

การค้นหาคำแหน่ง QTL ของลักษณะความต้านทานโรคราสนิม
ในประชากรสายพันธุ์ข้าวโพดรับประทานสด

Identification of Quantitative Trait Loci (QTL) for Rust Disease Resistance
in Fresh-market Corn Population

ศาสตราจารย์ สังกษ์สุข¹ สุรพงษ์ ดำรงกิตติกุล² วินิตชาญ รื่นใจชน³ ฉลอง เกิดศรี⁴ อาวีวุฒิ ยงสุวรรณ³
นราภรณ์ ชาวเมือง³ จินตนา อันอาดมิ่งาม¹
Sasawat Sangsuk¹ Surapong Dumrongkittikule² Vinitchan Ruanjaichon³ Charong Kerd Sri⁴
Arweewut Yongsuwan³ Naraporn Chaomueang³ Jintana Unartgam¹

Received 14 Oct 2020/Revised 23 Nov 2020/Accepted 9 Dec 2020

ABSTRACT

Southern rust disease caused by *Puccinia polysora* Underw. is the main problem of corn production in Thailand. The objectives of this study were screening resistance varieties of corn to *P. polysora* and identifying quantitative trait loci (QTL) associated with the resistance. Two isolates of *P. polysora* were morphologically characterized, and sequentially analyzed in the ITS rDNA region. Results revealed that both isolates could be grouped with *P. polysora* from Genbank (NCBI) with 99% bootstrap supporting. Resistance evaluation of 66 lines of sweet corn and waxy corn against these two isolates found that Bio18-1 and Bio18-35 lines were highly resistance. They were suitable candidates for further investigation of resistant sources to corn rust disease. In addition, we found that each inbred line showed different degrees of resistance and susceptibility to *P. polysora* collected from different sources. Therefore, more than one fungal isolates should be used in the breeding programme for corn rust resistance in Thailand to ensure that resistance obtained are effective against wide range of isolates present in the country. To identify genomic regions associated with rust resistance in maize, a genome-wide association analysis (GWAS) was conducted using 159,201 single-nucleotide polymorphism (SNP) markers of the 66 corn lines. Results showed

^{1/} ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University,
Kamphaeng Saen campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

^{2/} ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

^{2/} Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University,
Kamphaeng Saen campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

^{3/} ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)
คลองหลวง ปทุมธานี 12120

^{3/} National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development
Agency (NSTDA), Khlong Luang, Pathum Thani, Thailand

^{4/} ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท 522 หมู่ที่ 4 ตำบลบางหลวง อำเภอสรรพยา จังหวัดชัยนาท 17150

^{4/} Chai Nat Field Crops Research Center, Chai Nat 17000, Thailand

*Corresponding author : agrjne@ku.ac.th

that the two QTLs significantly associated with rust resistance were on chromosome 10 which was against Chiang Mai isolate and on chromosome 3 which was against Nakhon Ratchasima isolate. For future analysis, SNP markers and haplotype associated with 2 QTLs will be developed and evaluated for rust resistance in corn breeding programme.

Keywords: Corn, *Puccinia polysora* Underw, Genome Wide Association study

บทคัดย่อ

โรคราสนิมข้าวโพด (Corn rust disease) เป็นปัญหาที่สำคัญต่อการผลิตข้าวโพดของประเทศไทย โรคราสนิม เกิดจากเชื้อรา *Puccinia polysora* Underw. การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาสายพันธุ์ข้าวโพดที่มีความต้านทานต่อเชื้อรา *P. polysora* และค้นหาตำแหน่ง quantitative trait loci (QTL) ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานด้วยวิธี Genome Wide Association Study (GWAS) จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS rDNA พบว่า เชื้อรา *P. polysora* 2 ไอโซเลต จัดอยู่กลุ่มเดียวกับเชื้อรา *P. polysora* ในฐานข้อมูล Genbank (NCBI) โดยมีค่าความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่มที่ 99 % ประเมินความต้านทานของข้าวโพดหวาน และข้าวโพดข้าวเหนียว จำนวน 66 พันธุ์ จากการปลูกเชื้อด้วยเชื้อราสนิมจาก 2 แหล่งปลูกพบว่า มีข้าวโพดที่แสดงลักษณะความต้านทานต่อเชื้อราสนิมทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวโพดสายพันธุ์ Bio18-1 และ Bio18-35 ที่แสดงลักษณะความต้านทานสูง เหมาะสมที่จะนำไปทดสอบเพื่อหาแหล่งของความต้านทานต่อโรคราสนิมต่อไป นอกจากนี้ ข้าวโพดแต่ละสายพันธุ์แสดงลักษณะความต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อรา *P. polysora*

จากแหล่งต่าง ๆ ได้แตกต่างกัน ดังนั้น ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดต้านทานโรคราสนิม ควรใช้แหล่งของเชื้อราในการทดสอบโรครามากกว่าหนึ่งแหล่ง เพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวโพดที่ต้านทานครอบคลุมสายพันธุ์ของเชื้อราที่ระบาดในประเทศไทย และผลการวิเคราะห์ GWAS โดยใช้ SNP จำนวน 159,201 ตำแหน่งร่วมกับประชากรข้าวโพดจำนวน 66 พันธุ์ พบตำแหน่ง QTL ที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรคราสนิมแหล่งเชื้อจากเชียงใหม่บนโครโมโซมที่ 10 และจากนครราชสีมาบนโครโมโซมคู่ที่ 3 นอกจากนี้ ตำแหน่ง SNP ที่พบใน QTLs ทั้ง 2 ตำแหน่ง มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นโมเลกุลเครื่องหมายสำหรับคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวโพดที่มีความต้านทานโรคราสนิมต่อไป

คำสำคัญ: ข้าวโพด, *Puccinia polysora* Underw. Genome Wide Association Study

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการปลูกข้าวโพดหวาน และข้าวโพดข้าวเหนียว เพื่อใช้ภายในประเทศและส่งออกเป็นอันดับต้น ๆ มีมูลค่าการส่งออก 536,365 ตัน ในปี พ.ศ.2562 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2562) เกษตรกรจึงนิยมเพาะปลูกข้าวโพดพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและมีคุณภาพดี อย่างไรก็ตามพบว่า มีปัญหาการระบาดของโรค ทำให้ข้าวโพดทั้ง 2 ชนิดนี้ เริ่มมีความอ่อนแอต่อโรค และคุณภาพของผลผลิตข้าวโพดลดลง นักปรับปรุงพันธุ์จึงได้มีการพัฒนาพันธุ์ข้าวโพด เพื่อให้มีคุณภาพและปริมาณตรงตามความต้องการ และต้านทานโรค

โรคราสนิม (rust) เป็นโรคทางใบที่สำคัญชนิดหนึ่งของข้าวโพด ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการจำกัดผลผลิตและคุณภาพของข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียว เกิดจากเชื้อรา *Puccinia sorghii* Schw. (common rust) *P. polysora* Underw. (southern rust) และ *Physopella zeae*

