รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองสิ้นสุด

1. **ชุดโครงการวิจัย** : การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
2. **โครงการวิจัย** : การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์พืช

   กิจกรรม : การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช
3. **ชื่อการทดลอง** : การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์และสการ์ตรวจหาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพด

   Using of SSR and SCAR markers for detection on Northern corn leaf blight resistance in maize germplasm
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง :	ประสาน สืบสุข	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	: กุหลาบ คงทอง	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	: จีราพร แก่นทรัพย์	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	: ศิวิไล ลาภบรรจบ	ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์
	: สุริพัฒน์ ไทยเทศ	ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์และสการ์ตรวจหาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพด

Using of SSR and SCAR markers for detection on Northern corn leaf blight resistance in maize germplasm

ประสาน สืบสุข[1/] กุหลาบ คงทอง[1/] จีราพร แก่นทรัพย์[1/] ศิวิไล ลาภบรรจบ[2/] สุริพัฒน์ ไทยเทศ[2/]

บทคัดย่อ

โรคใบไหม้แผลใหญ่ (Northern Corn Leaf Blight, NCLB) ที่เกิดจากเชื้อรา *Exserohilum turcicum* เป็นปัญหาสำคัญอย่างมากต่อการผลิตข้าวโพดในประเทศไทย ที่ทำความเสียหายให้กับข้าวโพด ส่งผลกระทบให้ผลผลิตลดลง 30-40 เปอร์เซ็นต์ โดยจะขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อและระยะการเจริญเติบโตของข้าวโพด การป้องกันความเสียหายจากโรคใบไหม้แผลใหญ่ที่มีประสิทธิภาพและประหยัดมากที่สุดคือการใช้พันธุ์ต้านทานโรค การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์และสการ์ตรวจหาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพด จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ 12 คู่ไพรเมอร์ตรวจหาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในพันธุ์ข้าวโพดที่พันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอต่อโรค พบว่าไพรเมอร์ umc2037 bnlg1233 และ bnlg1607 ให้รูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างข้าวโพดพันธุ์อ่อนแอต่อโรคและข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ และน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับความอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด การใช้เครื่องหมายโมเลกุลสการ์ SCA07496 SCA16420 SCB09464 และ SCE20429 ตรวจหาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลสการ์ทั้ง 4 เครื่องหมายให้รูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอไม่สัมพันธ์กับการต้านทานต่อโรคกับพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ได้ทำการศึกษา

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

[2/] ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 03-08-59-02-02-0001-59

Abstract

Northern Corn Leaf Blight (NCLB) is a destructive foliar disease of maize that results from infection of the fungal pathogen, *Exserohilum turcicum*. The yield losses incurred from NCLB in Thailand may exceed 30-40 % when environmental conditions were optimal for disease development. Using the cultivars resistance to reduce the detrimental effects of NCLB on maize productivity is the most cost-effective. However, this study was use of SSR and SCAR markers for detection on NCLB resistance in maize germplasm. After detecting 12 simple sequence repeat (SSR) markers for polymorphisms between resistant and susceptible cultivars of maize, three markers may be linked to NCLB resistance cultivars; umc2037, bnlg1233 and bnlg1607 were identified. The use of sequence characterized amplified region (SCAR) markers; $SCA07_{496}$ $SCA16_{420}$ $SCB09_{464}$ and $SCE20_{429}$ for polymorphisms between resistant and susceptible cultivars of maize, all of the SCAR markers were not related to the disease resistance of the studied maize cultivars.

