เทคนิคการประเมินความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ และการจำแนกตำแหน่งยีนต้านทานด้วยโมเลกุลเครื่องหมายในข้าวโพด

Evaluation Technique for Northern Corn Leaf Blight Resistance and Identification of Resistance Genes Position in Maize with DNA markers

กัญญณัช ศิริธัญญา[1*] พิมพ์พรรณ เมืองมา[2]

[1,2] สถาบันวิจัยเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จังหวัดลำปาง 52000

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคใหม่ในการปลูกถ่ายเชื้อและการประเมินความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด ทดสอบ 2 สภาพการทดลอง คือ สภาพโรงเรือน อายุข้าวโพด 10 - 14 วัน (4 - 5 ใบ) และสภาพแปลงทดลองอายุข้าวโพด 21 - 25 วัน (6 - 7 ใบ) โดยปลูกถ่ายเชื้อไอโซเลทจากภาคเหนือ ACIL1 ทำการฉีดพ่น spore suspension ความเข้มข้น 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ลงบนต้นข้าวโพด โดยใช้ประชากรลูกผสม Ki48/Ki47 ชั่วที่ 2 ทั้งหมด 160 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับพันธุ์มาตรฐานการค้า 2 พันธุ์ (ไฮบริกซ์3 และ อินทรี2) ได้ค่าความสัมพันธ์ของทั้งสองสภาพ (Correlation) เท่ากับ 0.658 นั้นคือการประเมินความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด ทั้งในสภาพโรงเรือน และสภาพแปลงทดลอง เป็นไปในทิศทางเดียวกัน

ประชากรลูกผสม Ki48/Ki47 ชั่วที่ 2 ทั้งหมด 160 สายพันธุ์ ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาตำแหน่ง Quantitative Trait Locus (QTL) เพื่อหาความสัมพันธ์ลักษณะทางพันธุกรรมและความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ โดยใช้ Simple Sequence Repeats (SSR) Marker จำนวน 100 คู่ บน 10 โครโมโซมของข้าวโพด พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ (Parental Polymorphism) ทั้ง 10 โครโมโซม แต่พบมากที่สุดบนโครโมโซม 5 และ 8 และเมื่อวิเคราะห์ Single QTL analysis ที่โครโมโซม 5 พบเครื่องหมายโมเลกุล UMC1365 และบนโครโมโซม 8 พบเครื่องหมายโมเลกุล UMC1095, UMC1268 และ UMC2356 สามารถจำแนกตำแหน่งยีนต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในประชากรนี้ได้อย่างชัดเจน

Abstract

This study aims to develop a new evaluation technique for Northern Corn Leaf Blight (NCLB) resistance in maize under greenhouse condition. Ki48/Ki47 F_2 (160 lines) and 2 commercial verities (Hi-Brix3 and Insee2) were evaluated. For this technique, 10-14 day old seedlings (4-5 leaves) were sprayed with ACIL1 spore suspension (10^4 spores/ml.) for infection. The results of this technique correlated with the results from the common technique under field condition, which used 21-25 days old seedlings (6-7 leaves) (correlation value = 0.658).

This evaluation technique was used to assist in QTL mapping of NCLB resistance. Population of Ki48/Ki47 F_2 (160 lines) were analyzed for QTL mapping by using Simple Sequence Repeats (SSR) markers. It was found that major parental polymorphism located on chromosome 5 and chromosome 8. When Single QTL analysis was performed, SSR marker UMC1365 could clearly indentified qualitative trait loci on chromosome 5 and SSR markers UMC1095, UMC1268 and UMC2356 could clearly indentified qualitative trait loci on chromosome 8.

คำสำคัญ : โมเลกุลเครื่องหมาย ตำแหน่งยีนต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ เชื้อรา ข้าวโพด
Keywords : Molecular Marker, Resistance Genes for Northern Corn Leaf Blight, *Exserohilum turcicum*, Maize

ผู้นิพนธ์ประสานงานไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ Pattamasirithunya@yahoo.com, โทร.08 1484 7661 , 08 0791 1012

1. บทนำ

ข้าวโพด (*Zea mays* Linn.) เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย ความต้องการใช้ข้าวโพดเพื่ออุตสาหกรรมมีเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ปี พ.ศ.2551 โดยมีพื้นที่ปลูกกระจายอยู่ทั่วทุกภูมิภาคประมาณ 5.9 ล้านไร่ (สำนักส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร, 2553) การบริโภคและอุตสาหกรรมข้าวโพดภายในประเทศได้ขยายตัวอย่างรวดเร็วในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา และมีแนวโน้มที่จะขยายตัวเพิ่มขึ้นอีก (โชคชัย และเกตุอร, 2556) ในปีเพาะปลูก 2553/54 ปริมาณความต้องการข้าวโพดขยายขึ้นถึงปีละ 4.1 ล้านตัน ขณะที่ผลผลิตภายในประเทศเฉลี่ย 4.2 ล้านตัน จากพื้นที่ปลูก 7.8 ล้านไร่ มีการนำเข้า 0.1 ล้านตัน และส่งออกเพียง 0.2 ล้านตัน จากข้อมูลสำนักเศรษฐกิจการเกษตร (2555) ในปัจจุบันปริมาณผลผลิตข้าวโพดลดลง สาเหตุอาจเนื่องมาจากสภาพเครียดต่างๆ และการเข้าทำลายของโรคศัตรูหลายชนิดทั้งที่เกิดจาเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และแมลง โรคข้าวโพดที่สำคัญ ส่งผลกระทบต่อการผลิต และเศรษฐกิจ คือ โรคใบไหม้แผลใหญ่ (Northern Corn Leaf Blight: NCLB) ที่เกิดจากเชื้อรา *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs ทำให้ผลผลิตลดลงถึงร้อยละ 30 - 40 ซึ่งขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อและระยะการเจริญเติบโตของข้าวโพด การป้องกันกำจัดโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือการใช้พันธุ์ต้านทานต่อโรคสามารถลดความเสียหายจากการทำลายของโรค (เบญจพรรณ และคณะ, 2546) การปลูกถ่ายเชื้อ (Inoculation) เป็นขั้นตอนสำคัญเพื่อศึกษาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพดได้อย่างรวดเร็ว และเป็นขั้นตอนสำคัญของการศึกษาของโรคใบไหม้แผลใหญ่ในหลายๆ ด้าน เช่น การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคพืช การทดสอบและการคัดเลือกพืชต้านทานโรค การหาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสาเหตุและพืชอาศัย เป็นต้น

ปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หรือโมเลกุลเครื่องหมาย (molecular marker) ได้เข้ามามีบทบาทในงานด้าน พันธุศาสตร์ และการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมาก การใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุ์พืช (varietal identification) ได้เข้ามาช่วยให้การจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น (สุรีพร, 2546) นอกจากนั้น โมเลกุลเครื่องหมายยังใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (genetic diversity) (Mondini *et al*., 2009) การประยุกต์ใช้โมเลกุลเครื่องหมายในงานปรับปรุงพันธุ์ส่วนใหญ่มีจุดประสงค์เพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีตามที่ต้องการ ซึ่งเป็นวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าการคัดเลือกจากฟีโนไทป์ เนื่องจากเป็นการคัดเลือกจากจีโนไทป์โดยตรง (สุรีพร, 2546) โมเลกุลเครื่องหมายสามารถตรวจสอบได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต จึงมีส่วนช่วยประหยัดเวลา ลดแรงงาน ลดต้นทุน และพื้นที่ในการเพาะปลูกได้ ดังนั้น งานปรับปรุงพันธุ์พืชซึ่งถือเป็นหัวใจสำคัญในการสร้างพืชสายพันธุ์ใหม่ (สรพงศ์, 2554) เพื่อให้ได้ข้าวโพดสายพันธุ์ดีจะโดยการเพิ่มผลผลิต เพิ่มคุณภาพ หรือเพิ่มความต้านทานโรคแมลงนั้น ความก้าวหน้าของเทคโนโลยีชีวภาพ ด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล การนำข้อมูลพื้นฐานและเทคโนโลยีด้านโมเลกุลเครื่องหมายมาใช้ในการจำแนกความต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพดจึงเป็นแนวทางในการแก้ไขอุปสรรคต่างๆ ของนักปรับปรุงพันธุ์ อีกทั้งยังใช้พันธุกรรมข้าวโพดที่มียีนความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป (*Yao et al.,* 2008)

2. วิธีการทดลอง

ประชากรข้าวโพด

สร้างประชากรข้าวโพดลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) ที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์ Ki48 (ต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่) และสายพันธุ์ Ki47 (อ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่) ทำการปลูกเพื่อประเมินความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่จำนวน 160 สายพันธุ์ ณ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ลำปาง โดยใช้พันธุ์มาตรฐานอ่อนแอ (พันธุ์ Hi-brix3) และพันธุ์มาตรฐานต้านทาน (อินทรี2) และใช้ในการศึกษาการจำแนกตำแหน่งยีนต้านทานด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย Simple Sequence Repeats (SSR)

การปลูกถ่ายเชื้อ *E. turcicum*

การปลูกถ่ายเชื้อและการประเมินความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ ดำเนินการทดสอบ 2 สภาพ คือ สภาพโรงเรือน และ สภาพแปลงทดลอง โดยปลูกถ่ายเชื้อไอโซเลทจากภาคเหนือ ACIL1 แหล่งที่มาของเชื้อจาก รศ.ดร.ประสาทพร สมิตะมาน ทำการฉีดพ่น spore suspension ความเข้มข้น 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร

การประเมินระดับอาการเกิดโรค

ให้คะแนนต้นที่ได้รับการปลูกถ่ายเชื้อโดยให้คะแนนตามหลักเกณฑ์ดังนี้ ดัดแปลงจาก *Lipps et al.,* 1997

ความต้านทาน	ระดับคะแนน	อาการเกิดโรค
R	0	0 % ของพื้นที่ใบรวม ไม่พบอาการเกิดโรค
R	1	1 - 20 % ของพื้นที่ใบรวม พบอาการโรคบางใบ
MR	2	21 - 40 % ของพื้นที่ใบรวม พบอาการโรคกระจาย
MS	3	41 - 60 % ของพื้นที่ใบรวม พบอาการโรคเกือบทุกใบ
S	4	61 - 80 % ของพื้นที่ใบรวม พบอาการโรคทั่วทั้งต้น
S	5	81 - 100 % ของพื้นที่ใบรวม พบอาการโรครุนแรงทั่วทั้งต้น

การแยกเชื้อ *E. turcicum*

การแยกเชื้อ *E. turcicum* ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์โดยการแยกสปอร์เดี่ยว (Single spore isolation) และการเลี้ยงเซลล์ปลายเส้นใย (Hyphal tip culture) จากนั้นทำการขยายเชื้อรา *E. turcicum* อาหาร V-8 juice agar ควบคุมอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อราที่ 27 - 28 องศาเซลเซียส เป็นการเพิ่มปริมาณเชื้อที่บริสุทธิ์แล้วให้มีปริมาณมาก เพื่อให้เพียงพอต่อการปลูกถ่ายเชื้อ

