่มผสมที่กล่าวมาแล้ว ยังทำการผสมเพิ่มอีก 4 กลุ่มผสม 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 กลุ่มผสม ในจำนวนนี้เป็นลูกผสมที่มีความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในระดับต้านทานมากจำนวน 13 ต้น (ตารางที่ 11) อย่างไรก็ตาม การประเมินโรคราน้ำค้างด้วยวิธีตัดใบมาวิเคราะห์อาจให้ผลต่างจากในสภาพไร่ จึงทำการติดตาม หรือตอจนถึงลูกผสมเหล่านี้ แล้วนำออกปลูกในสภาพไร่ เพื่อประเมินโรคราน้ำค้างและโรคอื่น ๆ ในสภาพไร่เป็นเวลาหลายปี และประเมินการเจริญเติบโต คุณภาพผล และผลผลิตในโครงการปรับปรุงพันธุ์ระยะที่สองต่อไป

ตารางที่ 11 ระดับความต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในอุนุ่นลูกผสมโดยการให้คะแนนจำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม.

คู่ผสม	ลูกผสม	คะแนนจำนวนสปอร์	ระดับความต้านทานโรค
<b>Black Queen x NY88.0517.01</b>	SUT0401.06	4.67 <sup>1/</sup>	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
	SUT0401.19	2.75	ต้านทานปานกลาง
	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	
<b>Black Queen x NY65.0550.04</b>	SUT0402.01	4.67	อ่อนแอมาก
	SUT0402.06	3.67	อ่อนแอ
	SUT0402.08	1.50	ต้านทานปานกลาง
	SUT0402.14	3.00	อ่อนแอปานกลาง
	SUT0402.30	4.00	อ่อนแอ
SUT0402.54	0.75	ต้านทาน	
<b>Carolina Black Rose x Wilcox 321</b>	SUT0403.03	3.75	อ่อนแอปานกลาง
	SUT0403.09	0.00	ต้านทานมาก

<sup>1/</sup>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 ระดับความต้านทานต่อโรคน้ำค้างในองุ่นลูกผสมโดยการให้คะแนนจำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม. (ต่อ)

คู่ผสม	ลูกผสม	คะแนนจำนวนสปอร์	ระดับความต้านทานโรค
<b>Calorina Black Rose x NY88.0517.01</b>	SUT0404.02	5.00	อ่อนแอมาก
	SUT0404.03	4.50	อ่อนแอมาก
	SUT0404.08	0.25	ต้านทานมาก
	SUT0404.11	0.00	ต้านทานมาก
	SUT0404.12	0.50	ต้านทาน
	SUT0404.14	5.00	อ่อนแอมาก
	SUT0404.15	5.00	อ่อนแอมาก
	SUT0404.20	4.33	อ่อนแอ
	SUT0404.36	0.00	ต้านทานมาก
<b>Calorina Black Rose x NY65.0550.04</b>	SUT0405.02	1.00	ต้านทาน
	SUT0405.03	0.67	ต้านทาน
	SUT0405.05	4.67	อ่อนแอมาก
	SUT0405.13	0.50	ต้านทาน
	SUT0405.14	1.25	ต้านทาน
	SUT0405.15	2.00	ต้านทานปานกลาง
	SUT0405.17	0.33	ต้านทานมาก
<b>Calorina Black Rose x NY65.0551.05</b>	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
	SUT0406.09	4.67	อ่อนแอมาก
	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

<sup>1/</sup>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 ระดับความต้านทานต่อโรคน้ำค้างในองุ่นลูกผสมโดยการให้คะแนนจำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม. (ต่อ)

คู่ผสม	ลูกผสม	คะแนนจำนวนสปอร์	ระดับความต้านทานโรค
<b>Italia x NY88.0517.01</b>	SUT0407.03	0.67	ต้านทาน
	SUT0407.06	2.33	ต้านทานปานกลาง
	SUT0407.14	2.67	ต้านทานปานกลาง
	SUT0407.17	2.50	ต้านทานปานกลาง
<b>Italia x NY65.0550.04</b>	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
<b>Italia x NY65.0551.05</b>	SUT0409.03	0.67	ต้านทาน
	SUT0409.04	4.50	อ่อนแอมาก
	SUT0409.06	4.25	อ่อนแอ
	SUT0409.21	2.25	ต้านทานปานกลาง
<b>Black Queen x NY65.0550.04</b>	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
<b>Black Queen x Wilcox</b>	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

<sup>1/</sup>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 ระดับความต้านทานต่อโรคน้ำค้างในองุ่นลูกผสมโดยการให้คะแนนจำนวนสปอร์ต่อพื้นที่ใบ 25 ตร. ซม. (ต่อ)

คู่ผสม	ลูกผสม	คะแนนจำนวนสปอร์	ระดับความต้านทานโรค
<b>Black Queen x Wilcox</b>	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
<b>Early Muscat x NY65.0551.05</b>	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
<b>Early Muscat x NY88.0517.01</b>	SUT0413.18	5.00	อ่อนแอมาก

<sup>1/</sup>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 จากองุ่นทั้งสามจีโนมไปรวม 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 นอกจากนี้ยังพบว่าโคลนเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนต้านทานในพืชหลากหลายชนิด อาทิเช่น แอปเปิ้ล (*Malus*) กุหลาบ (*Rosa*) ทานตะวัน (*Helianthus*) ไม้สกุล พยุง (*Populus*) ถั่ว chickpea (*Cicer*) ละหุ่ง (*Ricinus*) และ โกโก้ (*Theobroma*) ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ค้นพบโคลนใหม่จำนวน 3 โคลน คือ rgVhybNY507\_22, rgVhybNY507\_23 และ rgVhybNY 507\_90 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนแตกต่างจาก 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 ตัวแทนที่โคลนได้จากอุนพันธุ์ป่า อุนลูกผสมสายพันธุ์ต้านทานโรค และพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคทั่วทั้งแผนภาพ phylogram ซึ่งให้เห็นว่า 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) บ่งชี้ว่าผลของยีนแบบบวกสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์อุนให้ต้านทานโรคราน้ำค้างในประชากรนี้ พันธุ์พ่อที่ใช้ในการทดลองให้ผลของยีนแบบบวกสูงกว่าพันธุ์แม่ อัตราพันธุกรรมอย่างแคบสำหรับความต้านทานโรคราน้ำค้างมีค่า 55.6% ซึ่งเป็นผลมาจากยีนแบบบวกมากกว่ายีนที่ไม่เป็นแบบบวก อย่างไรก็ตามพบว่าผลของยีนที่ไม่เป็นแบบบวกและอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมมีค่าค่อนข้างสูง

อุนพันธุ์ Carolina Black Rose เป็นพันธุ์แม่ที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด เนื่องจากลูกผสมของพันธุ์นี้มีเปอร์เซ็นต์การผสมติด การงอกของเมล็ด การรอดชีวิตของต้นกล้าค่อนข้างสูง เจริญเติบโตทางลำต้นได้ดี และให้สัดส่วนลูกผสมที่ต้านทานโรคราน้ำค้างสูงกว่าพันธุ์แม่อื่น และคู่ผสมระหว่าง Carolina Black Rose  $\times$  NY 65.0550.04 เหมาะสมที่สุดในการพัฒนาพันธุ์/สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง และมีคุณภาพของผลสูง

จากอุนลูกผสมระหว่างสายพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอจำนวน 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-training46.html>
- กิตติพงษ์ ศรีทรยานนท์. (2544). การตัดแต่งกิ่งองุ่น. ภูมิปัญญาชาวบ้าน. วารสาร ส.ก.ว. ปีที่ 8. ฉบับที่ 1. หน้า 35.
- นันทกร บุญเกิด. (2543). คู่มือการปลูกองุ่น. ประวัติและโรคองุ่น. เทคโนโลยี มหาวชิราวุฒยาลัยเทคโนโลยี สุรนารี. หน้า 8.
- นิพนธ์ วิสารทนนท์. (2542). โรคไม้ผลเขตกิ่งร้อน. เจ ฟิล์ม โพรเซส. หน้า 144.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2553). สถิติส่งออก-นำเข้าสินค้าที่สำคัญของไทย ออนไลน์ .(ได้มาจาก: [http://www.oae.go.th/oae\\_report/export\\_import/import\\_result.php](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.aspnnet.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 3<sup>rd</sup> millennium. Proceeding of the 7<sup>th</sup> 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). *NDRI*, 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 420 microsatellite 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 in grapevine. Theor. Appl. Genet. 104: 610-618.

- Eibach, R., Diehl, H. and Alleweldt, G. (1989). Untersuchungen zur Vererbung von Resistenzeigenschaften 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). *EDSI*, 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 *PI1*. 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., Huguency, 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 Modzhitov, 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 linkage 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 cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. Plant Molecular Biology Reporter. 12(1): 6-13.
- Lu, J. and Schell, L. (2000). Interspecific hybridization between *Vitis rotundifolia* and *Vitis vinifera* and evaluation of the hybrids. Proceeding of the 7<sup>th</sup> 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 coils: 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-lucine-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.
- Sprague, 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**



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

W. Seehalak<sup>a</sup>, S. Moonsom<sup>a</sup>, P. Metheenukul<sup>b</sup>, P. Tantasawat<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> School of Crop Production Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

