



วิทยานิพนธ์

การสร้างแผนที่ระดับโมเลกุลเพื่อหาดำแหน่งยืนต้านทาน
โรคแอนแทรกโนสจากพริก *Capsicum chinense* 'PBC932'

Molecular Mapping to Locate Anthracnose Resistance Genes
Derived from *Capsicum chinense* 'PBC932'

นางสาวนิภา ชื่นป้อม

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การสร้างแผนที่ระดับโมเลกุลเพื่อหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนสจากพริก
Capsicum chinense 'PBC932'

Molecular Mapping to Locate Anthracnose Resistance Genes Derived from *Capsicum chinense* 'PBC932'

นามผู้วิจัย นางสาวนิภา ชื่นป้อม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์อรรถน์ มงคลพร, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จุลภาศ คำนวณ, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์สิริกุล วะสี, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 4 เดือน มิ.ย. พ.ศ. 51

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การสร้างแผนที่ระดับโมเลกุลเพื่อหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนสจากพริก

Capsicum chinense ‘PBC932’

Molecular Mapping to Locate Anthracnose Resistance Genes Derived from

Capsicum chinense ‘PBC932’

โดย

นางสาวนิภา ชื่นป้อม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2551

นิภา ชื่นป้อม 2551: การสร้างแผนที่ระดับโมเลกุลเพื่อหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคแอนแทรกโนสจากพริก *Capsicum chinense* 'PBC932' ปรินญาวิทยาสาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์อรรจน์ มงคลพร, Ph.D. 80 หน้า

การศึกษากครั้งนี้เป็นการพัฒนา DNA เครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรคแอนแทรกโนส (*Colletotrichum capsici*) ในพริกระยะผลเขียว จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าถูกควบคุมด้วยยีนเดี่ยว 1 ตำแหน่ง (*coI*) (Pakdeevanapom *et al.*, 2005) โดยแบ่งการศึกษออกเป็นสองส่วน คือการสร้างแผนที่ระดับโมเลกุล และการใช้เทคนิค bulked segregant analysis (BSA) ร่วมกับเครื่องหมาย amplified fragment length polymorphisms (AFLP) เพื่อหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทาน การสร้างแผนที่ระดับโมเลกุลใช้ประชากรลูกผสมกลับ BC_1F_2 สร้างจากการผสมข้ามชนิดระหว่างพริก *C. annuum* 'บางช้าง' พันธุ์อ่อนแอ กับ *C. chinense* 'PBC932' สายพันธุ์ต้านทาน จำนวน 140 ต้น กับเครื่องหมายชนิด STMS (sequenced tagged microsatellite site) 35 ตำแหน่ง EST (expressed sequence tags) 10 ตำแหน่ง และลักษณะทางสัณฐานวิทยา 8 ตำแหน่ง แผนที่ที่ได้ประกอบด้วยกลุ่มลิงค์เกจ 11 กลุ่ม ครอบคลุม 770.8 cM โดยที่ยีน *coI* อยู่ในกลุ่มที่ 1 ซึ่งมีเครื่องหมาย STMS PMC3 อยู่ห่างจาก *coI* 36.9 cM จากการวิเคราะห์ QTL เพื่อหาตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทาน พบว่าเครื่องหมาย PMC3 มีอิทธิพลต่อ QTL ของลักษณะต้านทาน ที่ค่า LOD เท่ากับ 4.09 ($P = 0.0001$) มีระดับความน่าเชื่อมั่นมากกว่า 99%

การใช้เทคนิค BSA ได้สร้าง DNA bulk 2 bulk ได้แก่ bulk R ซึ่งรวม DNA จากต้นที่มีลักษณะต้านทาน (จีโนไทป์ *coIcoI*) จากประชากร BC_1F_2 และ bulk S ซึ่งรวม DNA จากต้นที่มีลักษณะอ่อนแอจากสายพันธุ์ในประชากร BC_1F_2 ที่แสดงลักษณะอ่อนแอทั้งหมด ที่คาดว่ามียีนโนไทป์แบบ homozygous *CoICoI* จากการแยกความแตกต่างระหว่าง bulk ด้วยเครื่องหมาย AFLP ทั้งหมด 51 ไพรเมอร์ พบเครื่องหมาย AFLP 2 ตำแหน่ง คือ 932-1 และ 932-2 มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคแอนแทรกโนสในพริกระยะผลเขียว 84 และ 68% ตามลำดับ เมื่อทดสอบในประชากร F_2

นิภา ชื่นป้อม

ลายมือชื่อนิติ



ลายมือชื่อประธานกรรมการ

26 / 5 / 51

Nipha Chuenpom 2008: Molecular Mapping to Locate Anthracnose Resistance Genes Derived from *Capsicum chinense* 'PBC932'. Master of Science (Agriculture Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Orarat Mongkolporn, Ph.D. 80 pages.

The study was aimed to develop molecular markers that were linked to resistance to anthracnose in chili at green fruit stage which was previously identified as *co1* (Pakdeevanaporn *et al.*, 2005). Two approaches, mapping and bulked segregant analysis (BSA) were applied to the study. A backcross population ($BC_1F_1P_2$) containing 140 plants derived from an interspecific cross between *C. annuum* 'Bangchang' (susceptible variety) and *C. chinense* 'PBC932' (highly resistant line) was used as mapping population with 35 STMS (sequenced tagged microsatellite site) 10 EST (expressed sequence tags) and 8 morphological markers. Eleven linkage groups were formed covering 770.8 cM. The *co1* was located in linkage group 1 with STMS PMC3 36.9 cM apart. QTL analysis found that the PMC3 was a major QTL of anthracnose resistance with the LOD score value of 4.09 ($P = 0.0001$) which was highly significant (>99%).

Two DNA bulks were generated from resistant plants of $BC_1F_1P_2$ population and from susceptible plants of susceptible lines of $BC_1F_1P_1$. Total 51 AFLP primers were screened on parents bulk R and bulk S. Two AFLP markers 932-1 and 932-2, appeared to be associated with resistance trait 84 and 68% respectively.

Nipha Chuenpom
Student's signature

Orarat Mongkolporn
Thesis Advisor's signature

26 / 5 / 08

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์พันธกิจวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่สนับสนุนทุนวิจัย และทุนการศึกษาหลัก ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม ที่ได้สนับสนุนทุนการศึกษา และทุนวิจัยส่วนหนึ่ง และขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม สำหรับสถานที่ในการปลูกทดลอง

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อรรถนันท์ มงคลพร มงคลพร ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้โอกาสในการทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้ และให้คำแนะนำตลอดจนได้ให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สามารถดำเนินไปได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จุลภาค คูนวงศ์ กรรมการวิชาเอก ที่ได้เสนอแนวทางการแก้ไขปัญหาดังกล่าว ทำให้วิทยานิพนธ์สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. สิริกุล วัชระสิ กรรมการวิชาการ ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ และขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ศศิธร วุฒิชัย อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ข้อเสนอแนะ และตรวจการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัว และขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ เพื่อนๆ จากห้องปฏิบัติการ A413 และ A310 (ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) ทุกคนสำหรับความรู้ด้านเทคนิคต่างๆ ความช่วยเหลือ คำปรึกษา และกำลังใจที่มีให้เสมอมา

นิภา ชื่นป้อม

พฤษภาคม 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	5
การตรวจเอกสาร	6
อุปกรณ์และวิธีการ	20
ผลและวิจารณ์	36
ผล	36
วิจารณ์	60
สรุป	63
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	64
ภาคผนวก	70

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความสามารถในการผสมข้ามชนิดของพริก และความสามารถของลูกผสมในการขยายพันธุ์ (Bassett, 1986)	8
2	เปอร์เซ็นต์สัดส่วนโรค และระดับความต้านทานโรคแอนแทรคโนสที่จัดแบ่งตามเปอร์เซ็นต์สัดส่วนโรค	22
3	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 8 ลักษณะ และการแสดงออกของยีน ที่มีความแตกต่างระหว่างพริก ‘บางช้าง’ และ ‘PBC932’	24
4	ความถี่ของเปอร์เซ็นต์สัดส่วนโรค หลังจากการปลูกเชื้อ <i>C. capsici</i> isolate 158ci เป็นเวลา 7 วัน ของพริก ‘PBC932’ ‘บางช้าง’ ลูกผสม F_1 และลูกผสมกลับ $BC_1F_1P_2$	37
5	การกระจายตัวของลักษณะทางสัณฐานวิทยา 8 ลักษณะ ในประชากร $BC_1F_1P_2$ ($P_2 \times F_1$)	38
6	การกระจายตัวของ DNA เครื่องหมาย sequenced tagged microsatellite site จำนวน 65 ตำแหน่ง ในพริกประชากร $BC_1F_1P_2$ ($P_2 \times F_1$)	41
7	การกระจายตัวของ DNA เครื่องหมาย sequence-characterized amplified region จำนวน 8 ตำแหน่ง ในพริกประชากร $BC_1F_1P_2$ ($P_2 \times F_1$)	45
8	การกระจายตัวของ DNA เครื่องหมาย cleaved amplified polymorphic sequence จำนวน 3 ตำแหน่ง ในพริกประชากร $BC_1F_1P_2$ ($P_2 \times F_1$)	46
9	เครื่องหมายที่นำไปใช้ในการสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจที่ได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ DNA เครื่องหมาย	46
10	เครื่องหมายที่เกี่ยวข้องกับลักษณะเชิงปริมาณของลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริกกระยะผลเขียว	50
11	การเกิดโรคแอนแทรคโนสในประชากร $BC_1F_2P_1$ และคัดเลือกต้นพริกที่คาดว่ามียีนไทป์ <i>Co1Co1</i> มาใช้ใน BSA	52
12	AFLP 36 ตำแหน่ง ที่ได้จาก bulked segregant analysis (BSA)	53
13	การทดสอบเครื่องหมาย 932-1 และ 932-2 ในสมาชิกกลุ่ม bulk	54

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	ลำดับเบส และคุณสมบัติของไพรเมอร์ เครื่องหมาย SACR 932-1 และ 932-2	56
15	การกระจายตัวของ SCAR 932-1 และ SCAR 932-2 ในประชากร F_2 (‘บางช้าง’ x ‘PBC932’) จำนวน 96 ต้น	59
16	ความสัมพันธ์ระหว่าง SCAR 932-1 และ SCAR 932-2 กับลักษณะความต้านทาน โรคแอนแทรกโนส	59
ตารางภาคผนวกที่		
1	ลำดับนิวคลีโอไทป์ของ microsatellite 76 ตำแหน่ง (Lee <i>et al.</i> , 2004)	71
2	ไพรเมอร์ sequenced tagged microsatellite site (STMS) 63 ตำแหน่ง (อรรถน์ มงคลพร, ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์)	76

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	Karyotypes ของพริก <i>Capsicum</i> spp. 5 ชนิด (Park <i>et al.</i> , 1999)	7
2	วงจรชีวิตของเชื้อ <i>Colletotrichum</i> (Agrios, 1997)	10
3	เทคนิค bulked segregant analysis (BSA) ร่วมกับเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) ในการแยกความแตกต่างของ DNA ระหว่าง bulk ที่ได้จากประชากร F_2 (Michelmore <i>et al.</i> , 1991)	15
4	การสร้างประชากร $BC_1F_1P_2$	21
5	disease diagram ของอาการโรคแอนแทรคโนสที่มี % สัดส่วนโรคตั้งแต่ 0- >25% ใช้สำหรับประเมินอาการโรคแอนแทรคโนส	23
6	การสร้างประชากร $BC_1F_1P_2$ และ $BC_1F_2P_1$ จากพริก ‘บางช้าง’ กับ ‘PBC932’ เพื่อใช้สร้าง DNA bulk R และ bulk S	30
7	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำนวน 8 ลักษณะ ในประชากรพริก $BC_1F_1P_2$ ($P_2 \times F_1$)	39
8	การกระจายตัวของ sequenced tagged microsatellite site ที่ตำแหน่ง PMC20 ในพริก ‘บางช้าง’ (P_1) ‘PBC932’ (P_2) F_1 และประชากร $BC_1F_1P_2$; M คือ molecular weight marker ϕ X174 DNA/ <i>Hinf</i> I (Fermentas, Canada)	40
9	การกระจายตัวของ sequence-characterized amplified region (SCAR) ที่ตำแหน่ง BOM18 ในพริก ‘บางช้าง’ (P_1) ‘PBC932’ (P_2) F_1 และประชากร $BC_1F_1P_2$; M คือ molecular weight marker GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas, Canada)	44
10	การกระจายตัวของ cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) ที่ตำแหน่ง POM14c ในพริก ‘PBC932’ (P_2) ‘บางช้าง’ (P_1) และประชากร $BC_1F_1P_2$; M คือ molecular weight marker GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas, Canada)	44
11	การกระจายตัวของ CAPS BOM24c ที่ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 1:1 ของการปรากฏแถบ DNA และไม่ปรากฏแถบ DNA ในประชากร $BC_1F_1P_2$; P_2 คือ ‘PBC932’ P_1 คือ ‘บางช้าง’; M คือ molecular weight marker GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas, Canada)	45

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	แผนที่กลุ่มลิงค์เกจของพริก ที่ได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ DNA เครื่องหมาย เพื่อหาความสัมพันธ์กับตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะด้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริกระยะผลเขียว (<i>coI</i>)	48
13	ค่า LOD ของ DNA เครื่องหมาย PMC3 ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะ QTL ของยีนด้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริกระยะผลเขียว ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 1	51
14	เครื่องหมาย AFLP 932-1 และ 932-2 ในพริก ‘PBC932’ (P_2) ‘บางช้าง’ (P_1) bulk R (R) bulk S (S) และสมาชิก bulk R และ bulk S	55
15	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมาย AFLP 932-2 ขนาด 233 bp และตำแหน่ง SCAR ไพรมเมอร์ ที่ออกแบบได้	55
16	ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของเครื่องหมาย AFLP 932-1 ขนาด 217 bp และตำแหน่ง SCAR ไพรมเมอร์ ที่ออกแบบได้	56
17	แถบเครื่องหมาย SCAR 932-1 ในพริก ‘PBC932’ (P_2) ‘บางช้าง’ (P_1) bulk R (R) bulk S (S) และสมาชิก bulk; ; M คือ molecular weight marker GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Canada)	57
18	แถบเครื่องหมาย SCAR 932-2 ในพริก ‘PBC932’ (P_2) ‘บางช้าง’ (P_1) bulk R (R) bulk S (S) และสมาชิก bulk; ; M คือ molecular weight marker GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Canada)	58

การสร้างแผนที่ระดับโมเลกุลเพื่อหาตำแหน่งยืนต้านทานโรคแอนแทรคโนสจากพริก

Capsicum chinense ‘PBC932’

Molecular Mapping to Locate Anthracnose Resistance Genes Derived from

Capsicum chinense ‘PBC932’

คำนำ

พริก (*Capsicum* spp.) เป็นพืชผักที่รู้จักกันทั่วโลก มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ ได้มีการสำรวจพบโดย Christopher Columbus ปีต่อมาได้มีการเผยแพร่ในแถบยุโรป และได้แพร่กระจายไปยังประเทศต่างๆ ในทวีปเอเชีย (Bosland and Votava, 1999) ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่นิยมรับประทานพริกกันมาเป็นเวลานาน พริกนอกจากมีรสชาติเผ็ดยังมีคุณค่าทางอาหารสูง เช่น วิตามินเอ และ ซี ปัจจุบันได้มีการนำพริกไปใช้ประโยชน์ในการผลิตยารักษาโรค และใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการผลิตซอสพริก จากข้อมูลการส่งออกผลผลิตพริกไปยังต่างประเทศในปี พ.ศ. 2550 มีมูลค่ามากกว่าร้อยละห้าของมูลค่าการส่งออกผลไม้สดทั้งหมด (กรมศุลกากร, 2550) ในรูปของพริกแห้ง และพริกป่น และมีแนวโน้มปริมาณการส่งออกผลผลิตพริกเพิ่มขึ้นทุกปี ดังนั้นพริกจึงนับว่าเป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย

โรคแอนแทรคโนสนับว่าเป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งของการผลิตพริกในประเทศไทย และบริเวณเขตร้อนชื้นอื่นๆ ทั่วโลก เช่น อินโดนีเซีย ใต้หวัน เกาหลี (Voorrips *et al.*, 2004; Manandhar *et al.*, 1994; Yoon and Park, 2005) เป็นต้น โรคแอนแทรคโนสเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ทำให้ผลผลิตพริกเกิดความเสียหายเป็นจำนวนมากทั้งก่อนการเก็บเกี่ยว และหลังการเก็บเกี่ยว จากการสำรวจแปลงปลูกพริกของเกษตรกรในเขตภาคตะวันตกของประเทศไทยปี พ.ศ. 2547 พบว่าผลผลิตพริกเกิดความเสียหายจากโรคแอนแทรคโนส มากกว่า 50% ดังนั้นโรคแอนแทรคโนสจึงเป็นปัญหาที่จำเป็นต้องรีบแก้ไข

การแก้ไขปัญหาระดับโมเลกุลในพริกแบบยั่งยืน สามารถทำได้โดยการปรับปรุงพันธุ์พริกให้ต้านทานต่อโรคแอนแทรคโนส พริกพันธุ์การค้าที่ปลูกกันมากทั่วโลก คือพริกชนิด *Capsicum annuum* ซึ่งพบว่าเมื่อทดสอบความต้านทานโรคแอนแทรคโนสด้วยเชื้อ *Colletotrichum* spp. ส่วนมากมีลักษณะอ่อนแอต่อโรค (Yoon *et al.*, 2004) ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์พริกให้ต้านทานต่อโรคแอนแทรคโนสจำเป็นต้องใช้แหล่งพันธุกรรมความต้านทานจากพริกในชนิดอื่นๆ จากรายงานของ AVRDC (The

World Vegetable Center) ได้ทดสอบความต้านทานโรคแอนแทรคโนสของพริกจากแหล่งพันธุ์กรรมต่างๆ พบว่าพริก *C. baccatum* สายพันธุ์ ‘PBC80’ และ ‘PBC81’ และ *C. chinense* ‘PBC932’ มีระดับความต้านทานสูง (AVRDC, 2002) และจากรายงานการผสมข้ามชนิดของพริก พบว่าการผสมข้ามชนิดระหว่างพริก *C. baccatum* กับ *C. annuum* สามารถผสมกันได้ แต่เมล็ดที่ได้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ตามธรรมชาติ ต้องใช้เทคนิคการช่วยชีวิตคัพภะ (embryo rescue) เพื่อให้ได้ประชากรลูกผสมต่อไป สำหรับการผสมข้ามชนิดระหว่างพริก *C. chinense* กับ *C. annuum* พบว่าสามารถผสมข้ามกันได้ และเมล็ดที่ได้สามารถเจริญเติบโตได้ตามธรรมชาติ (Bosland and Votava, 1999)

โครงการปรับปรุงพันธุ์พริกให้ต้านทานต่อโรคแอนแทรคโนส เป็นความร่วมมือระหว่างศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน และภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม โดยได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย มีเป้าหมายเพื่อสร้างพันธุ์พริกที่ต้านทานต่อโรคแอนแทรคโนส หัวใจสำคัญของงานปรับปรุงพันธุ์คือ การคัดเลือกลักษณะอย่างถูกต้องแม่นยำ และมีประสิทธิภาพ ลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนสเป็นลักษณะหนึ่งที่คัดเลือกยาก เนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างเข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งอาจทำให้ลักษณะต้านทานที่แสดงออกมานั้นไม่ได้เกิดจากพันธุ์กรรม เช่น ต้นพืชอยู่ในระยะที่ไม่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อ สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อ หรือเชื้อสาเหตุของโรคที่นำมาใช้ในการทดสอบไม่รุนแรง ดังนั้นเพื่อความแม่นยำ และเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนส จึงมีความต้องการที่จะนำเทคนิคทางด้าน DNA เครื่องหมายมาช่วยในการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนส

การสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจเป็นการจัดเรียง และวางตำแหน่งของยีน และ DNA เครื่องหมาย ช่วยทำให้ทราบตำแหน่งของยีนต่างๆ ในจีโนม และตำแหน่งของ DNA เครื่องหมายที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนที่น่าสนใจ นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในการรวมยีนที่ต้องการไว้ในพืชพันธุ์เดียวกัน (gene pyramiding) และนำไปสู่การแยกสกัดยีน เมื่อมีแผนที่ละเอียด ซึ่งการสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจของพริกในการศึกษาครั้งนี้ ต้องการจัดวางตำแหน่งของยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริกในพริกระยะผลเขียว และค้นหาตำแหน่งของ DNA เครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนส เพื่อนำ DNA เครื่องหมายที่ได้ไปช่วยในการคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนสได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำที่สุด

ได้มีความพยายามสร้างแผนที่ เพื่อหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนส ในประชากร F_2 จากการผสมข้ามชนิดระหว่าง *C. annuum* ‘บางช้าง’ กับ *C. chinense* ‘PBC932’ (พรศักดิ์ ภักดีวารานนท์, ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) โดยใช้ DNA เครื่องหมายชนิด RAPD จำนวน 368 ตำแหน่ง พบว่าเครื่องหมายมากกว่า 80% ไม่มีการกระจายตัว ทั้งนี้คาดว่าน่าจะมีสาเหตุมาจากการเข้าคู่กันของโครโมโซมสองชุดจากพริกต่างชนิดไม่สมบูรณ์ ซึ่งจากรายงานของ Onus and Pickersgill (2000) พบว่าจากการผสมข้ามชนิดของพริกทำให้มีการกระจายตัวของบางลักษณะ และ isozyme ไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล (segregation distortion) เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบ segregation distortion ในพืชอื่นๆ ที่มีการผสมข้ามชนิดด้วย เช่น ถั่วเขียว และข้าว (Lambrides *et al.*, 2004; Xian-Liang *et al.*, 2006) ดังนั้นการสร้างแผนที่ครั้งนี้จึงเลือกใช้ประชากรลูกผสมกลับ $BC_1F_1P_2$ ซึ่งได้จากกลุ่มผสมเดียวกัน คาดว่าประชากรนี้จะมีปัญหาเกี่ยวกับการไม่กระจายตัวของเครื่องหมายลดลง

การสร้างแผนที่ครั้งนี้จึงใช้ประชากรลูกผสมกลับ $BC_1F_1P_2$ ซึ่งได้จากกลุ่มผสมเดียวกันกับ พรศักดิ์ ภักดีวารานนท์, (ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) โดยทำการผสมกลับ F_1 ไปยัง ‘PBC932’ ซึ่งคาดว่าประชากรนี้จะมีปัญหาเกี่ยวกับการไม่กระจายตัวของ DNA เครื่องหมายลดลง เพราะได้เพิ่มโอกาสการเข้าคู่กันของโครโมโซมที่ไม่แตกต่างกันมากของ F_1 กับโครโมโซมของ ‘PBC932’

อย่างไรก็ตามจากการสร้างแผนที่ของพริกในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สมบูรณ์ ยังไม่สามารถค้นหาตำแหน่งของ DNA เครื่องหมายที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนสได้ ดังนั้นจึงได้เปลี่ยนแนวทางโดยการใช้เทคนิค bulked segregant analysis (BSA) เนื่องจากการสร้างแผนที่เป็นวิธีการที่สิ้นเปลืองเวลา และทรัพยากร ประกอบกับประชากรที่ใช้ในการสร้างแผนที่ครั้งนี้เป็นประชากรลูกผสมกลับ (backcross) ซึ่งทำให้มีข้อจำกัดในการใช้เครื่องหมายแบบ dominant เนื่องจากประชากรนี้มีการกระจายตัวของลักษณะแบบ heterozygous และ homozygous recessive ทำให้ไม่สามารถใช้เครื่องหมายที่มีแถบ DNA ปรากฏใน ‘PBC932’ ได้ เพราะเครื่องหมายนั้นจะไม่มีการกระจายตัว ในประชากรลูกผสมกลับนี้สามารถใช้เครื่องหมายแบบ dominant ได้เฉพาะตำแหน่งที่มีแถบ DNA ปรากฏใน ‘บางช้าง’ เท่านั้น จึงทำให้ไม่สามารถใช้ประโยชน์จาก DNA เครื่องหมายได้อย่างเต็มที่ เทคนิค BSA เป็นการรวม DNA สองกลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มได้จากต้นที่มีลักษณะฟีโนไทป์แตกต่างกัน โดยใช้ประชากรที่มีการกระจายตัว เมื่อนำมาแยกความแตกต่างกันบนจีโนมระหว่างทั้งสองกลุ่ม จะช่วยให้ค้นหา DNA เครื่องหมายที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนสได้อย่างรวดเร็ว

การศึกษาค้างนี้เลือกใช้ DNA เครื่องหมายชนิด AFLP ร่วมกับ BSA เนื่องจากเทคนิค AFLP สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ได้จำนวนมากต่อปฏิกิริยา จึงน่าจะเป็นการเพิ่มโอกาสในการค้นหาตำแหน่ง DNA ที่มีความแตกต่างกันระหว่าง DNA 2 กลุ่ม ได้มากขึ้นในเวลาอันสั้น

ด้วยเหตุผลที่ลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริกกระยะผลเขียว ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 ตำแหน่ง (*co1*) (Pakdeevaporn *et al.*, 2005) จึงมีข้อจำกัดในการใช้ DNA เครื่องหมายแบบ dominant ในการตรวจสอบแยกความแตกต่างระหว่าง DNA 2 กลุ่ม ในกรณีที่ต้องการหาความแตกต่างระหว่างลักษณะอ่อนแอที่มีจีโนไทป์เป็น heterozygous (*Co1co1*) และลักษณะต้านทานซึ่งเป็น homozygous recessive (*co1co1*)

ดังนั้นการศึกษาค้างนี้ ได้คัดเลือกต้นพริกที่มีลักษณะอ่อนแอจากสายพันธุ์ ในประชากร $BC_1F_2P_1$ ที่แสดงลักษณะอ่อนแอทั้งหมด และคาดว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous *Co1Co1* และคัดเลือกต้นพริกที่มีลักษณะต้านทานจากประชากร $BC_1F_2P_2$ ที่มีลักษณะต้านทาน มีจีโนไทป์เป็น *co1co1* เพื่อนำไปใช้ในการรวม DNA (DNA bulk) ของกลุ่มที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคแอนแทรคโนส (bulk R) กับกลุ่มที่มีลักษณะอ่อนแอต่อโรคแอนแทรคโนส (bulk S)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจของพริก โดยใช้ประชากร $BC_1F_1P_2$ ที่สร้างจากคู่ผสม *Capsicum annuum* L. พันธุ์ ‘บางช้าง’ กับ *C. chinense* Jacq. สายพันธุ์ ‘PBC932’ เพื่อหาดำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนส

2. เพื่อพัฒนา DNA เครื่องหมาย ที่ใกล้ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริกกระยะผลเขียว โดยใช้ประชากรพริก $BC_1F_1P_2$ และ $BC_1F_2P_1$ ที่สร้างจากคู่ผสมระหว่างพริก *Capsicum annuum* L. พันธุ์ ‘บางช้าง’ กับ *C. chinense* Jacq. สายพันธุ์ ‘PBC932’