การเตรียมโรงเรือนและแปลงทดลอง เพื่อเป็นสถานที่ในการปลูกถ่ายเชื้อ

- การเตรียมโรงเรือน โดยการมุงตาข่ายพรางแสงประมาณร้อยละ 50 และติดสปริงเกอร์ด้านบนของโรงเรือน เพื่อเป็นการควบคุมอุณหภูมิและความชื้นภายในรงเรือน
- การเตรียมแปลงทดสอบ โดยการไถด้วยผ่าน 7 จำนวน 1 ครั้ง และไถพรวนให้ดินละเอียดอีก 1 ครั้ง ระยะปลูกระหว่างแถว 75 เซนติเมตร และระหว่างต้น 25 เซนติเมตร
- ต้นกล้าข้าวโพด อายุ 10-14 วัน (4 - 5 ใบ) เพื่อการปลูกถ่ายเชื้อโรคโรคใบไหม้แผลใหญ่ ในสภาพโรงเรือน
- ต้นกล้าข้าวโพด อายุ 21 - 25 วัน (6 - 7 ใบ) เพื่อการปลูกถ่ายเชื้อโรคโรคใบไหม้แผลใหญ่ ในสภาพแปลงทดลอง

การปลูกถ่ายเชื้อรา *E. turcicum* ลงบนต้นข้าวโพด ในสภาพโรงเรือนและสภาพแปลงทดลอง ใช้การฉีดพ่น spore suspension ให้ตกบนใบและต้นข้าวโพด ความเข้มข้น 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

การประเมินระดับอาการเกิดโรคใบไหม้แผลใหญ่ ในสภาพโรงเรือนและสภาพแปลงทดลอง หลังจากการปลูกถ่ายเชื้อโรคลงบนข้าวโพด ประมาณ 7 และ 10 วัน เริ่มบันทึกอาการของโรคหลังจากการปลูกถ่าย (การปลูกถ่ายเชื้อใน

สภาพแปลงทดลองจะอ่านผลอยู่ 2 ระยะ คือ อายุ 21 - 25 วัน (6 - 7 ใบ) และหลังข้าวโพดผสมประมาณ 20 วัน (อายุ 90 - 95 วัน) เกณฑ์การประเมินระดับอาการเกิดโรคใบไหม้แผลใหญ่ให้คะแนนตามหลักเกณฑ์ Lipps *et al*., 1997 ในข้างต้น

การใช้โมเลกุลเครื่องหมาย จำแนกตำแหน่งยีน QTL ของความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่

- วิเคราะห์เครื่องหมาย Simple Sequence Repeats (SSR) ในประชากร F_2 เลือกเครื่องหมาย SSR จากแผนที่พันธุกรรมที่รายงานไว้ โดยใช้เครื่องหมายจำนวน 100 เครื่องหมาย ในสายพันธุ์ Ki48 และสายพันธุ์ Ki47 ที่กระจายครอบคลุมบนทั้ง 10 โครโมโซมของข้าวโพด

- วิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์ ระหว่างลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) และความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ (phenotype) เพื่อระบุเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้ยีนต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ วิเคราะห์ QTL analysis ประชากรข้าวโพดคู่ผสม

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

ในการสร้างประชากรข้าวโพดชั่วที่ 2 เริ่มจากปลูกสายพันธุ์แม่ (Ki48) และสายพันธุ์พ่อ (Ki47) ทำการผสมข้าม (Crossing) เมื่อได้เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ทำการปลูกและผสมตัวเอง (self-pollinated) ได้ประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) จำนวนทั้งหมด 160 สายพันธุ์

- การปลูกถ่าย (Inoculation) เชื้อรา *E. turcicum* ลงบนต้นกล้าข้าวโพดสายพันธุ์แท้ และการอ่านผลหลังจากการปลูกถ่ายเชื้อ ในสภาพโรงเรือน และสภาพแปลงทดลอง พบว่าข้าวโพดสายพันธุ์ Ki48 ให้ค่าความต้านทาน 1.3 และ 1.4 ระดับความต้านทานปานกลาง (modulate resistance) ในสภาพโรงเรือน และค่าความต้านทาน 1.0 และ 0.8 ระดับความต้านทาน (resistance) ในสภาพแปลงทดลอง ข้าวโพดสายพันธุ์ Ki47 ให้ค่าความต้านทาน 1.8 และ 3.4 ระดับความต้านทานอ่อนแอ (susceptible) ในสภาพโรงเรือน และค่าความต้านทาน 2.2 และ 1.6 ระดับความต้านอ่อนแอปานกลาง (modulate susceptible) ในสภาพแปลงทดลอง เปรียบเทียบกับพันธุ์มาตรฐานการค้า 2 พันธุ์ คือไฮบริกซ์3 ซึ่งมีระดับความอ่อนแอต่อโรค และอินทรี2 ซึ่งมีระดับความต้านทานต่อโรค และเมื่อนำค่าของทั้งสองสภาพมาหาค่าความสัมพันธ์ (Correlation) ได้เท่ากับ 0.993 นั้นคือการประเมินความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดสายพันธุ์แท้ ทั้งในสภาพโรงเรือน และสภาพแปลงทดลอง มีความสัมพันธ์กันในระดับสูง หรือเป็นไปในทิศทางเดียวกันอย่างมาก (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ระดับการเกิดโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดสายพันธุ์แท้ในสภาพโรงเรือนและสภาพแปลงทดลอง