<sup>b</sup> 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](mailto: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) polyvinylpyrrolidone and 0.2% (v/v)  $\beta$ -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  $\mu$ l (1x buffer, 0.1 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 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  $\beta$ -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](http://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. lincedumii*; 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. aestivalis*, *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 <sup>1/</sup>	Identity/coverage (%)	Proteins	Score (bit)	E-value <sup>1/</sup>	Identity/coverage (%)
<b>Hybrid 'NY88.0507.01'</b>									
rgVhybNY507_13 (HM773001)	1	No significant similarity found				Unnamed NBS-LRR protein candidate [ <i>V. vinifera</i> ] CBI17900.1	54	3e-13	50/62
rgVhybNY507_15 (HM773002)	1	No significant similarity found				Resistance protein candidate [ <i>V. amurensis</i> ] AAR08818.1	81	7e-14	53/38
rgVhybNY507_22 (HM773004)	2	No significant similarity found				Unnamed NBS-LRR protein candidate [ <i>V. vinifera</i> ] CBI17900.1 Putative LZ-NBS-LRR resistance protein [Rosa hybrid cultivar] CAJ27150.1	56 30	2e-10 0.0	61/78 46/67
rgVhybNY507_23 (HM773005)	1	No significant similarity found				Resistance protein candidate [ <i>V. amurensis</i> ] AAR08818.1	126	9e-30	53/86
rgVhybNY507_27 (HM773007)	1	No significant similarity found				P-loop NTPase [ <i>V. aestivalis</i> ] ACN91228.1 Resistance protein PLTR [ <i>A. hypogaea</i> ] AAX81243.1 Putative disease resistance gene analog NBS-LRR [ <i>M. prunifolia</i> ] AAM77260.1	48 39.7 39.3	4e-04 0.13 0.17	58/24 48/21 50/20
rgVhybNY507_29 (EU822228.1)	27	<i>V. vinifera</i> contig VV78X162558.4, whole genome shotgun sequence AM475374.1	904	0.0	99/97	P-loop NTPase [ <i>V. aestivalis</i> ] ACN91226.1	318	1e-85	92/98
rgVhybNY507_80 (EU822262.1)	2	<i>V. aestivalis</i> clone pSCA-C2 P-loop NTPase gene, partial cds FJ795341.1	909	0.0	99/98	P-loop NTPase [ <i>V. aestivalis</i> ] ACN91228.1 TIR-NBS-LRR resistance protein [ <i>P. trichocapa</i> ] XP_0022300210.1	308 177	1e-82 3e-43	99/98 57/98
rgVhybNY507_90 (EU822270.1)	1	<i>V. vinifera</i> contig VV78X247338.6, whole genome shotgun sequence AM483751.1	883	0.0	98/96	Unnamed NBS-LRR protein candidate [ <i>V. vinifera</i> ] CBI40355.1 NBS-LRR disease resistance protein [ <i>C. arietinum</i> ] ABB85178.1 Putative disease resistance protein RPH8A [ <i>R. communis</i> ] XP_002535012.1	154 142 139	5e-36 1e-32 1e-31	55/97 45/98 47/97
rgVhybNY507_101 (EU822276.1)	13	<i>V. rupestris</i> clone rgVrup119 putative RGA gene, partial sequence ABB85178.1	900	0.0	99/98	Unnamed NBS-LRR protein candidate [ <i>V. vinifera</i> ] CBI17900.1 Putative disease resistance gene analog NBS-LRR [ <i>M. prunifolia</i> ] AAM77267.1 NBS-LRR resistance like protein RGC402 [ <i>H. annuus</i> ] ABQ57715.1	298 139 136	1e-79 1e-31 1e-30	98/98 49/98 51/98
<b>Cultivar 'Black Queen'</b>									
rgVvinBQ_46 (EU822245.1)	38	<i>V. vinifera</i> contig VV78X110871.5, whole genome shotgun sequence AM436038.2	870	0.0	98/97	Unnamed NBS-LRR protein candidate [ <i>V. vinifera</i> ] CBI33323.1 Resistance protein candidate [ <i>V. amurensis</i> ] AAR08818.1	318 289	1e-85 9e-77	94/99 88/98
rgVvinBQ_47 (EU822246.1)	1	<i>V. amurensis</i> isolate rgVamu084 resistance protein candidate pseudogene, partial sequence AY427079.1	870	0.0	97/98	Resistance protein candidate [ <i>V. amurensis</i> ] AAR08840.1	226	1e-57	64/98
rgVvinBQ_53 (HM773013)	1	<i>V. vinifera</i> contig VV78X195949.3, whole genome shotgun sequence AM489403.2	296	1e-76	87/35	Resistance protein candidate [ <i>V. riparia</i> ] AAR08879.1	86	3e-15	46/41
rgVvinBQ_102 (HM773017)	1	<i>V. vinifera</i> contig VV78X148054.15, whole genome shotgun sequence AM463019.2	119	2e-23	81/27	Unnamed NBS-LRR protein candidate [ <i>V. vinifera</i> ] CBI33323.1 Resistance protein candidate [ <i>V. amurensis</i> ] AAR08818.1	70 59	7e-11 2e-07	61/33 52/33
rgVvinBQ_106 (HM773018)	1	<i>V. vinifera</i> contig VV78X148054.15, whole genome shotgun sequence AM463019.2	66	2e-07	86/11	No significant similarity found			

<sup>1/</sup>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.





**ภาคผนวก ข**

**Manuscript 2**

# Resistance Gene Analogs from *Vitis cinerea*, *Vitis rupestris*, and *Vitis* Hybrid Horizon

Siraprapa Mahanil,<sup>1\*</sup> Bruce I. Reisch,<sup>2</sup> Christopher L. Owens,<sup>3</sup>  
Piyada Thipyapong,<sup>1</sup> and Paisan Laosuwan<sup>1</sup>

**Abstract:** Resistance gene analogs (RGAs) characterized by the presence of nucleotide-binding sites (NBS) were cloned from *Vitis cinerea*, *V. rupestris*, and *V.* hybrid Horizon. Two degenerate PCR primer pairs were designed from conserved regions of NBS motifs within known resistance (*R*) genes and used for PCR amplification of putative RGAs. A total of 122 putative RGA sequences were cloned from all three genotypes by P-loop/GLPLAL-1 primers. Based on nucleic acid sequence-identity of 90% or greater, RGA clones were subdivided into eight, four, and seven groups for *V. cinerea*, *V. rupestris*, and Horizon, respectively. All of these clones showed similarity of nucleotide sequences to other known *R* genes or NBS-type nucleotide sequences, and seven clones showed high similarity. Thirty sequences were cloned from *V. cinerea* by P-loop/Rev loop and subdivided into four sequence groups, none of which were similar to nucleotide sequences of other *R* genes. Nineteen representative RGA clones were classified into 13 TIR- (*Drosophila Toll* and mammalian *Interleukin-1 Receptors*) NBS-leucine rich repeat (LRR)-like genes and six non-TIR-NBS-LRR-like genes based primarily on nucleotide sequences of kinase-2 motifs and phylogenetic analysis with known TIR or non-TIR proteins. Twenty-three sequence tagged site (STS) and three cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers developed from RGAs were checked for segregation among 179 seedlings from Horizon x Ill. 547-1, and 18 showed goodness-of-fit using a chi-square test. Marker stkVa011 correlated with segregation for downy mildew resistance in this population. These STS markers are currently being investigated for their potential in molecular breeding for disease resistance.

**Key words:** resistance gene analog, disease resistance, nucleotide-binding site, marker-assisted selection

Grapevines (*Vitis* spp.) are one of the most widely grown fruit crops in the world. The most widely cultivated grape species (*V. vinifera*) is highly susceptible to many diseases caused by fungi, bacteria, and viruses. However, many North American grape species such as *V. riparia*, *V. rupestris*, and *V. rotundifolia* are reported as highly resistant to several important diseases of *V. vinifera* (Eibach et al. 1989, Alleweldt et al. 1990).

Grape downy mildew, caused by the oomycete *Plasmopara viticola*, is one of the most economically important grape diseases worldwide. The disease can rapidly affect entire vineyards, destroying 50 to 75% of a crop in one

season (Muller et al. 1934). Most European grapes (*V. vinifera*) are highly susceptible to downy mildew, and young leaves and fruits are particularly susceptible (Kennelly et al. 2005). Application of fungicides is the most common tactic for control of grape downy mildew (Lafon and Clerjeau 1988). Although effective, chemical control is expensive and may have environmental consequences. Downy mildew resistant grape cultivars are a desirable alternative.

The development of molecular markers linked to disease-resistance genes could provide a valuable tool for breeding programs using marker-assisted selection (MAS) or for map-based cloning efforts. Cloned *R* genes from a number of plant species have been shown to confer resistance to individual diseases caused by viruses, bacteria, fungi, oomycetes, or nematodes (Hammond-Kosack and Jones 2000, Taler et al. 2004). Indeed, some *R* genes encode proteins that act in the signaling process by interacting with pathogen avirulence (*Avr*) gene products, or, in other cases, *R* genes encode proteins involved in race-specific recognition or act as general elicitors (Dangl and Jones 2001). *R* genes have been previously cloned from plants such as tobacco (*N*), flax (*L6*), rice (*Xa21*), tomato (*Cf*), and *Arabidopsis* (*RPS2* and *RPM1*) (Bent et al. 1994, Whitham et al. 1994, Song et al. 1995, Dixon et al. 1998). The major class of *R* genes in plants is characterized by the presence of NBS-LRR domains. LRRs and NBS domains have a role in both cell surface recognition and intracellular signaling (Parker et al. 1997). The se-

<sup>1</sup>School of Crop Production Technology, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Muang District, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand; <sup>2</sup>Department of Horticultural Sciences, Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station, 630 West North Street, Geneva, NY 14456; and <sup>3</sup>USDA-ARS, Grape Genetics Research Unit, Cornell University, Geneva, NY 14456.

\*Corresponding author (fax: 66-44-224281; email: sm379@cornell.edu; jub.siraprapa@gmail.com)

Acknowledgments: This work was supported by grants from the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program, the Thailand Research Fund and Suranaree University of Technology, Thailand, the New York State Agricultural Experiment Station, Cornell University, and USDA- Grape Genetics Research Unit, Geneva, NY. The authors warmly thank G. Di Gaspero for providing mapping data, primer sequences, and much thoughtful discussion.

Manuscript submitted February 2007; revised May 2007. Publication costs of this article defrayed in part by page fees.

Copyright © 2007 by the American Society for Enology and Viticulture. All rights reserved.

quences of NBS domains in general are highly divergent among members; however, short motifs such as the P-loop, kinase-2, and RNBS (resistance nucleotide binding site) are conserved in both dicots and monocots (Meyers et al. 1999, Ellis et al. 2000).

The sequence conservation of specific domains (e.g., the P-loop and GLPL domains) has facilitated the use of degenerate oligonucleotide primers to amplify and clone RGA sequences from genomic DNA of diverse species, including *Brassica*, *Hordeum*, *Arabidopsis*, *Beta*, and *Helianthus* (Aarts et al. 1998, Joyeux et al. 1999, Gedil et al. 2001, Hunger et al. 2003). RGA sequences have been developed as molecular markers using the resistance gene analog polymorphism (RGAP) technique, which has allowed identification of markers linked to disease resistance genes in plants such as barley, rice, sunflower, and wheat (Toojinda et al. 2000, Gedil et al. 2001, Yan et al. 2003). Because of the high probability of finding clustered RGAs in the plant genome, molecular markers developed from RGAs have great potential for co-localization with alleles for disease resistance on linkage maps. Six and 11 markers from RGA primers were co-segregating and tightly linked, respectively, to the *YR5* locus conferring stripe rust resistance in wheat (Yan et al. 2003). RGAs cloned from *V. amurensis* and *V. riparia* by degenerate primers of the P-loop and GLPL domains revealed 12 RGA groups with at least 40% identity to known *R* genes such as *Arabidopsis RPS5* and tobacco *N* (Di Gaspero and Cipriani 2002); the major groups of RGAs cloned were used to distinguish three disease-resistant varieties and six susceptible grape varieties. Also, 45 STS markers were developed from RGA sequences that showed polymorphism among 20 *Vitis* (Di Gaspero and Cipriani 2003). RGAs have also been isolated from *V. rotundifolia* and converted to 20 RGAP markers co-segregating with the resistance to *Uncinula necator* 1 (*Run1*) locus that controls powdery mildew resistance (Baker et al. 2005).

Previous work in our laboratory used the interspecific hybrid population, Horizon (Seyval x Schuyler) x Illinois 547-1 [Ill. 547-1] (*V. rupestris* x *V. cinerea*), to identify quantitative trait loci (QTL) and to study the inheritance of powdery mildew resistance. Ill. 547-1 has been shown previously to be highly resistant to several fungal diseases, including downy mildew and powdery mildew (Dalbo et al. 2000). One hundred fifty-three markers were mapped onto Horizon covering 1199 cM, whereas the Ill. 547-1 map had 179 markers covering 1470 cM (Dalbo et al. 2000). A single marker (CS25b) was associated with a major QTL (LOD score 6.56) from Ill. 547-1, which accounted for 41% of the phenotypic variation for powdery mildew resistance. Interestingly, the allele of this marker associated with resistance was also present in *V. cinerea* B9, a parent of Ill. 547-1 (Dalbo et al. 2001).

In this study we report the cloning of RGA sequences from the disease-resistant genotypes *V. cinerea* B9, *V. rupestris* B38, and Horizon. These sequences were classified based on variation in the NBS domain. These RGA

sequences were then used to develop molecular markers for placement on the Horizon x Ill. 547-1 genetic map, thus facilitating future identification and cloning of disease resistance genes.

