รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : แผนบูรณาการวิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตข้าวโพด

2. **โครงการวิจัย** : โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตข้าวโพดฝักสด
   กิจกรรม : การวิจัยและพัฒนาพันธุ์ข้าวโพดหวาน
   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การคัดเลือกข้าวโพดหวานต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ
   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : -

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**
   หัวหน้าการทดลอง : นายธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น
   ผู้ร่วมงาน : นายฉลอง เกิดศรี ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท
   นางสาววรรษมน มงคล ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท
   นางสาวเชาวนารถ พฤทธิเทพ ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท

5. **บทคัดย่อ** :

การคัดเลือกพันธุ์ข้าวไพดหวานที่มีลักษณะต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด 1) RAPD (random amplified polymorphic DNA) 2) ชนิด ISSR inter simple sequence repeat 3) SCAR (sequence characterized amplified region) และ 4) ชนิด SSR (simple sequence repeat) โดยใช้สารพันธุกรรมต้นแบบจากตัวอย่างที่ตรวจสอบแล้วว่ามีความต้านทานและอ่อนแอต่อโรค ซึ่งการทดลองนี้ใช้พันธุ์ไฮบริด 3 เป็นพันธุ์ควบคุมต้านทาน (60 % leaf area infected) และพันธุ์หวาน 54 เป็นพันธุ์ควบคุมอ่อนแอ (23 % leaf area infected) พบว่า มีเพียงเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR จำนวน 20 คู่ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่างและให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ต้านทานและอ่อนแอ เมื่อนำเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 20 ชนิดมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสารพันธุกรรมต้นแบบที่สกัดได้จากตัวอย่างข้าวโพดหวาน 50 ตัวอย่าง พบว่า สามารถแยกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีพันธุ์พันธุ์ไฮบริด 3 เป็นตัวควบคุมต้านทาน (RW) และกลุ่มที่มีพันธุ์พันธุ์หวาน 54 เป็นตัวควบคุมอ่อนแอ (SH)

คำสำคัญ: ข้าวโพดหวาน โรคใบไหม้แผลใหญ่ เครื่องหมายดีเอ็นเอ

กรมวิชาการเกษตร

6. คำนำ :

ข้าวโพดหวานสามารถปลูกได้ทั่วทุกภาคของประเทศ สถานการณ์การผลิตของข้าวโพดหวานปี 2562 ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกทั้งประเทศ 240,629 ไร่ ผลผลิตเฉลี่ย 501,242 ตัน ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ 2,107 กิโลกรัมต่อไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2563) อย่างไรก็ตาม อุตสาหกรรมข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋องที่ยังคงมีอัตราการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง เพราะมีความต้องการของตลาดที่เพิ่มสูงขึ้นแต่ปัจจุบันยังพบว่าผู้ประกอบการยังประสบปัญหาขาดแคลนวัตถุดิบเพื่อป้อนเข้าสู่โรงงาน ทำให้ราคาผลผลิตสูงและกระทบถึงต้นทุนการผลิต ประกอบกับปัญหาในเรื่องของพื้นที่เพาะปลูกข้าวโพดหวานลดลง เนื่องจากเกษตรกรหันไปปลูกพืชทดแทนชนิดอื่น เช่น มันสำปะหลัง อ้อย หรือการที่เกษตรกรหันไปปลูกพืชที่อยู่ในโครงการประกันราคาของรัฐบาลยิ่งส่งผลกระทบอย่างหนักให้กับโรงงานแปรรูป ซึ่งจะต้องหาวิธีในการเพิ่มผลผลิตต่อไร่ให้สูงขึ้นเพื่อทดแทนพื้นที่เพาะปลูกที่ลดลง นอกจากนี้ ความรุนแรงของการระบาดโรคข้าวโพดหวานมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น จากผลของการปลูกข้าวโพดหวานที่มีพันธุกรรมอ่อนแอต่อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคใบไหม้แผลใหญ่ (Northern Corn Leaf Blight: NCLB) มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs โรคใบไหม้แผลใหญ่ทำให้ผลผลิตลดลงถึงร้อยละ 30-40 ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อและระยะการเจริญเติบโตของข้าวโพด การป้องกันกำจัดโรคที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือการใช้พันธุ์ต้านทานต่อโรค ซึ่งจะสามารถลดความเสียหายได้ ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดเพื่อให้ได้พันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงแล้ว ต้องมีความต้านทานโรคด้วย แต่ในการคัดเลือกด้วยวิธีดั้งเดิมจะใช้ระยะเวลาที่ยาวนาน และประสิทธิภาพไม่ดีนัก โดยเฉพาะกับการคัดเลือกลักษณะที่มีเกี่ยวข้องจำนวนมากหรือลักษณะทางปริมาณ

ปัจจุบันมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอมาเป็นเครื่องมือช่วยในการบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุ์พืช ซึ่งสามารถจำแนกสายพันธุ์พืชได้อย่างแม่นยำ การนำเครื่องหมายดีเอ็นมาใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ทำให้การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะตามต้องการนั้นมีประสิทธิภาพมากขึ้นเนื่องจากเป็นการคัดเลือกจากจีโนไทป์โดยตรง และสามารถตรวจสอบได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต จึงช่วยประหยัดเวลา ลดแรงงาน ลดต้นทุน และพื้นที่ในการเพาะปลูกได้ การสร้างพันธุ์ข้าวโพดต้านทานโรคเป็นวิธีที่ดีที่สุดที่ใช้ในการความเสียหายจากโรคใบไหม้แผลใหญ่ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเข้ามาเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายแบบ random amplified polymorphic DNA (RAPD) ในประชากร F_2 พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด $OPA07_{521}$ $OPA16_{457}$ $OPA09_{520}$ และ $OPE20_{536}$ มีความเกี่ยวข้องกับความต้านทานโรค และเครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้ถูกเปลี่ยนมาเป็น sequence characterized amplified region (SCAR) ได้แก่ $SCA07_{521}$ $SCA16_{457}$ $SCA09_{520}$ และ $SCE20_{536}$ ซึ่งนำไปใช้ในการคัดเลือกพันธุกรรมต้านทานโรค (Kampila et al., 2008) การคัดเลือกลูกผสม Ki48xKi47 รุ่น F_2 ทั้งหมด 160 สายพันธุ์ โดยการวิเคราะห์หาตำแหน่ง Quantitative Trait Locus (QTL) โดยใช้ SSR markers จำนวน 100 คู่ บน 10 โครโมโซมของข้าวโพด พบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ ทั้ง 10 โครโมโซม แต่พบมากที่สุดบนโครโมโซม 5 และ 8 ที่โครโมโซม 5 พบเครื่องหมายดีเอ็นเอ UMC1365 และบนโครโมโซม 8 พบเครื่องหมายดีเอ็นเอ umc1095, umc1268 และ umc2356 สามารถจำแนกตำแหน่งยีนต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในประชากรได้ (กัญญณัช และพิมพ์พรรณ, 2556) การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ SSR markers ชนิด bnlg1721 และ umc1042 บน

ศรีวิชัยการเกษตร

โครโมโซม 2 พบว่าอยู่ใกล้กับยีนต้านทาน *Ht1* (R^2 = 0.298 และ 0.2626 ตามลำดับ $p<0.0001$) ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งสองชนิดน่าจะนำมาใช้ในการคัดเลือกข้าวโพดต้านทานโรคได้ (Puttarach et al., 2016) การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอมาเป็นเครื่องมือในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง และต้านทานโรค ซึ่งเป็นความต้องการของเกษตร จึงมีความสำคัญอย่างมาก วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยคัดเลือกลูกผสมพันธุ์ต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่

7. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์ -

1. วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์
   1.1 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์
   1.2 เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า แบบแนวนอน
   1.3 เครื่องปั่นแยกสารควบคุมอุณหภูมิได้ชนิดตั้งโต๊ะ
   1.4 เครื่องดูดจ่ายสารละลาย
2. ชุดน้ำยาและสารเคมีที่ใช้สำหรับงานด้านเครื่องหมายโมเลกุล
3. กล้องถ่ายภาพพร้อมเลนส์

- วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอ

1. รวบรวมตัวอย่างข้าวโพดหวาน ที่ถูกคัดเลือกความต้านทาน (Bulk resistant) และอ่อนแอ ต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ (Bulk susceptible) รวมทั้งพันธุ์เปรียบเทียบ ได้แก่พันธุ์ไฮบริกซ์ 3 (อ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่) พันธุ์ไฮบริกซ์ 53 และข้าวโพดหวาน 54 (ต้านทานต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่) ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท จากนั้นเก็บตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอ นำใบอ่อนข้าวโพดหวานมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 0.1 กรัม ใส่ลงในโกร่งที่มีไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดเป็นผง แล้วสกัดดีเอ็นเอจากชุดสกัดสำเร็จรูป Plant DNA Extraction kit (Vivantis Technology) จากนั้นให้นำไปวัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นด้วยเครื่องดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A_{260}/A_{280} นำสารละลายดีเอ็นเอแบ่งเป็น 2 ส่วนเพื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C สำหรับการนำมาใช้ในการทดลอง และที่ –20°C สำหรับเป็นคลังดีเอ็นเอไว้ใช้ต่อไป

2. รวบรวมและค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอได้แก่ random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers (Khampila et al., 2008; Barakat et al., 2009) inter simple sequence repeat (ISSR) markers (Barakat et al., 2009) sequence characterized amplified region (SCAR) markers (Barakat et al., 2009) simple sequence repeat (SSR) markers (กัญญณัช และพิมพ์พรรณ, 2556; พิมพ์พรรณ, 2557; Wang et al., 2012; Osman et al., 2015; Puttarach et al., 2016)

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

3.1 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมได้แก่ ความเข้มข้นของ 10X buffer, $MgCl_2$, dNTP, DNA template, Taq polymerase และ ไพรเมอร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

3.2 ทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการจับระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอช่วง annealing

3.3 ทดสอบจำนวนรอบที่เหมาะสม

4. ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์

4.1 แยกขนาดของผลผลิตพีซีอาร์จากการใช้ random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers บนเจลอะกาโรส 1.2% ที่เติมสีย้อม Visafe ตรวจสอบขนาดผลผลิตพีซีอาร์ภายใต้แสงยูวี

4.2 แยกขนาดของผลผลิตพีซีอาร์จากการใช้ inter simple sequence repeat (ISSR) markers บนเจลอะกาโรส 2% โดยใช้ loading dye ตรวจสอบขนาดผลผลิตพีซีอาร์ภายใต้แสงแอลอีดีสีน้ำเงิน

4.3 แยกขนาดของผลผลิตพีซีอาร์จากการใช้ sequence characterized amplified region (SCAR) markers บนเจลอะกาโรส 1.2% ที่เติมสีย้อม SYBER Gold ตรวจสอบขนาดผลผลิตพีซีอาร์ภายใต้แสงแอลอีดีสีน้ำเงิน

4.4 แยกขนาดของผลผลิตพีซีอาร์จากการใช้ simple sequence repeat (SSR) markers บนเจลโพลิอะคริลลาไมด์ 6.7% โดยใช้ 1X TBE buffer

5. วิเคราะห์หาไพรเมอร์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างกันระหว่างข้าวโพดหวานต้านทานโรคและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่

6. สรุปผลการทดลอง

ขั้นตอนที่ 2 การคัดเลือกข้าวโพดหวานต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่

1. รวบรวมตัวอย่างข้าวโพดหวาน ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท นำใบอ่อนข้าวโพดหวานมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 0.1 กรัม ใส่ลงในโกร่งที่มีไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดเป็นผง แล้วสกัดดีเอ็นเอจากชุดสกัดสำเร็จรูป Plant DNA Extraction kit (Vivantis Technology) จากนั้นให้นำไปวัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นด้วยเครื่องดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A_{260}/A_{280} นำสารละลายดีเอ็นเอแบ่งเป็น 2 ส่วนเพื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C สำหรับการนำมาใช้ในการทดลอง และที่ –20°C สำหรับเป็นคลังดีเอ็นเอไว้ใช้ต่อไป

