

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสปีส์เพื่อช่วยในการคัดเลือกความต้านทาน
ต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดหวาน



เกศฎาภรณ์ จันต๊ะ

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพืชไร่

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2562

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสปีส์เพื่อช่วยในการคัดเลือกความต้านทาน
ต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดหวาน



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพืชไร่

สำนักบริหารและพัฒนาระบบราชการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสั้นเพื่อช่วยในการคัดเลือกความต้านทาน
ต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดหวาน

เกศภาภรณ์ จันตะ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชไร่

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(อาจารย์ ดร.อรพินธุ์ สฤษดิ์นำ)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เรืองชัย จุวัฒน์สำราญ)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ประวิตร พุทธานนท์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(Dr.Darush Struss)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เนตรนภา อินสูลด)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ)

รักษาการแทนรองอธิการบดี ปฏิบัติการแทน

อธิการบดีมหาวิทยาลัยแม่โจ้

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์เพื่อช่วยในการคัดเลือกความต้านทาน ต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดหวาน
ชื่อผู้เขียน	นางสาวเกศฎาภรณ์ จันตะ
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชไร่
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	อาจารย์ ดร.อรพินธุ์ สฤกษ์ดีนำ

บทคัดย่อ

โรคใบไหม้แผลใหญ่ (Northern corn leaf blight; NCLB) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Exserohilum turcicum* (Pass.) ทำความเสียหายให้กับผลผลิตข้าวโพดหวานมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาพภูมิอากาศที่เย็นและมีความชื้นสูง การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดหวานให้ต้านทานต่อโรค NCLB ด้วยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกยีน (MAS) ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อ NCLB จะเป็นวิธีการช่วยให้การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น จากการค้นพบยีนควบคุมความต้านทานต่อ NCLB ในข้าวโพด ได้แก่ ยีน *Ht1*, *Ht2*, *Ht3* และ *HtN* การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดหวาน อ้างอิงจากเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์ที่มีความสัมพันธ์กับยีน *Ht1* ได้แก่ umc1042 และ bnlg1721 โดยใช้สายพันธุ์อ่อนแอ NT58WS₆#4 เป็นสายพันธุ์แม่ และใช้สายพันธุ์ต้านทาน ChallengerS₆-1 เป็นสายพันธุ์พ่อ ในการสร้างประชากรรุ่นที่ 1 และ 2 ทำการประเมินการเกิดโรคใบไหม้แผลใหญ่ ในประชากรข้าวโพดหวานลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 184 ต้น โดยการให้คะแนนการเป็นโรค ที่ระยะ 56 วันหลังปลูกพบว่า อัตราส่วนการกระจายตัวของคะแนนการเกิดโรคไม่เป็นไปตามอัตราส่วนที่คาดหวังโดยมีค่า Chi-square เท่ากับ 33.51 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญและจากการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ทั้งหมด 92 และ 48 เครื่องหมาย บนโครโมโซมที่ 2 และ 8 พบ 5 เครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 2 ที่แสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ ได้แก่ MZSNP-0055106, MZSNP-0065744, MZSNP-0070164, MZSNP-0063922 และ MZSNP-0073150 ผลการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 5 เครื่องหมายกับการกระจายตัวของความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในประชากรรุ่นที่ 2 จำนวน 184 ต้นพบว่า เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 5 เครื่องหมาย ให้ค่า Chi-square ($P \leq 0.05$) เท่ากับ 0.82, 1.08, 1.08, 0.64 และ 0.64 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ด้วยการวิเคราะห์ QTL ด้วยวิธีการ Interval mapping พบว่าทั้ง 5 เครื่องหมายให้ค่า R-square เท่ากับ 0.21, 0.20, 0.18, 0.18

และ 0.17 ตามลำดับ จึงยอมรับอัตราส่วนการกระจายตัวของยีนโหนดเท่ากับ 1:2:1 นอกจากนี้ยังให้ค่า LOD score เท่ากับ 9.43, 9.04, 8.15, 8.03 และ 7.54 ตามลำดับ ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสไนป์สทั้ง 5 เครื่องหมายนี้ จะถูกนำมาช่วยคัดเลือกจีโนมโหนดสายพันธุ์ต้านทานต่อ NCLB ในข้าวโพดหวาน เพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ : โรคใบไหม้แผลใหญ่, ข้าวโพดหวาน, เครื่องหมายสไนป์ส, ความต้านทาน



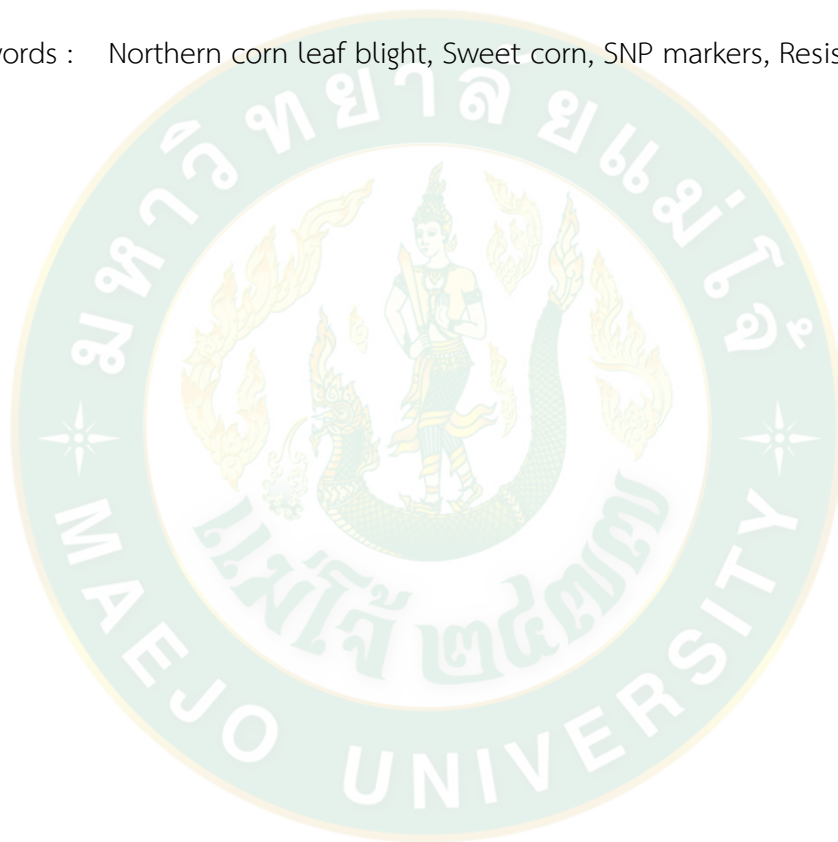
Title	IDENTIFICATION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM MARKERS ASSOCIATED WITH NORTHERN CORN LEAF BLIGHT RESISTANCE IN SWEET CORN
Author	Miss Kedsadaporn Junta
Degree	Master of Science in Agronomy
Advisory Committee Chairperson	Dr. Orapin Saritnum

ABSTRACT

Northern corn leaf blight disease (NCLB) is a foliar disease of corn (*Zea mays* L.) caused by *Exserohilum turcicum* (Pass.). The disease could lead to an economic impact with yield at a loss of up to 30 percent in epidemic area especially in especially in cool weather with high humidity. The most effective way to control this disease is using resistant varieties. The *Ht1*, *Ht2*, *Ht3* and *HtN1* resistant genes in corn were found to control the NCLB disease. There is an effort to identify various types of molecular markers associated to these genes in order for marker assisted selection (MAS) to be use. The objective of this study was to identify Single Nucleotide Polymorphism (SNP) markers which are associated with *Ht1* resistant gene. According to the previous experiment, two simple sequence repeat (SSR) markers (umc1042 and bnlg1721) located in the region of *Ht1* resistant gene were identified and efficiently used in the breeding program. The susceptible line “NT58WS₆#4” and the resistant line “ChallengerS₆-1” were used to develop F₁ and F₂ generations. The segregated ratio of disease resistance in F₂ population was tested by Chi-square analysis. The result showed that Chi-square value was 33.51 which was significantly greater than Chi-square ($P \leq 0.05$) of 5.99. Ninety-two and forty-eight SNP markers were tested in *Ht1* regions, which are located on chromosome 2 and 8. Five SNP primers (MZSNP-0055106, MZSNP-0065744, MZSNP-0070164, MZSNP-0063922, MZSNP-0073150) on chromosome 2 showed polymorphism between susceptible and resistant lines. The Chi-square test of genotypic data of 184 F₂ plants (NT58WS₆#4 x

ChallengerS6-1) amplified by five markers was fit to 1:2:1 ratio with Chi-square value of 0.82, 1.08, 1.08, 0.64 and 0.64 respectively. QTL analysis was conducted in this study for the *Ht1* resulted in R-square value of 0.21, 0.20, 0.18, 0.18 and 0.17, respectively ($P < 0.0001$). They showed LOD score value of 9.34, 9.04, 8.15, 8.03 and 7.54, respectively. These 5 SNP primers may be useful as molecular markers assisting selection for NCLB resistance in sweet corn.

Keywords : Northern corn leaf blight, Sweet corn, SNP markers, Resistance



กิตติกรรมประกาศ

การศึกษางานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของประธานกรรมการที่ปรึกษา อาจารย์ ดร. อรพินธุ์ สถฤชดี้นำ กรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เรืองชัย จูวัฒน์ สำราญ รองศาสตราจารย์ ประวิตร พุทธิานนท์ และ Dr. Darush Struss ที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน พร้อมทั้งให้คำปรึกษา และคำแนะนำในการแก้ไข ตลอดระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย อีกทั้งยังสละเวลาอันมีค่าในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ รวมทั้งคอยให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ บริษัท อีสท์ เวสท์ ซีด จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านสถานที่การทดลองใน ส่วนของห้องปฏิบัติการรวมถึง อุปกรณ์ และสารเคมี ในห้องปฏิบัติการโมเลกุล ในการศึกษาครั้งนี้

ขอบคุณฝ่ายปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์กรรมพืชและสัตว์ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการ การเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนด้านสายพันธุ์ข้าวโพดหวาน รวมถึงสถานที่ในการ ทำการศึกษาในส่วนของแปลงทดลอง

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและ วิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการที่ให้การ สนับสนุนด้านทุนวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนร่วมงานบริษัท อีสท์ เวสท์ ซีด จำกัด ทุกท่านที่ให้การสนับสนุนข้าพเจ้าโดย ตลอดมา

นอกจากนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อศรีทนต์ คุณแม่อิงอร และครอบครัวของ ข้าพเจ้า ที่ได้มอบโอกาสที่ดีในการศึกษา และคอยให้กำลังใจในการศึกษาครั้งนี้ รวมถึงพี่ๆ เพื่อนๆ และ น้องๆ และอาจารย์สาขาวิชาพืชไร่ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ทุกคนที่คอยให้ความ ช่วยเหลือมาโดยตลอด

เกศฎาภรณ์ จันดี๊ะ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ประวัติและความสำคัญของข้าวโพดหวาน.....	4
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าวโพดหวาน.....	6
โรคที่สำคัญของข้าวโพด.....	7
โรคใบไหม้แผลใหญ่ (Northern Corn Leaf Blight; NCLB).....	7
เชื้อราสาเหตุของโรคใบไหม้แผลใหญ่.....	8
ลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่.....	9
การประเมินความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่.....	10
ยีนควบคุมความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่.....	11
เครื่องหมายพันธุกรรม (Genetic marker).....	12
ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอ.....	13
การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (Marker-Assisted Selection; MAS).....	14
Single-nucleotide polymorphism (SNP หรือ สนิปส์).....	16
เทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลแบบสนิปส์.....	18

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	22
การทดลองที่ 1 ฤดูปลายฝน ปี พ.ศ. 2559 การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่ต้านทาน (R) และอ่อนแอ (S) ต่อโรค ด้วยการปลูกเชื้อรา <i>Exserohilum turcicum</i>	24
การทดลองที่ 2 ฤดูแล้ง ปี พ.ศ. 2560 การสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (F ₁ population) โดยการผสมข้ามระหว่าง สายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่อ่อนแอต่อโรค กับสายพันธุ์ต้านทาน.....	28
การทดลองที่ 3	29
การทดลองที่ 3.1 ห้องปฏิบัติการ ปี 2560 การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ที่บอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่อ่อนแอ, ต้านทานโรค และลูกผสม F ₁	29
การทดลองที่ 3.2 ฤดูฝน พ.ศ. 2560 การสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F ₂ populations) โดยการผสมตัวเองของต้น F ₁	36
การทดลองที่ 4	37
การทดลองที่ 4.1 ฤดูปลายฝน ปี พ.ศ. 2560 การปลูกเชื้อ <i>Exserohilum turcicum</i> ในประชากรข้าวโพดหวานลูกผสมชั่วที่ 2 เพื่อเป็นข้อมูลทางด้านฟีโนไทป์	37
การทดลองที่ 4.2 การศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ กับลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2	38
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	41
วิจารณ์ผลการทดลอง	60
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	64
บรรณานุกรม.....	67
ภาคผนวก.....	73
ประวัติผู้วิจัย.....	87

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 วิธีการให้คะแนนการเกิดโรคใบไหม้แผลใหญ่	27
ตารางที่ 2 เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์ที่สัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่จากการรายงานของ Puttarach et al. (2016)	30
ตารางที่ 3 การเตรียมชุดไพรเมอร์ ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร	33
ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของสารใน 1 ปฏิกริยา PCR	34
ตารางที่ 5 ขั้นตอนปฏิกริยา PCR	35
ตารางที่ 6 ลักษณะทางการเกษตรและคะแนนการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ของสายพันธุ์ข้าวโพดหวาน หลังการปลูกเชื้อสาเหตุ <i>Exserohilum turcicum</i> จากเชื้อแหล่งอำเภอสันทราย เชียงใหม่ (MJU) ในฤดูปลายฝน ปี พ.ศ. 2559	42
ตารางที่ 7 แสดงจำนวนต้นข้าวโพดหวานในประชากรรุ่นที่ 2 (F_2) ที่แสดงความต้านทานต่อโรคใบไหม้ในระดับคะแนน	49
ตารางที่ 8 การทดสอบค่า Chi-square การแสดงออกด้านฟีโนไทป์ของความต้านทานต่อโรคใบไหม้.. แผลใหญ่ ในประชากร F_2	51
ตารางที่ 9 การทดสอบค่า Chi-square การแสดงออกด้านจีโนไทป์ของความต้านทานต่อโรคใบไหม้ .. แผลใหญ่ ในประชากร F_2 ของเครื่องหมายสแนิปส์ MZSNP-0065744	56
ตารางที่ 10 การทดสอบค่า Chi-square การแสดงออกด้านจีโนไทป์ของความต้านทานต่อโรคใบไหม้ แผลใหญ่ ในประชากร F_2 ของเครื่องหมายสแนิปส์ MZSNP-0055106	57
ตารางที่ 11 การทดสอบค่า Chi-square การแสดงออกด้านจีโนไทป์ของความต้านทานต่อโรคใบไหม้ แผลใหญ่ ในประชากร F_2 ของเครื่องหมายสแนิปส์ MZSNP-0063922	57
ตารางที่ 12 การทดสอบค่า Chi-square การแสดงออกด้านจีโนไทป์ของความต้านทานต่อโรคใบไหม้ แผลใหญ่ ในประชากร F_2 ของเครื่องหมายสแนิปส์ MZSNP-0073150	58
ตารางที่ 13 การทดสอบค่า Chi-square การแสดงออกด้านจีโนไทป์ของความต้านทานต่อโรคใบไหม้ แผลใหญ่ ในประชากร F_2 ของเครื่องหมายสแนิปส์ MZSNP-0070164	58

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ QTL ด้วยวิธีการ Interval mapping กับลักษณะต้านทานต่อโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่ (Exserohilum turcicum) ในข้าวโพดหวาน..... 60



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ระบบการทำงานของ FRET	18
ภาพที่ 2 การประยุกต์ใช้หลักการของ FRET ในการตรวจวัดผลิตภัณฑ์ PCR.....	19
ภาพที่ 3 ระบบ KASPar™ Genotyping ที่มา : Raitio (2012)	20
ภาพที่ 4 ลักษณะของกราฟจุดที่แปลผลจากสัญญาณฟลูออเรสเซนส์โดยเครื่อง Araya.....	21
ภาพที่ 5 แผนภูมิการวิจัยเพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่.....	23
ภาพที่ 6 ลักษณะใบข้าวโพดหวานที่ถูกโรคใบไหม้แผลใหญ่เข้าทำลาย (ก), ชิ้นส่วนของใบข้าวโพดหวานที่เป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ ที่นำมาเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข), ลักษณะของโคโลนีของเชื้อโรคใบไหม้แผลใหญ่ (ค),(ง).....	25
ภาพที่ 7 เชื้อราบริสุทธิ์หลังจากบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อ 10 วัน (ก), สารแขวนลอยที่เตรียมสำหรับปลูกเชื้อ... ลงบนใบข้าวโพดหวาน (ข).....	26
ภาพที่ 8 การปลูกเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่บนใบข้าวโพดหวาน และการคลุมพลาสติก	27
ภาพที่ 9 แสดงหน้าตาเว็บไซต์ในการค้นหาและคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์.....	29
ภาพที่ 10 แสดงการนำตำแหน่งยีนของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ไปค้นหาเครื่องหมายโมเลกุล... ชนิดสนิปส์.....	30
ภาพที่ 11 ขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยา PCR และการตรวจสอบ PCR โดยระบบ Ultra High Throughput Technology of SNPs (Douglas Scientific)	35
ภาพที่ 12 ลักษณะฝักและใบข้าวโพดหวานสายพันธุ์ที่ต้านทาน; ChallengerS ₆ -1 (ก),(ค) และสาย... พันธุ์ที่อ่อนแอ; NT58WS ₆ #4 (ข), (ง) ต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่.....	43
ภาพที่ 13 ลักษณะฝักข้าวโพดลูกผสมชั่วที่ 1 (F ₁ seeds) (NT58WS ₆ #4 x ChallengerS ₆ -1).....	44
ภาพที่ 14 ผลการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ MZSNP-0065744 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อ (AA), สายพันธุ์แม่ (BB) และสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (AB).....	45

ภาพที่ 15 ผลการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิปส์ MZSNP-0055106 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อ (AA), สายพันธุ์แม่ (BB) และสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (AB).....	45
ภาพที่ 16 ผลการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิปส์ MZSNP-0063922 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อ (AA), สายพันธุ์แม่ (BB) และสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (AB).....	46
ภาพที่ 17 ผลการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิปส์ MZSNP-0073150 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อ (AA), สายพันธุ์แม่ (BB) และสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (AB).....	46
ภาพที่ 18 ผลการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิปส์ MZSNP-0070164 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อ (AA), สายพันธุ์แม่ (BB) และสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (AB).....	47
ภาพที่ 19 ผลการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิปส์ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อ (AA), สายพันธุ์แม่ (BB) และสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (AB).....	47
ภาพที่ 20 ลักษณะฝักข้าวโพดหวานลูกผสมชั่วที่ 2 (F ₂ seeds), (NT58WS ₆ #4 x ChallengerS ₆ -1) F ₂	48
ภาพที่ 21 แสดงภาพประกอบในการประเมินเพื่อให้คะแนนการเกิดโรคที่คะแนนตั้งแต่ 1-9 ในประชากรลูกชั่วที่ 2 จำนวน 184 ต้น	50
ภาพที่ 22 กราฟแสดงการกระจายตัวของลักษณะคะแนนการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ของประชากร ข้าวโพดหวานลูกผสมชั่วที่ 2.....	50
ภาพที่ 23 ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของไพรเมอร์สลิปส์ MZSNP-0065744 ที่ได้รับการคัดเลือกและนำไปตรวจสอบในประชากร F ₂ 184 ต้น.....	53
ภาพที่ 24 ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของไพรเมอร์สลิปส์ MZSNP-0055106 ที่ได้รับการคัดเลือกและนำไปตรวจสอบในประชากร F ₂ 184 ต้น.....	53
ภาพที่ 25 ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของไพรเมอร์สลิปส์ MZSNP-0063922 ที่ได้รับการคัดเลือกและนำไปตรวจสอบในประชากร F ₂ 184 ต้น.....	54
ภาพที่ 26 ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของไพรเมอร์สลิปส์ MZSNP-0073150 ที่ได้รับการคัดเลือกและนำไปตรวจสอบในประชากร F ₂ 184 ต้น.....	54
ภาพที่ 27 ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของไพรเมอร์สลิปส์ MZSNP-0070164 ที่ได้รับการคัดเลือกและนำไปตรวจสอบในประชากร F ₂ 184 ต้น.....	55
ภาพที่ 28 ตัวอย่างของผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของไพรเมอร์ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้....	55

ภาพที่ 29 แสดง Genetic map และค่า LOD score สำหรับตำแหน่ง major QTL ของเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 5 เครื่องหมายที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 2 ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทาน ต่อเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่ (*Exserohilum turcicum*).....59



บทที่ 1

บทนำ

ข้าวโพดหวาน (*Zea mays var. rugosa*) เป็นพืชเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทย ปลูกรับประทานสด และเพื่อส่งเข้าโรงงานแปรรูปสำหรับการส่งออก เนื่องจากมีอายุเก็บเกี่ยวสั้น เป็นพืชใช้น้ำน้อย จึงเหมาะเป็นพืชหลังนาหรือใช้ในระบบปลูกพืช ตลอดจนมีตลาดรองรับผลผลิตที่มีการขยายตัวเพิ่มขึ้นทั้งในและต่างประเทศ การบริโภคฝักสดและการแปรรูปซึ่งมีทั้งบรรจุทั้งเมล็ด (whole kernel) ข้าวโพดครีม (cream style corn) และบรรจุทั้งฝัก (corn on cob) นอกจากนี้ยังมีการแปรรูปแบบแช่แข็งทั้งเมล็ด แช่แข็งทั้งฝัก แบบเมล็ดแห้ง (dehydrated kernel) และอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับคามนิยมของตลาดในปัจจุบันทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ คือ ข้าวโพดหวานพร้อมรับประทาน (corn retort pouch) การปลูกข้าวโพดหวานในปี พ.ศ. 2560 พบว่ามีพื้นที่ปลูกรวมทั้งสิ้น 224,879 ไร่ ได้ผลผลิตรวม 460,923 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561) ในพื้นที่ปลูกข้าวโพดหวาน พบว่าโรคใบไหม้แผลใหญ่ (Northern corn leaf blight; NCLB) ที่เกิดจากเชื้อรา *Exserohilum turcicum* ทำความเสียหายให้กับผลผลิตอย่างมาก โดยข้าวโพดหวานที่ปลูกในภาคเหนือฤดูแล้งปี 2557 และ 2558 ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่พบการแพร่ระบาดของ NCLB ร้อยละ 65 และ 95 ของพื้นที่สำรวจ ในภาคกลาง พื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี และนครปฐม พบการแพร่ระบาดร้อยละ 70 และ 73 ของพื้นที่สำรวจ (พรพรรณ และคณะ, 2559) ในข้าวโพดหวานที่ถูกโรค NCLB เข้าทำลายจะทำให้ผลผลิตเสียหายได้มากถึงร้อยละ 63, 43 และ 17 ในข้าวโพดลูกผสมพันธุ์เบา ปานกลาง และพันธุ์หนักตามลำดับ (Galiano and Miedaner, 2017) การป้องกันกำจัดโรค NCLB สามารถทำได้โดยการใช้วิธีกลและการใช้สารกำจัดเชื้อรา การพ่นสารกำจัดเชื้อราสามารถลดความรุนแรงในการเข้าทำลายของ NCLB ได้ถึงร้อยละ 50 เปรียบเทียบกับการไม่พ่นสารกำจัดเชื้อรา (Blandino et al., 2012) นอกจากนี้ การเตรียมแปลงปลูกโดยการไถดินก่อนปลูกก็สามารถลดความรุนแรงของ NCLB ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Pedersen and Oldham, 1992) แต่ในปัจจุบันได้มีส่งเสริมการปลูกข้าวโพดโดยไม่มีการไถและเผาเตรียมดิน เนื่องจากต้องอนุรักษ์ดิน ลดการชะล้างหน้าดิน ลดการอัดตัวของอนุภาคดิน เพิ่มความหลากหลายทางชีวภาพ ลดระยะเวลาและต้นทุนในการผลิต (Punyalue et al., 2015; Wilhelm et al., 2004) แต่ในทางกลับกันทำให้เพิ่มความรุนแรงของ NCLB ในการเข้าทำลายพืชที่ปลูกฤดูถัดไป เนื่องจาก NCLB สามารถพักตัวในดินหรือเศษซากพืชข้ามฤดูได้ และเข้าทำลายเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ อย่างไรก็ตามหากใช้พันธุ์ข้าวโพดหวานที่สามารถต้านทานต่อเชื้อได้ สามารถลดความเสียหายที่เกิดจากโรคได้ อีกทั้งยังไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม เกษตรกร และผู้บริโภค รวมถึงลดต้นทุนในการผลิตจากการใช้สารเคมี

การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดหวานให้ต้านทานต่อโรค NCLB ด้วยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือกยีน (gene) ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อ NCLB จะเป็นวิธีการช่วยให้การปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดหวานในประเทศไทยให้ต้านทานต่อ NCLB ซึ่งดำเนินไปอย่างมีประสิทธิภาพ โดยในปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) เข้ามาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์อย่างแพร่หลาย ซึ่งทำให้การคัดเลือกมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น จากการศึกษาการค้นพบยีนควบคุมความต้านทานต่อ NCLB คือ *Ht* gene ในข้าวโพด ซึ่งพบได้ทั้งในข้าวโพดเขตร้อนและเขตหนาว ได้แก่ ยีน *Ht1*, *Ht2*, *Ht3* และ *HtN* (*Ht* มาจาก *Helminthosporium turcicum*) (Gevers, 1975; Hooker, 1963; Hooker, 1977) ในประเทศไทยยังมีข้อมูลเกี่ยวกับเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับ *Ht* gene อย่างจำกัด มีเพียงรายงานจากกลุ่มวิจัยเพียง 2 กลุ่มที่ศึกษาเกี่ยวกับเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับยีน *Ht* gene โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด random amplified polymorphic DNA (RAPD) และเครื่องหมายโมเลกุลชนิด sequence characterized amplified regions (SCARs) ในข้าวโพดข้าวเหนียว (Khampila et al., 2008) ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด simple sequence repeats (SSRs) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) (Puttarach et al., 2016) ไมโครแซทเทลไลท์จึงเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการตรวจสอบความหลากหลายของประชากร แต่ก็มีข้อจำกัดด้วยเครื่องหมายของไมโครแซทเทลไลท์คือ ถึงแม้ไมโครแซทเทลไลท์จะเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถให้ข้อมูลทางพันธุกรรมได้มากมายแต่การพัฒนาหรือสร้างไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์นั้นมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงมาก ซึ่งจะเป็นอุปสรรคสำหรับพืชที่ไม่เคยมีข้อมูลลำดับเบสใน GENBANK มาก่อน นอกจากนี้แล้วปัญหาทางด้านเทคนิคที่พบบ่อยๆ คือการวิเคราะห์ผลค่อนข้างยากโดยเฉพาะกรณีที่ต้องการรู้ขนาดอัลลีลที่แน่นอน ทั้งนี้เนื่องมาจากการเกิด “stutter band” ทำให้การอ่านแถบดีเอ็นเอผิดพลาดได้ (สุริพร, 2546) แต่อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลอีกชนิดหนึ่งขึ้นมา ซึ่งมีความละเอียดสูงและสามารถเชื่อมโยงยีนที่ต้องการศึกษาอย่างใกล้ชิด ได้แก่ เครื่องหมายโมเลกุลชนิด single nucleotide polymorphism (SNP หรือ สนิปส์) ที่บ่งชี้จุดที่ DNA มีความแตกต่างของลำดับเบสเพียงหนึ่งลำดับเบส (A,T,G และ C) ระหว่างสายพันธุ์ สนิปส์ เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมทั้งในพืชและสัตว์ เนื่องจากมีการแสดงออกแบบข่มร่วมกัน (co-dominance) ทำให้สามารถแยก allele ที่เป็น homozygous และ heterozygous ได้ ซึ่งถ้าหากสามารถบ่งชี้ สนิปส์ ที่เชื่อมโยงกับยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อ NCLB ได้ จะเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพอย่างมากสำหรับช่วยคัดเลือกสายพันธุ์ต้านทานต่อ NCLB ในข้าวโพดหวานเพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดหวาน ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่โดยการปลูกเชื้อ
2. พัฒนาเทคนิคและวิธีการคัดเลือกโดยใช้ข้อมูลความต้านทานและอ่อนแอต้านพีโนไทท์ร่วมกับอีโนไทท์ที่แตกต่างกัน (polymorphism) ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิปส์ในสายพันธุ์ข้าวโพดหวาน
3. ประเมินความสัมพันธ์ระหว่างยีนควบคุมความต้านทานกับลักษณะความต้านทานโรค (gene – trait association)

ขอบเขตของงานวิจัย

1. ใช้เชื้อรา *Exserohilum turcicum* ไอโซเลทจากมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ในการปลูกเชื้อ
2. พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิปส์ที่มีความสัมพันธ์กับยีนต้านทาน *Ht1* โดยเทียบเคียงจากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 2 เครื่องหมาย ได้แก่ bnlg1721 และ umc1042
3. ใช้ประชากรรุ่น F_2 ในการพัฒนาและประเมินความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะความต้านทานโรค

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิปส์ สำหรับคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดหวานต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ สายพันธุ์แท้คุณภาพดี ที่ได้จากการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลิปส์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *Ht1* เพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์

บทที่ 2

ตรวจเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ประวัติและความสำคัญของข้าวโพดหวาน