(tropical rust) (Melching, 1975; Casela, 1998; Dolezal, 2010) ประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อราสนิม 2 ชนิด คือ common rust และ southern rust แต่ปัจจุบันมีรายงานเพียงชนิดเดียว คือ southern rust ซึ่งเป็นโรคที่ทำความเสียหายต่อข้าวโพดอย่างกว้างขวางในพื้นที่เขตอบอุ่นและเขตร้อนชื้น เช่น สหรัฐอเมริกา แอฟริกา และเอเชีย (Liu et al., 2003; Dolezal et al., 2009; Brewbaker et al., 2011) Unartgam et al. (2011) ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสนิมและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA ของเชื้อราสนิมข้าวโพดในประเทศไทย พบว่า มีสาเหตุจากเชื้อรา *P. polysora* นอกจากนี้ ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อมและพืชอาศัยสลับ (alternate host) สามารถสนับสนุนได้ว่า เชื้อราสนิมข้าวโพดในประเทศไทยเกิดจากเชื้อรา *P. polysora* ต่อมา (2555) ปีต่อมา ได้ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราสนิมบนข้าวโพดสายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์ โดยทำการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อราสนิมบนข้าวโพดสายพันธุ์ Ki1-Ki52 ที่ปลูกในพื้นที่ที่มีการเกิดโรคระบาด (natural infection) ใน 4 จังหวัด ได้แก่ จ.สงขลา, จ.นครราชสีมา (ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ), จ.ลำปาง และ จ.กาญจนบุรี พบว่า พันธุ์ข้าวโพดแต่ละพันธุ์ (Ki1-Ki52) แสดงลักษณะอาการที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางด้านลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR พบว่า เชื้อราสนิมในแต่ละพื้นที่ปลูกนั้นมีความผันแปรทางพันธุกรรม การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาข้าวโพดสายพันธุ์แท้ (inbred line) ที่มีความต้านทานต่อเชื้อรา *P. polysora* และค้นหาตำแหน่ง QTL ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานด้วยวิธี Genome Wide Association study (GWAS)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การจำแนกชนิดเชื้อราสนิมด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เก็บรวบรวมใบข้าวโพดที่พบอาการของโรคราสนิมจาก อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ (พิกัด 19.069661, 98.943383) และศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ (ไร่สุวรรณ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ.นครราชสีมา (พิกัด 14.651857, 101.312686) ซึ่งเป็นแหล่งที่มีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดและมีการคัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดอย่างต่อเนื่องมาโดยตลอด โดยเฉพาะข้าวโพดหวานที่อ่อนแอต่อเชื้อราสนิม นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope ที่กำลังขยาย 20 เท่า และ 40 เท่า โดยทำสไลด์กึ่งถาวร ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ได้แก่ ลักษณะสปอร์ สี และขนาด

2. การจำแนกเชื้อราสนิมด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

สกัดดีเอ็นเอจากเชื้อราโดยเขี่ย urediospores (200-300) จาก uredium บนใบข้าวโพดวางบนแผ่นสไลด์แก้วที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำอีกแผ่นวางประกบกัน ทำให้สปอร์แตกโดยกดแผ่นสไลด์แก้ว จากนั้นดูดสารละลาย Extraction buffer (10 mM Tris-HCL pH 8, 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCL, 0.01% SDS, 0.01% Proteinase K) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นสไลด์เพื่อล้างสปอร์ที่แตกละเอียดบนแผ่นสไลด์ ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 60 นาที และ 95°C. เป็นเวลา 10 นาที (จินตนา, 2562; Virtudazo et al., 2001) จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C. เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นต่อไป

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) rDNA ด้วยไพรเมอร์ ITS 1 (5' – TCC GTA GGT GAA CCTGCG G – 3') และ ITS 4 (5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3') (White *et al.*, 1990) อย่างละ 0.2 pmole, 10X buffer, 2.5mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP และ 2 unit Taq DNA polymerase (Takara) นำเข้าเครื่องพีซีอาร์ รุ่น PCRmax Alpha Cyclor เพื่อทำปฏิกิริยาที่ 95°C. เป็นเวลา 30 วินาที 55°C. เป็นเวลา 1 นาที 72°C. เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ จำนวน 35 รอบ และสุดท้ายที่ 72°C. เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis บนเจล agarose ที่ความเข้มข้น 1% โดยมี 100 base pair (ExcelBand) เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard Marker) และเติม 0.1% Gel star (SMOBIO) ผสมกับ PCR product และ loading dry หยอดลงบนเจลที่แข็งตัว นำมาตรวจสอบใน 0.5% TBE buffer (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที (จินตนา, 2562) แล้วนำ PCR product ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ส่งวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ โดยบริษัท Solgent Sequencing Service, ประเทศเกาหลี นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่วิเคราะห์ได้มาทำ multiple alignments โดยใช้ โปรแกรม ClustalW. ร่วมกับข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันที่มีบันทึกในฐาน ข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรมชุดคอมพิวเตอร์ MEGA7 (Thompson *et al.*, 2003) โดยนำข้อมูล มาวิเคราะห์ร่วมกันด้วยวิธี UPGMA และหาค่า bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ (Yap *et al.*, 1996)

3. ประเมินโรคราสนิมของสายพันธุ์อินเบรด ข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียว

ประเมินสายพันธุ์อินเบรดข้าวโพดหวานและ ข้าวโพดข้าวเหนียว ที่มีความแตกต่างกันในระดับ พันธุกรรมของลักษณะความต้านทานต่อโรคราสนิม จำนวนทั้งหมด 66 สายพันธุ์ (รุ่นที่ S6-S10)

(Table 1) โดยแบ่งเป็นข้าวโพดข้าวเหนียว 20 สายพันธุ์ และข้าวโพดหวาน 46 สายพันธุ์ ซึ่ง ทั้ง 66 สายพันธุ์นี้ ใช้เป็นตัวอย่างเพื่อนำไปประเมิน ข้อมูลจีโนมไทป์และฟีโนไทป์ในกิจกรรมอื่น ๆ ต่อไป

วางแผนการทดลองแบบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) ปลูก ต้นข้าวโพดสายพันธุ์อินเบรด จำนวน 66 สายพันธุ์ และข้าวโพดหวานลูกผสมที่เป็นการค้าพันธุ์ไฮบริด 3 (Hybrix 3) ที่เป็นพันธุ์อ่อนแอ (susceptible check) ต่อโรคราสนิมในโรงเรือนทดลอง จำนวน 4 ซ้ำ ซ้ำละ 5 ต้น ทำการสุ่มเก็บใบข้าวโพดที่เป็นโรคราสนิมที่มีลักษณะหงส์ส้มปกคลุมใบ จาก 2 แหล่งปลูก ประกอบด้วย แปลงเกษตรกร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ และศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ (ไร่สุวรรณ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ.นครราชสีมา นำใบดังกล่าวมาล้าง โดยแกว่งใบ เบา ๆ ในน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อล้างให้สปอร์หลุด ออกจากใบ เป็นสปอร์แขวนลอย จากนั้นนำไปกรอง บนกระดาษกรอง Whatman no.1 ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว และนำกระดาษกรองที่มีหงส์ส้มปกคลุมอยู่ มาตัดเป็นชิ้นเล็กขนาด 1 ตร.ซม. นำชิ้นกระดาษกรอง ราสนิมที่เตรียมไว้ มาวางบนใบข้าวโพดที่ปลูกในโรง เรือนเมื่อข้าวโพดมีอายุ 14 วัน โดยคว่ำด้านที่มีสปอร์ บนใบ และประเมินระดับความรุนแรง โรคหลังปลูก เชื้อที่ 14 และ 21 วัน โดยระดับ 0 คือ ไม่แสดงอาการ ระดับ 1 คือ มีการปรากฏของ pustules หรือ uredium จำนวน 1-25% ของพื้นที่ ใบที่ปลูกเชื้อ แผลปิด ขนาดเล็ก และไม่มีการพัฒนา ของแผลเพิ่มขึ้น ระดับ 2 คือ มีการปรากฏของ pustules หรือ uredium จำนวน 25-50% ของพื้นที่ ใบ มีการพัฒนาอาการ มีจำนวน pustules หรือ uredium เพิ่มขึ้นไม่เกิน 1 เท่าตัว และระดับ 3 คือ มีการปรากฏของ pustules หรือ uredium มากกว่า 50% ของพื้นที่ใบที่ปลูกเชื้อ มีการพัฒนาของ pustules อย่างต่อเนื่องและลูกกลมกระจายทั่วใบ (จินตนา, 2562) จากนั้น นำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์ ดัชนีการเกิดโรคตามสูตร ดังนี้

$$\text{ดัชนีการเกิดโรค (Disease index, DI)} = \frac{\text{ผลรวมของ (จำนวนต้นพืชแต่ละระดับอาการ X คะแนนของระดับอาการ)}}{\text{จำนวนต้นพืชทดสอบทั้งหมด X คะแนนสูงสุดของระดับอาการ}} \times 100$$

เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ดัชนีการเกิดโรคแล้ว จึงจำแนกลักษณะความต้านทานโรคของพืช โดย 0% คือ พืชมีลักษณะความต้านทานสูง (highly resistance), 1-10% พืชมีลักษณะความต้านทาน (resistance), 11-25% พืชมีลักษณะความต้านทานปานกลาง (moderately resistance), 25-50% พืชมีลักษณะความอ่อนแอปานกลาง (moderately susceptible), 51-70% พืชมีลักษณะความอ่อนแอ (susceptible) และ 70-100% พืชมีลักษณะความอ่อนแอมาก (highly susceptible) (จินตนา, 2562)

4. การค้นหา QTL ที่อธิบายลักษณะความต้านทานต่อโรคราสนิมด้วยเทคนิค Genome wide association study (GWAS)

เลือกสุ่มใบข้าวโพดของแต่ละสายพันธุ์พันธุ์ละ 5 ต้น จำนวน 3-5 ใบ จากต้นกล้าที่มีอายุ 7-14 วัน มาสกัดดีเอ็นเอ จำนวน 60 ไมโครลิตร ต่อสายพันธุ์ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) ส่งข้อมูลไปวิเคราะห์ด้วย Axiom® Maize Genotyping Array (ThermoFisher, USA) เพื่อใช้ในการค้นหาตำแหน่ง SNP ซึ่งมีตำแหน่งทั้งหมด 616,201 ตำแหน่ง ที่พัฒนามาจากฐานข้อมูลพันธุ์กรรม B73 AGP__v2 (30 inbred Topical) แบ่งเป็น SNP จำนวน 609,442 ตำแหน่ง และ Indel จำนวน 6,909 ตำแหน่ง โดยมีตำแหน่ง SNP ที่พบอยู่บนยีนจำนวน 116,224 ตำแหน่ง

นำชุด SNP ที่ได้จากการทำจีโนไทป์ด้วย Axiom® Maize Genotyping Array (ThermoFisher, USA) โดยมีเงื่อนไขมาตรฐานการวิเคราะห์ให้มีค่า % SNP call rate ที่ระดับ 90% และมีค่าเฉลี่ยของ sample QC call rate เท่ากับ 95.5% ได้จำนวน SNP เท่ากับ 518,457 ตำแหน่ง จากข้าวโพด จำนวน 66 พันธุ์ ทำการคัดกรอง

คุณภาพ SNP รอบที่ 2 โดยใช้เงื่อนไขดังนี้ คือ เอาค่าเปอร์เซ็นต์ Heterozygosity ที่มากกว่า 20% และค่า missing data ที่มากกว่า 10% ออก ทำให้ได้ SNP เท่ากับ 426,858 ตำแหน่ง จากนั้น นำ SNP ที่ผ่านการคัดกรองไปลดจำนวนความถี่ของ SNP ที่ 1 Kb ได้ชุด SNP ที่มีจำนวน 159,201 ตำแหน่ง พร้อมสำหรับทำ GWAS ต่อไป

การวิเคราะห์ GWAS โดยใช้โปรแกรม GAPIT (Genome Association and Prediction Integrated Tool) เวอร์ชัน -3.0 กำหนดมาตรฐานการวิเคราะห์ให้ SNP ที่ใช้มีค่า missing data น้อยกว่า 10% minor allele frequency (MAF) มากกว่า 0.05 และเพิ่มการทำ thinning ที่ 1 K ใช้ mixed model (MLM) เป็นโมเดลในการวิเคราะห์ association และการวิเคราะห์ PCA (principal component analysis) และ kinship ร่วมด้วย สำหรับการวิเคราะห์ trait associated SNP กำหนดค่า Bonferroni-adjusted significance threshold ให้มีค่า $-\log_{10}(p) > 3.5$

การค้นหาและวางตำแหน่ง SNP ที่ให้ผลความสัมพันธ์กับลักษณะที่สนใจอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ threshold ที่กำหนด โดยใช้จีโนมอ้างอิงของข้าวโพด B73 สำหรับค้นหาเป้าหมาย (Schnable *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2016) ยีนที่สัมพันธ์กับตำแหน่ง SNP จากฐานข้อมูล MaizeGDB4 ในการกำหนดตำแหน่งในจีโนม รวมถึงการทำนายบทบาทหน้าที่ของยีนเป้าหมาย โดยกำหนดค่า LD ของตำแหน่ง SNP ที่ $r^2 = 0.1$ ในช่วง 210-kb ด้วยการใช้โปรแกรม Haploview v.4.27

Table 1 The list of 66 corn inbred lines used in this study

| No. | Name | Corn type | Gene | No. | Name | Corn type | Gene |
|-----|----------|------------|------------|-----|----------|------------|------------|
| 1 | Bio18-1 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 34 | Bio18-34 | Sweet corn | <i>sh2</i> |
| 2 | Bio18-2 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 35 | Bio18-35 | Sweet corn | <i>sh2</i> |
| 3 | Bio18-3 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 36 | Bio18-36 | Sweet corn | <i>sh2</i> |
| 4 | Bio18-4 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 37 | Bio18-37 | Sweet corn | <i>sh2</i> |
| 5 | Bio18-5 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 38 | Bio18-38 | Sweet corn | <i>sh2</i> |
| 6 | Bio18-6 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 39 | Bio18-39 | Sweet corn | <i>sh2</i> |
| 7 | Bio18-7 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 40 | Bio18-40 | Sweet corn | <i>sh2</i> |
| 8 | Bio18-8 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 41 | Bio18-41 | Sweet corn | <i>sh2</i> |
| 9 | Bio18-9 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 42 | Bio18-42 | Sweet corn | <i>sh2</i> |
| 10 | Bio18-10 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 43 | Bio18-43 | Sweet corn | <i>sh2</i> |
| 11 | Bio18-11 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 44 | Bio18-44 | Sweet corn | <i>sh2</i> |
| 12 | Bio18-12 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 45 | Bio18-45 | Sweet corn | <i>sh2</i> |
| 13 | Bio18-13 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 46 | Bio18-46 | Sweet corn | <i>sh2</i> |
| 14 | Bio18-14 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 47 | Bio18-47 | Waxy corn | <i>wx</i> |
| 15 | Bio18-15 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 48 | Bio18-48 | Waxy corn | <i>wx</i> |
| 16 | Bio18-16 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 49 | Bio18-49 | Waxy corn | <i>wx</i> |
| 17 | Bio18-17 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 50 | Bio18-50 | Waxy corn | <i>WX</i> |
| 18 | Bio18-18 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 51 | Bio18-51 | Waxy corn | <i>wx</i> |
| 19 | Bio18-19 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 52 | Bio18-52 | Waxy corn | <i>WX</i> |
| 20 | Bio18-20 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 53 | Bio18-53 | Waxy corn | <i>WX</i> |
| 21 | Bio18-21 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 54 | Bio18-54 | Waxy corn | <i>WX</i> |
| 22 | Bio18-22 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 55 | Bio18-55 | Waxy corn | <i>WX</i> |
| 23 | Bio18-23 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 56 | Bio18-56 | Waxy corn | <i>WX</i> |
| 24 | Bio18-24 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 57 | Bio18-57 | Waxy corn | <i>WX</i> |
| 25 | Bio18-25 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 58 | Bio18-58 | Waxy corn | <i>WX</i> |
| 26 | Bio18-26 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 59 | Bio18-59 | Waxy corn | <i>wx</i> |
| 27 | Bio18-27 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 60 | Bio18-60 | Waxy corn | <i>WX</i> |
| 28 | Bio18-28 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 61 | Bio18-61 | Waxy corn | <i>WX</i> |
| 29 | Bio18-29 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 62 | Bio18-62 | Waxy corn | <i>WX</i> |
| 30 | Bio18-30 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 63 | Bio18-63 | Waxy corn | <i>WX</i> |
| 31 | Bio18-31 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 64 | Bio18-64 | Waxy corn | <i>WX</i> |
| 32 | Bio18-32 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 65 | Bio18-65 | Waxy corn | <i>WX</i> |
| 33 | Bio18-33 | Sweet corn | <i>sh2</i> | 66 | Bio18-66 | Waxy corn | <i>WX</i> |