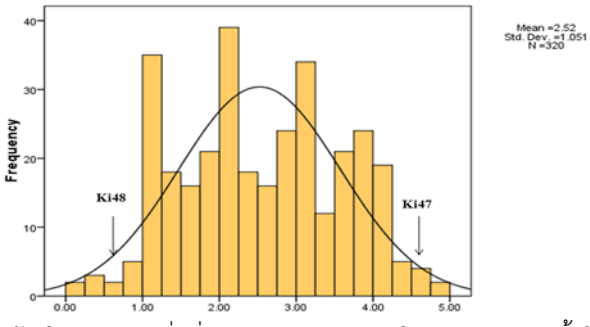
ลำดับ	สายพันธุ์	สภาพโรงเรือน			สภาพแปลงทดลอง		
		ระดับเกิดโรคครั้ง 1 เชื้อ H5	ระดับเกิดโรคครั้ง 2 เชื้อMCC7	ระดับ	ระดับเกิดโรคครั้ง 1 เชื้อ H5	ระดับเกิดโรคครั้ง 2 เชื้อ MCC7	ระดับ
1	Ki48	1.3	1.4	MR	1.0	0.8	R
2	Ki47	1.8	3.4	S	2.2	1.6	MS
3	Hibrix3	4.8	4.6	S	3.9	4.6	S
4	อินทรี2	0.6	0.5	R	0.3	0.5	R
							Correlation = 0.993

รูปที่ 1 ขั้นตอนการประเมินโรคใบไหม้แผลใหญ่บนต้นกล้าข้าวโพดในสภาพโรงเรือน

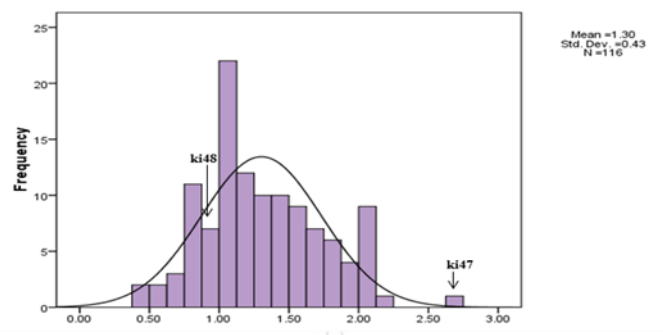
รูปที่ 2 ขั้นตอนการประเมินโรคใบไหม้แผลใหญ่บนต้นข้าวโพดในสภาพแปลงทดลอง

- การปลูกถ่าย (Inoculation) เชื้อรา *E. turcicum* ลงบนต้นข้าวโพดประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) และการอ่านผลหลังจากการปลูกถ่ายเชื้อ ในสภาพโรงเรือน และสภาพแปลงทดลอง

ระดับความเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพด F_2 อยู่ระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ แสดงให้เห็นว่า ประชากร F_2 ลักษณะการเป็นโรคค่อนข้างผันแปรในเชิงปริมาณและการกระจายระดับความเป็นโรคค่อนข้างปกติ (รูปที่ 3 และ 4) ซึ่งสายพันธุ์พ่อแม่แตกต่างกันอย่างชัดเจนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ จึงทำให้ประชากร F_2 มีการกระจายตัวเป็นลักษณะ normal curve ดังนั้นประชากรกลุ่มนี้มีความเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ QTL การกระจายตัวระดับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ของประชากร F_2 มีการกระจายอย่างต่อเนื่องไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อนำค่าของทั้งสองสภาพมาหาค่าความสัมพันธ์ (Correlation) ได้เท่ากับ 0.658 นั้นคือการประเมินความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด F_2 ทั้งในสภาพโรงเรือน และสภาพแปลงทดลอง มีความสัมพันธ์กัน หรือเป็นไปในทิศทางเดียวกัน



รูปที่ 3 การกระจายตัวของข้าวโพดลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) (Ki48/Ki47) ในการปลูกถ่ายเชื้อโรคใบไหม้แผลใหญ่ ในสภาพโรงเรือน



รูปที่ 4 การกระจายตัวของข้าวโพดลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) (Ki48/Ki47) ในการปลูกถ่ายเชื้อโรคใบไหม้แผลใหญ่ ในสภาพธรรมชาติ

การใช้เครื่องหมายโมเลกุล (Marker Assisted Selection: MAS) ในการจำแนกความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ (NCLB)

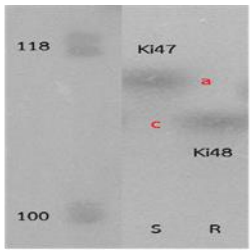
สืบหาเครื่องหมายในการจำแนกความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล จำนวน 169 เครื่องหมาย จากการตรวจเอกสารอ้างอิง พบเครื่องหมายที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในพ่อแม่ จำนวน 149 เครื่องหมาย กระจายตัวทั่วทั้งจีโนม โดยเฉพาะอย่างยิ่งบนโครโมโซมที่ 5 และโครโมโซมที่ 8 ซึ่งพบ QTL หลายตำแหน่งวางตัวใกล้เคียงกัน (common QTL) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนโมเลกุลเครื่องหมายที่ให้ความต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่

โครโมโซม	จำนวนโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบ	จำนวนโมเลกุลเครื่องหมายที่แสดง polymorphism	จำนวนโมเลกุลเครื่องหมายที่แสดง polymorphism	
			Ki48 และ Ki47	คิดเป็นร้อยละ
1	18	16	10	62.5
2	10	2	1	50.0
3	12	12	8	66.7
4	16	14	8	57.1
5	26	23	12	52.2
6	18	17	12	70.6
7	16	16	9	56.3
8	17	16	10	62.5
9	17	16	12	75.0
10	19	17	14	82.4
รวม	169	149	96	64.4