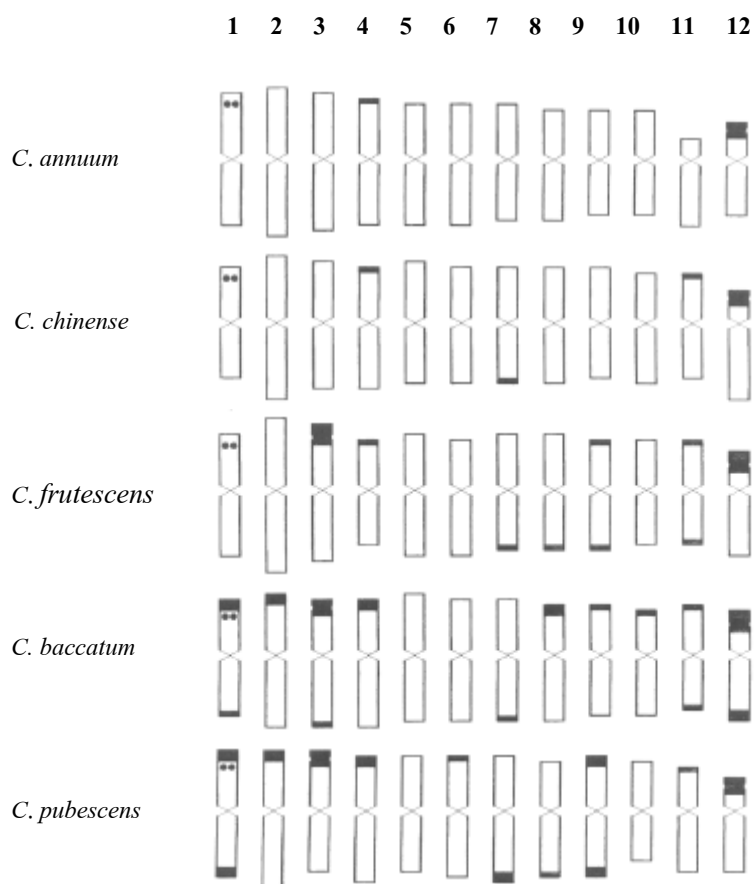
การตรวจเอกสาร

อนุกรมวิธานของพริก

พริกเป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ (family) Solanaceae เช่นเดียวกับ มะเขือเทศ มันฝรั่ง ยาสูบ และ พริกเนียบ จัดอยู่ในสกุล (genus) *Capsicum* (Bosland and Votava, 1999)

อาณาจักร	<i>Plantae</i>
หมวด	<i>Magnoliophyta</i>
ชั้น	<i>Magnoliopsido</i>
วงศ์	<i>Solanaceae</i>
สกุล	<i>Capsicum</i>

พริกมีชื่อที่นิยมเรียก และเขียนกันทั่วไปหลายชื่อ เช่น pepper, chile, chili, chilli และชื่อเรียกในประเทศไทยรู้จักกันดี คือ พริก พริกมีอยู่มากกว่า 30 ชนิด (species) ทั่วโลก แต่มีอยู่ 5 ชนิดที่เป็นพันธุ์ปลูก (cultivated species) ได้แก่ *C. annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L. และ *C. pubescens* L. (Bosland and Votava, 1999) พริกแต่ละชนิดถูกจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอก และเมล็ด เช่น *C. annuum* มีลักษณะสีของกลีบดอกเป็นสีขาว ก้านชูเกสรเพศผู้ไม่มีสีม่วง และตำแหน่งการออกดอกจะมีเพียง 1 ดอกต่อข้อ ส่วน *C. chinense* กลีบดอกมีสีขาว หรือเขียว ก้านชูเกสรเพศผู้เป็นสีม่วง และมีดอก 2-3 ดอกต่อข้อ (DeWitt and Bosland, 1997) พริกจัดเป็นพืชประเภทที่มีโครโมโซมสองชุด (diploid) มีจำนวนโครโมโซมทั้งหมด คือ $2n=24$ ซึ่งรูปร่างลักษณะของแท่งโครโมโซมพริกที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 1) ทำให้ความสามารถในการเข้าคู่กันของโครโมโซมในการผสมข้ามชนิดก็จะแตกต่างกัน เป็นสาเหตุทำให้เมล็ดที่เกิดจากการผสมข้ามของพริกบางชนิดไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 1 Karyotypes ของพริก *Capsicum* spp. 5 ชนิด (Park *et al.*, 1999)

ความสามารถในการผสมข้ามชนิดของพริก

การผสมข้ามชนิดของพริกชนิดต่างๆ สามารถทำได้สำเร็จเพียงบางคู่ชนิด ซึ่งได้มีการศึกษาความสามารถในการผสมข้ามของพริกพันธุ์ปลูก (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความสามารถในการผสมข้ามชนิดของพริก และความสามารถของลูกผสมในการขยายพันธุ์ (Bassett, 1986)

การผสมข้ามชนิด	ความสามารถของ เซลล์เริ่มต้น	ความสามารถในการขยายพันธุ์ของเมล็ด		
		F ₁	F ₂	ลูกผสมกลับ
<i>C. annuum</i> x <i>C. frutescens</i>	-			
<i>C. annuum</i> x <i>C. chinense</i>	++	++	++	++
<i>C. annuum</i> x <i>C. baccatum</i>	E	E	+	-
<i>C. annuum</i> x <i>C. pubescens</i>	-			
<i>C. frutescens</i> x <i>C. annuum</i>	+	+	+	+
<i>C. frutescens</i> x <i>C. chinense</i>	+	+	+	+
<i>C. frutescens</i> x <i>C. baccatum</i>	++	++	+	+
<i>C. chinense</i> x <i>C. frutescens</i>	+	+	+	+
<i>C. chinense</i> x <i>C. annuum</i>	+	+	+	+
<i>C. chinense</i> x <i>C. baccatum</i>	+	+	-	-
<i>C. chinense</i> x <i>C. pubescens</i>	E	E	-	-
<i>C. baccatum</i> x <i>C. pubescens</i>	-			

E คือเมล็ดสามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้เทคนิคช่วยชีวิตคัพพะ

- คือเมล็ดไม่เจริญเติบโตได้

+ คือมีเมล็ดจำนวนน้อยที่สามารถเจริญเติบโตได้

++ คือเมล็ดส่วนมากสามารถเจริญเติบโตได้

โรคแอนแทรคโนสในพริก

1. เชื้อสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในพริก

แอนแทรคโนสเป็นโรคที่มีความสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตพริก เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. เมื่อเชื้อเข้าทำลายผลพริกจะทำให้เนื้อเยื่อของผลพริกที่ถูกทำลายยุบตัวลงทีละน้อย และขนาดขยายใหญ่ขึ้นเป็นวงกลม หรือรี บริเวณบาดแผลของเชื้อรามีการเรียงซ้อนกันเป็นวง (concentric ring) เส้นใยของเชื้อราอาจมีสีดำ หรือสีชมพูขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อที่เข้าทำลาย เมื่อเกิดการระบาดของโรครุนแรงอาจทำให้ผลผลิตเสียหายมากกว่า 50% โดยเฉพาะในเขตร้อน และร้อนชื้น ซึ่งเชื้อ *Colletotrichum* สามารถเจริญเติบโตได้ดี

Colletotrichum จัดอยู่ในอันดับ (order) *Melanconiales* เชื้อสาเหตุที่เข้าทำลายพริกมีอยู่ 4 ชนิด คือ *C. gloeosporioides* *C. capsici* *C. acutatum* และ *C. coccodes* (Bailey and Jeger, 1992) ซึ่งในประเทศไทยพบว่าเชื้อสาเหตุของโรคแอนแทรคโนสที่เข้าทำลายผลพริกมีอยู่ 3 ชนิด คือ *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* (Than et al., 2007)

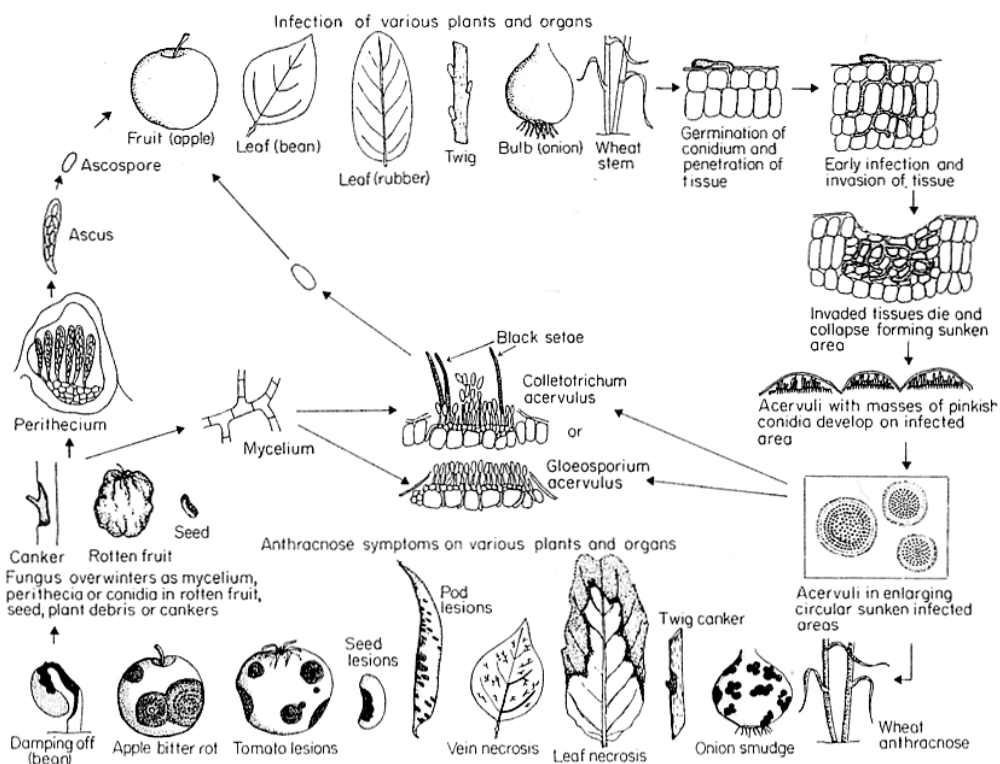
C. capsici ลักษณะแผลที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ เนื้อเยื่อพืชจะมีลักษณะแผลชุ่มน้ำและยุบตัวลง แผลเริ่มขยายมากขึ้น บริเวณบาดแผลมีสีดำเนื่องจาก setae ของเชื้อชนิดนี้มีสีดำ หรือน้ำตาลเข้มอยู่เป็นจำนวนมาก ทำให้มองเห็นบริเวณแผลมีสีดำ แต่ลักษณะเส้นใยโปร่งใสปลายเรียวแหลม ลักษณะสีของ colony มีได้ตั้งแต่สีขาวจนถึงสีน้ำตาล หรือดำ รูปร่างของ appressoria เป็นรูปทรงกระบอก หรือรูปไข่ สีน้ำตาล หรือเทา ขนาดตั้งแต่ 9-14 x 6.5-11.5 μm ส่วนรูปร่างของ conidia เป็นแบบเลี้ยวพระจันทร์ มีสีเหลืองอ่อนจนถึงสีส้มอ่อน ขนาด 18-23 x 3.5-4 μm (Bailey and Jeger, 1992)

C. gloeosporioides เข้าทำลายพริกทำให้เกิดลักษณะอาการของบาดแผลยุบตัวลงคล้ายกับแผลที่เกิดจาก *C. capsici* แต่บาดแผลไม่เป็นสีดำ เพราะลักษณะ colony และเส้นใยของ *C. gloeosporioides* มีสีครีม หรือน้ำตาลเทา บางครั้งพบ setae หรือไม่พบก็ได้ ส่วนรูปร่างของ conidia มีได้หลายแบบ เช่น ทรงตรง (straight) ทรงกระบอกหัวและท้ายมน (cylindrical) มีขนาดตั้งแต่ 12-17 x 3.5-6 μm นอกจากนี้ appressoria มีรูปร่างหลายแบบเช่น รูปทรงกระบอก รูปไข่ หรือ บางครั้งมีรูปทรงเป็น lobed สีน้ำตาล ขนาด 6-20 x 4-12 μm (Bailey and Jeger, 1992)

C. acutatum มีลักษณะ colony เป็นสีขาวแล้วเปลี่ยนเป็นสีเทาหรือน้ำตาล จากนั้นจะกลายเป็นสีชมพูจนถึงสีแดงเข้ม appressoria มีรูปร่างทรงกระบอก รูปร่างรี หรือมีรูปทรงที่ไม่แน่นอน มีขนาด $4.5-6 \times 8.5-10 \mu\text{m}$ ส่วน conidia มีสีชมพูส้ม รูปร่างทรงกระบอกปลายเรียวแหลม ขนาด $2.5-4 \times 8.5-16.5 \mu\text{m}$

2. การเข้าทำลายพริก และวงจรชีวิตของเชื้อ *Colletotrichum* spp.

เชื้อ *Colletotrichum* spp. ทำลายผลพริกได้ทั้งก่อน และหลังการเก็บเกี่ยว เชื้อ *Colletotrichum* spp. สามารถแพร่กระจายได้ในรูปของสปอร์ผ่านทางอากาศไปยังที่ต่างๆ ได้ ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต และชักนำให้เกิดการเข้าทำลายของเชื้ออยู่ในช่วง $20-24^{\circ}\text{C}$ และทำให้สปอร์มีการพัฒนาสร้าง appressoria เพื่อแทงทะลุผ่านเนื้อเยื่อผนังด้านบนของผลพริกแล้วจึงมีการพัฒนาสร้างเส้นใยเจริญเข้าไปในผลพริกต่อไป (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 วงจรชีวิตของเชื้อ *Colletotrichum* (Agrios, 1997)

3. การสืบพันธุ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

3.1 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual spores)

เป็นการสืบพันธุ์โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม คือไม่มีการรวมตัวของนิวเคลียส เซลล์สืบพันธุ์ หรืออวัยวะสืบพันธุ์ การสืบพันธุ์แบบนี้มีความสำคัญอย่างมากต่อการแพร่ระบาด เนื่องจากเชื้อราสามารถเพิ่มจำนวนได้หลายๆ ครั้ง ในฤดูเดียว การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศสามารถเกิดขึ้นได้หลายแบบ เช่น เส้นใยของเชื้อราเกิดจากการขาด แฉกหัก ออกเป็นท่อนๆ แต่ละท่อนสามารถเกิดเป็นเส้นใยใหม่เจริญต่อไปได้ หรือมีการสร้างสปอร์โดยที่ไม่ได้เกิดจากการรวมกันของนิวเคลียสจากเซลล์สืบพันธุ์แล้วสามารถเจริญเป็นเส้นใยต่อไปได้

3.2 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual spores)

เป็นการสืบพันธุ์ที่มีการรวมตัวและแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมกันระหว่าง เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (Chaisrisuk, 2003) ขบวนการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะแรก plasmogamy เป็นระยะที่มีการรวมตัวกันของ protoplasm ของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย กลายเป็นเซลล์เดียวที่มีจำนวนนิวเคลียสเป็น $n+n$ หรือเรียกว่า dikaryon ระยะที่สอง karyogamy หลังจากเกิด plasmogamy แล้วต่อมาจะเกิดการรวมตัวกันของนิวเคลียสจากทั้งสองเพศ กลายเป็นนิวเคลียสเดียว ที่มีจำนวนโครโมโซมเป็นสองชุด ($2n$) และระยะที่สาม meiosis หรือ haploidization มีการลดจำนวนโครโมโซมจากนิวเคลียสในระยะ karyogamy เหลือครึ่งหนึ่ง กลายเป็นนิวเคลียสที่มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุด (haploid) นิวเคลียสใหม่ที่ได้จะเคลื่อนที่เข้าไปในโครงสร้างที่จะสร้างสปอร์ต่อไป เรียกสปอร์ที่เกิดขึ้นว่า สปอร์แบบมีเพศ

กลไกการป้องกันโรคของพืช

พืชส่วนใหญ่มีกลไกการป้องกันการเข้าทำลายจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และ ไส้เดือนฝอย (Slusarenko *et al.* 2000) กลไกการป้องกันของพืชสามารถแบ่งได้ 2 แบบ ดังนี้

1. การป้องกันก่อนการเข้าทำลาย

ลักษณะโครงสร้างของพืชโดยทั่วไปสามารถป้องกันการเข้าทำลายจากเชื้อสาเหตุโรคได้ระดับหนึ่ง ซึ่งจัดเป็นกลไกการป้องกันด่านแรกที่พืชมีอยู่แล้วในธรรมชาติ ลักษณะโครงสร้างภายนอกดังกล่าว เช่น ใบ ขน โครงสร้างกิ่งก้าน ใบ ทรงต้น และช่วงเวลาการปิดเปิดของปากใบ (Slusarenko *et al.*, 2000)

Oh *et al.* (1999a) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างไขที่อยู่บนผลพริกกับการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยเปรียบเทียบผลพริกที่ไม่ได้กำจัดไข และกำจัดไขด้วยสาร chloroform ของผลพริกสองระยะ คือระยะผลเขียว และผลแดง จากนั้นปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* สายพันธุ์ KG13 ลงบนผลพริกทั้งสองระยะ พบว่าบนผลพริกที่ถูกกำจัดไขออก เชื้อมีการสร้าง conidia และ appressoria มากกว่าผลที่ไม่ได้กำจัดไขออก แสดงให้เห็นว่าไขที่อยู่บนผลพริกมีความสัมพันธ์ต่อการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคพืช นอกจากนี้ยังมีการเปรียบเทียบการเข้าทำลายของเชื้อระหว่างพริกผลเขียว และผลแดงที่มีการกำจัดไขออก พบว่าเชื้อรามีการสร้างเส้นใยบนพริกผลแดงมากกว่าผลเขียว แสดงว่าอายุของผลพริกมีความสัมพันธ์กับการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคเช่นกัน

2. การป้องกันหลังการเข้าทำลาย

กลไกการป้องกันของพืชหลังจากเชื้อเข้าทำลาย แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

2.1 การเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของพืช

หลังจากพืชถูกเชื้อสาเหตุของโรคเข้าทำลาย พืชบางชนิดที่มีลักษณะด้านทาน จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง เช่น มีการเจริญของเซลล์ชั้นคอร์ค (cork) หรือมีการสร้างส่วนอื่นในบริเวณท่อลำเลียงน้ำ (tylose) ขึ้นมากระหนาบเนื้อเยื่อที่เป็นโรค และเนื้อเยื่อปกติ เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อโรคเจริญรุกรานเข้าทำลายเนื้อเยื่อปกติได้ (Slusarenko *et al.*, 2000)

2.2 การสร้างสารเคมีของพืช

หลังจากพืชถูกเชื้อสาเหตุของโรคเข้าทำลาย พืชที่มีลักษณะต้านทาน จะมีการสร้างสารเคมี เพื่อป้องกันการลุกลามจากเชื้อที่เข้าทำลาย พืชต้านทานมีกลไกการสร้างสารเคมีต่างๆ เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรค สารเคมีที่พืชสร้างขึ้นส่วนมากมีฤทธิ์เป็นกรด หรือ ด่างเข้มข้น ทำให้เซลล์พืชที่ถูกเชื้อโรคเข้าทำลายมีการตายเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แสดงอาการไหม้ เกิดแผลจุดบริเวณที่มีการรุกรานของเชื้อ เป็นผลให้เชื้อสาเหตุของโรคถูกทำลายไปพร้อมกับเซลล์พืช ซึ่งลักษณะการตายของเซลล์อย่างรวดเร็วนี้เรียกว่า ปฏิกริยาแบบ hypersensitive response (Bonas and Lahaye, 2002)

มีการศึกษากลไกความต้านทานโรคในระดับโมเลกุลของพริก ต่อโรคแอนแทรคโนส พบว่ามียีน *PepThi* สังเคราะห์โปรตีนที่มีลักษณะคล้ายกับ thionin (Oh *et al.*, 1999b) ยีน *PepTLP* สังเคราะห์โปรตีน thaumatin-like protein (Kim *et al.*, 2002) และยีน *PepEST* สร้างเอนไซม์ pepper esterase (Ko *et al.*, 2005) เพื่อยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อ *C. gloeosporioides* นอกจากนี้ยังมียีน *CATHION1* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน thionin หลังจากมีการเข้าทำลายของเชื้อ *C. gloeosporioides* และ *C. coccodes* (Lee *et al.*, 2000a) ยีน *CACBP1* สังเคราะห์โปรตีน chitin-binding protein (CBP) หลังจากการเข้าทำลายของเชื้อ *C. coccodes* (Lee *et al.*, 2001)

ลักษณะทางพันธุกรรมที่ควบคุมความต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริก

เนื่องจากโรคแอนแทรคโนสเป็นโรคที่สำคัญของพริกหลายประเทศในเอเชีย จึงได้มีความพยายามค้นหาแหล่งพันธุกรรมความต้านทานจากพริก *C. annuum* เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พริก การค้าให้ต้านทานต่อโรคแอนแทรคโนส Yoon *et al.* (2004) ได้ทดสอบความต้านทานใน *C. annuum* 291 สายพันธุ์ พบว่าทุกสายพันธุ์มีลักษณะอ่อนแอ และจากการรายงานของ AVRDC (2004) ซึ่งได้พยายามค้นหาแหล่งพันธุกรรมความต้านทานจากพริก *C. annuum* พบว่ามี 2 สายพันธุ์ที่แสดงอาการโรคล็กน้อย จากรายงานของ AVRDC (2003) พบความต้านทานโรคแบบ immune ในพริก *C. baccatum* สายพันธุ์ ‘PBC80’ ‘PBC81’ และ *C. chinense* สายพันธุ์ ‘PBC932’ ซึ่งได้มีการนำสายพันธุ์ต้านทานเหล่านี้ไปใช้ในการถ่ายทอดพันธุกรรมความต้านทานให้แก่ *C. annuum*

การศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนสจาก *C. baccatum* ในประชากร F_2 และ BC_1F_1 ที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดระหว่าง *C. baccatum* ‘PBC80’ กับ *C. annuum* ซึ่งมีลักษณะอ่อนแอ (Yoon and Park, 2005) และ *C. baccatum* ‘PBC81’ กับ *C. annuum* (Yoon *et al.*, 2006) พบว่ายีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานจาก *C. baccatum* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 ตำแหน่ง

ส่วนการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานจาก *C. chinense* ‘PBC932’ ในประชากร F_2 และ BC_1F_1 ที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดกับ *C. annuum* ‘บางช้าง’ พบว่าในประชากร F_2 มีอัตราส่วนการกระจายตัวของลักษณะอ่อนแอต่อลักษณะต้านทานในอัตราส่วน 3:1 และ ประชากรลูกผสมกลับ (backcross) BC_1 มีอัตราส่วน 1:1 ซึ่งจากรายงานสรุปว่าลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนสถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 ตำแหน่ง (Pakdeevaporn *et al.*, 2005)

มีการศึกษา QTL ของลักษณะความต้านทานโรคแอนแทรคโนสด้วยวิธีการสร้างแผนที่โครโมโซมจากประชากร F_2 ที่สร้างจากกลุ่มผสมข้ามชนิดระหว่าง *C. chinense* สายพันธุ์ ‘PRI95030’ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีลักษณะต้านทานนอกเหนือจากที่ AVRDC ได้รายงานไว้ กับ *C. annuum* พันธุ์อ่อนแอ พบว่าลักษณะความต้านทานอยู่ในช่วงระดับกึ่งกลางระหว่างพ่อกับแม่ (Voorrips *et al.*, 2004)

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยี DNA (marker assisted selection (MAS))

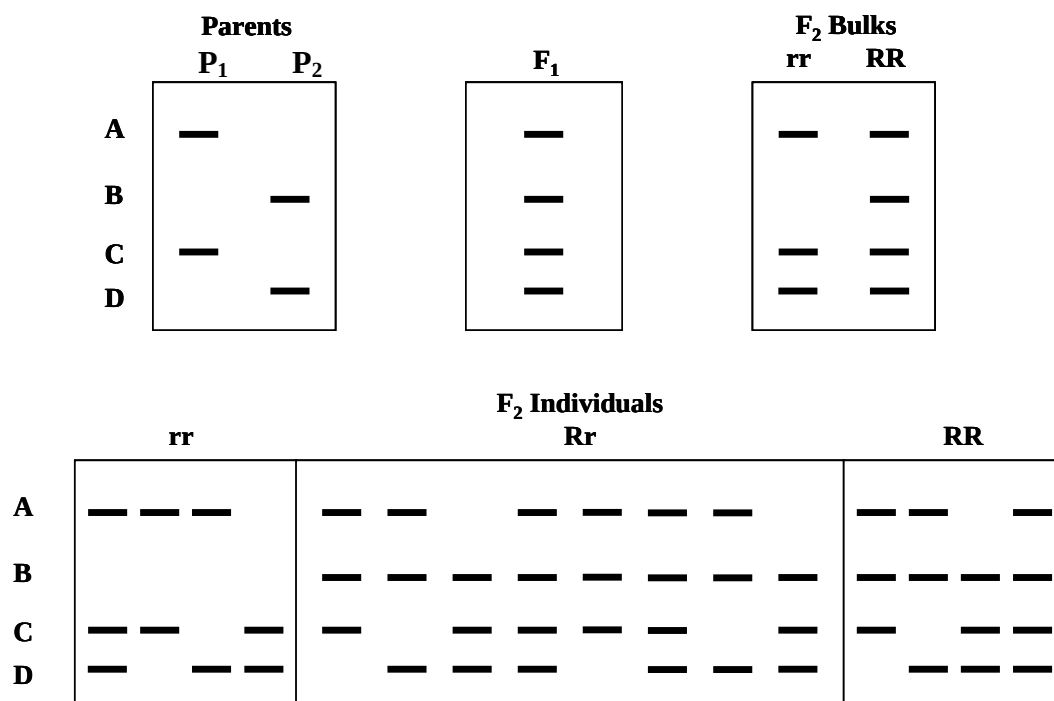
การนำเทคโนโลยีทางด้าน DNA เข้ามาใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกลักษณะที่สนใจ ช่วยให้สามารถคัดเลือกลักษณะที่สนใจได้อย่างมีประสิทธิภาพ และรวดเร็ว เนื่องจาก DNA เครื่องหมายที่ได้จะไม่เปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อม ไม่ว่าต้นพืชจะมีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะใดก็ตาม ซึ่งจากข้อดีดังกล่าวสามารถนำ DNA เครื่องหมายเข้ามาช่วยในการคัดเลือกลักษณะที่คัดเลือกยากได้

1. เทคนิค bulked segregant analysis (BSA)

