บทที่ 4
การศึกษาการใช้โมเลกุลเครื่องหมายสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ของประชากรข้าวโพด

บทนำ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หรือโมเลกุลเครื่องหมาย (molecular marker) มีบทบาทในงานด้านพันธุศาสตร์ และการปรับปรุงพันธุ์พืช การใช้โมเลกุลเครื่องหมายช่วยในการบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุ์พืช (varietal identification) ได้เข้ามาช่วยให้การจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ มีความถูกต้องแม่นยำ นอกจากนั้น ยังใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต (genetic diversity) การประยุกต์ใช้โมเลกุลเครื่องหมายในงานปรับปรุงพันธุ์ส่วนใหญ่เพื่อการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีตามที่ต้องการ ซึ่งเป็นวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าการคัดเลือกจากฟีโนไทป์ โมเลกุลเครื่องหมายสามารถตรวจสอบได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต จึงมีส่วนช่วยประหยัดเวลา ลดแรงงาน ลดต้นทุน และพื้นที่ในการเพาะปลูกได้ เพื่อให้ได้ข้าวโพดสายพันธุ์ดีจะโดยการเพิ่มผลผลิต เพิ่มคุณภาพ หรือเพิ่มความต้านทานโรคแมลงนั้น ความก้าวหน้าของเทคโนโลยีชีวภาพ ด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล การนำข้อมูลพื้นฐานและเทคโนโลยีด้านโมเลกุลเครื่องหมายมาใช้ในการจำแนกความต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพดจึงเป็นแนวทางในการแก้ไขอุปสรรคต่างๆ ของนักปรับปรุงพันธุ์ อีกทั้งยังใช้พันธุกรรมข้าวโพดที่มียีนความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในการปรับปรุงพันธุ์

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกโมเลกุลเครื่องหมาย Simple Sequence Repeats (SSR) Marker สำหรับการสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมประชากรข้าวโพด

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

4.1 อุปกรณ์

1) เมล็ดพันธุ์ข้าวโพด พันธุ์พ่อ และพันธุ์แม่ จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ Ki48 และ Ki47 คัดเลือกมาจากข้าวโพดพันธุ์พ่อแม่จำนวน 16 พันธุ์

2) เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 160 สายพันธุ์ ที่ได้จากการผสมข้ามพันธุ์พ่อแม่ (Ki48 x Ki47)

3) อุปกรณ์สกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร, หลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร, Vortex, ตู้อบ, น้ำแข็ง, spin down, micropipette, tip ขนาด 10, 200 และ 1000 มิลลิลิตร, ถุงมือยาง

4) สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ ไนโตรเจนเหลว, Extraction buffer, Neutralizer, trapping buffer, Washing buffer I, Washing buffer II, Elution buffer

5) อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในขบวนการ Polymerase Chain Reaction (PCR) ได้แก่ เครื่อง Polymerase Chain Reaction (PCR), DAN template, $Mgcl_2$, dNTPs, primer foreword, primer reword, DNA tag polymerase, dH_2O, Agarrosgle

6) โมเลกุลเครื่องหมาย Simple Sequence Repeats (SSR) Marker อย่างน้อย 100 เครื่องหมาย

4.2 วิธีการทดลอง

การใช้โมเลกุลเครื่องหมาย จำนวนอย่างน้อย 100 เครื่องหมาย สำหรับการสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมประชากรข้าวโพด

1) การรวบรวมและค้นหาโมเลกุลเครื่องหมาย Simple Sequence Repeats (SSR) Marker ที่มีการรายงานและวางแผนที่โครโมโซมไว้ทั้ง 10 โครโมโซม ตามตำแหน่งบนโครโมโซมที่จัดกลุ่ม (Bin) โดยให้กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม โดยทดสอบเพื่อให้ได้โมเลกุลเครื่องหมายที่ให้ความต่างของสายพันธุ์อย่างน้อย 100 เครื่องหมาย

2) การตรวจหาโมเลกุลเครื่องหมาย ที่สามารถ จำแนก ความแตกต่าง (polymorphism markers) ระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ (Ki48 และ Ki47) โดยการใช้โมเลกุลเครื่องหมายอย่างน้อย 100 เครื่องหมาย สร้างแผนที่ทางพันธุกรรม เพื่อหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ต่อไป

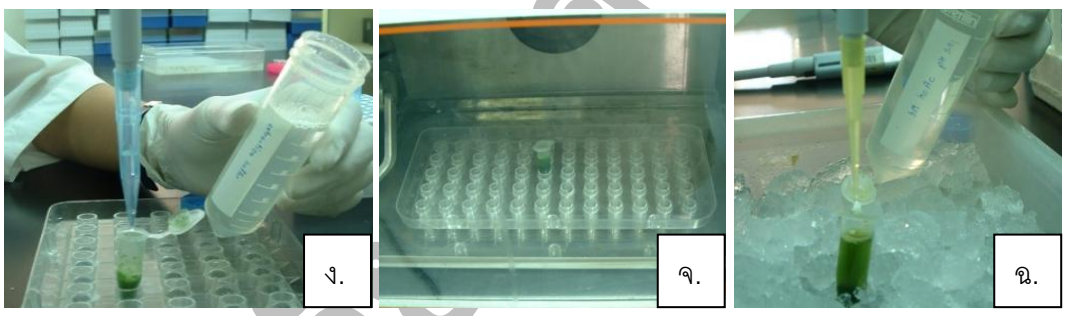
สถาบันวิจัยพืชไร่กำแพงแสน

3) เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์พ่อและแม่ (Ki48 และ Ki47) และประชากรข้าวโพดคู่ผสม Ki48 / Ki47 ลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 160 สายพันธุ์ เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยเทคนิคของ Rogers and Bebdich (1994) โดยการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างสด ใช้ตัวอย่างปริมาณน้อย

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอข้าวโพด

ก. เก็บตัวอย่างใบอ่อนข้าวโพดอายุ 14 วัน ใส่ตัวอย่างลงในถุงซิบพลาสติก แช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง เพื่อป้องกันดีเอ็นเอเสียสภาพ

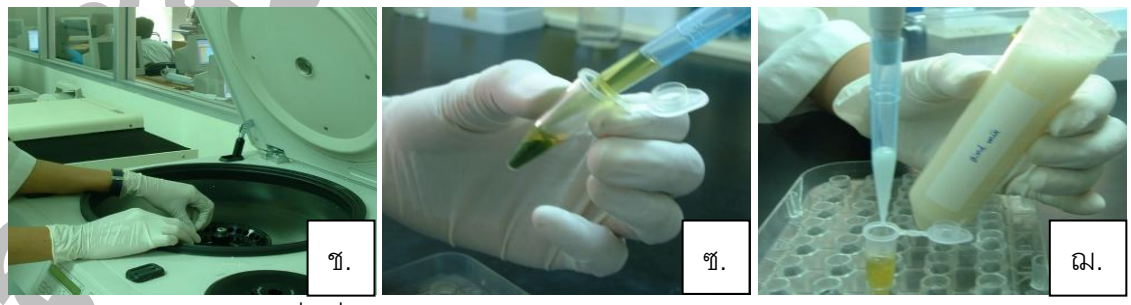
ข - ค. ตัดตัวอย่างพืชใส่หลอดขนาด 1.5 ml บดตัวอย่างใบอ่อนข้าวโพดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว



ง. เติม Extraction buffer ปริมาตร 1,000 ml ผสมโดยใช้ Vortex

จ. บ่มไว้ที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

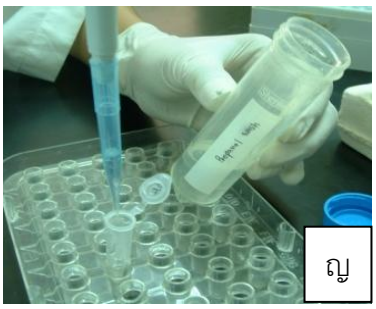
ฉ. วางหลอดตัวอย่างบนน้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วเติม Neutralizer ปริมาตร 100 ml ผสมให้เข้ากันโดย Vortex แล้ววางบนน้ำแข็ง 5 นาที

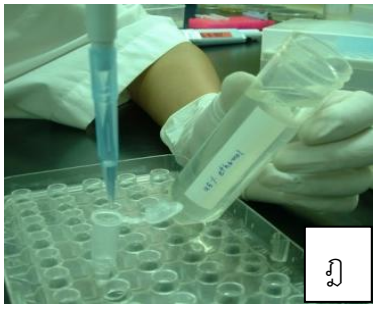


ช. นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบ นาน 10 นาที

ช. ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอด 1.5 ml หลอดใหม่เข้ากันโดยเขย่าเบาๆ

ฌ. เติม Trapping buffer ปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ความเร็ว 2, 000 รอบ นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง


ญ

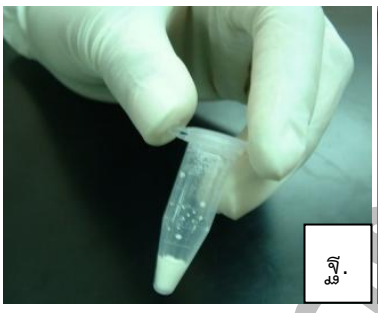

ฎ

ฏ

ญ. เติม Washing buffer I ปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex นำไปปั่นที่ความเร็ว 2,000 รอบ นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง

ฎ. เติม Washing buffer II ปริมาตร 500 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex นำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบ นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง

ฏ. เปิดฝาหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งของเหลวจะระเหยออกจากตะกอนหมด


ฐ.

ฑ.