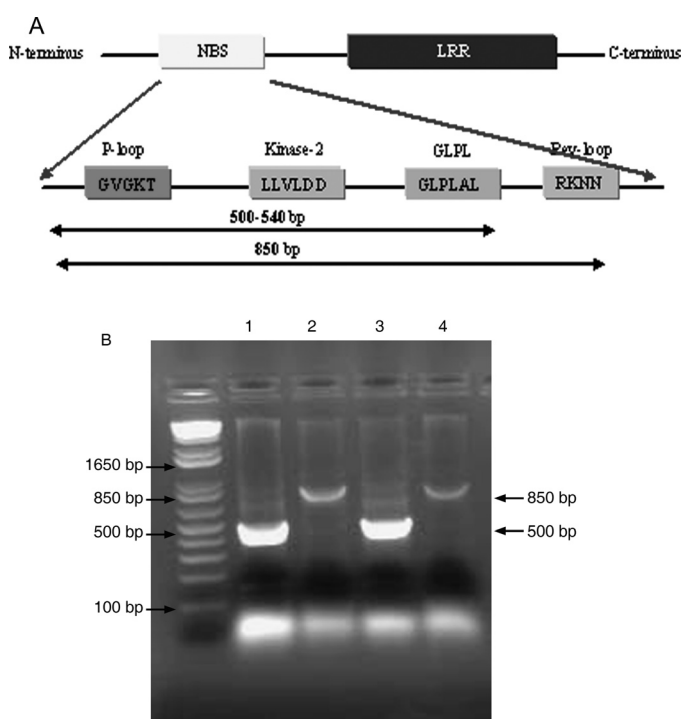
## Materials and Methods

**Plant materials and DNA extraction.** Grapevine genotypes *V. cinerea* B9, *V. rupestris* B38, and Horizon (Seyval x Schuyler) were used as template for PCR-based cloning of NBS sequences. DNA was extracted from 2 g of young leaves using an existing method (Lodhi et al. 1994) with the following modification to the CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) extraction buffer: 3% (w/v) CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, pH 8.0, 0.1 M Tris HCl, pH 8.0, 2% (w/v) polyvinylpyrrolidone, and 0.2% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanol. DNA pellets were dissolved in sterile water, and, after RNase A treatment, DNA concentrations were calculated from absorbance values at 260 nm using a spectrophotometer.

**Amplification and cloning of NBS-LRR genes by degenerate primers.** Two oligonucleotide primers, P-loop (5'GGIGGIGTIGGIAAIACIAC3') and GLPLAL-1 (5' IA-GIGCIAGIGGIAGICC 3') were modified (Hunger et al. 2003), having been designed from the most conserved domains within the NBS P-loop and GLPL motifs from the *N*, *RPS2*, and *L6* and the *N*, *RPS2*, *RPM1*, *L6* genes, respectively. The other degenerate primer, Rev loop (5'GTIGTITTICCIACICIC3') (Hunger et al. 2003), was derived from the *N*, *RPS2*, and *L6* genes. The P-loop/GLPLAL-1 and P-loop/Rev loop primer pairs were used to amplify RGA fragments from *V. cinerea* B9 (Figure 1). NBS regions of *V. rupestris* B38 and Horizon were amplified using only the P-loop/GLPLAL-1 primer pair. PCR amplifications were performed in a reaction volume of 20  $\mu$ L containing 1x PCR buffer, 0.1 mM dNTPs, 2.5 mM  $MgCl_2$ , 2  $\mu$ M of each primer and 1 unit of Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI). The initial step of the amplification reaction was denaturation at 95°C for 4 min; followed by 35 cycles of 95°C for 45 sec, 50°C for 1 min, and 72°C for 1 min; and a final extension at 72°C for 10 min.

**Cloning and sequencing of RGAs.** PCR products for cloning were fractionated on 0.8% agarose gel and stained with 3x SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA). Fragments of the expected size were excised from the agarose gel and purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Promega). The PCR products were then cloned into the pGEM-T Easy plasmid vector (Promega) and transformed into competent *Escherichia coli* Top-10 cells (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions. The transformation reaction was plated on selective media containing 20% (w/v) X-gal/2% (w/v) IPTG for blue/white screening of plasmids with inserts. Plasmid DNA from single white colonies was examined by *EcoRI* restriction analysis to determine the size of the inserted fragments.

486 – Mahanil et al.



**Figure 1** Model of the structure of NBS-LRR type resistance genes (A). PCR products amplified with two degenerate primer pairs from *V. cinerea* B9 (B). The expected sizes of amplified DNA bands are 500 bp for the P-loop/GLPLAL-1 primer pair (samples 1, 3) and 850 bp for the P-loop/Rev loop primer pair (samples 2, 4). Marker DNA (1 kb) is shown in the lane on the left.

Plasmid DNA harboring inserts were sequenced using the Applied Biosystems Automated 3730 DNA Analyzer at the Biotechnology Resource Center (Cornell University). Sequencher 4.2 software (Genecodes Corp., Ann Arbor, MI) was used to select representative clones based on 90% minimum overlap and 90% minimum identity of nucleotide sequence.

**Sequence analysis.** Identification of clones showing significant homology to known RGA sequences and resistance proteins in GenBank was performed by Nucleotide-Nucleotide Basic local alignment search tool (BLASTN) and translated query vs. Protein database (BLASTX) software ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)). Nucleotide sequences of RGAs cloned from the P-loop/GLPLAL-1 primer pair were translated into amino acid sequences by Translate software (<http://bio.lundberg.gu.se/edu/translat.html>). Amino acid sequences from *R* genes already classified as TIR or non-TIR proteins were searched using GenBank Entrez ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). In addition, selected TIR-NBS-LRR genes (*L6* and *M* from flax, *N* from tobacco and *RPS4* from *Arabidopsis*) and non-TIR-NBS-LRR genes (*RPS2* and *RPS5* from *Arabidopsis*, *Xal* from *Oryza sativa*, and *I2* from tomato) were added to the alignment. The alignment of *Vitis* RGA clones, along with known TIR and non-TIR amino acid sequences, was performed by ClustalW-XXL software (<http://clustalW.genome.jp>). Motif structures in RGA clones were analyzed by MEME software (<http://meme.nbcr.net>). A phyloge-

netic tree of *Vitis* RGA clones, known TIR, and non-TIR amino acid sequences was constructed with Phylip software, version 3.6 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>).

**RGA-STS marker.** PCR primers specific to the 19 cloned *Vitis* RGAs were designed using Primer 3 ([http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_www.cgi)). Nine additional RGA-STS primers (Di Gaspero and Cipriani 2003) were also used (Table 1). PCR amplifications were performed in a reaction volume of 20  $\mu$ L containing 1x PCR buffer, 0.1 mM dNTPs, 2.5 mM  $MgCl_2$ , 2  $\mu$ M of each primer and 1 unit of Taq DNA polymerase (Promega). The initial step of the amplification reaction was denaturation at 94°C for 1 min, followed by 25 cycles of 92°C for 50 sec, 46 to 58°C (variable by primer) for 50 sec and 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 10 min. Amplified DNA fragments were cut by 1 U restriction enzyme and incubated for 3 hr at the appropriate temperature. The corresponding restriction enzymes were selected using Sequencher 4.2 software. CAPS analyses were performed on 2% agarose gels and stained with SYBR Green. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analyses were performed using 2% glycerol and 8% polyacrylamide gels at 4°C and 12-13 W. Gels were stained with silver nitrate.

***Plasmopara viticola* inoculation.** Sporangia of *P. viticola* were harvested from sporulating leaves of *Vitis* hybrid cv. Delaware into double distilled water using a spray bottle. The collected sporangial suspensions were counted in a hemacytometer and adjusted to  $10^5$  sporangia per mL. Leaves from nodes 5, 6, and 7 (node 1 being the first expanded leaf) of 179 Horizon x Ill. 547-1 seedlings were used for inoculation. The inoculated leaves were placed abaxial surface up on moist filter paper in Petri plates. The sporangial suspensions were sprayed onto the abaxial leaf surface. Petri dishes were held at 22°C, 18-hr photoperiod for 8 days. A second set of Petri dishes were incubated for 10 days. Infected leaves were placed in 5 mL double distilled water per 50-mL tube and then shaken for 3 min. The total number of spores produced per leaf was determined by counting the number of spores in 5  $\mu$ L under a microscope. Length and width of infected leaves were measured. The area of 10 different leaves was measured using a leaf area meter. Regression analysis was then used to convert leaf length and width to leaf area, and the number of spores per leaf was converted to number of spores/25 cm<sup>2</sup> leaf area. Resistance levels were based on spore production. The six-point disease resistance classification was defined as: 0 = 0 to 5 spores/25 cm<sup>2</sup>, highly resistant; 1 = >5 to 10 spores/25 cm<sup>2</sup>, resistant; 2 = >10 to 15 spores/25 cm<sup>2</sup>, moderate or intermediate; 3 = >15 to 25 spores/25 cm<sup>2</sup>, moderately susceptible; 4 = >25 to 40 spores/25 cm<sup>2</sup>, susceptible; and 5 = >40 spores/25 cm<sup>2</sup>, highly susceptible.