เทคนิค BSA พัฒนาโดย Michelmore *et al.* (1991) เป็นเทคนิคที่ช่วยในการค้นหา DNA เครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์ (linked) กับยีน หรือลักษณะที่สนใจได้อย่างรวดเร็ว โดยการรวม DNA (DNA bulk) จากประชากรที่มีการกระจายตัวของลักษณะที่สนใจ เช่น ลักษณะต้านทานโรค ที่สร้างจากพ่อแม่คู่หนึ่ง DNA ที่นำมารวมได้จากต้นที่มีฟีโนไทป์เหมือนกัน ดังนั้น DNA ที่เกิดจากการรวมของทั้งสองกลุ่ม จะมีความแตกต่างกันเฉพาะบริเวณตำแหน่งที่สนใจ ส่วนตำแหน่งอื่นๆ ไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อแยกความแตกต่างของ DNA รวมระหว่าง 2 กลุ่ม จะช่วยให้สามารถพัฒนา DNA เครื่องหมายที่มี

ความสัมพันธ์กับลักษณะที่สนใจได้อย่างรวดเร็ว ดังภาพที่ 3 เป็นการใช้เทคนิค BSA ร่วมกับ DNA เครื่องหมาย random amplified polymorphic DNA (RAPD) ทดสอบในพันธุ์พ่อ (P_1) และแม่ (P_2) จะพบตำแหน่งที่มีความแตกต่างกัน คือตำแหน่ง A-D เมื่อนำมาทดสอบใน DNA bulk ที่ได้จากประชากร F_2 ซึ่ง DNA bulk หนึ่งได้จากการรวมของต้นที่มีจีโนไทป์ (rr) และอีก bulk ได้จากการรวมของต้นที่มีจีโนไทป์ (RR) พบว่าเครื่องหมาย B เป็นตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่สนใจ คือ allele R เมื่อทดสอบเครื่องหมาย B กับประชากร F_2 ทุกต้น พบว่าต้นที่มีลักษณะที่สนใจมีจีโนไทป์ RR และ Rr จะปรากฏเครื่องหมาย B ส่วนต้นที่ไม่มีลักษณะที่สนใจ มีจีโนไทป์ rr จะไม่ปรากฏเครื่องหมาย B (Michelmore *et al.*, 1991)

เทคนิค BSA ช่วยให้การค้นหา DNA เครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีน หรือลักษณะสำคัญๆ มากมาย ได้แก่ ลักษณะต้านทาน และลักษณะอ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง ของผักกาดหอม โดยใช้ร่วมกับเทคนิค RAPD ในประชากร near-isogenic lines (Michelmore *et al.*, 1991) ลักษณะต้านทานโรคใบไหม้ในมะเขือเทศ ร่วมกับเทคนิค AFLP ในประชากร F_2 (Moreau *et al.*, 1997) และลักษณะ acetylcholinesterase (ALD) สูง ร่วมกับเทคนิค RAPD (Bouarte-Medina *et al.*, 2002)



ภาพที่ 3 เทคนิค bulked segregant analysis (BSA) ร่วมกับเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) ในการแยกความแตกต่างของ DNA ระหว่าง bulk ที่ได้จากประชากร F_2 (Michelmore *et al.*, 1991)

2. การสร้างแผนที่โครโมโซม

การสร้างแผนที่โครโมโซม เป็นการจัดเรียงความสัมพันธ์ของ DNA เครื่องหมาย กับยีนที่น่าสนใจ โดยอาศัยพื้นฐานการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของ DNA บนโครโมโซม (crossing over) ซึ่งจะช่วยให้ทราบตำแหน่งของยีนต่างๆ ในจีโนม และตำแหน่งของเครื่องหมายที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนที่น่าสนใจ เพื่อนำเครื่องหมายที่ได้ไปช่วยในการคัดเลือกลักษณะที่สนใจได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำที่สุด นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในการรวมยีนที่น่าสนใจไว้ในพืชพันธุ์เดียวกัน (gene pyramiding) และเป็นบันไดก้าวแรกในการแยกสกัดยีน วิเคราะห์หาลำดับเบส และหน้าที่ของยีน

การสร้างแผนที่โครโมโซมต้องใช้ประชากรที่มีการกระจายตัว ซึ่งประชากรที่มีการกระจายตัวที่สร้างได้รวดเร็วที่สุด ได้แก่ประชากรลูกผสม F_2 และประชากรลูกผสมกลับ แต่ประชากรที่สามารถนำมาใช้ในการสร้างแผนที่โครโมโซมได้อย่างถาวร ได้แก่ประชากร recombinant inbred lines (RILs) และประชากร doubled haploids (DH) (Vienne, 2002) เนื่องจากเป็นประชากรที่มีความเป็น homozygous สูง มีความสม่ำเสมอของ allele สามารถปลูกทำการทดลองซ้ำได้ แต่ใช้ระยะเวลานานในการสร้างประชากร

2.1 การสร้างแผนที่โครโมโซมในพริก

การสร้างแผนที่โครโมโซมของพริกได้เริ่มจากการใช้เครื่องหมาย RFLP และ isozymes ทั้งหมด 192 ตำแหน่ง ในประชากร F_2 46 ต้น ที่สร้างจากพันธุ์ลูกผสม F_1 ของ *C. annuum* L. สามารถสร้างแผนที่ได้ 19 กลุ่ม ครอบคลุม 720 cM และพบ 2 เครื่องหมายมีความสัมพันธ์กับ QTL ของลักษณะจำนวนดอกต่อข้อ และมีเครื่องหมายที่ไม่สามารถจัดกลุ่มได้ 26 ตำแหน่ง (Prince *et al.*, 1992)

ต่อมา Lefebvre *et al.* (1995) ได้สร้างแผนที่โดยใช้เครื่องหมาย RFLP 19 ตำแหน่ง และ RAPD 66 ตำแหน่ง รวมทั้งหมด 85 ตำแหน่ง ในประชากร doubled haploid ที่สร้างจาก F_1 ของคู่ผสม *C. annuum* สร้างแผนที่ได้ 14 กลุ่ม ครอบคลุม 820 cM และสามารถวางตำแหน่งของยีนด้านทานต่อไวรัส TMV และยีนที่ควบคุมลักษณะชี้ขึ้นของผล

การสร้างแผนที่โครโมโซมโดยใช้เครื่องหมาย RFLP 399 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบในแผนที่โครโมโซมของมะเขือเทศมาใช้เป็น prob เครื่องหมาย isozyme 7 ตำแหน่ง RAPD 116 ตำแหน่ง และ AFLP 805 ตำแหน่ง ในประชากร F_2 75 ต้น ที่สร้างจาก *C. annuum* กับ *C. chinense* สามารถสร้างแผนที่ได้ 11 กลุ่มใหญ่ และ 2 กลุ่มเล็ก ครอบคลุม 1,245.7 cM (Livigstone *et al.*, 1999)

การสร้างแผนที่โครโมโซมได้มีการพัฒนาเพิ่มขึ้นโดยใช้ DNA เครื่องหมายชนิด RFLP 150 ตำแหน่ง และ AFLP 430 ตำแหน่ง ในการสร้างกลุ่มลิงค์เกจโดยใช้ประชากร F_2 107 ต้น จากพริกคู่ผสมระหว่าง *C. annuum* cv. TF68 กับ *C. chinense* cv. Habanero (Kang *et al.*, 2001) แผนที่ที่ได้ประกอบด้วยกลุ่มลิงค์เกจที่มีขนาดใหญ่ 11 กลุ่ม และขนาดเล็ก 5 กลุ่ม ครอบคลุม 1,320 cM

การหาตำแหน่ง QTL ที่เกี่ยวข้องกับปริมาณผลผลิตของพริก (Chaim *et al.*, 2001) โดยใช้แผนที่โครโมโซมของพริกเปรียบเทียบกับแผนที่โครโมโซมของมะเขือเทศ ซึ่งแผนที่ของพริกประกอบด้วย RFLP, AFLP, RAPD และลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมทั้งหมด 177 ตำแหน่ง ในประชากร F_3 สร้างแผนที่ลิงค์เกจได้ 12 กลุ่ม ครอบคลุม 1,740 cM และพบตำแหน่งของ QTL ทั้งหมด 55 ตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับปริมาณผลผลิต ซึ่งตำแหน่ง QTL หลักที่มีอิทธิพลต่อผลผลิตมากกว่า 60% คือ ลักษณะรูปร่างทรงผล ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 3 ส่วน ตำแหน่ง QTL อื่นๆ เช่น วันสุกแก่ของผล ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางผล ความยาวผล ความหนาของผนังผล และ ความยาวของก้านดอก มีอิทธิพลต่อผลผลิตประมาณ 20% พบอยู่บนกลุ่มลิงค์เกจที่ 2, 3, 4, 8, และ 10 ตามลำดับ

การสร้างแผนที่โครโมโซมเพื่อหาตำแหน่งของยีนความเผ็ด (capsaicinoids) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของพริก ด้วยเทคนิค RFLP: CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) โดยใช้ประชากร F_2 จากการผสมข้ามชนิดระหว่าง *C. frutescens* L. ที่มีลักษณะเผ็ด กับ *C. annuum* L. จำนวน 242 ต้น พบ DNA เครื่องหมาย TG205 มีตำแหน่งอยู่ใกล้ยีนความเผ็ด (C) ระยะทาง 0.4 cM บนโครโมโซมแท่งที่ 2 (Blum *et al.*, 2002)

จากรายงานล่าสุดมีการสร้างแผนที่โครโมโซมเพื่อหาตำแหน่งของยีนต้านทานโรค *Phytophthora capsici* Leon. โดยใช้เทคนิค RAPD และ SCAR (sequence characterized amplified region) ในประชากรลูกผสมข้ามระหว่าง *C. annuum* ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอ กับ *C. chinense* สายพันธุ์ต้านทาน พบว่ามียีนตำแหน่งอื่นๆ เข้ามามีอิทธิพลต่อลักษณะความต้านทาน (QTL) หลายตำแหน่ง ซึ่งมี QTL หลัก คือ *Phyto.5.2* อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 5 (Quirin *et al.*, 2005)

จากการรายงานที่ผ่านมาเกี่ยวกับการสร้างแผนที่โครโมโซมในพริก พบว่ายังไม่มีรายงานใดที่สามารถวางตำแหน่งของยีนด้านทานโรคแอนแทรคโนส และหาตำแหน่งของ DNA เครื่องหมายที่ใกล้เคียงได้ ซึ่งมีเพียงรายงานของ Voorrips *et al.* (2004) ศึกษาการสร้างแผนที่โครโมโซมเพื่อหาตำแหน่งของยีนด้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริก ที่เกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. capsici* โดยใช้ประชากร F_2 ที่สร้างจาก *C. chinense* 'PRI95030' ซึ่งมีลักษณะที่ต้านทานต่อโรคแอนแทรคโนส ผสมข้ามชนิดกับ *C. annuum* var. 'Jatilaba' เป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรคแอนแทรคโนส ได้ DNA เครื่องหมายทั้งหมด 266 ตำแหน่ง จาก DNA เครื่องหมายชนิด AFLP 249 SSR 11 และ RGA 6 ตำแหน่ง เมื่อนำแต่ละตำแหน่งมาหาความสัมพันธ์ในการจัดกลุ่มลิงค์เกจสามารถจัดได้ 26 กลุ่ม ครอบคลุม 1,060 cM พบว่ามี QTL 3 ตำแหน่งที่มีผลต่อการแสดงออกของลักษณะต้านทานโรคที่เกิดจากเชื้อ *C. gloeosporioides* แต่ยังไม่สามารถหาความสัมพันธ์ของ DNA เครื่องหมายที่เกี่ยวข้องกับลักษณะต้านทานต่อเชื้อ *C. capsici* ได้

เทคนิคทางโมเลกุลที่ใช้ในการพัฒนา DNA เครื่องหมาย

1. เทคนิค hybridization

เทคนิคนี้อาศัยขบวนการ DNA hybridization เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของชิ้น DNA ที่ probe สามารถ hybridize ได้ เทคนิคหนึ่งที่อยู่กันดีคือ restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Botstein *et al.*, 1980) เทคนิค RFLP เป็นการตัดย่อย genomic DNA ด้วยเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่มีตำแหน่งจดจำในการตัดตั้งแต่ 4-10 เบส แล้วจึงแยกขนาดของชิ้นส่วน DNA ที่ได้ด้วยวิธี gel electrophoresis จากนั้นทำการย้าย DNA ไปยังแผ่น nylon membrane แล้ว hybridize ด้วย probe ที่ติดฉลากให้เข้าจับกับ complementary DNA ซึ่งจะทำได้ DNA ที่มีความแตกต่าง เพื่อนำไปใช้ในการสร้าง DNA เครื่องหมายต่อไป อย่างไรก็ตาม RFLP เป็นเทคนิคที่ยุ่งยาก และมีราคาแพง

2. เทคนิค PCR (polymerase chain reaction)

PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณ DNA ในหลอดทดลอง (Saiki *et al.*, 1988) โดยอาศัยไพรเมอร์ หรือ DNA ลำดับเบสสั้นๆ ที่ complementary กับ DNA เป้าหมาย มี DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ DNA ในบริเวณที่ไพรเมอร์เข้าจับ ความยาวของชิ้นส่วน DNA ที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดโดยประมาณไม่เกิน 5 กิโลเบส (kb) เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่รวดเร็วและไม่ยุ่งยากที่จะนำมาใช้

ในการหาความแตกต่างของ DNA เทคนิค PCR มีมากมายหลายชนิด เช่น random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphisms (AFLP), sequence-tagged microsatellite site markers (STMS), inter simple sequence repeats (ISSR) เป็นต้น

RAPD (Williams *et al.*, 1990) เป็นเทคนิคที่ใช้ไพรเมอร์ สายเดี่ยว ที่มีขนาดสั้นประมาณ 10 เบส เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมาย ซึ่งการเข้าจับของไพรเมอร์เป็นแบบสุ่มทั่วทั้ง genome โดยใช้ อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาประมาณ 37-40°C ทำให้ไพรเมอร์สามารถเข้าจับกับ DNA ได้หลายตำแหน่ง พบแถบ DNA ที่เป็นผลจาก PCR จำนวนมาก RAPD เป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว

AFLP ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดย Vos *et al.* (1995) เป็นเทคนิคที่นำข้อดีของสองเทคนิค ได้แก่ RFLP และ PCR มาปรับใช้ร่วมกัน โดยมีการนำเอนไซม์ตัดจำเพาะมาใช้ตัด genomic DNA ร่วมกับการ ใช้วิธีเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ทำให้ได้ชิ้นส่วน DNA จาก PCR (amplified product) จำนวนมากต่อ ปฏิกิริยา AFLP จึงเป็นเทคนิคที่สามารถสร้าง DNA เครื่องหมายจำนวนมากได้รวดเร็ว

STMS (Tautz and Renz, 1989) และ ISSR (Zietkiewicz *et al.*, 1994) เป็นเทคนิค PCR ที่มี เป้าหมายของการศึกษาอยู่ที่ DNA microsatellite โดยเทคนิค STMS ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจง กับ DNA บริเวณที่เป็น microsatellite คือมีลำดับเบสของ DNA 1-4 เบส ซ้ำกันประมาณ 10-20 ครั้ง เช่น (AT)_n, (GA)_n หรือ (ATT)_n ส่วนเทคนิค ISSR ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อให้เข้าจับกับ DNA บริเวณที่ ขนาบข้างของตำแหน่ง microsatellite

อุปกรณ์และวิธีการ

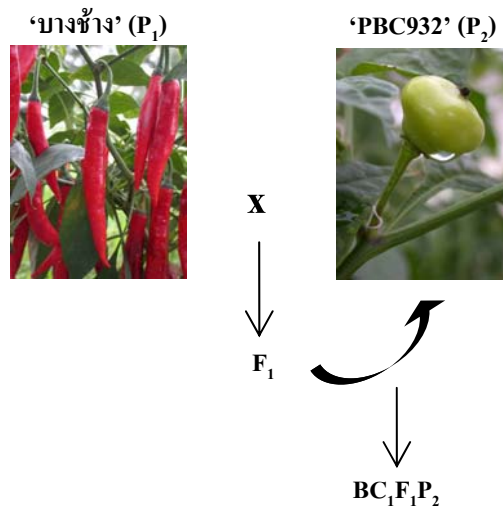
การศึกษาเพื่อหาตำแหน่งของยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนส (*col*) และค้นหา DNA เครื่องหมาย ที่ใกล้ชิดกับยีนที่ต้านทานในพริกกระยะผลเขียว ได้แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เพื่อหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริก

การสร้างประชากร $BC_1F_1P_2$

นำลูกผสม F_1 ที่ได้จากการผสมข้ามชนิดระหว่างพริก *C. annuum* พันธุ์ ‘บางช้าง’ (P_1) กับ *C. chinense* สายพันธุ์ ‘PBC932’ (P_2) แล้วทำการผสมกลับไปยัง ‘PBC932’ ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทาน (ภาพที่ 4) ปลูกประชากร $BC_1F_1P_2$ 2 ชุดที่แปลงทดลองของศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ชุดแรกปลูกประชากรจำนวน 150 ต้น เมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2549 ชุดที่ 2 จำนวน 200 ต้น ในเดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2549

การผสมเกสร (hand pollination) ทำในช่วงเช้าเวลา 8.00 - 10.00 น. โดยเริ่มจากการตอนเกสรเพศผู้ (emasculation) ของดอกตูมที่จะบานในวันรุ่งขึ้นของดอกพริกที่ใช้เป็นต้นแม่ แล้วนำละอองเกสรจากพริกที่ใช้เป็นต้นพ่อเกาะเบาๆ บนยอดเกสรเพศเมียของดอกพริกบนต้นแม่ เพื่อสร้างลูกผสม หลังจากผสมเกสรเสร็จแล้วนำลากลุ่มดอกไว้เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากละอองเกสรของพริกพันธุ์อื่น ติดป้าย (tag) ที่ให้รายละเอียดของพันธุ์ที่ทำการผสม และวันที่ผสม



ภาพที่ 4 การสร้างประชากร $BC_1F_1P_2$

การประเมินลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนส

1. การเตรียมผลพริกสำหรับการปลูกเชื้อ

เก็บเกี่ยวผลพริกที่ระยะผลเขียวแก่เต็มที่ (อายุประมาณ 30 วันหลังดอกบาน) ต้มละ 5 ผล จากพริกทุกต้นของประชากร $BC_1F_1P_2$ ปลิดขั้วผลออก ล้างทำความสะอาดผลพริกด้วยน้ำเปล่า แล้วแช่ใน 1% (w/v) sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างผลพริกด้วยน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ครั้งละ 2 นาที ซับผลพริกให้แห้ง วางผลพริกบนถาดเพื่อรอการปลูกเชื้อต่อไป

2. การเตรียมเชื้อ *C. capsici* เพื่อใช้ในการปลูกเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *C. capsici* isolate 158ci (ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. สมศิริ แสงโชติ ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน) บนอาหาร potato dextrose agar (PDA; DifcoTM, Becton, Dickinson and Company, MD USA) เป็นเวลาประมาณ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 27°C ภายใต้แสง fluorescence 12 ชั่วโมง สลับกับสภาวะมืด 12 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญเติบโตสร้างเส้นใย และสปอร์จึงเก็บเกี่ยว spore โดยใช้ loop เก็บสปอร์ของเชื้อมาเจือจางในน้ำเปล่าที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปรับความเข้มข้นของ spore suspension ให้ได้ 10^6 spore/ml โดยการนับจำนวนสปอร์ด้วย haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) ที่กำลังขยาย 10X

3. การปลูกเชื้อบนผลพริก

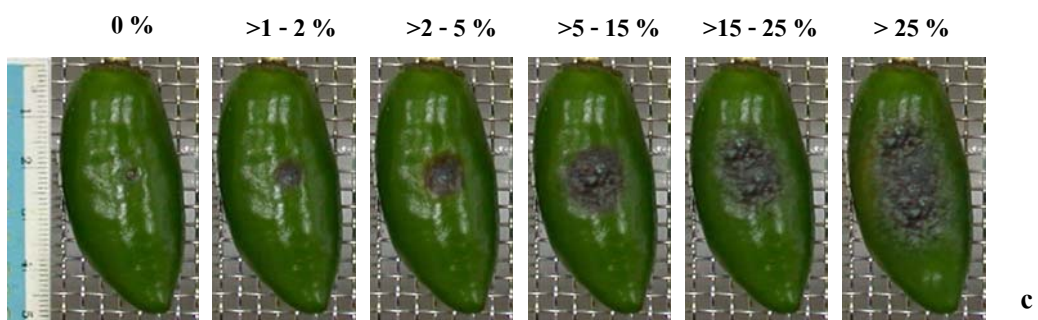
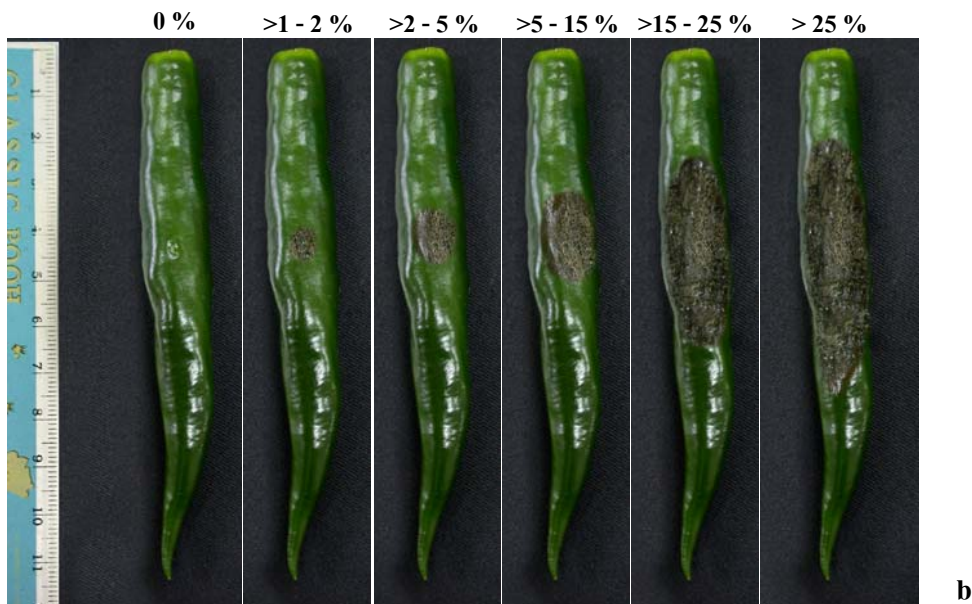
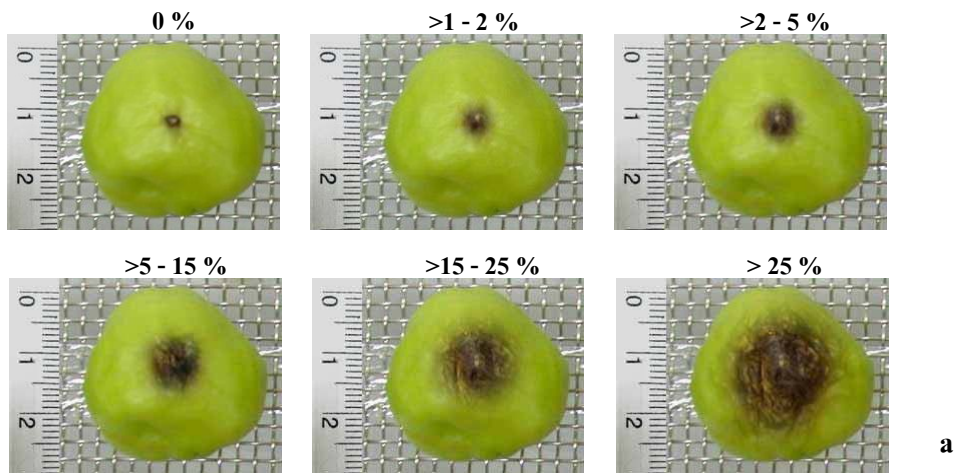
ใช้วิธีฉีดสปอร์เข้าสู่ผลพริก ด้วยวิธี microinjection (Kanchana-udomkan *et al.*, 2004) อุปกรณ์ที่ใช้ประกอบด้วย Micro Syringe™ รุ่น 1705 TLL กับ dispenser PB600-1 (Hamilton, Switzerland) ที่มีเข็มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 mm และยาว 1 mm dispenser ทำหน้าที่ควบคุมปริมาตรของ spore suspension ในการฉีด inoculum เข้าสู่ผลพริกแต่ละครั้ง ให้มีปริมาตรเท่ากัน และเข็มเป็นตัวกำหนดขนาดแผลบนผลพริก โดยนำ spore suspension ของเชื้อ *C. capsici* isolate 158ci ที่เตรียมไว้ฉีดลงบนผลพริกบริเวณกลางผล ผลละ 1 แผล ปริมาตร 1 μ l (ประมาณ 1,000 spore) จากนั้นนำผลพริกที่ปลูกเชื้อแล้ว บ่มไว้ในกล่องพลาสติกที่หล่อด้วยน้ำเปล่าปิดฝา เพื่อควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ให้ใกล้เคียง 100% และวางกล่องพลาสติกไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 - 30°C) จากนั้นเมื่อครบ 3 วัน เปิดฝากล่องเพื่อลดความชื้น

4. การประเมินอาการโรคแอนแทรคโนส

ประเมินอาการโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก ในวันที่ 7 หลังจากปลูกเชื้อ โดยประเมินเปอร์เซ็นต์สัดส่วนโรค จากขนาดแผลที่เกิดขึ้นจากการปลูกเชื้อ ต่อขนาดผล เปรียบเทียบกับ disease diagram (ภาพที่ 5) คำนวณค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์สัดส่วนโรค จากผลพริกทั้ง 5 ผล ในแต่ละต้น จากนั้นแบ่งระดับความต้านทานโรคแอนแทรคโนสตามระดับเปอร์เซ็นต์สัดส่วนโรคเป็น 2 ระดับ (Pakdeewaraporn *et al.*, 2005) ดังนี้ ต้านทาน (R) ไม่พบอาการโรคเกิดขึ้น และระดับอ่อนแอ (S) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์สัดส่วนโรรมากกว่า 1% (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์สัดส่วนโรค และระดับความต้านทานโรคแอนแทรคโนสที่จัดแบ่งตามเปอร์เซ็นต์สัดส่วนโรค

% สัดส่วนโรค	ลักษณะอาการโรค	ระดับความต้านทาน
0	ไม่พบรอยแผล	ต้านทาน (R)
>1 - 2	ขนาดแผล >1 - 2% เป็นแผลเน่ายุบ หรือแผลชุ่มน้ำรอบๆ รอยเข็ม	
>2 - 5	ขนาดแผล >2 - 5% เป็นแผลเน่ายุบ หรือแผลชุ่มน้ำ 5%	
>5 - 15	ขนาดแผล >5 - 15% ปรากฏ acervuli หรือแผลเน่ายุบ 25%	อ่อนแอ (S)
>15 - 25	ขนาดแผล >15 - 25% ปรากฏ acervuli หรือแผลเน่ายุบ	
>25	ขนาดแผล >25% ปรากฏกลุ่มของ spore เรียงเป็นวงรอบรอยแผล	



ภาพที่ 5 disease diagram ของอาการ โรคแอนแทรคโนสที่มี % สัดส่วน โรคตั้งแต่ 0- >25% ใช้
สำหรับประเมินอาการ โรคแอนแทรคโนส