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การจำแนกเชื้อราสนิมด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ตัวอย่างโรคราสนิมข้าวโพดสำหรับใช้ปลูกเชื้อจาก อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ ที่มีระดับการเกิดโรคราสนิมมากกว่า 70% ของพื้นที่ปลูก และแหล่งของเชื้อราจากศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา มีระดับความรุนแรงการเกิดโรคมากกว่า 60% อาการของโรคเกิดบนใบปรากฏเป็นตุ่มแผล (pustules) สีส้ม เป็นระยะที่ราสนิมสร้าง uredium ปรากฏอาการมากกว่า 50% ของพื้นที่ใบ แผลมีลักษณะเปิด สามารถมองเห็นสปอร์ (urediospores) ชัดเจน ลักษณะของสปอร์สีส้มจนถึงน้ำตาลอ่อน สำหรับต้นที่แสดงอาการรุนแรงสามารถพบแผลทั้งบนใบ ได้ใบ ลำต้น และกาบใบ (Figure 1)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสนิมได้ทดลองจุลทรรศน์พบว่า ระยะที่มีการสร้างสปอร์ชนิดเดียว คือ urediospore มีขนาด (15-36.92) x(22.82-44.36) ไมโครเมตร ลักษณะผิวสปอร์มีหนาม (echinulate) สปอร์มี 2 แบบ คือ ลักษณะกลมรี ผนังหนา (ellipsoid: E) และลักษณะแบนกลม ผนังหนา (Ovoid: O) (Figure 2)

2. การจำแนกเชื้อราสนิมด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA ของเชื้อรา *P. polysora* ทั้ง 2 ไอโซเลตที่ปลูกเชื้อเพื่อประเมินลักษณะความต้านทานบนข้าวโพดสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า เชื้อรา *P. polysora* มีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ประมาณ 600 คู่เบส เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำ Multiple alignment ด้วยวิธี ClustalW ด้วยโปรแกรม MEGA7 มาวิเคราะห์ร่วมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *P. polysora* จาก

ฐานข้อมูล NCBI จำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ HQ189432, HM467909, AB599975, AB599968, AB599970, HQ154024, HQ189433, HQ154021, HQ154022 และ AB599972 พบว่า เชื้อรา *P. polysora* ทั้ง 2 ไอโซเลต จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *P. polysora* จากฐานข้อมูล NCBI โดยมีความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่ม (bootstrap value) 99% (Figure 3) โดยกลุ่มของเชื้อรา *P. polysora* ได้แยกจากเชื้อ *P. sorghi* ที่เป็นสาเหตุโรค common rust ของข้าวโพดซึ่งมีความแตกต่างจากเชื้อรา *P. polysora* ทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวงจรชีวิต *P. sorghi* มีวงจรชีวิตแบบ macrocyclic heteroecious และต้องการพืชต่างชนิดในสกุล *Oxalis* sp. เป็นพืชสลับ (alternate host) (White, 2000) และเชื้อราสาเหตุโรคราสนิมข้าวโพดทั้ง 2 ชนิด ที่ได้แยกกลุ่มจากเชื้อรา *P. melanocephala* (KP744149, KP744148), *P. tanacetii* (EU014058 และ EU014059), *Phakopsora myrtacearum* (NR132913 และ KP729468), *Ustilago maydis* (AF135431, LC228638) และ *U. scitaminea* (EF185078, EF185078, AF135433, MH8165951) (Figure 3) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Unartgam *et al.* (2011) ที่ได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS rDNA ของตัวอย่างเชื้อราสนิมข้าวโพด เพื่อประเมินความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ จากการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่า ในประเทศไทยเชื้อราสนิมข้าวโพดที่ระบาดนั้น เกิดจากเชื้อรา *P. polysora* ซึ่งจากการสำรวจและการเก็บรวบรวมเชื้อราสนิมจากแหล่งปลูกต่าง ๆ ของประเทศไทย พบว่า ไอโซเลตต่าง ๆ จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *P. polysora* และแยกกลุ่มจาก *P. sorghi* ที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล Genbank

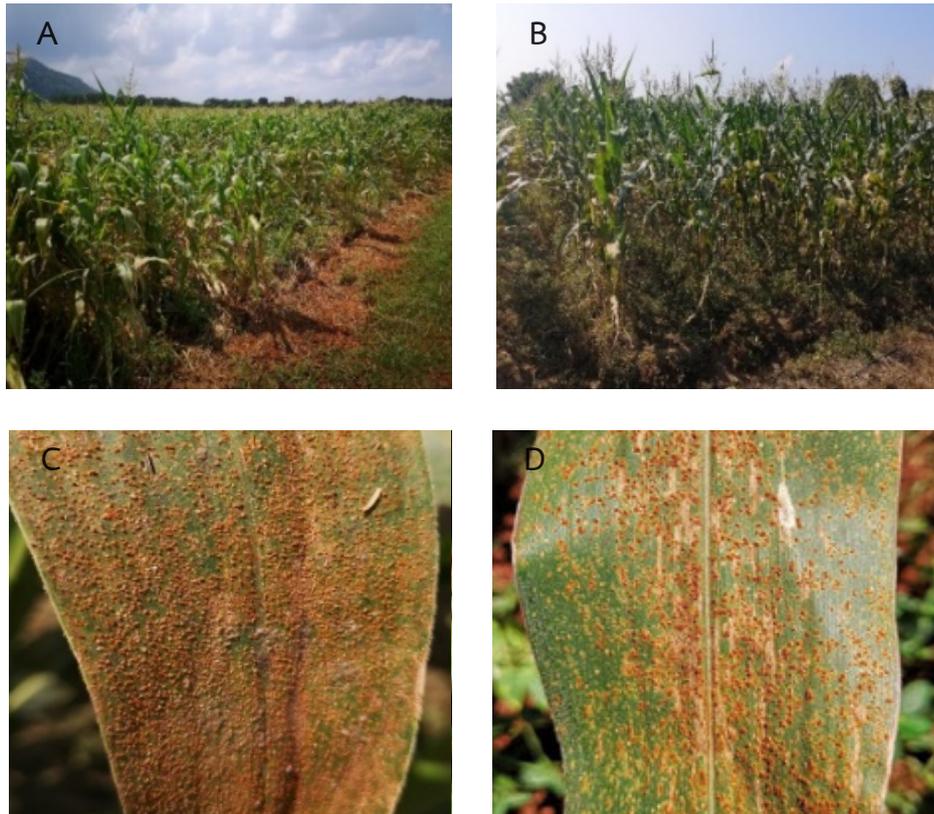


Figure 1 Symptom of corn rust disease in the fields observed at Chiang Mai Province (A, C) and Nakhon Ratchasima Province (B, D)