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกข้าวโพดหวานต้านทานโรคและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ได้

3. ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยการเปรียบเทียบความเหมือน และความต่างของแถบดีเอ็นเอ โดยถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น 0 สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e เลือกการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithimethic mean)

3. วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

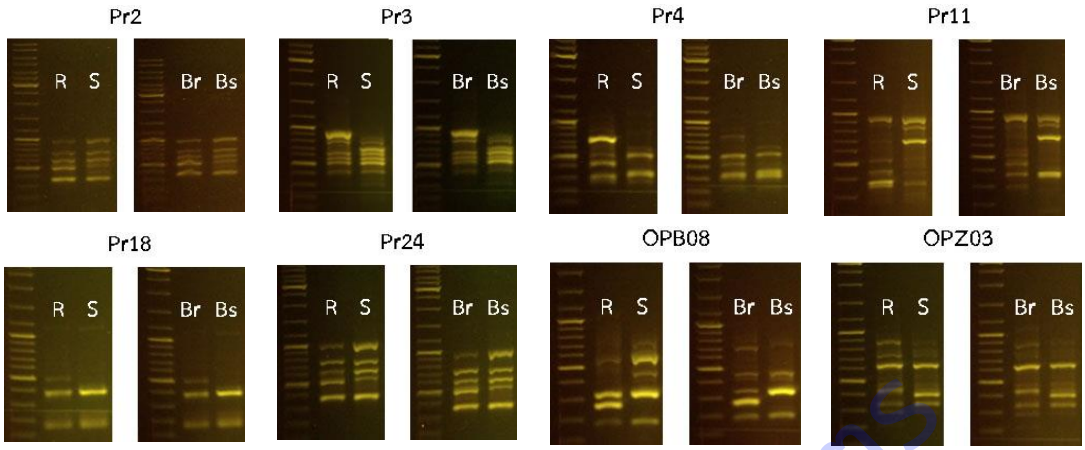
8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอ

1.1 การคัดเลือกพันธุ์ต้านทานด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

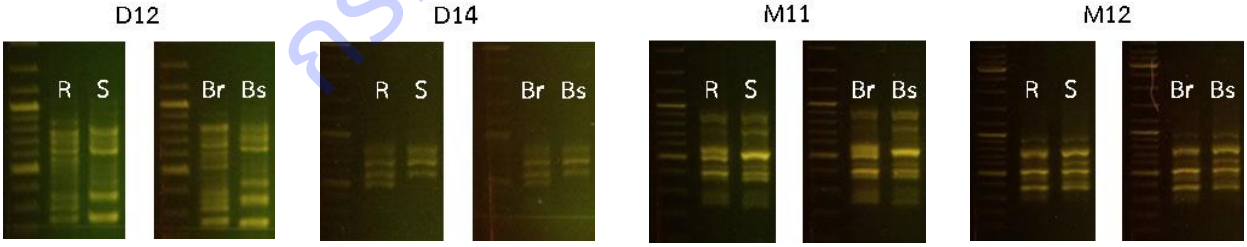
จากการทำการทดลองเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่าง แบ่งเป็น กลุ่มตัวอย่างที่ประเมินระดับต้านทาน และอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ที่ประเมินระดับความต้านทานมาแล้ว โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด RAPD จำนวน100 สาย พบว่า มีไพรเมอร์ 7 สายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ที่มีระดับความต้านทานต่างกัน ดังนี้ Pr2 Pr3 Pr4 Pr11 Pr18 OPB08 OPZ03 แสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD (random amplified polymorphic) ที่สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่

2. การคัดเลือกพันธุ์ต้านทานด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด ISSR

จากการทำการทดลองเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่าง แบ่งเป็น กลุ่มตัวอย่างที่ประเมินระดับต้านทาน และอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ที่ประเมินระดับความต้านทานมาแล้ว โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด ISSR จำนวน 100 สาย พบว่า มีไพรเมอร์ 4 สายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ที่มีระดับความต้านทานต่างกัน ดังนี้ D12 D14 M11 M12 แสดงดังภาพที่ 2