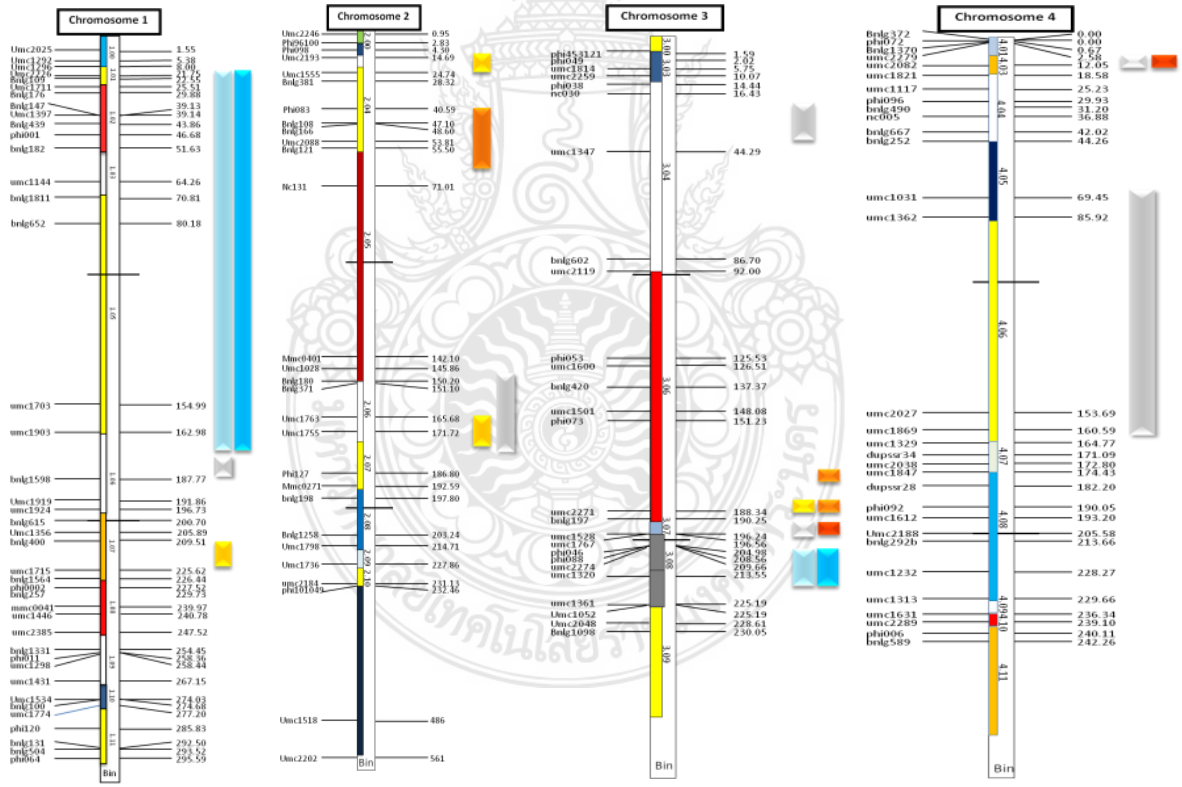
ตารางที่ 3 เครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างของอัลลีลระหว่างกลุ่มข้าวโพดสายพันธุ์ต้านทานและกลุ่มสายพันธุ์อ่อนแอ

Marker	Chromosome	Position (Mb)	Susceptible	Resistance	Size (bp)
			Ki47	Ki48	
UMC1365	5	6.433	a	c	100-110