- สำหรับประเมินอาการ โรคบนผลพริกที่มีรูปร่างผลทรงกลม
- สำหรับประเมินอาการ โรคบนผลพริกที่มีรูปร่างผลทรงรียาว
- สำหรับประเมินอาการ โรคบนผลพริกที่มีรูปร่างผลทรงรีวสัน

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาระหว่างพริก ‘บางช้าง’ และ ‘PBC932’ จำนวน 8 ลักษณะ (ตารางที่ 3) ได้แก่ 1) สีม่วงบริเวณข้อ (*A*) บันทึกลักษณะสีม่วงบริเวณข้อของต้นพริก เมื่อต้นพริกอายุ 2 เดือน หลังย้ายปลูก 2) จำนวนดอกต่อข้อ (*Mf*) นับจำนวนดอกต่อข้อ โดยสุ่มนับ 5 ตำแหน่ง บริเวณรอบต้นพริก 3) ความเรียบของใบ (*Sm*) บันทึกลักษณะความเรียบของใบ ที่ระยะใบแก่ บริเวณกลางต้น 4) ลักษณะชี้ขึ้นของก้านชูดอก หรือผล (*up-2*) บันทึกลักษณะชี้ขึ้นของก้านชูดอก หรือผล โดยสุ่ม 5 ตำแหน่ง บริเวณรอบต้นพริก 5) สีผลแก่เต็มที่ (*cl*) บันทึกลักษณะสีเขียวเข้มของผลพริกที่ ระยะผลเขียวแก่เต็มที่ (30 วัน หลังจากดอกบาน) จำนวน 5 ผลต่อต้น 6) สีอับเรณู (*ya*) บันทึกลักษณะสี อับเรณู ในขณะที่ดอกตูมใกล้บาน 7) มุมระหว่างดอกกับก้านชูดอก (*Af*) บันทึกลักษณะความกว้างของ มุมระหว่างดอกกับก้านชูดอก โดยสุ่ม 5 ตำแหน่ง บริเวณรอบต้นพริก และ 8) ความยาวของยอดเกสรเพศ เมื้อย (stigma length) (*StL*) บันทึกลักษณะความยาวของยอดเกสรเพศเมื้อย โดยสุ่ม 5 ตำแหน่ง บริเวณรอบ ต้นพริก

ตารางที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 8 ลักษณะ และการแสดงออกของยีน ที่มีความแตกต่างระหว่างพริก ‘บางช้าง’ และ ‘PBC932’

ลักษณะ	ยีน (Bosland <i>et al.</i> , 2006)	การแสดงออก และการ กระจายตัวของลักษณะ	จำนวนยีนที่ควบคุม และการข้าม (Bosland <i>et al.</i> , 2006)
1) สีม่วงบริเวณข้อ	<i>A</i>	สีม่วง > สีเขียว	ยีนเด่น 1 ตำแหน่ง
2) จำนวนดอกต่อข้อ	<i>Mf</i>	> 2 ดอกต่อข้อ > 1 ดอกต่อข้อ	ยีนเด่น 1 ตำแหน่ง
3) ความเรียบของใบ	<i>Sm</i>	ใบเรียบ > ใบหยัก	ยีนเด่น 1 ตำแหน่ง
4) ลักษณะชี้ขึ้นของก้านชูดอก หรือผล	<i>up-2</i>	โค้งลง > ชี้ขึ้น	ยีนด้อย 1 ตำแหน่ง
5) สีเขียวเข้มของผลแก่เต็มที่	<i>Cl</i>	สีเขียวอ่อน > สีเขียวเข้ม	ยีนด้อย 1 ตำแหน่ง
6) สีเหลืองของอับเรณู	<i>Ya</i>	สีม่วง > สีเหลือง	ยีนด้อย 1 ตำแหน่ง
7) มุมระหว่างดอกกับก้านชูดอก	<i>Af</i>	-	na
8) ความยาวของยอดเกสรเพศเมื้อย	<i>StL</i>	-	na

na คือลักษณะที่ยังไม่ทราบการแสดงออกของยีน

การสร้าง DNA เครื่องหมาย

1. สกัด DNA พริก

สกัด genomic DNA ของพริก ‘บางช้าง’ ‘PBC932’ ลูกผสม F_1 และประชากร $BC_1F_1P_2$ ด้วยวิธี CTAB ดัดแปลง (Mongkolporm *et al.*, 2004) โดยสกัดจากยอดอ่อนสดของพืช ใช้เนื้อเยื่อพืชประมาณ 200 mg บดให้ละเอียดในโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลว เมื่อบดไปละเอียดแล้วเติม CTAB buffer (2% cetyltrimethyl ammonium bromide, 1 M Tris-base, 0.5 M EDTA, 5 M NaCl, pH 5.5) 1 ml ผสมให้เข้ากัน ผสม CTAB ใส่หลอด microcentrifuge ใหม่ขนาด 1.5 ml แล้ว incubate ที่ 55°C เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นใน microcentrifuge ที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอด microcentrifuge ใหม่ เติมน้ำละลาย chloroform: isoamyl alcohol (24: 1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายส่วนใสที่ดูดได้ เพื่อกำจัดส่วนที่เป็นโปรตีนออก นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 10 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอด microcentrifuge ใหม่ เติมน้ำละลาย chloroform: isoamyl alcohol ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายส่วนใสด้านบนที่ดูดได้ พลิกหลอด microcentrifuge ไปมา (inversion) และนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 10 นาทีอีกครั้ง จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอด microcentrifuge ใหม่ แล้วเติม 100% ethanol ที่เย็นจัดปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ดูดได้ เพื่อดกตะกอน DNA พลิกหลอดไปมาจะเห็นสาย DNA ตกตะกอนลงมา แช่ที่ -20°C ต่ออีก 30 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm 10 นาที เทสารละลายทั้งหมดทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน DNA ที่ก้นหลอด ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol ปริมาตร 250 μl นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 10 นาที อีกครั้ง แล้วเท 70% ethanol ทิ้ง รอให้ DNA แห้ง resuspend ตะกอน DNA ด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 50 μl สารละลาย DNA ที่ได้นำไปเก็บไว้ที่ -20°C

วัดความบริสุทธิ์ และความเข้มข้นของ DNA โดยวิธี spectrophotometry วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm (A_{260}) และความยาวคลื่น 280 nm (A_{280}) โดยใช้เครื่อง uv/vis spectrophotometer รุ่น GeneQuant *pro* (Amersham Biosciences, UK) ความบริสุทธิ์ของ DNA ควรมีค่าอยู่ในช่วง 1.8 – 2.0 (A_{260}/A_{280}) (Sambrook and Russell, 2001) คำนวณความเข้มข้นของ DNA ได้ดังสมการ 1

$$\text{ความเข้มข้นของ DNA } (\mu\text{g/ml}) = (A_{260}) \times 50 \times \text{dilution factor} \quad \text{----- (1)}$$

2. การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR

เทคนิคที่เลือกใช้ในการสร้างแผนที่โครโมโซมในครั้งนี้มี 2 เทคนิค คือ sequenced tagged microsatellite site (STMS) ที่มีเป้าหมายของการเพิ่มปริมาณ DNA อยู่ตำแหน่ง microsatellite ของพริก และ expressed sequence tags (EST) ซึ่งได้จากการศึกษาการแสดงออกของยีน ด้วยเทคนิค microarray ในพริก ‘PBC932’ ภายหลังจากการปลูกเชื้อ *C. capsici* 158ci เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (อรรรัตน์ มงคลพร, ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์)

2.1 STMS

STMS ที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้จาก microsatellite 139 ตำแหน่ง โดยที่ 76 ตำแหน่ง มาจาก GeneBank (Lee *et al.*, 2004) และอีก 63 ตำแหน่ง มาจากการเข้าร่วม International Consortium of Pepper Microsatellite (อรรรัตน์ มงคลพร, ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) ปฏิบัติ PCR แต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย DNA ต้นแบบปริมาณ 50 ng, 0.2 μ M ของแต่ละ primer, 0.45 unit ของ DNA polymerase, 0.24 mM dNTPs, 2.5 mM ของ MgCl₂ และ 10 mM ของ buffer โดยที่ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 15 μ l ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Whatman Biometra, Germany หรือ Corbett Research, Australia) โดยกำหนดอุณหภูมิ และรอบของการทำปฏิกิริยา ดังนี้ predenature ที่ 94°C เป็นเวลา 3 นาที DNA denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที annealing 55-65°C เป็นเวลา 30 วินาที extension 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension 72°C เป็นเวลา 7 นาที หลังจากเสร็จปฏิกิริยา PCR นำ PCR products ไปตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วย 1.5% (w/v) agarose gel electrophoresis หากเกิดปฏิกิริยา PCR สมบูรณ์ จึงนำ PCR products ที่เหลือไปแยกความแตกต่างของ DNA ด้วย 4.5% (w/v) Polyacrylamide gel electrophoresis

2.2 EST

EST ได้จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในพริกสายพันธุ์ ‘PBC932’ ภายหลังจากปลูกเชื้อ *C. capsici* isolate 158ci เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค microarray โดยใช้ *Arabidopsis* DNA chip (อรรรัตน์ มงคลพร, ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) จากนั้นได้พัฒนา EST ที่ได้ ให้เป็น DNA เครื่องหมายชนิด sequence-characterized amplified region (SCAR) 7 ตำแหน่ง และ cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) 3 ตำแหน่ง โดยชัชมาศ กาญจนอุดมการณ์, (ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) ส่วน SCAR อีก 1 ตำแหน่ง ชัชมาศ กาญจนอุดมการณ์, (ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) ได้ออกแบบไพรเมอร์จากยีนที่สังเคราะห์

โปรตีน pathogenesis-related protein 10 mRNA เพื่อยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อในพริก *C. annuum* ในฐานข้อมูล NCBI (national center for biotechnology information)

2.2.1 SCAR

SCAR จำนวนทั้งหมด 8 คู่ไพรเมอร์ ทำปฏิกิริยา PCR แต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย DNA ต้นแบบปริมาณ 50 ng, 0.2 μ M ของไพรเมอร์, 0.45 unit ของ DNA polymerase, 0.24 mM dNTPs, 2.5 mM ของ $MgCl_2$ และ 10 mM ของ buffer โดยที่ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 15 μ l ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Whatman Biometra, Germany หรือ Corbett Research, Australia) โดยกำหนดอุณหภูมิและรอบของการทำปฏิกิริยา ดังนี้ DNA denaturation ที่ $94^{\circ}C$ เป็นเวลา 1 นาที annealing $55-65^{\circ}C$ เป็นเวลา 1 นาที extension $72^{\circ}C$ เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension $72^{\circ}C$ เป็นเวลา 5 นาที หลังจากเสร็จปฏิกิริยา PCR นำ PCR products ไปตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วย 1.5% (w/v) agarose gel electrophoresis

2.2.2 CAPS

CAPS จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ ใช้ปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับ SCAR หลังจากเสร็จปฏิกิริยา PCR นำ PCR products ไปตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วย 1% (w/v) agarose gel electrophoresis หากเกิดปฏิกิริยา PCR สมบูรณ์ จึงนำ PCR products อีก 10 μ l ที่เหลือตัดด้วย enzyme *Tru1I* (เป็น isoschizomer กับ *MseI*) (Fermentas, Canada) ที่มีตำแหน่งจดจำลำดับเบส 4 เบส คือ T/TAA ความเข้มข้น 0.5 unit/ μ l, 1x buffer R^+ (Fermentas, Canada) จากนั้น incubate ที่ $65^{\circ}C$ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงตรวจสอบ PCR products หลังจากการตัดด้วย enzyme อีกครั้งหนึ่งด้วย 1.5% (w/v) agarose gel electrophoresis

3. การแยกความแตกต่างของชิ้นส่วน DNA

3.1 การแยกความแตกต่างของชิ้นส่วน DNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

เจือจาง PCR products ด้วย gel-loading buffer (0.25% (w/v) Bromophenol blue, 0.25% (w/v) Xylene cyanol FF, 30% (v/v) Glycerol) ปริมาตร 6 เท่า จากนั้นแยกความแตกต่างของ DNA ด้วย 1.5% (w/v) agarose gel electrophoresis (BIORAD, USA) ใน 1x Tris-acetate (TAE buffer) (90 mM

Tris-borate, 0.2mM EDTA, pH 8.0) หลังจากแยกขนาด DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าที่ 100 volt แล้วย้อม DNA ด้วย 1 µg/ml ethidium bromide และถ่ายรูปแถบ DNA โดยใช้ gel documentation system รุ่น TCX-20 (Vilber Lourmat, France)

3.2 การแยกความแตกต่างของชิ้นส่วน DNA ด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis

เจือจาง PCR products ด้วย formamide-loading buffer (80% (w/v) Deionised formamide, 10 mM EDTA, 10% (w/v) Xylene cyanol FF, 10% (w/v) Bromophenol blue) ปริมาตร 1 เท่า และแยกความแตกต่างของ DNA ด้วย 4.5% acrylamide gel (40% acrylamide 19:1, urea, 5x TBE buffer) ใน 1x TBE buffer (90 mM Tris-borate, 0.2mM EDTA, pH 8.0) หลังจากแยกขนาดของ DNA ย้อม DNA ด้วย silver nitrate (0.1% silver nitrate (w/v); 0.15% formaldehyde) เป็นเวลา 30 นาที แล้ว develop สีด้วย developer (3% sodium carbonate anhydrous (w/v); 0.2% sodium thiosulfate; 0.15% formaldehyde)

การสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจ (linkage map)

1. การแปลงข้อมูล (marker scoring)

แปลงข้อมูล DNA เครื่องหมาย และลักษณะทางพันธุกรรมเป็นระบบ A, B, H ดังนี้ DNA เครื่องหมายชนิด STMS และ CAPS กำหนดให้ A = จีโนไทป์ ‘PBC932’ (มีแถบ DNA ปรากฏใน ‘PBC932’) B = จีโนไทป์ ‘บางช้าง’ (มีแถบ DNA ปรากฏใน ‘บางช้าง’) และ H = heterozygous (มีแถบ DNA ปรากฏทั้งใน ‘PBC932’ และ ‘บางช้าง’)

DNA เครื่องหมาย SCAR กำหนดให้ A = จีโนไทป์ ‘PBC932’ (ไม่มีแถบ DNA ปรากฏใน ‘PBC932’) B = จีโนไทป์ ‘บางช้าง’ (ไม่มีแถบ DNA ปรากฏใน ‘บางช้าง’) และ H = heterozygous (มีแถบ DNA ปรากฏเหมือน ‘PBC932’ หรือ ‘บางช้าง’)

ลักษณะความต้านทานโรคแอนแทรกโนส และลักษณะทางพันธุกรรมวิทยา กำหนดให้ A = จีโนไทป์ ‘PBC932’ (มีลักษณะปรากฏเหมือน ‘PBC932’) B = จีโนไทป์ ‘บางช้าง’ (มีลักษณะปรากฏเหมือน ‘บางช้าง’) และ H = heterozygous (มีลักษณะปรากฏเหมือน ‘บางช้าง’)

2. การสร้างแผนที่

การสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจ (linkage map) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ MAPMAKER/EXP version3 (Lander *et al.*, 1987) ใช้ mapping function ของ Kosambi กำหนดค่า LOD เท่ากับ 4.0 และเปอร์เซ็นต์ recombination เท่ากับ 40

3. การวิเคราะห์ QTL

วิเคราะห์หาตำแหน่งของ DNA เครื่องหมาย และลักษณะทางสัณฐานวิทยา ที่เกี่ยวข้องกับ ลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait loci; QTL) ของลักษณะความต้านทานโรคแอนแทรคโนสของ พริกที่ระยะผลเขียว โดยใช้ single point analysis ระหว่าง DNA เครื่องหมาย และลักษณะทางสัณฐาน วิทยา กับค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์สัดส่วนการเกิดโรค และใช้วิธี interval mapping เพื่อหาความสัมพันธ์ของ ตำแหน่งที่จัดวางอยู่บนกลุ่มลิงค์เกจกับค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์สัดส่วนการเกิดโรคแบบกลุ่ม โดยใช้โปรแกรม คอมพิวเตอร์ MapQTL[®] version 4.0 (Van Ooijen *et al.*, 2002)

การทดลองที่ 2 การค้นหา DNA เครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนส โดยใช้เทคนิค bulked segregant analysis (BSA) ร่วมกับเทคนิค amplified fragment length polymorphisms (AFLP)

การสร้างพริกประชากร BC₁F₂P₁

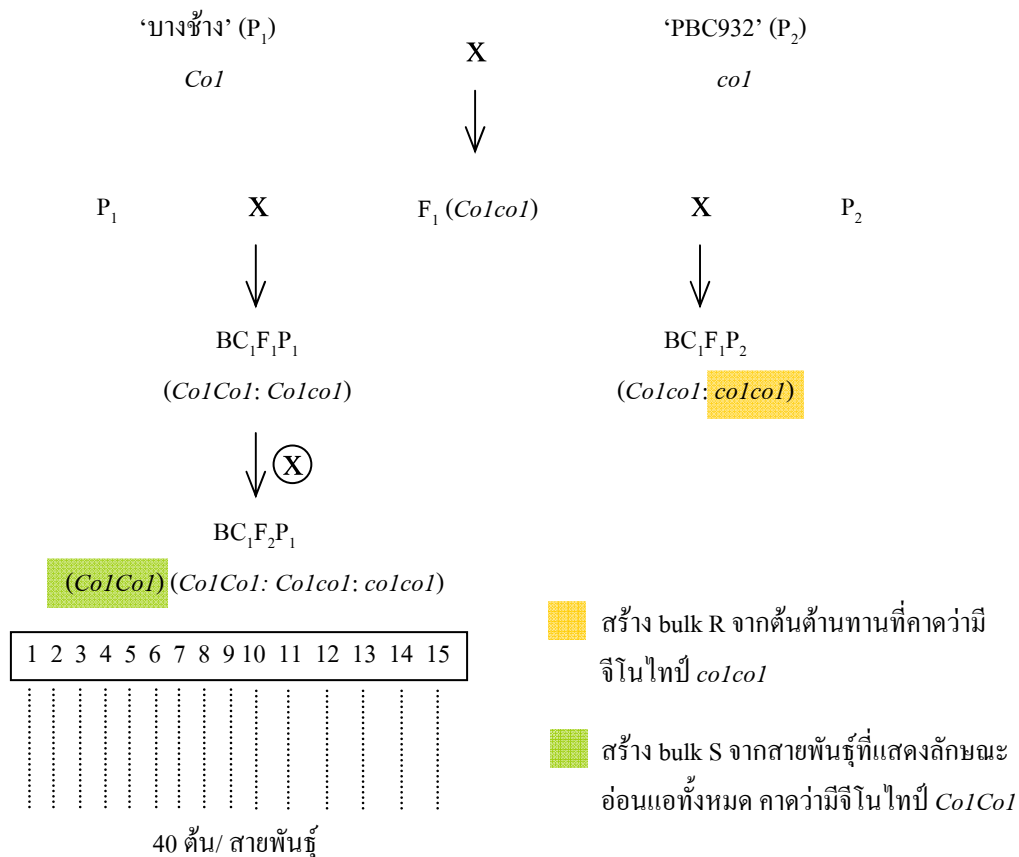
นำลูกผสม F₁ (*C. annuum* ‘บางช้าง’ x *C. chinense* ‘PBC932’) ผสมกลับไปยัง ‘บางช้าง’ ซึ่งเป็น พันธุ์อ่อนแอ เพื่อสร้างประชากร BC₁F₂P₁ จากนั้นทำการผสมตัวเองของพริก BC₁F₂P₁ จำนวน 15 ต้น เพื่อให้ได้พริกประชากร BC₁F₂P₁ จำนวน 15 สายพันธุ์ ปลูกประชากรพริกทั้ง 15 สายพันธุ์ (40 ต้น/ สายพันธุ์) ที่แปลงทดลองของศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2549 และเก็บผล พริกมาทดสอบระดับความต้านทานโรคแอนแทรคโนส ในช่วงเดือน มกราคม -กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2550

การผสมตัวเอง (self pollination) ของพริก สามารถทำได้ทุกช่วงเวลา โดยการนำสาเกิลคลุมดอก ในระยะก่อนดอกบาน 1 วัน เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากละอองเกสรของพริกพันธุ์อื่น จากนั้นติดป้าย (tag) ที่ให้รายละเอียดของการผสม และวันที่ผสม

เทคนิค bulked segregant analysis (BSA)

การคัดเลือกต้นพริกเพื่อนำไปใช้ในการสร้าง DNA bulk โดย bulk R คัดเลือกต้นด้านทาน (คาดว่ามิโนไทป์ *colcol*) 10 ต้น จากประชากร $BC_1F_1P_2$ ซึ่งเป็นประชากรเดียวกับที่ใช้สร้างแผนที่ และ bulk S คัดเลือกต้นอ่อนแอ (คาดว่ามิโนไทป์ *ColCol*) 10 ต้น จากประชากร $BC_1F_2P_1$ จำนวน 15 สายพันธุ์ โดยใช้สายพันธุ์ที่แสดงลักษณะอ่อนแอทั้งหมด (ภาพที่ 6)

การสร้าง DNA bulk โดยสกัด DNA จากต้นที่คัดเลือกได้ แล้วรวม DNA จากต้นที่มีฟีโนไทป์เดียวกัน เข้าด้วยกัน ใช้ DNA ปริมาณเท่ากันจากแต่ละต้น



ภาพที่ 6 การสร้างประชากร $BC_1F_1P_2$ และ $BC_1F_2P_1$ จากพริก ‘บางช้าง’ กับ ‘PBC932’ เพื่อใช้สร้าง DNA bulk R และ bulk S

การแยกความแตกต่างระหว่าง DNA bulk โดยใช้เทคนิค AFLP

นำ DNA ของพริก ‘บางช้าง’ และ ‘PBC932’ ซึ่งเป็นพริกพันธุ์แม่ และพ่อ กับ DNA ของ bulk R และ bulk S มาแยกความแตกต่างของ DNA โดยใช้เทคนิค AFLP ตามวิธีของ Vos *et al.* (1995) ซึ่งใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 51 คู่ไพรเมอร์ เทคนิค AFLP มี 3 ขั้นตอน คือ digestion, ligation และ การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR

1. Digestion

นำ genomic DNA ปริมาณ 500 ng มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *EcoRI* (Fermentas, Canada) ซึ่งมีตำแหน่งในการจดจำลำดับเบส 6 เบสคือ G/AATTC และ *TruI* (เป็น isoshizomer กับ *MseI*) (Fermentas, Canada) ที่มีตำแหน่งจดจำลำดับเบส 4 เบส คือ T/TAA ความเข้มข้นอย่างละ 5 unit, 4X buffer A (BM) (Roche, Germany) โดยที่ปริมาตรรวม 40 µl บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง

2. Ligation

เชื่อมต่อชิ้นส่วนของ DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะกับ adapter ที่ปลายแต่ละข้างด้วย *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter เพื่อป้องกันการเข้าจับกันเองของชิ้นส่วน DNA ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน โดย adapter มีลำดับเบส ดังนี้

EcoRI-adapter

5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'

3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'

MseI-adapter

5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'

3'-TACTCAGGACTCAT-5'

Ligation ใน 1 ปฏิกริยาประกอบด้วย 1X buffer A (BM) (Roche, Germany), *EcoRI* adapter 5 pmol, *MseI* adapter 50 pmol, 1mM dATP และ 1 unit T4 DNA ligase (Promega, USA) รวมปริมาตรทั้งหมด 10 μ l เติมลงในสารละลายหลังขั้นตอน digestion บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 3 ชั่วโมง หลังจาก ligation เจือจางชิ้นส่วน DNA ที่ได้ ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 5 เท่า เพื่อนำไปทำ PCR ต่อไป

3. PCR

preselective amplification (PCR I) ใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีบริเวณ selective extension 1 เบส ต่อเข้ากับชิ้นส่วน DNA ที่ถูกตัด ซึ่งใน PCR I มีองค์ประกอบของปฏิกริยา ดังนี้ DNA ที่ได้จากขั้นตอนการ ligation ปริมาตร 5 μ l, 1X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, *Taq* DNA polymerase 1 unit (Invitrogen, Brazil), 0.2 μ M ER และ MS ไพรเมอร์ ในปริมาตรทั้งหมด 50 μ l โดยใช้โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิดังนี้ DNA denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที annealing 56°C เป็นเวลา 1 นาที extension 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 20 รอบ และ final extension 72°C เป็นเวลา 5 นาที

selective extension (PCR II) ใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีบริเวณ selective extension 3 เบส ซึ่งประกอบด้วย DNA จาก PCR I ปริมาตร 2 μ l, 1X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, *Taq* DNA polymerase 0.4 unit (Invitrogen, Brazil), 0.25 μ M ER และ MS ไพรเมอร์ ในปริมาตรทั้งหมด 20 μ l โดยใช้โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิดังนี้ DNA denaturation 94°C เป็นเวลา 30 วินาที, 65-57°C เป็นเวลา 30 วินาที (touch down step) และ 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 9 รอบ เพื่อลดอุณหภูมิในขั้นตอน annealing โดย touch down step ครั้งละ 1°C จาก 65°C -57°C ตามด้วย DNA denaturation 94°C เป็นเวลา 30 วินาที, annealing 56°C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ หลังจากทำปฏิกริยา PCR เสร็จ ตรวจสอบ PCR products ที่ได้โดยใช้ 6% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

AFLP ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR ประกอบด้วย 3 ส่วน คือบริเวณ core sequence (CORE) บริเวณที่เข้าจับกับส่วนที่ถูกตัดด้วย enzyme ตัดจำเพาะ (ENZ) และบริเวณ selective extension (EXT) ที่มีลำดับเบส 1 เบส (PCR I) และ 3 เบส (PCR II) จากส่วน ENZ ดังนี้

	CORE	ENZ	EXT
<i>EcoRI</i>	5'-GACTGCGTACC	AATTC	NNN-3'
<i>MseI</i>	5'-GATGAGTCCTGAG	TAA	NNN-3'

การทดสอบ DNA เครื่องหมายที่ได้จาก BSA

นำเครื่องหมาย AFLP ที่แสดงความแตกต่างระหว่าง bulk ทั้ง 2 ได้ มาทดสอบกับ DNA ของสมาชิกภายในแต่ละกลุ่ม bulk เพื่อทดสอบความสัมพันธ์ของเครื่องหมาย AFLP ที่พบกับลักษณะด้านทาน และลักษณะอ่อนแอ โดยคำนวณจากความถูกต้องของการปรากฏ หรือไม่ปรากฏของแถบเครื่องหมายในกลุ่มต้นด้านทาน และอ่อนแอ ถ้าความถูกต้องมากกว่า 80% จึงนำ DNA เครื่องหมายนั้นไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (linkage analysis) กับลักษณะด้านทาน และลักษณะอ่อนแอ ในพริกประชากร F₂ ต่อไป

การสร้าง DNA เครื่องหมาย SCAR จากเครื่องหมาย AFLP

เครื่องหมาย AFLP ที่มีความถูกต้องมากกว่า 80% ได้รับการพัฒนาเป็น SCAR ก่อนนำไปทดสอบกับประชากร F₂