คำนำ

โรคใบไหม้แผลใหญ่ (Northern Corn Leaf Blight; NCLB) ที่เกิดจากเชื้อรา *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs. เป็นปัญหาสำคัญอย่างมากต่อการผลิตข้าวโพดในประเทศไทย ที่ทำความเสียหายให้กับข้าวโพด ส่งผลกระทบให้ผลผลิตลดลง 30-40 เปอร์เซ็นต์ โดยจะขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อและระยะการเจริญเติบโตของข้าวโพด พบว่าถ้าเกิดโรคก่อนระยะออกไหมจะทำให้ผลผลิตลดลงมาก หากมีการระบาดเกิดขึ้นหลังจากข้าวโพดออกไหมแล้ว 6-8 สัปดาห์ ความเสียหายจะลดน้อยลง (Degefu, 2003) ซึ่งการป้องกันความเสียหายจากโรคใบไหม้แผลใหญ่ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือการใช้พันธุ์ต้านทานโรค (Lipps and Mills, 2002; Pataky *et al.*, 1998) ซึ่งสามารถลดความเสียหายจากการเข้าทำลายของโรคได้ เป้าหมายของการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ นอกจากให้ได้พันธุ์ที่มีผลผลิตสูงแล้วจะต้องมีความต้านทานต่อโรคของข้าวโพดด้วย การพัฒนาสายพันธุ์ต้านทานโรคในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์พืชเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมความเสียหายของผลผลิต ปัจจุบันการศึกษาด้านเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ สามารถนำมาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดต้านทานโรคให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ได้มีการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ เช่น ได้มีการค้นพบเครื่องหมายดีเอ็นเอสการ์ (Sequence Characterized Amplified Region; SCAR) ของชิ้นดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงต่อพันธุ์ข้าวโพดที่มีความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ (Juthaporn *et al*., 2008) นักวิจัยหลายคณะได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์ศึกษาตำแหน่งของชุดยีนที่ทำให้เกิดลักษณะถ่ายทอดเชิงปริมาณ (Quantitative Trait Loci; QTL) ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ บนโครโมโซมทั้ง 10 คู่ ของข้าวโพด พบว่ามีตำแหน่งของชุดยีนจำนวน 5 ตำแหน่ง ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพด วางตัวอยู่บนโครโมโซม 1.01 (mmc0031), 5.05 (bnlg1118), 6.05 (nc009), 7.03 (phi114-bmc1666) และ 8.05

(bmc1812) (จุฑาพร., 2551; Freymark et al., 1994; Dingerdissen et al., 1996; Simcox and Bennetzen, 1993) และได้มีรายงานลำดับเบสของยีนที่ในพืชที่เกี่ยวข้องกับการสร้างความต้านทานต่อโรคของข้าวโพด จากองค์ความรู้เกี่ยวกับเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ สามารถนำไปใช้ตรวจหาและจำแนกข้าวโพดสายพันธุ์ที่ต้านทาน และไม่ต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ได้ และซึ่งสามารถนำมาใช้คัดเลือกข้าวโพดต้นที่ต้านทาน และต้นไม่ต้านทานโรคได้อย่างรวดเร็วและมีความแม่นยำถึงระดับดีเอ็นเอ เป็นการลดเวลาในการคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดให้มีความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ให้สั้นลงได้ ในงานวิจัยนี้จึงได้นำเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ ตรวจหาและจำแนกข้าวโพดในประชากรของเชื้อพันธุกรรมข้าวโพด เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ข้าวโพดพันธุ์ต้านทาน และอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่

2. ไพรเมอร์ และลำดับเบสที่ติดฉลากสารเรืองแสง

3. สารเคมี ได้แก่ ชุดสกัดสกัดดีเอ็นเอจากพืช Taq DNA polymerase ดีเอ็นเอมาตฐาน 100 bp DNA Ladder agarose สีย้อมดีเอ็นเอ POP4 สารดีเอ็นเอมาตรฐาน LIZ500 Hi-di formamide และสารเคมีอื่น ๆ

4. วัสดุวิทยาศาสตร์ ได้แก่ ปิเปตต์ทิป microtube 1.5 ml PCR tube 0.2 ml PCR plate 96 well capillary กระดาษพิมพ์ชนิด Thermal paper และวัสดุวิทยาศาสตร์อื่น ๆ

5. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ได้แก่ เครื่องผสมสารละลาย เครื่องหมุนเหวี่ยง เครื่องชั่งสาร เครื่องวัดการดูดกลืนแสง เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เครื่องแยกสารด้วยไฟฟ้า เครื่อง UV transilluminator (Biorad) และชุดถ่ายภาพ เครื่องอัตโนมัติ ABI PRISM^{TM} 310 DNA Sequencer และเครื่องมือวิทยาศาสตร์อื่น ๆ

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทาน และอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ จำนวน 18 พันธุ์ จากศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ อ.ตากฟ้า จ.นครสวรรค์ ประกอบด้วย