## Results

**Cloning RGA sequences.** Genomic DNA of *V. cinerea* B9, a genotype resistant to multiple diseases includ-

**Table 1** Specific primers, annealing temperatures, and sizes of PCR product for RGA-STS markers.

Name <sup>a</sup>	Forward primer (5'—3')	Reverse primer (5'—3')	Temp.	Size	Enzyme
rgVrip064 <sup>b</sup>	GACTACTATTGCCAAGGCTGTTT	AATCTACTGCTTGGTAGGAGAG	58	467	<i>EcoRI</i>
rgVamu085 <sup>b</sup>	GACGACCCTCTTGACCAGGAT	TGAGAATTTATAGTGTCTTCTCCTACA	58	435	<i>Sau 3AI</i>
stkVa011 <sup>b</sup>	GAAGGCACTTTGAGCAATGG	AACCATTCTGGGAGCCAAG	57	479	<i>EcoRV</i>
rgVrip145 <sup>b</sup>	GCCAGACTTGCTTATAACGATGA	CGCACTTTTCCACAATCTTCTT	58	475	<i>Alu I</i>
GLPL6-1 <sup>b</sup>	GCATATGCTACAACTCCATTCA	CAATTTCTTCTAGTTCTGGGATG	58	206	<i>Hinf I</i>
rgVrip158 <sup>b</sup>	CCAGTTGATATACAGGGACGATG	GATCCTTGATCAAGCAATCTCA	58	463	<i>Mnl I</i>
rgVamu100 <sup>b</sup>	CATCAATATGATGGTAGTAGCTTTCTT	GAGCTTAGACACCTCTTTATCACACT	58	164	
rgVamu092 <sup>b</sup>	AACTCACATCAATTTGAGAGTAGAATC	TGATTTGAGAGGTCAACATAGTCA	58	431	<i>Alu I</i>
rgVamu111 <sup>b</sup>	ACCAGAGAGTGGTGGGACAC	CCTTTTATCTTGTAATACTGCCTGA	58	194	
rgVcin109	GGAAGACGACAATTGCCAAA	GCATCGACTCCAAGCACAT	56	358	<i>Alu I</i>
rgVcin111	ATGGTGTGATGAAGGAAAAA	AGACCAAACCAACCATGCTC	57	164	<i>Xba I</i>
rgVcin123	GATGGGATGGAGTCAAAGGA	CACTCACTCCATGGCACATT	58	217	<i>aTaq I</i>
rgVcin125	GTCCAGGAAACCGTTCTCAA	CCTTGGTCCGAAACAAAGAA	54	304	<i>Hinf I</i>
rgVcin127	GATGGGATGGAGTCAAAGGA	GGGGAGGCCTTTAGCATAAT	54	352	<i>Mnl I</i>
rgVcin139	TGACGTGGATGATTTGATGC	GGGGAGGCCTTTAGCATAAT	58	259	<i>Alu I</i>
rgVcin165	CATGGTATCCTGAGGGGAAA	GGAGGCCATCAGCATAATCT	58	361	<i>Mae II</i>
rgVrup103	CATGGTATCCTGAGGGGAAA	GGCCATCAGCGTAATCTATGA	56	358	<i>Rsa I</i>
rgVrup119	GGTGCAAATGCTCACAGAGA	CTCCCAAACAAGGTCCAAGA	58	383	<i>EcoR I</i>
rgVrup124	AATGGAGGCTCGTTTTGAGA	GCCGATGTGTTCTCTCTTCC	58	323	<i>Mnl I</i>
rgVrup126	GGTCCAGGAAACCATTCTCA	CCTTGGTCCGAAACAAAGAA	54	304	<i>Hinf I</i>
rgVhyb101	GGGGTGGGGAAGACAACACTAT	CCTACTTCTTGGACCAAACCA	50	306	<i>Aci I</i>
rgVhyb102	CACAAATGCAATTTGCCCTA	GCTGGAGGAGGTTGGTGTTA	58	329	<i>EcoR I</i>
rgVhyb110	ATCCAGGGTTGAGTTTGACG	CAATGCCCTTAGCTCCATA	58	317	<i>Dpn II</i>
rgVhyb121	AATTCGATTGAGGGCAAGTG	GTGAGGATGAAAGGGCAGAA	58	347	<i>Nco I</i>
rgVhyb127	TGATCGTGGTGTGCTTCAAT	TTCCGTAGCTTGCTTGTGTG	54	310	<i>Nco I</i>
rgVhyb149	GATTGGTTGGTTCGAGGAAG	CGGCAGACCTTGAGGATAAA	46	212	<i>EcoR I</i>

<sup>a</sup>Primers named according to the RGA cloned.

<sup>b</sup>Markers developed by Di Gaspero and Cipriani (2003).

ing downy mildew, was amplified using two degenerate primer pairs, P-loop/GLPLAL-1 and P-loop/Rev loop, producing ~500-bp and 850-bp PCR products, respectively (Figure 1). Complete nucleotide sequences were obtained from 78 of 100 clones. Based on 90% minimum overlap and 90% minimum identity, 48 clones from P-loop/GLPLAL-1 primers were subdivided into eight unique groups. In contrast, 52 clones from P-loop/Rev loop primers were sequenced but unambiguous nucleotide sequences were obtained for only 30 clones, which were subdivided into four representative groups.

With the finding that clones generated from *V. cinerea* B9 using the P-loop/GLPLAL-1 oligonucleotide primer pair were highly conserved at the NBS domain, this primer set was considered to have more potential for marker development than the P-loop/Rev loop primers. Therefore, only P-loop/GLPLAL-1 primers were used to clone RGA sequences from *V. rupestris* B38 and Horizon. Twenty-seven and 47 sequences were cloned from *V. rupestris* B38 and Horizon, respectively. RGAs cloned from *V. rupestris* B38 were separated into four unique groups,

while 47 clones from Horizon were subdivided into seven unique groups based on 90% identity or greater.

**Sequence analysis of RGA clones.** Nucleotide sequences from 8 of the 12 unique groups from *V. cinerea* B9 had significant BLASTN hits to RGAs in GenBank (Table 2). All of these were generated with the P-loop/GLPLAL-1 primer pair, whereas the four RGA clones from P-loop/Rev loop primers were not similar to any RGA clones in GenBank. Seven showed similarity to RGA clones that were isolated from *V. amurensis* (Di Gaspero and Cipriani 2003). Moreover, nucleotide sequences of rgVcin109, rgVcin125, rgVcin139, and rgVcin165 were nearly or completely similar to RGA clones from *V. amurensis* (E-value = 0 and (bit) value = 724, 894, 876, and 718, respectively). Only one clone (rgVcin152) showed sequence similarity to a NBS-LRR like gene from a non-*Vitis* species (*Oryza sativa*).

Similarly, BLASTX analysis showed that 10 of 12 representative clones from *V. cinerea* B9 had amino acid sequence similarity to resistance protein candidates in GenBank (Table 2). As with the nucleotide sequences,

**Table 2** Results of the search for similarity between *Vitis* RGA sequences with nucleotide and amino acid GenBank accessions carried out using the programs BLASTN and BLASTX.

Genotype/ primer pairs	RGAs (n) /unique clones	Representative clone/ number cloned in group	GenBank nucleotide accession showing highest similarity						
			Nucleotide	(bit) Value	E value <sup>a</sup>	Amino acid	(bit) Value	E value <sup>a</sup>	
<b><i>V. cinerea</i> B9</b>		48/8							
P-loop/GLPLAL-1		rgVcin109/3 (DQ885292)	<i>Vitis amurensis</i> isolate rgVamu090 gi/38045679/gb/AY427105.1/	724	0.0	Resistance-protein candidate ( <i>V. amurensis</i> )	267	1e-70	
		rgVcin111/5 (DQ885293)	<i>Vitis amurensis</i> isolate rgVamu092	502	1e-139	Resistance-protein candidate ( <i>V. amurensis</i> )	254	6e-67	
		rgVcin123/6 (DQ885294)	<i>Vitis amurensis</i> isolate rgVamu090	86	1e-13	NBS-type resistance protein ( <i>Gossypium barbadense</i> )	115	8e-25	
		rgVcin125/4 (DQ885295)	<i>Vitis amurensis</i> isolate rgVamu151 gi/38045730/gb/AY427133.1/	894	0.0	Resistance protein candidate ( <i>V. amurensis</i> )	306	2e-82	
		rgVcin127/13 (DQ885296)	<i>Vitis amurensis</i> isolate rgVamu092	80	7e-12	Resistance-protein candidate ( <i>V. amurensis</i> )	127	2e-82	
		rgVcin139/6 (DQ885297)	<i>Vitis amurensis</i> isolate rgVamu053 gi/38045673/gb/AY427102.1/	876	0.0	Resistance-protein candidate ( <i>V. amurensis</i> )	272	3e-72	
		rgVcin152/8 (DQ885298)	<i>Oryza sativa</i> clone sk98 NBS-LRR-like gene	74	4e-10	Disease resistance-like protein 585-8 ( <i>Mentha longifolia</i> )	118	8e-26	
P-loop/Rev loop	30/4	rgVcin165/3 (DQ885299)	<i>Vitis amurensis</i> isolate rgVamu094 gi/38045681/gb/AY427106.1/	718	0.0	Resistance-protein candidate ( <i>V. amurensis</i> )	295	5e-79	
		rgVcin209/4	No significant similarity found			No significant similarity found			
		rgVcin210/6	No significant similarity found			No significant similarity found			
		rgVcin254/13	No significant similarity found			RCa10.6 NBS type resistance protein ( <i>Manihot esculenta</i> )	140	5e-32	
		rgVcin269/7	No significant similarity found			Resistance-protein candidate ( <i>V. amurensis</i> )	52	3e-05	
<b><i>V. rupestris</i> B38</b>		27/4							
P-loop/GLPLAL-1		rgVrup103/4 (DQ885300)	<i>Vitis amurensis</i> isolate rgVamu094	712	0.0	Resistance-protein candidate ( <i>V. amurensis</i> )	292	3e-78	
		rgVrup119/6 (DQ885301)	<i>Oryza sativa</i> clone sk98 NBS-LRR-like gene	87.7	3e-14	Putative disease-resistance gene analog ( <i>Malus prunifolia</i> )	143	3e-33	
		rgVrup124/10 (DQ885302)	<i>Vitis riparia</i> isolate rgVrip148	446	3e-122	Putative disease-resistance gene analog ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	228	1e-58	
		rgVrup126/7 (DQ885303)	<i>Vitis amurensis</i> isolate rgVamu151	900	0.0	Resistance protein candidate ( <i>V. amurensis</i> )	195	6e-49	
<b>Horizon</b>		47/7							
P-loop/GLPLAL-1		rgVhyb101/11 (DQ885304)	<i>Vitis amurensis</i> isolate rgVamu050 gi/38045671/gb/AY427101.1/	860	0.0	Resistance protein candidate ( <i>V. amurensis</i> )	248	4e-63	
		rgVhyb102/9 (DQ885305)	<i>Oryza sativa</i> clone sk98 NBS-LRR-like gene	65.9	1e-07	probable methyleletrahydrofolate red	65	2e-04	
		rgVhyb110/4 (DQ885306)	<i>Vitis riparia</i> isolate rgVrip068	628	4e-177	Resistance protein candidate ( <i>V. riparia</i> )	248	6e-65	
		rgVhyb121/3 (DQ885307)	<i>Vitis amurensis</i> isolate rgVamu035	261	9e-69	Resistance protein candidate ( <i>V. amurensis</i> )	261	9e-69	
		rgVhyb127/7 (DQ885308)	<i>Vitis riparia</i> isolate rgVrip004	173	3e-42	Resistance protein candidate ( <i>V. amurensis</i> )	173	2e-42	
		rgVhyb139/5 (DQ885309)	<i>Oryza sativa</i> clone sk50 NBS-LRR-like gene	78.9	8e-12	NBS/LRR resistance protein-like ( <i>Theobroma cacao</i> )	43.1	0.004	
		rgVhyb149/8 (DQ885310)	<i>Malus prunifolia</i> putative disease	67.9	3e-08	Resistance protein candidate ( <i>V. amurensis</i> )	53.5	3e-06	

<sup>a</sup>Expected (E) value refers to the number of matches expected by chance alone. The lower the E value, the more strongly supported the match.

amino acid sequences of most RGA clones were similar to resistance protein candidates from *V. amurensis*. Two exceptions among those derived from the P-loop/GLPLAL-1 primers were rgVcin123 and rgVcin152, which

showed high similarity with resistance protein candidates and NBS-type resistance proteins from *Gossypium barbadense* and *Mentha longifolia*, respectively. In addition, rgVcin254 and rgVcin269 from P-loop/Rev loop primers

were similar to resistance protein candidates from *Manihot esculenta* and *V. amurensis*, respectively; however, these were not as strongly matched as the RGA clones from P-loop/GLPLAL-1 primers (Table 2).

Three of four RGA sequences from *V. rupestris* B38 and one of seven sequences from Horizon showed high similarity to the same RGA GenBank accessions as those from *V. cinerea* B9 (Table 2). Some RGA sequences, including rgVrup103, rgVrup126, and rgVhyb101, with E-values = 0, had near or complete similarity to RGA clones isolated from *V. amurensis* (Di Gaspero and Cipriani 2003). RGA amino acid sequences from *V. rupestris* B38 and Horizon were similar to resistance protein candidates from *V. amurensis* and *V. riparia*, as well as putative disease resistance proteins from *Malus prunifolia*, *Theobroma cacao*, and *Arabidopsis thaliana* (Table 2).