1. การแยกแถบเครื่องหมาย AFLP จาก polyacrylamide gel

แยกแถบ DNA AFLP จาก 6% แผ่นเจล polyacrylamide gel จากวิธีของ Hong *et al.* (2006) โดยใช้น้ำเปล่าที่นิ่งมาเชื้อแล้ว แด้มบริเวณแถบ DNA ที่ต้องการ เพื่อช่วยให้ polyacrylamide gel อ่อนนุ่ม และสามารถตัดชิ้นเจลที่มีแถบ DNA ที่ต้องการออกมาได้ง่าย นำชิ้นเจลใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml เติม TE buffer (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 10 µl ใช้ปลาย pipette tip กดเจลให้ละเอียดเพื่อให้ DNA ละลายอยู่ใน TE buffer นำไปต้มในน้ำเดือด 1 นาที เพื่อช่วยให้ DNA แยกออกมาจากเจลได้ดีขึ้น นำไปปั่นตกตะกอนของเศษเจลที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 10 นาที แล้วดูดสารละลายใส่หลอด microcentrifuge ใหม่ขนาด 1.5 ml นำ DNA ที่ตัดแยกออกมาได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

เพิ่มปริมาณ DNA ที่แยกออกมาได้ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ และโปรแกรม PCR เช่นเดียวกับการทำปฏิกิริยา PCR II ของเทคนิค AFLP หลังจากทำปฏิกิริยา PCR ตกตะกอน DNA โดยเติม 100% ethanol ที่เย็นจัดปริมาตร 2 เท่าของปริมาตร PCR ทั้งหมด นำไปแช่ที่ -20°C อีก 30 นาที ปั่นตกตะกอน DNA ที่ความเร็ว 13,000 rpm 10 นาที เทสารละลายทั้งหมดทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนชิ้นส่วน DNA ล้างตะกอนชิ้นส่วน DNA ด้วย 70% ethanol ปริมาตร 250 µl นำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 10 นาที แล้วเท 70% ethanol ทิ้ง รอให้ DNA แห้ง ละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer ปริมาตร 5 µl

ตรวจสอบความเข้มข้นของ DNA ที่ได้โดยด้วย 1% (w/v) agarose gel electrophoresis และเก็บสารละลาย DNA ที่ได้ไว้ที่ -20°C เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ด้วย *E. coli* ต่อไป

2. การเพิ่มปริมาณ DNA ใน *E. coli*

การเพิ่มปริมาณ DNA ที่ได้จากเครื่องหมาย AFLP ด้วย *E. coli* โดยเชื่อมต่อชิ้นส่วน DNA ที่ตัดแยกมาได้เข้ากับพลาสมิด pGEM[®]-T easy (Promega, USA) โดยเติม DNA 3 μl , 1X T4 DNA ligase buffer, 50 ng pGEM[®]-T easy vector และ 3 unit T4 ligase รวมปริมาตรทั้งหมด 10 μl บ่มไว้ที่อุณหภูมิ $5-6^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้น transform พลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี heat-shock หลังการ transform เติมหาอาหารเหลว SOB (tryptone 2%, yeast extract 0.5% และ NaCl 0.05% w/v) ที่ไม่เติม ampicillin ปริมาตร 990 μl นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที นำเซลล์ที่เลี้ยงได้ปริมาตร 300 μl spread ลงบนอาหารแข็ง LB (tryptone 1%, yeast extract 1% NaCl 0.5% และ agar 1.5% w/v) ที่เติม ampicillin ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ นำไปเพาะเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาประมาณ 16-24 ชั่วโมง สุ่มคัดเลือก single colony มาตรวจสอบว่ามีชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR นำโคลนที่มีชิ้น DNA ที่ต้องการไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติม ampicillin ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที 12 ชั่วโมง ในที่มืด จากนั้นสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด GeneJET[™] Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Canada)

การตรวจสอบโคลนที่มีชิ้นส่วนของ DNA ที่ต้องการด้วย PCR ใช้คู่ไพรเมอร์ AFLP คู่เดิมที่สร้าง DNA เครื่องหมาย AFLP นั้น และตรวจสอบ PCR products ด้วย 1% (w/v) agarose gel electrophoresis

3. การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำพลาสมิดที่สกัดได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น DNA insert ที่ Bioservice Unit (BSU) อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ถนนพระราม 6 พญาไท ราชเทวี กรุงเทพฯ

4. การออกแบบ SCAR ไพรมเมอร์

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ ซึ่งเป็น DNA เครื่องหมาย AFLP ทำการวิเคราะห์เพื่อออกแบบคู่ไพรมเมอร์ โดยใช้โปรแกรม Primer3 (Rozen *et al.*, 2000) คู่ไพรมเมอร์ใหม่ที่ได้จะมีความจำเพาะเจาะจงกับตำแหน่งของ DNA เครื่องหมาย AFLP ที่ต้องการเท่านั้น DNA เครื่องหมายใหม่ที่ได้นี้เรียกว่า SCAR

5. การทดสอบเครื่องหมาย SCAR กับ DNA ในสมาชิก bulk

นำเครื่องหมาย SCAR ที่ได้ ตรวจสอบความถูกต้องของการปรากฏแถบ DNA สอดคล้องกับ AFLP ที่สกัดมา ในพริก ‘PBC932’ ‘บางช้าง’ และสมาชิก bulk R และ bulk S

6. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SCAR กับลักษณะต้านทานต่อโรคแอนแทรกโนสในพริกระยะผลเขียว

นำเครื่องหมาย SCAR ทดสอบในประชากรพริก F_2 จำนวน 96 ต้น ซึ่งเป็นประชากรที่มีการกระจายตัว สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (linkage) (ประชากรนี้สร้างโดย นายนพพล ขำเพ็ง ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม) จากการคำนวณ recombination frequency ที่เกิดขึ้นในประชากร

ผลและวิจารณ์

ผล

การทดลองที่ 1 การสร้างแผนที่ยืนเพื่อหาตำแหน่งของยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริก

1. การประเมินลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนส

ผลการประเมินลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนส ด้วยการปลูกเชื้อ *C. capsici* isolate 158ci บนผลพริก ‘PBC932’ ‘บางช้าง’ ลูกผสม F_1 และประชากร $BC_1F_1P_2$ พบว่าภายหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน พริก ‘PBC932’ ไม่พบอาการโรคแอนแทรคโนส (สัดส่วนโรคเท่ากับ 0%) ซึ่งจัดอยู่ในระดับต้านทาน (R) ทั้ง 10 ต้น พริก ‘บางช้าง’ พบอาการโรคแอนแทรคโนส บริเวณที่ได้รับการปลูกเชื้อ ผลพริกมีอาการยุบตัวลง แผลมีสีดำจากเส้นใยของเชื้อราที่เจริญบนผล มีเปอร์เซ็นต์สัดส่วนโรคมากกว่า 15% ทั้ง 10 ต้น ซึ่งจัดอยู่ในระดับอ่อนแอ (S) ส่วนลูกผสม F_1 จำนวน 31 ต้น พบว่าลูกผสม F_1 แต่ละต้นมีระดับการเกิดโรคที่แตกต่างกัน คือมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์สัดส่วนโรค อยู่ในช่วงตั้งแต่ 5-45% ซึ่งเป็นลักษณะอ่อนแอทั้งหมด (ตารางที่ 4)

การประเมินลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนสของพริกประชากร $BC_1F_1P_2$ จากจำนวนทั้งหมด 140 ต้น พบว่าแต่ละต้นมีระดับการเกิดโรคแตกต่างกัน มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์สัดส่วนโรคอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0-100% ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับระดับการเกิดโรคของ ‘PBC932’ และ ‘บางช้าง’ สามารถแบ่งลักษณะการเกิดโรคได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีลักษณะต้านทาน มีเปอร์เซ็นต์สัดส่วนโรคเท่ากับ 0% จำนวน 74 ต้น และกลุ่มที่มีลักษณะอ่อนแอ มีเปอร์เซ็นต์สัดส่วนโรค >1% จำนวน 66 ต้น โดยที่ระดับการเกิดโรคมีลักษณะเบี่ยงเบนมากกว่าพริก ‘บางช้าง’ (ตารางที่ 4)

การที่ F_1 แสดงลักษณะอ่อนแอทั้งหมดนั้น แสดงว่าความต้านทานโรคแอนแทรคโนสถูกควบคุมด้วยยีนด้อย และจากข้อมูลลักษณะการเกิดโรคแอนแทรคโนสในพริกประชากร $BC_1F_1P_2$ พบว่ามีลักษณะต้านทาน จำนวน 74 ต้น ต่อลักษณะอ่อนแอ จำนวน 66 ต้น เมื่อนำมาคำนวณค่า Chi-square ภายใต้สมมุติฐานลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนสถูกควบคุมด้วยยีนด้อยหนึ่งตำแหน่งตามที่ Pakdeevaporn *et al.* (2005) ได้รายงานไว้ คือมีสัดส่วนของลักษณะต้านทานต่อลักษณะอ่อนแอ เท่ากับ 1:1 พบว่าค่า Chi-square ที่คำนวณได้ยอมรับสมมุติฐาน คือ มีค่าเท่ากับ 0.457 และค่า Probability เท่ากับ

0.499 (ตารางที่ 4) ซึ่งเป็นการยืนยันว่ายีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคแอนแทรคโนส ในพริก ระยะผลเขียว ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 ตำแหน่ง (*co1*)

ตารางที่ 4 ความถี่ของเปอร์เซ็นต์สัดส่วนโรค หลังจากการปลูกเชื้อ *C. capsici* isolate 158ci เป็นเวลา 7 วัน ของพริก ‘PBC932’ ‘บางช้าง’ ลูกผสม F_1 และลูกผสมกลับ $BC_1F_1P_2$

ประชากร	% สัดส่วนโรค						ความถี่ของ ค่าสังเกต (R: S)	อัตรา ส่วนที่ คาดหวัง	χ^2	Prob.
	0	>1 - 2	>2 - 5	>5 - 15	>15 - 25	>25				
‘PBC932’	10	0	0	0	0	0				
‘บางช้าง’	0	0	0	0	10	0				
F_1	0	0	0	1	9	21				
$BC_1F_1P_2$	74	3	5	2	13	43	74: 66	1:1	0.457	0.499

2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งหมด 8 ลักษณะ (ภาพที่ 7) ในประชากรพริก $BC_1F_1P_2$ จำนวน 140 ต้น การกระจายตัวของลักษณะทั้ง 8 (ตารางที่ 5) มีดังนี้

ลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 ตำแหน่ง ในประชากร $BC_1F_1P_2$ คาดว่าควรมีการกระจายตัวในอัตราส่วน 1:0 ได้แก่ สีม่วงบริเวณข้อ (*A*) จำนวนดอกต่อข้อ (*Mf*) และความเรียบของใบ (*Sm*) ซึ่งพบว่าลักษณะจำนวนดอกต่อข้อมีการกระจายตัวของลักษณะในอัตราส่วนเป็นไปตามที่คาดหวัง แต่ลักษณะสีม่วงบริเวณข้อ และลักษณะความเรียบของใบพบว่ามีอัตราส่วนไม่เป็นไปตามที่คาดหวัง มีการกระจายตัวไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล

ลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 ตำแหน่ง ในประชากร $BC_1F_1P_2$ คาดว่าควรมีการกระจายตัวในอัตราส่วน 1:1 ได้แก่ ลักษณะชี้ขึ้นของก้านชูดอก หรือผล (*up-2*) สีผลแก่เต็มที่ (*cl*) และสีอับเรณู (*ya*) ซึ่งพบว่าทั้ง 3 ลักษณะมีการกระจายตัวในอัตราส่วน 1:1 เป็นไปตามที่คาดหวัง

สำหรับลักษณะที่ไม่ทราบการแสดงออกของยีน ในประชากร $BC_1F_1P_2$ ได้แก่ ลักษณะมุมระหว่างดอกกับก้านชูดอก (*Af*) พบว่าการกระจายตัวไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล ส่วนลักษณะความยาวของยอดเกสรเพศเมีย (*StL*) พบว่ามีการกระจายตัวของต้นที่มียอดเกสรเพศเมียวาวกว่าอับเรณู ต่อต้นที่มียอดเกสรเพศเมียสั้นกว่าอับเรณู มีอัตราส่วนเท่ากับ 1:1

ตารางที่ 5 การกระจายตัวของลักษณะทางสัณฐานวิทยา 8 ลักษณะ ในประชากร $BC_1F_1P_2$ ($P_2 \times F_1$)

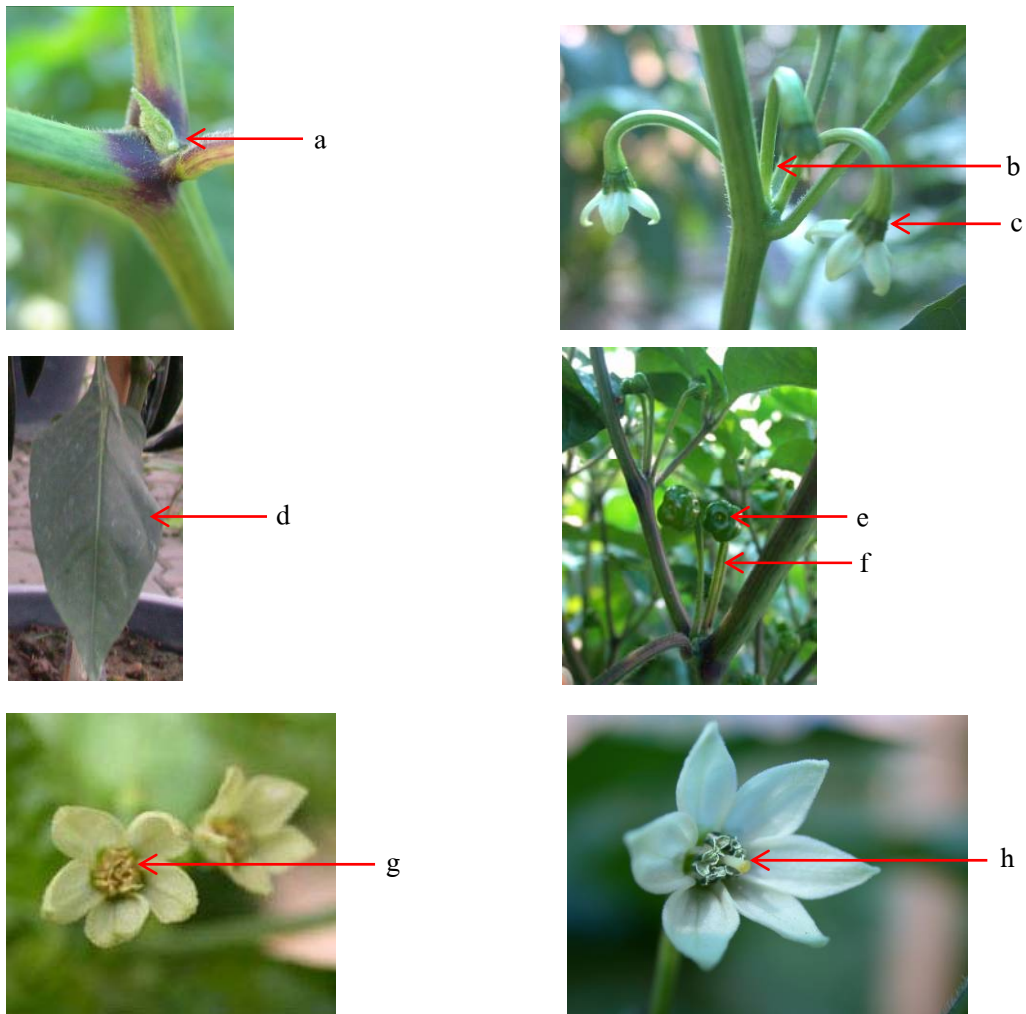
ยีน	จำนวนต้น ทั้งหมด	ลักษณะที่ แตกต่าง (P_1/P_2)	จำนวนต้น ที่พบ	อัตราส่วน ที่คาดหวัง	χ^2	Prob.
<i>A*</i>	140	ม่วง (P_1)	117	1:0	n/a	n/a
		เขียว (P_2)	23			
<i>Mf</i>	140	1 ดอก (P_1)	0	0:1	n/a	n/a
		>2 ดอก (P_2)	140			
<i>Sm*</i>	134	เรียบ (P_1)	29	1:0	n/a	n/a
		หยัก (P_2)	105			
<i>up-2</i>	134	โค้งลง (P_1)	57	1:1	2.99	0.084
		ตั้งขึ้น (P_2)	77			
<i>cl</i>	131	เขียวเข้ม (P_1)	56	1:1	2.76	0.097
		เขียวอ่อน (P_2)	75			
<i>ya</i>	133	ม่วง (P_1)	61	1:1	0.91	0.340
		เหลือง (P_2)	72			
<i>Af*</i>	135	>90° (P_1)	50	-	-	-
		90 (P_2)	85			
<i>StL</i>	134	ยาว (P_1)	69	1:1	0.12	0.730
		สั้น (P_2)	65			

P_1 คือพริกพันธุ์ ‘บางช้าง’

P_2 คือพริกสายพันธุ์ ‘PBC932’

n/a คือ not applicable

* คือมีการกระจายตัวไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดล



ภาพที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำนวน 8 ลักษณะ ในประชากรพริก $BC_1F_1P_2 (P_2 \times F_1)$

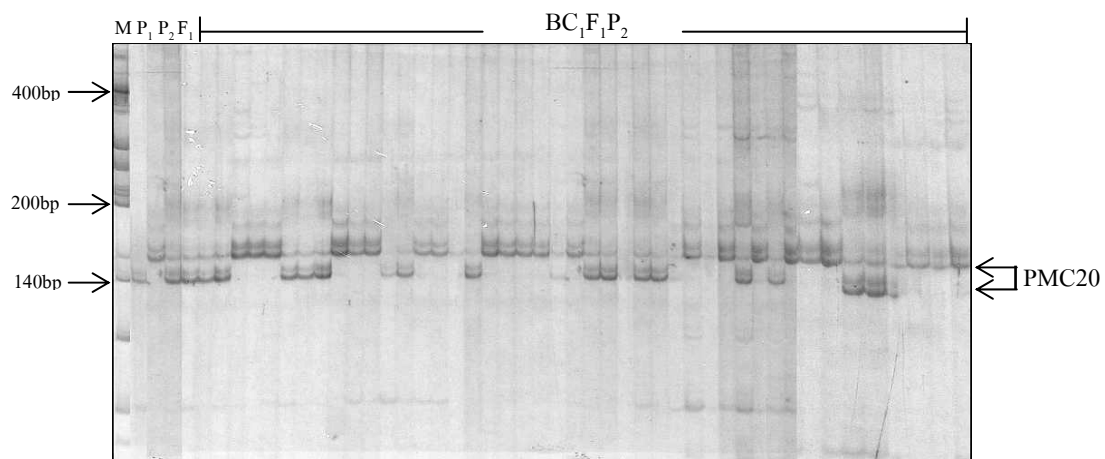
- a) สีม่วงบริเวณข้อ (A)
- b) จำนวนดอกต่อข้อ (Mf)
- c) มุมระหว่างดอกกับก้านชูดอก (Af)
- d) ความเรียบของใบ (Sm)
- e) สีผลแก่เต็มที่ (cl)
- f) ลักษณะชี้ขึ้นของก้านชูดอก หรือผล ($up-2$)
- g) สีอับเรณู (ya)
- h) ความยาวของยอดเกสรเพศเมีย (StL)

3. DNA เครื่องหมาย

3.1 STMS

จาก microsatellite ทั้งหมด 139 ตำแหน่ง พบว่ามี 65 คู่ไพรเมอร์ (47%) ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพริกสายพันธุ์ ‘PBC932’ และ ‘บางช้าง’ ได้ ส่วนอีก 50 คู่ไพรเมอร์ (36%) ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ และอีก 24 คู่ไพรเมอร์ (17%) ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้

microsatellite เป็น DNA เครื่องหมายแบบ co- dominant จากการทดสอบ 65 STMS (ตารางที่ 6) ในประชากร $BC_1F_1P_2$ จำนวน 140 ต้น ซึ่งอาจมีบางต้นที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้ จึงทำให้แต่ละคู่ไพรเมอร์ที่ใช้มีจำนวนต้นในการทดลองไม่เท่ากัน จากการทดสอบพบแถบ DNA 2 แบบ ได้แก่ แถบ DNA เหมือน ‘PBC932’ และแถบ DNA เหมือน ‘บางช้าง’ (ภาพที่ 8) การกระจายตัวของแถบ DNA ทั้ง 2 แบบพบในอัตราส่วน 1:1 จำนวน 35 ตำแหน่ง (54%) ไม่สอดคล้องกับอัตราส่วน 1:1 จำนวน 29 ตำแหน่ง (45%) และไม่มีการกระจายตัวจำนวน 1 ตำแหน่ง (1%)



ภาพที่ 8 การกระจายตัวของ sequenced tagged microsatellite site ที่ตำแหน่ง PMC20 ในพริก ‘บางช้าง’ (P₁) ‘PBC932’ (P₂) F₁ และประชากร BC₁F₁P₂; M คือ molecular weight marker ϕ X174 DNA/ *Hinf* I (Fermentas, Canada)

ตารางที่ 6 การกระจายตัวของ DNA เครื่องหมาย sequenced tagged microsatellite site จำนวน 65
ตำแหน่ง ในพริกประชากร BC₁F₁P₂ (P₂ x F₁)

STMS	จำนวนต้นที่	จำนวนต้น		Mendelian ratio	χ^2	Prob.
	ทดสอบ	H	A			
G1	120	56	64	1 : 1	0.53	0.467
G4	127	49	78	1 : 1	6.62	0.010*
G5	118	57	61	1 : 1	0.14	0.712
G6	137	50	87	1 : 1	9.99	0.002*
G10	113	49	64	1 : 1	1.99	0.158
G12	137	58	79	1 : 1	3.22	0.073
G13	125	39	28	1 : 1	3.53	0.060
G14	134	74	60	1 : 1	1.46	0.227
G25	104	54	50	1 : 1	0.15	0.699
G27	127	83	44	1 : 1	11.98	0.001*
G28	130	73	57	1 : 1	1.97	0.160
G30	133	85	48	1 : 1	10.29	0.001*
G31	127	52	75	1 : 1	4.17	0.041*
G33	132	72	60	1 : 1	1.09	0.296
G34	140	65	75	1 : 1	0.71	0.399
G35	131	60	71	1 : 1	0.92	0.337
G37	137	70	67	1 : 1	0.07	0.791
G39	140	68	72	1 : 1	0.11	0.740
G40	128	74	54	1 : 1	3.13	0.077
G41	132	76	56	1 : 1	3.03	0.082
G42	132	41	91	1 : 1	18.94	0*
G47	140	19	121	1 : 1	74.31	0*
G48	134	44	90	1 : 1	15.79	0*
G49	120	63	57	1 : 1	0.30	0.584
G50	127	62	65	1 : 1	0.07	0.791
G51	140	58	82	1 : 1	4.11	0.043*
G54	129	56	73	1 : 1	2.24	0.134
G55	106	38	68	1 : 1	8.49	0.004*
G57	96	61	35	1 : 1	7.04	0.008*

ตารางที่ 6 (ต่อ)

STMS	จำนวนต้นที่	จำนวนต้น		Mendelian ratio	χ^2	Prob.
	ทดสอบ	H	A			
G58	137	56	81	1 : 1	4.56	0.033*
G60	100	54	46	1 : 1	0.64	0.424
G61	117	40	77	1 : 1	11.70	0.001*
G64	132	49	83	1 : 1	8.76	0.003*
G65	140	36	104	1 : 1	33.03	0*
PMC1	94	60	34	1 : 1	7.19	0.007*
PMC3	140	61	79	1 : 1	2.31	0.129
PMC6	135	49	86	1 : 1	10.14	0.001*
PMC7	124	58	66	1 : 1	0.52	0.471
PMC9	140	62	78	1 : 1	1.83	0.176
PMC11	134	44	90	1 : 1	15.79	0*
PMC13	134	74	60	1 : 1	1.46	0.227
PMC17	100	52	48	1 : 1	0.16	0.689
PMC18	126	51	75	1 : 1	4.57	0.033*
PMC19	140	55	85	1 : 1	6.43	0.011*
PMC20	135	68	67	1 : 1	0.01	0.920
PMC21	140	68	73	1 : 1	0.19	0.663
PMC22	127	82	45	1 : 1	10.78	0.001*
PMC23	140	33	107	1 : 1	39.11	0*
PMC24	140	70	70	1 : 1	0.00	1
PMC25	132	52	80	1 : 1	5.94	0.015*
PMC26	126	40	86	1 : 1	16.79	0*
PMC29	131	68	63	1 : 1	0.19	0.663
PMC32	126	51	75	1 : 1	4.57	0.033*
PMC33	140	81	59	1 : 1	3.46	0.063
PMC39	140	58	82	1 : 1	4.11	0.043*
PMC45	138	74	64	1 : 1	0.72	0.396
PMC46	133	58	75	1 : 1	2.17	0.141
PMC49	138	0	138	1 : 1	n/a	-
PMC52	125	61	64	1 : 1	0.07	0.791

ตารางที่ 6 (ต่อ)

STMS	จำนวนคั่นที่ ทดสอบ	จำนวนคั่น		Mendelian ratio	χ^2	Prob.
		H	A			
PMC54	131	60	71	1 : 1	0.92	0.337
PMC55	139	136	3	1 : 1	127.26	0*
PMC57	138	53	85	1 : 1	7.42	0.006*
PMC58	139	66	73	1 : 1	0.35	0.554
PMC63	138	69	69	1 : 1	0.00	1

A คือมีแถบ DNA ปรากฏเหมือน ‘PBC932’

H คือมีแถบ DNA ปรากฏเหมือน ‘PBC932’ และ ‘บางช้าง’

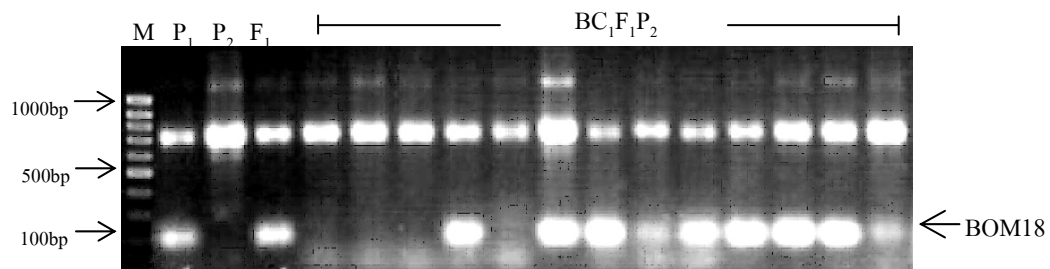
n/a คือ not applicable

* คือมีความแตกต่างทางสถิติ (ที่ระดับความน่าเชื่อมั่นน้อยกว่า 95%)