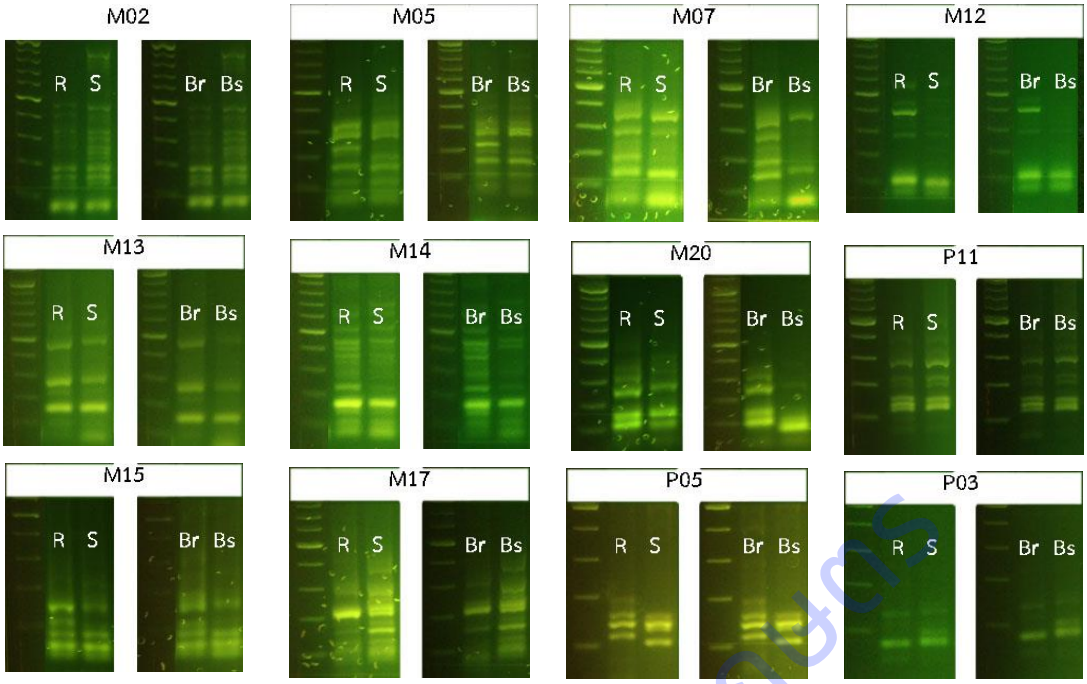
ภาพที่ 2 เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด ISSR (inter simple sequence repeat) ที่สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่

3. การคัดเลือกพันธุ์ต้านทานด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR

จากการทำการทดลองเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่าง แบ่งเป็น กลุ่มตัวอย่างที่ประเมินระดับต้านทาน และอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ที่ประเมินระดับความต้านทานมาแล้ว โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด SSR จำนวน 100 สาย

กรมวิชาการเกษตร

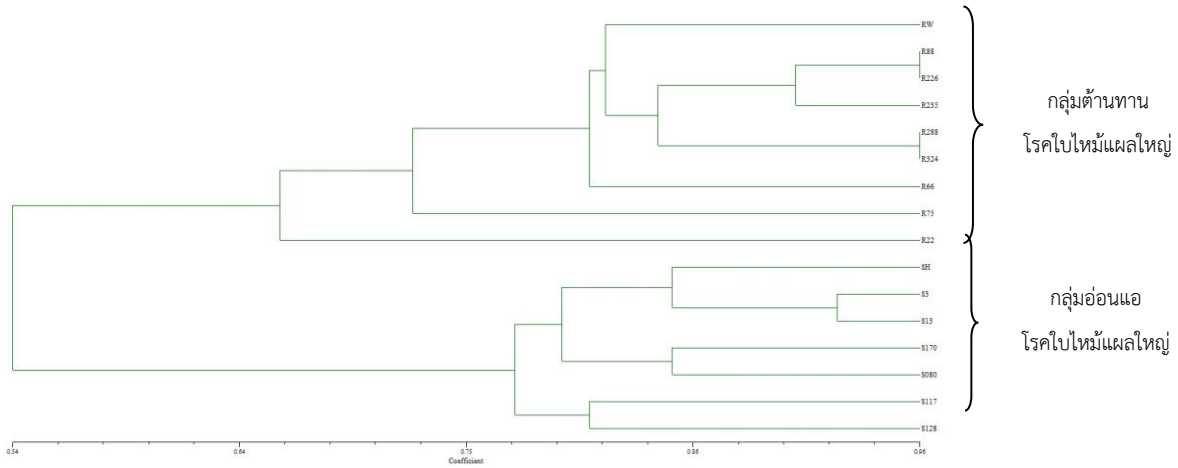
พบว่า มีไพรเมอร์ 20 สายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ที่มีระดับความต้านทานต่างกัน ดังนี้ M02 M05 M07 M12 M13 M14 M15 M17 M20 P03 P05 P11 แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR (simple sequence repeat) ที่สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่

เมื่อได้ไพรเมอร์แล้ว นำมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดมาได้พันธุ์ที่ทดสอบแล้วว่ามีความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ จำนวน 10 ตัวอย่าง ได้แก่ CN-NLBHX75-RRSC0)-21-B CN-NLBHX75-RRSC0)-56-B CN-NLBHX75-RRSC0)-84-B CN-NLBHX66-RRSC0)-2-B CN-NLBHX66-RRSC0)-35-B CN-NLBHX66-RRSC0)-44-B CN-NLBHX66-RRSC0)-94-B CN-NLBHX66-RRSC0)-146-1 CNS75 CNS66 ซึ่งมีพื้นที่ใบติดเชื้อ 60 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์ที่อ่อนแอ จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ CN-NLBHX75-RRSC0)-3-1 CN-NLBHX75-RRSC0)-12-B CN-NLBHX75-RRSC0)-111-B CN-NLBHX75-RRSC0)-134-1 CN-NLBHX75-RRSC0)-161-B ซึ่งมีพื้นที่ใบติดเชื้อ 16.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีพันธุ์ควบคุมต้านทานคือ พันธุ์ไฮบริด 3 มีพื้นที่ใบติดเชื้อ 16.5 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์อ่อนแอ คือ พันธุ์หวาน 54 มีพื้นที่ใบติดเชื้อ 23.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่า มีเพียงเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR เท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และแยกขนาดชิ้นเอ็นเอได้ครบตัวอย่างหมด ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความแตกต่างกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ นำมาจัดกลุ่ม พบว่า สามารถจัดกลุ่มพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้ได้ ดังภาพที่ 4