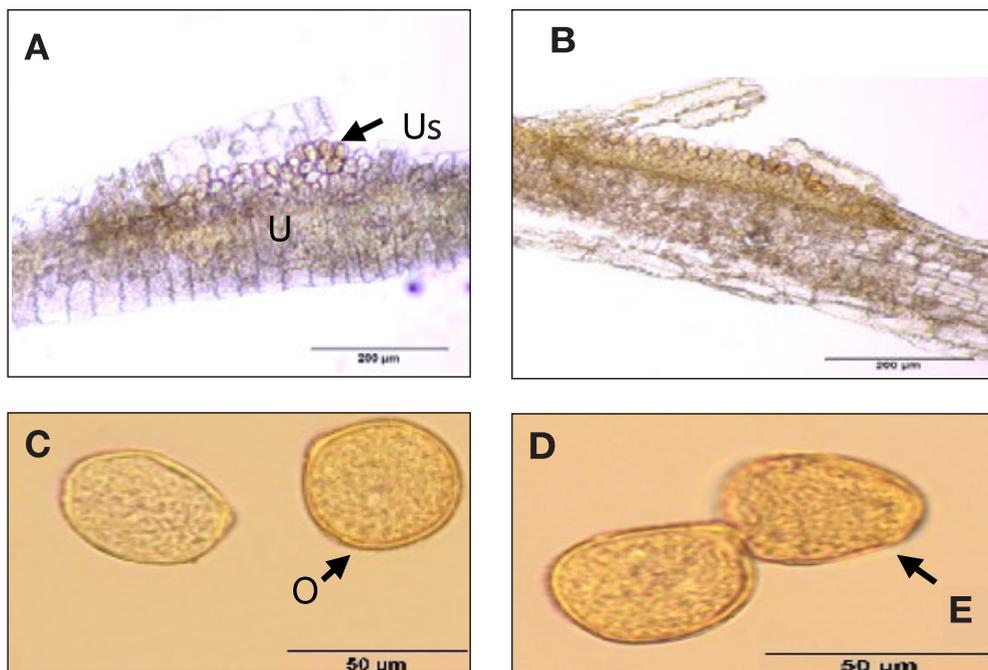


Figure 2 Morphological characters of uredium and urediospore of *Puccinia polysora* collected from Chiang Mai Province (A, C) and Nakhon Ratchasima Province (B, D) (U, uredium; Us, Urediospores; E, Ellipsoid shape; O, Ovoid shape)

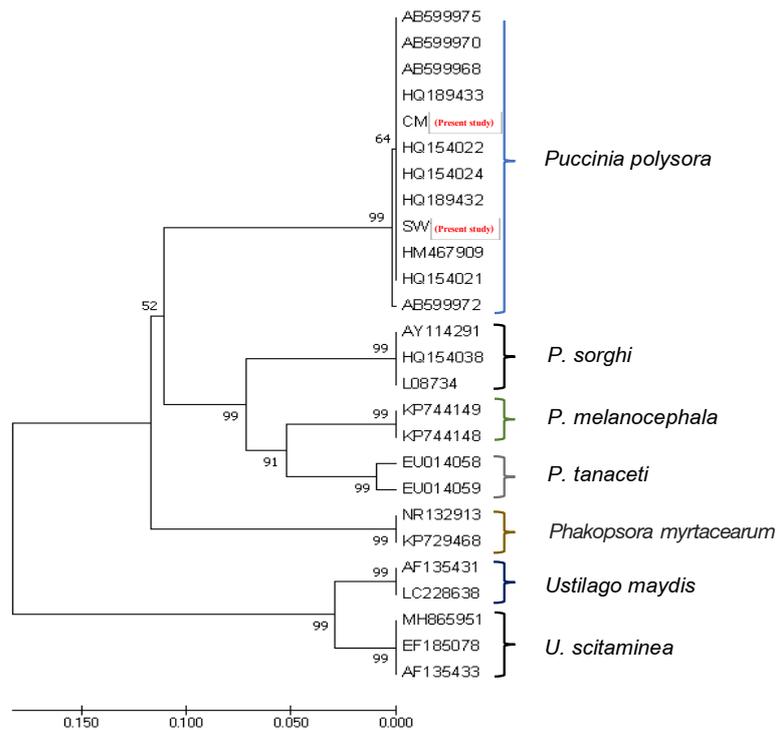


Figure 3 UPGMA tree obtained from ITS rDNA sequences of *Puccinia polysora* (CM, SW) and sequence from GenBank database using MEGA7 program. Bootstrap values are indicated on the branches (1,000 replications)

3. ประเมินโรคราสนิมของสายพันธุ์อินเบรด ข้าวโพดหวานและข้าวโพดข้าวเหนียว

จากผลการประเมินเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคราสนิมบนข้าวโพดอินเบรด จำนวน 66 สายพันธุ์ โดยการปลูกเชื้อราสนิมจาก จ.เชียงใหม่ พบว่า มีข้าวโพดที่แสดงลักษณะต้านทานสูง (highly resistance) จำนวน 15 สายพันธุ์ ข้าวโพดที่แสดงลักษณะต้านทาน (resistant) จำนวน 3 สายพันธุ์ ข้าวโพดที่แสดงลักษณะต้านทานปานกลาง (moderately resistant) จำนวน 17 สายพันธุ์ ข้าวโพดที่แสดงลักษณะอ่อนแอปานกลาง (moderately susceptible) จำนวน 21 สายพันธุ์ และข้าวโพดที่มีลักษณะอ่อนแอ (susceptible) จำนวน 8 สายพันธุ์ แต่ไม่พบลักษณะที่อ่อนแอมาก สำหรับการปลูกเชื้อราสนิมจาก ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ (ไร่สุวรรณ) พบว่า ข้าวโพดที่แสดงลักษณะต้านทานสูง มีจำนวน 2 สายพันธุ์ ข้าวโพดที่แสดง

ลักษณะต้านทาน จำนวน 1 สายพันธุ์ ข้าวโพดที่แสดงลักษณะต้านทานปานกลาง จำนวน 5 สายพันธุ์ ข้าวโพดที่แสดงลักษณะอ่อนแอปานกลาง จำนวน 37 สายพันธุ์ ข้าวโพดที่มีลักษณะอ่อนแอ จำนวน 11 สายพันธุ์ และพบลักษณะอ่อนแอมาก เพียง 1 สายพันธุ์ (Table 2, Figure 4) และมี 2 สายพันธุ์ที่ไม่ออก คือ Bio18-41 และ Bio18-42

เมื่อพิจารณาผลการปลูกเชื้อจาก ทั้ง 2 แหล่งเชื้อ พบว่า มีข้าวโพดที่แสดงลักษณะต้านทานสูงเหมือนกัน จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ Bio18-1 และ Bio 18-35 สายพันธุ์ที่แสดงลักษณะต้านทานปานกลาง จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Bio18-11, Bio18-12 และ Bio18-16 สายพันธุ์แสดงลักษณะอ่อนแอปานกลาง จำนวน 13 สายพันธุ์ ได้แก่ Bio18-3, Bio18-4, Bio18-5, Bio18-19, Bio18-24, Bio18-34, Bio18-44, Bio18-45, Bio18-48, Bio18-49, Bio18-50, Bio18-59 และ