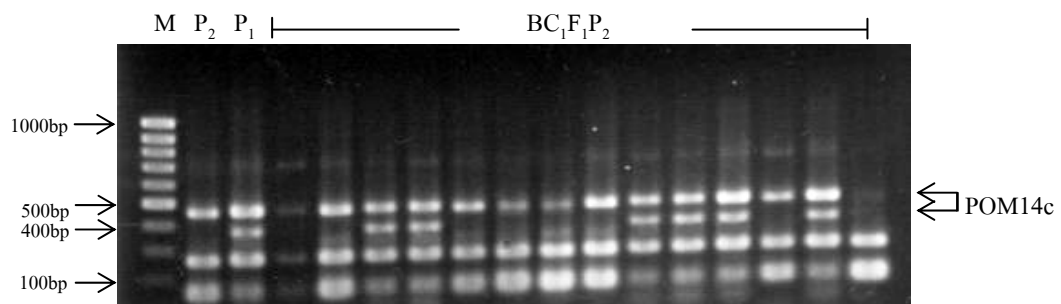
3.2 EST

เครื่องหมาย SCAR จำนวน 8 ตำแหน่ง (ตารางที่ 7) มีการปรากฏแถบ DNA แบบ dominant ทั้งหมด คือมีแถบ DNA ปรากฏใน ‘บางช้าง’ ดังนั้นเมื่อทดสอบในประชากร $BC_1F_1P_2$ ควรมีการกระจายตัวของแถบ DNA ที่ปรากฏเหมือน ‘บางช้าง’ ต่อไม่มีแถบ DNA ปรากฏเหมือน ‘PBC932’ (ภาพที่ 9) ในอัตราส่วน 1:1 ทั้งหมด 8 ตำแหน่ง

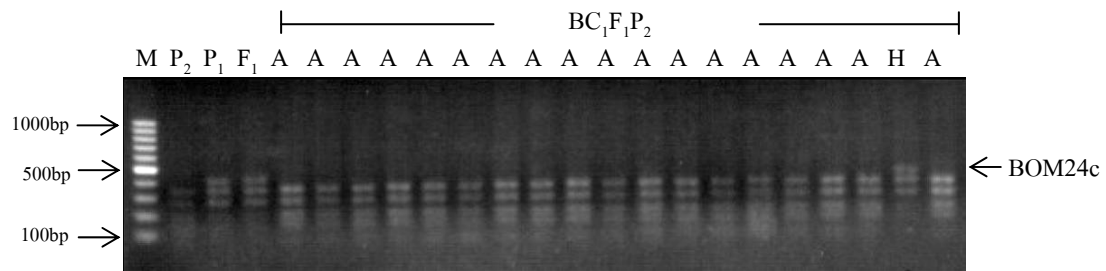
เครื่องหมาย CAPS จำนวน 3 ตำแหน่ง (ตารางที่ 8) มีการปรากฏแถบ DNA แบบ co-dominant และเมื่อทดสอบในประชากร $BC_1F_1P_2$ เครื่องหมายมีการกระจายตัวของแถบ DNA ปรากฏเหมือน ‘PBC932’ ต่อมีแถบ DNA ปรากฏเหมือนทั้งใน ‘PBC932’ และ ‘บางช้าง’ (ภาพที่ 10) ในอัตราส่วน 1:1 จำนวน 2 ตำแหน่ง ส่วนอีก 1 ตำแหน่ง มีการกระจายตัวในอัตราส่วนไม่เป็น 1:1 (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 9 การกระจายตัวของ sequence-characterized amplified region (SCAR) ที่ตำแหน่ง BOM18 ใน
พริก ‘บางช้าง’ (P_1) ‘PBC932’ (P_2) F_1 และประชากร $BC_1F_1P_2$; M คือ molecular weight marker
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas, Canada)



ภาพที่ 10 การกระจายตัวของ cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) ที่ตำแหน่ง POM14c
ในพริก ‘PBC932’ (P_2) ‘บางช้าง’ (P_1) และประชากร $BC_1F_1P_2$; M คือ molecular weight
marker GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas, Canada)



A คือไม่มีแถบ DNA ปรากฏเหมือน ‘PBC932’

H คือมีแถบ DNA ปรากฏเหมือน ‘บางช้าง’

ภาพที่ 11 การกระจายตัวของ CAPS BOM24c ที่ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 1:1 ของการปรากฏแถบ DNA และไม่ปรากฏแถบ DNA ในประชากร $BC_1F_1P_2$; P_2 คือ ‘PBC932’ P_1 คือ ‘บางช้าง’; M คือ molecular weight marker GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas, Canada)

ตารางที่ 7 การกระจายตัวของ DNA เครื่องหมาย sequence-characterized amplified region จำนวน 8 ตำแหน่ง ในพริกประชากร $BC_1F_1P_2$ ($P_2 \times F_1$)

SCAR	จำนวนต้นที่ทดสอบ	จำนวนต้น		Mendelian ratio	χ^2	Prob.
		H	A			
POM16	133	57	76	1 : 1	2.71	0.010
BOM18	113	56	57	1 : 1	0.01	0.920
POM18-2	110	55	55	1 : 1	0.00	1
BOM25-1	124	62	62	1 : 1	0.00	1
BOM25-2	140	70	70	1 : 1	0.00	1
BOM4	140	69	71	1 : 1	0.03	0.862
BOM32	114	57	57	1 : 1	0.00	1
CA44	116	50	66	1 : 1	2.21	0.137

A คือไม่มีแถบ DNA ปรากฏเหมือน ‘PBC932’

H คือมีแถบ DNA ปรากฏเหมือน ‘บางช้าง’

ตารางที่ 8 การกระจายตัวของ DNA เครื่องหมาย cleaved amplified polymorphic sequence จำนวน 3 ตำแหน่ง ในพริกประชากร BC₁F₁P₂ (P₂ x F₁)

CAPS	จำนวนต้นที่	จำนวนต้น		Mendelian ratio	χ^2	Prob.
	ทดสอบ	H	A			
POM9c	90	45	45	1 : 1	0.00	1
BOM24c	133	14	119	1 : 1	82.89	0*
POM14c	133	56	77	1 : 1	3.32	0.068

A คือมีแถบ DNA ปรากฏเหมือน 'PBC932'

H คือมีแถบ DNA ปรากฏเหมือน 'PBC932' และ 'บางช้าง'

* คือมีความแตกต่างทางสถิติ

4. การวิเคราะห์แผนที่กลุ่มลิงค์เกจ

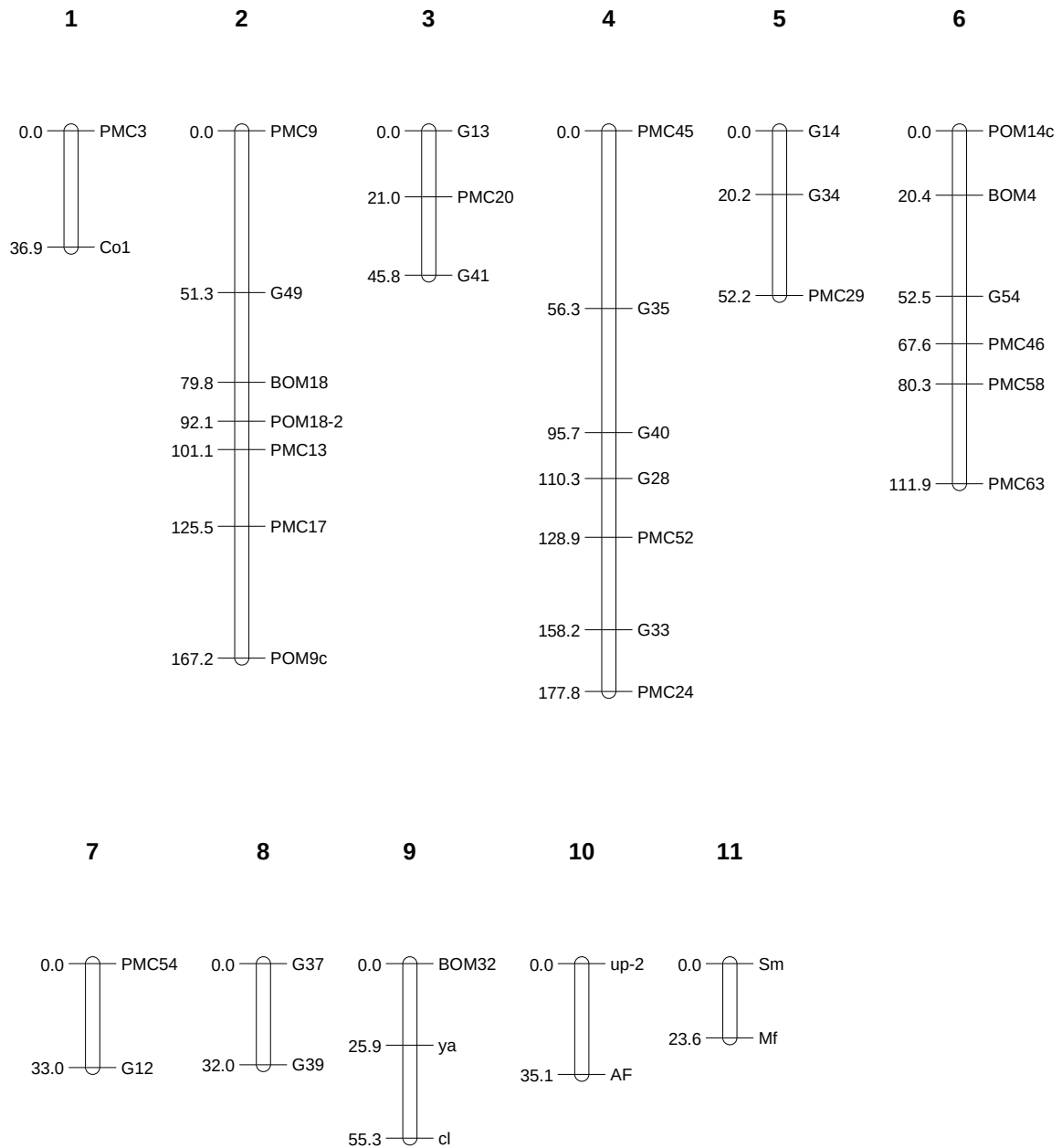
จำนวนเครื่องหมายทั้งหมดจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ DNA เครื่องหมาย จำนวน 53 ตำแหน่ง (ตารางที่ 9) และลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริกกระยะผลเขียว (*coI*) นำไปใช้ในการสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจ

ตารางที่ 9 เครื่องหมายที่นำไปใช้ในการสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจที่ได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ DNA เครื่องหมาย

ชนิดของเครื่องหมาย	จำนวน เครื่องหมายทั้งหมด	เครื่องหมายที่นำไปใช้สร้างแผนที่
ลักษณะสัณฐานวิทยา	8	8
STMS	139	35
SCAR	8	8
CAPS	3	2
รวม	158	53

เมื่อนำเครื่องหมาย ทั้งหมด 53 ตำแหน่ง มาวิเคราะห์การสร้างกลุ่มลิงค์เกจโดยใช้โปรแกรม MAPMAKER version3 (Lander *et al.*, 1987) ใช้ mapping function ของ Kosambi กำหนดค่า LOD มีค่าเท่ากับ 4 และ recombination เท่ากับ 40% สามารถสร้างกลุ่มลิงค์เกจได้ 11 กลุ่ม (ภาพที่ 12) ซึ่งครอบคลุมระยะทาง 770.8 cM และมีเครื่องหมายที่ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มลิงค์เกจได้จำนวน 15 ตำแหน่ง ดังนี้ PMC7 PMC21 PMC33 G1 G5 G10 G25 G50 G60 POM16 BOM25-1 BOM25-2 CA44 *StL* และ *A*

จากการสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจเพื่อวางตำแหน่งของยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริก ระยะผลเขียว และค้นหาตำแหน่งของเครื่องหมาย ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริกระยะผลเขียว พบว่าจากการสร้างแผนที่สามารถวางตำแหน่งของยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริกระยะผลเขียว (*co1*) ได้ อยู่ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 1 โดยมีเครื่องหมายชนิด STMS ที่ตำแหน่ง PMC3 ซึ่งเป็นตำแหน่งของ Microsatellite DNA อยู่ห่างจากตำแหน่งของยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริกระยะผลเขียว 36.9 cM



ภาพที่ 12 แผนพิกัดกลุ่มลิงก์เกจของฟริก ที่ได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ DNA เครื่องหมาย เพื่อหาความสัมพันธ์กับตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนสใน ฟริกยะยะผลเขียว (*coI*)

5. การวิเคราะห์ QTL

ได้วิเคราะห์ QTL 2 แบบ คือ 1) single point analysis 2) interval mapping เพื่อหาตำแหน่งของเครื่องหมาย ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริกระยะผลเขียว โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ MapQTL® ในประชากรพริก BC₁F₁P₂ กับ DNA เครื่องหมายชนิด STMS SCAR CAPS และ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งหมด 74 ตำแหน่ง ผลการวิเคราะห์ single point analysis พบว่ามี DNA เครื่องหมายจำนวน 11 ตำแหน่ง กับ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทาน โดยที่ 6 ตำแหน่ง ได้แก่ STMS PMC19 G6 G28 G31 SCAR POM18-2 และ CRAPS BOM24c มีความสัมพันธ์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % อีก 5 ตำแหน่ง STMS PMC3 PMC13 PMC17 PMC20 G41 และลักษณะความยาวของยอดเกสรเพศเมีย มีความสัมพันธ์ที่ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 99% (ตารางที่ 10)

ใน 12 ตำแหน่งของเครื่องหมายที่พบมีความสัมพันธ์เชิงปริมาณกับลักษณะต้านทาน พบว่า 7 ตำแหน่ง อยู่ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 1 2 3 และ 4 ที่เหลืออีก 5 ตำแหน่ง ยังไม่สามารถจัดกลุ่มได้ (ตารางที่ 10)

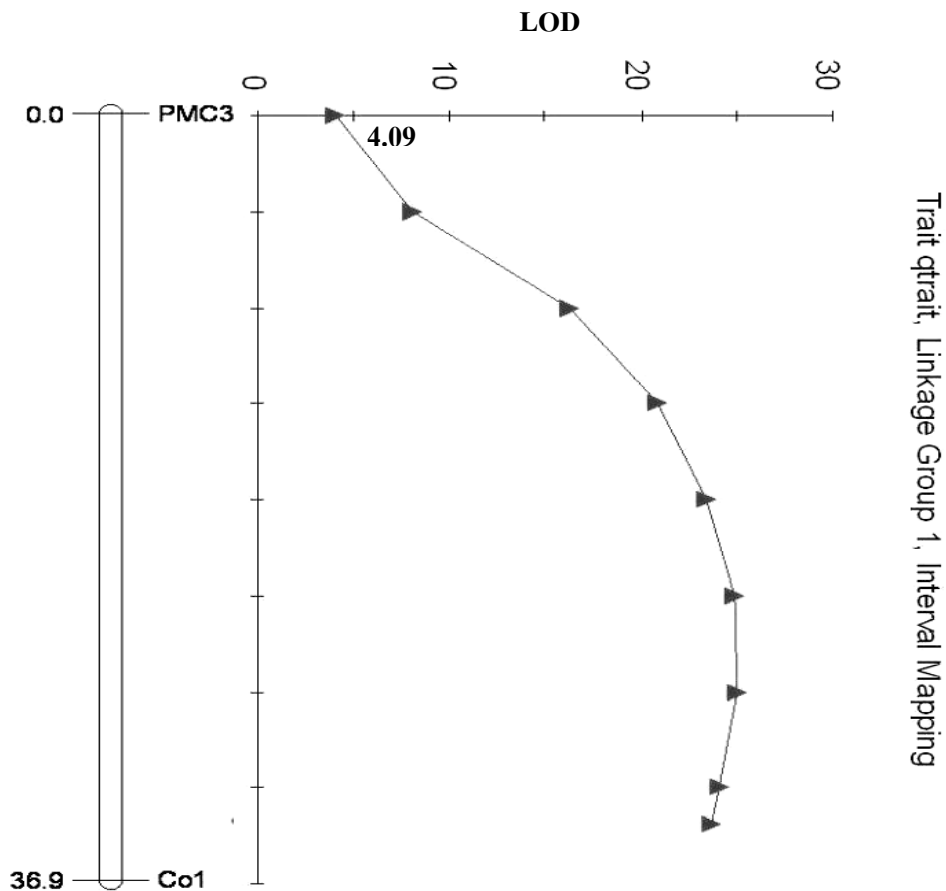
สำหรับการวิเคราะห์ interval mapping พบว่า DNA เครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานมากที่สุด ได้แก่ STMS PMC3 ซึ่งอยู่ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 1 มีระดับความน่าเชื่อมั่นที่ค่า LOD เท่ากับ 4.09 (ภาพที่ 13) ส่วนเครื่องหมายที่วางอยู่ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 2 3 และ 4 จัดว่ายังมีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานที่ระดับความน่าเชื่อมั่นน้อย ดังนี้ STMS PMC13 PMC17 และ SCAR POM18-2 ซึ่งวางอยู่ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 2 เป็นบริเวณที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะ QTL ที่ค่า LOD เท่ากับ 0.53 1.33 และ 0.48 ตามลำดับ เครื่องหมาย STMS PMC20 และ G41 ที่วางอยู่ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 3 พบว่าเป็นมีความสัมพันธ์กับลักษณะ QTL ที่ค่า LOD เท่ากับ 1.07 และ 0.88 ตามลำดับ และเครื่องหมาย STMS G28 ที่วางอยู่ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 4 พบว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะ QTL ที่ค่า LOD 0.73 (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 เครื่องหมายที่เกี่ยวข้องกับลักษณะเชิงปริมาณ ของลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนสใน
พริกกระยะผลเขียว

ชนิดของเครื่องหมาย	ตำแหน่งยีน/ เครื่องหมาย	<i>P-value</i>	LOD	ตำแหน่งของเครื่องหมาย
STMS	PMC3	0.0001	4.09	linkage group ที่ 1
STMS	POM18-2	0.05	0.48	linkage group ที่ 2
STMS	PMC13	0.01	0.53	linkage group ที่ 2
SCAR	PMC17	0.005	1.33	linkage group ที่ 2
STMS	PMC20	0.01	1.07	linkage group ที่ 3
STMS	G41	0.05	0.88	linkage group ที่ 3
STMS	G28	0.05	0.73	linkage group ที่ 4
STMS	PMC19	0.05	-	unmapped
STMS	G6	0.05	-	unmapped
STMS	G31	0.05	-	unmapped
CAPS	BOM24c	0.05	-	unmapped
ลักษณะพื้นฐานวิทยา	<i>StL</i>	0.001	-	unmapped

ค่า *P-value* ที่ 0.05 มีความสัมพันธ์กับลักษณะ QTL ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ค่า *P-value* ที่ 0.01- 0.0001 มีความสัมพันธ์กับลักษณะ QTL ที่ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 99%



ภาพที่ 13 ค่า LOD ของ DNA เครื่องหมาย PMC3 ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะ QTL ของยืนต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริกกระยะผลเขียว ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 1

การทดลองที่ 2 การค้นหา DNA เครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนส โดยใช้เทคนิค bulked segregant analysis (BSA) ร่วมกับเทคนิค amplified fragment length polymorphisms (AFLP)

1. การคัดเลือกต้นพริกเพื่อใช้ในการสร้าง bulk R และ bulk S

คัดเลือกต้นต้านทาน (R) ที่มีระดับการเกิดโรค 0% จากประชากร $BC_1F_1P_2$ จำนวน 10 ต้น (bulk R) และคัดเลือกต้นอ่อนแอ (S) จากประชากร $BC_1F_2P_1$ ทั้งหมด 15 สายพันธุ์ (line) ที่พบว่า 5 สายพันธุ์มีการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรค และอีก 10 สายพันธุ์แสดงลักษณะอ่อนแอทั้งหมด จึงคัดเลือกต้นอ่อนแอจำนวน 10 ต้น (bulk S) จาก 5 สายพันธุ์ที่แสดงลักษณะอ่อนแอทั้งหมด ได้แก่สาย

พันธุ์ที่ 1, 4, 6, 9 และ 10 จำนวนสายพันธุ์ละ 2, 1, 2, 3 และ 2 ต้น ตามลำดับ เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มีความสม่ำเสมอของลักษณะอ่อนแอในทุกต้น (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 การเกิดโรคแอนแทรคโนสในประชากร BC₁F₂P₁ และคัดเลือกต้นพริกที่คาดว่าไม่มีจีโนไทป์ *Co1Co1* มาใช้ใน BSA

BC ₁ F ₂ P ₁	จน. ต้นทั้งหมด	ระดับการเกิดโรค	จำนวนต้น		ต้นที่ใช้สร้าง bulk S	
			R	S	จน. ต้น	ระดับการเกิดโรค
line ที่ 1	26	15-40%		26	2	30-40%
line ที่ 2	38	0-60%	2	36		
line ที่ 3	34	15-60%		34		
line ที่ 4	22	15-50%		22	1	30-40%
line ที่ 5	17	0-40%	3	14		
line ที่ 6	19	10-50%		19	2	30-40%
line ที่ 7	29	0-40%	3	26		
line ที่ 8	21	10-50%		21		
line ที่ 9	24	10-40%		24	3	30-40%
line ที่ 10	16	15-100%		16	2	30-40%
line ที่ 11	28	0-45%	2	26		
line ที่ 12	24	1-40%		24		
line ที่ 13	32	0-40%	1	31		
line ที่ 14	22	1-35%		22		
line ที่ 15	30	1-55%		30		

2. การแยกความแตกต่างของ DNA bulk ด้วยเทคนิค AFLP

การแยกความแตกต่างของ DNA bulk โดยใช้ AFLP จำนวน 51 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามี 21 คู่ไพรเมอร์ ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง bulk R และ bulk S ได้ โดยได้เครื่องหมาย AFLP ทั้งหมด 36 ตำแหน่ง ซึ่งมี 22 ตำแหน่งที่ปรากฏแถบ DNA ใน bulk R และจำนวน 14 ตำแหน่งมีแถบ DNA ปรากฏใน bulk S (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 AFLP 36 ตำแหน่ง ที่ได้จาก bulked segregant analysis (BSA)

เครื่องหมายที่	PCR I		PCR II		ขนาดแถบ DNA (bp)	
	ER ^{1/}	MS ^{2/}	ER ^{1/}	MS ^{2/}	bulk R	bulk S
1	T	A	AAC	ACT	300	-
2	T	A	AAC	AGG	400	-
3					300	-
4					-	200
5	T	A	ACA	ACT	300	-
6					250	-
7	T	A	ACA	ACG	250	-
8	T	A	ACA	AGG	400	-
9					250	-
10					-	300
11					-	200
12	T	A	TAC	ACG	300	-
13	T	A	TAC	AGG	250	-
14	T	A	CTA	ACC	-	400
15					-	120
16	T	A	CTA	ACG	300	-
17	T	A	CTA	AGG	200	-
18					-	250
19	T	A	AGC	ACT	-	250
20					-	100
21	T	A	AGC	ACG	300	-
22					-	400
23	T	A	ACC	ACC	250	-
24					-	200
25	T	A	AAG	AGG	250	-
26	A	T	AAC	TAC	300	-
27	A	T	ACA	TAG	400	-
28					-	300
29					-	250
30	A	T	TAC	TAC	250	-
31	A	T	CTA	TAG	250	-

ตารางที่ 12 (ต่อ)

เครื่องหมายที่	PCR I		PCR II		ขนาดแถบ DNA (bp)	
	ER ^{1/}	MS ^{2/}	ER ^{1/}	MS ^{2/}	bulk R	bulk S
32					200	-
33	A	T	CTA	TAC	-	250
34					-	150
35	A	C	TCG	CAG	300	-
36					250	-

^{1/} primer ด้านที่ต่อกับชิ้นส่วน DNA ที่ถูกตัดด้วย *EcoRI*

^{2/} primer ด้านที่ต่อกับชิ้นส่วน DNA ที่ถูกตัดด้วย *Tru1I*

- คือไม่ปรากฏแถบ DNA

3. การทดสอบ DNA เครื่องหมาย ที่ได้จาก BSA

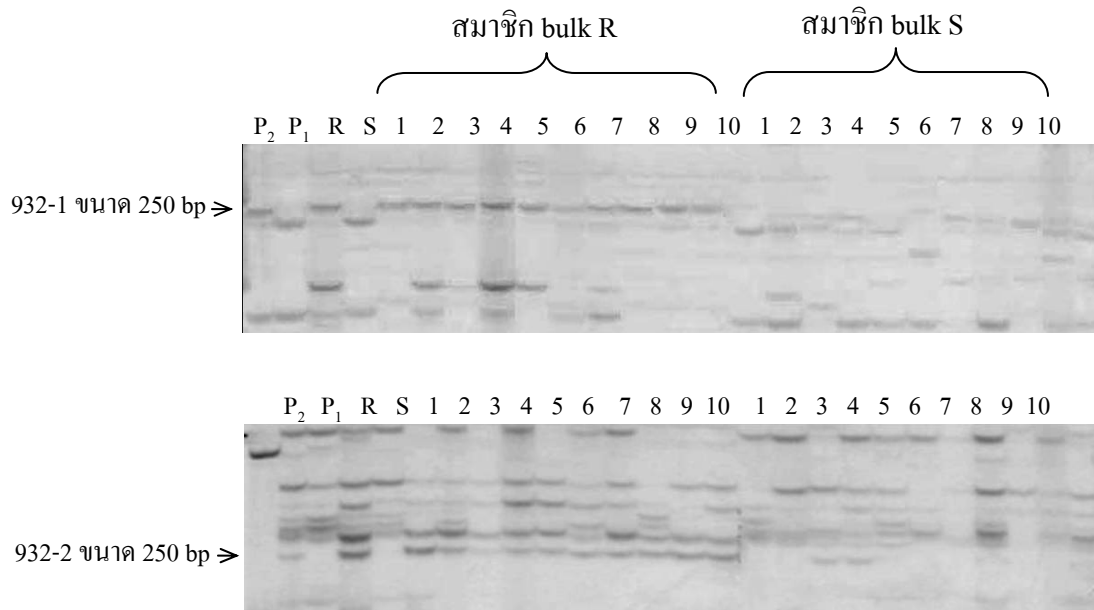
ทดสอบ AFLP 36 ตำแหน่ง ที่ได้จาก BSA มาทดสอบกับ DNA ที่เป็นสมาชิกของ DNA bulk ทั้ง 2 bulk พบว่ามีเพียง 2 ตำแหน่ง ให้ชื่อว่า 932-1 และ 932-2 (ตารางที่ 13) พบแถบเครื่องหมาย 932-1 ปรากฏในทุกต้นของ bulk R และไม่พบแถบ DNA ในทุกต้นของ bulk S ส่วนเครื่องหมาย 932-2 มีแถบ DNA ปรากฏในทุกต้นของ bulk R แต่พบแถบ DNA ปรากฏใน bulk S จำนวน 2 ต้น (ภาพที่ 14)

ตารางที่ 13 การทดสอบเครื่องหมาย 932-1 และ 932-2 ในสมาชิกกลุ่ม bulk

เครื่องหมาย	PCRI		PCRII		จำนวนแถบ DNA ที่ปรากฏ		ขนาด (bp)	% ความถูกต้องของ แถบ DNA กับจีโนมไทป์
	ER ^{1/}	MS ^{2/}	ER ^{1/}	MS ^{2/}	bulk R	bulk S		
932-1	T	A	ACA	ACG	10	0	250	100
932-2	T	A	AAG	AGG	10	2	250	80