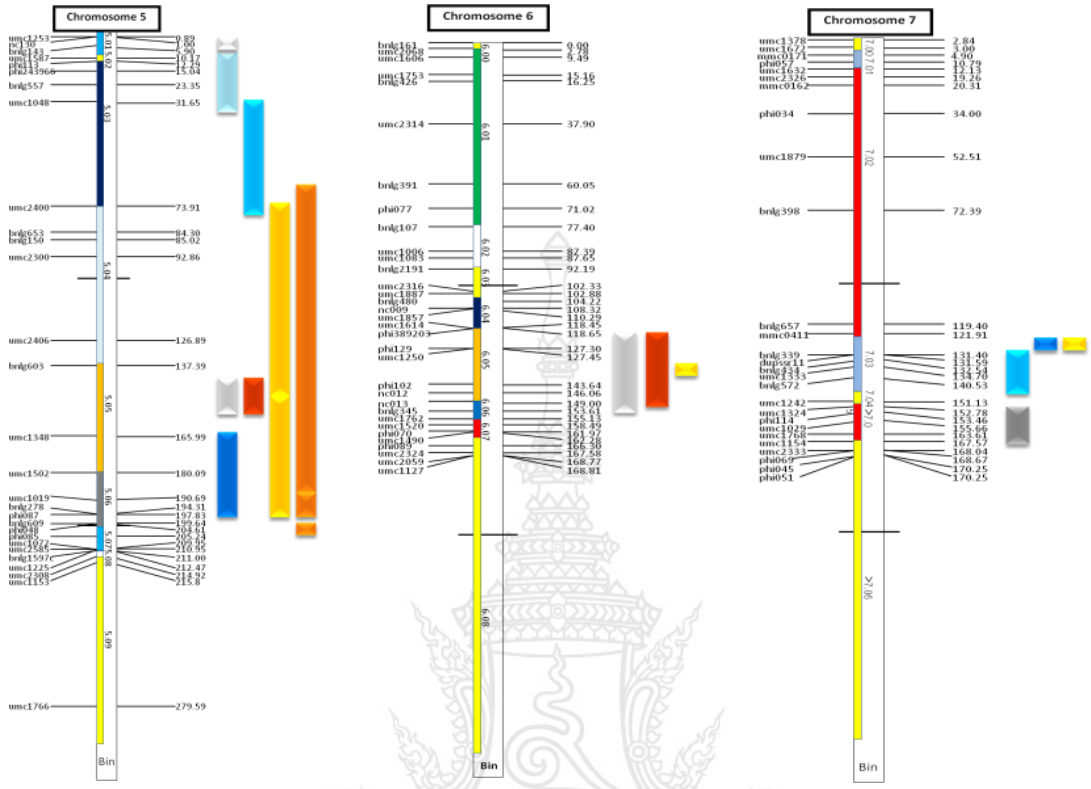


รูปที่ 5 UMC1365 (Chromosome 5)

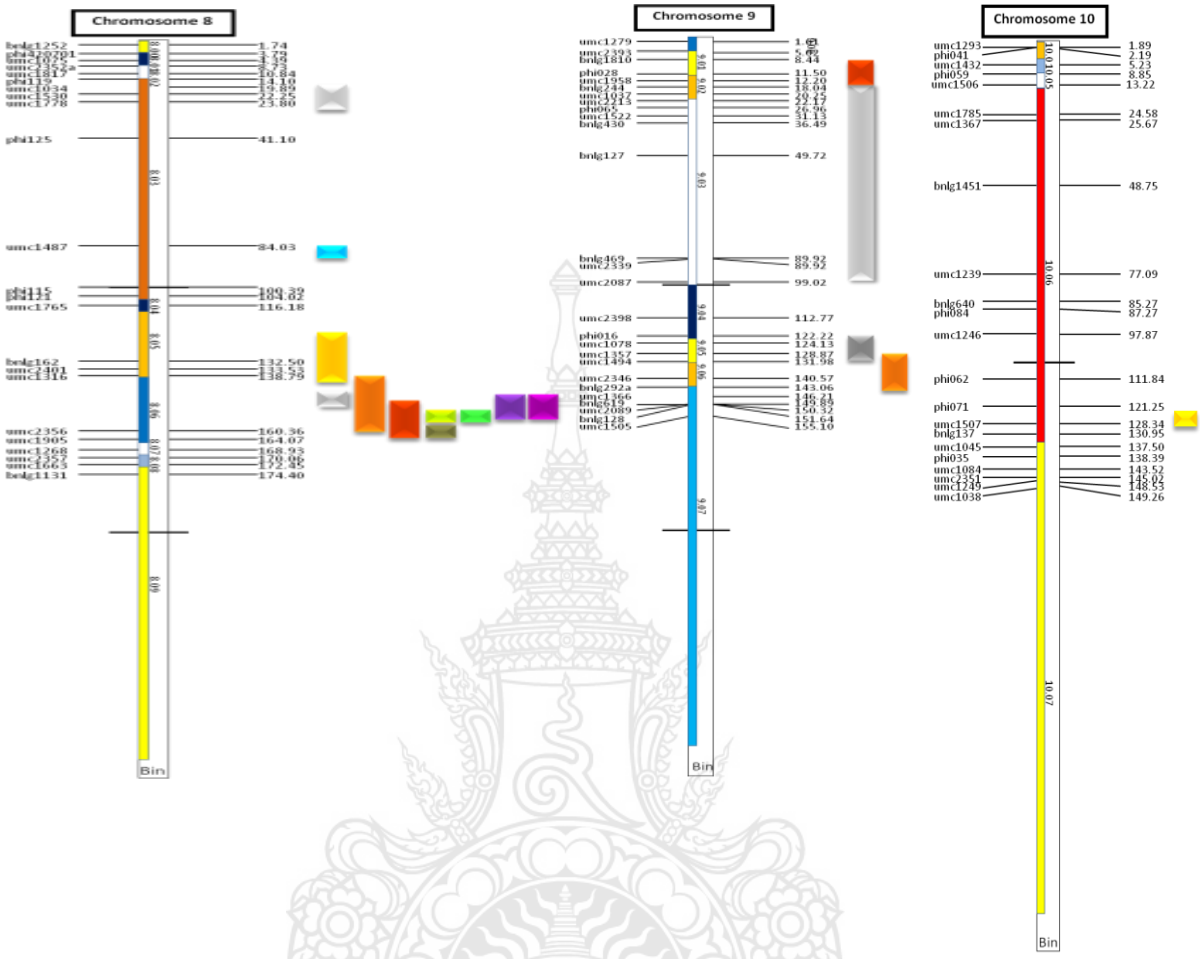
จากนั้น สืบหาเครื่องหมายในการจำแนกความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในสายพันธุ์พ่อแม่ โดยการคัดเลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุล จำนวน 100 เครื่องหมาย จากการจำแนกความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ (ตารางที่ 3) จำนวนทั้งสิ้น 56 ตำแหน่งกระจายตัวทั่วทั้งจีโนม (รูปที่ 6) โดยมีเครื่องหมายที่สามารถจำแนกสายพันธุ์พ่อแม่ คือ UMC1365 บนโครโมโซมที่ 5 ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับลักษณะต้านทานโรค ร่วมกับการทดสอบลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ ในสภาพเรือนทดลอง และในสภาพแปลงทดลอง



รูปที่ 6 แสดงตำแหน่งของ QTL ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดที่เคยได้รับรายงานไว้แล้ว (ตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลอ้างอิงจาก www.maizegdb.org)