Bio18-61 สายพันธุ์ที่มีลักษณะอ่อนแอ จำนวน 1 สายพันธุ์ ได้แก่ Bio18-22 และมี 9 สายพันธุ์ที่ไม่ออกคือ Bio18-23, Bio18-26, Bio18-28, Bio18-30, Bio18-32, Bio18-46, Bio18-57, Bio18-58 และ Bio18-67 อย่างไรก็ตาม มีข้าวโพดหลายสายพันธุ์ที่แสดงลักษณะที่ต่างกัน เมื่อปลูกด้วย

เชื้อราสนิมทั้ง 2 แหล่ง เช่น Bio18-43 แสดงลักษณะต้านทานต่อแหล่งเชื้อจาก จ.เชียงใหม่ แต่แสดงลักษณะอ่อนแอปานกลางต่อแหล่งเชื้อจาก จ.นครราชสีมา จากผลการปลูกเชื้อนี้แสดงให้เห็นว่ามีความผันแปรและแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์เชื้อราสนิมในการเข้าทำลายข้าวโพดพันธุ์ต่าง ๆ (Figure 5)

Table 2 The phenotype of corn inbred line inoculated by Chiang Mai isolate and Nakhon Ratchasima isolate of corn rust fungi, *Puccinia polysora*

| Phenotype | Variety no. (Bio18-) | |
|-----------|---|--|
| | Chiang Mai inoculum | Nakhon Ratchasima inoculum |
| HR | 1, 7, 9, 13, 14, 15, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 56, 65, 66 | 1, 35 |
| R | 43, 57, 64 | 20 |
| MR | 6, 8, 10, 11, 12, 16, 17, 20, 26, 27, 29, 31, 33, 46, 53, 55, 62 | 9, 11, 12, 15, 16, 40 |
| MS | 3, 4, 5, 18, 19, 24, 28, 30, 32, 34, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 58, 59, 60, 61, 63 | 2, 3, 4, 5, 6, 7, 13, 14, 19, 21, 24, 25, 29, 31, 33, 34, 37, 38, 42, 43, 44, 45, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 59, 61, 62, 64, 65, 66 |
| S | 2, 21, 22, 23, 25, 51, 52, 54 | 8, 10, 17, 22, 27, 36, 39, 41, 47, 63 |
| HS | - | 18 |

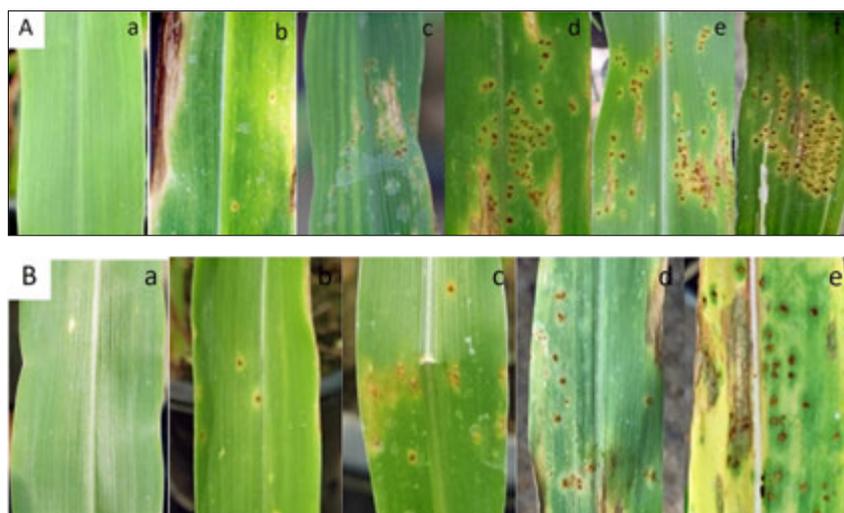


Figure 4 Symptom and phenotype of corn rust disease after inoculation with *Puccinia polysora* collected from Nakhon Ratchasima province (A) and Chiang Mai province (B) a: Highly resistance (HR), b: Resistance (R), c: Moderately resistance (MR), d: Moderately susceptible (MS), e: susceptible (S), f: Highly susceptible (HS)

ปีพม่า (2555) ได้ประเมินการเกิดโรค ราสนิมและความรุนแรงของโรคบนข้าวโพด สายพันธุ์แท้ Ki1-Ki52 ในพื้นที่ที่ตั้งอยู่ในภูมิศาสตร์ ที่ต่างกัน ได้แก่ จ.สงขลา, จ.นครราชสีมา, จ.ลำปาง และ จ.กาญจนบุรี พบว่า ข้าวโพดทั้ง 52 สายพันธุ์ (Ki1-Ki52) มีลักษณะความต้านทานต่อโรคราสนิม แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ที่ทดสอบโรค จากผลการ ทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อราสนิมที่ระบาดใน แต่ละพื้นที่ที่มีความผันแปรภายในสปีชีส์หรือมี ความแตกต่างในระดับสายพันธุ์ของเชื้อราในการ ก่อให้เกิดโรค

4. การค้นหา QTL ที่อธิบายลักษณะความ ต้านทานต่อโรคราสนิมด้วยเทคนิค Genome wide association study (GWAS)

จากการวิเคราะห์ association โดยใช้ ข้อมูล SNP ทั้งจีโนม จำนวน 159,201 ตำแหน่ง โดยทำการคัดกรอง (filter) จาก SNPs จำนวน 518,457 ตำแหน่ง โดยเลือกตำแหน่ง SNPs ที่มี ค่า minor allele frequency มากกว่า 5 % (MAF > 0.05) และไม่มีข้อมูลสูญหายมากกว่า 10% รวมถึง มีการตัดจำนวนตัวอย่างที่มีค่า heterozygosity ที่มากกว่า 20 % และจากการลดจำนวนความถี่ ของจำนวน SNP ด้วยการทำ Linkage Disequilibrium based SNP pruning (Thinning) ใน ระยะ 1 Kb แล้ววิเคราะห์ GWAS ด้วยโปรแกรม GAPIT โดยใช้วิธีการ MLM (mixed linear model)

แบบ PCA+K ซึ่งใช้ค่า PCA (principal component analysis) 3 ระบายแรก (PC1-3 dimensions) และ Kinship matrix (K) ร่วมวิเคราะห์ในสมการ ของ linear model พบ ตำแหน่ง SNP, AX-91585214 อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 3 (QTL__chr3) และตำแหน่ง SNP, AX-91180376 อยู่บน โครโมโซมที่ 10 (QTL__chr10) (Figure 6, Figure 7) มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ ($-\log_{10}(p) > 3.5$) กับลักษณะความ ต้านทานโรคราสนิมแหล่งเชื้อจาก จ. นครราชสีมา และลักษณะความต้านทานโรคราสนิมแหล่งเชื้อ จาก จ.เชียงใหม่ ตามลำดับ (Table 3) (Figure 8) จากการค้นหาตำแหน่งยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะ ความต้านทาน Wanlayaporn *et al.* (2013) พบ QTLs ต้านทานต่อโรคราสนิมบนโครโมโซมคู่ 1, 6 และ 10 ในข้าวโพดหวาน recombinant inbred lines (RILs) จากการทดสอบโรคที่ศูนย์วิจัย ข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ (ไร่สุวรรณ) และ sweet seeds research station นอกจากนี้ Ce *et al.* (2019) ได้ทดสอบพันธุ์ต้านทานต่อโรค ราสนิมข้าวโพดบนลูกผสมกลับช่วงที่ 1 ของ Recombination inbred line (RIL) จำนวน 118 พันธุ์ จาก 3 แหล่งปลูกและวิเคราะห์ร่วมกับ genetic map constructed จาก 1635 SNP markers พบตำแหน่งยีนบนโครโมโซมคู่ 4 (qSCR4.08) และ 9 (qSCR9.04).