นักโบราณคดีได้ขุดฟอสซิล (fossil) ของข้าวโพดมาศึกษาถึงถิ่นกำเนิดจากฟอสซิล ของ ละอองเกสรเพศผู้ของข้าวโพดที่พบในประเทศเม็กซิโก นักวิชาการจึงสรุปว่า ประเทศเม็กซิโกและ อเมริกากลางเป็นถิ่นกำเนิดของข้าวโพด จากเอกสารเก่าแก่ของพระยาวิจิตร ว. นันดร ชื่อ หนังสือพันธุ์ไม้ต่างประเทศ บันทึกไว้ว่าข้าวโพดได้นำเข้าสู่ประเทศไทยในรัชสมัยสมเด็จพระนารายณ์มหาราช ราว พ.ศ. 2223 ส่วนจดหมายเหตุของ Monsieur De La lover ชาวฝรั่งเศสที่เข้ามาในรัชสมัยนั้นก็บันทึกว่า คนไทยรู้จักการปลูกข้าวโพดกัน แต่ก็เป็นการปลูกในสวนหลวงเท่านั้น (กรรณิการ์ และธนิต, 2545) ข้าวโพดหวานพันธุ์ Golden Bantan เริ่มปลูกในประเทศไทยประมาณปี พ.ศ. 2491 โดย นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา ปรับตัวเข้ากับประเทศไทยได้ดีพอสมควร มีความหวานสูงแต่เปลือก เมล็ดเหนียวจึงทำให้ติดฟันเวลารับประทาน จึงไม่ค่อยนิยมมาก ต่อมาในปี พ.ศ. 2494 ได้มีการนำ ข้าวโพดหวานพันธุ์ใหม่จากฮาวายประเทศสหรัฐอเมริกา ชื่อพันธุ์ Hawaiian Sugar มาปลูกใน ประเทศไทย พบว่าสามารถปรับตัวได้ดี และในปี พ.ศ. 2514 ได้มีการนำข้าวโพดหวานพิเศษ ชื่อ พันธุ์ Hawaiian Sugar Super Sweet : HSSW จาก ดร. บรูเบอเกอร์ มหาวิทยาลัยฮาวาย ประเทศ สหรัฐอเมริกา มาปลูกในประเทศไทย และพบว่าสามารถปรับตัวได้ดีมาก มีรสหวานและเปลือกหุ้ม เมล็ดค่อนข้างบาง ไม่ติดฟัน จึงได้ทำการขยายพันธุ์และเผยแพร่ไปสู่เกษตรกร ในปีต่อมาข้าวโพด หวานพันธุ์นี้ถูกใช้เป็นฐานพันธุ์กรรมของข้าวโพดหวานพันธุ์ต่าง ๆ ในประเทศไทยสืบต่อมา (ทวีศักดิ์, 2540)

ในปัจจุบันผลผลิตของข้าวโพดหวานนำมารับประทานสด และปลูกเพื่อส่งเข้าโรงงานแปรรูป สำหรับการส่งออก โดยประเทศไทยส่งออกข้าวโพดหวานแปรรูปเป็นอันดับ 1 ของโลก คิดเป็นมูลค่า ประมาณ 6,637 ล้านบาท จากสถิติการส่งออกข้าวโพดหวานปรุงแต่งไม่แช่แข็ง และดิบหรือทำให้สุก แช่แข็ง ผู้ปลูกข้าวโพดหวานรายใหญ่ของโลก ได้แก่ สหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส ฮังการี และแคนาดา ส่วน เอเชียมีผู้ปลูกรายใหญ่ ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น ไต้หวัน และไทย โดยประเทศไทยมีแหล่งเพาะปลูกสำคัญ ได้แก่ ภาคเหนือ เช่น จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัด หนองคาย นครพนม ภาคกลาง เช่น จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี ส่วนภาคใต้ เช่น จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และสตูล เกษตรกรมักปลูกข้าวโพดหวานในฤดูฝนช่วง เดือนพฤษภาคม และเก็บเกี่ยวในเดือนกรกฎาคม สิงหาคม และตุลาคม และปลูกหลังการเก็บเกี่ยว ข้าวในเดือนตุลาคม – พฤศจิกายน และเก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ – มีนาคม การจำหน่ายผลผลิตมี

ทั้งการจำหน่ายแก่โรงงานเพื่อแปรรูปเป็นข้าวโพดหวานกระป๋อง การส่งออกต่างประเทศ และนำมาบริโภคภายในประเทศ รูปแบบการจำหน่ายในประเทศมักพบนำเข้าฝักสดมาขายตามท้องตลาด การเกษตร ตลาดสด และมักพบการขายเป็นข้าวโพดหวานต้มหรือข้าวโพดหวานย่างไฟตามข้างถนน ของพื้นที่แปลงปลูก (สภาเกษตรกรแห่งชาติ, 2561)

ประเทศไทยถือว่าเป็นผู้ส่งออกรายใหญ่ติดอันดับ 1 ใน 10 ของโลก ทั้งด้านปริมาณและมูลค่า ข้อมูลจากศูนย์ข้อมูลการค้าระหว่างประเทศ (International Trade Centre: ITC) พบว่า ในปี 2557 – ปี 2559 ประเทศไทยมีมูลค่าการส่งออกข้าวโพดหวานแบบสดหรือแปรรูปฯ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดช่วงระยะเวลาดังกล่าว โดยในปี 2557 ปี 2558 และปี 2559 มีมูลค่าการส่งออกข้าวโพดหวานแบบสดหรือแปรรูป (ดิบหรือทำให้สุกโดยการนึ่งหรือต้ม) แช่เย็นจนแข็ง เท่ากับ 17.55 ล้านดอลลาร์สหรัฐ 19.74 ล้านดอลลาร์สหรัฐ และ 21.76 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ตามลำดับ ส่วนปริมาณการส่งออกข้าวโพดหวาน ในปี 2557 ปี 2558 และปี 2559 เท่ากับ 14,702 ตัน 17,494 ตัน และ 19,241 ตัน ตามลำดับ หรือคิดเป็นสัดส่วนปริมาณการส่งออกเท่ากับร้อยละ 5 ของปริมาณการส่งออกรวมทั่วโลก สำหรับการส่งออกข้าวโพดหวานแปรรูปโดยผ่านการความร้อนด้วยไอน้ำ หรือการต้มในน้ำ หรือแบบแช่เยือกแข็งประเทศไทยถือได้ว่าเป็นผู้ส่งออกรายที่ใหญ่ที่สุดของโลก ทั้งในด้านมูลค่าและด้านปริมาณ โดยในปี 2557 ปี 2558 และปี 2559 ประเทศไทยได้ส่งออกข้าวโพดหวานในกลุ่มนี้ มูลค่าเท่ากับ 206.35 ล้านดอลลาร์สหรัฐ 180.02 ล้านดอลลาร์สหรัฐ และ 196.00 ล้านดอลลาร์สหรัฐ ตามลำดับ ส่วนปริมาณการส่งออกในปี 2557 ปี 2558 และปี 2559 เท่ากับ 200,044 ตัน 186,060 ตัน และ 209,251 ตัน ตามลำดับ นอกจากนี้ การส่งออกข้าวโพดหวานและผลิตภัณฑ์ ในช่วง 11 เดือนของปี 2561 (ม.ค.-พ.ย.) มีปริมาณ 236,775.6 ตัน เพิ่มขึ้น 6.7% มูลค่า 7,329.9 ล้านบาท เพิ่มขึ้น 2.2% โดยเป็นการส่งออกไปญี่ปุ่นมากเป็นอันดับหนึ่ง คิดเป็น 26.5% รองลงมา ได้แก่ เกาหลีใต้ 10.2% และได้หวัน 10.1% ของมูลค่าการส่งออก ทำให้ไทยครองแชมป์ส่งออกอันดับ 1 ของโลกมาต่อเนื่องในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา โดยมีประเทศคู่แข่งสำคัญ คือ ฝรั่งเศส ฮังการี และสหรัฐฯ (ไทยโพสต์, 2562) ทั้งนี้ผลพลอยได้จากส่วนที่เหลือของข้าวโพดหวาน เช่น เปลือก ไหม และต้น นำมาใช้เป็นอาหารหยาบเลี้ยงโคเนื้อโคนมได้เป็นอย่างดี ปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้อุตสาหกรรมเกษตรนี้ยั่งยืน ประกอบไปด้วยวิธีการเกษตรที่ดีและเหมาะสม (Good Agricultural Practice : GAP) ของข้าวโพดหวานและพันธุ์ โดยเฉพาะพันธุ์ที่ต้องมีการปรับปรุงพันธุ์อยู่เสมอ ในการปรับปรุงพันธุ์นั้น จำเป็นต้องศึกษาการถ่ายทอดลักษณะปริมาณและคุณภาพข้าวโพดหวาน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการคัดเลือกพันธุ์ให้เหมาะสมกับความต้องการของโรงงานทั้งด้านผลผลิตและคุณภาพ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าวโพดหวาน

1. ราก รากของข้าวโพดมีระบบที่เรียกว่า ระบบรากฝอย (fibrous root system) ซึ่งแบ่งออกเป็นหลายชนิด เช่น รากชั้นต้น (primary root) รากยึดเหนี่ยว (brace root) รากด้านข้าง (lateral root) และรากฝอย (root hair) แต่ไม่มีรากแก้ว (tap root) น้ำหนักของรากคิดเป็นร้อยละ 12-15 ของน้ำหนักทั้งหมด ปริมาณของรากข้าวโพดแต่ละต้นแต่ละพันธุ์ มีมากน้อยต่างกันไปแล้วแต่ลักษณะทางพันธุกรรม และสิ่งแวดล้อม ข้าวโพดที่มีรากมากมีความแข็งแรงและทนทานต่อการหักล้มได้ดีกว่าพวกที่มีปริมาณรากน้อย

2. ลำต้น ข้าวโพดมีลำต้นแข็ง ใสนั่นไม่กลวงเหมือนพืชอื่น ความสูงของลำต้นมีตั้งแต่ 60 เซนติเมตร จนถึง 6 เมตร แล้วแต่ชนิดของพันธุ์ การแตกกอของต้นข้าวโพดขึ้นกับพันธุ์และความอุดมสมบูรณ์ของดิน โดยปกติข้าวโพดหัวแข็ง (flint) หรือข้าวโพดหวานมักแตกกอได้ง่ายกว่าข้าวโพดหัวบุบ (dent) ต้นที่แตกกอมาใหม่นั้นอาจจะมีจำนวน 3-4 ต้นก็ได้ จะมีลักษณะไม่แตกต่างจากต้นแม่เลย และทุกต้นอาจให้ฝักที่สมบูรณ์ได้ด้วย

3. ใบ ประกอบด้วย ใต้วใบ กาบใบ และหูใบ (ligule) ลักษณะของใบข้าวโพดก็มีความแตกต่าง กันไปมากมายแล้วแต่พันธุ์ จำนวนใบมีตั้งแต่ 8-48 ใบ

4. ดอก ข้าวโพดมีดอกเพศผู้ และดอกเพศเมียอยู่แยกกัน แต่อยู่ในต้นเดียวกัน (monoecious) ดอกเพศผู้รวมกันอยู่เป็นช่อ เรียกว่าช่อดอกเพศผู้ (tassel) ช่อดอกเพศผู้ของข้าวโพดธรรมดา 1 ต้น อาจจะมีผลิตรละองเกสรได้ถึง 25,000,000 เกสรหรือเฉลี่ยแล้วมีละองเกสรมากกว่า 25,000 เกสร ที่จะไปผสมไหมเมล็ดบนฝัก ซึ่งจะผลิตเมล็ดประมาณ 800 – 1,000 เมล็ด การสลัดละองเกสรเกิดขึ้นก่อนการออกไหม 1-3 วัน บนข้าวโพดต้นเดียวกัน การบานของดอกเพศผู้จะบานติดต่อกันหลายวัน ส่วนดอกเพศเมียนั้นอยู่รวมกันเป็นช่อหรือฝักที่กลาง ๆ ลำต้น ดอกเพศเมียแต่ละดอก ประกอบด้วยรังไข่ (ovary) และเส้นไหม (silk หรือ style) ซึ่งมีความยาวประมาณ 5-15 เซนติเมตร และยื่นปลายโผล่ออกไปรวมกันเป็นกระจุกอยู่ตรงปลายช่อดอก ซึ่งมีเปลือกหุ้มอยู่ และพร้อมที่จะผสมพันธุ์ทันทีที่งอกพันเปลือก เส้นไหมมีลักษณะเป็นยางเหนียว ๆ สำหรับคอยรับละองเกสรที่ปลิวมาสัมผัสเพื่อเข้าผสมกับไข่ และจับละองเกสรได้ตลอดความยาวของเส้นไหม เมื่อรังไข่ได้รับการผสม จากละองเกสร รังไข่ก็จะเติบโตเป็นเมล็ด ช่อดอกตัวเมียที่รับการผสมแล้วนี้เรียกว่า ฝัก (ear) ข้าวโพดต้นหนึ่งอาจมีมากกว่า 1 ฝักขึ้นไป และฝักหนึ่งอาจมีมากถึง 1,000 เมล็ด หรือมากกว่านั้น แกนกลางของฝักเรียกว่า ชัง (สถาบันวิจัยพืชไร่, 2550)

โรคที่สำคัญของข้าวโพด

1. โรคที่เกิดจากเชื้อรา

1.1 โรคราน้ำค้าง (downy mildew) สาเหตุ เกิดจากเชื้อรา *Peronosclerospora sorghi* การแพร่กระจายของโรค โรคเริ่มระบาดเมื่อบรรยากาศมีความชื้นสูง ราวๆ กลางฤดูฝนถึงสิ้น ฤดูฝน เชื้อโรคจะสร้าง conidia บนใบข้าวโพด เมื่อ conidia แก่จะแพร่กระจายไปโดยลม แล้วเข้าทำลาย ข้าวโพดต้นอื่นๆต่อไป นอกจากนี้ใบข้าวโพดแล้ว เชื้อโรคอาจติดไปกับเมล็ดพันธุ์ได้อีกด้วย

1.2 โรคใบไหม้ (leaf blight) สาเหตุ โรคใบไหม้แผลเล็กเกิดจากเชื้อ *Helminthosporium maydis* โรคใบไหม้แผลใหญ่เกิดจากเชื้อ *Helminthosporium turcicum* การแพร่กระจาย สปอร์ ของเชื้อโรคสามารถระบาดไปกับเมล็ด หรือถูกพัดพาไปโดยลมหรือ ฝน เชื้อราที่มีชีวิตอยู่ได้ในใบ ข้าวโพดนาน 8 เดือน และอยู่ในเมล็ดได้นาน 1 ปี พบว่าหญ้าเดือยเป็นพืชอาศัยของราชนิดนี้

1.3 โรคราสนิม (rust) สาเหตุ เกิดจากเชื้อรา *Puccinia polysora* การแพร่กระจายสปอร์ ของราจะถูกแพร่กระจายโดยลม อยู่ข้ามฤดูได้บนซากพืชในลักษณะของสปอร์ที่มีผนังหนา สปอร์ สามารถเข้าทำลายพืชในฤดูปลูกต่อไป

1.4 โรคฝัก-เมล็ดเน่า (botryodiplodia kernel rot หรือ ear rot) สาเหตุ เกิดจากเชื้อรา *Botryodiplodia sp.* การแพร่กระจายไปกับฝน แมลง หรือติดไปกับเมล็ด ระบาดมากในช่วงฤดูฝน เมล็ดข้าวโพด ที่ติดเชื้อจะมีจุดสีดำ กระจายอยู่บนเมล็ด ถ้าเป็นโรครุนแรงเมล็ดข้าวโพดจะมีเมล็ดสีดำ ฝักอาจเน่าบางส่วน หรือเน่าทั้งหมด

2. โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ได้แก่ Maize Dwarf Mosaic Virus (MDMV), Maize Chlorotic Dwarf Virus (MCDV), Sugarcane Mosaic Virus (SCMV), Maize Chlorotic Mottle Virus (MCMV), Brome Mosaic Virus (BMV) เป็นต้น (สถาบันวิจัยพืชไร่, 2550)

โรคใบไหม้แผลใหญ่ (Northern Corn Leaf Blight; NCLB)

โรคใบไหม้แผลใหญ่ (NCLB) เป็นหนึ่งในโรคเชื้อราที่สำคัญที่ส่งผลกระทบต่อความมั่นคงทางอาหาร (food security) เนื่องจากเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการสูญเสียผลผลิตในข้าวโพด ซึ่งหากโรคนี้มีการระบาดในแปลงปลูกข้าวโพดหวาน สามารถส่งผลกระทบต่อการผลิตถึงร้อยละ 20-30 NCLB จึงถูกจัดให้เป็นโรคพืชที่มีผลกระทบต่อความมั่นคงทางอาหาร เนื่องจากเป็นสาเหตุให้การสูญเสียแหล่งอาหารสำหรับประชากรโลก (Stange and Scott., 2005) ในสหรัฐอเมริกาเป็นโรคที่ระบาดมานานแล้ว ส่วนในประเทศไทยพบการระบาด ที่มีผลกระทบต่อผลผลิตในพื้นที่เพาะปลูกทางภาคเหนือ ซึ่งมีสภาพอากาศหนาวเย็นและความชื้นสูง ลักษณะอาการจะเกิดเป็นแผลรูปร่างรีคล้าย กระสวยเกิดที่ใบ ขนาดยาว 2-15 เซนติเมตร บริเวณแผลมีสีเขียวซีดถึงสีน้ำตาล แผลมักจะเริ่มเกิดที่ใบล่างก่อน บางครั้งถ้าแผลมีปริมาณมาก แผลอาจจะรวมกันเป็นผืน สีน้ำตาล และในที่สุดทำลาย

พื้นที่สีเขียวทั้งหมด โรคใบไหม้แผลใหญ่จะกระทบผลผลิตก็ต่อเมื่อใบบนเหนือฝักถูกทำลายหรือเกิดก่อนการผสมเกสร แต่มักมีผลน้อยถ้าแผลเกิดหลังผสมเกสรแล้ว

เชื้อราสาเหตุของโรคใบไหม้แผลใหญ่

เชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค NCLB คือเชื้อรา *Exserohilum turcicum* (Pass) K.J. Leonard and E.G. Suggs มีชื่อพ้องคือ *Helminthosporium turcicum* เป็น asexual stage และมี sexual stage คือ *Setosphaeria turcica* [(Luttrell) Leonard and Suggs.]

ข้อมูลทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic information)

Phylum Ascomycota

Class Dothideomycetes

Order Pleosporales

Family Pleosporaceae

Genus *Exserohilum*

Species *turcicum*

Race/Pathover

เชื้อ *Exserohilum turcicum* สามารถพักตัวในรูปเส้นใย (mycelium) ในเศษซากพืชหรือ chlamydospores อยู่ในดิน ข้ามฤดู การเข้าทำลายของเชื้อโดยส่วนใหญ่เกิดจาก conidia ที่ถูกสร้างจากเศษซากของข้าวโพด แพร่กระจายมาในอากาศแล้วถูกพัดมาโดยลม ฝน เชื้อ *Exserohilum turcicum* สามารถเข้าทำลายพืชได้เมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ ได้แก่ อุณหภูมิกลางวันต่ำลง ความชื้นสัมพัทธ์สูง และมีช่วงระยะเวลาการเกิดน้ำค้างอย่างน้อย 4 ชั่วโมง conidia จะถูกปล่อยออกมาจาก mycelium ในตอนบ่ายหลังจากที่ในคืนที่มีกลางวันอุ่นและมีความชื้นสัมพัทธ์สูงมากกว่า 90% อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการสร้าง conidia คือ อุณหภูมิที่อยู่ในช่วง 20 - 26 องศาเซลเซียส การเข้าทำลายของเชื้อต้องใช้เวลา 6 - 8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 18 - 27 องศาเซลเซียส (Setyawan et al., 2016) ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเมื่อสปอร์ตกลงที่ใบพืช สปอร์สร้าง germ tube และ appressoria เพื่อสร้างเส้นใยขนาดเล็ก (hyphae) เพื่อเข้าทำลายพืช โดย hyphae นี้จะแทรกผ่าน cuticle และ epidermis เพื่อเข้าสู่เซลล์ใบพืช (Wathaneeyawech et al., 2015) hyphae จะเจริญเติบโตไประหว่างเซลล์พืชเข้าไปถึงชั้น mesophyll และเจริญเติบโตเรื่อย ๆ ผ่านเข้าสู่ vascular bundles จนกระทั่งถึงท่อน้ำ (xylem) เมื่อ hyphae สามารถแทรกผ่านเข้าสู่ xylem ได้แล้วจะปลดปล่อยสาร HT toxin (*Helminthosporium turcicum*) ออกมา (Li et al., 2016; Zhang et al., 2012) HT toxin เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลต่ำ ละลายในน้ำ ยับยั้งการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ ดังนั้น จึงเป็นสารที่เป็นพิษต่อพืช (phytotoxin) (Bashan and Levy,

1992; Zhang et al., 2007) HT toxin เป็นปัจจัยสำคัญที่เชื้อสาเหตุทำให้พืชแสดงอาการของโรค (pathogenicity) นอกจากนี้ ยังพบว่าระดับความรุนแรงของเชื้อขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของ HT toxin ด้วย (Bashan and Levy, 1992)

ลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่

ลักษณะความต้านทานโรค (resistance) หมายถึง ความสามารถของพืชที่จะคงสภาพจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคให้อยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหาย โดยเชื้อโรคจะไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้ หรือเมื่อเข้าทำลายแล้วทำให้พืชเป็นโรคน้อย หรือเป็นโรคไม่รุนแรง ในทางกลับกัน ลักษณะอ่อนแอต่อโรค (susceptible) หมายถึง การที่พืชแสดงอาการของโรคอย่างรุนแรง เมื่อถูกเชื้อโรคเข้าทำลาย ทั้งนี้ลักษณะความต้านทานโรคของพืชสามารถแบ่งได้หลายแบบตามที่ กฤษฎา (2546) ได้รายงานไว้ดังนี้

1. การแบ่งโดยอาศัยรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรม ซึ่งแบ่งย่อยเป็น 3 แบบ ได้แก่ ลักษณะความต้านทานโรคที่ถูกควบคุมด้วยยีนเพียงหนึ่งตัว (monogenic resistance) ลักษณะความต้านทานโรคที่ควบคุมด้วยยีน 2-3 ตัว (oligogenic resistance) เมื่อยีนหนึ่งตัวหรือมากกว่าแสดงผลของลักษณะความต้านทานโรค เรียกว่ายีนนั้นว่าเป็นยีนหลัก (major gene) และลักษณะความต้านทานโรค ที่ถูกควบคุมด้วยยีนหลายตัว (polygenic resistance) เมื่อลักษณะความต้านทานโรคเป็นผลของยีนหลายตัว ยีนแต่ละตัวจะมีผลต่อการแสดงออกเพียงเล็กน้อย เรียกยีนนั้นว่ายีนรอง (minor gene)

2. การแบ่งลักษณะความต้านทานโรคแบ่งได้ 2 แบบ ได้แก่ ลักษณะความต้านทานจำเพาะต่อเชื้อใดเชื้อหนึ่งซึ่งก่อให้เกิดโรค (vertical resistance) หรืออาจเรียกอีกอย่างว่า race specific resistance และลักษณะความต้านทานแบบไม่จำเพาะ (horizontal resistance) หรืออาจเรียกอีกอย่างว่า non-specific resistance, general resistance, field resistance, partial resistance และ minor gene resistance หรือ tolerance พืชที่มีความต้านทานแบบนี้มักจะไม่สมบูรณ์เท่าแบบจำเพาะ โดยจะมีอาการของโรคปรากฏอยู่บ้างเล็กน้อย (สุทัศน์, 2552)

3. การแบ่งความต้านทานโรคโดยอาศัยกลไก (mechanism) ความต้านทานโรคของพืช ซึ่งแบ่งย่อยเป็น 2 แบบ ได้แก่ ความต้านทานโรคที่เกิดหลังจากเชื้อโรคเข้าสู่พืชแล้ว (active resistance) และความต้านทานที่พืชมีอยู่แล้วก่อนที่เชื้อโรคจะเข้าทำลายพืช (passive resistance)

4. การแบ่งความต้านทานโรคโดยอาศัยการแสดงออกในระยะต่างๆ ของการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งแบ่งย่อยออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ ลักษณะความต้านทานที่แสดงออกในระยะต้นกล้า (seedling

resistance) ทั้งนี้เมื่อพืชเจริญเติบโตเต็มที่ก็อาจจะแสดงลักษณะอ่อนแอต่อโรคได้ และลักษณะความต้านทานที่เกิดขึ้นเมื่อพืชเจริญเติบโตเต็มที่เท่านั้น (adult plant resistance)

5. การแบ่งความต้านทานโรคโดยอาศัยการกระจายตัวของลักษณะประชากรในพืช ซึ่งแบ่งย่อยเป็น 2 แบบ ได้แก่ ลักษณะความต้านทานที่มีการกระจายตัวของลักษณะความต้านทานและอ่อนแอต่อโรคในประชากรแบบไม่ต่อเนื่อง (qualitative resistance) ซึ่งง่ายต่อการแบ่งแยกลักษณะความต้านทานหรืออ่อนแอต่อโรค และลักษณะความต้านทานที่มีการกระจายตัวของลักษณะอย่างต่อเนื่อง (quantitative resistance) ซึ่งประชากรจะมีความต้านทานต่อโรคหลายระดับตั้งแต่ต้านทานมากจนถึงอ่อนแอต่อโรค

การประเมินความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่

เชาวนาถ และคณะ (2554) ได้ทำการประเมินความต้านทานของพันธุ์ข้าวโพดหวานจำนวน 26 พันธุ์ / สายพันธุ์ ต่อเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่ ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท ในฤดูแล้งปี 2554 วางแผนการทดลองแบบ RCBD จำนวน 3 ซ้ำ ทำการปลูกเชื้อโดยการหยอดในแนวรอบนอกแล้วปล่อยให้เกิดโรคตามธรรมชาติ ผลการทดลองพบว่า เปอร์เซ็นต์ต้นเป็นโรคของข้าวโพดหวานที่อายุ 28 วันหลังปลูก อยู่ระหว่าง 83.3-99.1 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พันธุ์ ATS 5 และ Hibrix 3 เป็นโรค 89.4 และ 100 เปอร์เซ็นต์ และที่อายุ 55 วันหลังปลูกทุกพันธุ์/สายพันธุ์เป็นโรค 100 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ CNSH 1011475 และ CNSH 1013975 เป็นโรค 99.4 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่า ข้าวโพดหวานที่อายุ 28 วันหลังปลูก ต้านทานปานกลางต่อโรค (Moderately Resistant ; MR) แสดงอาการเป็นโรคระหว่าง 19.4-25.0 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ ยกเว้นสายพันธุ์ CNSH 1011575 และ CNSH 10110075 ที่ต้านทานปานกลางต่อโรค (Moderately Resistant) แสดงอาการเป็นโรค 25.5 และ 26.7 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ ในขณะที่พันธุ์ ATS 5 และ Hibrix 3 ต้านทานปานกลางต่อโรคแสดงอาการเป็นโรค 20.6 และ 23.6 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบ การประเมินความต้านทานสายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่อายุ 55 วันหลังปลูก พบว่าทุกสายพันธุ์อ่อนแอปานกลางต่อโรค (Moderately Susceptible ; MS) แสดงอาการเป็นโรค 33.9 และ 40.0 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ใบตามลำดับ

นอกจากนี้ จำเริญ และคณะ (2554) ได้ทำการทดสอบความรุนแรงของเชื้อสาเหตุ *Exserohilum turcicum* จากเชื้อ CMU1:H, CMU2:KL, KB และ MJU ในปี 2554 ฤดูแล้ง โดยการปลูกเชื้อสาเหตุในสายพันธุ์ข้าวโพดหวาน 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ HA 4135 (R) และ NT58W S5 (S) ด้วยการเจาะใบข้าวโพดหวานที่อายุ 14 วันหลังปลูก โดยใช้สารแขวนลอยสปอร์ ความเข้มข้น 10^5 คอนนิตี/มล. ในเวลา 17.00-18.00 คลุมพลาสติกรักษาความชื้นไว้ที่ 90-100 เปอร์เซ็นต์ และประเมินการเกิดโรคใบไหม้แผลใหญ่เมื่อ 28 และ 56 วันหลังปลูก พบความสัมพันธ์ ของการเกิดโรคที่ระยะ 28 กับ 56 วันหลังปลูกอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยมีค่า $r = 0.9330$, $R^2 = 0.87$ ส่วนการประเมิน

โรคใบไหม้แผลใหญ่เมื่อ 28 และ 56 วันหลังปลูก เชื้อสาเหตุจาก 4 แหล่ง CMU1:H, CMU2:KL, KB และ MJU ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยเชื้อจากแหล่ง MJU ก่อให้เกิดโรคกับสายพันธุ์ NT58W S5 สูงสุดและเชื้อจากแหล่ง CMU1:H, CMU2:KL, KB และ MJU ไม่ก่อให้เกิดโรคกับสายพันธุ์ต้านทาน HA4135 ทุกระยะการประเมินโรค

ยีนควบคุมความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่

ในข้าวโพดที่มียีน *Ht* พบยีนแสดงออกโดยไปยับยั้งการทำงานของ HT toxin ทำให้ในสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อ NCLB ไม่เกิดแผล หรือเกิดแผลเพียงเล็กน้อย และยับยั้งการงอกของ conidia ของเชื้อ *Exserohilum turcicum* (Bilha et al., 1996) โรคใบไหม้แผลใหญ่มักเริ่มเกิดเมื่อข้าวโพดอายุประมาณ 45 วัน หรือก่อนข้าวโพดออกดอก อาการเริ่มแรกพบแผลขนาดเล็ก สีคล้ำยฟางข้าวบนใบข้าวโพด ต่อมาแผลจะขยายมีขนาดใหญ่ยาวตามใบข้าวโพดเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะพบอาการแผลบนใบข้าวโพดหลายแผลต่อใบ และเมื่อแผลขยายรวมกันมาก ๆ จะทำให้ใบข้าวโพดแห้งตาย สามารถพบอาการของแผลได้บนกาบฝัก การสูญเสียผลผลิตเนื่องจากการเข้าทำลายของ NCLB ขึ้นอยู่กับ 1) ระยะเจริญเติบโตของข้าวโพดขณะที่เชื้อเข้าทำลาย 2) ความรุนแรงของเชื้อซึ่งขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อ 3) ปริมาณเชื้อที่ตกลงบนใบพืช 4) ระดับความต้านทานต่อเชื้อของข้าวโพด 5) ระดับความรุนแรงของเชื้อ (Galiano and Miedaner, 2017) โดยทั่วไปผลผลิตจะลดลงสูงสุดเมื่อถูกเชื้อเข้าทำลายที่ระยะก่อนไหมโผล่ (Ding et al., 2015) มีการค้นพบยีนควบคุมความต้านทานต่อ NCLB คือ *Ht* gene ในข้าวโพดซึ่งพบได้ทั้งในข้าวโพดเขตร้อนและเขตหนาว ได้แก่ ยีน *Ht1*, *Ht2*, *Ht3* และ *HtN* (*Ht* มาจาก *Helminthosporium turcicum*) (Gevers, 1975; Hooker, 1963; Hooker, 1977) ลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของการต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด พบว่า ยีนต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดเป็นยีนหลัก (major gene) ได้แก่ *Ht1*, *Ht2*, *Ht3*, *ht4*, *Htn1* และ *Htm1* (Pataky and Ledencan, 2006; Simcox and Bennetzen, 1993) และมีลักษณะความต้านทานที่มีการกระจายตัวของลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อโรคในประชากรแบบไม่ต่อเนื่อง (qualitative resistance) ซึ่งง่ายต่อการแบ่งแยกลักษณะความต้านทานหรืออ่อนแอต่อโรค (Pataky, 1994)