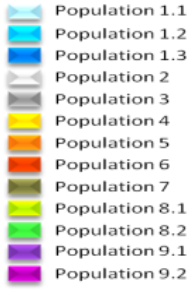


รูปที่ 6 (ต่อ) แสดงตำแหน่งของ QTL ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดที่เคยได้รับรายงานไว้แล้ว (ตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลอ้างอิงจาก www.maizegdb.org)



รูปที่ 6 (ต่อ) แสดงตำแหน่งของ QTL ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดที่เคยได้รับรายงานไว้แล้ว (ตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลอ้างอิงจาก www.maizegdb.org)

Population No.	Cross	Generation	References
Population 1.1	B52 x Mo17	150 $F_{2:3}$	Freymark et al., 1994
Population 1.2	B52 x Mo17	150 $F_{2:3}$	Freymark et al., 1994
Population 1.3	B52 x Mo17	150 $F_{2:3}$	Freymark et al., 1994
Population 2	D32 x D145	220 F_3	Welz et al., 1999
Population 3	IL731a x W6876	157 $F_{2:3}$	Brown et al., 2001
Population 4	B52 x Mo17	150 $F_{2:3}$	Welz and Geiger, 2000
Population 5	Lo951 x CML202	194 F_3	Welz and Geiger, 2000
Population 6	D32 x D145	220 F_3	Welz and Geiger, 2000
Population 7	S11 x DK888	53 F_7	Chung et al., 2010
Population 8.1	S11 x DK888	96 F_8	Chung et al., 2010
Population 8.2			
Population 9.1	S11 x DK888	12 F_9	Chung et al., 2010
Population 9.2			



รูปที่ 6 แสดงตำแหน่งของ QTL ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดที่เคยได้รับรายงานไว้แล้ว (ตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลอ้างอิงจาก www.maizegdb.org) (ต่อ)

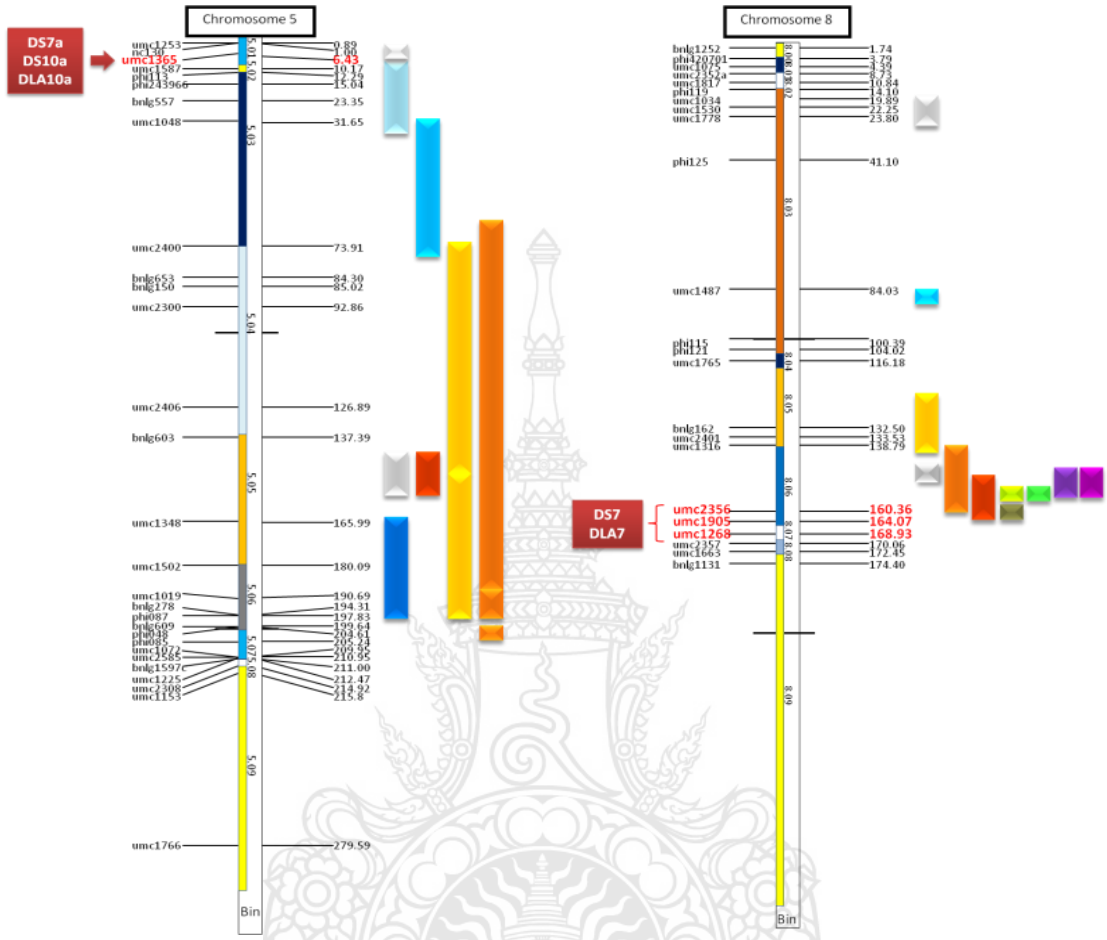
ผลของการวิเคราะห์ QTL แบบ single-marker analysis ในประชากรข้าวโพดลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) (Ki48 / Ki47) จำนวน 160 สายพันธุ์ พบว่ามี 4 เครื่องหมาย บนโครโมโซม 5 และ 8 (ตารางที่ 4 และรูปที่ 7) อธิบายลักษณะความแตกต่างของความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดลูกผสมชั่วที่ 2 ได้แก่เครื่องหมาย UMC1365 ขนาด 100-110 bp บนโครโมโซมที่ 5 และเครื่องหมาย UMC1095, UMC1268 และ UMC2356 ขนาด 68-150 bp บนโครโมโซม 8 ที่สามารถจำแนกแถบแบนความแตกต่างของสายพันธุ์ที่ต้านทานและอ่อนแอได้ชัดเจนมากที่สุดในประชากรจำนวน 160 สายพันธุ์