ฐ. เติม Elution buffer 100 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

ฑ. นำไปปั่นที่ความเร็ว 14 ,000 รอบ นาน 1 นาที ดูดสารละลาย ดีเอ็นเอ ใส่หลอดใหม่ แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจคุณภาพ

4) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของข้าวโพดโดยการทำ PCR (Polymerase Chain Reaction)

4.1) เตรียมหลอดขนาด 1.5 µl ใส่ ดีเอ็นเอ ตัวอย่าง ปริมาตร 2 µl

สถาบันวิจัยและพัฒนา

4.2) ผสมส่วนผสมทั้งหมด (PCR cocktail) ประกอบด้วย

10X Buffer	1	µl
$MgCl_2$	0.8	µl
1mM dNTPs	2	µl
5uM Forward Primer	0.5	µl
5uM Reverse Primer	0.5	µl
5U Taq polymerase	0.1	µl
Sterile dH_2O	3.1	µl

4.3) เติม PCR cocktail ลงในตัวอย่าง ดีเอ็นเอ ใน หลอดที่เตรียมไว้ ปริมาตร 8 µl

4.4) นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 1,200 รอบนาน 1 นาที

4.5) นำหลอดใส่เครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรมการทำงาน (PCR profile) ดังนี้

โปรแกรมการทำงาน (PCR profile)

ขั้นตอน	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ	เวลา
Denaturation	1x	$95^{O}C$	5 นาที
Annealing	30x	$95^{O}C$	30 วินาที
		$59^{O}C$	30 วินาที
		$72^{O}C$	1 นาที
Extension	1x	$72^{O}C$	5 นาที

4.6) นำ PCR plate ที่ได้มาวิเคราะห์ดูแถบ ดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis

การดำเนินการทดสอบโมเลกุลเครื่องหมายที่สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของสายพันธุ์พ่อแม่ (parental polymorphic) โดยการใช้โมเลกุลเครื่องหมายจำนวนอย่างน้อย 100 เครื่องหมาย เพื่อใช้ในการสร้างแผนที่พันธุกรรมของประชากรข้าวโพด

6) ข้อมูลจากโมเลกุลเครื่องหมายที่สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของสายพันธุ์พ่อแม่ นำมา จำแนกในประชากรข้าวโพดคู่ผสม Ki48 / Ki47 ลูกผสมชั่วที่ 2 เพื่อใช้สำหรับการสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมประชากรข้าวโพด

สถาบันวิจัยพืชไร่เกษตร

4.3 การบันทึกข้อมูล

4.3.1 บันทึกผลโมเลกุลเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่าง (polymorphism) โรคใบไหม้แผลใหญ่ในประชากรข้าวโพด บันทึกการอ่านผลเป็นตัวอักษร หรือตัวเลข เป็นการเตรียมข้อมูลเพื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ

4.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

4.4.1 การหาค่าสถิติเปอร์เซ็นต์ของความแตกต่างทางพันธุกรรม

4.4.2 โปรแกรมในการสร้างภาพแผนที่ทางพันธุกรรมประชากรข้าวโพด ทั้ง 10 โครโมโซม

4.5 สถานที่ทำการทดลอง

4.5.1 การดำเนินการสกัดดีเอ็นเอข้าวโพด ได้ทำการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชเพื่อประชาชน ตึกเมล็ดพันธุ์พืชไร่ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ตำบลพิชัย อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง

4.5.2 การดำเนินงานการแสดงผล ด้วย Polyacrylamide gel electrophoresis ทำการทดลอง ณ ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าวและหน่วยปฏิบัติการค้นหาและใช้ประโยชน์ยีนข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

4.6 ระยะเวลาในการทำการทดลอง

ระยะเวลาการวิจัย 10 เดือน ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ.2554 ถึง เดือนกรกฎาคม พ.ศ.2555

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ผลการทดลอง

1. การสืบหาข้อมูลของโมเลกุลเครื่องหมายวางตัวใกล้กับตำแหน่งยีนลักษณะต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่บนโครโมโซมข้าวโพด

จากการตรวจเอกสารอ้างอิง พบว่า โมเลกุลเครื่องหมายที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในประชากรข้าวโพด จำนวนทั้งสิ้น 56 ตำแหน่งกระจายตัวทั่วทั้งจีโนม (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1) โดยเฉพาะอย่างยิ่งบนโครโมโซมที่ 3 โครโมโซมที่ 5 และโครโมโซมที่ 8 ซึ่งพบ QTL หลายตำแหน่งวางตัวใกล้เคียงกัน (common QTL) นอกจากนี้ ยังเคยมีรายงานเกี่ยวกับยีนต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุในกลุ่ม *Helminthosporium turcicum* ได้แก่ ยีน Ht1, Ht2 และ Htn1 โดยมีตำแหน่งวางตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 2 (bin 2.07/2.08) และ 8 (bin 8.05 และ 8.06) ตามลำดับ (Weiz and Geiger, 2000, Yin et al., 2003, Pataky, 2006, Chung et al., 2010)

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ตารางที่ 4.1 ตำแหน่งของ QTL หรือยีน และชนิดของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวใกล้ตำแหน่งของ QTL หรือยีน ในประชากรต่างๆ ที่มีการรายงาน

ลำดับ	Bin	Position (Mbp)	Marker interval	LOD	R^2	Add effect	Allele	Population	Generation	Traits*	References
1	1.02/06	12.18-175.64	umc157 -umc67	2.31	6.8	-0.077	B52	B52 x Mo17	150 $F_{2:3}$	NL	Freymark et al., 1994
2	3.07/09	205.17-220.97	umc16 - npi457	4.6	13.2	0.171	Mo17				
3	5.00/01	3.02-79.56	bnl6.25 - umc90	3.85	11.8	0.161	Mo17				
4	1.02/06	12.18-175.64	umc157 -umc67	2.71	8	-0.08	B52			DLA	
5	3.07/09	205.17-220.97	umc16 - npi457	3.22	9.4	0.156	Mo17				
6	5.01/03	7.96-31.53	umc90 - umc166	4.14	13.4	0.184	Mo17				
7	7.03	131.98-143.16	bnl15.21 - umc110	3.84	13.2	0.2	Mo17				
8	8.03	87.08	bnl9.08 - bnl7.08a	2.32	7.5	0.133	Mo17				
9	5.05/06	170.91-197.82	bnl5.71 - umc51	4.32	18.1	0.093	Mo17			SL	
10	7.03	127.03-131.98	umc116 - bnl15.21	3.7	12.3	0.065	Mo17				
11	1.06	181.95	csu61b - dup12	2.8/3.3	5.8/6.7	2.33/2.56	D32	D32 x D145	220 F_3	DLA	Welz et al., 1999
12	2.06	148.56-173.07	umc255 -umc5a	-/3.7	-/7.5	-/-3.64	D145				
13	3.01	17.25-38.22	umc32a -umc121	-/2.5	-/5.2	-/-3.34	D145				
14	3.03	80.4-81.1	umc38b - asg24	-/4.7	-/9.3	-/5.09	D32				
15	3.07/08	192.26	umc3b -umc17a	4.2/6.0	8.4/11.8	-2.53/-5.13	D145				
16	4.01	4.91	phi21 - csu253b	13.0/11.1	23.9/20.9	-6.12/-8.96	D145				
17	4.05/07	65.70-162.88	umc47 - umc66a	-/4.8	-/9.6	-/-4.87	D145				
18	5.03	1.93	umc27a - umc43	-/3.2	-/6.5	-/-3.43	D145				

สถาบันวิจัยเกษตรแห่งประเทศไทย

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ลำดับ	Bin	Position (Mbp)	Marker interval	LOD	R^2	Add effect	Allele	Population	Generation	Traits*	References
19	5.04	141.74	csu36a - bnl7.71	6.8/3.6	13.4/7.3	-6.47/-5.32	D145				
20	6.05	120.8-190.88	umc21 - asg7	5.3/4.7	10.6/10.8	-4.27/-5.53	D145				
21	8.02/03	16.72-23.40	umc103a - bngl669	-/3.9	-/7.8	-/4.29	D32				
22	8.06	151.65	umc17b - npi268a	5.1/10.1	10.1/19.2	3.88/7.19	D32				
23	9.02/03	17.81-96.05	umc105a - umc114	-/2.8	-/5.8	-/3.71	D32				
24	1.07	209.51	umc33 - umc23	3.3	11.7	8.9	B52	B52 x Mo17	F_3	AUDPC	Weiz and Geiger, 2000
25	2.02	14.25-16.31	umc78 - npi287a	7.3	23.6	-18	Mo17				
26	2.06	172.66	agp2 - npi565	2.6	9.3	11.1	B52				
27	3.06	179.24-188.82	umc60 -bnl15.20	3	10.8	-18.6	Mo17				
28	5.03/04	72.50-141.74	bnl10.06 - bnl7.71	4.3	15	-16.3	Mo17				
29	5.04/06	141.74-197.83	bnl7.71 - umc51	2.8	10	9	B52				
30	6.05	133.08-139.15	bnl3.03 - npi560	3.1	11	8.2	B52				
31	7.03	127.04-131.98	umc116 - bnl15.21	6	20.4	-14.5	Mo17				
32	8.05	123.26	bnl7.08a - bnl8.26	3.7	13	-11.8	Mo17				
33			pio10.5 - c1	4.5	15.8	12.6	B52				
34	10.05	127.51	pio10.16 - npi232	2.5	9.2	7.8	B52				
35	2.04	40.58-57.60	umc371 - umc381	5.8	12.8	-12.7	CML202	Lo951 xCML202	F_3	AUDPC	Weiz and Geiger, 2000
36	3.06	170.64	bnl8.01 - umc389b	4	9.1	11.1	Lo951				

สถาบันวิจัยพืชไร่เกษตร

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ลำดับ	Bin	Position (Mbp)	Marker interval	LOD	R^2	Add effect	Allele	Population	Generation	Traits*	References
37	3.06	187.71-188.81	umc361 - bnl15.20	3.9	8.9	-9.6	CML202				
38	5.03/05	60.99-189.5	umc1 - bnl5.40	5	11.2	-9.1	CML202				
39	5.05/06	189.5	bnl5.40 - npi461	3	6.9	-7.6	CML202				
40	5.07/08	205.44	umc68 - bnl5.24	3.6	8.2	7.7	Lo951				
41	8.06	141.95-162.49	umc323 - umc30	8.6	18.3	-11.7	CML202				
42	9.05/06	130.90-144.61	umc340 - bnl7.57	6	13.2	-10.4	CML202				
43	3.07/08	192.26	umc3b - umc17a	6.1	12	-1.5	D145	D32 x D145	F_3	AUDPC	Weiz and Geiger, 2000
44	4.01	4.91	phi21 - csu253b	14	25.6	-3.4	D145				
45	5.04	141.74	csu36a - bnl7.71	6.8	13.4	-3.1	D145				
46	6.05/06	120.8-153.91	umc21 - umc38a	5.8	11.5	-2.1	D145				
47	8.06	151.65	umc17b - npi268a	5.8	11.5	2.2	D32				
48	9.01/02	9.58-17.81	umc113a - umc105a	2.8	5.7	1.4	D32				
49	7.05	141.95	u125b - n235b	3.27	7.9	2.17	IL731a	IL731a x W6876	$F_{2:3}$	DLA	Brown et al., 2001
50	7.05		n235b - b16.06	7.6	19.5	1.67	IL731a			DLA	
51	9.05		u114 - n209	3.45/5.8	8.2/15.2	2.39/3.24	IL731a				
52	8.06	160.36	umc1149	2.7	0.21	5.9 days	DK888	S11 x DK888	53 F_7	IP	Chung et al., 2010
53	8.06	155.79	umc1287	15	0.62	6.8 days	DK888		96 F_8	IP	
54	8.06	155.79	umc1287	9.5	0.38	-22.40%	DK888			PrimDLA	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตร

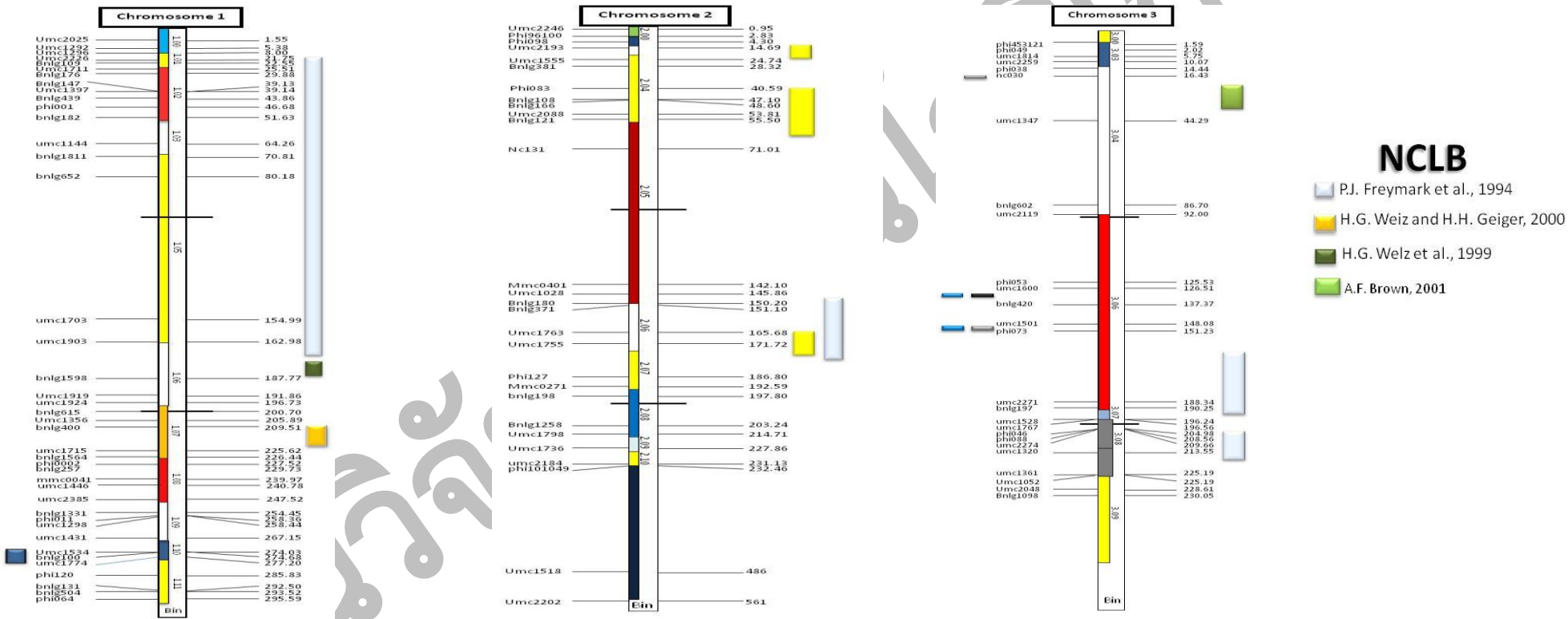
ตารางที่ 4.1 **(ต่อ)**

ลำดับ	Bin	Position (Mbp)	Marker interval	LOD	R^2	Add effect	Allele	Population	Generation	Traits*	References
55	8.06	148.25-155.79	umc2199-umc1287	29.4	0.59	2.9 days	DK888		12 F_9	IP	
56	8.06	148.25-155.79	umc2199-umc1287	7.9	0.19	-16.10%	DK888			PrimDLA	

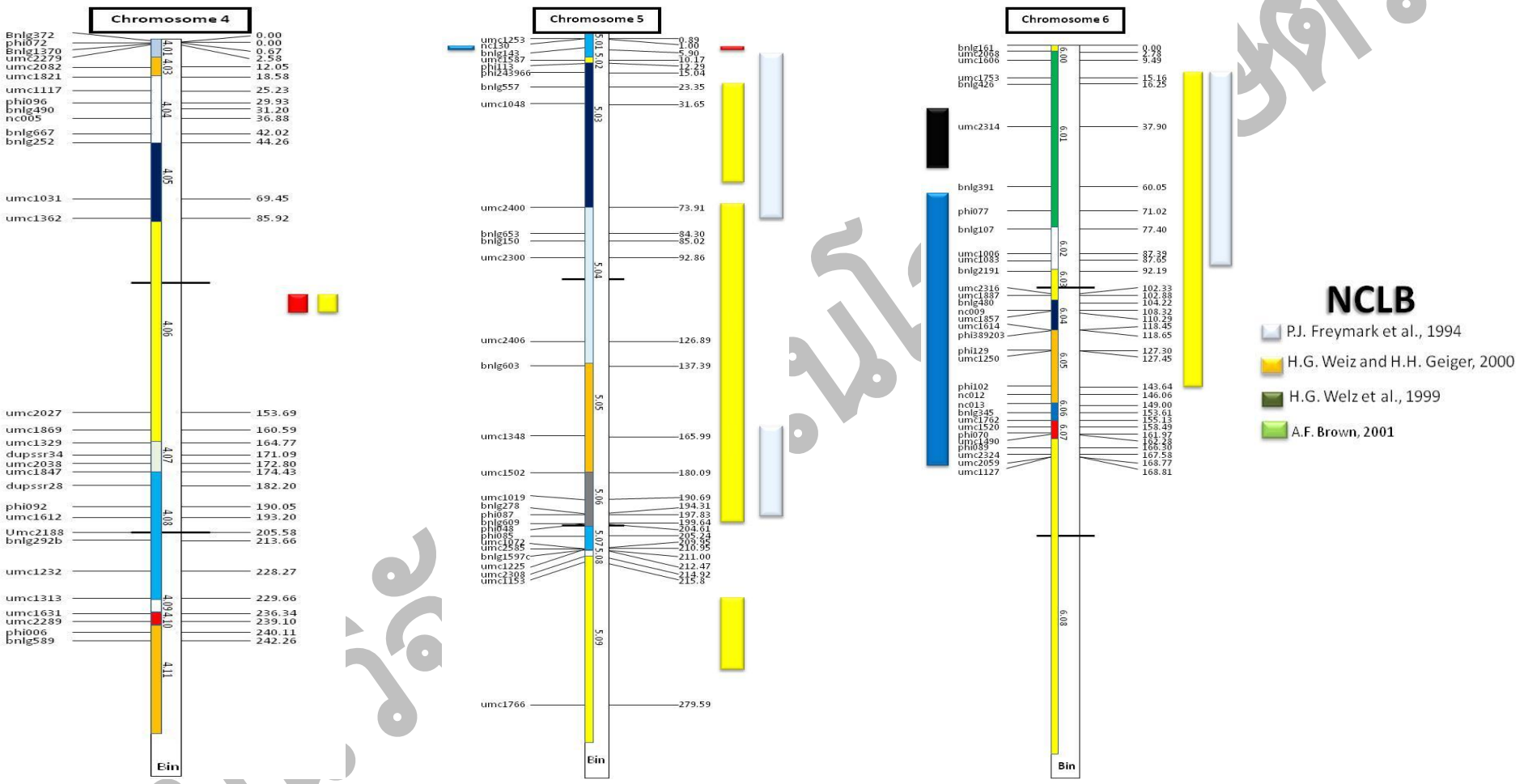
*Traits NL; Average number of lesions per leaf, SL; Average size of lession in cm2, DLA; Percentage of the total disease leaf area, PrimDLA; primary disease leaf area on inoculated leaves, AUDPC; area under the disease progress curve, and IP; incubation period

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

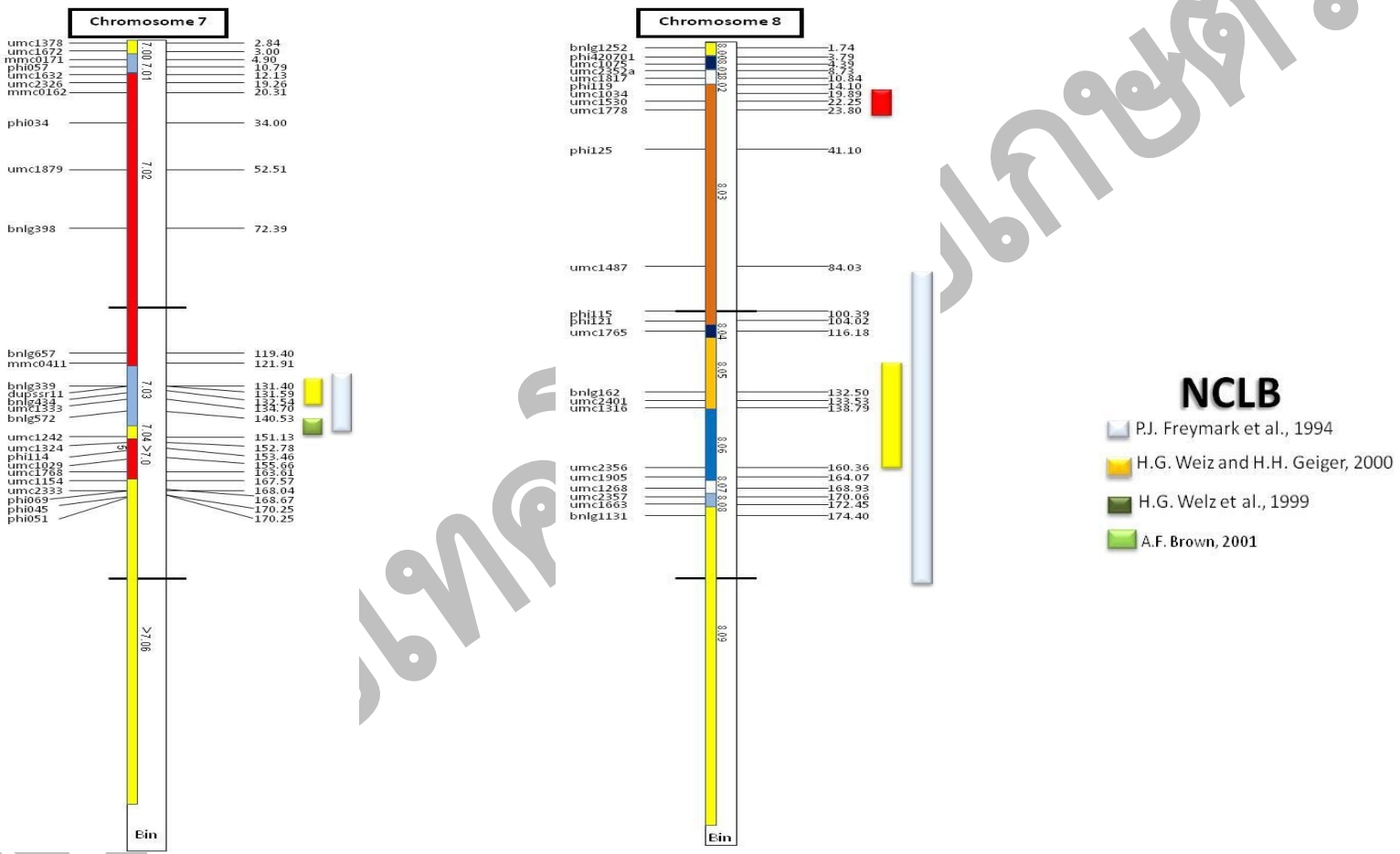
แผนผังแสดงการเชื่อมโยงทางพันธุกรรมของข้าวโพดกับ Marker ที่จะนำใช้ในการแยกความแตกต่างของแถบตำแหน่ง DNA ในขั้นตอนต่อไปและแสดงตำแหน่งของ Marker ที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ (NCLB) บนโครโมโซม 1 ถึง 10 ของจีโนมข้าวโพด จากการศึกษาที่ผ่านมา (ภาพที่ 10-13)