โรคใบไหม้แผลใหญ่จะส่งผลให้ข้าวโพดหวานที่อ่อนแอต่อโรคมีผลผลิตลดลง โดยจะพบอาการมีแผลที่ใบ ในสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อโรคแบบไม่เฉพาะเจาะจง (partial resistance) ทั้งที่มีหรือไม่มียีน *Ht* จะมีผลค่อนข้างน้อยต่อผลผลิต และจะต้านทานโรคใบไหม้ได้ดี ส่วนสายพันธุ์อ่อนแอต่อทั้ง race 0 และ 1 ของเชื้อ *Exserohilum turcicum* ทำให้ผลผลิตลดลงร้อยละ 50 (Pataky, 1994) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดหวานทั้งที่มีและไม่มียีน *Ht1* จำนวน 84 สายพันธุ์ โดยการใช้เชื้อ race 0 และ 1 ของ *E. turcicum* ผสมกันใน

การปลูกถ่ายเชื้อสำหรับการทดสอบ พบว่ามีเข้าทำลายของโรคก่อนข้างรุนแรง (จากการทดลอง race 0:1, 50%:50%) โดยสายพันธุ์ที่มีหรือไม่มียีน *Ht1* ไม่พบความแตกต่างกัน เมื่อมีความต้านทานอยู่ในระดับเดียวกัน ส่วนสายพันธุ์ที่มียีน *Ht1* จะมีความต้านทานต่อโรคดีกว่า ซึ่งเข้าทำลายไม่รุนแรง โดยมีความเสียหายร้อยละ 25 (Pataky and Ledencan, 2006)

เครื่องหมายพันธุกรรม (Genetic marker)

ลักษณะที่แสดงความแตกต่างที่ง่ายต่อการบ่งชี้ ง่ายต่อการติดตามการแสดงลักษณะที่กระจายตัวในรุ่นถัดไป แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรหรือภายในประชากร สามารถเรียกลักษณะนั้นๆ ได้ว่าเป็น เครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) ลักษณะนั้นๆ สามารถสังเกตด้วยตาเปล่า หรืออาจเป็นลักษณะทางชีวเคมี ซึ่งรวมไปถึงโปรตีนด้วย ดังนั้น genetic marker locus หมายถึงตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจงที่อยู่บนจีโนมของสิ่งมีชีวิต ที่สามารถบ่งชี้ได้ถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของแต่ละสิ่งมีชีวิตนั้นๆ genetic marker ที่ใช้บ่งชี้ความแตกต่างนี้สามารถแบ่งได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) เครื่องหมายโปรตีน (protein marker) และ เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ซึ่งสองกลุ่มหลังสามารถเรียกรวมกันได้เป็น เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker)

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมชนิดแรกที่ใช้ศึกษาทางพันธุศาสตร์ เพื่อบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต ตัวอย่างเครื่องหมายทางสัณฐาน เช่น รูปร่างและสีของดอก รูปร่างและสีของเมล็ด เป็นต้น ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยาหรือสรีรวิทยา ลักษณะที่ตรวจสอบนี้มักจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ทำให้การตรวจสอบมีข้อจำกัด และทำให้ตรวจสอบผลผิดพลาด ในบางครั้งต้องการความเชี่ยวชาญพิเศษของผู้ตรวจและระยะเวลาที่เหมาะสมเฉพาะเจาะจงในการตรวจสอบ อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยายังมีความจำเป็นที่ต้องทำการตรวจสอบเป็นอันดับแรก แล้วจึงใช้วิธีอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์

2. เครื่องหมายโปรตีน (protein marker) เป็นการตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลโปรตีนซึ่งรวมถึงเอนไซม์ หรือ ไอโซไซม์ด้วย โดยใช้วิธีแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วจึงย้อมดูแถบของโปรตีนจำเพาะโดยใช้สารที่เหมาะสม ข้อดีของการตรวจสอบโปรตีน คือ สามารถตรวจสอบได้หลายตำแหน่ง ค่าใช้จ่ายไม่สูงมาก และแถบของโปรตีนหรือไอโซไซม์นี้ยังมีการข่มร่วมกันแบบ co-dominance ทำให้ช่วยแยกความแตกต่างระหว่างแถบโปรตีนแบบ homozygous และ heterozygous ได้ แต่การตรวจสอบโปรตีนหรือไอโซไซม์มีข้อจำกัดของการตรวจสอบ คือ จำนวนยีนที่ตรวจสอบได้ยังมีไม่มากนัก ไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม และต้องมีการแสดงออกของยีนที่ศึกษาจึงต้องเลือกเนื้อเยื่อ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการ

วิเคราะห์ ผลที่ได้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ ระยะของการเจริญเติบโตและสิ่งแวดล้อมด้วยการตรวจสอบความแตกต่างของโปรตีนจะพบความแตกต่างเฉพาะการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ที่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ในอิเล็กโทรโฟรีซิสเท่านั้น ซึ่งในบางครั้งแถบโปรตีนที่ตรวจพบ อาจเกิดจากไอโซไซม์สองชนิดก็ได้ นอกจากนี้โปรตีนและไอโซไซม์ยังสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย ทำให้ต้องวิเคราะห์ผลในเวลาจำกัด

3. เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ตำแหน่งหนึ่งๆ บนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอใน organelles (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวนของ nucleotide ในโมเลกุลของดีเอ็นเอหรือเกิดความแตกต่างของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA polymorphism) ซึ่งสามารถตรวจสอบ DNA polymorphism ได้โดยการหาลำดับเบสของโมเลกุลดีเอ็นเอ (DNA sequencing) หรือการตรวจสอบโดยใช้ DNA marker การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิต มีที่มาจาก การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอซึ่งปัจจุบันนี้ยังคงใช้กันอยู่

ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายโมเลกุล สามารถแบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ๆ ได้ 2 ประเภท คือ

1. Hybridization-based marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ซึ่งพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเข้าคู่ของลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ โดยใช้เทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) ตัวอย่างได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (RFLP marker) (Tanksley et al., 1989; McCouch and Tanksley 1991)

2. PCR-based marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวดีเอ็นเอ หรือ เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction ; PCR) ตัวอย่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่

- Randomly amplified polymorphism DNAs (RAPDs)
- Amplified fragment length polymorphism (AFLP)
- Sequence-characterized amplified regions (SCAR)
- Sequence-tagged site (STS)
- Simple sequence repeat (SSR)
- Cleaved amplified polymorphic sequences (CAPSs)

- Inter-SSR (ISSR) markers
- Single-nucleotide polymorphism (SNP)

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้รับความนิยมในงานค้นหา ยีน เช่น RAPDs, RFLP, AFLP, SSR และ SNP เป็นต้น

เครื่องหมายโมเลกุลในอุดมคติ ที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตควรมีคุณสมบัติที่สามารถบ่งชี้ความแตกต่างได้แม้เพียงมีความแตกต่างของลำดับเบสในโมเลกุลดีเอ็นเอเพียงหนึ่งตำแหน่ง และความแตกต่างของลำดับเบสนี้ต้องกระจายอยู่ทั่วทั้งหมัดของจีโนม การแสดงออกต้องเป็นแบบ co-dominance และมีหลาย alleles เพื่อสามารถบ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสิ่งมีชีวิตตัวเดียวหรือระหว่างสายพันธุ์ได้อย่างละเอียด การตรวจสอบตำแหน่งของ marker allele เช่น การทำ genotyping ต้องไม่ซับซ้อน ง่าย รวดเร็ว ราคาไม่แพง สามารถตรวจสอบได้จำนวนมาก และสามารถตรวจสอบได้ด้วยระบบอัตโนมัติและมีประสิทธิภาพในปริมาณสูง และยิ่งไปกว่านั้นต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเอในการตรวจสอบพันธุกรรมน้อย ความผิดพลาดในการตรวจสอบต้องเกือบศูนย์หรือไม่มีเลย และสุดท้ายการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอไม่ควรต้องใช้ข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิต ในปัจจุบันถึงแม้จะมีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลขึ้นมาได้มากกว่า 20 ชนิด แต่ก็ยังไม่มีเครื่องหมายโมเลกุลชนิดใดที่มีคุณลักษณะตรงตามความต้องการคุณสมบัติของเครื่องหมายโมเลกุลในอุดมคติ แต่อย่างไรก็ตาม สนิปส์ เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ เครื่องหมายโมเลกุลอุดมคติมากที่สุด

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (Marker-Assisted Selection; MAS)

ความก้าวหน้าด้านเทคโนโลยีชีวภาพโดยเฉพาะด้านเครื่องหมายดีเอ็นเอทำให้มีการปฏิวัติแนวทางการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้หลายรูปแบบเรียกวิธีการเหล่านี้ว่า marker assisted selection (MAS) ซึ่ง MAS เป็นการนำเครื่องหมายโมเลกุลที่ทราบแล้วว่ามีตำแหน่งอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการ มาเพื่อช่วยในการคัดเลือกพันธุ์พืชหรือพันธุ์สัตว์ ที่คาดว่าจะมีลักษณะนั้นๆ โดยไม่จำเป็นต้องดูลักษณะปรากฏ (phenotype) ของพืชหรือของสัตว์ที่ต้องการ ไม่ต้องทราบว่ายีนที่ควบคุมลักษณะนั้นมีการทำงานหรือให้ผลผลิตอะไร ไม่ต้องทราบลำดับเบสของยีน หรือตำแหน่งที่แน่นอนบนโครโมโซม เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้สำหรับ MAS ต้องอยู่ใกล้กับยีนที่สนใจ ยิ่งอยู่ใกล้มากเท่าใดประสิทธิภาพในการใช้เพื่อช่วยคัดเลือกลักษณะดังกล่าวก็ยิ่งสูง และมีความแม่นยำมากขึ้น เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ เป็นได้ทั้งชนิดที่มีการข่มร่วมกัน (co-dominance) หรือข่มสมบูรณ์ (dominance) เครื่องหมายที่ตรวจสอบครั้งละ 1 ตำแหน่ง (single-locus) หรือหลายตำแหน่ง (multi-locus)

การรายงานของ Wang et al. (2012) พบว่า ยีน *HtNB* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับโรค NCLB ซึ่งมีลักษณะการแสดงออกเป็น QTLs โดยพบว่า ยีน *HtNB* ทำให้ข้าวโพดต้านทานต่อเชื้อ *Exserohilum turcicum* ไม่ทำให้เกิดแผล เพื่อที่จะทำแผนที่ยีนจึงได้ทำการสร้างประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่าง P111 (สายพันธุ์ต้านทาน) HuangZao4 (สายพันธุ์อ่อนแอ) และผสมข้ามระหว่าง P111 กับ B73 (สายพันธุ์อ่อนแอ) สายพันธุ์ต้านทาน P111 เป็นสายพันธุ์ที่เป็นพื้นเมืองจากประเทศอินโดนีเซีย ประชากร F_1 ปลูกในช่วงฤดูใบไม้ผลิ ของปี 2006 แล้วทำการผสมตัวเองเพื่อสร้างประชากร F_2 ในปี 2007 ในฟาร์มของ Huazhong Agriculture University จากการทดสอบ พบว่า *HtNB* อยู่บนโครโมโซม 8 (bin 8.07) ตรวจพบโดยเครื่องหมายโมเลกุล MAC216826-4 และ umc2218 ที่ระยะ 3.3 และ 3.4 cM ตามลำดับ ซึ่งจากงานนี้ *HtNB* เป็นยีนใหม่ที่ค้นพบว่าควบคุมลักษณะความต้านทานต่อ NCLB คาดว่า ยีนจะอยู่ระหว่าง umc1384 และ umc2218 *HtNB* ยังถูกตรวจพบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR เดิมในประชากร F_2

Technow et al. (2013) รายงานว่าการหาจีโนมของข้าวโพด สามารถช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามการพัฒนาารูปแบบการทำนายจีโนมที่ถูกต้อง จึงต้องการใช้จีโนมไทป์และพีโนมไทป์จำนวนมาก การสร้างข้าวโพดลูกผสมที่ดีต้องเกิดจากความแตกต่างของ heterotic groups ซึ่งจะทำให้มี heterosis สูง ใช้จำนวนประชากรที่ใช้ทดสอบที่มีขนาดเพียงพอภายในกลุ่ม ดังนั้นขนาดการใช้ชุดประชากรทดสอบใน heterotic groups จะมีความเป็นไปได้ที่ทำให้การทำนายมีความถูกต้อง การนำ genomic BLUP model มาใช้ในการทำนายค่าทางพันธุกรรม ซึ่งมีความแม่นยำสูง โดยกระบวนการนี้ จะนำไปสู่ความแม่นยำในการทำนายอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองนี้สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดให้ต้านทานโรค

กัญญณ์ชและคณะ (2556) ทำการพัฒนาเทคนิคใหม่ในการปลูกถ่ายเชื้อและการประเมินความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด ทดสอบ 2 สภาพการทดลอง คือ สภาพโรงเรือน และสภาพแปลงทดลอง โดยการปลูกถ่ายเชื้อไอโซเลทจากภาคเหนือ ACIL1 ที่ความเข้มข้น 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ลงบนต้นข้าวโพด และใช้ประชากรลูกผสม Ki48/Ki47 ช่วงที่ 2 ทั้งหมด 160 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับพันธุ์มาตรฐานการค้า 2 พันธุ์ (ไฮบริด 3 และ อินทรี 2) ได้ค่าความสัมพันธ์ของทั้งสองสภาพ เท่ากับ 0.658 นั่นคือการประเมินความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพด ทั้งในสภาพโรงเรือนและสภาพแปลงทดลอง เป็นไปในทิศทางเดียวกันประชากรลูกผสม Ki48/Ki47 ช่วงที่ 2 ทั้งหมด 160 สายพันธุ์ ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาตำแหน่ง Quantitative Trait Locus (QTL) เพื่อหาความสัมพันธ์ลักษณะทางพันธุกรรมและความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่โดยใช้ Simple Sequence Repeats (SSR) Marker จำนวน 10 คู่ บน 10 โครโมโซมของข้าวโพด พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ (parental polymorphism) ทั้ง 10 โครโมโซม แต่พบมากที่สุดบนโครโมโซม 5 และ 8 และเมื่อวิเคราะห์ Single QTL analysis ที่โครโมโซม 5 พบ

เครื่องหมายโมเลกุล UMC1365 และบนโครโมโซม 8 พบเครื่องหมายโมเลกุล UMC1095, UMC1268 และ UMC2356 สามารถจำแนกตำแหน่งยืนต้นทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในประชากรนี้ได้ได้อย่างชัดเจน

Puttarach et al., (2016) ศึกษาการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกลักษณะต้านทานต่อ NCLB โดยทำการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่ต้านทานและอ่อนแอต่อ *Exserohilum turcicum* โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ในการตรวจสอบ polymorphism ที่เชื่อมโยงกับยีน *Ht1* ที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อ NCLB และใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความแตกต่างนี้ เพื่อคัดเลือกประชากรรุ่นลูก F_2 โดยใช้พันธุ์อ่อนแอ 1 สายพันธุ์ (NT58WS6#4) และ สายพันธุ์ต้านทาน 3 สายพันธุ์ (ChallengerS6-1, Sugar73S7-18 และ hA4135) เพื่อตรวจสอบ polymorphism สร้างลูกผสมและผสมตัวเองเพื่อสร้างประชากร F_2 โดยพบว่า มี 3 โพรเมอร์ที่แสดง polymorphism ระหว่างสายพันธุ์ต้านทานและสายพันธุ์แท้ ได้แก่ umc1042, bnlg1721 และ umc1149 ตามลำดับ ในประชากร F_2 จำนวน 157 ต้น ถูกใช้เพื่อประเมินความเชื่อมโยงระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลและลักษณะความต้านทานต่อ NCLB พบว่า 2 โพรเมอร์ SSR คือ umc1042 และ bnlg1721 ที่ 6.7 cM บนโครโมโซมที่ 2 ที่แสดงความเชื่อมโยงกับยีน *Ht1* ที่ควบคุมลักษณะต้านทาน NCLB ทั้งสองโพรเมอร์นี้อาจใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์แท้ที่ต้านทานต่อ NCLB ในประชากรข้าวโพดหวานนี้ได้

Single-nucleotide polymorphism (SNP หรือ สนิปส์)

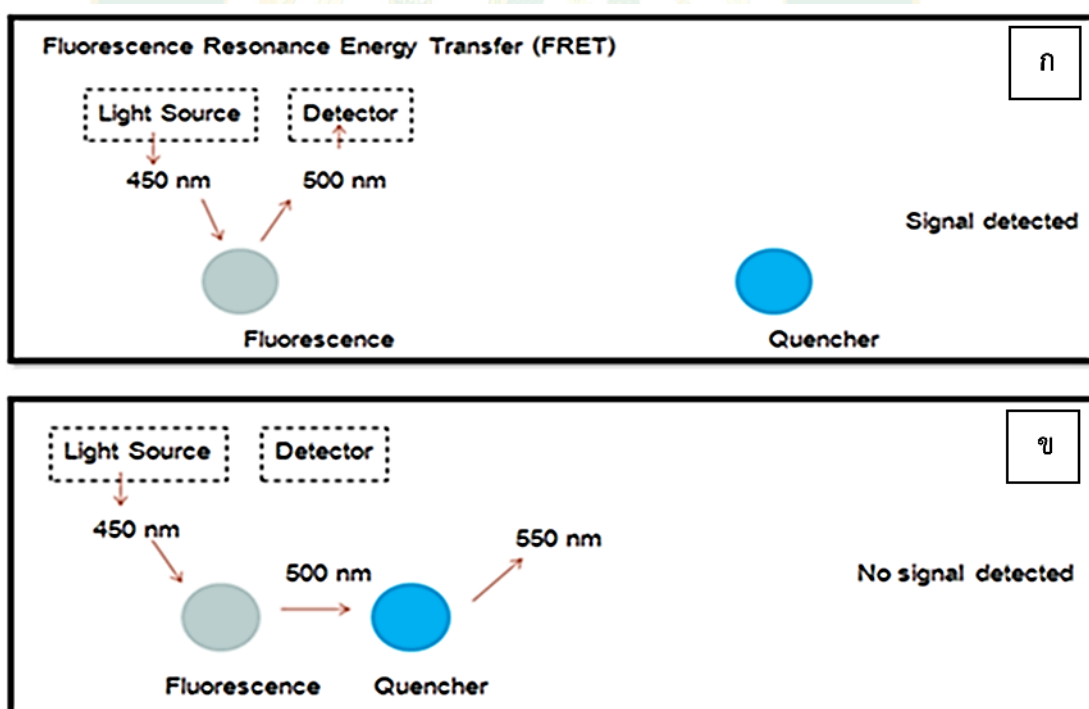
เครื่องหมายโมเลกุลที่เกิดจากความแตกต่างของลำดับเบส 1 เบส บนสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกัน สนิปส์ อาจเกิดจากเปลี่ยนตำแหน่งของเบสจาก C เป็น T หรือ G เป็น A หรือการเปลี่ยนแปลงเบสบนสายดีเอ็นเอ ระหว่างเบส C/G, A/T, C/A หรือ T/G ซึ่งเบสที่มีการเปลี่ยนแปลงขนาดเล็กๆนี้ สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นต่อไปได้ ซึ่งความสามารถในการถ่ายทอดนี้ทำให้สามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ และพบว่าตำแหน่ง สนิปส์ มีความถี่สูงมากในจีโนม ในข้าวโพดพบว่า จะพบ polymorphism เฉลี่ยในทุกๆ 31 bp ในส่วนที่ไม่ใช่ยีน และ ทุกๆ 124 bp ในส่วนที่เป็นยีน (Ching et al., 2002) และในตำแหน่ง SSR ของข้าวโพดพบ สนิปส์ ทุกๆ 40 bp ข้าวโพดมีขนาดจีโนมประมาณ 2.5×10^9 bp ดังนั้น ทั้งจีโนมของข้าวโพดอาจจะตรวจพบ สนิปส์ มากถึง 62 ล้านตำแหน่ง (Edwards and Mogg, 2001) การแสดงออกของสนิปส์เป็นแบบข่มร่วม ทำให้สามารถแยก homozygote ออกจาก heterozygote ได้ และสามารถตรวจสอบได้ด้วยระบบอัตโนมัติและมีประสิทธิภาพในปริมาณสูง ใช้ดีเอ็นเอในการตรวจสอบจำนวนเล็กน้อย แต่วิธีนี้มีข้อจำกัด คือ ต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการตรวจสอบก่อน

Inghelandt et al. (2012) ศึกษาการทำแผนที่ยีนในสายพันธุ์ข้าวโพดของยุโรป โดยใช้ข้าวโพดสายพันธุ์แท้ 1,487 สายพันธุ์ เพื่อบ่งชี้ตำแหน่งบนโครโมโซมของลักษณะที่ควบคุมเวลาในการออกดอกของข้าวโพด และลักษณะความต้านทานต่อ NCLB จากการตรวจสอบโดยเครื่องหมายโมเลกุล สนิปส์ 8,244 เครื่องหมาย พบว่า มี 7 เครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับระยะเวลาออกดอก 4 เครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับ NCLB และ 4 เครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับลักษณะความต้านทานต่อ NCLB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($P = 0.05$) เครื่องหมายโมเลกุลนี้สามารถตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variance) ที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะทั้งสามลักษณะได้ร้อยละ 0.36 ถึง 14.29% ซึ่งรูปแบบของการเชื่อมโยงของสนิปส์กับลักษณะเวลาออกดอกของข้าวโพดนี้สามารถนำไปใช้ช่วยในการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนหลายยีนได้เป็นอย่างดี

Chen et al. (2016) ทำการสร้างแผนที่ยีน QTL ที่ควบคุมลักษณะที่เกี่ยวข้องกับ NCLB โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ ทำการศึกษาในสายพันธุ์แท้จำนวน 207 สายพันธุ์ ที่ได้มาจากการผสมข้ามระหว่าง K22 และ By815 ที่ปลูกที่ Yangling ประเทศจีน ในปี 2012 และ 2013 เก็บข้อมูลระดับการเข้าทำลายของ NCLB และขนาดแผลที่ใบข้าวโพดหลังจากถูกปลูกเชื้อพบว่า มีความแตกต่างของขนาดแผลซึ่งแปรผันตามความต้านทานต่อ NCLB ทั้งสองปี การใช้แผนที่ยีนจากเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ที่มีความละเอียดสูงโดยมีระยะ genetic distance เฉลี่ยที่ 0.74 cM ทำการวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะ QTL ของระดับการเข้าทำลายของ NCLB และขนาดแผล โดยพบว่าระดับการเข้าทำลาย NCLB ถูกควบคุมด้วย QTL สี่และสามตำแหน่ง ในปี 2012 และ 2013 ตามลำดับ ซึ่งถูกค้นพบโดยเครื่องหมายโมเลกุล qNCLB5.04 บนโครโมโซม 5 (bin 5.04) และมีผลต่อลักษณะความแปรปรวน phenotype ที่ต้านทานต่อ NCLB ร้อยละ 19 และ 20 ในปี 2012 และ 2013 ตามลำดับ สำหรับลักษณะขนาดแผล พบว่า QTL 6 ตำแหน่งที่เกี่ยวข้อง หนึ่งใน QTL เหล่านี้พบว่า มีความเชื่อมโยงกับทั้งลักษณะความกว้างและความยาวของแผล และที่เหลือเชื่อมโยงกับลักษณะความกว้างของแผล จาก QTL ที่พบทั้งหมด มีเพียง qNCLB5.04 เท่านั้นที่เชื่อมโยงกับทั้งลักษณะระดับการเข้าทำลายและขนาดแผลของ NCLB ดังนั้น qNCLB5.04 สามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกลักษณะที่ต้านทานต่อ NCLB ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดได้

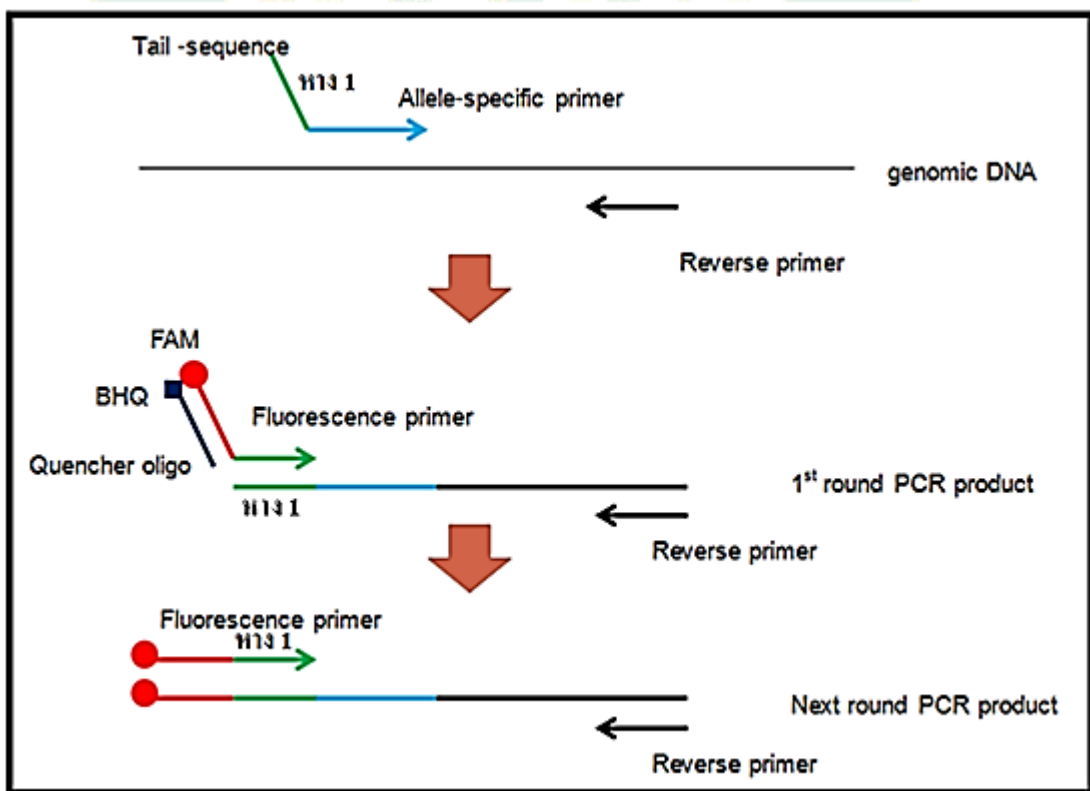
เทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลแบบสปีด

Raitio et al. (2012) จากบริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศฟินแลนด์ได้พัฒนาระบบ KASPar™ Genotyping เพื่อใช้ในการตรวจจีโนไทป์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแบบสปีด โดยใช้หลักการการถ่ายโอนพลังงาน หรือเรียกว่า FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) หลักการคือเมื่อสารเรืองแสง (fluorescence) ดูดกลืนแสงจากแหล่งกำเนิดแสงที่มีความยาวคลื่น 450 nm สาร fluorescence จะปล่อยความยาวคลื่นที่สูงขึ้นคือ 500 nm และส่งถ่ายไปยังตัวตรวจจับ (detector) ที่สามารถอ่านค่าความยาวคลื่นที่ 500 nm ได้ ทำให้สามารถตรวจวัดสัญญาณได้ ดังแสดงใน ภาพที่ 1ก ในอีกกรณี เมื่อสาร fluorescence อยู่ใกล้กับสาร quencher ที่เป็นสารเรืองแสงอีกชนิดหนึ่งที่สามารถดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นเท่ากับที่ fluorescence ส่งถ่ายออกมา จะพบว่าเมื่อสาร fluorescence ดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 450 nm จากแหล่งกำเนิดแสง และส่งถ่ายความยาวคลื่นที่ 500 nm ไปยังสาร quencher แทนที่จะส่งถ่ายให้ detector แล้วสาร quencher ปล่อยความยาวคลื่น 550 nm ออกมาในกรณีนี้ทำให้ detector ไม่สามารถตรวจวัดสัญญาณความยาวคลื่น 500 nm ได้ ดังแสดงใน ภาพที่ 1ข



ภาพที่ 1 ระบบการทำงานของ FRET

การเรืองแสงของ fluorescence จะใช้หลักการของ FRET หรือ fluorescence resonance electron transfer ซึ่งเมื่อสาร fluorescense อยู่ใกล้ quencher จะไม่เกิดการเรืองแสง แต่เมื่ออยู่ห่างออกมาจะทำให้เกิดการเรืองแสงจากหลักการของ FRET จึงนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวัดสัญญาณของ เครื่องหมายโมเลกุลแบบสนิปส์ โดยการออกแบบไพรเมอร์ให้ที่ปลาย 3' เป็นตำแหน่งสนิปส์ และที่ปลาย 5' เป็นบริเวณนิวคลีโอไทด์จำเพาะหรือที่เรียกว่า บริเวณหาง 1 ซึ่งระบบปฏิกิริยาพีซีอาร์ มีสารฟลูออเรสเซนส์ ที่เชื่อมต่อบริเวณหาง 1 และเป็นคู่สมกับสาร quencher ก่อนที่จะเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ สารฟลูออเรสเซนส์ จะติดอยู่กับ สาร quencher ทำให้ไม่สามารถตรวจวัดสัญญาณได้ แต่เมื่อเริ่มเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ไพรเมอร์จะเข้าคู่สมกับเส้นแม่พิมพ์และในรอบถัดมา บริเวณหาง 1 ที่มี สารฟลูออเรสเซนส์ จะเข้าคู่สมกับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์แล้วทำหน้าที่คล้ายไพรเมอร์ เหตุการณ์นี้ทำให้ สาร quencher หลุดห่างออกไป เครื่องจึงสามารถตรวจวัดสัญญาณได้ หากปริมาณผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ มีมากเท่าไร เครื่องจะตรวจวัดสัญญาณได้มากเท่านั้น ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การประยุกต์ใช้หลักการของ FRET ในการตรวจวัดผลิตภัณฑ์ PCR

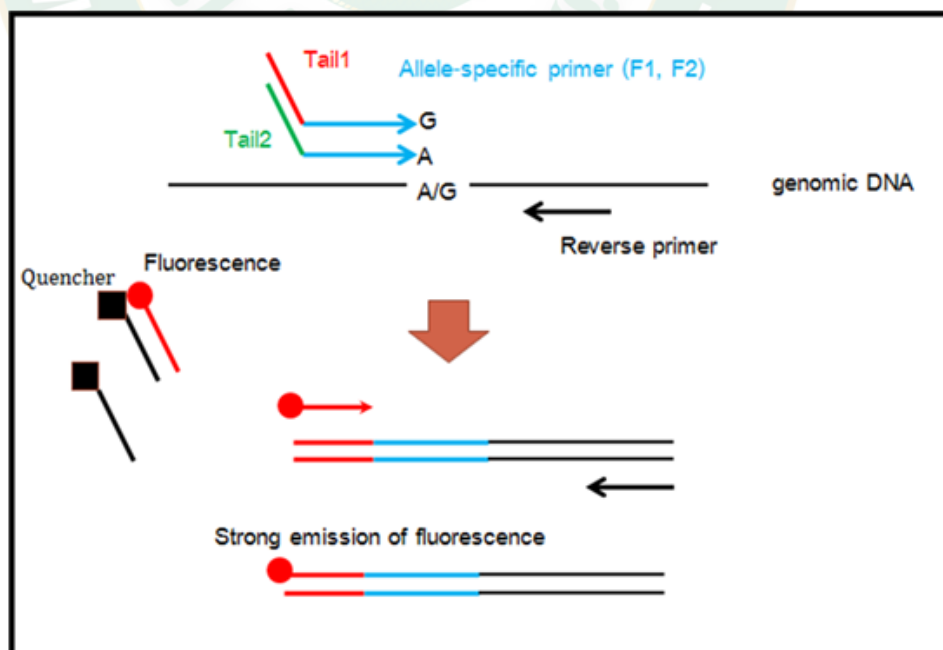
จากการประยุกต์ใช้ FRET ในการตรวจวัดผลิตภัณฑ์ PCR ของเครื่องหมาย โมเลกุลแบบสไนป์สในข้างต้น สามารถออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลแบบสไนป์สได้โดยใช้หลักการการแข่งขันของอัลลีลที่จำเพาะหรือสไนป์ส (ภาพที่ 3) โดยกำหนดให้ในหนึ่งปฏิกิริยาประกอบด้วย