^{1/} primer ด้านที่ต่อกับ DNA fragment ที่ถูกตัดด้วย *EcoRI*

^{2/} primer ด้านที่ต่อกับ DNA fragment ที่ถูกตัดด้วย *Tru1I*



ภาพที่ 14 เครื่องหมาย AFLP 932-1 และ 932-2 ในพริก ‘PBC932’ (P₂) ‘บางช้าง’ (P₁) bulk R (R) bulk S (S) และสมาชิก bulk R และ bulk S

4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมาย AFLP และการออกแบบ SCAR ไพรมเมอร์

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมาย AFLP 932-1 และ 932-2 พบว่า เครื่องหมาย 932-1 มีขนาด 233 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 15) และเครื่องหมาย 932-2 มีขนาด 217 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 16)

5'

```

1  GTCATGTTTT ATGTCCATTG TCGATACTTA GTCATCGTAT CTATATGTGG
51  TTGTGCATAT GTTTATTACT GAACTTTTGT AAATGCATTA TTTTTCCT
101 TTCCTTGGGT TGCATACTAG TACTTATTGT ACAAACCGTC CCTGGATACT
151 ACA TCATTTTC ATGATGTAAT TTTTGAGAGA TTTTCTTGTG ATCTTATGCA
201 GTGTTAGGTG GGTTGGTACT CCTATTTATC AAC 3'
  
```

ภาพที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเครื่องหมาย AFLP 932-2 ขนาด 233 bp และตำแหน่ง SCAR ไพรมเมอร์ ที่ออกแบบได้ (ในกรอบ)

5'

```

1  ACTGTTTTCT AGTATACAAG CAACCATCCA GGCTTCATAC CTGGGACAAT
51  AGTCATGTAC GTAGATGGAT AAACTCAACT ACAAATGATG TTCAGAAAAA
101 TTTGAGCCTT TGCTTTGAAA ACATTCATCT ATATACCCCT TTTGGTGGTC
151 TCCCAATGAA CCTTGTTGCA AGGACATAGC TTCTCTGCCA TCCAAATCCC
201 CGATTCATAC CCTATTG 3'

```

ภาพที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของเครื่องหมาย AFLP 932-1 ขนาด 217 bp และตำแหน่ง SCAR ไพร์เมอร์ ที่ออกแบบได้ (ในกรอบ)

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบส เพื่อออกแบบไพร์เมอร์ ด้วย Prime3 (Rozen *et al.*, 2000) โดยคู่ไพร์เมอร์ของ 932-1 และ 932-2 ดังแสดงในตารางที่ 14 ซึ่งความยาวของขนาด product ที่คาดว่าจะได้ คือ 216 และ 169 bp ตามลำดับ

ตารางที่ 14 ลำดับเบส และคุณสมบัติของไพร์เมอร์ เครื่องหมาย SACR 932-1 และ 932-2

เครื่องหมาย	ลำดับเบสของไพร์เมอร์	ความยาว ไพร์เมอร์	T _m (°C)	% GC	ความยาว product
SCAR					
932-1	F: 5'-TCATGTTTTATGTCCATTGTCG-3'	22pb	55	36.36	216 bp
	R: 5'-ACCAACCCACCTAACACTGC-3'	20bp		55.00	
932-2	F: 5'-AGGCTTCATACCTGGGACAA-3'	20bp	55	50.00	169 bp
	R: 5'-GATTTGGATGGCAGAGAAGC-3'	20bp		50.00	

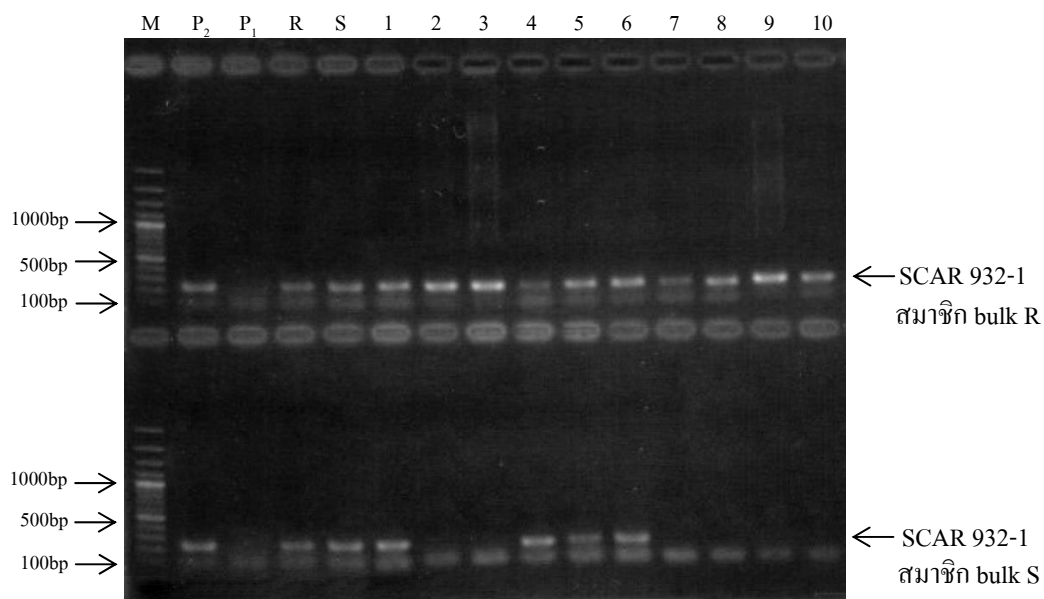
F คือลำดับเบสของไพร์เมอร์ที่เข้าจับกับ DNA ด้าน 3' - 5'

R คือลำดับเบสของไพร์เมอร์ที่เข้าจับกับ DNA ด้าน 5' - 3'

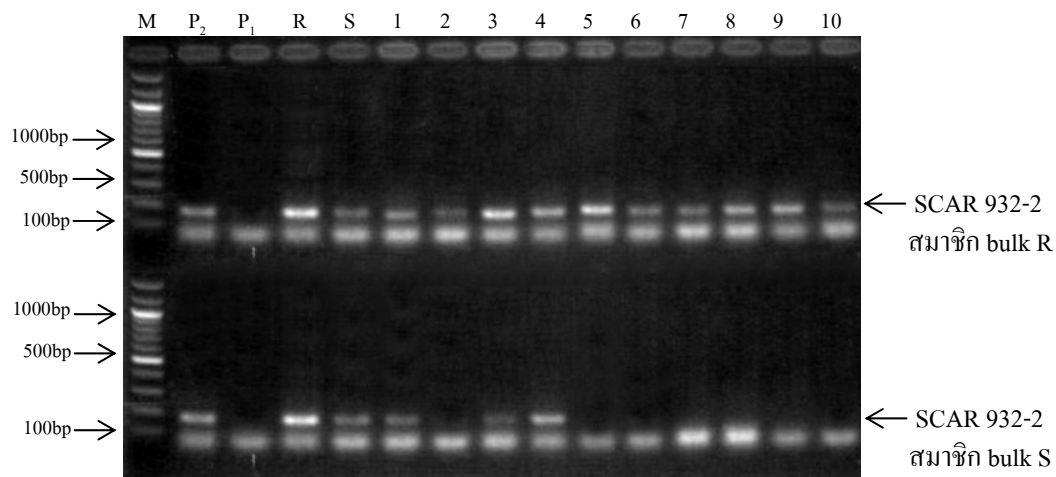
5. การทดสอบเครื่องหมาย SCAR 932-1 และ 932-2 ในสมาชิก bulk

ภายหลังจากการพัฒนาเครื่องหมาย AFLP ให้เป็น SCAR ได้ตรวจสอบการปรากฏแถบเครื่องหมาย SCAR ที่ได้ กับ DNA ที่เป็นสมาชิก bulk R และ bulk S ว่ามีความสอดคล้องกับ AFLP เดิม พบว่า SCAR 932-1 ปรากฏแถบ DNA ทุกต้นใน bulk R และปรากฏแถบ DNA 4 ต้น ใน bulk S ซึ่งแถบ DNA ที่ปรากฏใน 4 ต้น ของ bulk S ไม่สอดคล้องกับ AFLP เดิม (AFLP เดิมปรากฏแถบ DNA ใน bulk

R ทุกต้น และไม่ปรากฏแถบ DNA ใน bulk S ทุกต้น) (ภาพที่ 17) ส่วน SCAR 932-2 มีแถบ DNA ปรากฏในทุกต้นของ bulk R และมีแถบ DNA ปรากฏใน bulk S จำนวน 3 ต้น คือต้นที่ 1, 3 และ 4 ซึ่งแถบ DNA ที่ปรากฏใน bulk S มีเพิ่มจากเดิม 1 ต้น (AFLP เดิมมีแถบ DNA ปรากฏใน bulk R ทุกต้น และมีแถบ DNA ปรากฏใน bulk S 2 ต้น คือต้นที่ 3 และ 4) (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 17 แถบเครื่องหมาย SCAR 932-1 ในพริก ‘PBC932’ (P₂) ‘บางช้าง’ (P₁) bulk R (R) bulk S (S) และสมาชิก bulk; ; M คือ molecular weight marker GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Canada)



ภาพที่ 18 แถบเครื่องหมาย SCAR 932-2 ในพริก ‘PBC932’ (P_2) ‘บางช้าง’ (P_1) bulk R (R) bulk S (S) และสมาชิก bulk; ; M คือ molecular weight marker GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas, Canada)

6. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง SCAR 932-1 และ 932-2 กับลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริกกระยะผลเขียว

นำ SCAR 932-1 และ SCAR 932-2 ไปทดสอบในประชากร F_2 (‘บางช้าง’ x ‘PBC932’) จำนวน 96 ต้น พบว่า SCAR ทั้ง 2 มีการกระจายตัวของการมีแถบ DNA ปรากฏเหมือน ‘PBC932’ ต่อไม่มีแถบ DNA ปรากฏเหมือน ‘บางช้าง’ ในอัตราส่วน 3: 1 (ตารางที่ 15) ซึ่งเครื่องหมายมีลักษณะการกระจายตัวแบบ dominant ซึ่งในประชากร F_2 ย่อมมีการกระจายตัวในอัตราส่วน 3: 1 เป็นไปตามกฎของเมนเดล

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง SCAR 932-1 และ SCAR 932-2 กับลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริกกระยะผลเขียว โดยการนับจำนวน recombination frequency พบว่าต้นที่มีลักษณะต้านทานซึ่งมี 25 ต้น มีแถบ SCAR 932-1 ปรากฏ 21 ต้น และมีแถบ SCAR 932-2 ปรากฏ 17 ต้น (ตารางที่ 16) เนื่องจาก SCAR เป็นเครื่องหมายแบบ dominant ที่มีความสัมพันธ์กับ recessive allele ของลักษณะต้านทาน คือ *col* จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง heterozygous และ homozygous จีโนไทป์ (*Colcol* และ *Co1Co1*) ของฟีโนไทป์อ่อนแอได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถตรวจสอบ recombination frequency ของประชากร F_2 ทั้งหมดได้ การหาความสัมพันธ์ในครั้งนี้วิเคราะห์ได้เฉพาะ

ต้นด้านทานเท่านั้น ซึ่งพบว่า SCAR 932-1 และ 932-2 มีความสัมพันธ์กับลักษณะด้านทาน 84 และ 68% ตามลำดับ

ตารางที่ 15 การกระจายตัวของ SCAR 932-1 และ SCAR 932-2 ในประชากร F_2 ('บางช้าง' x 'PBC932') จำนวน 96 ต้น

DNA เครื่องหมาย	จำนวนต้น		อัตราส่วนที่คาดหวัง (- : +)	χ^2	Prob.
	-	+			
SCAR 932-1	22	74	1:3	0.222	0.6375
SCAR 932-2	25	71	1:3	0.055	0.8145

- คือไม่มีแถบ DNA ปรากฏ

+ คือมีแถบ DNA ปรากฏ

ตารางที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่าง SCAR 932-1 และ SCAR 932-2 กับลักษณะความต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริกกระยะผลเขียว ในพริกประชากร F_2 ('บางช้าง' x 'PBC932') จำนวน 96 ต้น

DNA เครื่องหมาย	จำนวนต้น				% ความสัมพันธ์กับจีโนไทป์ ของลักษณะต้านทาน
	ต้นที่แสดงลักษณะต้านทาน		ต้นที่แสดงลักษณะอ่อนแอ		
	-	+	-	+	
SCAR 932-1	4	21	18	53	84
SCAR 932-2	8	17	17	54	68

- คือไม่มีแถบ DNA ปรากฏ

+ คือมีแถบ DNA ปรากฏ

วิจารณ์

การทดลองที่ 1 การสร้างแผนที่ยืนเพื่อหาตำแหน่งของยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริก

1. ประชากรที่ใช้ในการสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจ

การนำประชากรพริกลูกผสมกลับ $BC_1F_1P_2$ มาใช้สร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจพบว่า DNA เครื่องหมายเพียง 1 ตำแหน่งที่ไม่มีการกระจายตัว แสดงให้เห็นว่าการใช้พริกลูกผสมกลับไปยังพริกสายพันธุ์ 'PBC932' สามารถแก้ไขปัญหากลุ่มลิงค์เกจที่ไม่กระจายตัวของ DNA เครื่องหมายได้ ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ใช้พริกประชากร F_2 ในการสร้างแผนที่ พบว่ามี DNA เครื่องหมายจำนวนมากถึง 80% ไม่มีการกระจายตัว (พรศักดิ์ ภักดีวารภรณ์, ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์)

การใช้พริกประชากรลูกผสมกลับ $BC_1F_1P_2$ พบว่ามี DNA เครื่องหมายประมาณ 45% จาก STMS และ CAPS มีการกระจายตัวของแถบ DNA ที่ปรากฏเหมือน 'PBC932' ต่อมีแถบ DNA ปรากฏเหมือนทั้งใน 'PBC932' และ 'บางช้าง' ในอัตราส่วนไม่เป็น 1:1 ตามที่ควรจะเป็นในประชากร $BC_1F_1P_2$ ซึ่งเครื่องหมายที่มีการกระจายตัวผิดปกตินี้ไม่สามารถนำไปใช้ในการสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจได้ การที่เครื่องหมายมีการกระจายตัวไม่เป็นไปตามกฎของเมนเดลอาจเป็นเพราะ 'PBC932' ไม่ใช่สายพันธุ์แท้ จึงมีความเป็น heterozygosity สูง ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะการเกิดโรคในลูกผสม F_1 ที่ไม่สม่ำเสมอ ซึ่งประชากร $BC_1F_1P_2$ นี้สร้างจาก F_1 หลายต้น ดังนั้นเมื่อนำ F_1 จากต่างต้นกันมาใช้ในการผสมกลับไปยัง 'PBC932' ทำให้ได้ประชากร $BC_1F_1P_2$ ที่มีการกระจายตัวของเครื่องหมายผิดปกติ

2. แผนที่กลุ่มลิงค์เกจ

แผนที่กลุ่มลิงค์เกจที่ได้ครั้งนี้ ประกอบด้วยกลุ่มลิงค์เกจขนาดเล็กจำนวน 11 กลุ่ม ครอบคลุมระยะทาง 770.8 cM ที่สร้างจาก DNA เครื่องหมาย และลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำนวน 53 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นแผนที่ที่มีขนาดเล็กยังไม่ครอบคลุมทั้งจีโนม สังเกตได้จากกลุ่มลิงค์เกจที่ได้มีจำนวนไม่เท่ากับจำนวนโครโมโซมของพริก และยังมีเครื่องหมายที่ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มลิงค์เกจได้ 15 ตำแหน่ง ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนเครื่องหมายที่ได้ยังมีจำนวนน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาการสร้างแผนที่ในพริกที่ผ่านมา ต้องใช้เครื่องหมายมากกว่า 200 ตำแหน่งขึ้นไป เช่นแผนที่ของ Kang *et al.* (2001) ประกอบด้วย RFLP 150 ตำแหน่ง และ AFLP 430 ตำแหน่ง จึงได้แผนที่ครอบคลุม 1,320 cM แผนที่ของ Chaim *et al.* (2001) ประกอบด้วย RFLP, AFLP, RAPD และลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมทั้งหมด 177 ตำแหน่ง จึง

ได้แผนที่ครอบคลุม 1,740 cM และจากแผนที่ของ Voorrips *et al.* (2004) ที่สร้างจาก AFLP 249 ตำแหน่ง SSR 11 ตำแหน่ง และ RGA 6 ตำแหน่ง รวมทั้งหมด 266 ตำแหน่ง สร้างแผนที่ครอบคลุม 1,060 cM

จากแผนที่ที่สร้างได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบเครื่องหมาย STMS PMC3 ที่อยู่ใกล้ยีน *co1* มากที่สุดประมาณ 36.9 cM ซึ่งยังไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกได้ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการค้นหา DNA เครื่องหมายที่ใกล้ชิดกับยีนมากกว่านี้ โดยใช้เทคนิค BSA ร่วมกับเทคนิค AFLP เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สะดวก และรวดเร็ว

3. การวิเคราะห์ QTL

ตำแหน่งที่มีอิทธิพลต่อ QTL ของลักษณะด้านทานมากที่สุด คือเครื่องหมาย STMS PMC3 ส่วนเครื่องหมาย STMS PMC17 และลักษณะความยาวของยอดเกสรเพศเมีย ถึงแม้จากการวิเคราะห์จะมีความสัมพันธ์กับลักษณะด้านทานไม่มากนัก แต่เป็นตำแหน่งที่น่าสนใจ ซึ่งในอนาคตควรนำเครื่องหมายทั้ง 3 ไปทดสอบความสัมพันธ์กับลักษณะด้านทานในประชากรอื่นๆ ต่อไป เพื่อทดสอบประสิทธิภาพและความถูกต้องของเครื่องหมาย

การทดลองที่ 2 การค้นหา DNA เครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะด้านทานโรคแอนแทรคโนส โดยใช้เทคนิค bulked segregant analysis (BSA) ร่วมกับเทคนิค amplified fragment length polymorphisms (AFLP)

การใช้เทคนิค BSA ร่วมกับเทคนิค AFLP ในการพัฒนา DNA เครื่องหมาย เป็นเทคนิคที่สามารถช่วยในการค้นหา DNA เครื่องหมายได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งจากการทดลองภายในระยะเวลา 3 เดือน สามารถพัฒนาเครื่องหมาย SCAR ได้ 2 ตำแหน่ง หากเพิ่มระยะเวลาอาจช่วยให้พัฒนาเครื่องหมายได้จำนวนมากขึ้น

การทดสอบ SCAR 932-1 และ 932-2 กับ DNA ที่เป็นสมาชิก bulk R และ bulk S ภายหลังการแปลงเครื่องหมายจาก AFLP 932-1 และ 932-2 พบว่าการปรากฏแถบของ SCAR ทั้ง 2 ไม่สอดคล้องกับเครื่องหมาย AFLP เดิมในบางต้น ซึ่งน่าจะเป็นเพราะว่าแถบ AFLP เดิมของต้นนั้นปรากฏไม่ชัดเจน

SCAR 932-1 และ SCAR 932-2 แสดงความสัมพันธ์กับจีโนไทป์ลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริกระยะผลเขียว จากการทดสอบในพริกประชากร F_2 ประมาณ 84 และ 68% ตามลำดับ แต่ยังไม่สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ได้ เพราะไม่สามารถตรวจสอบ recombination frequency ของทั้งประชากรได้ ซึ่งเป็นข้อจำกัดของเครื่องหมายแบบ dominant ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง homozygous กับ heterozygous ของลักษณะอ่อนแอได้ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติม โดยใช้เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Botstein *et al.*, 1980) โดยใช้ SCAR 932-1 และ 932-2 เป็น probe อาจช่วยให้แยกความแตกต่างของจีโนไทป์ที่เป็น homozygous กับ heterozygous ได้

จากการศึกษาครั้งนี้ยังไม่ได้เครื่องหมายที่จะสามารถใช้คัดเลือกลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนสได้ จึงควรมีการพัฒนาต่อไป โดยใช้แนวทาง BSA ร่วมกับข้อมูลที่ได้จากการสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจ (PMC3) มาช่วยในการคัดเลือกจีโนไทป์สร้าง DNA bulk เพื่อค้นหาเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนสต่อไป

สรุป

1. สามารถสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจได้จำนวน 11 กลุ่ม ซึ่งประกอบด้วยเครื่องหมาย STMS 26 ตำแหน่ง EST 6 ตำแหน่ง และลักษณะทางสัณฐานวิทยา 6 ตำแหน่ง ครอบคลุมระยะทาง 770.8 cM และมีเครื่องหมายที่ไม่สามารถจัดอยู่ในกลุ่มลิงค์เกจได้ 15 ตำแหน่ง คือ PMC7 PMC21 PMC33 G1 G5 G10 G25 G50 G60 POM16 BOM25-1 BOM25-2 CA44 *StL* และ *A*
2. การสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจสามารถวางตำแหน่งของยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริก ระยะผลเขียว (*col*) ได้ อยู่ในกลุ่มลิงค์เกจที่ 1 โดยมีเครื่องหมาย STMS PMC3 อยู่ห่างจากยีน *col* 36.9 cM นอกจากนี้เครื่องหมาย PMC3 ยังเป็นตำแหน่งที่มีอิทธิพลต่อ QTL ของลักษณะต้านทานมากที่สุด ที่ค่า LOD เท่ากับ 4.09 ($P = 0.0001$) มีระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 99%
3. DNA เครื่องหมาย SCAR 932-1 และ SCAR 932-2 ที่ได้การใช้เทคนิค BSA ร่วมกับเทคนิค AFLP มีความสัมพันธ์กับจีโนไทป์ *colcol* ของลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนสในพริก ระยะผลเขียวประมาณ 84 และ 68% ตามลำดับ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมศุลกากร. 2550. **พริกและเครื่องเทศ**. แหล่งที่มา:

[//http://www.customs.go.th/Statistic/StatisticResult2550](http://www.customs.go.th/Statistic/StatisticResult2550). มีนาคม. 2551.

Agrios, G.N. 1997. **Plant Diseases Caused by Fungi**. San Diego, USA.

AVRDC. 2003. **AVRDC Progress Report 2003**. Development of anthracnose-resistant lines. Thinan, Taiwan. 52-57.

AVRDC. 2004. **AVRDC Progress Report 2004**. Reselection of new sources of anthracnose resistance. Thinan, Taiwan. 25-29.

Bailey, J.A. and M.J. Jeger. 1992. **Colletotrichum Biology, Pathology and Control**. CAB International, UK.

Bassett, M.J. 1968. **Breeding Vegetable Crops**. The AVI Publishing Company, University of Florida, Gainesville, Florida.

Blum, E., K. Liu, M. Mazourek, E.Y. Yoo, M. Jahn and I. Paran. 2002. Molecular mapping of the *C* locus for presence of pungency in *Capsicum*. **Genome**. 45: 702-705.

Bonas, U. and T. Lahaye. 2002. Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. **Current Opinion in Microbiology**. 5: 44-50.

Bosland, P.W. 2006. The genes of *Capsicum*. **Horticultural Science**. 41(5): 1169-1187.

Bosland, P.W. and E.J. Votava. 1999. **Peppers: Vegetable and Spice Capsicums**. CABI Publishing, London.

- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Human Genetics**. 32: 314-331.
- Bouarte-Medina, T., E. Fogelman, E. Chani, A.R. Miller, I. Levin, D. Levy and R.E. Veilleux. 2002. Identification of molecular markers associated with lupine in reciprocal backcross families of diploid potato. **Theoretical and Applied Genetics**. 105: 1010-1018.
- Chaim, A.B., I. Paran, R.C. Grube, M. Jahn, R.v. Wijk and J. Peleman. 2001. QTL mapping of fruit-related traits in pepper (*Capsicum annuum*). **Theoretical and Applied Genetics**. 102: 1016–1028.
- Chaisrisuk, C. 2003. **Fungal Genetics**. Kasetsart University, Bangkok, Thailand.
- DeWitt, D. and P.W. Bosland. 1997. **Peppers of the World: an identification guide**. Ten Speed Press, Berkeley, California.
- Hong, D., L.P. Liu, G. Yang and Q. He. 2006. AFLP and SCAR markers linked to the suppressor gene (*Rf*) of a dominant genetic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.). **Euphytica**. 151: 401–409.
- Kanchana-udomkam, C., P.W.J. Taylor and O. Mongkolporn. 2004. Development of a bioassay to study anthracnose infection of *Capsicum chinense* Jacq. fruit caused by *Colletotrichum capsici*. **Thai Journal of Agricultural Science**. 37: 293 – 297.
- Kang, B.C., S.H. Nahm, J.H. Huh, H.S. Yoo, J.W. Yu, M.H. Lee and B.-D. Kim. 2001. An interspecific (*Capsicum annuum* x *C. chinense*) F₂ linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**. 102: 531–539.
- Kim, Y.S., J.Y. Park, K.S. Kim, M.K. Ko, S.J. Cheong and B. Oh. 2002. A thaumatin-like gene in nonclimacteric pepper fruits used as molecular marker in probing disease resistance, ripening, and sugar accumulation. **Plant Molecular Biology**. 49: 125-135.

- Ko, M.K., W.B. Jeon, K.S. Kim, H.H. Lee, H.H. Seo, Y.S. Kim and B.J. Oh. 2005. A *Colletotrichum gloeosporioides*-induced esterase gene of nonclimacteric pepper (*Capsicum annuum*) fruit during ripening plays a role in resistance against fungal infection. **Plant Molecular Biology**. 58: 529-541.
- Lander, E.S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M.J. Daly, S.E. Lincoln and L. Newburg. 1987. Mapmaker. An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**. 1: 174-181.
- Lee, S.C., J.K. Hong, Y.J. KIM and B.K. Hwang. 2000a. Pepper gene encoding thionin is differentially induced by pathogens, ethylene and methyl jasmonate. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. 56: 207-216.
- Lee, J.M., S.H. Nahm, Y.M. Kim and B.D. Kim. 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. **Theoretical and Applied Genetics**. 108: 619-627.
- Lee, S.C., Y.J. Kim and B.K. Hwang. 2001. A pathogen-induced chitin-binding protein gene from pepper: its isolation and differential expression in pepper tissues treated with pathogens, ethephon, methyl jasmonate or wounding. **Plant and Cell Physiology**. 42: 1321-1330.
- Lee, S.C., Y.K. Lee, K.D. Kim and B.K. Hwang. 2000b. In situ hybridization study of organ- and pathogen-dependent expression of a novel thionin gene in pepper (*Capsicum annuum*). **Physiologia Plantarum**. 110: 384-392.
- Lefebvre, V., A. Palloix, C. Caranta and E. Pochard. 1995. Construction of an intraspecific integrated linkage map of pepper using molecular markers and doubled-haploid progenies. **Genome**. 38: 112-121.
- Livingstone, K.D., V.K. Lackney, J.R. Blauth, R.v. Wijk and M.K. Jahn. 1999. Genome mapping in *capsicum* and the evolution of genome structure in the solanaceae. **Genetics**. 152: 1183-1202.