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรมในประชากรข้าวโพดลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) (Ki48 / Ki47) จำนวน 160 สายพันธุ์

Trait	Chromosome	Marker	R^2	Allele		
				Ki48	Heterosis	Ki47
DLA7	8	UMC2356	3.85	13.8	15.5	18.7
	8	UMC1095	4.62	13.5^{a}	15.8^{ab}	19.7^{b}
	8	UMC1268	3.61	14.6^{a}	14.7^{a}	20.1^{b}
DLA10	5	UMC1365	3.51	13.6^{a}	21.5^{b}	24.1^{b}
DS7	5	UMC1365	2.49	1.6	2.0	2.0
	8	UMC2356	4.58	1.6^{a}	1.8^{ab}	2.1^{b}
	8	UMC1095	4.85	1.6^{a}	1.9^{ab}	2.2^{b}
	8	UMC1268	3.43	1.7^{a}	1.8^{a}	2.2^{b}
DS10	5	UMC1365	3.08	1.7^{a}	2.1^{b}	2.1^{b}
	8	UMC1268	2.86	1.7^{a}	2.1^{b}	2.1^{b}

Trait: DLA; percentage of disease leaf area: DLA7: DLA10

DS; disease score (lesion type) 7 and 10 days after inoculating respectively



รูปที่ 7 เครื่องหมายโมเลกุลที่กระจายตัวในประชากรข้าวโพดลูกผสมชั่วที่ 2 คู่ผสม Ki48/Ki47 บนโครโมโซม 5 และ 8

4. สรุป

1. การปลูกถ่ายเชื้อและประเมินระดับการเกิดโรคใบไหม้แผลใหญ่ทั้งในสภาพโรงเรือนและสภาพแปลงทดลอง ค่าความสัมพันธ์ (correlation) ได้เท่ากับ 0.658 แสดงเทคนิคการปลูกถ่ายเชื้อทั้งสองสภาพมีความสัมพันธ์กัน และเป็นไปในทิศทางเดียวกัน สามารถใช้เทคนิคใดเทคนิคหนึ่งเพื่อย่นระยะเวลา และประหยัดค่าใช้จ่ายในการประเมินความต้านทานของโรคใบไหม้แผลใหญ่ในแต่ละครั้ง

2. สายพันธุ์ Ki48 แสดงความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ และสายพันธุ์ Ki47 แสดงความอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ จึงใช้เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ของประชากรรุ่นต่อไปในการหาตำแหน่ง QTL

3. โมเลกุลเครื่องหมาย SSR UMC1365 บนโครโมโซม 5 และเครื่องหมายโมเลกุล SSR UMC1095, UMC1268 และ UMC2356 บนโครโมโซม 8 สามารถจำแนกพันธุกรรมประชากรข้าวโพดลูกผสมชั่วที่ 2 คู่ผสม Ki48 / Ki47 จำนวน 160 สายพันธุ์ ที่มีต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่

5. กิตติกรรมประกาศ

การทำวิจัยในครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) รวมทั้งขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ประสาทพร สมิตะมาน ดร.สรรเสริญ จำปาทอง และ ดร. ธีรยุทธ ตู้จินดา ที่ได้ให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะ อนุเคราะห์เชื้อสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่ ตลอดจนให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

โชคชัย เอกทัศนาวรรณ, เกตุอร ทองเครือ. 2556. **การปลูกข้าวโพด**. ศูนย์วิจัยข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กองเกษตรสัมพันธ์ [on-line]. Available: http www.eto.ku.ac.th/neweto/e-book/plant/herb_gra/can2.pdf. 20 มกราคม 2556.

เบญจพรรณ เอกะสิงห์, พฤกษ์ ยิบมันตะสิริ กุศล, ทองงาม และพิเชษฐ์ กรุดลอยมา. 2546. **วิธีและผลการจัดลำดับความสำคัญงานวิจัยข้าวโพดในประเทศไทย**. วารสารเศรษฐศาสตร์การเกษตร ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กระทรวงเกษตร และสหกรณ์. น. 49-63

สรพงศ์ เบญจศรี. 2554. **เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืช**. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. น. 39:350-363.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2555. **สถิติการส่งออก (Export) ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์: ปริมาณและมูลค่าการส่งออกราย [on-line]. Available**: http www.oae.go.th/oae_report/export _import/export_ result.php วันที่ 19 เมษายน 2556 สำนักส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร. 2553. สรุปสถานการณ์สินค้าเกษตรเดือนพฤศจิกายน และ แนวโน้มเดือนธันวาคม 2553. 10 น.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. น. 5:37-59.

Lipps, P.E., R.C. Pratt and J.J. Hakiza. 1997. **Interaction of Ht and partial resistance to *Exserohilum turcicum* in maize**. Plant Dis. 81:277-282.

Mondini, L., A. Noorani, and M.A. Pagnotta. 2009. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. Diversity. 1:19-35.

Yao Qi-Lun, Fang Ping, Kang Ke-Cheng and Pan Guang-Tang. 2008. Genetic diversity based on SSR markers in maize (*Zea mays* L.) landraces from Wuling mountain region in China. Vol. 87. 287-291.