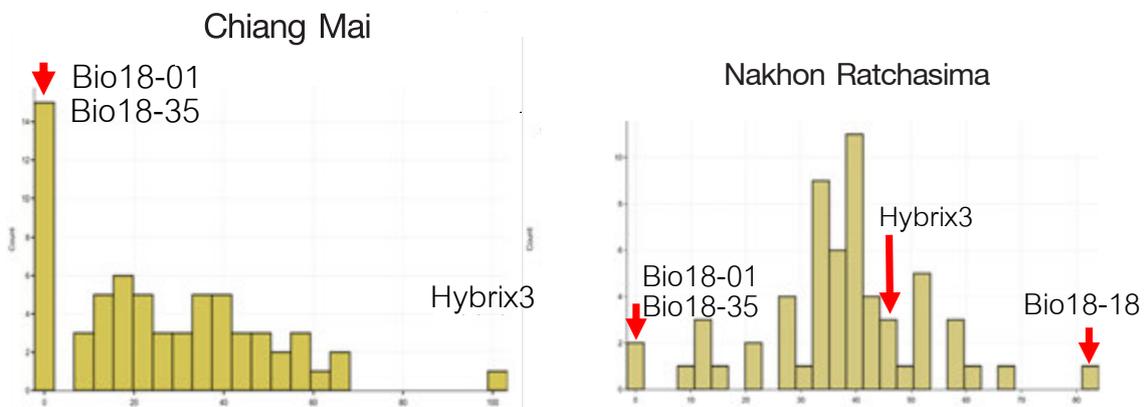


Figure 5 Histogram with fit normal model of phenotype distribution on several corn inbred line causes by rust fungi isolated Chiang Mai (A) and Nakhon Ratchasima (B)

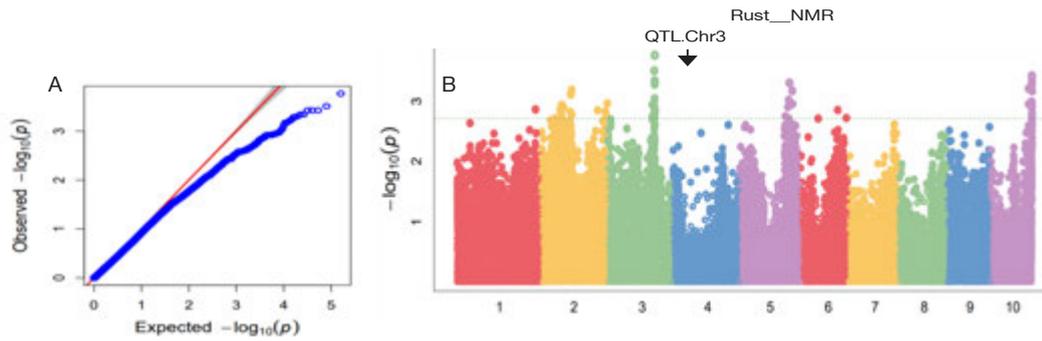


Figure 6 The analysis of resistance gene in corn to *P. polysora* from Nakhon Ratchasima inoculum (A) Inflation depicted by Q-Q plots of observed versus the expected $-\log_{10}(P)$ plot using MLM and kinship matrix. (B) Manhattan plot with the individual SNPs on the X-axis and $-\log_{10}(P)$ values of each SNP on the Y-axis. The red vertical line showed the significant associations with SNPs of disease response P values ≤ 0.05

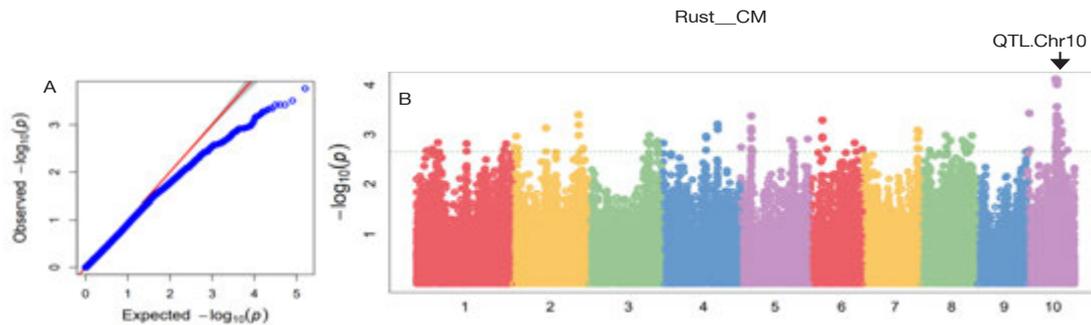


Figure 7 The analysis of resistance gene in corn to *P. polysora* from Chiang Mai inoculum (A) Inflation depicted by Q-Q plots of observed versus the expected $-\log_{10}(P)$ plot using MLM and kinship matrix. (B) Manhattan plot with the individual SNPs on the X-axis and $-\log_{10}(P)$ values of each SNP on the Y-axis. The red vertical line showed the significant associations with SNPs of disease response P values ≤ 0.05

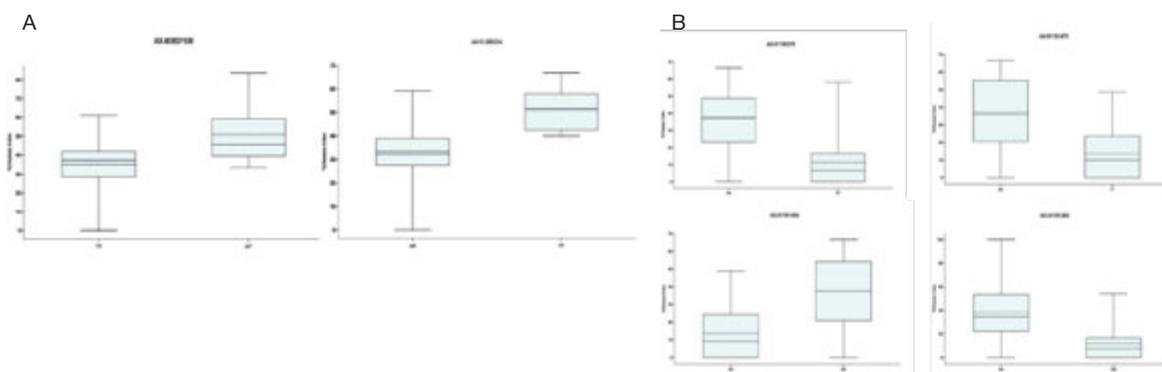


Figure 8 Box plot that show the result of allele effect of SNPs position that most relatively with rust disease resistance (A: Nakhon Ratchasima isolate), (B: Chiang Mai isolate) on chromosome 3 (QTL__chr3, AX91585214, AX90837106) and 10 (QTL__chr10, AX91180376, Ax91181475, AX91181454, AX91181383)