1.1 พันธุ์ต้านทาน (R) ได้แก่ Nei452015 (R) Nei462013 (R) Nei542011 (R) Nei542013 (R) และ Ki56 (R)

1.2 พันธุ์อ่อนแอ (S) ได้แก่ Nei9202 (S) Nei9202(T) (S) และ Ki59 (S)

1.3 พันธุ์ต้านทานต่อโรคปานกลาง ได้แก่ (MR) Ki58(MR) Nei452008 (MR) Nei452006 (MR) Nei452009 (MR) KI48 (MR) KI60 (MR)

1.4 พันธุ์อ่อนแอต่อโรคปานกลาง ได้แก่ (MS) Ki101 (MS) Nei40211 (MS) Nei532005 (MS) Nei542017 (MS)

2. สกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวโพดโดยใช้ชุดสำเร็จรูปสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากพืช ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ตรวจสอบและบันทึกภาพ จากนั้นวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องไบโอดรอป (BioDrop) ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3. สังเคราะห์ไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ (SSR) และสการ์ (SCAR) ในข้าวโพดที่เคยรายงานว่าเกี่ยวข้องกับลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด และเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ที่วางตัวอยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน ht1, ht2, ht3, และ htn1 ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด ประกอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ จำนวน 12 คู่ไพรเมอร์ และ เครื่องหมายโมเลกุลสการ์ จำนวน 4 คู่ไพรเมอร์

4. ทดสอบหาอุณภูมิและปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์เอสเอสอาร์ และสการ์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพด และตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยมีดีเอ็นเอมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอ ตรวจสอบและบันทึกภาพ

5. ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสการ์ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้แผลใญ่ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทาน และอ่อนแอต่อโรค ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยมีดีเอ็นเอมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอ ตรวจสอบและบันทึกภาพ

6. บันทึกข้อมูลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในข้าวโพดแต่ละพันธุ์ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ ที่ได้จากการตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลสการ์

7. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทาน และอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง จากนั้นตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยมีดีเอ็นเอมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเอ ตรวจสอบและบันทึกภาพ

8. นำผลผลิตพีซีอาร์ของข้าวโพดพันธุ์ต่างๆ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ไปตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเออย่างละเอียด โดยการแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเครื่องอัตโนมัติ ABI PRISM™ 310 DNA Sequencer ที่มีตัวเปรียบเทียบขนาดชิ้นดีเอ็นเออยู่ทุกตัวอย่าง (Internal Size Standard) เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ

9. บันทึกข้อมูลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในข้าวโพดแต่ละพันธุ์ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ ที่ได้จากการตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์

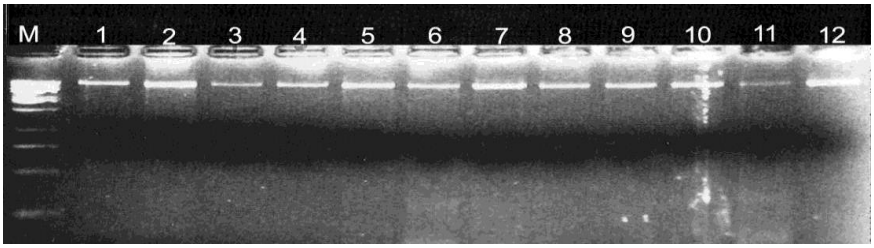
เวลาและสถานที่

- ระยะเวลาดำเนินการทดลอง ตุลาคม พ.ศ. 2558 – กันยายน พ.ศ.2560 (ระยะเวลาดำเนินงานตามแผนที่วางไว้คือ ตุลาคม พ.ศ. 2558 – กันยายน พ.ศ.2561 แต่การทดลองนี้อยู่ภายใต้แผนงานวิจัยที่ไม่ได้สนับสนุนให้ดำเนินการต่อ)
- สถานที่ดำเนินงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ตรวจหาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่

จากการเก็บตัวอย่างพร้อมกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวโพดต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ พบว่าการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปสำหรับพืช สามารถสกัดจากใบข้าวโพดได้ในปริมาณมากเพียงพอสำหรับใช้ในการทดลองเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพดด้วยเครื่องหมายโมเลกุล ดังแสดงผลการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังแสดงในภาพที่ 1