ภาพที่ 4.1 แผนที่การเชื่อมโยงทางพันธุกรรมของข้าวโพดกับ Marker ที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ NCLB บน Chromosome 1 2 และ 3

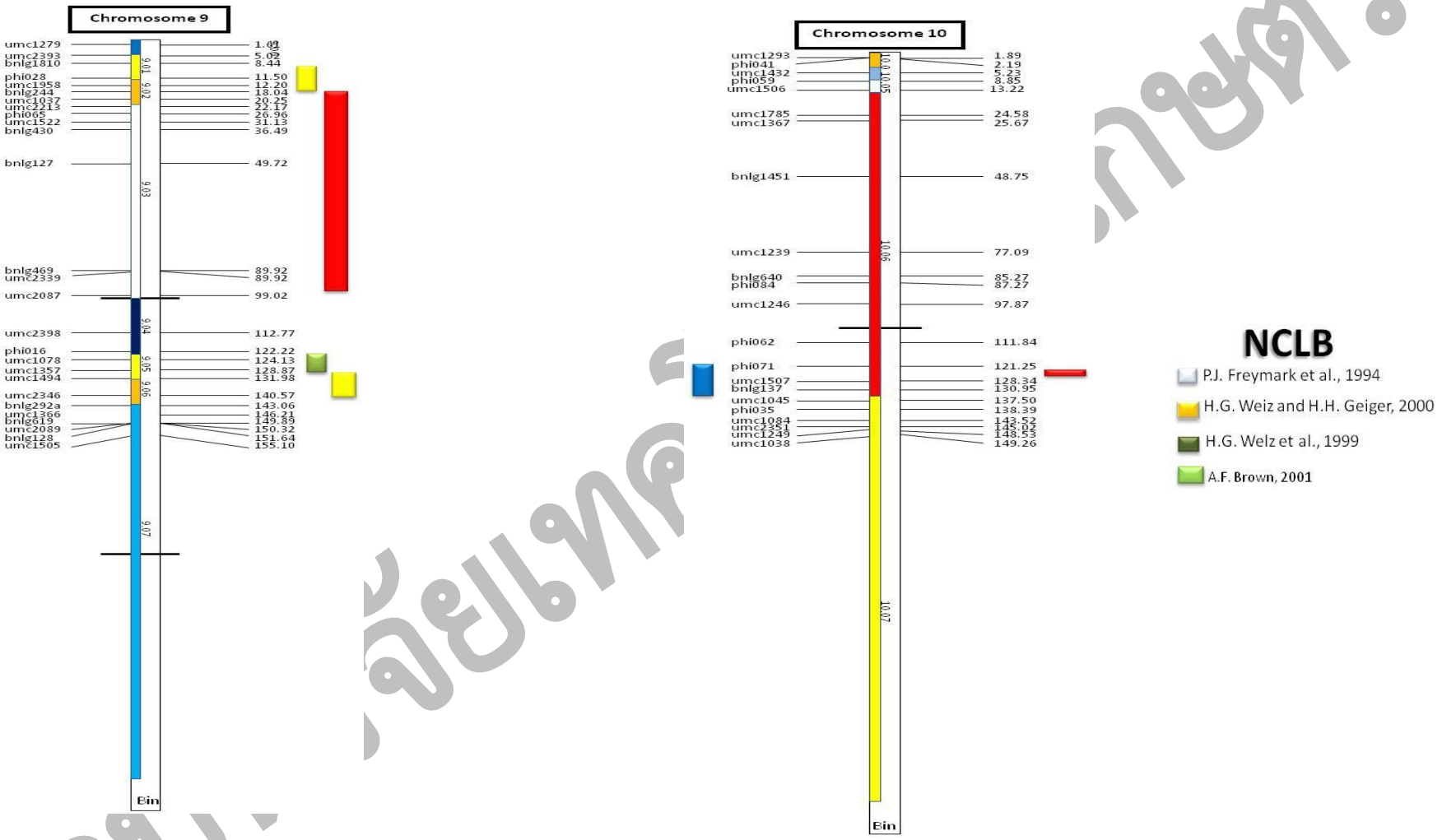


ภาพที่ 4.1 **(ต่อ)** แผนที่การเชื่อมโยงทางพันธุกรรมของข้าวโพดกับ Marker ที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ NCLB บน Chromosome 4 5 และ 6



ภาพที่ 4.1 **(ต่อ)** แผนที่การเชื่อมโยงทางพันธุกรรมของข้าวโพดกับ Marker ที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ NCLB บน Chromosome 7 และ 8

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.1 **(ต่อ)** แผนที่การเชื่อมโยงทางพันธุกรรมของข้าวโพดกับ Marker ที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ NCLB บน Chromosome 9 และ 10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตร

2. **การตรวจโมเลกุลเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างของพันธุ์พ่อ และพันธุ์แม่** (parental polymorphism survey)

โมเลกุลเครื่องหมายที่มีตำแหน่งวางตัวอยู่บนโครโมโซมทั้ง 10 โครโมโซม จำนวนทั้งสิ้น 100 เครื่องหมาย (ตารางที่ภาคผนวกที่ 4) เพื่อจะหาตำแหน่งของ QTL ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ ในข้าวโพดคู่ผสม Ki48 / Ki47 ลูกผสมชั่วที่ 2 (F2) ในเบื้องต้น ได้ทำการจำแนกโมเลกุลเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างของพันธุ์พ่อแม่ คือ Ki48 และ Ki47 โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายชนิด microsatellite จำนวนทั้งสิ้น 161 เครื่องหมาย ที่มีตำแหน่งวางตัวอยู่บนโครโมโซมทั้ง 10 โครโมโซม ตารางภาคผนวกที่ 3ข

พบว่า เมื่อพิจารณาระหว่างพันธุ์ Ki48 และ Ki47 มีโมเลกุลเครื่องหมายที่แสดงความต่างระหว่างสองพันธุ์ (polymorphism) ดังกล่าว จำนวน 98 เครื่องหมาย ดังตารางที่ 4.2 โดยมีตำแหน่งวางบนโครโมโซมทั้ง 10 โครโมโซม คิดเป็นร้อยละ 60.86 ของจำนวนเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมด โมเลกุลเครื่องหมายที่แสดงความต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่เหล่านี้ จะถูกนำไปใช้ตรวจสอบในประชากรข้าวโพดลูกผสมชั่วที่ 2 เพื่อหา QTL ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ต่อไป

ตารางที่ 4.2 โมเลกุลเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพันธุ์พ่อแม่ (Ki48 และ Ki47)

โครโมโซม	**จำนวนโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบ**	**จำนวนโมเลกุลเครื่องหมาย** polymorphism	**โมเลกุลเครื่องหมายที่แสดง** polymorphism
1	16	11	UMC2025, UMC1613, UMC1353, BNLG1179, UMC1269, UMC1144, BNLG1811, UMC1356, UMC1715, UMC2385, BNLG1331
2	3	1	PHI098
3	12	8	PHI453121a, UMC1793, UMC1814, UMC2259, NC030, UMC1347, UMC1501, BNLG1591
4	17	8	UMC1757, UMC2410, UMC1821, UMC1031, UMC1847, UMC2188, UMC1631, UMC1820
5	26	13	UMC1365, UMC1587, PHI113, PHI243966, BNLG653, UMC1502, UMC1019, UMC1072, UMC2585 BNLG1597c, UMC1792, UMC1225, UMC1153

สถาบันวิจัยพืชไร่เขตร้อน

โครโมโซม	จำนวนโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบ	จำนวนโมเลกุลเครื่องหมาย polymorphism	โมเลกุลเครื่องหมายที่แสดง polymorphism
6	18	12	UMC1006, UMC1083, BNLG2191, UMC1918, UMC1614, PHI389203, UMC1250, UMC1520, UMC1490, UMC1350, UMC2059, BNLG600
7	16	9	MMC0171, UMC2325, UMC1632, UMC2328, UMC1242, UMC1251, PHI114, UMC2334, UMC1760,
8	17	10	UMC1034, UMC1530, UMC2401, UMC1316, UMC2356, UMC1905, UMC1607, UMC1268, UMC1005, BNLG1131
9	17	12	UMC1040, UMC2393, BNLG1810, UMC1430, UMC1033, BNLG469, UMC1771, UMC1519, UMC1357, UMC1494, UMC1366, UMC2089
10	19	14	UMC1293, UMC1291, UMC1319, UMC1506, UMC1367, UMC1239, UMC1336, UMC1739, UMC2349, UMC1077, UMC1330, UMC1045, BNLG1028, UMC2351
รวม	**161**	**98**	