**NBS-LRR domain.** Nineteen RGAs amplified by P-loop/GLPLAL-1 primers were analyzed for the presence of conserved amino acid motifs. As expected, P-loop and GLPL motifs were present in the first seven and last six amino acids of all RGAs cloned, except rgVhyb121. Those amino acids correspond to oligonucleotide primers derived from P-loop and GLPL motifs (modified from Hunger et al. 2003). RNBS-A, kinase-2, RNBS-B, and RNBS-C motifs also appeared in all RGAs cloned (Figure 2). The RNBS-A motifs could not be identified by MEME analysis because they were diffuse and poorly conserved. However, these motifs were found and verified by visual inspection of alignments. As previously suggested, kinase-2 is useful to distinguish between TIR or non-TIR proteins (Meyer et al. 1999). The presence of tryptophan in the kinase-2 motif is predictive of non-TIR proteins (e.g., *RPS2*, *RPS5*, *I2*, and *Xal*). On the other hand, *L6* and *N* from flax and *M* from tobacco have aspartic acid in the kinase-2 motif, which is typical of TIR proteins (Figure 2). The amino acid sequence of the kinase-2 motif classified rgVcin125, rgVcin152, rgVrup119, rgVrup126, and rgVhyb110 as well as *RPS2*, *RPS5*, *I2*, and *Xal* as non-TIR proteins. On the other hand, *L6*, *N*, rgVcin109, rgVcin139, rgVcin165, rgVrup103, and rgVhyb101 were classified as TIR proteins (Figure 3).

Using the amino acid change in the kinase-2 motif to classify proteins, 9 out of 19 RGAs (rgVcin111, rgVcin123, rgVcin127, rgVrup124, rgVhyb102, rgVhyb121, rgVhyb127, rgVhyb139, and rgVhyb149) could not be classified as either TIR or non-TIR types, possibly because of incomplete amino acid sequences, especially tryptophan and aspartic acid, in conserved domains of these clones. Therefore, phylogenetic analysis was used to verify the overall sequence similarity to other *R* genes representative of the two subclasses. The unclassified RGA, rgVhyb124, can be found in the major branch along with *Xal*, and *I2*, as well as *Vitis* non-TIR proteins, suggesting that this clone is more closely related to non-TIR than to TIR proteins (Figure 3). In addition, rgVcin111, rgVcin123, rgVcin127, rgVhyb102, rgVhyb121, rgVhyb127, rgVhyb139, and rgVhyb149 clustered in the same branch

with *RPS4*, *M*, *L6*, and *N*, the known TIR proteins (Figure 3). Therefore, these clones are likely more closely related to TIR than to non-TIR proteins. Even though the rgVcin152 appeared in the same branch with other TIR proteins, it was still classified as a non-TIR protein since tryptophan appeared in the kinase-2 motif. In total, 19 RGA clones were classified into 13 TIR-NBS-LRRs-like genes and 6 non-TIR-NBS-LRR-like genes.

***P. viticola* resistance analysis.** A segregating seedling population developed by the grape breeding program at Cornell University, Geneva, New York, was tested for downy mildew resistance. The parents, Horizon and Ill. 547-1, were reported to be moderately and highly resistant to downy mildew, respectively (Dalbo et al. 2000). A detached leaf assay confirmed this observation. Horizon and Ill. 547-1 had 15.1 and 2.2 spores/25 cm<sup>2</sup>, respectively. The seedling population segregated for resistance, with the number of downy mildew spores/25 cm<sup>2</sup> ranging from 2.2 to 122.1 (data not shown). Eighty-seven seedlings, or 48.6%, grouped into the intermediate classification (2 and 3). Resistant (classes 0 and 1) and susceptible individuals (classes 4 and 5), comprised 32.4 and 19.0% of the population, respectively.

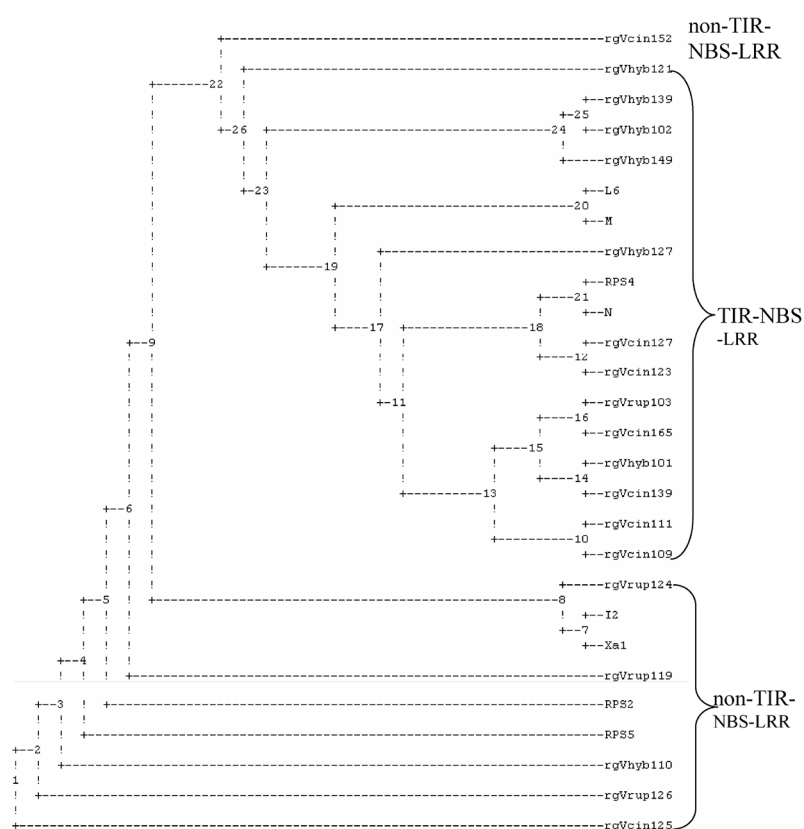
**RGA-STS marker.** Twenty-three STS and three CAPS primer pairs were used to amplify the parents and 179 progeny of the Horizon x Ill. 547-1 population. The 17 STS markers developed from the RGA nucleotide sequences from the present study (from *V. cinerea*, *V. rupestris*, and Horizon) produced polymorphic markers among 179 progenies. Surprisingly, at least 4 to 5 primer pairs from two clones, rgVcin152 and rgVhyb139, were tested but PCR products could not be amplified. Nine (six STS and three CAPS) of these 26 markers were developed by Di Gaspero and Cipriani (2003) based on RGA sequences from *V. amurensis* and *V. riparia*. From segregation analyses, eight STS markers (rgVamu085, GLPL6-1, rgVcin125, rgVcin127, rgVcin139, rgVrup126, rgVhyb102, and rgVhyb110) were present in the male (Ill. 547-1) but absent in the female parent (Horizon). Five STS markers (rgVamu100, rgVrup119, rgVhyb101, rgVhyb121, and rgVhyb127) were present in the female and absent in the male parent. The rest of the STS markers were either present or absent in both parents. The chi-square goodness-of-fit statistic was used to check conformity of marker segregation with the expected ratio. A 1:1 segregation ratio could not be rejected for all markers present only in the male or female parent except rgVamu085, rgVamu100, rgVrup126, and rgVhyb102. Also, markers showing a 3:1 segregation ratio, such as rgVrip064, rgVrip145, stkVa011, rgVamu092, rgVcin109, rgVcin111, rgVcin123, rgVrup103, and rgVrup124, will be useful for mapping to both Horizon and Ill. 547-1 linkage maps.

Based on correlation analysis among CAPS and STS markers, three groups of markers emerged (Table 3). Some of the markers in each group were designed from closely related nucleotide sequences (Di Gaspero et al. 2007). As described above, some of markers were de-