1. Kompetitive Allele Specific PCR genotyping system (KASP) Assay mix ประกอบด้วย โพรเมอร์ที่จำเพาะกับเบสชนิดที่ 1 เรียกว่า forward 1 (F1) โพรเมอร์ที่จำเพาะกับเบสชนิดที่ 2 เรียกว่า forward 2 (F2) และ reverse primer (R)

2. KASP Master mix

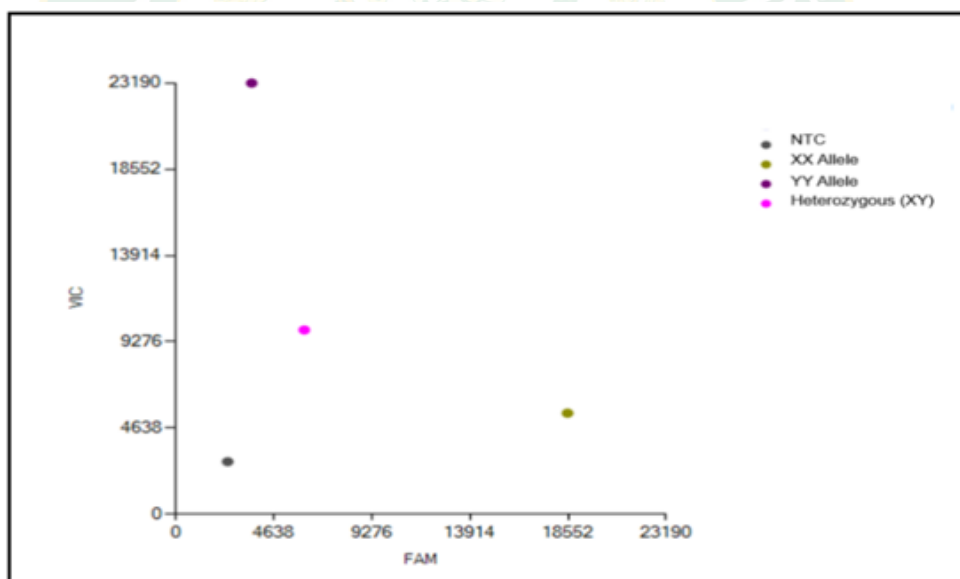
3. DNA template

โดย forward primer 2 ชนิดมีความแตกต่างกัน 2 บริเวณ คือที่บริเวณปลาย 3' ซึ่งจะจำเพาะต่อลำดับเบสหรือ SNP นั้นๆ และส่วนของปลาย 5' ที่เรียกว่า tail โดย primer แต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับบริเวณที่เกิด SNP ในส่วนของสารละลาย KASP จะมีความจำเพาะเจาะจงหรือมีเบสที่ complementary กับ tail ของ primer ทำให้เมื่อ forward primer เข้าไปจับกับ complementary base ของ DNA template oligonucleotide ของ KASP ก็จะสามารถเข้าไปจับที่ tail ได้ การอ่านผล จะอ่านออกมาจากการเรืองแสงของ fluorescence ทั้งสองชนิด ถ้ามี FAM อย่างเดียวจะอ่านเป็น homozygous A/A ถ้าอ่านออกมามี VIC อย่างเดียวจะเป็น homozygous G/G แต่ถ้าออกมาทั้งสองสี อ่านผลเป็น heterozygous A/G



ภาพที่ 3 ระบบ KASPar™ Genotyping ที่มา : Raitio (2012)

การตรวจวัดผลผลิต PCR และการแปลผล ทำได้โดยใช้เครื่องอ่านค่าการเรืองแสงของฟลูออเรสเซนต์ (เครื่อง Araya) ของผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR จากนั้นผลที่อ่านได้จากเครื่อง Araya จะถูกแปลผลและแสดงออกมาในรูปแบบกราฟจุด และอัลลีลของสไนป์สโดยโปรแกรม Araya ดังแสดงในภาพที่ 4 ซึ่งเป็นการแสดงกราฟจุด โดยแนวแกน Y แสดงปริมาณของสาร fluorescence ชนิด VIC ส่วนแกน X แสดงปริมาณของ สาร fluorescence ชนิด FAM โดยจุดแต่ละจุดแสดงถึงตัวอย่าง เช่น จุดสีม่วง ให้ค่า VIC สูง ค่า FAM ต่ำ แสดงว่าตัวอย่าง สีม่วงเป็น homozygous (YY) แล้วจึงตรวจสอบว่า สาร fluorescence ชนิด VIC คู่สมกับ อัลลีลหรือสไนป์สชนิดใด ในทางตรงกันข้าม จุดสีเขียว ให้ค่า FAM สูง ค่า VIC ต่ำ แสดงว่าตัวอย่าง สีเขียวเป็น homozygous (XX) แล้วจึงตรวจสอบว่า fluorescence ชนิด FAM คู่สมกับ อัลลีลหรือสไนป์สชนิดใด ส่วนจุดสีชมพูแสดงถึงตัวอย่างที่เป็น heterozygous เนื่องจากให้ค่าได้ทั้ง VIC และ FAM (XY) ส่วนจุดสีเทา เป็นชุดควบคุมชนิด negative เป็นตัวอย่างที่ไม่มีดีเอ็นเอเพราะฉะนั้นปฏิกิริยา PCR ต้องไม่เกิด ดังนั้นค่า VIC และ FAM จึงต่ำ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ลักษณะของกราฟจุดที่แปลผลจากสัญญาณฟลูออเรสเซนต์โดยเครื่อง Araya

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ในการทำงานวิจัยครั้งนี้ ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลอง โดยในขั้นตอนของการปลูกข้าวโพดหวานลงแปลงจัดทำขึ้น ณ แปลงทดลองฝ่ายปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์กรรมพืชและสัตว์ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และใช้ห้องปฏิบัติการห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ บริษัท อีสท์ เวสท์ ซีด จำกัด ในการเก็บข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรม ซึ่งการทดลองที่ 1 ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่ต้านทาน (R : คะแนน 1) และอ่อนแอต่อโรค (S : คะแนน 9) ด้วยการปลูกเชื้อสาเหตุโรค เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ต้านทาน และอ่อนแอต่อโรค ในฤดูปลูกฝน ปี พ.ศ. 2559 จากนั้นในการทดลองที่ 2 คือการสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 population) ในฤดูแล้ง ปี พ.ศ. 2560 โดยใช้สายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่อ่อนแอต่อโรคไปไหม้แผลใหญ่ คือสายพันธุ์ NT58WS₆#4 เป็นสายพันธุ์แม่ผสมกับสายพันธุ์ต้านทานโรคไปไหม้แผลใหญ่ คือสายพันธุ์ ChallengerS₆-1 เป็นสายพันธุ์พ่อ ในการทดลองที่ 3 ปลูกสายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่อ่อนแอ, ต้านทานโรค และลูกผสม F_1 เพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ประชากรชั่วรุ่นที่ 2 จัดทำขึ้น ในฤดูฝน ปี พ.ศ. 2560 และเพื่อเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอของใบข้าวโพดหวานทั้ง 3 สายพันธุ์ดังกล่าวไปทดสอบกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ที่พัฒนาขึ้นมาสำหรับการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ที่บอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่อ่อนแอ, ต้านทานโรค และลูกผสม F_1 และในการทดลองที่ 4 เพื่อเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์กับลักษณะความต้านทานโรคไปไหม้แผลใหญ่ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ได้ทำการปลูกประชากรชั่วที่ 2 ของข้าวโพดหวาน ในฤดูปลูกฝน พ.ศ. 2560 เพื่อเก็บข้อมูลของลักษณะความต้านทานต่อโรคไปไหม้แผลใหญ่ที่ปรากฏ (ฟีโนไทป์) และ เก็บตัวอย่างใบข้าวโพดหวานของประชากรดังกล่าวไปทดสอบกับเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จากการทดลอง 3 เพื่อเก็บข้อมูลของลักษณะทางพันธุกรรม (จีโนไทป์) และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะความต้านทานที่ปรากฏโดยใช้วิธี Single Marker Analysis (point analysis) โดยโปรแกรมสำเร็จรูป MapQTL6 โดยมีขั้นตอนการดำเนินงานและรายละเอียดการทดลองดังภาพที่ 5

ฤดูที่ 1	ฤดูปลายฝน พ.ศ. 2559	การทดลองที่ 1 การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคโดย การปลูกเชื้อ <i>Exserohilum turcicum</i>
ฤดูที่ 2	ฤดูแล้ง พ.ศ. 2560	การทดลองที่ 2 การสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 population) โดยการผสมข้าม ระหว่างสายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่อ่อนแอกับต้านทานโรค ($S \times R$)
ฤดูที่ 3	ฤดูฝน พ.ศ. 2560	การทดลองที่ 3.1 คัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสปีส์ที่บอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ ข้าวโพดหวานที่อ่อนแอ, ต้านทานโรค และลูกผสม F_1 การทดลองที่ 3.2 การสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2 population) โดยการผสม ตัวเองของต้น F_1
ฤดูที่ 4	ฤดูปลายฝน พ.ศ. 2560	การทดลองที่ 4.1 การปลูกเชื้อ <i>Exserohilum turcicum</i> ในประชากรข้าวโพดหวาน ลูกผสมชั่วที่ 2 เพื่อเป็นข้อมูลทางด้านฟีโนไทป์ การทดลองที่ 4.2 การศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสปีส์ กับลักษณะ ความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2

ภาพที่ 5 แผนภูมิการวิจัยเพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสปีส์ที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่

การทดลองที่ 1 ฤดูปลายฝน ปี พ.ศ. 2559 การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่ต้านทาน (R) และอ่อนแอ (S) ต่อโรค ด้วยการปลูกเชื้อรา *Exserohilum turcicum*

อุปกรณ์

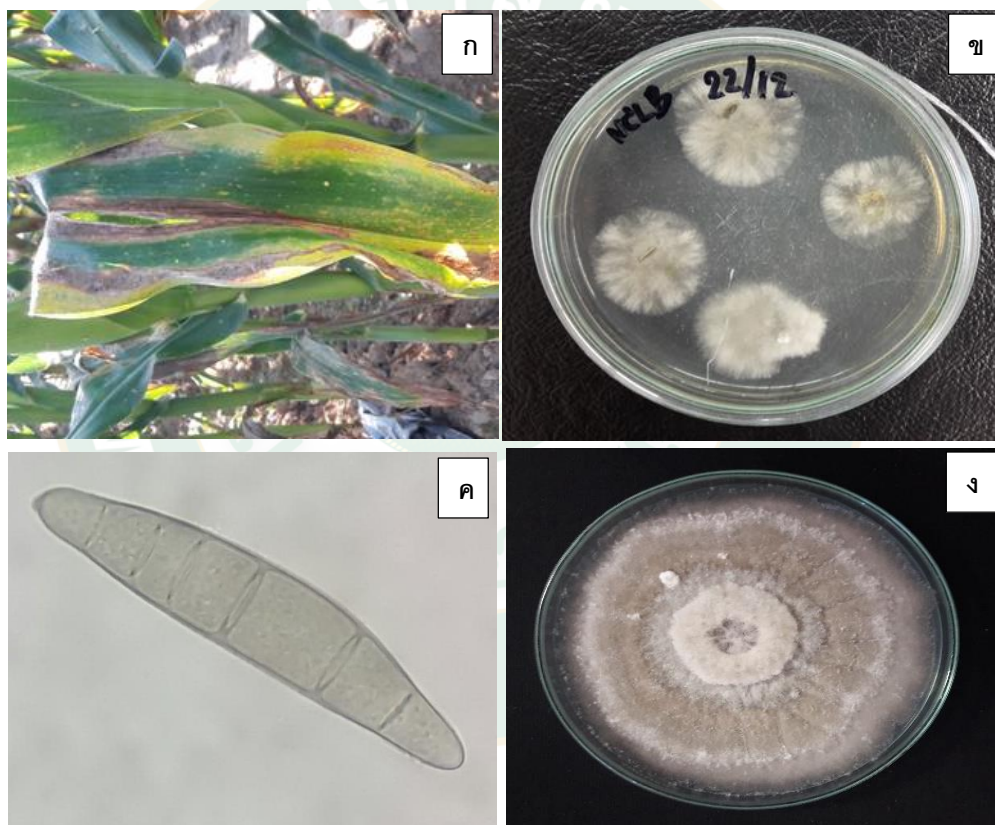
1. เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานจำนวน 8 สายพันธุ์
 - 1.1 สายพันธุ์ ChallengerS₆-1
 - 1.2 สายพันธุ์ Sugar73S₇-18
 - 1.3 สายพันธุ์ SuregoldS₅-2
 - 1.4 สายพันธุ์ NT58WS₆#4
 - 1.5 สายพันธุ์ Hibrix3S₇-6
 - 1.6 สายพันธุ์ EndeavorS₅-1
 - 1.7 สายพันธุ์ Cabaret(W)S₄-B
 - 1.8 สายพันธุ์ No.40-7
2. เชื้อสาเหตุ *Exserohilum turcicum* จากแหล่ง มหาวิทยาลัยแม่โจ้
3. วัสดุเพาะเมล็ด
4. อุปกรณ์เตรียมเชื้อ และปลูกเชื้อสาเหตุ *Exserohilum turcicum*
 - 4.1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
 - 4.2 อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ
 - 4.3 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อสูตร PDA
 - 4.4 เครื่องนับจำนวนสปอร์ (haemocytometer)
 - 4.5 คีมตอกตาไก่ พู่กันและดริบบเปอร์

วิธีการ

1. วางแผนการทดลองแบบ RCBD มี 8 สิ่งทดลอง คือ ข้าวโพดหวาน 8 สายพันธุ์ มี 3 ซ้ำ เตรียมเมล็ดสายพันธุ์ข้าวโพดหวาน นำมาเพาะในภาดหลุม แยกตามสายพันธุ์ เมื่อต้นกล้ามีอายุ 7 วัน นำต้นกล้าไปย้ายปลูกลงแปลงทดลอง โดยแต่ละสายพันธุ์จะปลูก 2 แถว จำนวน 20 ต้นต่อแถว แถว ยาว 5 เมตร ใช้ระยะปลูกระหว่างต้น 25 เซนติเมตร ระยะระหว่างแถว 75 เซนติเมตร

2. การเตรียมเชื้อและการแยกเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่ (*Exserohilum turcicum*) นำใบข้าวโพดหวานที่แสดงอาการของโรคมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี tissue transplanting method ตัดชิ้นส่วนของใบบริเวณระหว่างเนื้อเยื่อปกติกับเนื้อเยื่อที่เป็นโรคออกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 3 x 3 มิลลิเมตร แล้วล้างฆ่าเชื้อที่ผิวโดยการแช่ในสารละลายไฮโปคลอไรท์

เข้มข้น 1% (คลอโรกซ์ 10%) นาน 3 นาที แล้วจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วซับให้แห้ง ด้วยกระดาษชำระที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน เมื่อเส้นใยเจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืช ทำการตัดปลายเส้นใย แล้วนำเส้นใยที่ได้ไปจำแนกชนิดของเชื้อรา โดยการตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และทำการระบุชนิดของเชื้อราด้วยการเปรียบเทียบเชื้อราในหนังสือ Compendium of Corn Diseases (Shurtleff, 1980) จากนั้นย้ายปลายเส้นใยของเชื้อรา เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์และนำไปเลี้ยงบน PDA (Potato Dextrose Agar) เพื่อเก็บเป็น stock culture ใช้ในการศึกษาต่อไป (ภาพที่ 6)

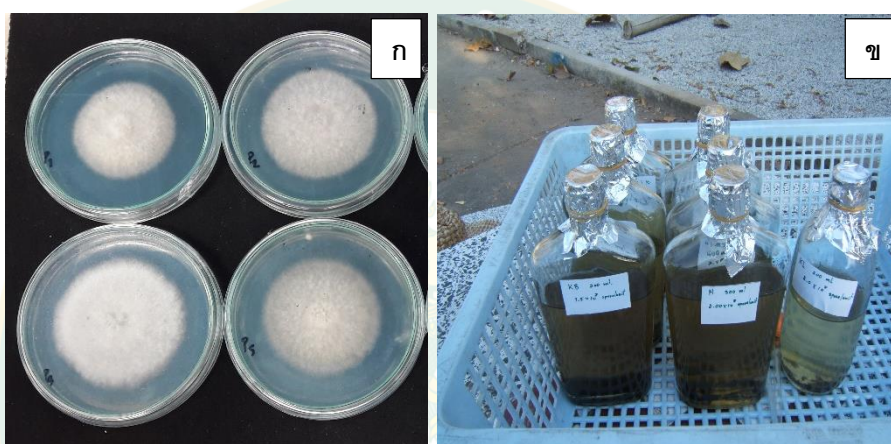


ภาพที่ 6 ลักษณะใบข้าวโพดหวานที่ถูกโรคใบไหม้แผลใหญ่เข้าทำลาย (ก), ชิ้นส่วนของใบข้าวโพดหวานที่เป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ ที่นำมาเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ข), ลักษณะของโคโลนีของเชื้อโรคใบไหม้แผลใหญ่ (ค),(ง)

3. การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อสาเหตุ *Exserohilum turcicum* จากแหล่งอำเภอสันทราย เชียงใหม่ (MJU) ความเข้มข้น 1×10^5 คอนนิตีต่อมิลลิลิตร

3.1 ทำการย้ายเชื้อราบริสุทธิ์ในตู้ถ่ายเชื้อ โดยการวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 10 วัน จนกว่าเชื้อราจะมีการสร้างสปอร์ (ภาพที่ 7 ก)

3.2 เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ ความเข้มข้น 1×10^5 คอนนิตีต่อมิลลิลิตร (Pedersen et al., 1986) โดยการนับจำนวนสปอร์ด้วย Haemocytometer (ภาพที่ 7 ข)



ภาพที่ 7 เชื้อราบริสุทธิ์หลังจากบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อ 10 วัน (ก), สารแขวนลอยที่เตรียมสำหรับปลูกเชื้อลงบนใบข้าวโพดหวาน (ข)

4. ปลูกเชื้อสาเหตุ (inoculation)

4.1 วิธีการปลูกเชื้อสาเหตุ (inoculation) โดยใช้ฟู่กันและสารแขวนลอยสปอร์มาหยดที่ร่องของคีมตอกตาไก่ แล้วจึงใช้คีมเจาะใบข้าวโพด โดยไม่ให้เนื้อเยื่อของใบขาด เจาะ 1 รูต่อใบ และทำ 2 ใบต่อต้น เมื่อข้าวโพดหวานมีอายุ หลังปลูก 14 วัน ในเวลา 17.00 น. - 18.00 น. (ภาพที่ 8)

4.2 ทำการปรับสภาพแวดล้อมให้เอื้อต่อการเกิดโรคให้มีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 90 - 100 เปอร์เซ็นต์ โดยการรดน้ำให้ชื้นทั่วบริเวณที่วางแปลงปลูกทดลอง และคลุมด้วยพลาสติกไว้ในเวลากลางคืนและเปิดออกในเวลาประมาณ 08.00 น. ทำการคลุมพลาสติกเป็นเวลา 10 วัน



ภาพที่ 8 การปลูกเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่บนใบข้าวโพดหวาน และการคลุมพลาสติก

5. ทำการประเมินอาการของโรคที่ 56 วัน หลังจากวันที่ปลูกเชื้อ โดยให้คะแนนการเกิดโรคตั้งแต่ 1-9 และคำนวณเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเกิดโรค โดยดัดแปลงวิธีการให้คะแนนจาก Galiano et al., 2017 ซึ่งมีหลักเกณฑ์ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 วิธีการให้คะแนนการเกิดโรคใบไหม้แผลใหญ่

ระดับคะแนน	อาการของโรค
1	ไม่มีการแสดงอาการของโรคเลย
2	แสดงอาการของโรค < 5% ของพื้นที่ใบรวม
3	แสดงอาการของโรค 5-10% ของพื้นที่ใบรวม
4	แสดงอาการของโรค 11-20% ของพื้นที่ใบรวม
5	แสดงอาการของโรค 21-40% ของพื้นที่ใบรวม
6	แสดงอาการของโรค 41-60% ของพื้นที่ใบรวม
7	แสดงอาการของโรค 61-80% ของพื้นที่ใบรวม
8	แสดงอาการของโรค 81-90% ของพื้นที่ใบรวม
9	แสดงอาการของโรค 91-100% ของพื้นที่ใบรวม

การทดลองที่ 2 ฤดูแล้ง ปี พ.ศ. 2560 การสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 population) โดยการผสมข้ามระหว่าง สายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่อ่อนแอต่อโรค กับสายพันธุ์ต้านทาน

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานจำนวน 2 สายพันธุ์
 - 1.1 สายพันธุ์อ่อนแอ คือ NT58WS6#4
 - 1.2 สายพันธุ์ต้านทาน คือ ChallengerS6-1
2. วัสดุเพาะเมล็ด
3. ถาดเพาะเมล็ด
4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการผสมพันธุ์ ได้แก่
 - 4.1 ถุงคลุมเกสรเพศเมียหรือฝักข้าวโพด (glassine bag)
 - 4.2 ถุงคลุมเกสรเพศผู้หรือดอกข้าวโพด (tassel bag)
 - 4.3 ถุงใส่อุปกรณ์ผสมพันธุ์ (apron)
 - 4.4 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น มีด ดินสอ 2B และเครื่องเย็บกระดาษ ฯลฯ

วิธีการ

1. การเตรียมเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานจำนวน 2 สายพันธุ์ เพื่อปลูกจำนวน 30 ต้น ต่อสายพันธุ์ นำเมล็ดข้าวโพดหวานเพาะลงในถาดเพาะเมล็ด
2. เมื่อข้าวโพดมีอายุกล้า 7 วันหลังเพาะ ย้ายปลูกลงแปลงปลูกโดยใช้ระยะปลูกระหว่างแถว 75 เซนติเมตร ระยะระหว่างต้น 25 เซนติเมตร (75 x 25 cm.)
3. การผสมพันธุ์ ใช้วิธีการผสมข้ามเมื่อข้าวโพดเจริญเติบโตถึงระยะออกดอก เลือกต้นที่มีลักษณะที่ดีและแข็งแรงไว้ ตามขั้นตอนต่อไปนี้
 - 3.1 การคลุมถุงตัวเมียหรือฝักข้าวโพด เมื่อฝักเริ่มโผล่ออกมา ให้ทำการดึงใบที่อยู่ข้อเดียวกับฝักทิ้ง เพื่อที่จะได้เห็นฝักได้ง่าย โดยใช้ถุงคลุมฝักที่ใหม่ยังไม่โผล่ออกมา
 - 3.2 การเตรียมช่อดอกเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียเพื่อผสมพันธุ์ ในช่วงตอนเย็นเมื่อฝักที่คลุมไว้มองเห็นไหมโผล่ออกมาประมาณ 3-5 เซนติเมตร และช่อดอกเกสรตัวผู้บาน ได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของช่อดอก ทำการคลุมเกสรตัวผู้ด้วยถุงคลุมเกสรเพื่อป้องกันเกสรจากต้นอื่นๆ ปลิวเข้ามาผสม แล้วปิดให้มีมิดชิดและติดลวดเสียบกระดาษป้องกันเกสรไหลออก และใช้ดินสอบันทึกรูปแบบวิธีการผสมพันธุ์พร้อมกับวันที่ผสมพันธุ์ไว้ที่ด้านซ้ายของถุงผสม
 - 3.3 การผสมจะผสมในช่วงเวลา 9.00-11.00 นาฬิกา ของวันรุ่งขึ้นโดยทำการเขย่าช่อดอกเกสรตัวผู้ที่คลุมไว้ ให้ละอองเกสรตกใส่ภายในถุงแล้วนำมาเทใส่ลงบนไหมของต้นข้าวโพดที่

เตรียมไว้ เพื่อทำการผสมข้าม แล้วใช้ถุงคลุมเกสรตัวผู้คลุมฝักทันทีที่ทำการผสมเสร็จ แล้วเย็บถุงด้วยเครื่องเย็บกระดาษติดกับต้นข้าวโพด

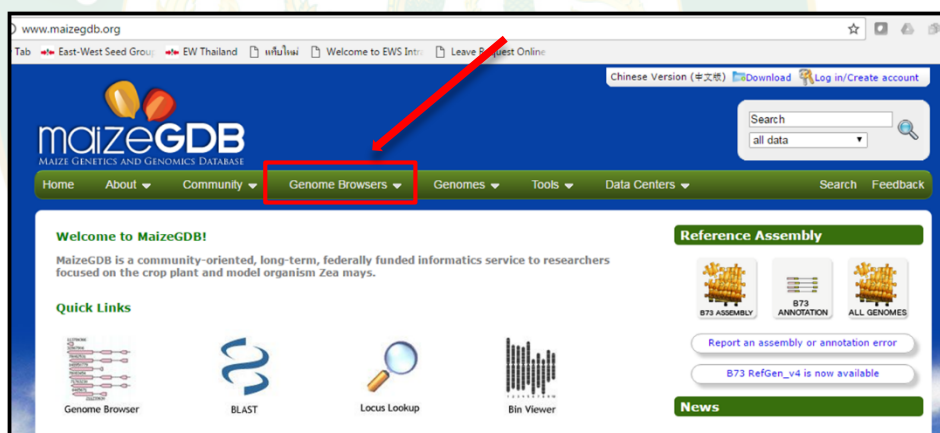
4. การเก็บเกี่ยว เมื่อฝักเริ่มแห้ง หรือประมาณ 35 วันหลังจากที่ทำการผสม จะเก็บมาทั้งถุงที่คลุมฝักนำมาตากให้แห้ง แล้วนำมาจดบันทึกประวัติพันธุ์ลงบนแต่ละซอง แล้วจึงแกะเอาเมล็ดใส่ซอง เก็บรักษาไว้ในห้องเย็นสำหรับเก็บเมล็ดพันธุ์

การทดลองที่ 3

การทดลองที่ 3.1 ห้องปฏิบัติการ ปี 2560 การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสปีส์ที่บอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่อ่อนแอ, ต้านทานโรค และลูกผสม F₁

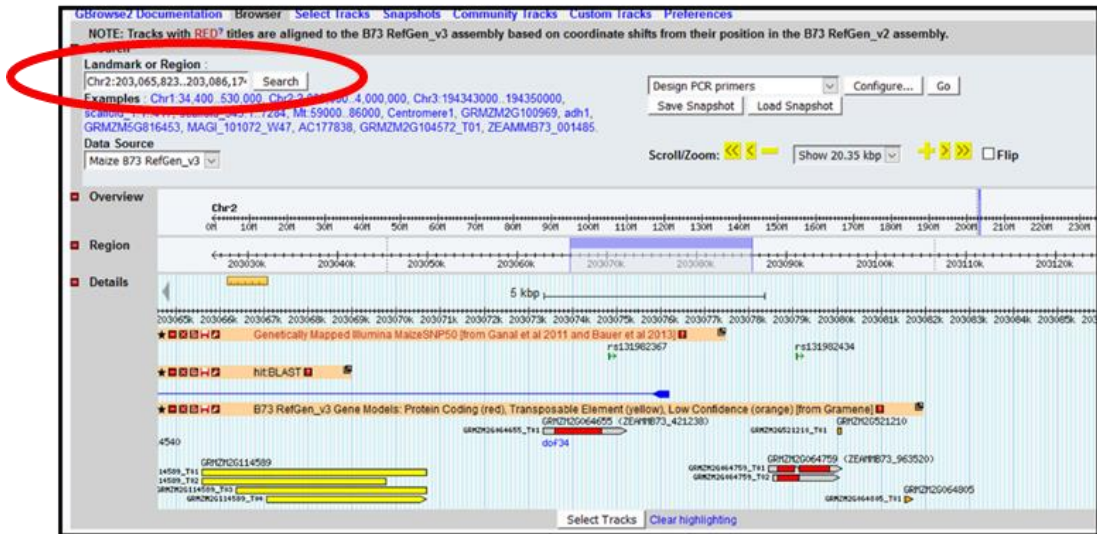
การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสปีส์

1. เข้าเว็บไซต์ <https://www.maizegdb.org/> แล้วคลิกเลือกเมนู Genome Browsers ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 แสดงหน้าต่างเว็บไซต์ในการค้นหาและคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสปีส์

2. นำตำแหน่งของยีน (Gene position) อ้างอิงจากตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR จำนวน 2 เครื่องหมาย คือ bnlg 1721 และ umc 1042 ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุล ที่อยู่ใกล้ชิดกับยีน *Ht1* ควบคุมลักษณะการต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ (Puttarach et al., 2016) ดังแสดงในตารางที่ 2 ไปค้นหาและออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสปีส์ที่สอดคล้องกับตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 แสดงการนำตำแหน่งยีนของเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ไปค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับ

3. นำเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้มาทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของสายพันธุ์ต่างทาน, สายพันธุ์อ่อนแอ และสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 เพื่อคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสลับที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ต่างทานและอ่อนแอ

ตารางที่ 2 เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์ที่สัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่จากการรายงานของ Puttarach et al. (2016)

จำนวนไพรเมอร์	ยีน	โครโมโซม	ตำแหน่งยีน
12	<i>Ht1</i>	2	206,643,048 to 207,194,203
10	<i>Ht2</i>	8	135,858,136 to 398,042,717
10	<i>HtN1</i>	8	161,901,417 to 162,533,647

ตัวอย่างพืช

ใบอ่อนของข้าวโพดหวานสายพันธุ์ละ 5 ตัวอย่าง ได้แก่ พันธุ์พ่อ (ChallengerS₆-1) หรือ พันธุ์ต้านทานต่อเชื้อรา *Exserohilum turcicum* พันธุ์แม่ (NT58WS₆#4) หรือพันธุ์อ่อนแอ และ ประชากร F₁ ที่ได้จากลูกผสมของสายพันธุ์ NT58WS₆#4 กับ ChallengerS₆-1 โดยเลือกเมล็ดพันธุ์ ลูกผสมชั่วที่ 1 จากฝักที่ติดเมล็ดสมบูรณ์ที่สุดจำนวน 1 ฝัก ซึ่งตัวอย่างใบอ่อนข้าวโพดหวานทั้งหมด เก็บและรวบรวมได้จากแปลงทดลองมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัด เชียงใหม่ในฤดูฝน พ.ศ. 2560