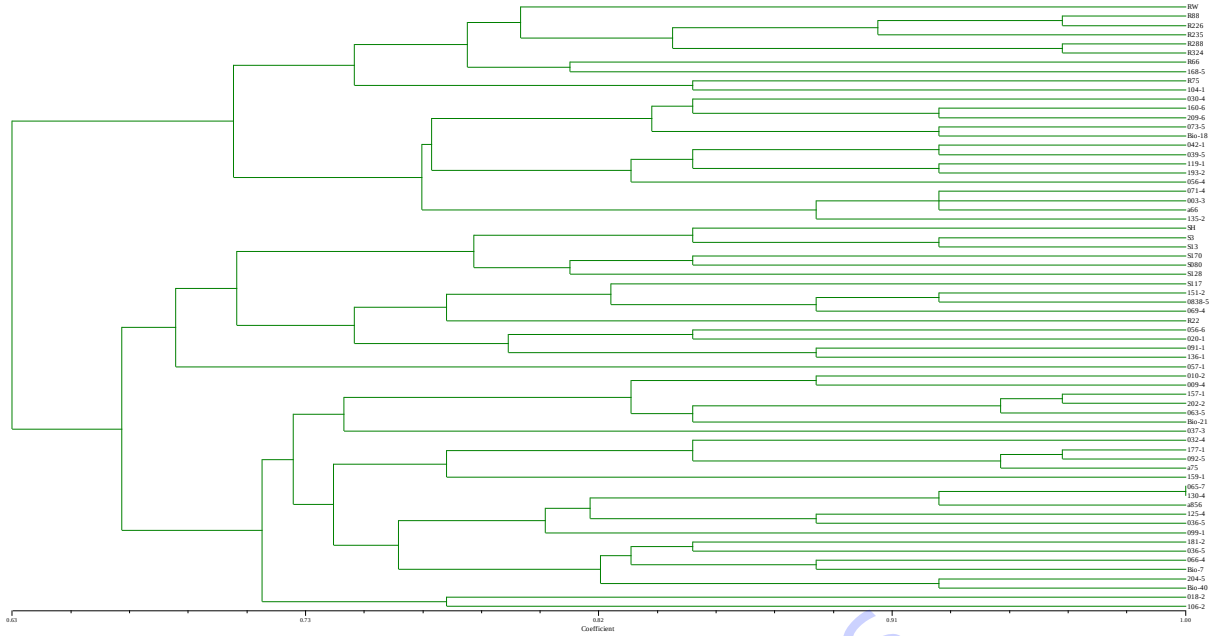
ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 4 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม RW = พันธุ์หวานตรวจสอบต้านทานโรค และ SH = พันธุ์ไฮบริดตรวจสอบอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ S3 = CN-NLBHX75-RRSC0)-3-1 S13 = CN-NLBHX75-RRSC0)-12-B S117 = CN-NLBHX75-RRSC0)-111-B S141 = CN-NLBHX75-RRSC0)-134-1 S169 = CN-NLBHX75-RRSC0)-161-B R22 = CN-NLBHX75-RRSC0)-21-B R59 = CN-NLBHX75-RRSC0)-56-B R88 = CN-NLBH X75-RRS C0)-84-B R191 = CN-NLBHX66-RRSC0)-2-B R = 226 CN-NLBHX66-RRSC0)-35-B R235 =CN-NLBHX66-RRSC0)-44-B R288 = CN-NLBHX66-RRSC0)-94-B R342 = CN-NLBHX66-RRSC0)-146-1 CNS75 CNS66

และนำเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR ทั้ง 20 ชนิด นี้มาทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสารพันธุกรรมต้นแบบจำนวน 50 ตัวอย่าง การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e และเลือกการจัดกลุ่มแบบ UPGMA แล้ว พบว่าค่าดัชนีความเหมือน 0.63-1.00 และเมื่อพิจารณาค่าดัชนีความเหมือนที่ 0.65 สามารถแยกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีพันธุ์พันธุ์ไฮบริด 3 เป็นตัวควบคุมต้านทาน (RW) ประกอบด้วย R88 R226 R235 R288 R234 R66 R75 168-5 104-1 030-4 160-6 209-6 073-5 Bio-18 042-1 039-5 119-1 193-2 056-4 071-4 003-3 66 135-2 และกลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่มีพันธุ์พันธุ์หวาน 54 เป็นตัวควบคุมอ่อนแอ (SH) ประกอบด้วย S3 S13 S170 S080 S128 S117 151-2 0838-5 069-4 056-6 020-1 091-1 136-1 010-2 009-4 157-1 202-2 063-5 Bio-21 037-3 032-4 177-1 092-5 75 159-1 065-7 130-4 856 125-4 159-1 065-7 130-4 856 125-4 036-5 099-1 181-2 036-5 066-4 Bio-7 204-5 Bio-40 018-2 106-2 เห็นได้ว่ากลุ่มที่ 2 เป็นที่มีขนาดใหญ่กว่า

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 5 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม RW = พันธุ์หวานตรวจสอบต้านทานโรค และ SH = พันธุ์ไฮบริดตรวจสอบอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e เลือกการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithimethic mean)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