	P-loop	RNBS-A		GLPL	
rgVcin139	GGVGKTTITKAVYN----	DISCQFDGSSFLNVRERSKD--	NALQLQQUELLHGSLKGGK	rgVcin139	IMLKASPSITKIR--
rgVhyb101	GGVGKTTIAKAVYN----	DISYQFDGSSFLNVRERSKD--	NALQLQQUELLG-ILKGGK	rgVhyb101	VVYAGLPLAL----
rgVcin165	GGVGKTTIAKAIYN----	EISNOYDGRSFLNIRERSKG--	DILQLQQUELLHGILRG-K	rgVcin165	IIDYADGLPLAL----
rgVrup103	GGVGKTTIAKAIYN----	EISHQYDGSFLNIRERSKG--	DILQLQQUELLHGILRGKN	rgVrup103	IIDYADGLPLAL----
rgVcin109	GGVGKTTIAKAVVYN----	NISHQFESRIFLENVRERSKQ	SSLLQLQKELLENGVVGKKN	rgVcin109	EVVYVNGPLPLAL----
N	GGVGKTTIARAIFTLGRMDSS	YQFDGACFLDKIKENKRG---	MHSLQNALLESELLREKA	N	VVNYAKGLPLAL----
L6	GGIGKTTIAKAVYN----	KISSCFDCCCFIDNIRETQEK	DGVVVLQKKVSEILRIDS	L6	VVDTTAGLPLTL----
M	GGIGKTTIAKAVYN----	KISSHFDRCFVDNVRAMQEK	DGIFLQKQKLVSEILRIDS	M	IVSTTGGPLPLTL----
rgVcin125	GGVGKTTILKRIDN----	DFLQTCYEVVVVIVVVSQGG	QNVKQVETLNLKLEIAEYK	rgVcin125	FVKECKGLPLAL----
rgVrup126	GGVGKTTILKRINN----	EFLQTCYEVVVVIVVVSQGG	VKKVQVETLNLKLEIAEYK	rgVrup126	KSAASPSITSEFA--
rgVhyb110	GGVGKTTILNRMVN----	EFLKSRVEFDVAVIVVSR	PANVEKVVQLFNKLEIPSN	rgVhyb110	-----
RPS5	GGVGKTTILTKINN----	KFSKIDDRFDVIVVVSRSST	VRKIQRDLAEKVLGGMEW	RPS5	VARKCRGLPLAL----
RPS2	GGVGKTTILNQSINN----	ELITKGHQYDVLIVVQMSRE	FGECTIQAVGARLGLS---	RPS2	IVSKCGGLPLAL----
I2	-GVGKTTIAKAVYN----	NEK-LKDRFDLKAIVCVSE	PYDASRITKGLLEEIGSNLM	I2	IAKCKGLPLAL----
Xal	GGIGKTTLAQLVCK----	DLV-IKSFVNVKIVVVSDF	VVKITRQLLDHVSNQSHG	Xal	IASELKGNPLAA----
rgVrup124	GGVGKTTLAQVVFN----	DREMEARFERRMWSVST	GTPNEKRILRSMLRNLGDM	rgVrup124	IVHKCGGLPLAL----
rgVrup119	GGVGKTTIMVQVGN----	AHRDGLFORVAMAVISQNP	DLRKTKAQIADMLNLK	rgVrup119	IVKCGGLPLAL----
rgVcin152	GGWGRRLGQTYLMMG----	EFAHFEKRMWVCFSEFD---	VKRLIKEIITSATHG	rgVcin152	IVCRPPRPQSLVMRP
RPS4	-GIGKTTLLKELYK-----	TWQCKFSRHALIDQIRVKS	KHLELDRLPQMLLGLS	RPS4	FVHYARGHPLAL----
rgVhyb149	GGVGKTTFLLEDGKG-----	-----	FRILRVSNYMK	rgVhyb149	ILKVCRLPSFTIA----
rgVhyb102	GGVGKTTISPMAGQ-----	-----	QFALSRECCQLKRSHLLH	rgVhyb102	TLCRPPHPQSLVMSR
rgVcin123	GGVGKTTYSQSCLS-----	-----	NLSIGHLPCYRSLQKLWF	rgVcin123	LNSRPPAC-----
rgVcin111	GGVGKTTTCQSCIY-----	-----	LTSIENLSKCRKIQRLLK	rgVhyb127	GLCRPPSSQSL----
rgVhyb127	GGVGKTTILAKVCLQ-----	-----	VYRSITPLSKCEREIRSW	rgVcin111	YIMLKASPL----
rgVcin127	GGVGKTTIAVCFIIQ-----	-----	SLVNLRALASLQILEKSP	rgVhyb127	SRGWFSRRPQSLV----
rgVhyb121	GGKFDGQVGGRHLLWQ----	-----	PSPPALVYLDENLWCLLL	rgVcin127	QPSAVGTPLPL----
rgVhyb139	GGVGKTTGITRHSR-----	-----	AHCQTTHFGHVLLGD	rgVhyb121	-----
	*			rgVhyb139	-----
		Kinase-2			
rgVcin139	LKVSNMDEGIQMIKRSLS	SKRVLVVFDDVDD--	LMQIENLAEHIIWFG-----	PR	S
rgVhyb101	LKVSNMDEG-IMLKRS	SLSKRVLVVFDDVDD--	LMQLN--LAEHSWFG-----	PR	S
rgVcin165	FFINNVDGEGISMIKRC	LTSNRVLVIFVDDVDE-	LKQLEYLVEEKDWFH-----	AK	S
rgVrup103	FKINNVDGEGISMIKRC	LTSNRVLVIFVDDVDE-	LKQLEYLVEEKDWFH-----	AK	S
rgVcin109	LEISNVHEGIDVIRNRF	SNKVVLLILDDVDN-	LKQKFLAGGHGWFG-----	PR	S
N	NYN-NEEDGKHQMASR	LRSKVVILVDDIDN	KDHYLEVLAGLDWFG-----	NG	S
L6	VGFMNDSGGRKTIKER	VSRFKILVVLDDDEK--	FKFEDLG-SPKDFI-----	SQ	S
M	VGFTNDSGGRKMIKER	VSKLVLVDDVDEK--	FKFEDILGCKPKDFD-----	SG	T
rgVcin125	KDRSVHE-RAEELF	SVLQTKKFFVLLDD	IKQKLDLLEVGIPPLNDQK-----	KS	S
rgVrup126	KDRSVHE-RAEELI	SVLQTKKFFVLLDD	IKQKLDLLEVGIPPLNDQK-----	KS	S
rgVhyb110	EGRSEDE-RKEAIF	NVLMKKIVVLLDD	IELELDFAVGIPINDEN-----	KS	S
RPS5	SEKNDNQ-IAVDI	HNVLRRKFFVLLDD	IEKVNKAVGVYPSKDN-----	GC	S
RPS2	DEKETGENRALKIYR	ALRQKFLVLLDD	VUEEIDLKTG-VPRPDREN-----	KC	S
I2	DNTLNQL--QIKLKE	SLKGGKFLVLLDD	VWMDKYIEWDDLRNPFAPG-----	EIG	S
Xal	ISMALDL--QQDLE	QMKSKKFLVLLDD	VUEERTDDWKLKAPLRPMD	QVNSSQEEATGN	
rgVrup124	DCGELLR---KINQ	YLLGKRFLLVMD	DVGEINTWWRKISDGLPKG-----	NG	S
rgVrup119	EEESEAGRAARLRER	IMRGSVLIILDD	IURRIDLSEIGIPSTGSDLD-----	ACK	S
rgVcin152	DDLPMDELARLLIN	VLDKFFLLILDD	VWSKNRDKWLELALDGG-----	AK	G
RPS4	KLMHHPVDNLKDP	YSQLHERKVLVLLD	VSKREQIDALREILDWIKG-----	KE	G
rgVhyb149	NFFNLNRKRIKID	SHLRDLVQKRFLL	FSTMMIQEYVNAIGNRDWFG-----	RG	S
rgVhyb102	LTMKGSKSKKIC	KNKSKQITMD	IVIVYQADQEITALYLNKISVLLS-----	LN	K
rgVcin123	DGMESKDKQCRMN	QCANGQTS	SLKGSYYSRQFE	SITILSWKLVWYW-----	
rgVcin111	CSDCDKKQVSLK	GSYSYSCRQFE	ATIILSRRAWLVWSKMHHLRSTL	FK-----	CA
rgVhyb127	SLYSNGEKFEV	KYRNQDNEAS	LKGSYCSRLSKTIKIFCSSM	VRSSR-----	KH
rgVcin127	RNMVFVFDG	GVKASME	SMCUTDFTLKRFLFLM	TWMIINMPLEMLIG-----	
rgVhyb121	IPSGFTLVIALIP	SSTYLDDSEEE	YQLWIDPAAPICHLTKA	QISLSS-----	GH
rgVhyb139	CLRRRPCMSVLM	HRSYCRKDDFL	FHQTGGMHPSCFI	IKTIAGKTE	FCS-----
					KIR
	RNBS-B	RNBS-C			
rgVcin139	RIITTTTRHKHFL	TQYGV---IESYEV	PKLHDAEAIELFSW	WAFK-QNLP	MEIYKNLSYR
rgVhyb101	RIIITTRHKRFL-	QYGV---KESYEV	QKLHDEIELSLA---	FP-QNLP	SEIYR---NYR
rgVcin165	TIITTTTRDKH	VLAQYGA---DIPYEV	SKLNKEEATEL	FLSWALK-QNH	PQEVYKNLSYN
rgVrup103	TIITTTTRDKH	VLAQYGA---DIPYEV	STLNKEEATEL	FLSWAFK-QNH	PQEVYKNLSYN
rgVcin109	RIIITTRDQHC	LMVLGV---DASYEV	KALNVEESIQL	FCQHAFC-QNLP	KSDYVLDLSNH
N	RIIITTRDKH	LIEKN-----DIIYEV	TALPDHESIQL	FKQHAFC-KEV	PNMFEKLSLE
L6	RFIITSRMRV	LGTLMENQ--CKLYE	VGSMSKPRSE	LEFSKHAFK-KNT	PPSYETLAND
M	RFIITSRNRQ	NVLSRLMENQ--CKLYE	VGSMSQHSLE	LEFSKHAFK-KNT	PPSDYETLAND
rgVcin125	KVIFTTRFST	VCHMGAKS---IEVE	CLAWEAFA	SLFRKTVGED--	TLDSPDIQKLAEI
rgVrup126	KVIFTTRFST	VCHMGAKA---LKL	SAWHGRKFL	FCFGPREKTP--	ILIQIYKRLRRFLS
rgVhyb110	KVFTTRFST	VCPDMGAKG---IEV	CLEAFALFOAY	VGKDT-----	
RPS5	KVFTTRSRD	VCGRMGVDD--PMEV	SCLQPEES	WDLFQMKVGGN--	TLGSHPDIPGLARK
RPS2	KVMFTTRSI	ALCNMGAEY--KLR	VEFLEKKHAWEL	FCSKVGRK--	DLES
I2	KIIVTRKES	VAMMGSRP---IIME	ILSSEFSW	PLFKRHAFK	ERK-DPKE
Xal	MILLITRIS	IAKSLGTVQ--SIK	LEALKD	DDIWSL	FKVHAFGND-KH
rgVrup124	SIITTTTRKE	VATMMGVEE	ERTHRPKVLSKDD	SWLFRN	VAFAMGGICTS
rgVrup119	KILLITRLEN	VCHVMSQAK--VPL	NI	LSAQD	SWLFRKAG---RV
rgVcin152	SKLIIVR-DKL	VASHGTCF---MYE	LKGLSDEE	CLSLFITCAF	D---DRD
RPS4	RVVLAIS	DMSLTNGLDVDD---	YMVQNL	MHRD	SLOLFYHAFID
rgVhyb149	RIIITTTTRDK	CLLSFHCVNY---YE	VEKFYRDEAY	SDIIHSL	THELPTAFLGAFKI
rgVhyb102	YLIVNIRI	YQLITPLTPTS---SSK	ILDGSP	PRSQSLVNSRPP	
rgVcin123	KNCYNNRT	ICMCHGVSEIY-----	EAKELPEEAL	QLFSQYAF	SKSRIRLVEP
rgVcin111	RCIISLRHD	TRLSNFSVN-----	NPLNTT	FLKVTMTS	QINYMKASPS
rgVhyb127	NHCDHEKT	LPRCTVIFIIG-----	GISTQAS	YGTLLLECL	STTPSKRELC
rgVcin127	LWLELLQ	LEINCMCEVVKY-----	MRLRN	NKRLFN	FSVMNLS---
rgVhyb121	IFLLP	FHPHSYLP	PIYKELAE	PPHVLW	TPSPKSLHQIP
rgVhyb139	CLGIL	CPTRLEFP	LETE-----Q	SPDP	QSYVCLRN

**Figure 2** Multiple alignments of representative amino acid sequences of 19 RGA clones and eight known R-genes based on ClustalW analysis. The P-loop and GLPL motifs corresponding to primer sequences are shown in the first seven and the last six amino acids. Aspartic acid (D) and tryptophan (W); underline in the kinase-2 motif are characteristic of TIR and non-TIR proteins, respectively.



**Figure 3** Phylogenetic tree of 19 *Vitis* RGA sequences and eight known TIR or non-TIR proteins.

veloped by Di Gaspero and Cipriani (2003), and these have already been located on the *Vitis* map. For example, rgVamu092 is located on linkage group 13, rgVrip064 on linkage group 18, and rgVamu085 on linkage group 19 (Di Gaspero et al. 2007); linkage groups are numbered according to set standards (Riaz et al. 2004, Doligez et al. 2006). We therefore suggest that markers with a significant correlation of their segregation in the same populations are located on the same linkage group (Table 3). Interestingly, we found a significant correlation between segregation for downy mildew resistance and segregation of three markers, rgVamu085, stkVa011, and rgVcin165 ( $r = -0.173, 0.152, \text{ and } 0.151$ , respectively), suggesting that each of these markers may co-segregate with a gene controlling downy mildew resistance in grape. Further work is needed to confirm this possibility.

### Discussion

Nineteen unique groups of RGA sequences from *V. cinerea* B9, *V. rupestris* B38, and Horizon have been cloned from P-loop/GLPLAL-1 PCR, and four unique groups were derived from *V. cinerea* B9 by P-loop/Rev loop PCR. The P-loop/Rev loop primers produced sequence data with a low percent match with known RGAs in GenBank. These data suggest that the P-loop/GLPAL-1 primer pairs used are highly conserved at the NBS

domain and have greater potential for cloning RGAs from grape, compared with P-loop/Rev loop primers.

Most of the RGA clones from the three grape genotypes used here displayed high similarity with RGA clones from *V. amurensis*, especially seven RGA clones that showed complete similarity to RGAs cloned from *V. amurensis*. We also found similarity with RGAs cloned from *V. riparia*. Interestingly, *V. amurensis*, *V. cinerea*, *V. riparia*, and *V. rupestris* are reported as being highly resistant to downy mildew and powdery mildew (Eibach et al. 1989, Alleweldt et al. 1990). Moreover, none of the RGA clones identified showed similarity to sequences from susceptible species such as *V. vinifera*. There is evidence that RGA sequences from *V. amurensis* and *V. riparia* had a high probability of linkage with disease resistance genes in *Vitis* germplasm (Di Gaspero and Cipriani 2002). Since these RGAs were found in several grape species that are resistant to diseases such as downy mildew and powdery mildew, they could possibly be linked to or be candidate genes for disease resistance (Di Gaspero and Cipriani 2002). The RGA sequences we identified in resistant genotypes may also be linked to disease-resistance loci in *Vitis*, but further segregation studies will be needed for verification.