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องบดตัวอย่าง
2. ตู้อบ
3. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง
5. เครื่องวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอ รุ่น Nano-Drop8000 (Thermo science)
6. เครื่องดูดจ่ายสาร (Nexar) (Douglas Scientific)
7. เครื่อง Thermal Cycler (Soellex) (Douglas Scientific)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับแอเรย์เทป (Douglas Scientific)
9. เครื่องอ่านสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (Araya) (Douglas Scientific)
10. โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับวิเคราะห์ข้อมูล (East-West Seed Company Limited)
11. ไมโครปิเปตชนิดหลายช่องดูดจ่าย 8 ช่อง ขนาดต่างๆ
12. ไมโครปิเปตชนิดหลายช่องดูดจ่าย 12 ช่อง ขนาดต่างๆ
13. ไมโครปิเปตขนาดต่างๆ
14. ลูกแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร
15. ไมโครปิเปตทึบขนาดต่างๆ
16. ไมโครปิเปตทึบชนิดกรอง ขนาดต่างๆ
17. แอเรย์เทป (Array tape TM) ชนิด 384 หลุม ขนาด 2 ไมโครลิตร (Douglas Scientific)
18. พลาสติกปิดแอเรย์เทป (Cover tape) (Douglas Scientific)
19. เพลทพลาสติกชนิดก้นแหลม (V shape) 96 หลุม ยี่ห้อ NUNC
20. หลอดไมโครเซ็นติพีร์กขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Extragen)

สารเคมี

1. ไพรเมอร์สนิปส์ ชนิด forward 1 (F1) สั่งเคราะห์จากบริษัท Integrated DNA Technologies
2. ไพรเมอร์สนิปส์ ชนิด forward 2 (F2) สั่งเคราะห์จากบริษัท Integrated DNA Technologies
3. ไพรเมอร์สนิปส์ ชนิด reverse (R) สั่งเคราะห์จากบริษัท Integrated DNA Technologies
4. บัฟเฟอร์สำเร็จรูป KASPar master mix ความเข้มข้น 2 เท่า
5. บัฟเฟอร์ cetyl trimethyl ammonium bromine (CTAB) ความเข้มข้น 2 เท่า
6. บัฟเฟอร์ ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 25 : 24 : 1
7. เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์
8. ไอโซโพรพานอล
9. น้ำกลั่นบริสุทธิ์
10. บัฟเฟอร์ 1X TE

วิธีการ

การสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าวโพด

1. เก็บตัวอย่างใบอ่อนข้าวโพด 1-2 ใบ ใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. เติมลูกแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ปริมาณ 3-4 เม็ด จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ CTAB ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
3. บดตัวอย่างด้วยเครื่องบดตัวอย่างนาน 30 วินาทีแล้วบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
4. เติมสารฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25 : 24 : 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้ว นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
5. เติมสารไอโซโพรพานอลปริมาตร 400 ไมโครลิตรใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์หลอดใหม่
6. ดูดสารละลายส่วนใสส่วนบนปริมาตร 400 ไมโครลิตร ย้ายใส่หลอดที่มีสารไอโซโพรพานอล (ขั้นตอนที่ 5) กลับหลอดไปมา เพื่อผสมตัวอย่างและสารละลายให้เข้ากันดี จากนั้นนำไปแช่ที่ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

7. นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ค่อยๆ เทสารละลายทิ้ง เหลือตะกอนที่ก้นหลอดไว้ แล้วเติมสารเอทานอลความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอน

8. นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วเทสารละลายส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอนดีเอ็นเอที่ก้นหลอดไว้

9. นำหลอดที่มีตะกอนดีเอ็นเอไปตากให้แห้งแล้วละลายกลับดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

10. ตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง Nano-Drop 8000

11. ปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 15 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์

การทำ Polymerase Chain Reaction; PCR

1. การเตรียมปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์สนิปส์

ในปฏิกิริยา PCR จะใช้ไพรเมอร์ 1 ชุด ที่ประกอบด้วยไพรเมอร์ 3 เส้น ได้แก่ forward1 (F1), forward2 (F2) และ reverse (R) จากไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ผสมชุดของไพรเมอร์ ดังแสดงใน ตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การเตรียมชุดไพรเมอร์ ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร

ชนิดไพรเมอร์	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย (ไมโครโมลาร์)
forward1 (F1) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์	12	12
forward2 (F2) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์	12	12
reverse (R) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์	30	30
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	46	-
ปริมาตรรวม	100	-

2. การเตรียมปฏิกิริยา PCR

2.1. เติมบัฟเฟอร์สำเร็จรูป KASPar master mix (2X) ไว้ในเพลทพลาสติกชนิดกัน แหลม หลังจากนั้นเติมไพรเมอร์ เรียกว่า เพลท assay (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของสารใน 1 ปฏิกิริยา PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
ดีเอ็นเอ (15 นาโนกรัม / ไมโครลิตร)	0.8	7.4 นาโนกรัม / ไมโครลิตร
บัฟเฟอร์สำเร็จรูป KASPar master mix (2X)	0.8	2X
ไพรเมอร์ สนิปส์ (54 ไมโครโมลาร์)	0.02	0.67 ไมโครโมลาร์
ปริมาตรรวม	1.62	-

2.2. เตรียมดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 15 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในเพลทพลาสติก ชนิดกันแหลม เรียกว่า เพลทดีเอ็นเอ

2.3. นำเพลทดีเอ็นเอ และเพลท assay ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที นาน 20 นาที

2.4. ใส่เพลทดีเอ็นเอและเพลท assay ใส่เข้าไปในเครื่องดูดจ่ายสาร (Nexar) เพื่อ ดูดจ่ายดีเอ็นเอ และ assay จากเพลทพลาสติกไปสู่แอเรย์เทป (Array tapeTM) ชนิด 384 หลุม จากนั้นปิดแอเรย์เทป ที่มีดีเอ็นเอ และ assay ด้วยพลาสติกปิดแอเรย์เทป (cover tape)

2.5. นำแอเรย์เทป (Array tapeTM) ที่เตรียมปฏิกิริยาเสร็จแล้ว ไปปั่นเหวี่ยงด้วย เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับแอเรย์เทป ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วนำไปใส่ เครื่อง Thermal Cycler (Soellex) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เวลาและอุณหภูมิ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ขั้นตอนปฏิกิริยา PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวนรอบ
Pre-denaturing	94 องศาเซลเซียส	15 นาที	1 รอบ
Denaturing	94 องศาเซลเซียส	20 วินาที	10 รอบ
	65-67 องศาเซลเซียส	60 วินาที	
Denaturing	94 องศาเซลเซียส	20 วินาที	
Annealing และ extension	57 องศาเซลเซียส	60 วินาที	36 รอบ

รวมเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำแอเรียเทปไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ซึ่งขั้นตอนการทำปฏิกิริยาทั้งหมดจะใช้ระบบที่เรียกว่า Ultra High Throughput Technology of SNPs (Douglas Scientific) ดังแสดงในภาพที่ 11

2.6. นำผลของ PCR มาตรวจสอบด้วยเครื่องอ่านสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (Araya)

2.7. วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป



ภาพที่ 11 ขั้นตอนการเตรียมปฏิกิริยา PCR และการตรวจสอบ PCR โดยระบบ Ultra High Throughput Technology of SNPs (Douglas Scientific)

การทดลองที่ 3.2 ฤดูฝน พ.ศ. 2560 การสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2 populations) โดยการผสมตัวเองของต้น F_1

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน 1 พันธุ์ ได้แก่ ประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 population)
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการผสมพันธุ์ ได้แก่
 - 2.1 ถุงคลุมเกสรตัวเมีย (glassine bag)
 - 2.2 ถุงคลุมเกสรตัวผู้ (tassel bag)
 - 2.3 ถุงใส่อุปกรณ์ผสมพันธุ์ (apron)
 - 2.4 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น มีด ดินสอ 2B และเครื่องเย็บกระดาษ ฯลฯ

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวานลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่าง สายพันธุ์อ่อนแอ (NT58WS₆#4) กับ สายพันธุ์ต้านทาน (ChallengerS₆-1) 1 โดยเลือกเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 จากฝักที่ติดเมล็ดสมบูรณ์ที่สุดจำนวน 1 ฝัก เพื่อปลูกจำนวน 15 ต้น
2. เมื่อข้าวโพดมีอายุกล้า 7 วันหลังเพาะ ย้ายปลูกลงแปลงปลูกโดยใช้ระยะปลูกระหว่างแถว 75 เซนติเมตร ระยะระหว่างต้น 25 เซนติเมตร (75 x 25 cm.)
3. การผสมพันธุ์ ใช้วิธีการผสมตัวเองภายในประชากรเมื่อข้าวโพดเจริญเติบโตถึงระยะออกดอก เลือกต้นที่มี ลักษณะที่ดีและแข็งแรงไว้ ตามขั้นตอนต่อไปนี้
 - 3.1 การคลุมถุงตัวเมียหรือฝักข้าวโพด เมื่อฝักเริ่มโผล่ออกมา ให้ทำการดึงใบที่อยู่ข้อเดียวกับฝักทิ้ง เพื่อที่จะได้เห็นฝักได้ง่าย โดยใช้ถุงคลุมฝักที่โผล่ยังไม่โผล่ออกมา
 - 3.2 การเตรียมช่อดอกเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียเพื่อผสมพันธุ์ ในช่วงตอนเย็นเมื่อฝักที่คลุมไว้มองเห็นไหมโผล่ออกมาประมาณ 3-5 เซนติเมตร และช่อดอกเกสรตัวผู้บาน ได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของช่อดอก ทำการคลุมเกสรตัวผู้ด้วยถุงคลุมเกสรเพื่อป้องกันเกสรจากต้นอื่นๆ ปลิวเข้ามาผสม แล้วปิดให้มีมิดชิดและติดลวดเสียบกระดาษป้องกันเกสรไหลออก และใช้ดินสอบันทึกรูปแบบวิธีการผสมพันธุ์พร้อม กับวันที่ผสมพันธุ์ไว้ที่ด้านซ้ายของถุงผสม
 - 3.3 การผสมจะผสมในช่วงเวลา 9.00-11.00 นาฬิกา ของวันรุ่งขึ้นโดยทำการเขย่าช่อดอกเกสรตัวผู้ ที่คลุมไว้ให้ละอองเกสรตกใส่ภายในถุงแล้วนำมาเทใส่ลงบนไหมของต้นข้าวโพดที่เตรียมไว้ เพื่อทำการผสมตัวเอง แล้วใช้ถุงคลุมเกสรตัวผู้คลุมฝักทันทีที่ทำการผสมเสร็จ แล้วเย็บถุงด้วยเครื่องเย็บกระดาษติดกับต้นข้าวโพด

4. การเก็บเกี่ยว เมื่อฝักเริ่มแห้ง หรือประมาณ 35 วันหลังจากที่ทำการผสม จะเก็บมาทั้งถุงที่คลุมฝักนำมาตากให้แห้ง แล้วนำมาจดบันทึกประวัติพันธุ์ลงบนแต่ละซอง แล้วจึงแกะเอาเมล็ดใส่ซอง เก็บรักษาไว้ในห้องเย็นสำหรับเก็บเมล็ดพันธุ์

การทดลองที่ 4

การทดลองที่ 4.1 ฤดูปลายฝน ปี พ.ศ. 2560 การปลูกเชื้อ *Exserohilum turcicum* ในประชากรข้าวโพดหวานลูกผสมชั่วที่ 2 เพื่อเป็นข้อมูลทางด้านฟีโนไทป์
อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน 3 สายพันธุ์ ได้แก่
 - 1.1 สายพันธุ์ต้านทาน (ChallengerS₆-1)
 - 1.2 สายพันธุ์อ่อนแอ (NT58WS₆#4)
 - 1.3 ลูกผสมชั่วที่ 1 (NT58WS₆#4 x ChallengerS₆-1) F₁
2. ประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (NT58WS₆#4 x ChallengerS₆-1) F₂ จำนวน 184 ต้น
3. เชื้อสาเหตุ *Exserohilum turcicum* จากแหล่งมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จังหวัดเชียงใหม่
4. ถาดเพาะเมล็ด
5. วัสดุเพาะเมล็ด
6. อุปกรณ์เตรียมเชื้อ และปลูกเชื้อสาเหตุ *Exserohilum turcicum*
 - 6.1 งานอาหารเลี้ยงเชื้อ
 - 6.2 อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ
 - 6.3 อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อสูตร PDA
 - 6.4 เครื่องนับจำนวนสปอร์ (haemocytometer)
 - 6.5 คีมตอกตาไก่ พู่กันและดริบบเปอร์

วิธีการทดลอง

1. เพาะเมล็ดข้าวโพดหวาน สายพันธุ์ต้านทาน สายพันธุ์อ่อนแอ สายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 สายพันธุ์ละ 20 เมล็ด และลูกผสมชั่วที่ 2 โดยเลือกเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 2 จากฝักที่ติดเมล็ดสมบูรณ์ที่สุดจำนวน 1 ฝัก ลงในถาดเพาะขนาด 200 หลุม
2. การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อสาเหตุ *Exserohilum turcicum* จาก แหล่งแม่โจ้ ความเข้มข้น 1×10^5 คอนนิตีต่อมิลลิลิตร

3. เก็บตัวอย่างใบอ่อนของข้าวโพดหวานในแต่ละประชากรที่อายุกล้า 7 วันหลังเพาะ แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านจีโนมไทป์

4. ปลูกเชื้อสาเหตุ (inoculation) โดยการปลูกเชื้อสาเหตุลงบนต้นกล้าข้าวโพดที่มีอายุ 14 วันหลังเพาะโดยอ้างอิงวิธีการของ Puttarach et al.,(2016)

5. ทำการประเมินอาการของโรคที่ 56 วัน หลังจากวันที่ปลูกเชื้อ โดยให้คะแนนการเกิดโรคตั้งแต่ 1-9 โดยดัดแปลงวิธีการให้คะแนนจาก Galiano et al., 2017 ซึ่งมีหลักเกณฑ์ตามตารางที่ 1 เพื่อเก็บข้อมูลทางด้านฟีโนไทป์

การทดลองที่ 4.2 การศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสปีส์ กับลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2

การศึกษาคือความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสปีส์ กับลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ จะต้องใช้ข้อมูล 2 ส่วน ได้แก่ ข้อมูลทางด้านฟีโนไทป์ ซึ่งได้มาจากการให้คะแนนการเกิดโรคใบไหม้แผลใหญ่ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 184 ต้น โดยการให้คะแนนการเกิดโรคตั้งแต่ 1-9 (ต้นต้านทานสูงสุด = คะแนน 1, ต้นอ่อนแอมากที่สุด = 9) และข้อมูลทางด้านจีโนมไทป์ ซึ่งได้มาจากผลการวิเคราะห์ลักษณะของอัลลีลที่ควบคุมการแสดงออกของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 184 ต้น ที่ได้เก็บตัวอย่างใบเพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอและทดสอบกับเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จากการทดลองที่ 3.1 ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ต้านทาน สายพันธุ์อ่อนแอ และสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 ได้

การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการวิเคราะห์ข้อมูลแบ่งขั้นตอน ดังนี้

1. การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะทางฟีโนไทป์และจีโนมไทป์

นำข้อมูลทางด้านฟีโนไทป์ (คะแนนการเกิดโรคตั้งแต่ 1-9) และข้อมูลทางด้านจีโนมไทป์ที่แสดงการกระจายตัวของกลุ่มประชากร F_2 ที่ได้นำมาสร้างกราฟเพื่อดูการกระจายตัวของฟีโนไทป์ และวิเคราะห์การกระจายของข้อมูลโดยใช้วิธีการทดสอบค่าไคสแควร์ ซึ่งวิธีการทดสอบไคสแควร์ (Chi-Square Test) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ข้อมูลที่ใช้กับข้อมูลเชิงคุณภาพ หรือข้อมูลเชิงปริมาณที่แบ่งเป็นช่วง และข้อมูลไม่จำเป็นต้องมีการแจกแจงแบบปกติ ตัวเลขที่นำมาวิเคราะห์ในทดสอบไคสแควร์เป็นความถี่ของแต่ละระดับของตัวแปรที่ต้องการศึกษา หลักการของการทดสอบไคสแควร์ คือเปรียบเทียบความถี่ที่ได้จากตัวอย่าง หรือเรียกว่าความถี่ที่สังเกตได้ (observed frequency) แทนด้วยสัญลักษณ์ O กับความถี่ตามทฤษฎี หรือเรียกว่าความถี่คาดหวัง (expected frequency) แทนด้วยสัญลักษณ์ E ว่ามีความแตกต่างกันมากเกินไปหรือไม่

สมมติฐานเชิงสถิติ

H₀: ข้อมูลมีการแจกแจงสัดส่วนตามค่าคาดหวัง

H₁: ข้อมูลไม่มีการแจกแจงสัดส่วนตามค่าคาดหวัง

ตัวสถิติทดสอบ

$$X^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

เมื่อ O แทนความถี่ที่ได้จากการสังเกต

E แทนความถี่คาดหวัง

2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์

วิเคราะห์ไพเรเมอร์สนิปส์ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อเชื้อรา *E.turcicum* ด้วยวิธี Composite Interval mapping โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป MapQTL 6 ในการวิเคราะห์ไพเรเมอร์สนิปส์ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการต้านทานต่อ เชื้อรา *Exserohilum turcicum* ใช้การวิเคราะห์ single markers analysis (Doerge, 2002) ระหว่างค่าจีโนไทป์ คือ R หรือ S ที่ได้จากการทดสอบด้วยไพเรเมอร์ โดย R แสดงอัลลีลเหมือนพ่อ คือพันธุ์ต้านทาน ส่วน S แสดงอัลลีลเหมือนแม่ คือพันธุ์อ่อนแอ และฟีโนไทป์ที่ได้จากประชากร F₂ ที่เป็นค่าคะแนนการเกิดโรค ตั้งแต่ 1-9 โดยหากมีค่ามากแสดงว่าอ่อนแอต่อเชื้อรา *Exserohilum turcicum* และหากมีค่าน้อยแสดงว่าต้านทานต่อ เชื้อรา *Exserohilum turcicum* เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์กับลักษณะต้านทาน โดยพิจารณาจากคะแนน logarithm of odd ratio (LOD) เพื่อแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายโมเลกุลนั้นสามารถอธิบายลักษณะที่ต้องการศึกษาได้มากน้อยเพียงใด การวิเคราะห์คะแนน LOD พัฒนาโดย Morton (1955) ซึ่งคะแนน LOD เป็นค่าทางสถิติที่ใช้บ่งชี้ว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่ศึกษาสัมพันธ์กันหรือไม่ โดยคะแนน LOD คือ ค่า logarithm (base 10) of odd ratio หรือ logarithm (base 10) of the likelihood ratio ซึ่งค่า likelihood ratio คือ โอกาสที่เครื่องหมายโมเลกุลที่ศึกษาเชื่อมโยงกันในรูปเลขยกกำลัง ตัวอย่างเช่น ค่า LOD เป็น 3 แสดงว่า โอกาสที่เครื่องหมายโมเลกุลที่ศึกษาเชื่อมโยงกันเป็น 10³ ดังนั้นคะแนน LOD เป็นจึงเป็นค่า logarithm (base 10) ของอัตราส่วนของความน่าจะเป็นระหว่างโอกาสที่เครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะมีความเชื่อมโยงกัน (linkage) ต่อโอกาสเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะไม่มีความเชื่อมโยงกัน (non linkage) ถ้าคะแนน LOD สูง แสดงว่าเครื่องหมายโมเลกุลอยู่ใกล้ แต่ในทางตรงกันข้ามถ้าคะแนน LOD ต่ำ แสดงว่าเครื่องหมายโมเลกุลอยู่ไกล โดยปกติค่าคะแนน LOD ต่ำที่สุดที่ยอมรับได้

(thresholds) มีค่าประมาณ 3 นอกจากนี้ค่าความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ฟีโนไทป์ยังใช้บ่งชี้ว่าเป็น QTL หลัก หรือ QTL รอง ถ้ามีค่าความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ฟีโนไทป์มากกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ให้ เป็น QTL หลัก แต่ถ้าค่าความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ฟีโนไทป์น้อยกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ให้ เป็น QTL รอง (Liu et al., 2014)



บทที่ 4

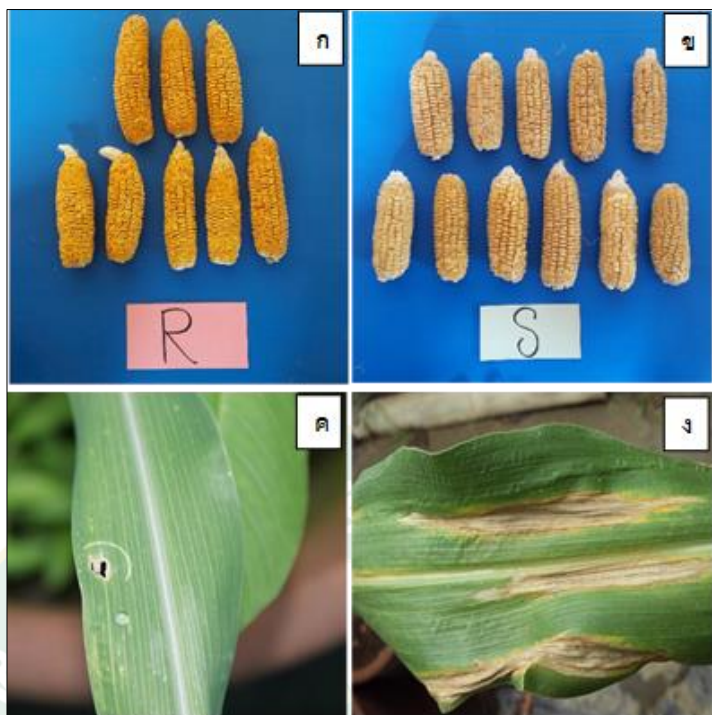
ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ฤดูปลายฝน ปี พ.ศ. 2559 การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่ต้านทาน และอ่อนแอโรค โดยการปลูกเชื้อรา *Exserohilum turcicum*

การปลูกเชื้อสาเหตุ *Exserohilum turcicum* ของโรคใบไหม้แผลใหญ่จากแหล่งมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย เชียงใหม่ (MJU) กับสายพันธุ์ข้าวโพดหวาน ทั้ง 8 สายพันธุ์ ทำการประเมินการเกิดโรคใบไหม้แผลใหญ่ ที่ระยะ 56 วันหลังปลูก ในฤดูปลายฝน ปี พ.ศ. 2559 จะเห็นได้ว่า สายพันธุ์ข้าวโพดหวานทั้ง 8 สายพันธุ์ มีคะแนนการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ที่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยสายพันธุ์ Challenger_{S₆}-1 และสายพันธุ์ Sugar73S₇-18 มีปฏิกริยาของพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคสูงสุด ที่ระดับ 1.0 คะแนน ในขณะที่สายพันธุ์ NT58WS₆#4 และ Cabaret(W)_{S₄}-B มีปฏิกริยาของพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคสูงสุด ที่ระดับ 9.0 คะแนน (ตารางที่ 6 และภาพที่ 12) ซึ่งจะเห็นได้จากการทดสอบครั้งนี้ได้สายพันธุ์ที่ต้านทานและอ่อนแอสายพันธุ์ อย่างละ 2 สายพันธุ์ จึงได้ทำการคัดเลือกให้เหลืออย่างละ 1 สายพันธุ์ เพื่อนำมาผลิตลูกผสมชั่วที่ 1 ในการทดลองต่อไป โดยจะใช้ข้อมูลของความต้านทานต่อโรค คุณภาพในการบริโภคน้ำตาล และความเป็นสายพันธุ์แท้มาประกอบการคัดเลือก จากข้อมูลด้านประวัติของสายพันธุ์ต้านทานได้แก่ สายพันธุ์ Challenger_{S₆}-1 และสายพันธุ์ Sugar73S₇-18 จะเห็นได้ว่า ทั้งสองสายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์แท้ชั่วที่ 6 และ 7 ตามลำดับ แต่เนื่องจาก เมื่อทำการทดสอบคุณภาพการบริโภคน้ำตาลแล้วพบว่า สายพันธุ์ Challenger_{S₆}-1 มีคุณภาพการบริโภคน้ำตาลที่ดีกว่าทั้งยังมีอายุการออกดอกที่เร็วกว่า ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ Challenger_{S₆}-1 เป็นสายพันธุ์พ่อเพื่อที่จะนำมาผลิตลูกผสมชั่วที่ 1 ส่วนสายพันธุ์อ่อนแอจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สายพันธุ์ NT58WS₆#4 และ Cabaret(W)_{S₄}-B มีปฏิกริยาของพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคสูงสุด ที่ระดับ 9.0 คะแนน ซึ่งเมื่อพิจารณาจากความเป็นสายพันธุ์แท้แล้วจะเห็นได้ว่าสายพันธุ์ NT58WS₆#4 มีความเป็นสายพันธุ์แท้มากกว่า (S₆) เมื่อเปรียบเทียบกับ สายพันธุ์ Cabaret(W)_{S₄}-B ซึ่งยังไม่เป็นสายพันธุ์แท้ (S₄) ประกอบกับผลการทดสอบในด้านคุณภาพการบริโภคน้ำตาลพบว่า สายพันธุ์ NT58WS₆#4 มีคุณภาพการบริโภคน้ำตาลที่ดีกว่า ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ NT58WS₆#4 มาใช้เป็นสายพันธุ์แม่ในการผลิตลูกผสมชั่วที่ 1 เพื่อจะได้ข้าวโพดหวานสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (F₁ population) ที่มีคุณภาพในการบริโภคน้ำตาลที่ดีและมีความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่

ตารางที่ 6 ลักษณะทางการเกษตรและคะแนนการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ของสายพันธุ์ข้าวโพดหวาน หลังการปลูกเชื้อสาเหตุ *Exserohilum turcicum* จากเชื้อแหล่งอำเภอสันทราย เชียงใหม่ (MJU) ในฤดูปลายฝน ปี พ.ศ. 2559

Entry no.	Lines	Origin	Days to 50%		Height		Disease score :
			Tassel	Silk	Plant	Ear	NCLB (1 = R. 9 = S.)
							56 Days After Plant
1	ChallengerS ₆ -1	2016LR	45	46	119	55	1.0c
2	Sugar73S ₇ -18	2016LR	59	61	191	112	1.0c
3	SuregoldS ₅ -2	2016LR	46	48	126	50	8.0a
4	NT58WS ₆ #4	2016LR	46	48	162	77	9.0a
5	Hibrix3S ₇ -6	2016LR	53	53	184	124	3.0b
6	EndeavorS ₅ -1	2016LR	45	47	120	49	3.5b
7	Cabaret(W)S ₄ -B	2016LR	44	46	140	68	9.0a
8	No.40-7	2016LR	51	51	150	95	3.5b
Mean			49	50	149	79	5
F-test			**	**	**	**	**
C.V. (%)			3.61	4.27	5.03	6	12.27
LSD (0.01)			5.17	6.3	22.28	13.98	1.61



ภาพที่ 12 ลักษณะฝักและใบข้าวโพดหวานสายพันธุ์ที่ต้านทาน; Challenger_S₆-1 (ก),(ค) และสายพันธุ์ที่อ่อนแอ; NT58WS₆#4 (ข), (ง) ต่อโรคใบไหม้แมลงใหญ่

การทดลองที่ 2 ฤดูแล้ง ปี พ.ศ. 2560 การสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 population) โดยการผสมข้ามระหว่าง สายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่อ่อนแอต่อโรค กับสายพันธุ์ต้านทาน

การสร้างประชากรข้าวโพดหวานลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 population) จากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่อ่อนแอต่อโรค คือสายพันธุ์ NT58WS₆#4 เป็นสายพันธุ์แม่ กับสายพันธุ์ต้านทานโรค คือ สายพันธุ์ Challenger_S₆-1 เป็นสายพันธุ์พ่อ พบว่า ได้ข้าวโพดหวานพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (NT58WS₆#4 x Challenger_S₆-1) จำนวน 5 ฝัก และได้เมล็ดรวมทั้งหมด 950 เมล็ด (ภาพที่ 13 และ ตารางภาคผนวกที่ 1) โดยข้าวโพดหวานพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จะนำไปปลูกและทำการผสมตัวเองภายในประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 เพื่อพัฒนาเป็นข้าวโพดหวานพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 2 สำหรับใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *Ht1* บนโครโมโซม 2 กับลักษณะฟีโนไทป์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ที่คัดเลือก ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่บอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่อ่อนแอ และต้านทานต่อโรคใบไหม้แมลงใหญ่



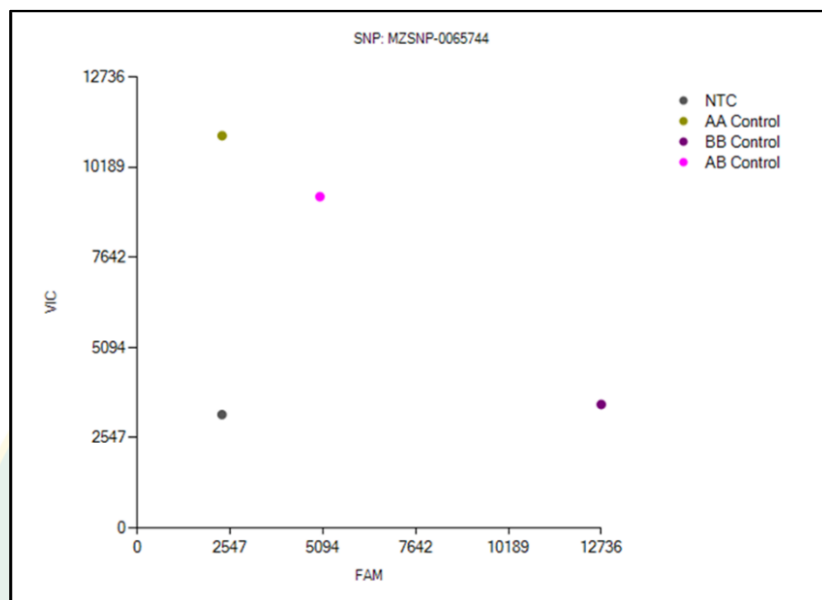
ภาพที่ 13 ลักษณะฝักข้าวโพดลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1 seeds) (NT58WS₆#4 x ChallengerS₆-1)