การทดลองนี้ได้ทำการคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดหวานที่มีลักษณะต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่นำมาใช้ ได้แก่ 1) RAPD (random amplified polymorphic DNA) 2) ชนิด ISSR inter simple sequence repeat 3) SCAR (sequence characterized amplified region) และ 4) ชนิด SSR (simple sequence repeat) โดยใช้สารพันธุกรรมต้นแบบจากการรวมกลุ่มตัวอย่างที่ตรวจสอบแล้วว่ามีความต้านทานและอ่อนแอต่อโรค ซึ่งการทดลองนี้ใช้พันธุ์ไฮบริด 3 เป็นพันธุ์ควบคุมต้านทาน และพันธุ์หวาน 54 เป็นพันธุ์ควบคุมอ่อนแอ พบว่า มีเพียงเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR จำนวน 20 คู่ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่างและให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ต้านทานและอ่อนแอ เมื่อนำมาทดสอบกับการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ทราบลักษณะความต้านทานต่อโรค พบว่า สามารถแยกตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะความต้านทานได้ และเมื่อนำเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 20 ชนิดมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสารพันธุกรรมต้นแบบที่สกัดได้จากตัวอย่างข้าวโพดหวาน unknown จำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่า สามารถแยกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีพันธุ์พันธุ์ไฮบริด 3 เป็นตัวควบคุมต้านทาน (RW) และกลุ่มที่มีพันธุ์พันธุ์หวาน 54 เป็นตัวควบคุมอ่อนแอ (SH)

กองวิชาการเกษตร

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

เป็นข้อมูลที่นำไปใช้สนับสนุนให้มีการวิจัยพืชพันธุ์ใหม่ที่มีศักยภาพผลิตพืชพันธุ์ดี ให้เกษตรกรได้นำไปใช้เพื่อลดต้นทุนการผลิตและให้ได้ผลผลิต ที่มีคุณภาพและปริมาณเพียงพอกับความต้องการด้านอาหารและวัตถุดิบสำหรับด้านอุตสาหกรรม

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ช่วยเหลือให้งานวิจัยลุล่วงไปด้วยดี แต่มิได้เป็นผู้ร่วมปฏิบัติงานด้วย

12. เอกสารอ้างอิง :

กัญญณัช ศิริธัญญา และ พิมพ์พรรณ เมืองนา. 2556. เทคนิคการประเมินความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ และการจำแนกตำแหน่งยีนต้านทานด้วยโมเลกุลเครื่องหมายในข้าวโพด. วารสารวิชาการและวิจัย มทร. พระนคร ฉบับพิเศษ 229-240.

ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร. 2564. ตารางแสดงรายละเอียดข้าวโพดหวาน ใน ข้อมูลเศรษฐกิจเกษตร. อ้างเมื่อวันที่ 21 กุมภาพันธ์ 2564 http://www.oae.go.th/

พิมพ์พรรณ เมืองมา. 2557. การใช้โมเลกุลเครื่องหมายจำแนกยีนต้านทานโรคใบไหม้แลใหญ่ที่เกิดจากเชื้อรา *Exserohilum turcicum* ในข้าวโพด. วิทยานิพนธ์หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พืชศาสตร์) 109 หน้า

Khampila, J., P. Theerakulpisut, K. Lertrat, W. Saksirirat, J. Sanitchon and N. Muangsan. Identification of RAPD markers for northern corn leaf blight resistance in waxy corn (*Zey may* var. ceratina). Asian Journal of Plant Sciences 7(1): 18-21.

Barakat, MN., AA. El-Shafei and AA. Al-Doss. 2009 Identification of molecular markers linked to northern corn leaf blight resistance in yellow population of maize. Genes, Genomes and Genomics 3 (Special Issue1): 89-95.

Osman, HT., GB. Maha, EK. Ahmed and RA. Nader. 2015. Marker assisted-selection for leaf blight in maize (*Zey mays* L.). Middle East Journal of Agriculture 4(3): 417-426.

Puttarach, J., P. Puddhanon, S. Siripin, V. Sangtong and S. Songchantuek. 2016. Marker assisted selection for resistance to northern corn leaf blight in sweet corn. SABRAO Journal of Breeding and Genetics 48(1): 72-76.

Wang, H., ZX. Xiao, FG. Wang, YN. Xiao, JR. Zhao, YL. Zheng and FZ. Qui. 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.

กรมวิชาการเกษตร