**R gene evolution.** Plants respond to pathogens by direct and/or indirect interaction between plant *R* genes and *Avr* genes in the pathogen (Dangl and Jones 2001).

**Table 3** STS markers on three expected linkage groups and correlation analysis for marker segregation within each group.

STS marker	Expected LGs	Correlation within group	
		Marker	$r^b$
rgVamu092 <sup>a</sup>	13	rgVamu092 -rgVcin109	0.248**
rgVcin109 <sup>a</sup>		rgVamu092 -rgVcin165	0.163*
rgVcin123		rgVcin109 -rgVcin165	0.240**
rgVcin165		rgVcin109 -rgVhyb149	0.258**
rgVhyb121		rgVcin109 -rgVhyb121	0.288**
rgVhyb149		rgVhyb121 -rgVamu092	0.174*
		rgVhyb121 -rgVcin165	0.261**
		rgVhyb121 -rgVcin123	0.266**
		rgVcin123 -rgVamu092	0.188*
rgVrip064 <sup>a</sup>	18	rgVrip064 -rgVhyb101	-0.128**
rgVcin139 <sup>a</sup>		rgVcin139 -rgVhyb101	0.315**
rgVhyb101 <sup>a</sup>			
rgVamu085 <sup>a</sup>	19	rgVamu085 -rgVcin125	-0.254**
rgVcin111		rgVamu085 -rgVhyb110	-0.301**
rgVcin125 <sup>a</sup>		rgVcin125 -rgVhyb110	0.604**
rgVrup126		rgVcin125 -rgVcin111	-0.201*
rgVhyb110 <sup>a</sup>		rgVhyb110 -rgVrup126	0.282**

<sup>a</sup>Closely related original nucleotide sequence in the group.

<sup>b</sup>\* and \*\* indicate significance at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively.

Gene-for-gene interactions may increase resistance to pathogens if *R* genes increase the ability to recognize the pathogen. The LRR and TIR/non-TIR have a role in pathogen recognition; therefore unbalanced selection was needed to recognize rare *Avr* gene products in pathogen populations (Zhou et al. 2004). Mechanisms such as chromosome breaking, rearrangement, preexisting divergent duplication, unequal crossing over, gene conversion, and diversifying selection have been proposed to generate diversity in LRRs and TIR/non-TIR domains (Ellis et al. 2000, Richter and Ronald 2000).

Diversifying selection relies upon genomic instability mediated by unequal crossing over in meiosis (Richter and Ronald 2000). Interestingly, diversifying selection has been found in non-TIR-NBS-LRR rather than TIR-NBS-LRR genes. As shown in rice, there is no significant increase in the number of similar or almost identical genes within non-TIR-NBS-LRRs, whereas copies of similar TIR-NBS-LRR genes were duplicated (Zhou et al. 2004). Their data support the hypothesis that non-TIR-NBS-LRR genes are more highly variable than TIR-NBS-LRRs. The difference in diversity between TIR and non-TIR domains was also present in the NBS-LRR domains of the three grape genotypes in the present study. The DNA sequences among the TIR-NBS-LRR group displayed high similarity, ranging from 73.5 to 97.4% (for example, rgVcin111/rgVcin123, *L6/M*, and rgVcin165/rgVrup103 have 73.5, 78.2, and 97.4% identity, respectively). On the other hand, the amino acid sequence in the non-TIR-NBS-LRR group showed more variation within groups, with similarities ranging from 43 to 97.4% (for example, *RPS2/RPS5*, rgVhyb110/rgVrup119, and rgVhyb110/rgVcin125 have 43, 57.5, 77.1% identity, respectively). The shorter branch lengths among TIR-NBS-LRR groups as compared with non-TIR-NBS-LRR groups support the hypothesis that these proteins are more highly conserved (Figure 3). Therefore, in terms of gene diversification, non-TIR-NBS-LRRs might be more adaptively responsive and selection acting on this fluidity could lead to the more rapid development of pathogen recognition.

**Potential of *Vitis* RGAs as molecular markers.** Molecular markers based on RGAs have been developed from conserved domains of diverse plant species. The RGA sequences cloned in the present study from highly conserved domains of three disease-resistant grape genotypes will hopefully be useful for the development of markers linked to disease resistance. Because of their complete association with resistance-like genes, RGA markers may have the potential to improve the efficacy of MAS for disease-resistance traits. At least, three markers developed from RGA sequences (rgVamu085, stkVa011, and rgVcin165) are candidates for co-segregation with downy mildew resistance loci because of their significant correlations of marker segregation with disease resistance in a segregating population. However, rgVamu085 and rgVcin165 have a nonnormal segregation ratio. Therefore, stkVa011 seems to be the best candidate to co-segregate with a downy

mildew resistance locus. Many of our RGA-STS markers are expected to map to linkage groups 13, 18, and 19. Interestingly, RGA-STS markers from Di Gaspero and Cipriani (2003) also show high numbers on these three linkage groups from Cabernet Sauvignon, Bianca, and Chardonnay maps (Di Gaspero et al. 2007), suggesting that RGAs cluster on linkage groups 13, 18, and 19 of the *Vitis* genome. However, further proof is required through final map placement of the RGA-STS markers identified here. Future work will also be able to determine whether RGAs in grapevine are responsible for disease resistance and to relate each RGA to the disease it affects.

## Conclusions

Downy mildew may cause severe losses in yield and reductions in fruit quality of susceptible grape varieties. *Vitis vinifera* is the primary scion variety grown around the world and is highly susceptible to downy mildew. *R* genes are accessible in American and Asiatic species of *Vitis*, which hybridize readily with *V. vinifera*, and have been used extensively in breeding programs to create resistant cultivars. To improve the efficiency of grapevine breeding, an important goal is to locate molecular markers linked to alleles responsible for disease resistance. Genetic maps have been created using numerous crosses involving *Vitis* species, and quantitative trait loci analyses have been used to locate markers with strong associations to disease resistance. Breeders are actively trying to incorporate various molecular markers into their programs.

RGAs should have very good potential for use as molecular markers for disease resistance traits because of their known associations with disease resistance in plants. We have shown that RGA sequences derived from three downy mildew resistant genotypes have a high degree of similarity with RGAs cloned from *V. amurensis* and *V. riparia*, two species that harbor downy mildew resistance. There is a possibility that the RGA sequences characterized in the present work may confer functional resistance to downy mildew, but that will require further work to confirm. The precise linkage map locations of the most promising markers identified from *V. cinerea*, *V. rupestris*, and Horizon will need to be identified in future work. Indications at this time are that some of the RGAs we have identified are located on linkage groups already known to be associated with resistance loci.

## Literature Cited

- Aarts, M.G.M., B. te Lintel Hekkert, E.B. Holub, J.L. Beynon, W.J. Stiekema, and A. Pereira. 1998. Identification of *R*-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11:251-258.
- Alleweldt, G., P. Spiegel-Roy, and B.I. Reisch. 1990. Grape (*Vitis*). In *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops*. J.N. Moore and J.R. Ballington (Eds.). *Acta. Hort.* 290:291-337.

- Baker, C.L., T.M. Donald, J. Pauquet, M.B. Ratnaparkhe, A. Bouquet, A.F. Adam-Blondon, M.R. Thomas, and I.B. Dry. 2005. Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. *Theor. Appl. Genet.* 111:370-377.
- Bent, A.F., B.N. Kunkel, D. Dahlbeck, K.L. Brown, R. Schmidt, J. Giraudat, J. Leung, and B.J. Staskawicz. 1994. *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: A leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265:1856-1860.
- Dalbo, M.A., G.N. Ye, N.F. Weeden, H. Steinkellner, K.M. Sefc, and B.I. Reisch. 2000. A gene controlling sex in grapevines placed on a molecular marker-based genetic map. *Genome* 43:333-340.
- Dalbo, M.A., G.N. Ye, N.F. Weeden, W.F. Wilcox, and B.I. Reisch. 2001. Marker-assisted selection for powdery mildew resistance in grapes. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 126:83-89.
- Dangl, J.L., and J.D.G. Jones. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-833.
- Di Gaspero, G., and G. Cipriani. 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 G. Cipriani. 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., G. Cipriani, A.F. Adam-Blondon, and R. Testolin. 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.
- Dixon, M.S., K. Hatzixanthis, D.A. Jones, K. Harrison, and J.D.G. Jones. 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.
- Doligez, A., A.F. Adam-Blondon, G. Cipriani, G. Di Gaspero, V. Laucou, D. Merdinoglu, C.P. Meredith, S. Riaz, C. Roux, and P. This. 2006. An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations. *Theor. Appl. Genet.* 113:369-382.
- Eibach, R., H. Diehl, and G. Alleweldt. 1989. Untersuchungen zur Vererbung von Resistenzeigenschaften bei Reben gegen *Oidium tuckeri*, *Plasmopara viticola* und *Botrytis cinerea*. *Vitis* 28:209-228.
- Ellis, J., P. Dodds, and T. Pryor. 2000. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:278-284.
- Gedil, M.A., M.B. Slabaugh, S. Berry, R. Johnson, R. Michelmore, J. Miller, T. Gulya, and S.J. Knapp. 2001. Candidate disease resistance genes in sunflower cloned using conserved nucleotide-binding site motifs: Genetic mapping and linkage to the downy mildew resistance gene *PI1*. *Genome* 44:205-212.
- Hammond-Kosack, K.E., and J.D. Jones. 2000. Response to plant pathogens. *In* *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. B.B. Buchanan et al. (Eds.), pp. 1102-1156. Rockville, MD.
- Hunger, S., G. Di Gaspero, S. Möhring, D. Bellin, R. Schäfer-Pregl, D.C. Borchardt, C.F. Durel, M. Weber, B. Weisshaar, F. Salamini, and K. Schneider. 2003. Isolation and linkage analysis of expressed disease-resistance gene analogues of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Genome* 46:70-82.
- Joyeux, A., M.G. Fortin, R. Mayerhofer, and A.G. Good. 1999. Genetic mapping of plant disease resistance gene homologues using a minimal *Brassica napus* L. population. *Genome* 42:735-743.
- Kennelly, M.M., D.M. Gadoury, W.F. Wilcox, P.A. Magarey, and R.C. Seem. 2005. Seasonal development of ontogenic resistance to downy mildew in grape berries and rachises. *Phytopathology* 95:1445-1452.
- Lafon, R., and M. Clerjeau. 1988. Downy mildew. *In* *Compendium of Grape Diseases*. R.C. Pearson and A.C. Goheen (Eds.), pp. 11-13. Am. Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Lodhi, M.A., G.N. Ye, N.F. Weeden, and B.I. Reisch. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12:6-13.
- Meyers, B.C., A.W. Dickerman, R.W. Michelmore, S. Sivaramakrishnan, B.W. Sobral, and N.D. Young. 1999. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J.* 20:317-332.
- Muller, K., and H. Sleumer. 1934. Biologische Untersuchungen über die Peronosporakrankheit des Weinstocks mit besonderer Berücksichtigung ihrer Bekämpfung nach Inkubationsmethode. *Z. Wiss. Landwirtschaft* 79:509-576.
- Parker, J.E., M. Coleman, V. Szabo, L. Frost, R. Schmidet, E.V.D. Biezen, T. Moores, C. Dean, and J.D.G. Jones. 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.
- Riaz, S., G.S. Dangl, K.J. Edwards, and C.P. Meredith. 2004. A molecular marker based framework linkage map of *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* 108:864-872.
- Richter, T.E., and P.C. Ronald. 2000. The evolution of disease resistance genes. *Plant Mol. Biol.* 42:195-204.
- Song, W.Y., G.L. Wang, L.L. Chen, H.S. Kim, L.Y. Pi, T. Holsten, J. Gardner, B. Wang, W.X. Zhai, L.H. Zhu, C. Fauquet, and P. Ronald. 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* 270:1804-1806.
- Taler, D., M. Galperin, I. Benjamin, Y. Cohen, and D. Kenigsbuch. 2004. Plant *ER* genes that encode photorespiratory enzymes confer resistance against disease. *Plant Cell* 16:172-184.
- Toojinda, T., L.H. Broers, X.M. Chen, P.M. Hayes, A. Kleinhofs, J. Korte, D. Kudrna, H. Leung, R.F. Line, W. Powell, L. Ramsay, H. Livar, and R. Waugh. 2000. Mapping quantitative and qualitative disease resistance genes in a doubled haploid population of barley (*Hordeum vulgare*). *Theor. Appl. Genet.* 101:580-589.
- Whitham, S., S.P. Dinesh-Kumar, D. Choi, R. Hehl, C. Corr, and B. Baker. 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: Similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 78:1101-1115.
- Yan, G.P., X.M. Chen, R.F. Line, and C.R. Wellings. 2003. Resistance gene-analog polymorphism markers co-segregating with the *Yr5* gene for resistance to wheat stripe rust. *Theor. Appl. Genet.* 106:636-643.
- Zhou, T., Y. Wang, J.Q. Chen, H. Araki, Z. Jing, K. Jiang, J. Shen, and D. Tian. 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.