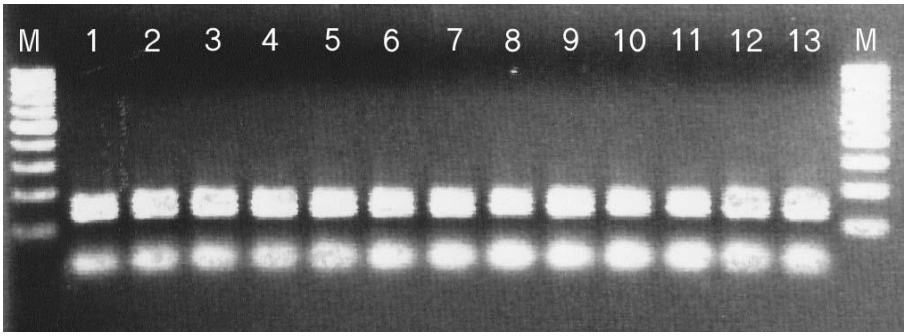
ภาพที่ 1 แสดงดีเอ็นเอของข้าวโพด (1-12) ที่สกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอจากพืช และตรวจสอบด้วยอะกาโรส M= 1 Kb DNA Ladder

จากการสังเคราะห์ไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ (SSR) ในข้าวโพดที่เคยรายงานว่าเกี่ยวข้องกับลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด และเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ที่วางตัวอยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน ht1, ht2, ht3, และ htn1 ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด ประกอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ จำนวน 12 คู่ไพรเมอร์ ผลการทดสอบหาค่า Annealing Temperature (Ta) ที่เหมาะสมของเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพดด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยแต่ละเครื่องหมาย SSR มีค่า Ta ที่เหมาะสม ชนิดของสารเรืองแสงที่ติดฉลาก และขนาดชิ้นดีเอ็นเอ ดังตาราง 1 และตัวอย่างการตรวจสอบผลด้วยด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังแสดงในภาพที่ 2 และ 3

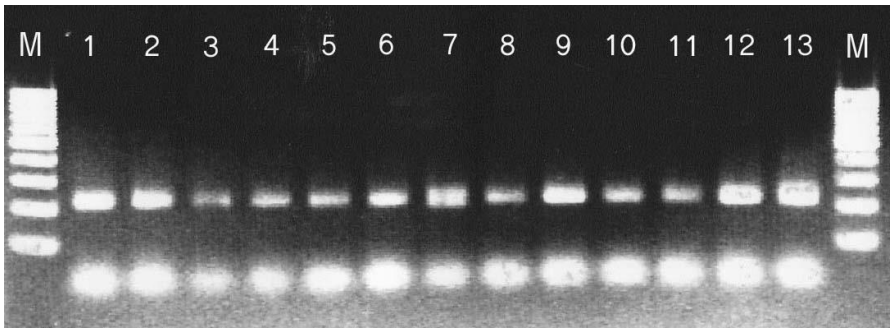
ตารางที่ 1 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยไพรเมอร์ที่ติดฉลากสารเรืองแสง

ลำดับที่	เครื่องหมาย SSR	สารเรืองแสงที่ติดฉลาก	ค่า Ta (^{O}C)	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (bp)
1	umc1745	VIC	67	137
2	bnlg162	NED	65	223
3	bnlg1607	PET	64	235
4	umc1342	FAM	60	86
5	umc1526	VIC	60	109
6	bnlg666	NED	55	122

7	bnlg2356	PET	55	211
8	umc1049	FAM	50	129
9	bnlg1233	VIC	55	132
10	umc1712	NED	55	109
11	umc2037	PET	55	98
12	umc2562	FAM	55	164



ภาพที่ 2 แสดงขนาดชิ้นดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวโพด (1-12) ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมาย bnlg666 และตรวจสอบด้วยอะกาโรส M= 100 pb DNA Ladder



ภาพที่ 3 แสดงขนาดชิ้นดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวโพด (1-12) ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมาย umc2356 และตรวจสอบด้วยอะกาโรส M= 100 pb DNA Ladder

ผลจากการหาแบบแผนการเกิดแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย SSR ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง จำนวน 12 คู่ กับข้าวโพดพันธุ์ต้านและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ พบว่าเครื่องหมาย SSR ที่ใช้ทดสอบให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอต่อโรค ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้