การทดลองที่ 3

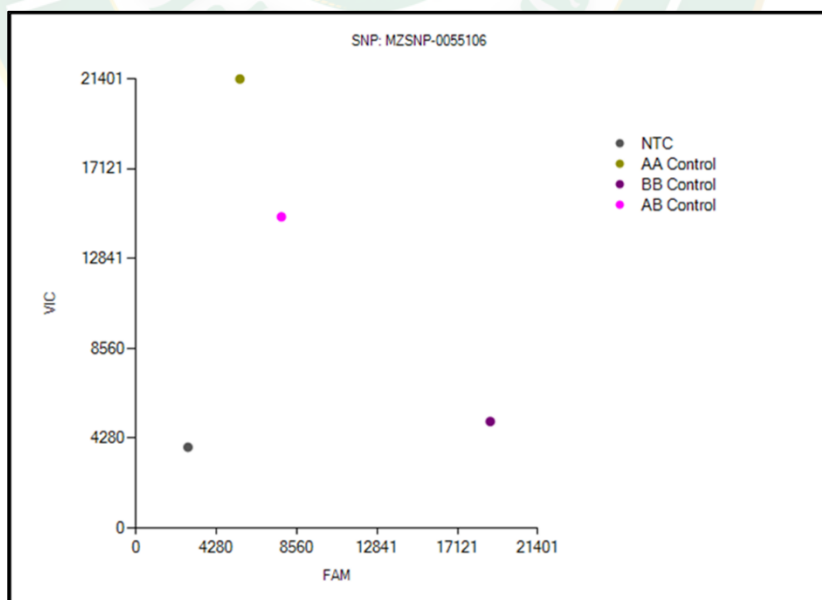
การทดลองที่ 3.1 ห้องปฏิบัติการ ปี พ.ศ. 2560 การคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ที่บอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่อ่อนแอ ด้านทานโรค และลูกผสม F_1

จากการ ค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ โดยใช้ตำแหน่งยีนอ้างอิงจากเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์ โดยนำตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอสเอสอาร์คือ เครื่องหมาย umc1042 (202,213,552 - 202,371,807) bnlgl1721 (205,842,785 - 207,194,203) ละตำแหน่งของยีน *Ht1* (206,643,048 - 207,194,203) จากการค้นหาลำดับเบส (sequence) ในตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุล umc1042 บนโครโมโซมที่ 2 โดยใช้โปรแกรม BLAST จากฐานข้อมูล Maize Genetics Database พบลำดับเบสที่มีความสัมพันธ์กัน จึงทำการออกแบบไพรเมอร์สนิปส์ บนโครโมโซมที่ 2 จาก Genome browser พบไพรเมอร์สนิปส์ ทั้งหมด 92 ตัว (ตารางภาคผนวกที่ 3) และค้นหาบนโครโมโซม 8 ได้ ทั้งหมด 48 ตัว (ตารางภาคผนวกที่ 4) นำเครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมดไปทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของสายพันธุ์ด้านทาน (ChallengerS₆-1), สายพันธุ์อ่อนแอ (NT58WS₆#4) จากผลการทดสอบ พบไพรเมอร์สนิปส์เพียง 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ MZSNP-0065744, MZSNP-0055106, MZSNP-0063922, MZSNP-0073150 และ MZSNP-0070164 ซึ่งเป็นเครื่องหมายสนิปส์บนโครโมโซมที่ 2 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวโพดหวานสายพันธุ์พ่อและแม่ การตรวจวัดผลผลิต PCR และการแปลผล ทำได้โดยใช้เครื่องอ่านค่าการเรืองแสงของฟลูออเรสเซนต์ (เครื่อง Araya) ของผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR จากนั้นผลที่อ่านได้จากเครื่อง Araya จะถูก

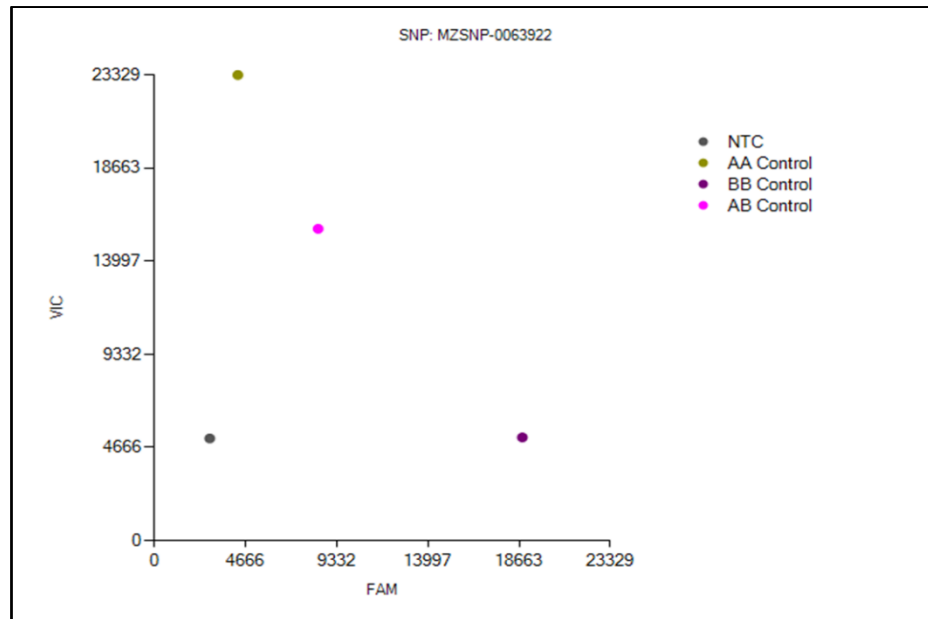
แปลผลและแสดงออกมาในรูปแบบกราฟจุด และอัลลีลของสไนป์สโดยโปรแกรม Araya ได้ (ภาพที่ 14 - 19) และพบไพรเมอร์สไนป์สจำนวน 87 ไพรเมอร์ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวโพดหวานทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 19



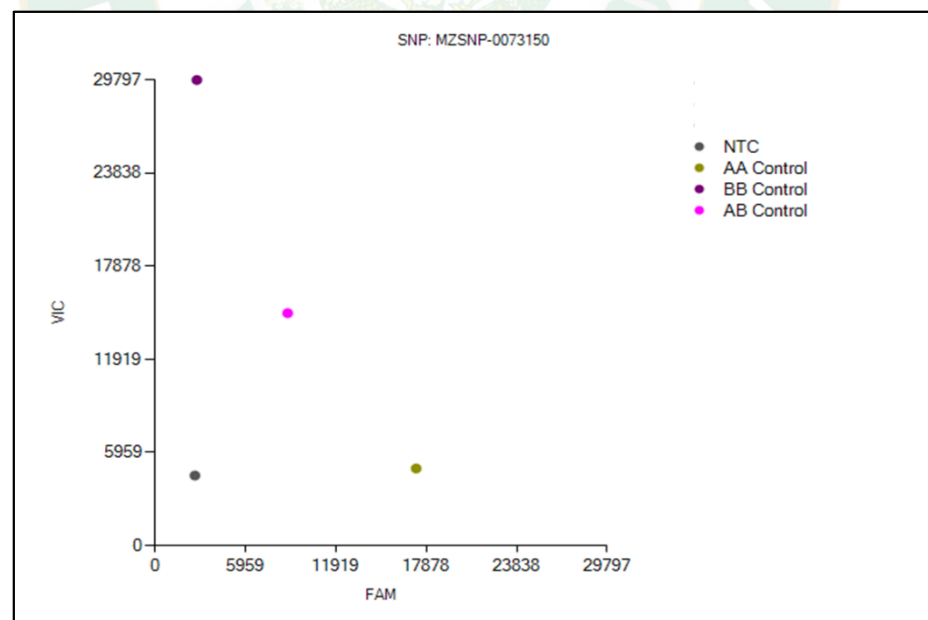
ภาพที่ 14 ผลการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสไนป์ส MZSNP-0065744 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อ (AA), สายพันธุ์แม่ (BB) และสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (AB)



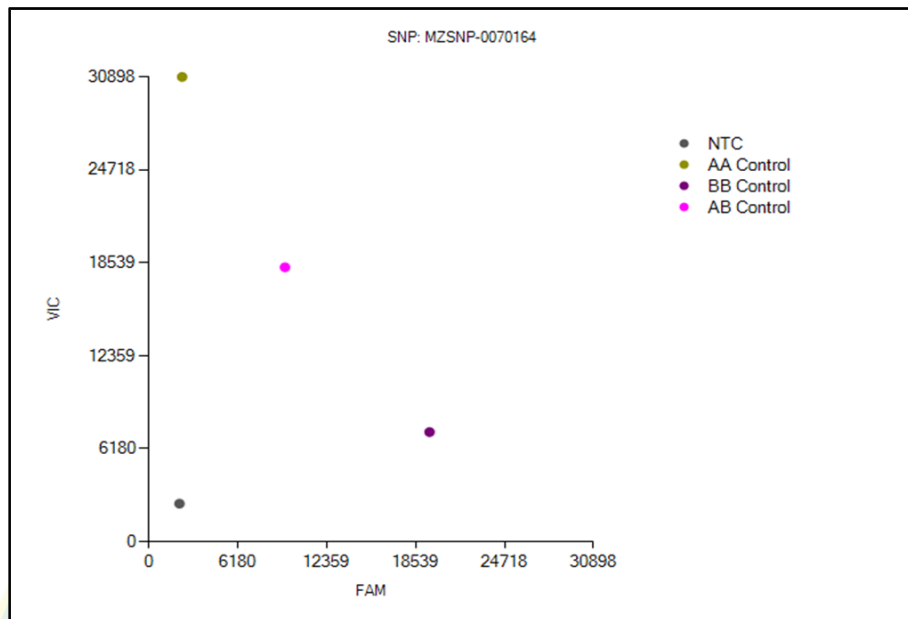
ภาพที่ 15 ผลการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสไนป์ส MZSNP-0055106 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อ (AA), สายพันธุ์แม่ (BB) และสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (AB)



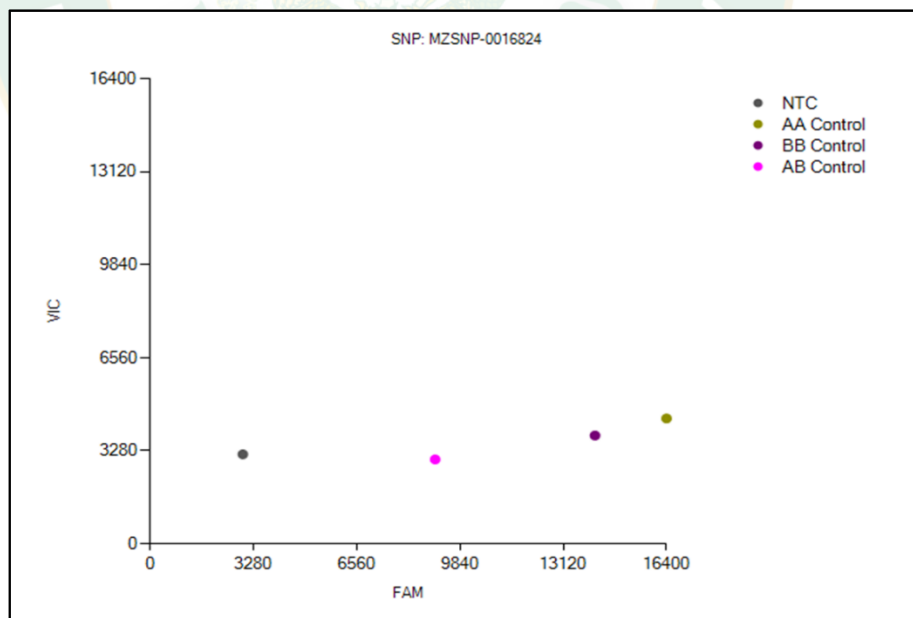
ภาพที่ 16 ผลการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสั้น (SNP) MZSNP-0063922 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อ (AA), สายพันธุ์แม่ (BB) และสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (AB)



ภาพที่ 17 ผลการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสั้น (SNP) MZSNP-0073150 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อ (AA), สายพันธุ์แม่ (BB) และสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (AB)



ภาพที่ 18 ผลการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสไนป์ MZSNP-0070164 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อ (AA), สายพันธุ์แม่ (BB) และสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (AB)



ภาพที่ 19 ผลการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสไนป์ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อ (AA), สายพันธุ์แม่ (BB) และสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (AB)

การทดลองที่ 3.2 ฤดูฝนปี พ.ศ. 2560 การสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2 populations) โดยการผสมตัวเองของต้น F_1

ทำการสร้างประชากรข้าวโพดหวานลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2 population) จากข้าวโพดหวานพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (NT58WS₆#4 x ChallengerS₆-1) ที่ได้จากการทดลองที่ 2 โดยการผสมตัวเองภายในประชากรของพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 เพื่อสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2 Seeds) พบว่าได้ข้าวโพดหวานพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 6 ฝัก และได้จำนวนเมล็ดรวมทั้งหมด 1,780 เมล็ด (ภาพที่ 20 และตารางภาคผนวกที่ 2) เตรียมเมล็ดข้าวโพดหวานพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 200 เมล็ดที่มาจากข้าวโพดฝักเดียวกัน เพื่อนำไปเพาะเป็นต้นกล้าและสกัดดีเอ็นเอ สำหรับใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของยีน *Ht1* บนโครโมโซม 2 กับลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสปีปส์ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 3.1 ได้แก่ MZSNP-0065744, MZSNP-0055106, MZSNP-0063922, MZSNP-0073150 และ MZSNP-0070164 ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่บอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่อ่อนแอ และต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในการทดลองที่ 4 ต่อไป



ภาพที่ 20 ลักษณะฝักข้าวโพดหวานลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2 seeds), (NT58WS₆#4 x ChallengerS₆-1)

F_2

การทดลองที่ 4

การทดลองที่ 4.1 ฤดูปลูกปี พ.ศ. 2560 การปลูกเชื้อ *Exserohilum turcicum* ในประชากรข้าวโพดหวานลูกผสมชั่วที่ 2 เพื่อเป็นข้อมูลทางด้านฟีโนไทป์

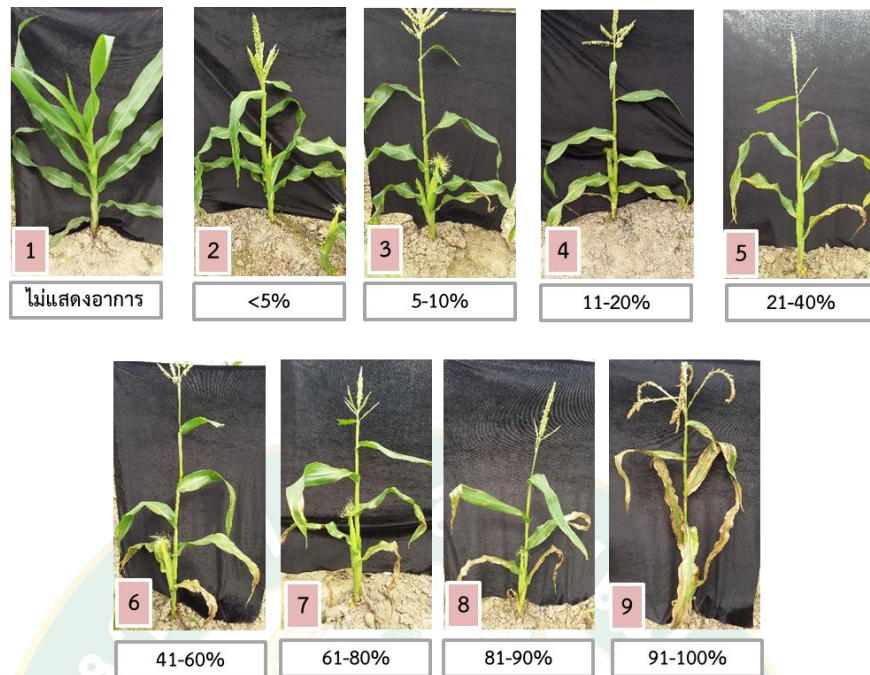
การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะความต้านทานทางฟีโนไทป์ในลูกผสมชั่วที่ 2

จากการปลูกเชื้อสาเหตุของโรคใบไหม้แผลใหญ่ (*Exserohilum turcicum*) ในประชากรข้าวโพดหวานลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 184 ต้น แล้วทำการประเมินการเกิดโรคใบไหม้แผลใหญ่ โดยการให้คะแนนการเป็นโรค 1-9 ที่ระยะ 56 วันหลังปลูก (ภาพที่ 21) พบว่า ได้ข้อมูลฟีโนไทป์ ด้วยการให้คะแนนการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ในประชากรข้าวโพดหวานลูกผสมชั่วที่ 2 มีจำนวนต้นในแต่ละระดับคะแนนดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนต้นข้าวโพดหวานในประชากรรุ่นที่ 2 (F_2) ที่แสดงความต้านทานต่อโรคในแต่ละระดับคะแนน

ระดับคะแนน	อาการของโรค	จำนวนต้น	ระดับความต้านทาน
1	ไม่มีการแสดงอาการของโรคเลย	9	ต้านทานสูง (HR)
2	แสดงอาการของโรค < 5% ของพื้นที่ใบรวม	21	ต้านทาน (R)
3	แสดงอาการของโรค 5-10% ของพื้นที่ใบรวม	25	
4	แสดงอาการของโรค 11-20% ของพื้นที่ใบรวม	22	ค่อนข้างต้านทาน (MR)
5	แสดงอาการของโรค 21-40% ของพื้นที่ใบรวม	27	
6	แสดงอาการของโรค 41-60% ของพื้นที่ใบรวม	36	ค่อนข้างอ่อนแอ (MS)
7	แสดงอาการของโรค 61-80% ของพื้นที่ใบรวม	23	
8	แสดงอาการของโรค 81-90% ของพื้นที่ใบรวม	12	อ่อนแอ (S)
9	แสดงอาการของโรค 91-100% ของพื้นที่ใบรวม	9	
	รวม	184	

จากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟเพื่อดูการกระจายตัวของลักษณะการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ของประชากรข้าวโพดหวานลูกผสมชั่วที่ 2 (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 21 แสดงภาพประกอบในการประเมินเพื่อให้คะแนนการเกิดโรคที่คะแนนตั้งแต่ 1-9 ในประชากรลูกข้าวที่ 2 จำนวน 184 ต้น



ภาพที่ 22 กราฟแสดงการกระจายตัวของลักษณะคะแนนการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ของประชากรข้าวโพดหวานลูกผสมชั่วที่ 2

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปทดสอบอัตราส่วนของการกระจายตัวทางพีโนไทป์เพื่อวิเคราะห์จำนวนยีนที่ควบคุมความต้านทานโรค โดยวิธีการทดสอบ Chi-square test จากคะแนนการเกิดโรค

ใบไหม้แผลใหญ่ (ตารางที่ 8) ซึ่งจะกำหนดให้อัตราส่วนที่คาดหมายระหว่างสายพันธุ์ที่ต้านทานและอ่อนแอในประชากรรุ่นที่ 2 เท่ากับ 3:1 (ต้นต้านทาน : ต้นอ่อนแอ) แต่จากค่าสังเกตจะได้จำนวนต้นต้านทานทั้งหมด 104 ต้น ที่มาจากการรวมจำนวนต้นของต้นที่มีคะแนนการเกิดโรคตั้งแต่ 1-5 และจำนวนต้นอ่อนแอทั้งหมด 80 ต้น ที่มาจากการรวมจำนวนต้นของต้นที่มีคะแนนการเกิดโรคตั้งแต่ 6-9 พบว่าค่า Chi-square ที่คำนวณได้เท่ากับ 33.51 ซึ่งมีค่ามากกว่าค่า Chi-square ในตารางที่ความน่าจะเป็น 0.05 ที่ระดับความเป็นอิสระเท่ากับ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.84 แสดงว่าอัตราส่วนฟีโนไทป์ที่ได้จากการทดลองในประชากรรุ่น F_2 กับอัตราส่วนที่คาดหมายนี้มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยอัตราส่วนต้นต้านทาน : ต้นอ่อนแอ ไม่เท่ากับ 3:1

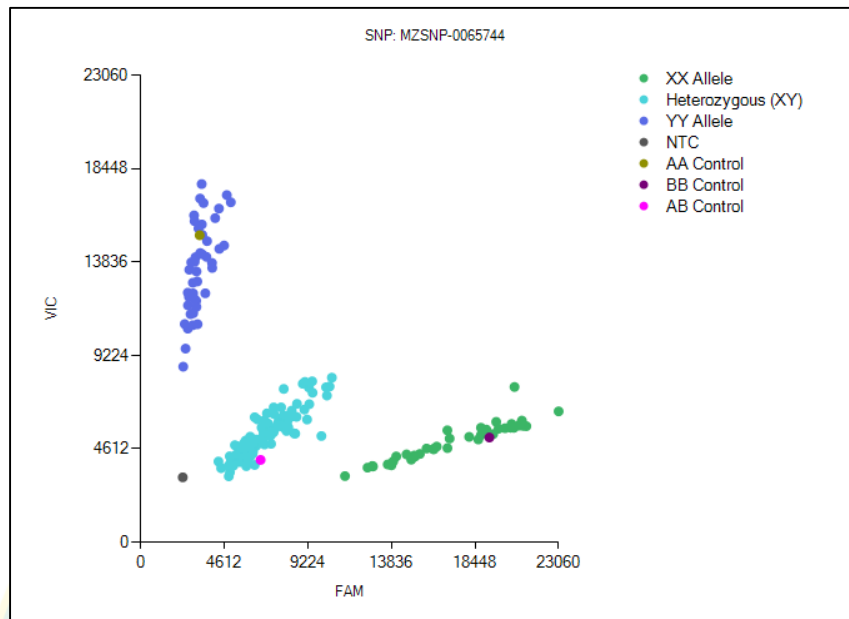
ตารางที่ 8 การทดสอบค่า Chi-square การแสดงออกด้านฟีโนไทป์ของความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในประชากร F_2

ฟีโนไทป์	อัตราส่วนที่ คาดหมาย	ค่าที่ได้จาก	ค่าที่ได้ตาม	Chi- square	df
		การทดลอง (O)	ทฤษฎี (E)		
จำนวนต้นต้านทาน	3	104	138	8.38	1
จำนวนต้นอ่อนแอ	1	80	46	25.13	
รวม		184		33.51	

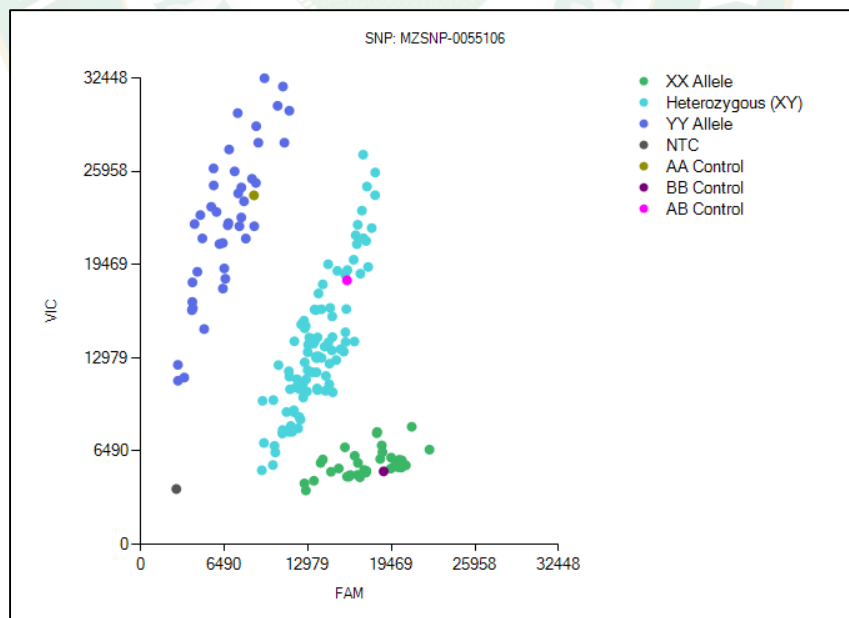
การทดลองที่ 4.2 การศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ กับลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2

4.2.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางจีโนไทป์ในลูกผสมชั่วที่ 2

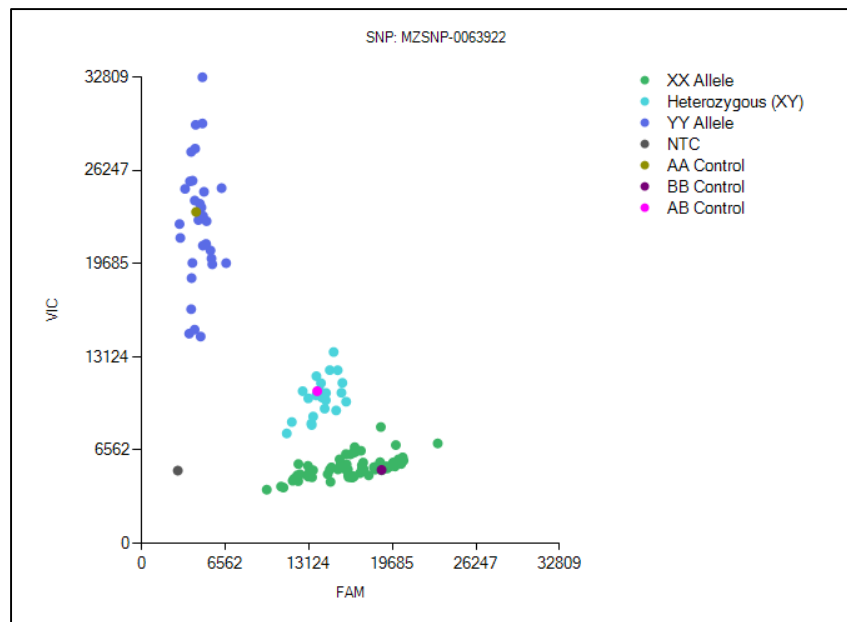
การตรวจสอบจีโนไทป์ของการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 โดยการนำตัวอย่างดีเอ็นเอของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 184 ต้น มาทดสอบกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ จำนวน 5 เครื่องหมาย ได้แก่ MZSNP-0065744, MZSNP-0055106, MZSNP-0063922, MZSNP-0073150 และ MZSNP-0070164 ที่ได้จากการทดลองที่ 3.1 พบว่า ได้ข้อมูลจีโนไทป์ด้วยการให้คะแนน จากการวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการของประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 184 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่อยู่ในกลุ่มต้านทานมีจีโนไทป์ แบบ YY allele ซึ่งเป็นจีโนไทป์เดียวกับดีเอ็นเอของสายพันธุ์ต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ (ChallengerS₆-1) มีจีโนไทป์ AA control (homozygous AA) และตัวอย่างดีเอ็นเอที่อยู่ในกลุ่มอ่อนแอมีจีโนไทป์แบบ XX allele ซึ่งเป็นจีโนไทป์เดียวกับดีเอ็นเอของสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ (NT58WS₆#4) ที่มีจีโนไทป์แบบ BB control (homozygous BB) และตัวอย่างดีเอ็นเอที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับดีเอ็นเอของพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (NT58WS₆#4 x ChallengerS₆-1) มีจีโนไทป์แบบ Heterozygous XY ซึ่งเป็นจีโนไทป์เดียวกับดีเอ็นเอของสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่มีจีโนไทป์แบบ AB control (Heterozygous AB) (ตารางภาคผนวกที่ 5) และเมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR ผลที่อ่านได้จากเครื่อง Araya จะถูกแปลผลและแสดงออกมาในรูปแบบกราฟจุด และอัลลีลของสนิปส์โดยโปรแกรม Araya ได้ผลกราฟจุดจากการอ่านค่าจีโนไทป์ ดังแสดงในภาพที่ 23-28 ตัวอย่าง โดยจุดสีน้ำเงิน (YY allele) แสดงกลุ่มตัวอย่างของต้นต้านทาน สีเขียวแสดงกลุ่มตัวอย่างของต้นอ่อนแอ (XX allele) และ สีฟ้าแสดงกลุ่มตัวอย่างของต้นค่อนข้างต้านทาน (Heterozygous XY) ซึ่ง จุดสีเขียวเข้ม (AA control) คือสายพันธุ์พ่อที่ต้านทาน (ChallengerS₆-1) จุดสีม่วง (BB control) คือสายพันธุ์แม่ที่อ่อนแอ (NT58WS₆#4) จุดสีชมพู (AB control) คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (NT58WS₆#4 x ChallengerS₆-1) และจุดสีดำ (NTC) คือชุดควบคุมที่ไม่มีตัวอย่างดีเอ็นเอ (Non-template control)



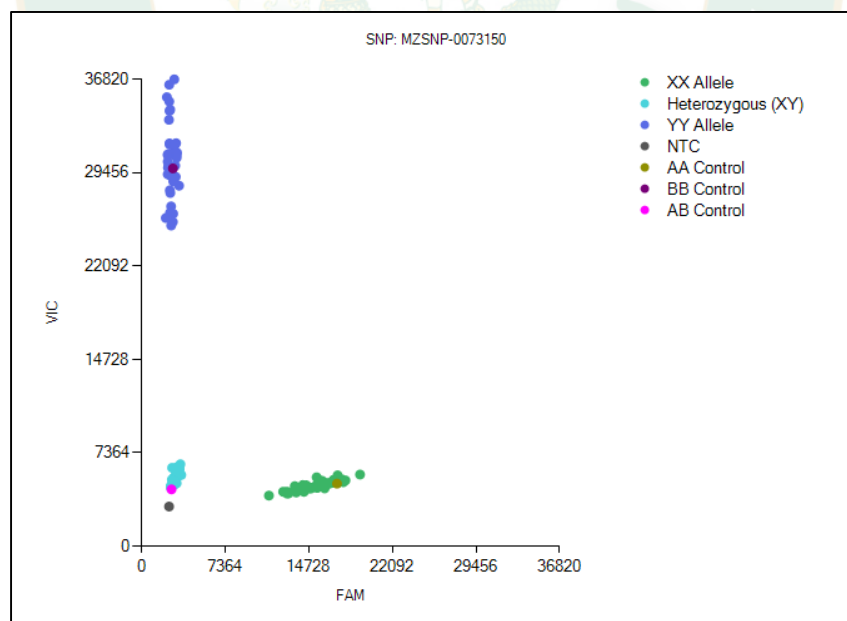
ภาพที่ 23 ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของไพรมอร์สนิปส์ MZSNP-0065744 ที่ได้รับการคัดเลือกและนำไปตรวจสอบในประชากร F_2 184 ต้น