ทำการตรวจสอบข้าวโพดพันธุ์ พ่อ และแม่ ด้วยโมเลกุลเครื่องหมายชนิด Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ microsatellite เพิ่มเติมจากเดิม จำนวนทั้งสิ้น 35 เครื่องหมาย แบ่งเป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่วางตัวบนโครโมโซมที่ 2 โครโมโซมที่ 5 และโครโมโซมที่ 8 ผลการตรวจสอบ พบว่า โมเลกุลเครื่องหมายทั้งหมดที่ใช้ในการตรวจสอบสามารถแสดงความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างข้าวโพดพันธุ์แท้ พ่อ และแม่ ได้ โดยลักษณะอัลลีล (Allele) ของข้าวโพดตำแหน่งของโมเลกุลเครื่องหมายบนจีโนมและแต่ละโครโมโซม และขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้หลังการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR product) แสดงในตารางภาคผนวกที่ 5ข โดย อักษร a ถึง f เป็นสัญลักษณ์แสดงลักษณะอัลลีลของข้าวโพดพันธุ์แท้ที่มีขนาดต่างๆ กัน โดยอัลลีล a เป็นอัลลีลที่มีขนาดใหญ่สุดในแต่ละตำแหน่งของโมเลกุลเครื่องหมาย และอัลลีลที่ถูกแสดงด้วยตัวอักษรเดียวกัน เป็นอัลลีลที่มีขนาดเท่ากัน ตำแหน่งของโมเลกุลเครื่องหมายบนจีโนมแสดงด้วยตำแหน่งของ Bin และลำดับเบส (แสดงหน่วยเป็นล้านเบส) ได้จากการสืบค้นจาก

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

http://www.maizegdb.org ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือ PCR product มีหน่วยเป็นคู่เบส (base pair)

โมเลกุลเครื่องหมายที่จำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวโพดพันธุ์พ่อ และแม่ (polymorphism)ซึ่งวางตัวบนโครโมโซมที่ 2 โครโมโซมที่ 5 และโครโมโซมที่ 8 แสดงในตารางที่ 4. 3 จากจำนวนโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบ 35 เครื่องหมาย มีจำนวนโมเลกุลเครื่องหมายที่จำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวโพดพันธุ์พ่อ และแม่ 16 เครื่องหมาย คือ บนโครโมโซมที่ 2 จำนวน 12 เครื่องหมาย (ร้อยละ 55) ได้แก่ UMC1637a UMC1890 UMC2205 UMC2625 UMC1042 UMC1560 UMC1745 UMC1526 UMC1947 UMC2615 UMC1516 และ UMC2374 และบนโครโมโซมที่ 8 จำนวน 4 เครื่องหมาย (ร้อยละ 40) ได้แก่ UMC2598 UMC2199 UMC2210 และ UMC1161 ส่วนโครโมโซมที่ 5 เครื่องหมายไม่สามารถพบความแตกต่าง (non polymorphism) (ร้อยละ 0) จึงจำเป็นต้องมีการ เพิ่มเติมโมเลกุลเครื่องหมายบนโครโมโซม 5

ตารางที่ 4.3 โมเลกุลเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างของอัลลีลระหว่างข้าวโพดพันธุ์พ่อ และแม่

โครโมโซมที่	**จำนวนโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบ**	**จำนวนโมเลกุลเครื่องหมายที่แสดง** polymorphism	**ร้อยละโมเลกุลเครื่องหมายที่แสดง** polymorphism	**โมเลกุลเครื่องหมายที่แสดง** polymorphism
2	20	12	55	UMC1637a UMC1890 UMC2205 UMC2625 UMC1042 UMC1560 UMC1745 UMC1526 UMC1947 UMC2615 UMC1516 UMC2374
5	5	0	0	-
8	10	4	40	UMC2598 UMC2199 UMC2210 UMC1161
รวม	35	16	46	

ดังนั้นจึงดำเนินการจำแนกโมเลกุลเครื่องหมายที่จำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวโพดพันธุ์พ่อ และแม่ เพิ่มเติมบนโครโมโซม2, 5 และ8 พบว่าโมเลกุลเครื่องหมาย ที่โครโมโซม2 มี จำนวน 1 เครื่องหมาย โครโมโซมที่ 5 จำนวน 13 เครื่องหมาย และโครโมโซมที่ 8 จำนวน 10 เครื่องหมาย ดังนี้

- โมเลกุลเครื่องหมายที่มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 2 จำนวน 1 เครื่องหมาย ได้แก่ PHI098
- โมเลกุลเครื่องหมายที่มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 5 จำนวน 13 เครื่องหมาย ได้แก่ UMC1365, UMC1578, PHI243966, BNLG653, UMC1019, UMC1792, UMC1225, UMC1153, PHI113, UMC1502, UMC1072, UMC2585 และ BNLG1597c
- โมเลกุลเครื่องหมายที่มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 8 จำนวน 10 เครื่องหมาย ได้แก่ UMC1316, UMC2356, UMC1905, UMC1268, UMC1005, BNLG1131, UMC1034, UMC1530, UMC2401 และ UMC1607

3. การสืบหา QTL ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดคู่ผสม Ki48 / Ki47 ลูกผสมชั่วที่ 2

ประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) จากการผสมระหว่าง คู่ผสม Ki48 / Ki47 จำนวน 160 สายพันธุ์ ได้ถูกนำมาประเมินความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในสภาพโรงเรือนและ ในสภาพแปลงทดลอง พร้อมทั้งได้ตรวจสอบจีโนไทป์ที่ตำแหน่งต่างๆ บนโครโมโซมที่ 2 โครโมโซมที่ 5 และโครโมโซมที่ 8 (จากการตรวจเอกสารอ้างอิงที่มีรายงานมาก่อน พบว่า QTLs ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดมีตำแหน่งกระจายตัวทั่วทั้งจีโนม โดยพบหลาย QTLs วางตัวใกล้เคียงกัน (common QTL) บนโครโมโซมที่ 2 โครโมโซมที่ 5 และโครโมโซมที่8 แต่เนื่องจากโมเลกุลเครื่องหมายบางเครื่องหมาย แสดงผลไม่ชัดเจน ซึ่งเมื่อนำมาใช้วิเคราะห์หา QTLs ทำให้ผลที่คลาดเคลื่อน ดังนั้นจึงทำการ คัดเลือกข้อมูลที่ได้จากโมเลกุลเครื่องหมาย ที่ให้ผลชัดเจนและเชื่อถือได้เท่านั้นมาทำการวิเคราะห์ ซึ่งเป็นข้อมูลที่ได้จากโมเลกุลเครื่องหมาย บนโครโมโซมที่ 2 จำนวน 8 เครื่องหมาย ได้แก่ บนโครโมโซมที่ 5 จำนวน 8 เครื่องหมาย ได้แก่ UMC1365, UMC1578, PHI243966, BNLG653, UMC1019, UMC1792, UMC1225 และ UMC1153 และโครโมโซมที่ 8 จำนวน 6 เครื่องหมาย ได้แก่ UMC1316, UMC2356, UMC1905, UMC1268, UMC1005 และ BNLG1131 ตามลำดับ

จึงแสดงข้อมูลข้อมูลจีโนไทป์ (genotypic data) ของประชากรคู่ผสม Ki48 / Ki47 ลูกผสมชั่วที่ 2 จำนวน 160 สายพันธุ์บนโครโมโซมที่ 2 จำนวน 8 เครื่องหมาย ได้แก่ UMC2205, UMC2625 UMC1042, UMC1560, UMC1526, UMC1947, UMC2615 และ UMC1516 โครโมโซมที่ 5 จำนวน 8 เครื่องหมาย ได้แก่ UMC1365, UMC1587, PHI243966, BNLG653, UMC1019, UMC1792, UMC1225 และ UMC1153 และโครโมโซม 8 ที่จำนวน 9 เครื่องหมาย ได้แก่

UMC1316, UMC2356, UMC1905, UMC1268, UMC1005, BNLG1131, UMC2598, UMC2199 และ UMC1161

อัลลีลที่ได้จากการตรวจสอบประชากรด้วยโมเลกุลที่เครื่องหมายมีตำแหน่งบนจีโนม เรียกว่า ข้อมูลจีโนไทป์ (genotypic data) แสดงผลดังตารางที่ 4.4 และผลคะแนนระดับความต้านทานโรคที่ได้จากการประเมินในสภาพโรงเรือนและ ในสภาพแปลงทดลอง เรียกว่า ข้อมูลฟีโนไทป์ (phenotypic data) ข้อมูลทั้งสองส่วนดังกล่าว ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์สืบหาตำแหน่งของ QTLs ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดด้วยวิธี single marker analysis ในการอ่านผลข้อมูลจีโนไทป์ จะให้สัญลักษณ์ของอัลลีลในสภาพต่างๆ ดังนี้ คือ สภาพโฮโมไซกัสอัลลีลของ Ki48 แทนด้วย 1 สภาพโฮโมไซกัสอัลลีลของ Ki47 แทนด้วย 3 และสภาพเฮทเทอโรไซกัสอัลลีลระหว่าง Ki48 และ Ki47 แทนด้วย 2 ข้อมูลสูญหายแทนด้วย -

ตารางที่ 4.4 ข้อมูลจีโนไทป์ของประชากรคู่ผสม Ki48 / Ki47 ลูกผสมชั่วที่ 2

ลำดับ	สายพันธุ์	โครโมโซมที่ 2										โครโมโซมที่ 5						โครโมโซมที่ 8								
		UMC2205	UMC2625	UMC1042	UMC1560	UMC1526	UMC1947	UMC2615	UMC1516	UMC1365	UMC1587	PHI243966	BNLG653	UMC1019	UMC1792	UMC1225	UMC1153	UMC1316	UMC2356	UMC1905	UMC1268	UMC1005	BNLG1131	UMC2598	UMC2199	UMC1161
	Ki48	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Ki47	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
1	P1210401	1	1	1	1	2	-	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	3	-	2	2	1	2	3	2	2
2	P1210403	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	3	3	3	2	2	2
3	P1210404	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2
4	P1210411	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	3	2	2	2
5	P1210413	3	3	3	3	3	3	2	3	3	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
6	P1210414	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	-	1	1	2	2	2	3	2	2	2	2	2	3	2	2
7	P1210415	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
8	P1210418	3	3	3	3	3	3	2	3	2	2	-	2	1	-	2	-	1	1	1	1	2	3	2	1	1
9	P1210502	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1
10	P1210504	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	-	2	3	3	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
11	P1210508	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2
12	P1210512	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3
13	P1210514	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	-	3	1	2	-	3	3	3	3	3	2	3	3	3
14	P1210515	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	1	1	1	2	3	3	3	3	1	2	3	3
15	P1210519	3	3	3	3	3	3	2	3	2	2	-	3	2	3	3	2	3	3	2	2	2	2	3	3	3
16	P1210604	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	-	1	1	1	-	3	3	3	3	3	3	3	3	3
17	P1210608	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	1	-	1	1	2	2	1	1	1
18	P1210610	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	3	3	3	1	-	1	1	1	2	1	1	1