- Manandhar, J.B., G.L. Hartman and T.C. Wang. 1995. Anthracnose development on pepper fruits inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Disease**. 79(4): 380-383.
- Michelmore, R.W., I. Paran and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. 88: 9828-9823.
- Mongkolporn, O., Y. Dokmaihom, C. Kanchana-Udomkan and P. Pakdeevaporn. 2004. Genetic purity test of F₁ hybrid *Capsicum* using molecular analysis. **Horticultural Science & Biotechnology**. 79(3): 449-451.
- Moreau, L., A. Charcosset, F. Hospital and A. Gallais. 1998. Marker-assisted selection efficiency in populations of finite size. **Genetics**. 148: 1353-1355.
- Oh, B.J., K.D. Kim and Y.S. Kim. 1999a. Effect of cuticular wax layers of green and red pepper fruits on infection by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**. 147: 547-552.
- Oh, B.J., M.K. Ko, L. Kostenyuk, B. Shin, and K.S. Kim. 1999b. Coexpression of a defensin gene and a thionin-like gene via different signal transduction pathways in pepper and *Colletotrichum gloeosporioides* interactions. **Plant Molecular Biology**. 41: 313-319.
- Onus, A.N. and P. Barbara. 1996. Monogenic segregations in backcross progenies of *Capsicum baccatum* x Two interspecific F₁ hybrids and some possible explanations for distorted segregation ratios in *Capsicum*. **Turkish Journal of Botany**. 24: 319-328.
- Pakdeevaporn, P., S. Wasee, P.W.J. Taylor and O. Mongkolporn. 2005. Inheritance of resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum capsici* in *Capsicum*. **Plant Breeding**. 124: 206-208.
- Park, Y.K., B.D. Kim, B.S. Kim, K.C. Armstrong and N.S. Kim. 1999. Karyotyping of the chromosomes and physical mapping of 5S rRNA and 18S-26S rRNA gene families in five different species in *Capsicum*. **Genes & Genetic Systems**. 74: 149-157.

- Prince, J.P., E. Pochard and S.D. Tanksley. 1993. Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with tomato. **Genome**. 36: 404-417.
- Quirin, E.A., E.A. Ogundiwin, J.P. Prince, M. Mazourek, M.O. Briggs, T.S. Chlanda, K.-T. Kim, M. Falise, B.-C. Kang and M.M. Jahn. 2005. Development of sequence characterized amplified region (SCAR) primers for the detection of Phyto.5.2, a major QTL for resistance to *Phytophthora capsici* Leon. in pepper. **Theoretical and Applied Genetics**. 110: 605-612.
- Rozen, S. and H.J. Skaletsky. 2000. WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ: 365-386.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis and H.A. Ehrlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable FNA polymerase. **Science**. 239: 487-491.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Slusarenko, A.J., R.S.S. Fraser and L.C.v. Loon. 2000. **Mechanisms of Resistance to Plant Diseases**. Kluwer Academic Publishers. London.
- Tautz, D. and M. Renz. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukartotic genomes. **Nucleic Acids Research**. 12: 4127-4138.
- Than, P.P., R. Jeewon, K.D. Hyde, S. Pongsupasanit, O. Mongkolporn and P.W.J. Taylor. 2007. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum species* associated with anthracnose on chilli (*Capsicum spp.*) in Thailand. **Plant Pathology**. 10.1111/j: 1365-3059.
- Van Ooijen, J.W., M.P. Boer, R.C. Jansen and C. Maliepaard. 2002. **MAPQTL 4.0, Software for the Calculation of QTL Positions on Genetic Maps**. Plant Research International, Wageningen.

- Vienne, D.D. 2002. **Molecular Markers in Plant Genetics and Biotechnology**. Institute National de la Recherche Agronomique Versailles. Paris, France.
- Voorrips, R.E., R. Finkers, L. Sanjaya and R. Groenwold. 2004. QTL mapping of anthracnose (*Colletotrichum* spp.) resistance in a cross between *Capsicum annuum* and *C. chinense*. **Theoretical and Applied Genetics**. 109: 1275–1282.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T.v.d. Lee, M. Hornes, A. Fritjers, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new concept for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**. 23: 4407-4414.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. 18: 6531-6535.
- Xian-Liang, S., Sun X.Z. and Zhang T.Z. 2006. Segregation distortion and its effect on genetic mapping in plants. **Agricultural Biotechnology**. 3(3): 163–169
- Yoon, J.B., D.C. Yang, W.P. Lee, S.Y. Ahn and H.G. Park. 2004. Genetic resources resistant to anthracnose in the genus *Capsicum*. **Korean Society Horticulture Science**. 45(6): 318-323.
- Yoon, J.B. and P. Hyo Guen. 2005. Trispecies bridge crosses, (*Capsicum annuum* x *C. chinense*) x *C. baccatum*, as an alternative for introgression of anthracnose resistance from *C. baccatum* into *C. annuum*. **Korean Society Horticulture Science**. 46(1): 5-9.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR amplification. **Genomics**. 20: 176-183.

ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทป์ของ microsatellite 76 ตำแหน่ง (Lee *et al.*, 2004)

ลำดับ ที่	ตำแหน่ง	ตำแหน่งซ้ำ	ลำดับเบส		T (°C)	ขนาดชิ้นส่วน
			Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')	annealing	DNA (bp)
1	G1	(CA)12(TA)4	TCAACCCAATATTAAGGTCCTTCC	CCAGGCGGGGATTGTAGATG	55	283
2	G30	(AT)10(GT)12	TGGGAAATAGGATGCGCTAAACC	AACTTTAAGACTCAAAATCCATAACC	55	223
3	G31	(AT)11(GT)17	CCAAACGAACCGATGAACACTC	GACAATGTTGAAAAAGGTGGAAGAC	55	311
4	G32	(AT)2(GT)4(AT)8(GT)13	TCCATAACTTCACCCATGAGTATGA	GCAACACCCACATTCCCTTCTC	55	197
5	G33	(AT)6(GT)32IMPf	GGGTATCATCCGTTGAAAGTTAGG	CAAGAGGTATCACAACATGAGAGG	55	192
6	G34	(GT)9T(TG)7	AACCAGCAATCCCATGAAAACC	GGGCTTTGGGGAGAATAGTGTG	60	154
7	G35	(TG)23(AG)9	CATGAGGTCTCGCATGATTTAC	GGAGAAGGACCATGTACTGCAGAG	60	186
8	G2	(AC)9(AT)4	CGGTGGCATGTAGTTTCTGGAG	AAGACATGAAATCCACAAGTTTTTC	60	217
9	G36	(AAAAAT)4	TCCAAACTACAAGCCTGCCTAACC	TTTTGCATTATTGAGTCCCACAGC	65	159
10	G3	(AAT)11	AAGCTTATCCCTTTCAAATATAA	ATATCTCACGTATTGCGGATTCTT	55	159
11	G4	(AT)9(GT)14	ACCCAAATTTGCCTTGTTGAT	AATCCATAACCTTATCCCATAAA	50	189
12	G37	(CT)2(AG)15	CCAACAGTAGGACCCGAAAATCC	ATGAAGGCTACTGCTGCGATCC	60	299
13	G38	(AG)12	AATGCTGAGCTGGCAAGGAAAG	TGAAGGCAGTAGGTGGGGAGTG	55	221
14	G5	(CT)21(AT)13	AGCTTGTGTCATAATCTTGAAAACTC	TGAAAAGACGATTTTGTCTAATGCG	65	150
15	G39	(GA)14	GGCGGAGAAGAAGTAGACGATTAGC	CCACCCAATCCACATAGACG	60	197
16	G40	(TA)3CA(GA)21	ACGAGGCCCAAGCTGTTATGTC	TTGTCCCGACTCTCCATTGACC	65	207
17	G41	(GA)13	GGCTATTTCCGACAAACCTCAG	CCATTGGTGTTCCTACTGTTGTG	65	213

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

ลำดับ ที่	ตำแหน่ง	ตำแหน่งซ้ำ	ลำดับเบส		T (°C)	ขนาดชิ้นส่วน
			Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')	annealing	DNA (bp)
18	G42	(GA)13AA(AT)2	CTCCTTCGGAAATGCATGATGG	CAGCACTTTGATTCCAGAACTTCG	65	132
19	G43	(TA)17(GA)12	GCCCCGATCAATGAATTTCAAC	TGATTTTTGGGTGGAGAGAAAACC	60	208
20	G44	(GA)15	GGGTTTGCATGATCTAAGCATTTT	CGCTGGAATGCATTGTCAAAGA	50	344
21	G6	(GA)16(TG)2	TGCTGGGAAAGATCTCAAAAGG	ATCAAGGAAGCAAACCAATGC	50	163
22	G7	(GTTT)2(TTG)9	TGCGAGTACCGAGTTCTTTCTAG	GGCAGTCCTGGGACAACTCG	50	100
23	G45	(TTG)7...(TTG)8	TGCTTGTTGTTTTTACCCCTCAGC	AGTGAAAGGTGGGCAACAGC	60	108
24	G46	(TTG)7	CGTGGCTTCAAGTATGGACTGC	GGGGCGGAACTTTTCTTATCC	50	237
25	G8	(AG)2(TTG)7(ATG)2	GAATGTGAATCGCCCGTATGC	CATCCGGCATCAATATGTTAGTAGC	50	214
26	G47	(GTT)7	TCCCAGACCCCTCGTGATAG	TCCTGCTCCTTCCACAACCTG	50	174
27	G48	(TTG)6	TGAGGCAGTGGTATGGTCTGC	CCCAGTTCGTCTGCCAATAG	50	132
28	G49	(GT)9	GCAAGGATGCTTAGTTGGGTGTC	TCCCAAATTACCTTGCAGCAC	55	146
29	G9	(GT)7	CCCGTATGTGATTCTAGGATGG	CGTTAGCAGGTACTGAGGATAAGG	50	189
30	G10	(AC)12(AT)4	TCACCTCATAAGGGCTTATCAATC	TCCTTAACCTTACGAAACCTTGG	55	259
31	G50	(TTG)11	CCTCCCCAGACCCTACTTTATGC	TCAACCAAACAAGTCGAAGTCAGC	55	162
32	G11	(AT)11(AC)9(ATAC)10	TTTTCAATTGATGCATGACCGATA	CATGTCATTTTGTCAATTGATTGG	55	295
33	G12	(TTG)7(GT)9	CCCTCGGCTCAGGATAAATACC	CCCCAGACTCCCACTTTGTG	55	126
34	G51	(CT)17(CA)5A21	TCGTATTGGCTTGTGATTTACCG	TTGAATCGAATACCCGCAGGAG	55	205

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

ลำดับ ที่	ตำแหน่ง	ตำแหน่งซ้ำ	ลำดับเบส		T (°C)	ขนาดชิ้นส่วน
			Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')	annealing	DNA (bp)
35	G52	(TTG)7	GGGATGTAGGAACAACCCTAACC	TGCATCTTTTCTTCATCCCCCTTC	55	217
36	G53	(TTG)7	ATGGACTGCGTACATCCTACCC	TGCTCTTTATGCACTAGCTTGAGAGG	65	144
37	G54	(TTG)7	CTTCCCAGACCTCACTTTGTGG	TCTTTGCGGTTATGTCAAGTGC	65	161
38	G55	(TTG)9	CGAAAGGTAGTTTTGGGCCTTTG	TGGGCCCAATATGCTTAAGAGC	65	148
39	G13	(AAT)16IMP	TTTAGGGTTTCCAACCTCTTCTCC	CTAACCCACCAAGCAAAACAC	60	174
40	G56	(AAT)18	TGCACTGTCTTGTGTTAAAATGACG	AAAATTGCACAAATATGGCTGCTG	65	148
41	G57	(CT)6(AT)8(GTAT)5	CATGAATTTCTGCTTGAAGGTCCC	AAGGGTGTATCGTACGCAGCCTTA	60	218
42	G58	(AT)17	TGCTTTCAAAACAATTTGCATGG	GCGTCTAATGCAAAACACACATTAC	60	210
43	G14	(AT)16IMP	CTCTAATAGGCAATAGCTCACATGC	GCAGTCTCCCAGAACGTTGTCC	60	243
44	G59	(GAGGTC)2(GAGGGC)2	GACAACATAGGCGGACCTTTGG	TGCTTTAGGTCTACGTCCTTGAC	60	267
45	G60	T20	TGGAAGTGATTACTGGAAACCATGC	GGGGTTTAGTCATGGAATCTTTTGC	55	202
46	G15	(AAG)3(AAT)2A(AC)2	ACACTCTCGGTGGAAAGCTTGG	TCCTCTTTTCGGGATTCCTTAGC	60	181
47	G76	(TTTG)2(TTG)10	GGATGCGGAAGATGAAGACGA	CAACAACAGCAACAACAAATCAAA	65	237
48	G61	A13	CACTTTGATACGTGAACACTTCC	AGTTTGCACTGGTCCTGCTC	60	112
49	G62	T16	GCTAATTACTTGCTCCGTTTTG	AATGGGGGAGTTTGTTTTGG	65	184
50	G16	T18IMP	GGGCTGACGGCCATTAAGAAC	CAGACAGCTAGAAAGAGAGGAATTCTG	65	195
51	G17	(TTG)6IMP	TGGTGATGCTGGCATGGTTAAG	CAGCACTGTTCACTTCCCCTTC	60	205

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

ลำดับ ที่	ตำแหน่ง	ตำแหน่งซ้ำ	ลำดับเบส		T (°C)	ขนาดชิ้นส่วน
			Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')	annealing	DNA (bp)
52	G18	(TTG)5IMP(AT)6IMP(GT)3IMP	TACCTCCTCGCCAATCCTTCTG	TTGAAAGTTCTTTCCATGACAACC	55	238
53	G63	(TA)9	GATTTTGGTGGCAGAAGAATTGG	TGCACTTTTGAAGCAAACAAACC	55	254
54	G64	T7A11	TGCACCAAGGTCCAGTAAGGTTG	CCAACCACCATGGTTCATACAAG	65	201
55	G65	(TAG)4IMP(GTT)3	GCAGACAATCTTGGTTGGTTTGG	CACCTTGAGGGCTAAAGGAAGG	65	234
56	G66	(AT)11IMP	ATGGATGCTTCGCCATCTCAAC	GACACAGCAGCCATATGTATACGC	55	176
57	G19	(TC)5(TTTC)2	CCAAGGTGAAGTGACGATGAGG	GACTCGGACTACGACTCGAAAAG	65	178
58	G67	(GAA)6	ACTGCTGGGCATTGAGGGTTAG	GCGACATCCCTCACGACATAAC	55	208
59	G68	(ATT)7	AGGCCATGGAAAAAGACACTGG	ACATGACCATGACCAACCATCC	65	189
60	G69	(GT)5IMP(CA)3	GGCCTTCAACTCCTCAAAGACG	TACTGCATCGGTTCTTGATTG	50	195
61	G20	(TTTC)4	CCCTCTCTCTCCCTTCACC	AGTGCTACGATGGCTTAGGG	60	95
62	G21	T26IMP	CCCCCTCGTCTCTCTTTATTT	TTGCAAATCTTTTGTCAATTTT	50	114
63	G70	(GA)9IMP	TGCCTTGAAGGTAGCCAAGAGG	CAAACATCAATTGAGGAGGATACCG	55	154
64	G71	(GAA)6imp	TGCTATTGATGAATACGCTGTGG	CCTGTCACAAGGAAGTCTTGATCG	60	179
65	G72	(AAG)7imp	GAGAAGAAGGCCGAGGGAGTTC	GCACCTGCTTCAGCACCTTG	55	154
66	G73	(TA)4(TC)3	TCCACTGCACCACAACCAATG	CCATAAGCAACCAACAGAATTAGGG	55	202
67	G74	(CCA)8	CCACCATGACCACCATGAGG	TTCAGCCCCTCTCATCAACC	65	202
68	G75	(AG)5(AAG)4imp	TCTGTCCCCTGTGAAGATTTGG	GCTCCACCAGTTCTGTACCTTGG	65	205

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

ลำดับ ที่	ตำแหน่ง	ตำแหน่งซ้ำ	ลำดับเบส		T (°C)	ขนาดชิ้นส่วน
			Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')	annealing	DNA (bp)
69	G22	(CT)6	ACAAACATATCTATAGTGCAAATT	ATTGTGCTCTGTCAAAACAA	65	103
70	G23	(CCA)8	CATGACCACCATGAGGATA	GATAGCCACGAGCATAGTATT	65	160
71	G24	(AG)5	AGTTAACAACCTTTGGTGCTGT	TAATATGGTAAGCACATTCCA	55	130
72	G25	(AG)6	TGTTCCCTCTCTCTTCTTATCG	CCGGAGATAAGATCTTGATAA	65	103
73	G26	(AT)5	TGAGGTCTGAAAAAGGTAAAG	TTAGTTGAACTTGCAGAATCC	60	112
74	G27	(AT)6	TTGGTTTTTGCTACTGGTAAT	AAACTGTCATATATTTGTGTGACT	55	158
75	G28	(AC)5(TA)8	TCTGCTTTAAAAACACATACAT	CATTCTAACTGAAATTGCATG	65	116
76	G29	(AAT)11	GGGATTTAATAAGGAACAATG	TCAAATATCGACATTAGCATG	60	200

ตารางภาคผนวกที่ 2 ไพรมเมอร์ sequenced tagged microsatellite site (STMS) 63 ตำแหน่ง (อรรรัตน์ มงคลพร, ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์)

ลำดับที่	ตำแหน่ง	ลำดับเบส		T (°C)	ขนาดชิ้นส่วน DNA
		Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')	annealing	(bp)
1	PMC1	CTTAAGTGATTAGAAGCTTGGA	AATCATTGAGTTACATGTTTGG	60	243
2	PMC2	ACATCTACGACATTTTAGGTGC	GAAAGAAGGGGAAATAGAGGAA	50	172
3	PMC3	GGTCCAATCAAATGCTGAAAAG	TTGCCAAGCAAAAATGTTATCC	60	140
4	PMC4	ACAAATATTGACCTCTGAAAAA	TACACCAAGAAACCTTAAGCAT	55	229
5	PMC5	TTTCATGTGAAGGTCTCAGCAG	AGAAATGTTCCGCGAGTAAGTG	50	124
6	PMC6	CCTGTGAAAACACTGTAAAATC	AGAAGTGTATGTTCAACTGCTC	55	128
7	PMC7	AAAGAGCTAAACCCAT ATACCCC	AATCAAGTAACCACGTGCAATC	55	178
8	PMC8	ACTATGTGGGAATACATTGGGT	GTACTCCCTCAGTCCATCTTTG	50	138
9	PMC9	GAAGTAAACAAAGAATTGAGTC	CTTCATGTAAAATAAGTGAGAGC	55	180
10	PMC10	CCTGCAGTTTGTGTTGGATTA	TTCTTTTCGGGATGTATGTGTG	50	151
11	PMC11	ACAAAGCAAACCTCTCTTATT	TACAGTACACAAACCTCTTCCT	55	303
12	PMC12	TTGTCTTTGTCTGGAAGTGTCT	TAAAAAATTCAAAAGCTGAGGAG	50	272
13	PMC13	CTCAAGGAGGATCTTACGGTTA	ACTCTTGGGCATCGATTATTTA	55	266
14	PMC14	CTTCAAAATACGAATTCCTT	TCTGCTGCAATCTAATTTCTCC	50	160
15	PMC15	GTTTATTTTCCATTTCGAGG	CCCCTTTGATTCTGAAAGACAT	55	132
16	PMC16	GTTAGGATTTGATTTCTAGGGT	TTCTTTAGAGGTAGTGGTATGG	60	182
17	PMC17	AAGAAAATGATACAGTTGGGTG	GGAAAACCTCCTTA TACTGCCT	60	177

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	ตำแหน่ง	ลำดับเบส		T (°C)	ขนาดชิ้นส่วน DNA
		Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')		
18	PMC18	GGGAGTTTATATGCAGGATTAG	AAGCAATAACTTACACAACCAA	65	161
19	PMC19	GAAACTGCATTGCAGGTAGAC	TTGAGACAACCTGATACGGAGGA	60	194
20	PMC20	AGGTTTCATGCGTAGGAACAAT	GGTTGGGAAGGTCATGAAATAA	60	297
21	PMC21	AGTTGATACCGGATCCAAGTTA	ACTTCTTTCTATCTCGGCATT	60	287
22	PMC22	CACATCGATTGATGGTTGAAAG	AATCAACACATACCCCT CTCCT	65	199
23	PMC23	ATCTGCTTCACTTCTTCAGGGA	TCAGGAGATAGCCTTCTTTGGT	65	199
24	PMC24	GTTTCGCCTGAGTTGCATAGAC	GCAGACCATACTACCCAGGTTTG	65	141
25	PMC25	AAATTCCTGCTTCCATTCATAC	AGTTCCAA TACTACATTCCATCTG	60	107
26	PMC26	CTACCCCATTAGAGGAGTTGAG	CTACTGCCTA TAGATCCTGCCA	55	140
27	PMC27	GCTTAAAGAAGCTTTAGACTTTGAC	GAAGATCCATTAACCACTTGAA	55	156
28	PMC28	TTTAAGCCACGTCAGTGCTACA	TACCAACCCAAGTCATAGCCAA	60	284
29	PMC29	AATCAAATCAGAACTGCTCCGT	TCTTTTGTCTGGGTCAGATGTC	60	227
30	PMC30	TATGTCGGTTAGATGAACACTC	CTGTTGTAAATGCTGATTATGC	55	252
31	PMC31	CATTAGCTGCATGAACCAAAGA	AGGGGGACAAATACTGAAAACC	60	162
32	PMC32	CCCAACTGAAATAGTAGTAAACA	AGATAACACATGATTGATGGATA	60	295
33	PMC33	GCAAGTTTTAAGACTAAACCCA	ATATTTCAACACAACCACATCA	55	201
34	PMC34	ACCCCACTAGGTGGGAATACA	AGGTATCCGTGGAATTACCAACT	60	112

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	ตำแหน่ง	ลำดับเบส		T (°C)	ขนาดชิ้นส่วน DNA
		Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')		
35	PMC35	GAAGAAGGATTTTCATTTGTGCT	CAATGCACCAACTTGATGATAA	50	259
36	PMC36	TATGTTATGCTCTATGAGATGA	AAGAAGCTCTAGACATGTTTTA	50	185
37	PMC37	TATTCATTATTGGAAGTGGAGA	AACTGGTAACATTTCCAACATC	50	287
38	PMC38	GAGGTGCGAAGATCTGTTTG	TGGTTTCAACAGGAGACACAT	55	185
39	PMC39	GCACTCGAATTAGGGTCTTAGCT	GCATTATGAAAACAGTCTAGCGC	55	241
40	PMC40	ACCATCTACAACAAGTAGCTCC	GTACATCCCAAGACTGTAAGGA	50	233
41	PMC41	CCAACCTATTCCATACTCGGATG	TGCAGGTCGACTCTAGAAGGATC	50	260
42	PMC42	CTGTTTTGTCCAAGTATCCAC	GTACCATCCCTTGCTGCATAAT	60	195
43	PMC43	CAACTGAATCGTACATACATA	CCAAATAAAAATACACCAATAA	50	158
44	PMC44	GTACCCTTTCCTAGTATGGTT	CTACATAACACGGGTAAACA	50	-
45	PMC45	CATCTCTGAGGGGTTATCTGGTTG	CTCCGGAATGACCCACACTCTAC	55	158
46	PMC46	GTAAGTGTAAAGGCTTGATATAATT	CTTAGCGTGTTAAATATAATTTT	50	232
47	PMC47	TGGCACAATCTCTGATTGACTA	CCTTCCCTTTATTCCACACTCT	50	174
48	PMC48	GACTGACAAACGTTTTTTATGA	TGTAAAATTCACATAAAAATGAGT	50	209
49	PMC49	CTTTATATTCATGAATGGCAAC	CATGTATAGTAGAACCTTGGCA	60	166
50	PMC50	GTACCATGGCTTCATATAACT	CTATGTCTAGCCATATGGATT	50	210
51	PMC51	TACAACGAACCTGTATGAGATG	AGAAGTTGATTTAGATTGTGGG	50	264

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	ตำแหน่ง	ลำดับเบส		T (°C)	ขนาดชิ้นส่วน DNA
		Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')	annealing	(bp)
52	PMC52	GTACCCCTTGTTTGGCT	GGCAGAGATTTACCCCT	55	117
53	PMC53	GAATCATGAATTCAATACACCC	TTGGAGGTTTATCAATCAAGTC	55	282
54	PMC54	GTCGCTTCAGAAGACGCTTGTA	CCCCCTTCAATGAAACGTGTAA	60	286
55	PMC55	CATTGTCTCTTGTGATTGTGT	CATGACCAATTTGTAGTTCTGA	60	161
56	PMC56	GACGTAGTCTATGCTCCAATG	GTACTCATGGAGTAATGTAACAAA	50	288
57	PMC57	AGGCACTGATTATGTTGGCACT	GATGCTTAAGACCACATGGGAA	55	194
58	PMC58	CTAAGCCCTGTTCTCTTTTTCG	GCTCACAAATCCCTGATCACTA	55	270
59	PMC59	TACATTTTATTTTACATTTAGCAAATTTTA	GTACATGCATACACACACG	50	166
60	PMC60	CGACCACGACTACATTATATTC	TTGTTAATAATGAGAGTTCTTAAGAGAG	55	202
61	PMC61	TCCCATGCATACCATCAAATG	TTCAAATTTTCATGCTAAGCCTTG	50	121
62	PMC62	TGAGGGTTTGACTCCTACTTTGTAAC	TCAAATTGCGTGAATATTCCA	50	160
63	PMC63	TGATACGCAAAGCAATCCAA	CATACATAATGTTTCAAGACTTGGTCTC	60	94

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวนิภา ชื่นป้อม
วัน เดือน ปี ที่เกิด	3 กรกฎาคม 2523
สถานที่เกิด	พิจิตร
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาวิชาพืชสวน)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานตีพิมพ์และรางวัลทางวิชาการ	Chuenpom, N. and O. Mongkolporn. 2005. Detection of polymorphisms between Bangchang and PBC932 using microsatellites, P. 82. Poster presentation, The 2nd AgBiotech Graduate Conference, Bangkok, Thailand. Chuenpom, N., N. Khampeng and O. Mongkolporn. 2007. Identification AFLP markers to chilli anthracnose resistance using bulked segregant analysis, P. 46. Oral presentation, The 3rd AgBiotech Graduate Conference, Bangkok, Thailand. Mongkolporn, O., N. Chuenpom, N. Khampeng, P. Montri, P. Mahasuk, S. Wasee and P. Taylor. 2008. Anthracnose disease of chili pepper-breeding and Pathogenicity, P.79. Oral presentation, The 5th Taiwan-Thailand Bilateral Conference, Pingtung, Taiwan. Chuenpom N., J. Chunwongse, S. Wasee and O. Mongkolporn. Molecular mapping of anthracnose resistance genes and identification of markers linked to anthracnose resistance in <i>Capsicum</i>, Impress.
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม