รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาพืชไร่น้ำมันอื่นๆ (งา ทานตะวัน สบู่ดำ)

2. ชื่อโครงการวิจัย : การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและการเพิ่มมูลค่าผลผลิตงา

กิจกรรม : การวิจัยและพัฒนาพันธุ์งา

ชื่อกิจกรรมย่อย : การปรับปรุงพันธุ์งาต้านทานโรค

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การสืบค้นยีนโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุลสำหรับคัดเลือกพันธุ์งาต้านทานโรคราแป้ง

ชื่อการทดลอง(ภาษาอังกฤษ) : Tagging gene of Sesame Powdery mildew Resistance by Molecular technique.

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	: จุไรรัตน์	หวังเป็น	สุรีพร	เกตุงาม
ผู้ร่วมงาน	: สมใจ	โควสุรัตน์	ธำรง	เชื้อกิตติศักดิ์
	สมหมาย	วังทอง		

5. บทคัดย่อ:

โรคราแป้ง (powdery mildew) เป็นโรคที่มีความสำคัญอย่างหนึ่งของการปลูกงา การใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการควบคุมโรคนี้และยังช่วยลดต้นทุนการใช้สารเคมีอีกทางหนึ่งด้วยดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์งาให้ต้านทานต่อโรคราแป้งจึงมีความสำคัญ การทดลองนี้ได้นำเครื่องหมายโมเลกุล มาใช้ศึกษาร่วมกับเทคนิค Bulk Segregant Analysis (BSA) เพื่อติดตามยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคราแป้งในงา โดยมีประชากรที่ได้มาจากประชากรลูกผสมชั่วที่ 3 ที่ได้จากการการทดลองเรื่อง การสร้างประชากรเพื่อใช้ในการสืบค้นยีนโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุลสำหรับคัดเลือกพันธุ์งาต้านทานโรคราแป้ง ปลูก พันธุ์ พ่อแม่ งาพันธุ์ต้านทาน (GMUB 1) พันธุ์อ่อนแอ (มหาสารคาม 60) และ พันธุ์อ่อนแอ (อุบลราชธานี 1) ลูกผสมสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่มีลักษณะที่ต้านทานต่อโรคราแป้งจำนวน 10 ต้น และกลุ่มที่อ่อนแอต่อโรคราแป้ง จำนวน 10 ต้น ลูกผสมที่ใช้ คือ GMUB1 x MK60 และ UB1 x GMUB1 โดยอาศัยข้อมูลจากการประเมินความรุนแรงของการเกิดโรคจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Oidium* sp. เป็นรายต้น จากนั้นสกัดดีเอ็นเอ โดยปลูกงาอายุประมาณ 3 สัปดาห์ เก็บใบอ่อนงานำมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำมาทดสอบกับไพรเมอร์ จำนวน 35 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ จำนวน 17 ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในงาได้ชัดเจน เมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ แม่ และลูกผสม พบว่า คู่ผสมระหว่าง UB1 x GMUB1 ได้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ จำนวน 5 ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างของงาพันธุ์พ่อแม่ และลูกผสมที่ต้านทาน และอ่อนแอต่อโรคราแป้งได้ ส่วนคู่ผสม GMUB1 x MK60 ไพร

เมอร์ไอเอสเอสอาร์ไม่สามารถแยกความแตกต่างของงาพันธุ์พ่อแม่ และลูกผสมที่ต้านทาน และอ่อนแอต่อโรคราแป้งได้ ดังนั้น เพื่อให้ได้เครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่ และ ลูกผสม อาจจะต้องใช้ไพรเมอร์ในการคัดเลือกเพิ่มขึ้น และข้อมูลที่ได้นี้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในงานวิจัยที่เกี่ยวกับงาต้านทานโรคราแป้งในอนาคตได้

6. คำนำ:

โรคราแป้งเกิดจากเชื้อรา *Oidium* sp. เป็นโรคที่สำคัญของงา เชื้อราสาเหตุโรคสามารถเข้าทำลายพืชได้ในทุกระยะการเจริญเติบโต และทำให้ผลผลิตลดลง 25 - 50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับระดับความรุนแรงของโรค (Ramana Rao *et al*., 2011) แต่หากโรคเกิดขึ้นในระยะแรกของการเจริญเติบโตจะทำให้ต้นงาชะงักการเจริญเติบโตและอาจไม่ให้ผลผลิตเลย ซึ่งระบาดในช่วงที่มีอากาศเย็น และความชื้นต่ำ ทำให้ผลผลิตเสียหาย การใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการควบคุมโรคนี้และยังช่วยลดต้นทุนการใช้สารเคมีอีกทางหนึ่งด้วย ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์งาให้ต้านทานต่อโรคราแป้งจึงมีความสำคัญ การทดลองนี้ได้นำเครื่องหมายโมเลกุล มาใช้ศึกษาร่วมกับเทคนิค Bulk Segregant Analysis (BSA) (สุรีพร, 2557) เพื่อติดตามยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคราแป้งในงา โดยการสร้างกลุ่มตัวแทนสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่มีลักษณะที่ต้านทานต่อโรคราแป้งจำนวน 10 ต้น และกลุ่มที่อ่อนแอต่อโรคราแป้ง จำนวน 10 ต้น โดยคัดเลือกจากประชากรลูกผสมชั่วที่ 3 ที่ได้จากการผสมระหว่างงาพันธุ์ต้านทาน (GMUB 1) พันธุ์อ่อนแอ (มหาสารคาม 60) และ พันธุ์อ่อนแอ (อุบลราชธานี 1) โดยอาศัยข้อมูลจากการประเมินความรุนแรงของการเกิดโรคจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Oidium* sp. เป็นรายต้นหลังจากที่เชื้อเริ่มเข้าทำลาย ทำการประเมินทุกสัปดาห์ จนกระทั่งเก็บเกี่ยว จากนั้นสกัดดีเอ็นเอ โดยปลูกงาอายุประมาณ 3 สัปดาห์ เก็บใบอ่อนงานำมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำมาทดสอบกับไพรเมอร์ เพื่อตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่และสองกลุ่มตัวแทน

7. วิธีดำเนินการ:

7.1 อุปกรณ์

1) พันธุ์งา

ปลูกพันธุ์งาพ่อ แม่ จำนวน 3 พันธุ์ (GMUB1 มหาสารคาม 60 และ อุบลราชธานี 1) ลูกผสม F_3 ที่ต้านทาน และลูกผสม F_3 ที่อ่อนแอ

2) สารละลายที่ใช้ (Solution required)

1. สารละลายที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ (extraction buffer) ประกอบด้วย 2 % CTAB (w/v), 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl, 2 % polyvinyl pyrrolidone (PVP), 0.2 % β- mercaptoethanol (v/v)
2. Chloroform : Octanol ; 24 : 1 (v/v)
3. 5 M NaCl
4. Isopropanol
5. 70 % ethanol
6. RNase A (Sigma) : 10 mg/ml
7. TE buffer

7.2 วิธีการทดลอง

ไม่มีแผนการทดลอง

ขั้นตอนในแปลงทดลอง

คัดเลือกงาลูกผสม 2 สายพันธุ์ คือ GMUB1 x MK60 และ UB1 x GMUB1 ที่มีลักษณะค่อนข้างต้านทานต่อโรคราแป้ง โดยปลูกงาพันธุ์พ่อ แม่ ลูกผสมชั่วที่ 3 ที่ต้านทาน จำนวน 10 ต้น และลูกผสมชั่วที่ 3 ที่อ่อนแอ จำนวน 10 ต้น ดูแลรักษาตามคำแนะนำการปลูกงา จนกระทั่งงาอายุได้ 3 สัปดาห์จะตัดใบงาเพื่อนำไปทำการทดลองในห้องปฏิบัติการต่อไป

ขั้นตอนในห้องปฏิบัติการ

1. **วิธีการสกัดดีเอ็นเอ (DNA Isolation Protocol)** (ดัดแปลงมาจาก Lodhi *et al*., 1994)

การสกัดดีเอ็นเอต้องเก็บใบอ่อนของงาเมื่องามีอายุได้ประมาณ 3 สัปดาห์หลังงอก จำนวน 2 คู่ผสม (GMUB1 x MK60 และ UB1 x GMUB1) โดยสกัดดีเอ็นเอของงาสายพันธุ์พ่อแม่ และลูกผสม F_3 ของแต่ละคู่ผสมเป็นรายต้น ประกอบด้วยลูกผสมที่อ่อนแอต่อโรคราแป้ง จำนวน 10 ต้น และลูกผสมที่ต้านทานต่อโรคราแป้ง จำนวน 10 ต้น จากนั้น นำดีเอ็นเอของลูกผสมที่ได้มารวมกัน (DNA bulk) มีรายละเอียดดังนี้

1.1 เตรียมตัวอย่างใบอ่อนงาที่สะอาดประมาณ 150 มิลลิกรัม ใส่ในโกร่งที่แช่เย็น เติม liquid nitrogen ให้ท่วมและบดให้ละเอียด ถ่ายผงใบลงในหลอดเซนติฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร เติม 2% CTAB extraction buffer (2 % CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M Nacl, 2 % β-mercaptoethanol) ปริมาตร 650 ไมโครลิตร เติม polyvinyl pyrrolidone (PVP - 40) ประมาณ 20 มิลลิกรัม ในหลอดเซนติฟิวส์ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม Chloroform : Octanol (24 : 1) ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ผสมเบา ๆ ให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ไปเปตส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม 5 M NaCl ปริมาตรครึ่งหนึ่ง และเติม Isopropanol ที่เย็นจัดปริมาตรหนึ่งเท่าของส่วนใสที่ไปเปตมา ผสมเบา ๆ ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70 % ethanol จำนวน 2 ครั้ง ตากตะกอนให้แห้ง และละลายตะกอนด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาณ 60 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน กำจัด RNA โดยเติม RNase A ปริมาณ 2 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

1.2 การประเมินความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

การประเมินความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธี อิเล็กโตรโฟริซิสในเจลอะกาโรส 1 % (agarose gel electrophoresis) โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่แน่นอน ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง ในสารละลาย 1X TBE ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ ภายใต้แสง UV และถ่ายภาพโดยใช้เครื่อง Gel documentation (Wealtec Dolphin)

2. การตรวจสอบความแตกต่างของงาลูกผสมโดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์

2.1 การคัดกรองไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์

ตรวจสอบเพื่อคัดกรองไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของงาและให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic markers) และชัดเจน (ตารางที่ 1)

2.2 การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ

นำไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ ที่ได้จากการคัดกรองที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน ดังกล่าวมาตรวจสอบความแตกต่างระหว่างลูกผสมที่ต้านทาน และอ่อนแอ จำนวน 8 ตัวอย่าง คือ พันธุ์พ่อ แม่ ลูกผสมที่ต้านทานและลูกผสมที่อ่อนแอ จำนวน 2 คู่ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลอง (Polymerase chain reaction) ปริมาตร 20 µl ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 20 ng, 200 mM dNTPs, 2.5 mM $MgCl_2$, 5 x green buffer, 0.8 µM Primer, 1 unit *Taq* DNA polymerase (promega) และ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้ initial denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที 1 รอบ ตามด้วย 40 รอบ ของการใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ 1 นาที ของแต่ละไพรเมอร์ (annealing) และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1.30 นาที (extension) และต่อด้วย final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบ ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้ความต่างศักย์ 80 โวลต์ นาน 2.30 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง พันธุ์ต้านทาน และพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคราแป้งได้ ภายใต้แสง UV และถ่ายภาพโดยใช้เครื่อง Gel documentation

8. ผลการทดลองและวิจารณ์:

1. การสกัดดีเอ็นเอของงา

งาเป็นพืชที่มีเมือก และมีโพลีแซคคาไรด์สูง (polysaccharide) ทำให้สกัดดีเอ็นเอค่อนข้างยาก ดังนั้น ต้นงาที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอควรมีอายุ ประมาณ 3 สัปดาห์ เพื่อลดปริมาณ polysaccharide จากการประเมินความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซีส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ราบปริมาณที่แน่นอน (200 และ 400 นาโนกรัม) พบว่า ปริมาณที่ได้มีความเข้มข้น ประมาณ 30-80 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปัจจัยที่ทำให้มีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอแตกต่างกัน เนื่องจากปริมาณของใบที่ใช้อาจมากน้อยแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างจึงทำให้ความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอที่ได้แตกต่างกัน (ภาพที่ 1)

2. การตรวจสอบความแตกต่างของงาลูกผสมโดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์

การตรวจสอบความแตกต่างของงาระหว่าง พ่อ แม่ ลูกผสมที่ต้านทานและลูกผสมที่อ่อนแอทั้ง 2 คู่ผสม โดยใช้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ที่ได้จากการคัดกรอง และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ชัดเจน จำนวน 17 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 2 ภาพที่ 2) พบว่า ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ จำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ ISSR 868 UBC 814 UBC 818 UBC 825 และ UBC 826 สามารถแยกความแตกต่างของงาสายพันธุ์พ่อ แม่ และลูกผสมที่ต้านทาน และอ่อนแอต่อโรคราแป้ง ที่ได้จากคู่ผสมระหว่าง UB1 x GMUB1 ได้ ส่วนคู่ผสมระหว่าง GMUB1 x MK60 มีไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จำนวน 2 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC 827 แล UBC 841 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่ได้ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างในลูกผสมที่ต้านทานและอ่อนแอได้ ส่วนไพรเมอร์อื่นสามารถเพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอในงาได้ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพ่อแม่ และ ลูกผสมได้ (ตารางที่ 2 ภาพที่ 3 - 6) เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงการข่มสมบูรณ์ (dominance marker) ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแต่ละโลกัส (Locus) จะแสดงออกมาในรูปแบบ ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกัน (Grativol et al., 2010; Lui and Wendel, 2001; Reddy et al., 2002) และเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์นี้เป็นเครื่องหมายที่พัฒนามาจากลำดับเบสซ้ำที่บริเวณไมโครแซทเทลไลท์ ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (polymorphism) ที่ได้นั้นเป็นผลเนื่องมาจากจำนวนเบสซ้ำที่ไม่เท่ากันในแต่ละโลกัส ทำให้พบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างน้อย อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นการยืนยันประสิทธิภาพของเครื่องหมายในตำแน่งที่แสดงความความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่ และลูกผสมที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคราแป้งนั้น สามารถทำได้โดยการส่งไปหาลำดับเบส เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมายที่จำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งนั้น ๆ ได้

9. สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ : จากการตรวจสอบดีเอ็นเอของงาพันธุ์พ่อแม่โดยใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ ใช้ไพรเมอร์ในการคัดกรอง ทั้งหมด จำนวน 35 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ จำนวน 17 ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในงาได้ชัดเจน เมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ แม่ และลูกผสม พบว่า คู่ผสมระหว่าง UB1 x GMUB1 ได้ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ จำนวน 5 ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างของงาพันธุ์พ่อแม่ และลูกผสมที่ต้านทาน และอ่อนแอต่อโรคราแป้งได้ ส่วนคู่ผสม GMUB1 x MK60 ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ไม่สามารถแยกความแตกต่างของงาพันธุ์พ่อแม่ และลูกผสมที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคราแป้งได้ ดังนั้น เพื่อให้ได้เครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่ และลูกผสม อาจจะต้องใช้ไพรเมอร์ในการคัดเลือกเพิ่มขึ้น และข้อมูลที่ได้นี้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในงานวิจัยที่เกี่ยวกับงาต้านทานโรคราแป้งในอนาคตได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : ได้ไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง พันธุ์ต้านทานโรคราแป้ง และพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคราแป้งได้

11. เอกสารอ้างอิง :

สุรีพร เกตุงาม. 2557. การปรับปรุงพันธุ์พืชระดับโมเลกุล. สำนักพิมพ์ โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 311 หน้า.

Grativol, C. Lira-Medeiros, C. F. Hemerly, A. S. and P. C. G. Ferreira. 2010. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity In Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. Plant Molecular Biology Reporter. 36: 115-120.

Lodhi, M.A.; Y. Guang-ning; N.F. Weeden and I.R. Bruce. 1994. Simple and Efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and Ampelopsis. Plant Molecular Biology Report. 12 (1) : 6 - 13.

Lui, B. and J. H. Wendel. 2001. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. Molecular Ecology Notes 1: 205-208.

Ramana Rao, P.V.; V.G. Shankar; J.V.P. Pavani; V. Rajiesh; A. Vishnuvardhan Reddy and K. Dharma Reddy. 2011. Evaluation of Sesame Genotypes for Powdery Mildew Resistance. International Journal of Bio-resource and Stress Management. 2(3) : 341 - 344.

Reddy, M. P., N. Sarla and E. A. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plan breeding. Euphytica 128: 9-17.

Williams J.G.K; A.R. Kubelik; K.J.Livak; J.A. Rafalski and S.V. Tingey . 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res., 18: 6531–6535.

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์งาที่ต้านทานโรคราแป้ง จำนวน 35 ไพรเมอร์

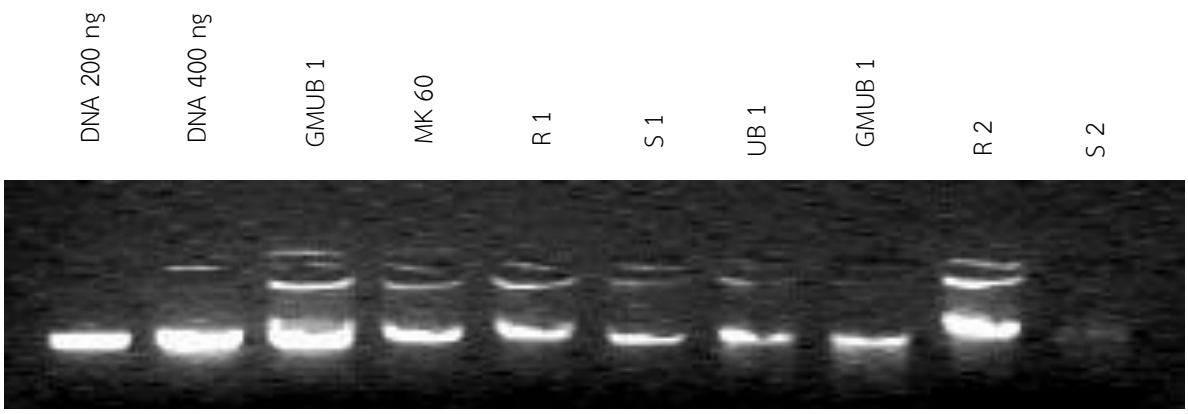
ลำดับที่	Primer name	Sequence 5' to 3'	Annealing temperature (°C)
1	ISSR 861	ACCACCACCACC ACCACC	49
2	ISSR 868	GAAGAAGAAGAA GAAGAA	48
3	ISSR 873	GACAGACAGACAGACA	48
4	ISSR 880	GGAGAGGAGAGGAGA	52
5	ISSR 881	GGGTGGGGTGGGGTG	62
6	UBC 15	CTCTCTCTCTCTCTCTG	50
7	UBC 807	AGAGAGAGAGAG AGAGT	50
8	UBC 808	AGAGAGAGAGAGAG AGC	50
9	UBC 809	AGAGAGAGAGAGAG AGG	50
10	UBC 811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	50
11	UBC 812	GAGAGAGAGAGAGAGA A	50
12	UBC 813	CTCTCTCTCTCTCTCTT	50
13	UBC 814	CTCTCTCTCTCTCTCTA	50
14	UBC 817	CACACACACACACACAA	50
15	UBC 818	CACACACACACACA CAG	50
16	UBC 820	GTGTGTGTGTGTGTGTC	50
17	UBC 823	TCTCTCTCTCTCTC TCC	50
18	UBC 824	TCTCTCTCTCTCTC TCG	50
19	UBC 825	ACACACACACACACACT	50
20	UBC 826	ACACACACACACACACC	50
21	UBC 827	ACACACACACACACACG	50
22	UBC 841	GAGAGAGAGAGAGAGATC	50
23	UBC 847	CACACACACACACACAAC	50
24	UBC 848	CACACACACACACACAAG	50
25	UBC 849	CTCTCTCTCTCTCTCTCA	50
26	IS 12	ATCATCATCATCATCATCT	50
27	IS 13	ATCATCATCATCATCATCC	50
28	IS 14	AGTAGTAGTAGTAGTAGTG	50
29	IS 16	CTACTACTACTACTACTAC	50
30	ISSR-1	GGCGGCGGCGGCGGCAT	56
31	ISSR-5	AGCAGCAGCAGCAGCCA	56

32	ISSR-7	GGCGGCGGCGGCGGCTA	56
33	ISSR-8	AGCAGCAGCAGCAGCGA	50
34	ISSR 09	CCACCACCACCACCA	47
35	Stag 3	CAGCAGCAGCAGCAG	46

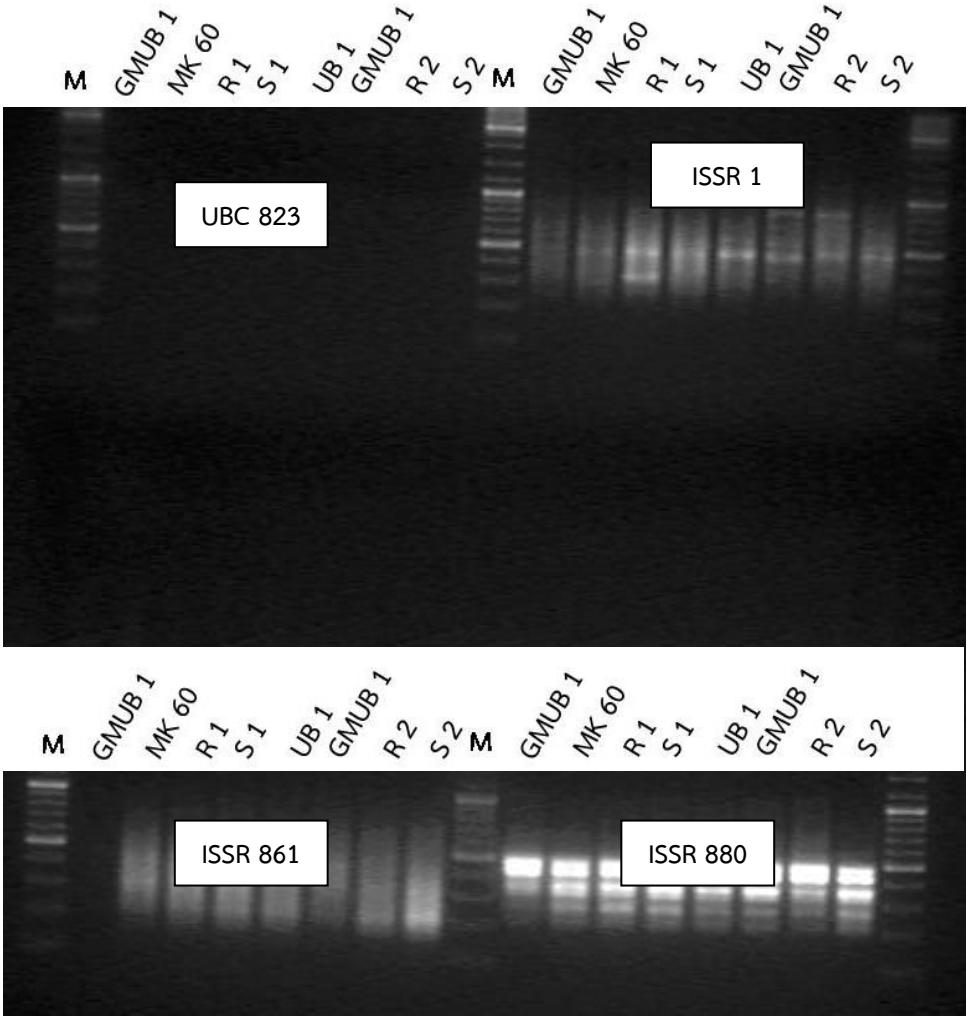
ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์จากการคัดเลือก จำนวน 17 ไพรเมอร์ ที่นำมาใช้ในการแยกความแตกต่างของงา ระว่างพันธุ์พ่อ แม่ และลูกผสมที่ต้านทาน และอ่อนแอต่อโรคราแป้ง

ลำดับที่	Primer name	คู่ผสมที่ 1 GMUB1 x MK60				คู่ผสมที่ 2 UB1 x GMUB1			
		GMUB1	MK60	R1	S1	UB1	GMUB1	R2	S2
1	ISSR 868	x	x	x	x	/ x	/ x	/ x	/ x
2	ISSR 873	x	x	x	x	x	x	x	x
3	ISSR 880	x	x	x	x	x	x	x	x
4	ISSR 881	x	x	x	x	x	x	x	x
5	UBC 15	x	x	x	x	x	x	x	x
6	UBC 807	x	x	x	x	x	x	x	x
7	UBC 808	x	x	x	x	x	x	x	x
8	UBC 809	x	x	x	x	x	x	x	x
9	UBC 811	x	x	x	x	x	x	x	x
10	UBC 814	x	x	x	x	/ x	/ x	/ x	/ x
11	UBC 818	x	x	x	x	/ x	/ x	/ x	/ x
12	UBC 825	x	x	x	x	/ x	/ x	/ x	/ x
13	UBC 826	x	x	x	x	/ x	/ x	/ x	/ x
14	UBC 827	/	/	/	/	/	/	/	/
15	UBC 841	/	/	/	/	x	x	x	x
16	ISSR-5	x	x	x	x	x	x	x	x
17	ISSR-7	x	x	x	x	x	x	x	x

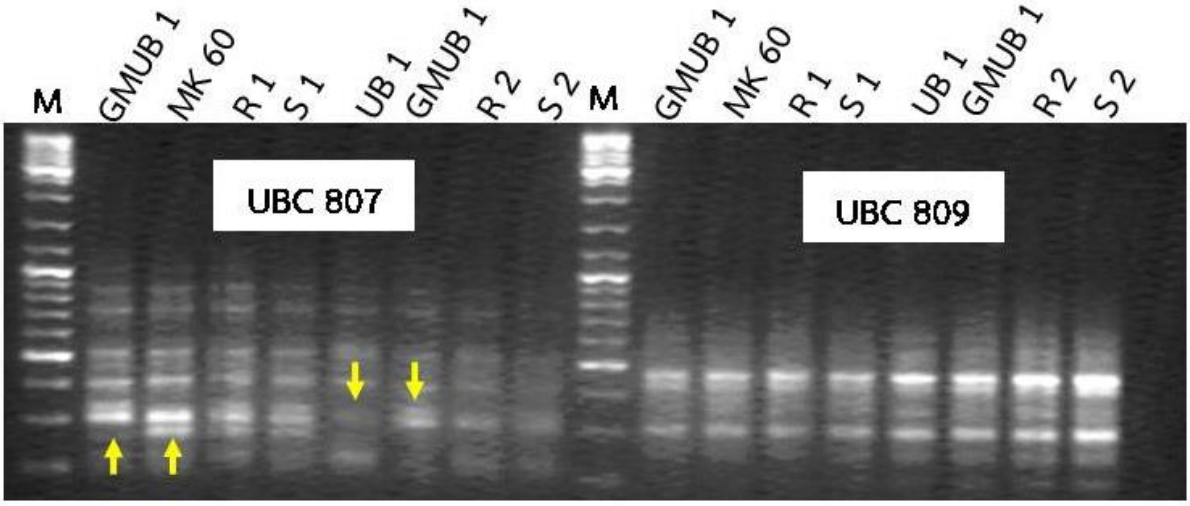
หมายเหตุ: x คือ ไพรเมอร์ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่ และลูกผสมได้
/ คือ ไพรเมอร์สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่ได้ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของลูกผสมได้
/x คือ ไพรเมอร์ที่แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่และลูกผสมได้



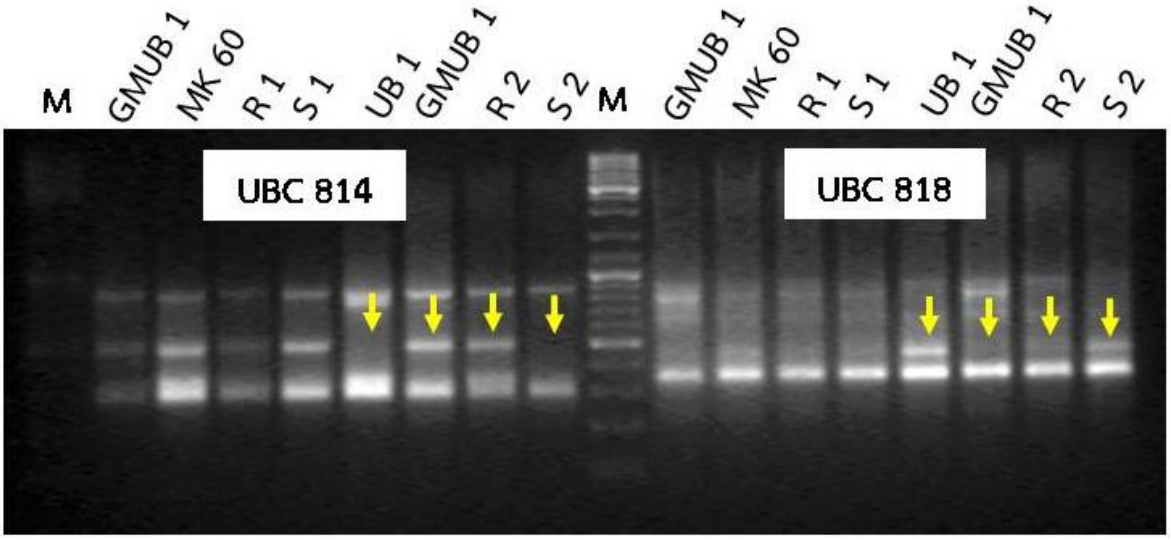
ภาพที่ 1 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซีสแสดงแถบดีเอ็นเอของงา 2 คู่ผสม คือ คู่ผสมที่ 1 GMUB1 (ต้านทาน) และ MK60 (อ่อนแอ) R1 = ลูกผสมคู่ที่ 1 ต้านทาน S1 = ลูกผสมคู่ที่ 1 อ่อนแอ คู่ผสมที่ 2 UB1 (อ่อนแอ) และ GMUB1 (ต้านทาน) R2 = ลูกผสมคู่ที่ 2 ต้านทาน S2 = ลูกผสมคู่ที่ 2 อ่อนแอ) ที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี modified CTAB method เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (200 ng และ 400 ng (Fermentas))



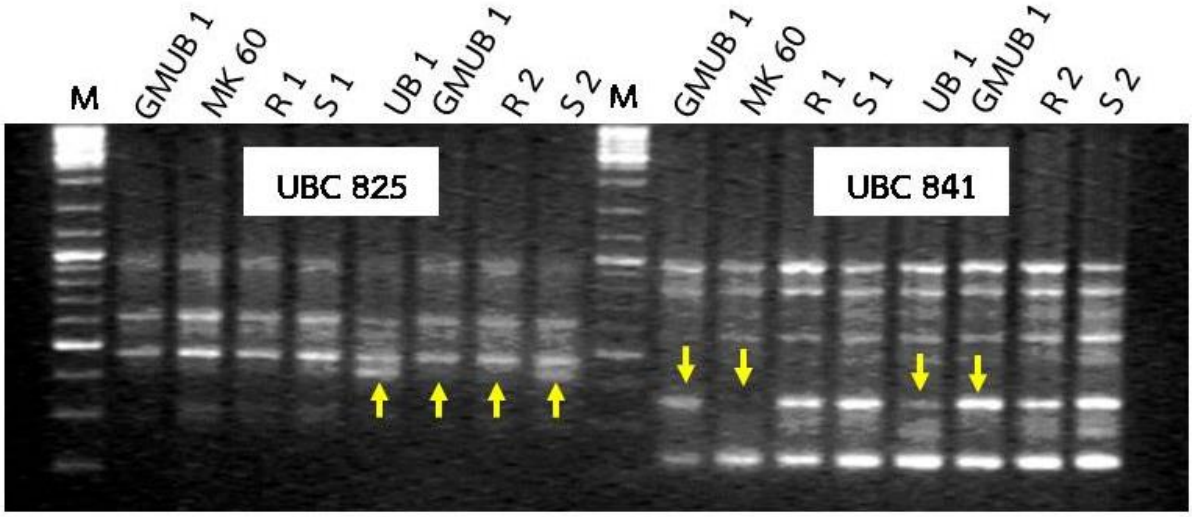
ภาพที่ 2 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสแสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากการคัดเลือกไพรเมอร์ ไอเอสเอสอาร์ จำนวน 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC 823 ISSR 1 ISSR 861 ISSR 880 ในงา 2 คู่ผสม (M = DNA ladder mix (Fermentas) คู่ผสมที่ 1 GMUB1 (ต้านทาน) และ MK60 (อ่อนแอ) R1 = ลูกผสมคู่ที่ 1 ต้านทาน S1 = ลูกผสมคู่ที่ 1 อ่อนแอ คู่ผสมที่ 2 UB1 (อ่อนแอ) และ GMUB1 (ต้านทาน) R2 = ลูกผสมคู่ที่ 2 ต้านทาน S2 = ลูกผสมคู่ที่ 2 อ่อนแอ)



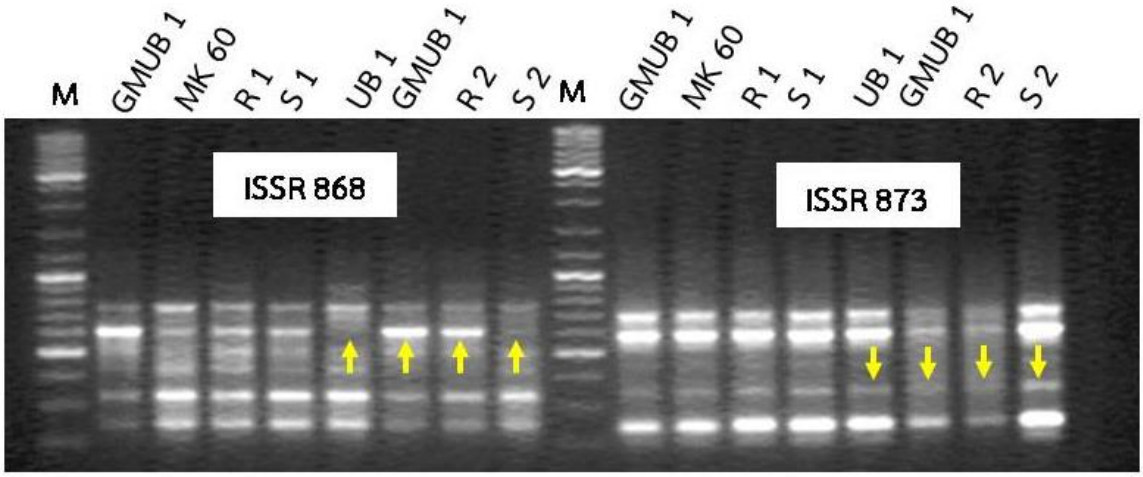
ภาพที่ 3 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสแสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากการคัดเลือกไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ จำนวน 2 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC 807 และ UBC 809 ในงา 2 คู่ผสม (M = DNA ladder mix (Fermentas) คู่ผสมที่ 1 GMUB1 (ต้านทาน) และ MK60 (อ่อนแอ) R1 = ลูกผสมคู่ที่ 1 ต้านทาน S1 = ลูกผสมคู่ที่ 1 อ่อนแอ คู่ผสมที่ 2 UB1 (อ่อนแอ) และ GMUB1 (ต้านทาน) R2 = ลูกผสมคู่ที่ 2 ต้านทาน S2 = ลูกผสมคู่ที่ 2 อ่อนแอ)



ภาพที่ 4 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสแสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากการคัดเลือกไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ จำนวน 2 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC 814 และ UBC 818 ในงา 2 คู่ผสม (M = DNA ladder mix (Fermentas) คู่ผสมที่ 1 GMUB1 (ต้านทาน) และ MK60 (อ่อนแอ) R1 = ลูกผสมคู่ที่ 1 ต้านทาน S1 = ลูกผสมคู่ที่ 1 อ่อนแอ คู่ผสมที่ 2 UB1 (อ่อนแอ) และ GMUB1 (ต้านทาน) R2 = ลูกผสมคู่ที่ 2 ต้านทาน S2 = ลูกผสมคู่ที่ 2 อ่อนแอ)



ภาพที่ 5 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสแสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากการคัดเลือกไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ จำนวน 2 ไพรเมอร์ ได้แก่ UBC 825 และ UBC 841 ในงา 2 คู่ผสม (M = DNA ladder mix (Fermentas) คู่ผสมที่ 1 GMUB1 (ต้านทาน) และ MK60 (อ่อนแอ) R1 = ลูกผสมคู่ที่ 1 ต้านทาน S1 = ลูกผสมคู่ที่ 1 อ่อนแอ คู่ผสมที่ 2 UB1 (อ่อนแอ) และ GMUB1 (ต้านทาน) R2 = ลูกผสมคู่ที่ 2 ต้านทาน S2 = ลูกผสมคู่ที่ 2 อ่อนแอ)



ภาพที่ 6 อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสแสดงผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากการคัดเลือกไพรเมอร์ไอเอสเอสอาร์ จำนวน 2 ไพรเมอร์ ได้แก่ ISSR 868 และ ISSR 873 ในงา 2 คู่ผสม (M = DNA ladder mix (Fermentas) คู่ผสมที่ 1 GMUB1 (ต้านทาน) และ MK60 (อ่อนแอ) R1 = ลูกผสมคู่ที่ 1 ต้านทาน S1 = ลูกผสมคู่ที่ 1 อ่อนแอ คู่ผสมที่ 2 UB1 (อ่อนแอ) และ GMUB1 (ต้านทาน) R2 = ลูกผสมคู่ที่ 2 ต้านทาน S2 = ลูกผสมคู่ที่ 2 อ่อนแอ)