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

ลำดับ	สายพันธุ์	โครโมโซมที่ 2											โครโมโซมที่ 5							โครโมโซมที่ 8							
		UMC2205	UMC2625	UMC1042	UMC1560	UMC1526	UMC1947	UMC2615	UMC1516	UMC1365	UMC1587	PHI243966	BNLG653	UMC1019	UMC1792	UMC1225	UMC1153	UMC1316	UMC2356	UMC1905	UMC1268	UMC1005	BNLG1131	UMC2598	UMC2199	UMC1161
19	P1210612	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	3	-	1	-	2	-	1	-	1	1	1	2	1	1	1
20	P1210615	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	2	2	2	2	-	2	1	1	1	2	2	3
21	P1210616	2	2	2	3	2	2	2	2	1	1	2	-	2	2	2	2	3	-	2	2	2	2	3	2	2
22	P1210617	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	-	3	2	2	-	3	3	2	2	2	-	3	2	2
23	P1210618	2	2	2	3	2	2	2	2	1	2	2	2	3	2	2	2	2	-	2	2	2	3	2	2	2
24	P1210620	3	3	3	3	3	3	2	3	2	2	3	2	2	1	1	1	1	-	1	2	2	2	1	1	1
25	P1210703	2	2	2	2	2	2	2	2	-	1	-	2	3	1	2	2	2	-	2	2	2	2	2	2	2
26	P1210708	3	3	3	3	3	3	2	3	2	2	2	-	2	2	2	3	1	-	1	2	2	2	1	1	1
27	P1210712	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	1	2	1	2	2	3	1	1	1	2	2	2	1	1	1
28	P1210719	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	-	1	-	1	-	1	-	2	2	2	2	1	2	2
29	P1210801	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	1	-	1	2	2	2	1	-	1	2	2	2	1	1	1
30	P1210804	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	1	2	3	3	3	2	3	-	2	2	2	1	3	3	2
31	P1210808	3	3	3	3	3	3	2	3	2	2	2	2	3	-	2	-	1	1	2	2	2	2	1	1	1
32	P1210812	3	3	3	3	3	3	2	3	1	3	1	3	3	3	3	3	2	2	1	1	1	1	2	2	2
33	P1210820	3	3	3	3	3	3	2	3	1	1	1	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
34	P1210905	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	1	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
35	P1210906	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	3	2	2	2	1	2	2	2	2	2	3	1	2	2
36	P1210907	3	3	3	3	3	3	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2
37	P1210913	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	3	2	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1
38	P1210914	2	3	2	2	2	2	2	2	1	1	-	1	2	2	2	2	3	3	1	1	1	1	3	2	2
39	P1210915	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	3	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2
40	P1210916	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	-	1	-	2	-	1	-	1	1	2	2	1	1	1
41	P1211001	2	3	2	3	2	2	3	3	1	1	1	-	1	1	1	-	2	-	2	3	3	3	2	2	2
42	P1211002	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	3	2	2	2	2	2	3	-	3	2	1	1	3	3	3
43	P1211009	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	1	1	2	3	3	3	2	3	2	1	1	1	2	2	2
44	P1211010	2	2	2	3	2	2	1	1	2	2	2	-	1	2	2	2	2	-	3	3	3	3	2	3	3
45	P1211011	2	2	2	3	2	2	2	2	1	1	3	2	2	3	3	3	2	-	2	3	3	3	2	2	2
46	P1211013	2	2	2	3	2	2	2	2	1	1	1	2	2	3	3	3	1	-	1	1	2	3	1	1	1
47	P1211014	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	-	1	1	2	2	1	1	1
48	P1211015	2	2	2	2	-	2	2	3	3	2	2	1	1	2	2	2	2	-	2	2	2	2	2	2	2
49	P1211016	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	1	2	3	2	2	2	2	-	1	1	1	1	2	2	1
50	P1211018	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	1	2	3	3	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2
51	P1211020	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2
52	P1211102	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	3	2	3	3	-	3	2	3	2	2	1	1	2	2	2
53	P1211103	1	1	1	1	1	1	1	2	2	3	1	2	2	3	3	3	3	3	3	2	2	2	3	3	3
54	P1211105	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	2	2	2	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1

สถาบันวิจัยพืชไร่ศรีสะเกษ

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

ลำดับ	สายพันธุ์	โครโมโซมที่ 2										โครโมโซมที่ 5						โครโมโซมที่ 8								
		UMC2205	UMC2625	UMC1042	UMC1560	UMC1526	UMC1947	UMC2615	UMC1516	UMC1365	UMC1587	PHI243966	BNLG653	UMC1019	UMC1792	UMC1225	UMC1153	UMC1316	UMC2356	UMC1905	UMC1268	UMC1005	BNLG1131	UMC2598	UMC2199	UMC1161
55	P1211106	3	3	3	3	3	3	2	3	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
56	P1211111	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	3	1	1	2	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2
57	P1211113	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	3	2	-	2	-	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1
58	P1211114	3	3	3	3	3	3	2	2	2	1	2	2	2	3	3	3	2	2	2	1	1	2	2	2	2
59	P1211204	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	3	3	1	1	1	3	3	3	2	1	1	3	3	3
60	P1211207	2	3	2	2	2	2	2	3	2	1	3	1	2	3	3	3	3	2	2	1	1	1	3	2	1
61	P1211208	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	3	2	2	2	1	2	2	2	2	3	3	3	2	2	2
62	P1211217	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2	3	-	3	-	3	2	1	1	1	1	1	3	2	1
63	P1211218	2	2	2	2	-	2	2	3		3	2	2	1	1	1	2	2	3	3	2	2	2	2	2	3
64	P1211302	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	1	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2
65	P1211306	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	-	3	2	3	1	-	2	2	2	2	2
66	P1211307	3	3	3	3	3	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	3	2
67	P1211314	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	3	-	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2
68	P1211316	3	3	3	3	3	3	-	2	1	1	1	1	-	2	2	2	3	3	2	-	2	3	3	2	2
69	P1211318	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	2	2	-	1	3	3	3	2	1	1
70	P1211319	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	2	1	-	1	2	3	2	2	2	2	2	2	2
71	P1211406	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	2	1	1	1	1	1	2	3	2	1	1	1	2	2	2
72	P1211409	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	2	3	2	2	2	2	3	2	3	3	3	2	2	2
73	P1211411	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	2	2	2	1	1	2	3	2	3	3	3	2	2	2
74	P1211413	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2	3	3	3	2	3	2	2	2	1	2	2	2
75	P1211414	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	1
76	P1211415	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2
77	P1211418	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	-	2	2	2	-	2	2	3	3	3	2	2	2	2	3
78	P1211419	2	2	2	2	3	3	3	3	1	1	3	2	2	1	1	1	2	2	2	1	1	1	2	2	2
79	P1211420	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	1	2	2
80	P1211503	3	3	3	3	3	3	2	3	2	2	2	2	3	2	2	2	3	3	3	3	2	2	3	3	3
81	P1211504	3	3	3	3	3	3	2	3	2	2	2	2	1	3	3	3	2	3	2	2	2	3	2	2	2
82	P1211505	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	2	3	3	2	3	3	1	1	1	2	2	2	1	1	1
83	P1211506	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	3	3	-	3	-	3	3	2	2	2	2	2	3	3
84	P1211507	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	2	2	-	2	2	2	2	2	2	2	2	2
85	P1211509	2	3	2	2	2	2	2	3	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1
86	P1211510	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2		3	3	2	2	1	2	3	2	2	2	2	2	2	2
87	P1211513	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	1	2	3	2	3	3	3	2	2	1	3	3	3
88	P1211514	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	3	2	1	2	2	2	2	1	1	1	2
89	P1211515	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	3	3	2	1	1	1	3	3	3
90	P1211516	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2	2	2	2	3	2	3	2	1	1	1	2	2	2

สถาบันวิจัยพืชไร่ศรีราชา

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

ลำดับ	สายพันธุ์	โครโมโซมที่ 2										โครโมโซมที่ 5						โครโมโซมที่ 8								
		UMC2205	UMC2625	UMC1042	UMC1560	UMC1526	UMC1947	UMC2615	UMC1516	UMC1365	UMC1587	PHI243966	BNLG653	UMC1019	UMC1792	UMC1225	UMC1153	UMC1316	UMC2356	UMC1905	UMC1268	UMC1005	BNLG1131	UMC2598	UMC2199	UMC1161
91	P1211517	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	3	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2
92	P1211519	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	1	1	1	2	3	3	3	2	2	2	3	3	3
93	P1211520	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	3	3	2	3	2	2	-	1	1	1	2	2	1	1
94	P1211602	3	3	3	3	3	3	2	3	2	1	3	2	1	2	2	3	2	3	2	3	3	3	2	2	2
95	P1211603	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	3	3	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1
96	P1211604	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
97	P1211606	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	1	1	2	3	3	1	1	1	2	2	2	1	1	1
98	P1211607	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	3	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2
99	P1211609	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2
100	P1211610	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	3	2	1	1	-	1	2	2	2	2	2	1	1	2
101	P1211613	1	1	1	1	1	1	2	2	3	3	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
102	P1211614	3	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2	2
103	P1211619	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	3	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2
104	P1211701	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	1
105	P1211703	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	2	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	1	3	2	2
106	P1211704	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
107	P1211705	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	3	3	3	3	2	2	2	2	2	1	2	2	2
108	P1211706	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2
109	P1211708	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	3	3	3	1	-	2	2	2	1	1	1	2
110	P1211716	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	3	2	1	1	2	3	2	2	2	2	2	1	1	2	2
111	P1211718	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	-	2	2	2	2	2	3	3
112	P1211719	2	3	3	3	3	3	2	3	3	3	2	3	3	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1
113	P1211802	2	2	2	2	2	3	2	3	3	3	1	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
114	P1211803	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	2	2	2	1	3	-	2	2	1	1	2	2
115	P1211804	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	3	-	2	2	2	2	3	3	2
116	P1211807	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	-	1	1	3	3	2	3	3	3	3	2	2
117	P1211809	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2
118	P1211812	3	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	2	2	3	3	3
119	P1211815	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2	3	3	1	1	1	3	3	1	2	2	2	3	2	2
120	P1211816	3	3	3	3	3	3	2	2	3	3	3	2	1	1	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2	2
121	P1211817	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	3	3	3	3	3	1	3	3	3
122	P1211820	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	3	1	2	2	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3
123	P1211901	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	3	1	2	2	2	2	1	2	2	2	3	2	1	1	2
124	P1211903	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	3	1	1	2	2	3	1	2	2	2	2	2	1	1	2
125	P1211905	1	1	1	1	1	1	2	2	3	3	1	2	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	3	3	3
126	P1211907	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	3	3	1	2	2	2	3	3	3	2	1	1	3	3	3

สถาบันวิจัยพืชไร่ศรีราชา

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

ลำดับ	สายพันธุ์	โครโมโซมที่ 2										โครโมโซมที่ 5						โครโมโซมที่ 8								
		UMC2205	UMC2625	UMC1042	UMC1560	UMC1526	UMC1947	UMC2615	UMC1516	UMC1365	UMC1587	PHI243966	BNLG653	UMC1019	UMC1792	UMC1225	UMC1153	UMC1316	UMC2356	UMC1905	UMC1268	UMC1005	BNLG1131	UMC2598	UMC2199	UMC1161
127	P1211908	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	3	3	1	1	1	3	3	3	3	2	1	3	3	3
128	P1211911	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	-	3	3	3	3	-	1	1	1	1	1	2	1	1	1
129	P1211917	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	2	2	2	3	3
130	P1211920	3	3	3	3	3	3	2	2	1	1	2	3	2	3	3	3	2	2	2	2	3	3	2	2	2
131	P1212001	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	-	2	1	-	2	2	2	2	2	3	3	3	2	2	2
132	P1212002	3	3	3	3	3	3	2	3	1	2	2	3	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1
133	P1212007	3	3	3	3	3	3	2	3	2	2	2	1	1	1	2	2	3	3	3	3	3	1	3	3	3
134	P1212014	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	-	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
135	P1212015	3	3	3	3	3	3	2	3	3	1	1	2	2	2	2	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3
136	P1212016	3	3	3	3	3	3	2	3	2	2	2	2	1	1	2	2	3	3	2	1	1	1	3	3	2
137	P1212017	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	-	2	2	-	2	-	1	1	1	2	2	2	1	1	1
138	P1212020	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	1	-	1	2	2	2	1	1	1
139	P1212101	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2	3	3	2	2	-	2	-	2	2	2	2	2	2	2
140	P1212103	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	2	2	2	2	2	3	-	3	3	3	3	3	3	3
141	P1212104	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	3	1	1	1	1	3	3	2	2	2	2	2	2	2
142	P1212106	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	3	2	2	2	2	2	-	2	2	1	1	3	3	3
143	P1212107	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	2	2	2	3	3	3	3	3	2	2	2	2
144	P1212109	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	3	2	2	2	2	3	3	3
145	P1212111	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	2	3	3	2	2	1	3	3	3	3	3	3	1	1	1
146	P1212112	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
147	P1212113	2	2	2	2	3	3	2	3	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	3	3	3	2	2	2
148	P1212115	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	2	2	2	1	1	1	3	3	3	3	3	2	3	3	3
149	P1212117	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	1	2	3	3	3	3	2	2	2	3	3	3	2	2	2
150	P1212118	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
151	P1212201	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	1	2	2	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2
152	P1212203	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3	2	1	3	3	3
153	P1212205	2	2	2	2	2	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	3	1	1	1
154	P1212211	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	3	2	3	2	1	1	2	2	2	3	2	2	2	2	2
155	P1212213	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	2	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	3	1	2	2
156	P1212215	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	3	3	3	2	2	2	3	3	3	3	2	1	2	3	3
157	P1212216	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2
158	P1212218	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2
159	P1212301	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	3	2	3	2	2	1	3	3	3	2	1	1	2	1	1
160	P1212308	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	-	3	3	3	3	2	1	1	1	1	2	3	3	3
161	P1212316	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	3	1	1	1	1	2	1	-	1	1	2	1	2	1	1
162	P1212318	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2	2	1	1	1	-	-	1	1	1	2	1	1	1

สถาบันวิจัยพืชไร่ศรีราชา

หมายเหตุ 1 แทนสภาพโฮโมไซกัสอัลลีลของ Ki48

2 แทนสภาพเฮทเทอโรไซกัสอัลลีลระหว่าง Ki48 และ Ki47

3 แทนสภาพโฮโมไซกัสอัลลีลของ Ki47

- แทนข้อมูลสูญหาย

ผลการสืบหาตำแหน่ง QTLs ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ใน ข้าวโพดคู่ผสม Ki48 / Ki47 ลูกผสมชั่วที่ 2 (F_2) พบ QTLs บนโครโมโซมที่ 5 และโครโมโซมที่ 8 โดยบนโครโมโซมที่ 5 พบ QTLs ภายใต้สภาพแปลงทดลอง จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ UMC1587 (ตำแหน่ง bin 5.02 / ลำดับเบสที่ 10.2 ล้านเบส) PHI243966 (ตำแหน่ง bin 5.0 3 / ลำดับเบสที่ 15.0 ล้านเบส) และ UMC1019 (ตำแหน่ง bin 5.0 6 / ลำดับเบสที่ 190.7 ล้านเบส) ซึ่ง UMC1019 เกี่ยวข้องกับลักษณะชนิดของบาดแผลหลังการปลูกถ่ายเชื้อที่ 90 และ 100 วัน (DS2 และ DS3) ส่วนบนโครโมโซม ที่ 8 พบ QTL s ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ มีตำแหน่งอยู่ระหว่าง UMC2356 (bin 8.06 / 160.4 ล้านเบส) และ UMC1268 (bin 5.02 / 168.9 ล้านเบส) ซึ่งตำแหน่งที่พบนี้ใกล้เคียงกับตำแหน่งของยีน *Ht2* และ *Htn1* (bin 8.05 และ 8.06 ตามลำดับ) ที่เคยมีการรายงานมาก่อน

ดังนั้น จึงเพิ่มจำนวนโมเลกุลเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 5 ในช่วง bin 5.06 และบนโครโมโซมที่ 8 ในช่วง bin 8.05-8.06 เพื่อให้สามารถระบุโมเลกุลเครื่องหมายที่วางตัวใกล้กับยีนต้านทานโรคมากขึ้น นอกจากนี้ ยังเพิ่มโมเลกุลเครื่องหมายในการตรวจสอบจีโนมข้าวโพดบนโครโมโซมที่ 2 ตำแหน่ง bin 2.07-2.08 ซึ่งเป็นบริเวณที่เคยมีการรายงานว่าตรวจพบยีน *Ht1* ทำการตรวจสอบข้าวโพดสายพันธุ์แท้ด้วยโมเลกุลเครื่องหมายชนิด Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ microsatellite เพิ่มจากเดิม จำนวนทั้งสิ้น 35 เครื่องหมาย แบ่งเป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่วางตัวบนโครโมโซมที่ 2 โครโมโซมที่ 5 และโครโมโซมที่ 8 จำนวน 20, 5 และ 10 เครื่องหมาย ตามลำดับ รายละเอียดแสดงดังตารางภาคผนวกที่ 4ข

โมเลกุลที่เครื่องหมายแสดงความต่าง (polymorphic marker) ของคู่ผสม Ki48 / Ki47 มีจำนวนเท่ากับ 15 และ 16 เครื่องหมาย โมเลกุลเครื่องหมายที่แสดงความต่างระหว่าง Ki47 / Ki48 จำนวน 16 เครื่องหมาย แบ่งเป็น โมเลกุลเครื่องหมายที่มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 2 จำนวน 12 เครื่องหมาย ได้แก่ UMC1637a UMC1890 UMC2205 UMC2625 UMC1042 UMC1560 UMC1745 UMC1526 UMC1947 UMC2615 UMC1516 และ UMC2374และโมเลกุลเครื่องหมายที่มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 8 จำนวน 4 เครื่องหมาย ได้แก่ UMC2598 UMC2199 UMC2210 และ

UMC1161 คิดเป็นร้อยละ 55 และ 40 ของโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมด ตามลำดับ แต่ไม่พบโมเลกุลเครื่องหมายที่แสดงความต่างระหว่าง Ki47 / Ki48 บนโครโมโซมที่ 5

ตารางที่ 4.5 แสดงจำนวนโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ และโมเลกุลเครื่องหมายที่แสดงความต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อ และแม่

โครโมโซมที่	**จำนวนโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบ**	**จำนวนโมเลกุลเครื่องหมายที่แสดง** polymorphism	**ร้อยละของโมเลกุลเครื่องหมายที่แสดง** polymorphism
		Ki47 / Ki48	Ki47 / Ki48
2	20	12	55
5	5	0	0
8	10	4	40
รวม	35	16	46

4. การตรวจสอบจีโนไทป์ในข้าวโพดคู่ผสม Ki48 / Ki47 ลูกผสมชั่วที่ 2

จำนวนโมเลกุลเครื่องหมายทั้งหมด 16 เครื่องหมายที่แสดงความต่างระหว่าง Ki47 และ Ki48 มีเพียง 11 เครื่องหมายที่ถูกใช้ในการตรวจสอบประชากรข้าวโพดชั่ว F_2 จำนวน 162 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 2 และโครโมโซมที่ 8 จำนวน 8 และ 3 เครื่องหมาย ตามลำดับ ทั้งนี้ เนื่องจากโมเลกุลเครื่องหมายบางเครื่องหมายมีขนาดต่างกันเพียงเล็กน้อย บางเครื่องหมายแสดงลักษณะอัลลีลในสภาพเฮทเทอโรไซกัสไม่ชัดเจน เมื่อใช้ตรวจสอบในประชากรทำให้อ่านผลยาก เพื่อลดความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้น และลดความคลาดเคลื่อนในการระบุตำแหน่งของ QTLs จึงคัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมายที่ไม่ชัดเจนออก และคงคัดเลือกโมเลกุลเครื่องหมายที่สามารถเห็นผลชัดเจนใช้ในการตรวจสอบประชากร ตามที่แสดงในตารางที่ 4.6

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่4.6 แสดงโมเลกุลเครื่องหมายที่แสดงความต่างระหว่าง Ki47 และ Ki48 และเครื่องหมายที่ใช้ในการตรวจสอบประชากรลูกผสมชั่วที่ 2

โครโมโซม	**โมเลกุลเครื่องหมาย ที่แสดง** polymorphism	**โมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ ในการตรวจสอบประชากร**
2	UMC1637a, UMC1890, UMC2205, UMC2625, UMC1042, UMC1560, UMC1745, UMC1526, UMC1947, UMC2615 และ UMC1516	UMC2205, UMC2625, UMC1042, UMC1560, UMC1526, UMC1947, UMC2615 และ UMC1516
8	UMC2598, UMC2199, UMC2210 และ UMC1161	UMC2598, UMC2199 และ UMC1161

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีการเกษตร

วิจารณ์ผลการทดลอง บทที่ 4

การสืบหาข้อมูลของโมเลกุลเครื่องหมายวางตัวใกล้กับตำแหน่งยีนลักษณะต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่บนโครโมโซมข้าวโพด จำนวนทั้งสิ้น 56 ตำแหน่งกระจายตัวทั่วทั้งจีโนม โดยบนโครโมโซมที่ 3 โครโมโซมที่ 5 และโครโมโซมที่ 8 ซึ่งพบ QTL หลายตำแหน่งวางตัวใกล้เคียงกัน (common QTL) นอกจากนี้ ยังเคยมีรายงานเกี่ยวกับยีนต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุในกลุ่ม Helminthosporium turcicum ได้แก่ ยีน Ht1, Ht2 และ Htn1 โดยมีตำแหน่งวางตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 2 (bin 2.07/2.08) และ 8 (bin 8.05 และ 8.06) ตามลำดับ (Weiz and Geiger, 2000, Yin et al., 2003, Pataky, 2006, Chung et al., 2010)

การจำแนกโมเลกุลเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างของพันธุ์พ่อ และพันธุ์แม่ (parental polymorphism survey) คือ Ki48 และ Ki47 โดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายชนิด microsatellite จำนวนทั้งสิ้น 161 เครื่องหมาย ที่มีตำแหน่งวางตัวอยู่บนโครโมโซมทั้ง 10 โครโมโซม มี จำนวน 98 เครื่องหมาย คิดเป็นร้อยละ 60.86 ของจำนวนเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมด โมเลกุลเครื่องหมายที่แสดงความต่างระหว่างพันธุ์พ่อแม่เหล่านี้ จะนำไปหาตำแหน่งของ QTL ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ ในข้าวโพดคู่ผสม Ki48 / Ki47 ลูกผสมชั่วที่ 2 (F2) ในเบื้องต้น

โมเลกุลเครื่องหมายที่จำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวโพดพันธุ์พ่อ และแม่ (polymorphism)ซึ่งวางตัวบนโครโมโซมที่ 2 โครโมโซมที่ 5 และโครโมโซมที่ 8 จำนวนโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบ 35 เครื่องหมาย มีจำนวนโมเลกุลเครื่องหมายที่จำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวโพดพันธุ์พ่อ และแม่ 16 เครื่องหมาย คือ บนโครโมโซมที่ 2 จำนวน 12 เครื่องหมาย (ร้อยละ 55) และบนโครโมโซมที่ 8 จำนวน 4 เครื่องหมาย(ร้อยละ 40) ส่วนโครโมโซมที่ 5 เครื่องหมายไม่สามารถพบความแตกต่าง (non polymorphism) (ร้อยละ 0) จึงจำเป็นต้องมีการ เพิ่มเติมโมเลกุลเครื่องหมายบนโครโมโซม 5 การเพิ่มเติมการตรวจสอบโมเลกุลเครื่องหมายที่ความแตกต่างระหว่างข้าวโพดพันธุ์พ่อ และแม่ ซึ่งวางตัวบนโครโมโซมที่ 2 โครโมโซมที่ 5 และโครโมโซมที่ 8 ดังกล่าว ซึ่งเป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ พบ QTL หลายตำแหน่งวางตัวใกล้เคียงกัน บนโครโมโซมที่ 3 โครโมโซมที่ 5 และโครโมโซมที่ 8 นอกจากนี้ ยังเคยมีรายงานเกี่ยวกับยีนต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อ ได้แก่ ยีน Ht1, Ht2 และ Htn1 โดยมีตำแหน่งวางตัวอยู่บนโครโมโซมที่ 2 (bin 2.07/2.08) และ 8 (bin 8.05 และ 8.06) (Weiz and Geiger, 2000, Yin et al., 2003, Pataky, 2006, Chung et al., 2010) ซึ่งทำการทดสอบโมเลกุลเครื่องหมายทั้งหมด 35 เครื่องหมาย ให้ความแตกต่างจำนวน 16 เครื่องหมาย นั้นคือ บนโครโมโซม ที่ 2 จำนวน 12 เครื่องหมาย และบนโครโมโซมที่ 8 จำนวน 4 เครื่องหมาย

สถาบันวิจัยพืชไร่ศรีสะเกษ

จำนวนโมเลกุลเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างจากการตรวจสอบพันธุ์พ่อและแม่ ทั้งหมด 16 เครื่องหมาย แสดงความต่างระหว่าง Ki47 และ Ki48 มีเพียง 11 เครื่องหมายที่ถูกใช้ในการตรวจสอบประชากรข้าวโพดชั่ว F2 จำนวน 162 สายพันธุ์โดยแบ่งเป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ 2 และโครโมโซมที่ 8 จำนวน 8 และ 3 เครื่องหมาย เนื่องจากโมเลกุลเครื่องหมายบางเครื่องหมายมีขนาดต่างกันเพียงเล็กน้อย บางเครื่องหมายแสดงลักษณะอัลลีลในสภาพเฮทเทอโรไซกัสไม่ชัดเจน

จากนั้นสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ของในข้าวโพดลูกผสมชั่วที่ 2 คู่ผสม Ki48 / Ki47 โดยการใช้โมเลกุลเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างระหว่าง ซึ่งได้จากการตรวจสอบพันธุ์พ่อและแม่ จำนวนโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ในการตรวจสอบประชากร F2 อยู่บนโครโมโซมที่ 5 จำนวน 8 เครื่องหมาย และโครโมโซมที่ 8 จำนวน 6 เครื่องหมาย ดังนั้น จึงเพิ่มจำนวนโมเลกุลเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 5 ในช่วง bin 5.06 บนโครโมโซมที่ 8 ในช่วง bin 8.05-8.06 และบนโครโมโซมที่ 2 ตำแหน่ง bin 2.07-2.08 อีกจำนวน 35 เครื่องหมาย แบ่งเป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่วางตัวบนโครโมโซมที่ 2 โครโมโซมที่ 5 และโครโมโซมที่ 8 จำนวน 20 , 5 และ 10 เครื่องหมาย

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีการเกษตร

สรุป บทที่ 4

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ จำแนกโมเลกุลเครื่องหมาย Simple Sequence Repeats (SSR) Marker สำหรับการสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมประชากรข้าวโพด

1. เพื่อจำแนกโมเลกุลเครื่องหมาย

การสืบหาข้อมูลของโมเลกุลเครื่องหมายวางตัวใกล้กับตำแหน่งยีนลักษณะต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่บนโครโมโซมข้าวโพด จำนวนทั้งสิ้น 56 ตำแหน่งกระจายตัวทั่วทั้งจีโนม โดยบนโครโมโซมที่ 3 โครโมโซมที่ 5 และโครโมโซมที่ 8

2. การสร้างแผนที่ทางพันธุกรรม

การจำแนกโมเลกุลเครื่องหมาย ชนิด microsatellite ที่ให้ความแตกต่างของพันธุ์พ่อแม่ (parental polymorphism survey) คือ Ki48 และ Ki47 จำนวน 161 เครื่องหมาย ตำแหน่งวางตัวอยู่บน 10 โครโมโซม จำนวน 98 เครื่องหมาย คิดเป็นร้อยละ 60.86 ของจำนวนเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบทั้งหมด โมเลกุล โดยโครโมโซมที่ 2 ,5 และ 8 ซึ่งมีโมเลกุลเครื่องหมายที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ พบ QTL หลายตำแหน่งวางตัวใกล้เคียงกันกับยีนต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อ ได้แก่ ยีน *Ht1*, *Ht2* และ *Htn1* มีโมเลกุลเครื่องหมายที่ จำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวโพดพันธุ์พ่อ และแม่ (polymorphism) 16 เครื่องหมาย จากจำนวน 35 เครื่องหมาย คือ บนโครโมโซมที่ 2 จำนวน 12 เครื่องหมาย (ร้อยละ 55) และบนโครโมโซมที่ 8 จำนวน 4 เครื่องหมาย (ร้อยละ 40) ส่วนโครโมโซมที่ 5 เครื่องหมายไม่สามารถพบความแตกต่าง (non polymorphism) (ร้อยละ 0) การเพิ่มเติมการตรวจสอบ โมเลกุลเครื่องหมายที่ความแตกต่างระหว่างข้าวโพดพันธุ์ พ่อแม่ ซึ่งวางตัวบนโครโมโซมที่ 2 โครโมโซมที่ 5 และโครโมโซมที่ 8 ดังกล่าว ซึ่งเป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ พบ QTL หลายตำแหน่ง

จากนั้นสร้างแผนที่ทางพันธุกรรมความต้านทานโรคใบไหม้แผลใหญ่ของ ในข้าวโพดลูกผสมชั่วที่ 2 คู่ผสม Ki48 / Ki47 โดยการใช้โมเลกุลเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างซึ่งได้จากการตรวจสอบพันธุ์พ่อแม่ จำนวนโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ในการตรวจสอบประชากร F_2 อยู่บนโครโมโซมที่ 5 จำนวน 8 เครื่องหมาย และโครโมโซมที่ 8 จำนวน 6 เครื่องหมาย ดังนั้น จึงเพิ่มจำนวนโมเลกุลเครื่องหมายบนโครโมโซมที่ 5 ในช่วง bin 5.06 บนโครโมโซมที่ 8 ในช่วง bin 8.05-8.06 และบนโครโมโซมที่ 2 ตำแหน่ง bin 2.07-2.08 อีกจำนวน 35 เครื่องหมาย แบ่งเป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่วางตัวบนโครโมโซมที่ 2 โครโมโซมที่ 5 และโครโมโซมที่ 8 จำนวน 20, 5 และ 10 เครื่องหมาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์