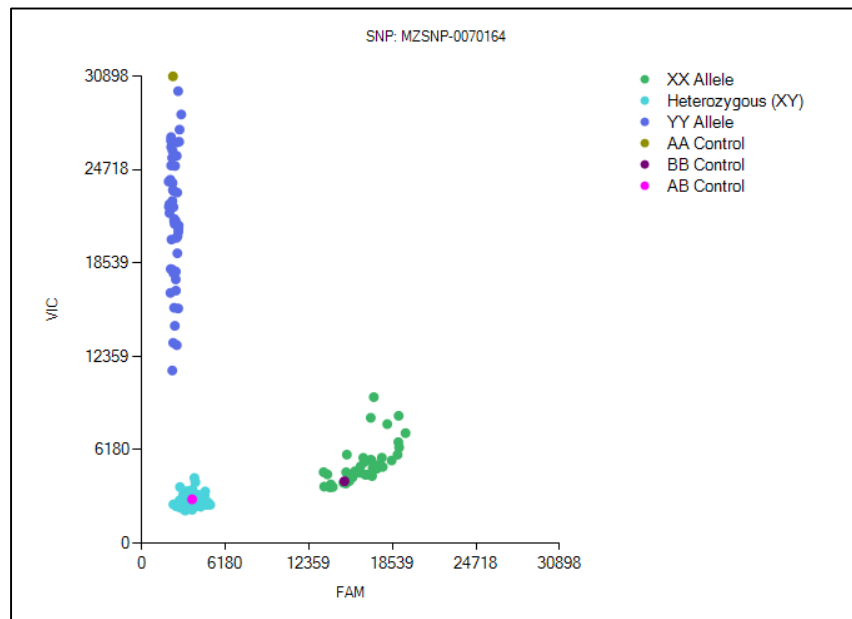
ภาพที่ 24 ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของไพรมอร์สนิปส์ MZSNP-0055106 ที่ได้รับการคัดเลือกและนำไปตรวจสอบในประชากร F_2 184 ต้น



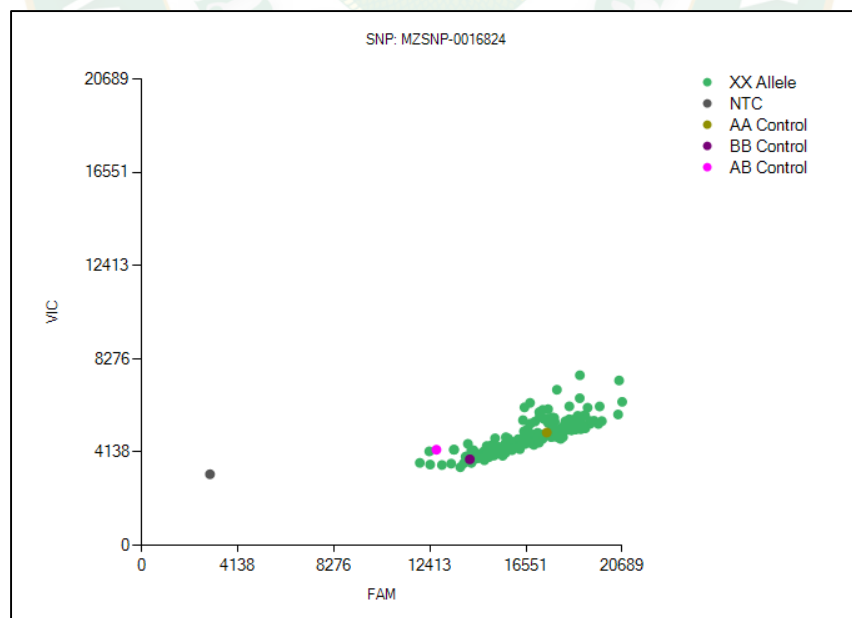
ภาพที่ 25 ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของไพเมอร์สนิปส์ MZSNP-0063922 ที่ได้รับการคัดเลือก และนำไปตรวจสอบในประชากร F_2 184 ต้น



ภาพที่ 26 ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของไพเมอร์สนิปส์ MZSNP-0073150 ที่ได้รับการคัดเลือกและนำไปตรวจสอบในประชากร F_2 184 ต้น



ภาพที่ 27 ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของไพรมอร์สไนปส์ MZSNP-0070164 ที่ได้รับการคัดเลือก และนำไปตรวจสอบในประชากร F_2 184 ต้น



ภาพที่ 28 ตัวอย่างของผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของไพรมอร์สที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปทดสอบอัตราส่วนของการกระจายตัวของจีโนไทป์ โดยวิธีการทดสอบ Chi-square test ของข้อมูลจีโนไทป์ที่ทดสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของประชากรรุ่น F_2 ซึ่งจะกำหนดอัตราส่วนจีโนไทป์ที่คาดหวัง เท่ากับ 1:2:1 ดังนั้น ในประชากรนี้ควรมีค่าที่จีโนไทป์ที่คาดหวังคือ 46 AA : 92 AB : 46 BB ผลการทดสอบพบว่าค่า Chi-square ที่คำนวณได้ของ เครื่องหมาย MZSNP-0065744 , MZSNP-0055106, MZSNP-0063922, MZSNP-0073150 และ MZSNP-0070164 เท่ากับ 1.08, 0.82, 0.64 ,0.64 และ 1.08 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่า Chi-square ในตารางที่ความน่าจะเป็น 0.05 ที่ระดับความเป็นอิสระเท่ากับ 2 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.99 (ตารางที่ 9 – 13)

ตารางที่ 9 การทดสอบค่า Chi-square การแสดงออกด้านจีโนไทป์ของความต้านทานต่อโรคใบไหม้ แผลใหญ่ ในประชากร F_2 ของเครื่องหมายสนิปส์ MZSNP-0065744

จีโนไทป์	อัตราส่วนที่ คาดหวัง	ค่าที่ได้จาก การทดลอง (O)	ค่าที่ได้ตาม ทฤษฎี (E)	Chi- square	df
ต้านทาน (AA)	1	47	46	0.02	2
ค่อนข้างต้านทาน (AB)	2	97	92	0.27	
อ่อนแอ (BB)	1	40	46	0.78	
รวม			184	1.08	

ตารางที่ 10 การทดสอบค่า Chi-square การแสดงออกด้านจีโนไทป์ของความต้านทานต่อโรคใบไหม้
แผลใหญ่ ในประชากร F_2 ของเครื่องหมายสนิปส์ MZSNP-0055106

จีโนไทป์	อัตราส่วนที่ คาดหมาย	ค่าที่ได้จาก	ค่าที่ได้ตาม	Chi- square	df
		การทดลอง (O)	ทฤษฎี (E)		
ต้านทาน (AA)	1	46	46	0.00	2
ค่อนข้างต้านทาน (AB)	2	97	92	0.27	
อ่อนแอ (BB)	1	41	46	0.54	
รวม			184	0.82	

ตารางที่ 11 การทดสอบค่า Chi-square การแสดงออกด้านจีโนไทป์ของความต้านทานต่อโรคใบไหม้
แผลใหญ่ ในประชากร F_2 ของเครื่องหมายสนิปส์ MZSNP-0063922

จีโนไทป์	อัตราส่วนที่ คาดหมาย	ค่าที่ได้จาก	ค่าที่ได้	Chi- square	df
		การทดลอง (O)	ตามทฤษฎี (E)		
ต้านทาน (AA)	1	45	46	0.02	2
ค่อนข้างต้านทาน (AB)	2	97	92	0.27	
อ่อนแอ (BB)	1	42	46	0.35	
รวม			184	0.64	

ตารางที่ 12 การทดสอบค่า Chi-square การแสดงออกด้านจีโนไทป์ของความต้านทานต่อโรคใบไหม้
แผลใหญ่ ในประชากร F₂ ของเครื่องหมายสนิปส์ MZSNP-0073150

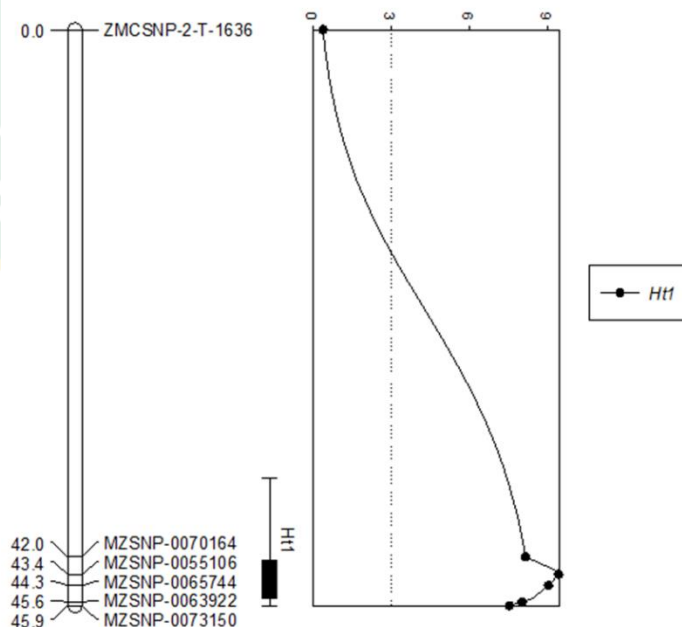
จีโนไทป์	อัตราส่วนที่ คาดหวัง	ค่าที่ได้จาก	ค่าที่ได้ตาม	Chi- square	df
		การทดลอง (O)	ทฤษฎี (E)		
ต้านทาน (AA)	1	45	46	0.02	2
ค่อนข้างต้านทาน (AB)	2	97	92	0.27	
อ่อนแอ (BB)	1	42	46	0.35	
รวม			184	0.64	

ตารางที่ 13 การทดสอบค่า Chi-square การแสดงออกด้านจีโนไทป์ของความต้านทานต่อโรคใบไหม้
แผลใหญ่ ในประชากร F₂ ของเครื่องหมายสนิปส์ MZSNP-0070164

จีโนไทป์	อัตราส่วนที่ คาดหวัง	ค่าที่ได้จาก	ค่าที่ได้ตาม	Chi- square	df
		การทดลอง (O)	ทฤษฎี (E)		
ต้านทาน (AA)	1	47	46	0.02	2
ค่อนข้างต้านทาน (AB)	2	97	92	0.27	
อ่อนแอ (BB)	1	40	46	0.78	
รวม			184	1.08	

4.2.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ในลูกผสมชั่วที่ 2

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ด้วยการวิเคราะห์ QTL โดยวิธีการ Interval mapping นำผลที่ได้จากการตรวจสอบจีโนไทป์ของประชากร F_2 และฟีโนไทป์ที่ได้จากการทดสอบความต้านทานโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่ *Exserohilum turcicum* มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป MapQTL6 เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสั้นทั้ง 5 เครื่องหมายที่พัฒนาขึ้นมา ได้แก่ MZSNP-0065744 , MZSNP-0055106, MZSNP-0063922, MZSNP-0073150 และ MZSNP-0070164 นั้นพบว่ามีความสัมพันธ์ของลักษณะความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่กับจีโนไทป์ เนื่องจากมีค่า LOD ที่มากกว่า 3 ซึ่งให้ค่าความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ฟีโนไทป์ (PVE) มากกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 14) ซึ่งทั้ง 5 เครื่องหมายดังกล่าวนี้ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 2 (ภาพที่ 29) และสามารถอธิบายได้ว่าน่าจะเป็น QTL หลัก (major QTL) ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานต่อโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่ *Exserohilum turcicum* ในข้าวโพดหวาน



ภาพที่ 29 แสดง Genetic map และค่า LOD score สำหรับตำแหน่ง major QTL ของเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 5 เครื่องหมายที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 2 ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่ (*Exserohilum turcicum*)

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ QTL ด้วยวิธีการ Interval mapping กับลักษณะต้านทานต่อโรคต่อเชื้อสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่ (*Exserohilum turcicum*) ในข้าวโพดหวาน

SNP Marker	Chr.	R-square	LOD	PVE (%)	P-value
MZSNP-0055106	2	0.21	9.43	21	<0.0001**
MZSNP-0065744	2	0.20	9.04	20	<0.0001**
MZSNP-0070164	2	0.18	8.15	18	<0.0001**
MZSNP-0063922	2	0.18	8.03	18	<0.0001**
MZSNP-0073150	2	0.17	7.54	17	<0.0001**

วิจารณ์ผลการทดลอง

การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่ต้านทาน และอ่อนแอโรค

จากการปลูกเชื้อสาเหตุ *Exserohilum turcicum* ของโรคใบไหม้แผลใหญ่จากแหล่งอำเภอสันทราย เชียงใหม่ (MJU) กับสายพันธุ์ข้าวโพดหวาน ทั้ง 8 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ข้าวโพดหวานทั้ง 8 สายพันธุ์ มีคะแนนการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยสายพันธุ์ ChallengerS₆-1 และสายพันธุ์ Sugar73S7-18 มีปฏิกริยาของพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคสูงสุด ที่ระดับ 1.0 คะแนน ในขณะที่สายพันธุ์ NT58WS₆#4 และ Cabaret(W)S4-B มีปฏิกริยาของพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคสูงสุด ที่ระดับ 9.0 คะแนน สายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอที่ถูกคัดเลือกมาใช้ในการสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 และ 2 ได้แก่ สายพันธุ์ ChallengerS₆-1 และสายพันธุ์ NT58WS₆#4 เนื่องจากมีปฏิกริยาต่อโรคที่คะแนน 1 และ 9 ตามตารางที่ 6 ขั้นตอนการประเมินและคัดเลือกสายพันธุ์พ่อและแม่เพื่อนำมาสร้างประชากรสำหรับการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อช่วยคัดเลือกลักษณะที่ต้องการนั้นเป็นขั้นตอนที่จำเป็นและมีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากในการสร้างประชากรนั้นจำเป็นที่จะต้องคัดเลือกสายพันธุ์พ่อและแม่ที่มีความแตกต่างทางลักษณะที่เราต้องการศึกษา ซึ่งในการผสมพันธุ์เพื่อสร้างแผนที่พันธุกรรมนั้น ต้องการพ่อแม่พันธุ์ที่มีความแตกต่างกันของรูปแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอ เพื่อให้เกิดพอลิมอร์ฟิซึม แต่ไม่แตกต่างกันมากเกินไปจนทำให้ลูกที่ออกมาเป็นหมัน การเลือกพ่อแม่อาจเลือกพันธุ์ที่มีคุณค่าทางการเกษตร หรือพันธุ์ที่มีลักษณะแตกต่างกันที่

ต้องการติดตามหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะดังกล่าวด้วย ทั้งลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนเพียง 1 คู่ (monogenic trait) หรือลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนหลายคู่ (polygenic trait หรือ quantitative trait) (สุรินทร์, 2552)

การคัดเลือกไพโรเมอร์สนิปส์

การตรวจสอบไพโรเมอร์สนิปส์ ทั้งหมด 140 ไพโรเมอร์ จากโครโมโซม 2 และ 8 ทั้งหมด 92 และ 48 ไพโรเมอร์ตามลำดับ กับตัวอย่างพันธุ์ต้านทานหรือ พันธุ์พ่อ Challenger₆-1 และพันธุ์อ่อนแอหรือ พันธุ์แม่ NT58WS₆#4 ได้ไพโรเมอร์ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ ทั้งหมด 5 ไพโรเมอร์ คิดเป็น 3.57 เปอร์เซ็นต์ และไพโรเมอร์ที่ไม่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่จำนวน 135 ไพโรเมอร์ คิดเป็น 96.43 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุที่ไพโรเมอร์แสดงความแตกต่างได้เพียง 3.57 เปอร์เซ็นต์ อาจจะเป็นเนื่องจากไพโรเมอร์สนิปส์ที่นำมาใช้ในการตรวจสอบครั้งนี้ได้รับการออกแบบจากลำดับเบสของสายพันธุ์ข้าวโพดที่มีในฐานข้อมูล (Maize Genetics Database) ซึ่งไม่ใช่สายพันธุ์ Challenger₆-1 และ NT58WS₆#4 ทำให้เปอร์เซ็นต์ของไพโรเมอร์ที่แสดงความแตกต่างระหว่างสองสายพันธุ์มีเพียง 3.57 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าไพโรเมอร์ทั้งหมดที่แสดงความแตกต่างได้นั้น ตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2 เพียงคู่เดียว ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Puttarach, et al. (2016) ที่ใช้แหล่งของสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอจากแหล่งเดียวกัน จึงไม่พบไพโรเมอร์บนโครโมโซมคู่ที่ 8 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอได้ แต่อย่างไรก็ตามการได้มีการนำไพโรเมอร์สนิปส์ซึ่งค้นพบจากการทดลองนี้ไปทดสอบกับสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอในข้าวโพดข้าวเหนียวจากบริษัท อีสท์ เวสต์ ซีดส์ จำกัด พบว่า มีเครื่องหมายสนิปส์จำนวน 20 เครื่องหมายซึ่งตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 8 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอได้

การประเมินความต้านทานต่อเชื้อรา *Exserohilum turcicum*

ผลการประเมินค่าความต้านทานของประชากรข้าวที่ 2 ต่อเชื้อรา *Exserohilum turcicum* จำนวน 184 ต้น มีค่าคะแนนการเกิดโรค ตั้งแต่ 1 ถึง 9 ในประชากรลูกผสมข้าวที่ 2 (คะแนน 1 หมายถึง ต้นที่ไม่มีการแสดงอาการของโรคเลย และ 9 หมายถึง ต้นที่แสดงอาการของโรค 91-100% ของพื้นที่ใบรวม) พบว่าไม่สามารถแยกพืชที่มีความต้านทานออกจากพืชที่อ่อนแอได้อย่างชัดเจน (ตารางที่ 7) โดยกราฟจำนวนต้นในแต่ละคะแนนการเกิดโรคมีการกระจายแบบต่อเนื่อง พืชที่มีความต้านทานค่าคะแนนการเกิดโรคจะมีค่าน้อย ในทางตรงกันข้ามพืชที่มีความอ่อนแอจะมีค่าที่มาก คะแนนการเกิดโรคตั้งแต่ 1-5 จัดให้อยู่ในกลุ่มของต้นที่มีความต้านทานต่อโรค โดยที่คะแนน 1-3 (R) คือต้านทานต่อโรค , 4-5 คือ ค่อนข้างต้านทาน (MR) , 6 คือ ค่อนข้างอ่อนแอ (MS) ส่วนคะแนนการเกิดโรค 7-9 จัดอยู่ในกลุ่มของต้นที่มีความอ่อนแอ (S) โดยคะแนน 9 คืออ่อนแอต่อโรคมามากที่สุด ซึ่ง

การกระจายตัวดังกล่าวนี้ยังไม่สามารถแยกกลุ่มของต้นที่ต้านทานและอ่อนแอออกจากกันได้อย่างชัดเจน ยังคงปรากฏจำนวนของต้นที่ค่อนข้างต้านทาน (MR) และต้นที่ค่อนข้างอ่อนแอ (MS) ปรากฏออกมา จึงแสดงให้เห็นว่าลักษณะต้านทานต่อเชื้อรา *Exserohilum turcicum* ในประชากรนี้มีอาจมียีนควบคุมหลายยีน หรือเป็นลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait) โดยสอดคล้องกับผลที่ได้จากการทดสอบค่า Chi-square test พบว่าอัตราส่วนที่ได้จากค่าในประชากรรุ่น F_2 กับอัตราส่วนที่คาดหวังนี้มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยอัตราส่วนต้นต้านทาน : ต้นอ่อนแอ ไม่เท่ากับ 3:1 แต่อย่างไรก็ตามจากลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แสดงออกมานั้น มีลักษณะการกระจายตัวที่มีค่าใกล้เคียงกับกฎของเมนเดล ดังจะเห็นได้ว่าจำนวนต้นที่ต้านทานมี 104 ต้น มากกว่าจำนวนต้นที่อ่อนแอที่มี 80 ต้น

การวิเคราะห์ข้อมูลจีโนไทป์

เนื่องจากประชากร F_2 ได้มาจากการผสมพันธุ์ระหว่าง สายพันธุ์แม่ (อ่อนแอ) สายพันธุ์พ่อ (ต้านทาน) เพื่อให้ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 แล้วผสมตัวเองเพื่อให้ได้ประชากรรุ่น F_2 ซึ่งโดยหลักการสร้างประชากรสำหรับทำแผนที่ยีน เมื่อคัดเลือกพันธุ์ที่จะใช้เป็นพ่อแม่ได้แล้ว จึงนำมาผสมกัน เพื่อให้ได้ลูก F_1 โดยทั่วไปถ้าพ่อแม่เป็นพันธุ์แท้ ลูก F_1 จะมีจีโนไทป์เฮเทอโรไซโกต ไม่มีการกระจายตัว และยังไม่สามารถใช้ทำแผนที่ยีนได้ ต้องนำลูกผสม F_1 มาผสมต่อ โดยอาจผสมกลับไปยังพ่อหรือแม่ เพื่อสร้างประชากรลูกผสมกลับ BC_1 (backcross) หรือผสมตัวเองเพื่อให้ได้ลูกรุ่น F_2 ในพืชนอกจากจะใช้ประชากรของลูกรุ่น BC_1 หรือ F_2 แล้วยังสามารถใช้ประชากร recombinant inbred (RI) หรือ ดับเบิลแฮพลอยด์ (double haploid, DH) ได้ด้วย (สุรินทร์, 2552) ซึ่งในการทดลองนี้เลือกใช้ประชากร F_2 เนื่องจากเป็นประชากรที่สร้างได้ง่ายและใช้เวลาในการสร้างประชากรน้อยกว่าประชากรชนิดอื่นๆ ดังการกระจายตัวของอัลลีลหรือเครื่องหมายโมเลกุลจะเป็นสัดส่วน 1 : 2 : 1 (AA : Aa : aa) ผลจากการทดลองนี้ใช้การทดสอบ Chi square test ไพรเมอร์สนิปส์ 5 ไพรเมอร์ ว่ามีการกระจายตัวของอัลลีลในประชากร F_2 แตกต่างจากค่าที่คาดหวังหรือไม่ พบว่าทั้ง 5 มีไพรเมอร์มีการกระจายตัวของอัลลีลตรงตามค่าคาดหวัง คือ 1 : 2 : 1 (AA : Aa : aa) ซึ่งคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ของไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบกับประชากรชั่วที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Welz et al. (2000) กล่าวว่าการแสดงออกของยีน *Ht1* เป็นการแสดงออกแบบข่มสมบูรณ (dominance) และจากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์พบว่าทั้ง 5 เครื่องหมายมีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ในการทดลองนี้ พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ทั้ง 5 เครื่องหมาย ซึ่งตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 2 ของข้าวโพดมีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานต่อเชื้อรา *Exserohilum turcicum* คือให้ค่า LOD เท่ากับ 9.43, 9.04, 8.15, 8.03 และ 7.54 โดยค่า LOD score ทั้งหมดที่ได้มีค่ามากกว่าค่าที่ยอมรับได้คือ เท่ากับ 3 และมีค่าความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ฟีโนไทป์ (PVE) เท่ากับ 21, 20.2, 18.5, 18.2 และ 17.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งการทดลองนี้ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Puttarach et al. (2016) รายงานผลการศึกษาการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR ช่วยในการคัดเลือกลักษณะความต้านทานต่อโรค ใบไหม้แผลใหญ่ โดยทำการตรวจสอบ polymorphism ระหว่างสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอต่อโรค และใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่แสดงความแตกต่างนี้ นำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะการเป็นโรครกับเครื่องหมายโมเลกุล ในประชากร F_2 จำนวน 157 ต้น พบว่า มี 2 ไพรเมอร์ คือ bnlq1721 และ umc1042 ที่ 6.7 cM บนโครโมโซมที่ 2 ที่แสดงความเชื่อมโยงกับยีน *Ht1* ที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรค ซึ่งให้ค่าความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ฟีโนไทป์ (PVE) เท่ากับ 27 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังได้ผลจากนำเครื่องหมายสนิปส์บนโครโมโซม 8 ทั้ง 20 เครื่องหมายไปทดสอบกับประชากรข้าวโพดข้าวเหนียวลูกผสมชั่วที่ 2 เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับความต้านทานโรค พบว่ามีเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ 2 เครื่องหมาย ที่มีความสัมพันธ์กับความกับลักษณะความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ในประชากรข้าวโพดข้าวเหนียวนี้ ซึ่งให้ค่าความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ฟีโนไทป์ (PVE) เท่ากับ 37.6 เปอร์เซ็นต์ และให้ค่า LOD score ที่สูงถึง 43.15 จากผลการทดลองร่วมกันที่ได้ในครั้งนี้นี้พบว่า สามารถพัฒนาเครื่องหมายสนิปส์บนโครโมโซมที่ 2 จำนวน 5 เครื่องหมาย และบนโครโมโซมที่ 8 จำนวน 2 เครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ดีเอ็นเอกับลักษณะความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ซึ่งให้ค่าความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ฟีโนไทป์ (PVE) มากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ และหากสามารถรวมยีนความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่จากทั้งสองประชากรนี้เข้าด้วยกันแล้วอาจส่งผลให้มีค่า ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ฟีโนไทป์ (PVE) มากถึงเกือบ 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งนับว่าเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดให้มีความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดหวานที่ต้านทาน และอ่อนแอโรค โดยการปลูกเชื้อรา *Exserohilum turcicum* การทดสอบปลูกเชื้อสาเหตุ *Exserohilum turcicum* ของโรคใบไหม้แผลใหญ่จากแหล่งมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย เชียงใหม่ (MJU) กับสายพันธุ์ข้าวโพดหวาน ทั้ง 8 สายพันธุ์ พบว่า ทั้ง 8 สายพันธุ์ มีคะแนนการเป็นโรคใบไหม้แผลใหญ่ที่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยสายพันธุ์ Challenger_S-1 และสายพันธุ์ Sugar73S₇-18 มีปฏิกิริยาของพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคสูงสุด ที่ระดับ 1.0 คะแนน ในขณะที่สายพันธุ์ NT58WS₆#4 และ Cabaret(W)S4-B มีปฏิกิริยาของพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคสูงสุด ที่ระดับ 9.0 แต่เนื่องจาก เมื่อทำการทดสอบคุณภาพการบริโภคร่วมแล้วพบว่า สายพันธุ์ Challenger_S-1 มีคุณภาพการบริโภคร่วมที่ดีกว่าทั้งยังมีอายุการออกดอกที่เร็วกว่า ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ Challenger_S-1 เป็นสายพันธุ์พ่อเพื่อที่จะนำมาผลิตลูกผสมชั่วที่ 1 ส่วนสายพันธุ์อ่อนแอ หากพิจารณาจากความเป็นสายพันธุ์แท้แล้วจะเห็นได้ว่า สายพันธุ์ NT58WS₆#4 มีความเป็นสายพันธุ์แท้มากกว่า ประกอบกับผลการทดสอบในด้านคุณภาพการบริโภคร่วมพบว่า สายพันธุ์ NT58WS₆#4 มีคุณภาพการบริโภคร่วมที่ดีกว่า ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ NT58WS₆#4 มาใช้เป็นสายพันธุ์แม่ในการผลิตลูกผสมชั่วที่ 1 เพื่อจะได้ข้าวโพดหวานสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (F₁ population) ที่มีคุณภาพในการบริโภคร่วมที่ดีและมีความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่

2. การคัดเลือกไพโรมอร์สนิปส์ จากการตรวจสอบไพโรมอร์สนิปส์ ทั้งหมด 140 ไพโรมอร์ จากโครโมโซม 2 และ 8 ทั้งหมด 92 และ 48 ไพโรมอร์ กับตัวอย่างพันธุ์ต้านทานหรือ สายพันธุ์พ่อ Challenger_S-1 และพันธุ์อ่อนแอหรือ สายพันธุ์แม่ NT58WS₆#4 ได้ไพโรมอร์ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ทั้งหมด 5 ไพโรมอร์ ได้แก่ MZSNP-0065744, MZSNP-0055106, MZSNP-0063922, MZSNP-0073150 และ MZSNP-0070164 และไพโรมอร์ที่ไม่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่จำนวน 135 ไพโรมอร์ ซึ่งไพโรมอร์ทั้งหมดที่แสดงความแตกต่างได้นั้นตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2 เพียงคู่เดียว ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Puttarach et al., (2016) ที่ใช้แหล่งของสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแามาจากแหล่งเดียวกัน จึงไม่พบไพโรมอร์บนโครโมโซมคู่ที่ 8 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอได้

3. ผลการประเมินค่าความต้านทานของประชากรข้าวที่ 2 ต่อเชื้อรา *Exserohilum turcicum* หรือค่าคะแนนการเกิดโรค ตั้งแต่ 1 ถึง 9 ในประชากรลูกผสมข้าวที่ 2 พบว่าไม่สามารถแยกต้นข้าวโพดหวานที่มีความต้านทานออกจากต้นที่อ่อนแอได้อย่างชัดเจน โดยกราฟจำนวนต้นในแต่ละคะแนนการเกิดโรคมีการกระจายแบบต่อเนื่อง พืชที่มีความต้านทานค่าคะแนนการเกิดโรคจะมีค่าน้อย ในทางตรงกันข้ามพืชที่มีความอ่อนแอจะมีค่าที่มาก คะแนนการเกิดโรคตั้งแต่ 1-5 จัดให้อยู่ในกลุ่มของต้นที่มีความต้านทาน ส่วนคะแนนการเกิดโรค 6-9 จัดอยู่ในกลุ่มของต้นที่มีความอ่อนแอ ซึ่งการกระจายตัวดังกล่าวนี้ยังไม่สามารถแยกกลุ่มของต้นที่ต้านทานและอ่อนแอออกจากกันได้อย่างชัดเจน ยังคงปรากฏจำนวนของต้นที่ค่อนข้างต้านทาน (MR) และต้นที่ค่อนข้างอ่อนแอ (MS) ปรากฏให้เห็นอยู่

4. การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะทางฟีโนไทป์ จากการปลูกเชื้อสาเหตุ (*Exserohilum turcicum*) ในประชากรข้าวโพดหวานลูกผสมข้าวที่ 2 จำนวน 184 ต้น แล้วทำการประเมินการเกิดโรคใบไหม้แผลใหญ่ โดยการให้คะแนนการเป็นโรค 1-9 ที่ระยะ 56 วันหลังปลูก จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปทดสอบอัตราส่วนของการกระจายตัวทางฟีโนไทป์เพื่อวิเคราะห์จำนวนยีนที่ควบคุมความต้านทานโรค โดยวิธีการทดสอบ Chi-square test จากคะแนนการเกิดโรคใบไหม้แผลใหญ่ พบว่าค่า Chi-square ที่คำนวณได้เท่ากับ 33.51 ซึ่งมีค่ามากกว่าค่า Chi-square ในตารางที่ความน่าจะเป็น 0.05 ที่ระดับความเป็นอิสระเท่ากับ 1 มีค่าเท่ากับ 3.84 แสดงว่าอัตราส่วนที่ได้จากค่าสังเกตในประชากรรุ่น F_2 กับอัตราส่วนที่คาดหมายนี้มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยอัตราส่วนต้านทาน : ต้นอ่อนแอ ไม่เท่ากับ 3:1 จึงแสดงให้เห็นว่าลักษณะต้านทานต่อเชื้อรา *Exserohilum turcicum* ในประชากรนี้มีอาจมียีนควบคุมหลายยีน หรือเป็นลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait)

5. การวิเคราะห์ข้อมูลจีโนไทป์ เนื่องจากประชากร F_2 ดังการกระจายตัวของอัลลีลหรือเครื่องหมายโมเลกุลจะเป็นสัดส่วน 1 : 2 : 1 (AA : Aa : aa) ผลจากการทดลองนี้ใช้การทดสอบ Chi square test ไพรเมอร์สนิปส์ 5 ไพรเมอร์ ว่ามีการกระจายตัวของอัลลีลในประชากร F_2 แตกต่างจากค่าที่คาดหวังหรือไม่ พบว่าทั้ง 5 มีไพรเมอร์มีการกระจายตัวของอัลลีลตรงตามค่าคาดหวัง คือ 1 : 2 : 1 (AA : Aa : aa) ซึ่งคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ของไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบกับประชากรข้าวที่ 2 ซึ่งผลวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์พบว่าทั้ง 5 เครื่องหมายมีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่

6. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจีโนไทป์และฟีโนไทป์ในการทดลองนี้ พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลสไนป์ส์ทั้ง 5 เครื่องหมาย ได้แก่ MZSNP-0055106, MZSNP-0065744, MZSNP-0070164, MZSNP-0063922 และ MZSNP-0073150 ซึ่งตั้งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 2 ของข้าวโพดมีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานต่อเชื้อรา *Exserohilum turcicum* คือมีค่าความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ฟีโนไทป์ (PVE) เท่ากับ 21, 20.2, 18.5, 18.2 และ 17.2 เปอร์เซ็นต์ และให้ค่า LOD เท่ากับ 9.43, 9.04, 8.15, 8.03 และ 7.54 ตามลำดับ



บรรณานุกรม

- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2559. **ระบบสารสนเทศการผลิตทางเกษตร**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://production.doae.go.th/report>. (16 กันยายน 2560).
- กรรณิการ์ จันบุญมี และธนิต โสภโณดร. 2545. ข้าวโพดพืชไร่มีแต่รุ่งไม่มีร่วง. **กสิกร**, (5), น.17-21.
- กฤษฎา สัมพันธ์รักษ์. 2546. **ปรับปรุงพันธุ์พืช : พื้นฐาน วิธีการและแนวคิด**. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.
- กัญญา ศิริธัญญา และ พิมพ์พรรณ เมืองมา. 2556. เทคนิคการประเมินความต้านทานโรคใบไหม้ แผลใหญ่ และการจำแนกตำแหน่งยืนต้นต้านทานด้วยโมเลกุลเครื่องหมายในข้าวโพด. ใน **การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 5. 15-16 กรกฎาคม 2556 ณ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ลำปาง**.
- จำเริญ พุทธราช ประวิตร พุทธานนท์ วราภรณ์ แสงทอง และ เสกสรร สงจันทิก. 2554. การคัดเลือกสายพันธุ์ผสมตัวเองชั่วที่ 5 ของข้าวโพดหวานต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่โดยการปลูกเชื้อจาก 4 แหล่ง. ใน **การประชุมวิชาการข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 35. 24-27 พฤษภาคม 2554 ณ โรงแรมมารวยการ์เด็น. กรุงเทพฯ**.
- เขาวนาถ พุทธิเทพ กิตติภพ วายุภาพ จิราลักษณ์ ภูมิไชยสง และ ชูชาติ บุญศักดิ์. 2554. การประเมินความต้านทานของพันธุ์ข้าวโพดหวานต่อเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้แผลใหญ่. ใน **การประชุมวิชาการข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 35. 24-27 พฤษภาคม 2554 ณ โรงแรมมารวยการ์เด็น. กรุงเทพฯ**.
- ทวีศักดิ์ ภู่อำ. 2540. **ข้าวโพดหวาน : การปรับปรุงพันธุ์และการปลูกเพื่อการค้า**. โอเดียนสโตร์: กรุงเทพฯ.
- พรพรรณ สุทธิแย้ม อารดา มาสรี ปวีณา ไชยวรรณ เขาวนาถ พุทธิเทพ ชูชาติ บุญศักดิ์ วลัยพร ศศิประภา โสพิศ ใจปาละ สุพรรณณี เป็งคำ ศิวีไล ลาภบรรจบ วรกานต์ ยอดชมภู บุญเหลือ ศรีมุงคุณ. 2559. การศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศต่อเทคโนโลยีการผลิตคุณภาพผลผลิต การระบาดของโรค แมลงศัตรูพืช และวัชพืชในแหล่งปลูกพืชไร่เศรษฐกิจสำคัญ. ใน **รายงานการวิจัยการศึกษาผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศต่อการผลิตพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.doa.go.th/research/attachment.php>. (16 กันยายน 2560).
- ไทยโพสต์. 2562. **การส่งออกข้าวโพดหวาน**.ไทยโพสต์. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <https://www.thaipost.net/main/detail/27471>. (19 มกราคม 2562).