Table 3 SNP location and target genes in the LD of SNPs associated with the characterization of corn rust resistance

| Trait | Isolate | SNP | Chr | Position (MDB_V2) | Position (MDB_V4) | Allele | -log10(p) | MAF | R2 | Effect | QTL | Gene ID | Candidate gene |
|-------|---------|-------------|-----|-------------------|-------------------|--------|-----------|------|------|--------|-----------|----------------|--|
| Rust | NRM | AX-91585214 | 3 | 169538777 | 172146164 | A/T | 3.77 | 0.25 | 0.31 | 11.80 | qtl_chr3 | Zm00001d042561 | Mitogen-activated protein kinase kinase 9 |
| | | AX-90837106 | 3 | 168009664 | 170594609 | A/T | 3.51 | 0.08 | 0.28 | 22.83 | | Zm00001d042524 | DNA-directed RNA polymerase II subunit 1 |
| CM | | AX-91180376 | 10 | 89111440 | 89274935 | A/T | 4.11 | 0.49 | 0.24 | -11.28 | qtl_chr10 | Zm00001d024814 | MYB-related-transcription factor 9 |
| | | AX-91181475 | 10 | 93139246 | 93371833 | A/T | 4.09 | 0.47 | 0.24 | -11.40 | | Zm00001d024894 | Putative thioredoxin superfamily protein Embryonic over 1-like |
| | | AX-91181454 | 10 | 93151168 | 93383754 | A/C | 4.01 | 0.48 | 0.23 | 11.90 | | Zm00001d024895 | protein%3 B protein Zn-nger%252C RanBP-type%252C containing |
| | | AX-91181383 | 10 | 92819057 | 93047655 | A/G | 3.56 | 0.50 | 0.20 | -10.48 | | Zm00001d024889 | protein Probable carbohydrate esterase |
| | | | | | | | | | | | | Zm00001d024890 | esterase |
| | | | | | | | | | | | | Zm00001d024891 | Beta-glucosidase 17 DNA-directed RNA |
| | | | | | | | | | | | | Zm00001d042524 | polymerase II subunit 1 Mitogen-activated protein |

LD decay = 210 kb

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบและประเมินโรคราสนิมที่เกิดจากเชื้อรา *P. polysora* 2 สายพันธุ์ พบว่ามีข้าวโพดพันธุ์เดียวกันแสดงระดับความต้านทานในระดับเดียวกัน และแตกต่างกัน จากการปลูกเชื้อราสนิมทั้ง 2 แหล่งเชื้อ แสดงให้เห็นว่า เชื้อราสนิม *P. polysora* มีความผันแปรหรือความแตกต่างในระดับสายพันธุ์และมีความสามารถก่อให้เกิดโรคต่างกัน ดังนั้น ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดต้านทานโรคราสนิม ควรใช้แหล่งของเชื้อราในการทดสอบโรคมากกว่าแหล่งเดียว เพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวโพดที่ต้านทานครอบคลุมแหล่งของเชื้อที่ระบาดในประเทศไทย การค้นหายีนหรือ QTL ด้วยเทคนิค GWAS สามารถหาตำแหน่ง QTL ที่เกี่ยวข้องหรือสัมพันธ์กับความต้านทานโรคราสนิมบนโครโมโซมคู่ที่ 3 จากแหล่งเขื่อนนครราชสีมา และโครโมโซมคู่ที่ 10 จากแหล่งเชื้อเชียงใหม่ โดยตำแหน่ง QTL นั้นมีขนาดประมาณ 210 Kb.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) สนับสนุนเงินทุนในการวิจัย (เลขที่โครงการ P-17-52167) ศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท จ.ชัยนาท ในการสนับสนุนเมล็ดพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง และภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

จินตนา อันอาดมิ่งงาม. 2562. *เทคนิควิจัยเชื้อราสาเหตุโรคพืช*. สำนักพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 164 หน้า

ปัทมา จันทร์เรือง. 2555. *การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อราสนิมบนข้าวโพด*

สายพันธุ์แท้เกษตรศาสตร์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน, นครปฐม. 110 หน้า.

- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2562. ส่งออกข้าวโพดหวานทิศทางสดใส ครองแชมป์ส่งออก อันดับ 1 ของโลก. แหล่งข้อมูล: <https://bit.ly/3iwJMdV>. สืบค้น: 31 สิงหาคม 2563.
- Brewbaker, J. L., S. Kim, K. So, Y. S. Logroo, M. H. G. Moon, and R. Ming. 2011. General resistance in maize to southern rust (*Puccinia polysora* Underw). *Crop Sci.* 51:1393–1409
- Casela, C., B. Renfro, and A. F. Krattiger. 1998. *Diagnosing maize diseases in Latin America*. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, NY (EUA). 69 PP.
- Ce, D., Li, H. Tian, Z. Chen, J. Chen, G. X. Zhang, J. Ding, and Y. Chang. 2019. New QTL for resistance to *Puccinia polysora* Underw in maize. *JAG.* 60:147-150.
- Dolezal, W., K. Tiwari, R. Kemerait, J. Kichler and J. Pataky. 2009. An unusual occurrence of Southern rust, caused by *Rpp9*-virulent *Puccinia polysora* on corn in Southwestern Georgia. *Plant Dis.* 93:676–676.
- Dolezal, Wm. E. 2010. *Corn Rust Identification*. Pioneer Hi-Bred International, Inc., Johnston, IA. USA. 31 pp.
- Liu, Z., S. Wang, J. Dai, L. Huang and H. Cao. 2003. Studies of genetic analysis and SSR linked marker location of gene resistance to southern rust in inbred line P25 of maize. *Acta Genet. Sin.* 30: 706-710.

- Melching, J.S. 1975. *Corn Rusts: Types, Races and Destructive Potential*. Proceedings of the 13th Annual Corn and Sorghum Research Conference. Publication No. 30 American Seed Trade Association. 24 pp.
- Schnable, P., D. Ware, R. Fulton and C. Joshua. 2009. The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity and Dynamics. *Science*. 326(5956): 1112-1115.
- Tang, Z., S. Li, Q. Nong, and L. Qin. 2013. Identification and evaluation of maize germplasm resources against southern corn rust. *Journal of Southern Agriculture*. 44(5):765-768.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson and D. G. Higgins. 2003. Multiple sequence alignment using Clustal W and Clustal X. *Current protocols in bioinformatics*.1: 2-3.
- Unartgam, J., P. Janruang and C. To-anan. 2011. Genetic diversity of *Puccinia polysora* in Thailand based on inter simple sequence repeat (ISSR) markers analysis. *J. Agri. Technol*. 7(4): 1125-1137.
- Virtudazo, E. V., H. Nakamura and M. Kakishima. 2001. Phylogenetic analysis of sugarcane rusts based on sequences of ITS, 5.8 S rDNA and D1/D2 regions of LSU rDNA. *J. Gen. Plant Pathol*. 67(1): 28-36.
- Wanlayaporn, K., J. Authrapun, A. Vanavichit, and S. Trangoonrung. 2013. QTL Mapping for Partial Resistance to Southern Corn Rust Using RILs of Tropical Sweet Corn. *Am. J. Plant Sci*. 4:878-889.
- Wang, X., Y. Zhang, X. Xu, H. Li, X. Wu, S. Zhang and X. Li. 2014. Evaluation of maize inbred lines currently used in Chinese breeding programs for resistance to six foliar diseases. *Crop Sci*. 4: 213-222.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* 18(1): 315-322.
- White, D.G. 2000. *Compendium of Corn Diseases*. APS Press. Minnesota. USA. 78 pp.
- Yap, I. and R.J. Neison. 1996. Winboot: A Program for Performing Bootstrap Analysis of Binary Data to Determine the Confidence Limits of UPGMA-Based Dendrograms. IRRI Discussion Paper Series 14. International Rice Research Institute. Manila, Philippine 22 pp.