ไพรเมอร์ umc2037 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 98 คู่เบส ในข้าวโพดพันธุ์ Nei9202(S) Nei9202(T)(S) Ki95 (S) และ Nei532005 (MS) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวโพดที่อ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ สำหรับข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 90 และ 94 คู่เบส การปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 98 คู่เบสของไพรเมอร์ umc2037 อาจจะมีความเกี่ยวข้องกับความอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด

ไพรเมอร์ bnlg1233 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 79 คู่เบส ในข้าวโพดพันธุ์ Nei9202(S) Nei9202(T)(S) Ki95 (S) และ Ki101 (MS) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวโพดที่อ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ สำหรับข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 235 209 227 234 และ 245 คู่เบส การปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 79 คู่เบสของไพรเมอร์ bnlg1233 อาจจะมีความเกี่ยวข้องกับความอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด

ไพรเมอร์ bnlg1607 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 219 คู่เบส ในข้าวโพดพันธุ์ Nei9202(S) และ Ki95 (S) ซึ่งเป็นพันธุ์ข้าวโพดที่อ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ สำหรับข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 76 83 และ 85 คู่เบส การปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 219 คู่เบสของไพรเมอร์ bnlg1607 อาจจะมีความเกี่ยวข้องกับความอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด

สำหรับไพรเมอร์อื่น ๆ การปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันนั้น ยังไม่สามารถแยกกลุ่มพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอออกจากกันได้อย่างชัดเจน เนื่องจากบางไพรเมอร์ให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่พบได้บ่อยในพันธุ์ต้านทาน แต่ก็ยังพบแถบดีเอ็นเอขนาดเดียวกันบ้างในพันธุ์อ่อนแอ ดังแสดงในตารางที่ 2

การปรากฏแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ umc2037 bnlg1233 และ bnlg1607 ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 97 79 และ 219 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งพบได้ในข้าวโพดพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ นั้น หากต้องการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดให้ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ สามารถตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ umc2037 bnlg1233 และ bnlg1607 ซึ่งต้องไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวข้างต้น อย่างไรก็ตาม เนื่องจากศึกษาครั้งนี้ใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่ได้มีรายงานมาก่อนว่ามีความเกี่ยวข้องหรือสัมพันธ์กับลักษณะการต้านทานและอ่อนแอโรคใบไหม้แผลใหญ่ ซึ่งมีความจำเพาะกับประชากรข้าวโพดที่ศึกษา ซึ่งอาจจะใช้ไม่ได้กับประชากรข้าวโพดอื่น ๆ ดังนั้นการนำเครื่องหมายโมเลกุลไปใช้คัดเลือกพันธุ์จะต้องมีการทดสอบหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ได้ดีกับประชากรนั้น ๆ

ตารางที่ 2 แสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจพบในข้าวโพดพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ ไพรเมอร์ umc1342 umc1526 bnlg666 umc2356 umc1560 และ umc2562

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ข้าวโพด	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่พบ (คู่เบส)					
		umc1342	umc1526	bnlg666	umc2356	umc1560	umc2562
1	Nei9202 (S)	87	109	116, 122	212	169	148
2	Nei452015 (R)	87	109, 118	116, 122	212	152	166
3	Nei9202(T) (S)	87	109	116, 122	212	152	164
4	Nei462013 (R)	87	109	116, 122	212	152	166
5	Nei542011 (R)	87	109	116, 122	208	169	159
6	Nei542013 (R)	87	109	116, 122	212	152	166
7	Ki56 (R)	87	109	116, 122	208, 212	152	166
8	Ki58 (MR)	87	109	116, 122	212	152	166

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ข้าวโพด	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่พบ (คู่เบส)					
		umc1342	umc1526	bnlg666	umc2356	umc1560	umc2562
9	Ki59 (S)	87	109	116, 122	212	169	148
10	Ki101 (MS)	87	109	116, 122	212	169	166
11	Nei40211 (MS)	81	107	116	210	169	149
12	Nei452008 (MR)	87	116	122	212	152	166
13	Nei452006 (MR)	76	119	116, 122	214	152	166
14	Nei452009 (MR)	76	98, 109	116	214	169	159
15	Nei532005 (MS)	76	116	122	207, 212	152	166
16	Nei542017 (MS)	76	98	116	214	152	159
17	KI48 (MR)	76	116	122	212	152	165
18	KI60 (MR)	76	107	116, 122	202	169	156

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจพบในข้าวโพดพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ ไพรเมอร์ umc1712 umc2037 bnlg1233 bnlg162 bnlg1607 และ umc1049

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ข้าวโพด	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่พบ (คู่เบส)					
		umc1712	umc2037	bnlg1233	bnlg162	bnlg1607	umc1049
1	Nei9202 (S)	110	98	79	219	219	87
2	Nei452015 (R)	107	90	76	233	235	88
3	Nei9202(T) (S)	110	98	79	222	209	91
4	Nei462013 (R)	107	90	-	227	207, 227	86
5	Nei542011 (R)	107	94	76	227	209, 227	86
6	Nei542013 (R)	107	90	-	-	227	86
7	Ki56 (R)	110	90	76	219	234	86
8	Ki58 (MR)	110	90	-	215	245	86
9	Ki59 (S)	110	98	79	219	219	87
10	Ki101 (MS)	110	90	-	219	219	86
11	Nei40211 (MS)	110	94	76, 85	219	227	84
12	Nei452008 (MR)	107	90	83	227	227	-
13	Nei452006 (MR)	107	90	76, 85	233	234	96
14	Nei452009 (MR)	110	90	76, 85	219	234	86
15	Nei532005 (MS)	107	90, 98	85	227	227	86

ลำดับที่	ชื่อพันธุ์ข้าวโพด	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่พบ (คู่เบส)					
		umc1712	umc2037	bnlg1233	bnlg162	bnlg1607	umc1049
16	Nei542017 (MS)	110	90	76, 85	227	234	86
17	KI48 (MR)	110	90	85	227	234	-
18	KI60 (MR)	110	90	85	247	227	112

2. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลสการ์ตรวจหาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่

จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลสการ์ (SCAR) จำนวน SCAR 4 คู่ ในข้าวโพดที่เคยรายงานว่าเกี่ยวข้องกับลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด ได้แก่ $SCA07_{496}$ $SCA16_{420}$ $SCB09_{464}$ และ $SCE20_{429}$ ตรวจสอบกับข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ ผลการทดลองไม่พบไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างระหว่างข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ แล้วให้ความเกี่ยวข้องกับพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรค ดังแสดงในตารางที่ 3 แต่ผลจากการทดลองของ Juthaporn *et al*. (2008) ได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCAR เพื่อค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดข้าวเหนียว โดยการสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ที่ได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ 241W (ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่) และพันธุ์ 209W (อ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่) ทดสอบความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในประชากรชั่วที่ 2 และวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย SCAR จำนวน 4 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่เครื่องหมาย $SCA07_{496}$ $SCA16_{420}$ $SCB09_{464}$ และ$SCE20_{429}$ มีพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล SCAR ทั้ง 4 ตำแหน่ง ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอขนาดที่พบเฉพาะในประชากรชั่วที่ 2 ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่เท่านั้น ซึ่งได้ทดลองดังกล่าวได้ทดสอบกับข้าวโพดข้าวเหนียว แต่ในการทดลองนี้เมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุล SCAR ชนิดเดียวกันมาทดสอบกับข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ให้ความเกี่ยวข้องกับการต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้นั้นมีความจำเพาะและใช้คัดเลือกการต้านทานต่อโรคได้กับประชากรข้าวโพดข้าวเหนียวที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์ 241W และพันธุ์ 209W เท่านั้น ซึ่งไม่มีความจำเพาะหรือไม่สามารถใช้คัดเลือกการต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ของประชากรข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

ตารางที่ 3 แสดงความแตกต่างของขนาดแถบดีเอ็นเอในข้าวโพดพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค SCAR

ชื่อพันธุ์ข้าวโพด	SCA07496		SCA16420	SCA09464		SCA20429
	496 bp	800 bp	420 bp	170 bp	464 bp	429 bp
1. Nei 9202 (S)	-	/	/	/	-	/
2. Nei 452006 (MR)	-	/	/	/	-	/
3. Nei 452009 (MR)	/	-	/	/	-	/

4. Nei 462013	-	/	/	/	-	/
5. Nei 532005 (MS)	-	/	/	/	-	/
6. Nei 542011 (R)	-	/	/	/	-	/
7. Nei 542017 (MS)	-	/	/	/	-	/

หมายเหตุ : / = ปรากฏแถบดีเอ็นเอ, - = ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลจากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์และสการ์ตรวจหาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในเชื้อพันธุกรรมข้าวโพด พบว่าแบบแผนการเกิดแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมาย SSR ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง จำนวน 12 คู่ กับข้าวโพดพันธุ์ต้านและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ ทำให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอต่อโรค โดยไพรเมอร์ umc2037 bnlg1233 และ bnlg1607 พบรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างข้าวโพดพันธุ์อ่อนแอต่อโรค กับข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ ซึ่งไพรเมอร์เหล่านี้อาจจะมีความเกี่ยวข้องกับความอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด แต่อย่างไรก็ตามจะต้องมีการทดสอบเพื่อยืนยันผลของเครื่องหมายโมเลกุลนี้กับประชากรข้าวโพดที่ต้องการนำมาศึกษาก่อนที่จะนำเครื่องหมายโมเลกุลนี้ไปใช้คัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นำเครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์ umc2037 bnlg1233 และ bnlg1607 ไปพัฒนาต่อเพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดให้รวดเร็ว แม่นยำมากยิ่งขึ้น

คำขอบคุณ (ถ้ามี)

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเมล็ดและใบข้าวโพดที่ใช้ในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

กัญญณัช ศิริธัญญา และ พิมพ์พรรณ เมืองมา. 2557. เทคนิคการประเมินความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ และการจำแนกตำแหน่งยีนต้านทานด้วยโมเลกุลเครื่องหมายในข้าวโพด. วารสารวิชาการและวิจัย มทร. พระนคร. 8(1) : 229-240.

จุฑาพร คำพิลา. 2551. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลและศึกษาตำแหน่ง QTL ที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดข้าวเหนียว (*Zea mays* var ceratina). วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 207 หน้า.

อนันต์ชัย อัศวเมฆิน. 2548. สาระน่ารู้อณูพันธุศาสตร์ : ความแปรผันหลากหลายทางพันธุกรรมในมนุษย์. สำนักพิมพ์เท็กซ์แอนด์เจอร์นัล พับลิเคชั่น. กรุงเทพฯ. พิมพ์ครั้งที่ 1.

Dingerdissen. A.L., Geiger. H.H., Lee. M., Schecherta. A. and Welz. H.G. 1996. Interval mapping of genes for quantitative resistance of maize to *Setosphaeria turcica*, cause of northern leaf lbight, in a tropical environment. Mol. Breed. 2: 143-156.

Freymark. P.J., Lee. M., Martinson. C.A. and Woodman. W.L. 1994. Molecular marker-facilitated investigation of host-plant response to *Exserohilum turcicum* in maize (*Zea mays* L.) Theor. Appl. Genet. 88: 305-313.

Juthaporn K., Piyada T., Kamol L., Weerasak S., Jirawat S. and Nooduan M. 2008. IdentiWcation of RAPD markers for northern corn leaf blight resistance in waxy corn (*Zea mays* var. *ceratina*). Asian Journal of Plant Sciences. 7(1): 18–21.

Juthaporn K., Kamol L., Weerasak S., Jirawat S., Nooduan M. and Piyada T. 2008. IdentiWcation of RAPD and SCAR markers linked to northern leaf blight resistance in waxy corn (*Zea mays* var. *ceratina*). Euphytica. 164: 615–625.

Simcox. K.D. and Bennetzen. J.L. 1993. Mapping the *HtN* resistance gene to the long arm of chromosome 8. Maize Genet. Coop. Newsl. 56: 118-119.

Wu. B., Yang. E., Khalid. H., Lin.F., Wang. B.Y. and Shi. Z.S. 2010. The analysis of the genotype segregation at SSR loci among double-cross F1 population resistant to northern corn leaf blight and head smut in maize. Am-Euras J. Agric. & Environ. Sci. 8(1): 35-39.