## ประวัติผู้วิจัย

นาง ปิยะดา นามสกุล ตันตสวัสดิ์ (Mrs. Piyada Tantasawat) เกิดเมื่อวันที่ 5 ธันวาคม พ.ศ. 2510 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี สาขาวิชาเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปี พ.ศ. 2531 (เกียรตินิยมอันดับ 1) และปริญญาเอก สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืช (Plant Breeding), Cornell University ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี พ.ศ. 2540 หลังจบการศึกษาได้ทำงานเป็น Postdoctoral research associate ที่ Cornell University ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นเวลา 3 ปี แล้วจึงกลับมาทำงานที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมาตั้งแต่ พ.ศ. 2543 จนถึงปัจจุบัน ตำแหน่งปัจจุบันคือ รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สอนวิชาต่าง ๆ ทั้งในระดับปริญญาตรี โท และเอก ด้านปรับปรุงพันธุ์พืช เทคโนโลยีชีวภาพ การต้านทานโรคและแมลง และเทคโนโลยีการผลิตพืช เป็นหัวหน้าโครงการวิจัยและผู้ร่วมวิจัยในประเทศไทยรวมทั้งอดีตถึงปัจจุบัน 9 โครงการ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพันธุ์ถั่ว ถั่วเขียว ทานตะวัน และแตงกวาโดยวิธีมาตรฐานและ/หรือการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพ (การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เครื่องหมายโมเลกุล และเทคนิคด้านอนุชีววิทยา) มีผลงานวิจัยที่เผยแพร่ในรูป บทความวิจัย บทความปริทัศน์ รายงานการประชุม รายงานการวิจัย ฯลฯ รวม 48 เรื่อง

หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถ. มหาวิทยาลัย

ต. สุรนารี อ.เมือง จ. นครราชสีมา 30000

โทร. 0-4422-4204

โทรสาร 0-4422-4281

E-mail piyada@sut.ac.th

### งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว: ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

1. การโคลนกลุ่มของยีนต้านทานโรค (RGAs) เพื่อให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในองุ่น (*Vitis* spp.). (2547). การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 4, เชียงใหม่. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ
2. การจำแนกพันธุ์ถั่วฝักยาวไร้ค้างและถั่วฝักยาวโดยใช้ ISSR analysis. (2548). การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5, ชลบุรี. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ
3. การตรวจสอบลูกผสมถั่วเขียวช้ำที่หนึ่งโดยเครื่องหมายโมเลกุล ISSR. (2549). การประชุมวิชาการพืชไร่วังศ์ถั่วแห่งชาติ ครั้งที่ 1, เชียงราย. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ
4. การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบถั่วเขียว (*Vigna radiata*). (2547). การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 4, เชียงใหม่. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ
5. การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) คับเบิลแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร. (2547). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. หน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ
6. การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) สายพันธุ์แท้โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร. (2547). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. หัวหน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ
7. การแยกโปรโตพลาสต์ทานตะวัน. (2550). การประชุมวิชาการ งาน ทานตะวัน ละหุ่ง และ คำฝอยแห่งชาติ ครั้งที่ 5, น่าน. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ
8. การส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดภายใต้สภาพ photoautotrophic. (2546). การประชุมศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติประจำปี นครปฐม. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ
9. บทบาทของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases) ในการต้านทานของมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* L.) ต่อการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* (F.)). (2548). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. หน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
10. ผลของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในมะเขือเทศต่อความต้านทานของหนอนกระทู้หอม. (2548). การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5, ชลบุรี. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน)
11. A simple and highly efficient protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration from proembryonic mass suspension culture in 'Autumn Royal Seedless'. (2007). *Vitis* 46(1): 45-46. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4

12. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. (2004). *Planta* 220: 105-117. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
13. Cloning of resistance gene analogs (RGAs) in grapevine (*Vitis cinerea*). (2005). International Grape Genomics Symposium, St. Louis, USA. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
14. Cloning of resistance gene analogs (RGAs) in grapevine hybrid. (2006). The 9<sup>th</sup> International Conference on Grape Genetics and Breeding, Udine, Italy. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
15. Cultural characteristics of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grape anthracnose on different media. (2009). *Suranaree J. Sci. Technol.* 6(2): 149-157.
16. Defensive role of polyphenol oxidases against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. (1996). Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists, San Antonio, Texas. *Plant Physiol.* 111s: 168. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เสนอผลงาน
17. Defensive role of tomato polyphenol oxidases against cotton bollworm (*Helicoverpa armigera* [Hübner]) and beet armyworm (*Spodoptera exigua* [Hübner]). (submitted). หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 4d
18. Development of food safety software prototype. (2006). *Suranaree J. Sci. Tech.* 13: 101-111. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4
19. Differential expression and turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. (1997). *Plant Physiol.* 113: 707-718. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
20. Diversity of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grapevine anthracnose in Thailand. (2006). Proceedings of the International Workshop on Tropical and Subtropical Fruits (at Royal Flora Ratchaphruek 2006, International Horticultural Exposition for His Majesty the King). Nov 20-23, 2006, Chiang Mai, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
21. Effects of colchicine on aseptic culture of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). (1988). พิเศษ
22. Functional analysis of polyphenol oxidases by antisense/sense technology. (2007). *Molecules* 12: 1569-1595. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1
23. Genetic diversity and pathogenicity analysis of *Sphaceloma ampelinum* causing grape anthracnose in Thailand. Short Communication. *J. Phytopathol.* (2010)
24. Genetic diversity of the *Vigna* germplasm from Thailand and neighboring regions revealed by AFLP analysis. (2006). *Gen. Res. Crop Evol.* 53: 1043-1059. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4

25. Identification of genes for resistance to powdery mildew in mungbean. (2007). Proceedings of the 8<sup>th</sup> African Crop Science Society Conference. Oct 27-31, 2007, El-Minia, Egypt. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
26. Increasing resistance of tomato to Lepidopteran insects by overexpression of polyphenol oxidase. (2004). 6<sup>th</sup> World Congress on the Processing Tomato, Melbourne, Australia. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน. แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
27. Modification of polyphenol oxidase expression in transgenic tomato: role of PPO in disease resistance. (1997). Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Copper Mountain, Colorado. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
28. Molecular characterization of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grapevine anthracnose in Thailand. (2007). Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Table Grape Symposium. Nov 14-16, 2007, Cape town, South Africa. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
29. Molecular, morphological and pathogenicity characterization of *Sphaceloma ampelinum* isolates from Thailand. (2006). The 9<sup>th</sup> International Conference on Grape Genetics and Breeding, Udine, Italy. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
30. NBS-LRR-type resistance gene analogs (RGAs) in *Vitis cinerea* B9, *V. rupestris* B38 and 'Horizon. (2006). Proceedings of the International Workshop on Tropical and Subtropical Fruits (at Royal Flora Ratchaphruek 2006, International Horticultural Exposition for His Majesty the King). Nov 20-23, 2006, Chiang Mai, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
31. Overexpression of a bacterial branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex in Arabidopsis results in accumulation of branched-chain acyl-CoAs and alteration of free amino acid composition in seeds. (2003). Plant Sci. 165: 1213-1219. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 2
32. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants increases resistance to common cutworm (*Spodoptera litura* (F.)). (2003). Plant Biology 2003, Honolulu, Hawaii. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน
33. Overexpression of tomato polyphenol oxidase increases resistance to common cutworm. (2008). Plant Sci. 174: 456-466. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 4
34. Polyphenol oxidase gene family: differential expression during vegetative and reproductive development, and in response to injuries, and defensive functional analysis. (1997). Ph.D. thesis. Cornell University, Ithaca, NY. 132 pp.



35. Polyphenol oxidase-mediated resistance to common cutworm. (2007). Proceedings of the 60<sup>th</sup> New Zealand Plant Protection Conference. Aug 13-16, 2007, Napia, New Zealand. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน
36. PPO expression and accumulation during pollen germination and pollen tube growth. (2002). Fourteenth Annual Penn State Symposium in Plant Physiology: Plant Reproduction 2002, State College, Pennsylvania. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
37. Production of doubled haploid maize (*Zea mays* L.) by anther culture. (2004). AgBiotech Graduate Conference I, Bangkok, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
38. Resistance gene analogs from *Vitis cinerea*, *Vitis rupestris*, and *Vitis* hybrid Horizon. (2007). Am. J. Enol. Vitic. 58(4): 484-493. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4
39. SSR analysis of soybean genetic diversity in Thailand. (2009). *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.* (submitted).
40. Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. (1997). 5th International Congress of Plant Molecular Biology, Singapore. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
41. Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. (2004). *Plant Sci.* 167: 693-703. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
42. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. (1995). *Phytochemistry* 40: 673-676. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
43. Tomato polyphenol oxidase (PPO) B expression. (in preparation).
44. Tomato polyphenol oxidase (PPO) D expression. (in preparation).
45. Tomato polyphenol oxidase (PPO): differential response of the PPO F promoter to injuries and wound signals. (1997). *Plant Physiol.* 115: 409-418. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
46. Tomato polyphenol oxidase (PPO): role of PPO during oxidative stress. (2004). *Plant Sci.* 167: 693-703.
47. Variety identification and comparative analysis of genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) using morphological characters, SSR and ISSR analysis. (2010). *Sci. Hort.* 124:204-216.
48. Variety identification and genetic relationships of mungbean and blackgram in Thailand based on morphological characters and ISSR analysis. (2010). *African Journal of Biotechnology.* 9(27): 4452-4464.