- สถาบันวิจัยพืชไร่. 2550. **ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของข้าวโพดหวาน**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.lib.kps.ku.ac.th/SpecialProject/Agricultural_Biotechnology/2550/Bs/RungthipwanPh/chapter.pdf. (20 มีนาคม 2560).
- สภาเกษตรกรแห่งชาติ. 2561. **ข้าวโพดหวานและการปลูกข้าวโพดหวาน**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <https://www.nfc.or.th/content/6944>. (27 พฤศจิกายน 2561).
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2560. **สถิติการส่งออกข้าวโพดหวาน**. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา www.oae.go.th/view/1/ตารางแสดงรายละเอียดข้าวโพดหวาน/TH-TH. (5 พฤษภาคม 2561).
- สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์. 2552. **การปรับปรุงพันธุ์พืช**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.
- สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.
- สุริพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช (DNA Marker in Plant Breeding) **วารสารวิชาการ ม.อ. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี**, 5(2).น. 37-58.
- Bashan, B & Levy, Y. 1992. Differential response of sweet corn cultivars to phytotoxic water-soluble compounds from culture filtrates of *Exserohilum turcicum*. **Plant Disease**, 76(5), 451-454.
- Bilha, B., Abadi, R. & Levy, Y. 1996. Involvement of a phytotoxic peptide in the development of the Northern leaf blight of corn. **European Journal of Plant Pathology**, 102(9), 891-893.
- Blandino, M., Galeazzi, M., Savoia, W. & Reyneri, A. 2012. Timing of azoxystrobin propiconazole application on maize to control northern corn leaf blight and maximize grain yield. **Field Crops Research**, 139, 20-29.
- Chen, G., Wang, X., Long, S., Jaqueth, J., Li, B., Yan, J. & Ding, J. 2016. Mapping of QTL conferring resistance to northern corn leaf blight using high-density SNPs in maize. **Molecular Breeding**, 36(1), 4.
- Ching, A., Caldwell, K. S., & Jung, M. 2002. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. **BMC Genet**, 3, 19.
- Ding, J., Ali, F., Chen, G., Li, H., Mahuku, G., Yang, N., Narro, L., Magorokosho, C., Makumbi, D. & Yan, J. 2015. Genome-wide association mapping reveals novel

- sources of resistance to northern corn leaf blight in maize. **BMC Plant Biology**, 15(1), 206.
- Doerge, R. W. 2002. **Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations**. Indiana: Genetics.
- Edwards, K. J. & Mogg, R. 2001. **Plant genotyping by analysis of single nucleotide polymorphism**. In R.J. Henry (ed.), **Plant Genotyping : The DNA Fingerprinting of Plants**. CABI Publishing: Oxon, U.K.
- Galiano-Carneiro, A. L. & Miedaner, T. 2017. Genetics of Resistance and Pathogenicity in the Maize/*Setosphaeria turcica* Pathosystem and Implications for Breeding. **Frontiers in Plant Science**, 8, 1490.
- Gevers, H. O. 1975. A new major gene for resistance to *Helminthosporium turcicum* leaf blight of maize [Breeding, fungus diseases]. **Plant Disease Reporter**, ISSN : 0032-0081.
- Hooker, A. L. 1963. Inheritance of chlorotic-lesion resistance to *Helminthosporium turcicum* in seedling corn. **Phytopathology**, 53(6), 660.
- Hooker, A. L. 1977. A second major gene locus in corn for chlorotic-lesion resistance to *Helminthosporium turcicum*. **Crop Science**, 17(1), 132-135.
- Inghelandt, V., Delphine, M., Albrecht E., Martinant, J. P. & Stich, B. 2012. Genome-wide association mapping of flowering time and northern corn leaf blight (*Setosphaeria turcica*) resistance in a vast commercial maize germplasm set. **BMC Plant Biology**, 12(1), 56.
- Khampila, J., Lertrat, K., Saksirirat, W., Sanitchon, J., Muangsan, N. & Theerakulpisut, P. 2008. Identification of RAPD and SCAR markers linked to northern leaf blight resistance in waxy corn (*Zea mays* var. *ceratina*). **Euphytica**, 164(3), 615- 625.
- Li, P., Xiao-dong, G., Hui, J., Yong-shan, F., Yun-feng, Z., Zhi-yan, C., Zhi-min, H., Jian-min, H., Shou-qin, G. & Jin-gao, D. 2016. MAP kinase gene STK1 is required for hyphal, conidial, and appressorial development, toxin biosynthesis, pathogenicity, and hypertonic stress response in the plant pathogenic fungus *Setosphaeria turcica*. **Journal of Integrative Agriculture**, 15(12), 2786- 2794.
- Liu, W. Y., Kang, J. H., Jeong, H. S., Choi, H. J., Yang, H. B., Kim, K. T. Choi, D., Choi, G. J., Jahn M. & B.C. Kang. 2014. Combined use of segregant analysis and

- microarrays reveals SNP markers pinpointing a major QTL for resistance to *Phytophthora capsici* in pepper. **Theor Appl Genet**, 127, 2503-2513.
- McCouch, S. & Tanksley, S. D. 1991. **Development and use of restriction fragment length polymorphisms in rice breeding and genetic**. Rice biotechnology. Wallingford: CAB International.
- Morton, N. E. 1955. Sequential tests for the detection of linkage. **Am. J. Hum. Genet**, 7(3), 277-318.
- Pataky, J. K. & Ledencan, T. 2006. Resistance conferred by the Ht1 gene in sweet corn infected by mixtures of virulent and avirulent *Exserohilum turcicum*. **Plant Disease**, 90(6), 771-776.
- Pataky, J. K., 1994. Effects of races 0 and 1 of *Exserohilum turcicum* on sweet corn hybrids differing for Ht-and partial resistance to northern leaf blight. **Plant Disease**, 78(12), 1189-1193.
- Pataky, J. K., Raid, R. N., Du-Toit, L. J. & Schueneman, T. J. 1998. Disease severity and yield of sweet corn hybrids with resistance to northern leaf blight. **Plant Disease**, 82(1), 57-63.
- Pedersen, W. L. & Oldham, M G. 1992. Effect of three tillage practices on development of northern corn leaf blight (*Exserohilum turcicum*) under continuous corn. **Plant disease**, 76(11), 1161-1164.
- Pedersen, W., Perkins, L., Radtke, J. M. & Miller, R. J. 1986. Field evaluation of corn inbreds and selections for resistance to *Exserohilum turcicum* race 2. **Plant Disease**, 70, 376-377.
- Punyalue, A., Jongjaidee, J., Jamjod, S. & Rerkasem, B. 2015. Reduce burning in maize production by relay cropping with legume. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, 5, 17-21.
- Puttarach, J., Puddhanon, P., Siripin, S., Sangtong, V. & Songchantuek, S. 2016. Marker assisted selection for resistance to Northern Corn Leaf Blight in sweet corn. **SABRAO Journal of Breeding & Genetics**, 48(1), 72-79.
- Raitio, M., Perala, A., Harinen, R. R., & Lampinen, J. 2012. **Validation of KASPar™ dual FRET based SNP genotyping assay**. Finland: Thermo Fisher Scientific.
- Setyawan, B., Suliansyah, I., Anwar, A. & Swasti, E. 2016. Resistance of eleven new

- hybrid maize genotypes to Turcicum leaf blight (*Exserohilum turcicum*). **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, 17(2), 604-608.
- Shurtleff, M. C. 1980. **Compendium of Corn Diseases**. American Phytopathological Society: St. Paul Minnesota.
- Simcox, K. D. & Bennetzen, J. L. 1993. Mapping the *HtN* resistance gene to the long arm of chromosome 8. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, 67, 118-118.
- Strange, R. N. & Scott, P. R. 2005. Plant disease: a threat to global food security. **Annual Review of Phytopathology**, 43, 83-116.
- Tanksley, S. D., Young, N.D., Patterson, A. H. & Bonierbale, M. W. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. **Bio/Technology**, 7, 257.
- Technow, F., Bürger, A. & Melchinger, A. E. 2013. **Genomic prediction of northern corn leaf blight resistance in maize with combined or separated training sets for heterotic groups**. *Genes, Genomes, Genetics*. 3(2), 197–203.
- Wang, H., Xiao, Z. X., Wang, F. G., Xiao, Y. N., Zhao, J. R., Zheng, Y. L. & Qiu, F. Z. 2012. Mapping of HtNB, a gene conferring non-lesion resistance before heading to *Exserohilum turcicum* (Pass.), in a maize inbred line derived from the Indonesian variety Bramadi. **Genetics and Molecular Research**, 11(3), 2523-2533.
- Wathaneeyawech, S., Sirithunya, P. & Smitamana, P. 2015. Study of the host range of northern corn leaf blight disease and effect of *Exserohilum turcicum* toxin on sweet corn. **Journal of Agricultural Technology**, 11, 953-963.
- Welz, H. G. & Geiger, H. H. 2000. Genes for resistance to northern corn leaf blight in diverse maize populations. **Plant Breeding**, 119, 1-14.
- Wilhelm, W. W., Johnson, J. M. F., Hatfield, J. L., Voorhees, W. B. & Linden, D. R. 2004. Crop and soil productivity response to corn residue removal. **Agronomy Journal**, 96(1), 1-17.
- Zhang, L. H., Dong, J. G., Wang, C. H. & Li, Z. Pi. 2007. Purification and structural analysis of a selective toxin fraction produced by the plant pathogen *Setosphaeria turcica*. **Agricultural Sciences in China**, 6(4), 452-457.
- Zhang, S. R., Hao, Z. M., Wang, L. H., Shen, S., Cao, Z. Y., Xin, Y. Y., Hou, M. L., Gu, S.

Q., Hou, J. M. & Dong, J. G. 2012. StRas2 regulates morphogenesis conidiation and appressorium development in *Setosphaeria turcica*. **Microbiological Research**, 167(8), 478-486.



ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงจำนวนเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์แม่อ่อนแอ (NT58WS₆#4) และสายพันธุ์พ่อต้านทาน (ChallengerS₆-1)

ฝักที่	จำนวนเมล็ด
1	196
2	195
3	183
4	192
5	184
รวม	950
เฉลี่ย	190

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงจำนวนเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 2 ที่ได้จากการผสมตัวเองของลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างสายพันธุ์แม่อ่อนแอ (NT58WS₆#4) และสายพันธุ์พ่อต้านทาน (ChallengerS₆-1)

ฝักที่	จำนวนเมล็ด
1	290
2	298
3	299
4	299
5	298
6	296
รวม	1780
เฉลี่ย	297

ตารางภาคผนวกที่ 3 แสดงรายชื่อเครื่องหมายสนิปส์บนโครโมโซมที่ 2

No.	ID	No.	ID
1	MZSNP-NCLB-02-0000007	25	MZSNP-0016741
2	MZSNP-NCLB-02-0000012	26	MZSNP-0016749
3	MZSNP-NCLB-02-0000018	27	MZSNP-0016750
4	MZSNP-NCLB-02-0000026	28	MZSNP-0016751
5	MZSNP-NCLB-02-0000030	29	MZSNP-0016752
6	MZSNP-NCLB-02-0000046	30	MZSNP-0016754
7	MZSNP-NCLB-02-0000049	31	MZSNP-0016758
8	MZSNP-NCLB-02-0000061	32	MZSNP-0016781
9	MZSNP-NCLB-02-0000069	33	MZSNP-0016782
10	MZSNP-NCLB-02-0000070	34	MZSNP-0016784
11	MZSNP-NCLB-02-0000073	35	MZSNP-0016785
12	MZSNP-NCLB-02-0000077	36	MZSNP-0016786
13	MZSNP-NCLB-02-0000105	37	MZSNP-0016787
14	MZSNP-NCLB-02-0000111	38	MZSNP-0016791
15	MZSNP-NCLB-02-0000119	39	MZSNP-0016794
16	MZSNP-0016714	40	MZSNP-0016796
17	MZSNP-0016715	41	MZSNP-0016797
18	MZSNP-0016716	42	MZSNP-0016799
19	MZSNP-0016722	43	MZSNP-0016800
20	MZSNP-0016724	44	MZSNP-0016802
21	MZSNP-0016725	45	MZSNP-0016809
22	MZSNP-0016726	46	MZSNP-0016810
23	MZSNP-0016731	47	MZSNP-0016816
24	MZSNP-0016732	48	MZSNP-0016824

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ)

No.	ID	No.	ID
49	MZSNP-0016733	71	MZSNP-0016825
50	MZSNP-0016734	72	MZSNP-0016826
51	MZSNP-0016736	73	MZSNP-0016827
52	MZSNP-0016839	74	MZSNP-0065746
53	MZSNP-0016849	75	MZSNP-0065747
54	MZSNP-0016851	76	MZSNP-0066001
55	MZSNP-0055106	77	MZSNP-0066883
56	MZSNP-0055995	78	MZSNP-0066884
57	MZSNP-0057502	79	MZSNP-0066885
58	MZSNP-0057825	80	MZSNP-0066886
59	MZSNP-0059611	81	MZSNP-0066983
60	MZSNP-0060087	82	MZSNP-0069693
61	MZSNP-0060245	83	MZSNP-0070164
62	MZSNP-0060497	84	MZSNP-0071240
63	MZSNP-0062755	85	MZSNP-0072585
64	MZSNP-0063921	86	MZSNP-0073150
65	MZSNP-0063922	87	MZSNP-0074070
66	MZSNP-0065250	88	MZSNP-0074118
67	MZSNP-0065251	89	MZSNP-0074274
68	MZSNP-0065445	90	MZSNP-0074308
69	MZSNP-0065744	91	MZSNP-0074421
70	MZSNP-0065745	92	MZSNP-0075557

ตารางภาคผนวกที่ 4 แสดงรายชื่อเครื่องหมายสนิปส์บนโครโมโซมที่ 8

1	MZSNP-NCLB-08-001	25	MZSNP-NCLB-08-025
2	MZSNP-NCLB-08-002	26	MZSNP-NCLB-08-026
3	MZSNP-NCLB-08-003	27	MZSNP-NCLB-08-027
4	MZSNP-NCLB-08-004	28	MZSNP-NCLB-08-028
5	MZSNP-NCLB-08-005	29	MZSNP-NCLB-08-029
6	MZSNP-NCLB-08-006	30	MZSNP-NCLB-08-030
7	MZSNP-NCLB-08-007	31	MZSNP-NCLB-08-031
8	MZSNP-NCLB-08-008	32	MZSNP-NCLB-08-032
9	MZSNP-NCLB-08-009	33	MZSNP-NCLB-08-033
10	MZSNP-NCLB-08-010	34	MZSNP-NCLB-08-034
11	MZSNP-NCLB-08-011	35	MZSNP-NCLB-08-035
12	MZSNP-NCLB-08-012	36	MZSNP-NCLB-08-036
13	MZSNP-NCLB-08-013	37	MZSNP-0016852
14	MZSNP-NCLB-08-014	38	MZSNP-0058018
15	MZSNP-NCLB-08-015	39	MZSNP-0064919
16	MZSNP-NCLB-08-016	40	MZSNP-0064920
17	MZSNP-NCLB-08-017	41	MZSNP-0064921
18	MZSNP-NCLB-08-018	42	MZSNP-0064922
19	MZSNP-NCLB-08-019	43	MZSNP-0068234
20	MZSNP-NCLB-08-020	44	MZSNP-0069581
21	MZSNP-NCLB-08-021	45	MZSNP-0069582
22	MZSNP-NCLB-08-022	46	MZSNP-0069583
23	MZSNP-NCLB-08-023	47	MZSNP-0069584
24	MZSNP-NCLB-08-024	48	MZSNP-0069585

ตารางภาคผนวกที่ 5 แสดงข้อมูลคะแนนการเกิดโรคใบไหม้แผลใหญ่ (ข้อมูลพีโนไทป์) และข้อมูลผลตรวจจีโนไทป์ (ข้อมูลจีโนไทป์) ของเครื่องหมายโมเลกุล MZSNP-0055106, MZSNP-006574, MZSNP-0070164, MZSNP-0063922 และ MZSNP-0073150 ในประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2 population) จำนวน 184 ต้น

Plant No.	Phenotype		Genotype score				
	score	NCLB score	MZSNP-0065744	MZSNP-0055106	MZSNP-0070164	MZSNP-0073150	MZSNP-0063922
1	5		H	H	H	H	H
2	6		H	H	H	H	H
3	6		H	H	H	H	H
4	5		B	B	B	B	B
5	3		A	A	A	A	A
6	7		B	B	B	B	B
7	6		B	B	B	B	B
8	5		H	-	H	H	H
9	5		H	H	H	H	H
10	8		B	B	B	B	B
11	7		B	B	B	B	B
12	2		A	A	A	H	A
13	8		H	H	H	H	H
14	3		A	A	A	A	A
15	3		A	A	A	H	H
16	5		H	H	H	H	H

ตารางภาคผนวกที่ 5 (ต่อ)

Plant No.	Phenotype score	Genotype score				
	NCLB score	MZSNP-0065744	MZSNP-0055106	MZSNP-0070164	MZSNP-0073150	MZSNP-0063922
17	3	H	H	H	H	H
18	3	H	H	H	H	H
19	3	A	A	A	A	A
20	6	H	H	H	H	H
21	4	A	A	A	A	A
22	6	B	B	B	B	B
23	5	H	H	H	H	H
24	5	H	H	H	H	H
25	3	A	A	A	A	A
26	4	A	A	A	A	A
27	6	H	H	H	H	H
28	6	H	H	H	H	H
29	5	B	B	B	B	B
30	3	A	A	A	A	A
31	4	B	B	B	B	B
32	8	H	H	H	H	H
33	7	H	H	H	H	H
34	5	B	B	B	B	B
35	4	H	H	H	H	H

ตารางภาคผนวกที่ 5 (ต่อ)

Plant No.	Phenotype score	Genotype score				
	NCLB score	MZSNP-0065744	MZSNP-0055106	MZSNP-0070164	MZSNP-0073150	MZSNP-0063922
36	4	A	A	A	A	A
37	6	H	H	H	H	H
38	6	H	H	H	H	H
39	2	A	A	H	A	A
40	3	H	H	H	H	H
41	2	B	B	B	B	B
42	3	B	B	B	B	B
43	2	A	A	A	A	A
44	2	H	H	H	H	H
45	5	H	H	H	H	H
46	6	B	B	B	B	B
47	2	H	H	A	H	H
48	6	H	H	H	H	H
49	5	H	H	H	H	H
50	7	H	H	H	H	H
51	8	H	H	A	H	H
52	6	H	H	H	H	H
53	6	B	B	B	B	B
54	3	A	A	A	A	A

ตารางภาคผนวกที่ 5 (ต่อ)

Plant No.	Phenotype		Genotype score				
	score	NCLB score	MZSNP-0065744	MZSNP-0055106	MZSNP-0070164	MZSNP-0073150	MZSNP-0063922
55	3		A	A	A	A	-
56	4		A	A	A	A	A
57	3		A	A	A	A	A
58	6		H	H	H	H	H
59	3		A	A	A	A	A
60	3		A	A	A	A	A
61	4		H	H	H	H	H
62	4		H	H	H	H	H
63	3		H	H	H	H	H
64	3		H	H	H	H	H
65	4		H	H	H	H	H
66	6		H	H	H	H	H
67	6		H	H	H	H	H
68	6		H	H	H	H	H
69	5		H	H	H	H	H
70	5		H	H	H	H	H
71	3		A	A	A	A	A
72	4		H	B	B	B	B

ตารางภาคผนวกที่ 5 (ต่อ)

Plant No.	Phenotype		Genotype score				
	score	NCLB score	MZSNP-	MZSNP-	MZSNP-	MZSNP-	MZSNP-
			0065744	0055106	0070164	0073150	0063922
73	3		H	H	H	H	H
74	4		H	H	H	H	H
75	2		A	A	A	A	A
76	7		H	H	H	H	H
77	4		B	B	B	B	B
78	2		B	B	B	B	B
79	4		H	H	H	H	H
80	4		H	H	H	H	H
81	5		A	H	H	H	H
82	5		B	B	B	B	B
83	3		B	B	B	B	B
84	3		A	A	A	A	A
85	3		B	B	B	B	B
86	2		B	H	B	B	B
87	3		A	A	A	A	A
88	2		A	A	A	A	A
89	2		H	H	H	H	H
90	6		B	B	B	B	B

ตารางภาคผนวกที่ 5 (ต่อ)

Plant No.	Phenotype		Genotype score				
	score	NCLB score	MZSNP-	MZSNP-	MZSNP-	MZSNP-	MZSNP-
			0065744	0055106	0070164	0073150	0063922
109	6		B	B	B	B	B
110	1		H	H	H	H	H
111	8		B	B	B	B	B
112	5		B	B	H	B	B
113	5		H	H	H	H	H
114	4		B	B	B	B	B
115	4		H	H	H	H	H
116	3		B	B	B	B	B
117	6		B	B	B	B	B
118	4		A	A	A	A	A
119	4		B	B	B	B	B
120	3		A	A	A	A	A
121	4		A	A	A	A	A
122	3		A	A	A	A	A
123	2		B	B	B	B	B
124	3		H	H	H	H	H
125	2		A	A	A	A	A
126	2		A	A	A	A	A

ตารางภาคผนวกที่ 5 (ต่อ)

Plant No.	Phenotype		Genotype score				
	score	NCLB score	MZSNP-0065744	MZSNP-0055106	MZSNP-0070164	MZSNP-0073150	MZSNP-0063922
127	3		A	A	A	A	A
128	2		A	A	A	A	A
129	5		H	H	H	H	H
130	6		H	H	H	H	H
131	3		B	B	B	B	B
132	2		H	H	H	H	H
133	8		B	B	B	B	B
134	5		B	B	B	B	B
135	6		H	H	H	H	H
136	4		H	H	H	H	H
137	2		H	H	H	H	H
138	1		H	H	H	H	H
139	7		H	H	H	H	H
140	2		A	A	A	A	A
141	3		A	A	A	A	A
142	5		H	H	H	H	H
143	4		A	A	A	A	A
144	3		H	H	H	H	H

ตารางภาคผนวกที่ 5 (ต่อ)

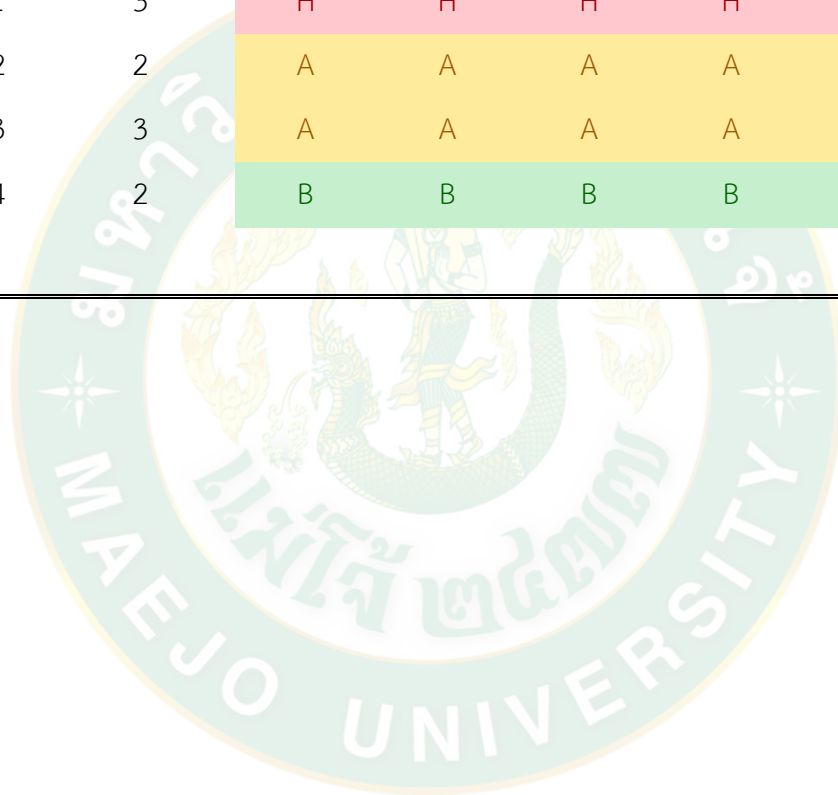
Plant No.	Phenotype		Genotype score				
	score	NCLB score	MZSNP-0065744	MZSNP-0055106	MZSNP-0070164	MZSNP-0073150	MZSNP-0063922
145	2		H	H	H	H	H
146	3		H	H	H	H	H
147	3		H	H	H	H	H
148	3		H	H	H	H	H
149	5		H	H	H	H	H
150	5		H	H	H	H	H
151	2		H	H	H	H	H
152	3		A	A	A	A	A
153	6		H	H	H	H	H
154	3		H	H	H	H	H
155	2		H	H	H	H	H
156	8		B	B	B	B	B
157	6		H	H	H	H	H
158	5		H	H	H	H	H
159	6		B	B	B	B	B
160	3		A	A	A	A	A
161	8		H	H	H	A	A
162	5		H	H	H	H	H

ตารางภาคผนวกที่ 5 (ต่อ)

Plant No.	Phenotype		Genotype score				
	score	NCLB score	MZSNP-0065744	MZSNP-0055106	MZSNP-0070164	MZSNP-0073150	MZSNP-0063922
163	4		H	H	H	H	H
164	3		H	H	H	H	H
165	6		H	H	H	H	-
166	8		H	H	H	H	H
167	7		B	B	B	B	B
168	6		H	H	H	H	H
169	5		A	A	A	A	A
170	3		H	H	H	H	H
171	7		H	H	H	H	H
172	2		A	A	A	A	A
173	7		H	H	H	H	H
174	3		A	A	A	A	A
175	6		H	H	H	H	H
176	2		A	A	A	A	A
177	7		H	H	H	H	H
178	5		H	H	H	H	H
179	2		H	H	H	H	H
180	3		A	A	A	A	-

ตารางภาคผนวกที่ 5 (ต่อ)

Plant No.	Phenotype score	Genotype score				
	NCLB score	MZSNP-0065744	MZSNP-0055106	MZSNP-0070164	MZSNP-0073150	MZSNP-0063922
181	3	H	H	H	H	H
182	2	A	A	A	A	A
183	3	A	A	A	A	A
184	2	B	B	B	B	B



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	เกศฎาภรณ์ จันดี๊ะ
เกิดเมื่อ	27 พฤศจิกายน 2529
ประวัติการศึกษา	พ.ศ.2552 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพืชผัก มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ พ.ศ.2547 สายวิทยาศาสตรครุฑศาสตร โรงเรียนแม่แตง อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่
ประวัติการทำงาน	พ.ศ.2552-ปัจจุบัน ตำแหน่งผู้ช่วยนักวิจัย บริษัท ฮอทเทนเนติกส์ รีเสิร์ช (เอส.อี.เอเชีย) จำกัด

