

การตรวจสอบความต้านทานโรคราแป้งในถั่วลันเตา โดยเครื่องหมายโมเลกุล

Investigation of Powdery Mildew Resistance in *Pisum sativum* L. by Molecular Marker

กมล ทิพโชติ^{1/} วิณัน บัณฑิตย์^{1/} และ ณัฐา โพธาภรณ์^{1/}

Kamon Thippachote^{1/}, Weenun Bundithya^{1/} and Nuttha Potapohn^{1/}

Abstract: Powdery mildew is a major disease which causes losses in both quality and yield in pea. Improvement for disease resistant varieties is an effective strategy to solve this problem. Sequence characterized amplified region (SCAR) was employed for screening powdery mildew resistance in pea. Fang 7 (BC₁F₅) and Nong-ook varieties were tested using ScOPD10 primer. The results showed that Fang 7 (BC₁F₅) had resistant marker whereas Nong-ook did not have any marker associated with resistance. However, phenotypic evaluation showed that both Fang 7 (BC₁F₅) and Nong-ook were resistant to powdery mildew. Crosses between Fang 7 (BC₁F₅) line and Nong-ook variety were made and the F₁- generation plants were allowed for selfed-pollination. Progenies of F₂ were planted and evaluated by both phenotype and resistance marker. The result showed that phenotypic evaluation could not distinguish non resistance and resistance plants whereas molecular marker could detect resistance plants.

Keywords: Pea (*Pisum sativum* L.), SCAR marker, powdery mildew

^{1/} ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

^{1/} Department of Plant Science and Natural Resources, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

บทคัดย่อ: โรคราแป้งเป็นโรคสำคัญที่สร้างความเสียหายต่อคุณภาพและผลผลิตของถั่วลิสง การพัฒนาพันธุ์ต้านทานโรคเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการแก้ไขปัญหา เครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCAR เป็นเทคนิคที่ช่วยในการคัดเลือกถั่วลิสงต้านทานโรคราแป้ง ถั่วลิสงรุ่นพ่อแม่พันธุ์ฝาง 7 รุ่น BC₁F₅ และพันธุ์หนองอูถูก ทดสอบโดยใช้ไพรเมอร์ ScOPD10 พบว่าพันธุ์ฝาง 7 รุ่น BC₁F₅ ปรากฏเครื่องหมายต้านทานโรคราแป้ง แต่ไม่พบในพันธุ์หนองอูถูกซึ่งถูกประเมินว่าสามารถต้านทานโรคราแป้งจากลักษณะปรากฏ ทำการผสมพันธุ์ระหว่างทั้งสองพันธุ์และปล่อยให้เกิดการผสมตัวเอง ปลูกลูกผสมรุ่นที่ 2 เพื่อประเมินการเกิดโรคจากลักษณะปรากฏและเครื่องหมายโมเลกุล พบว่าการประเมินจากลักษณะปรากฏไม่สามารถแยกระหว่างต้นที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคได้ ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุลสามารถตรวจสอบต้นที่ต้านทานโรคได้

คำสำคัญ: ถั่วลิสง เครื่องหมายสการ์ โรคราแป้ง

คำนำ

ถั่วลิสง (*Pisum sativum* L.) เป็นพืชผักวงศ์ถั่วที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่มีการใช้ประโยชน์ได้ทั้งเมล็ด ต้นอ่อน ยอด และฝัก พืชชนิดนี้ยังเป็นพืชนิยมของกลุ่มคนที่นิยมบริโภคอาหารมังสวิรัตเนื่องจากเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญทดแทนเนื้อสัตว์ โรคที่สำคัญที่พบเสมอในการปลูกถั่วลิสงคือการเข้าทำลายของเชื้อโรคราแป้ง (*Erysiphe pisi*) (Tiwarei et al., 1998) ทำให้ผลผลิตได้รับความเสียหายทั้งทางคุณภาพและปริมาณ โดยทั่วไปแล้วเกษตรกรมีการใช้สารเคมีควบคุมเมื่อเกิดการระบาดของโรคนี้ แต่การป้องกันกำจัดราแป้งโดยการใช้สารเคมีเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิต อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และความปลอดภัยของผู้บริโภคหากมีการปนเปื้อนของสารเคมี การใช้สารเคมีปริมาณมากอาจทำให้เชื้อดื้อยาและเกิดสารพิษตกค้างในผลผลิต เนื่องจากพืชชนิดนี้เก็บเกี่ยวผลผลิตในระยะฝักสด ทำให้ผลผลิตไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานเกษตรที่ดีและเหมาะสม

การพัฒนาสายพันธุ์พืชให้ต้านทานโรคราแป้งถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการแก้ไขปัญหาที่มีรายงานการค้นพบยีนต้านทานโรคราแป้งในถั่วลิสงซึ่งควบคุมด้วยยีนด้อย 2 ยีน คือ *er1* และ *er2* (Heringa et al., 1969; Tiwarei et al., 1997) หลังจากนั้น Fondevilla et al. (2007) ได้รายงานการค้นพบยีน *Er3* ซึ่งเป็นยีนเด่นควบคุมโรคราแป้งใน *Pisum fulvum* และได้ทำการย้ายยีนชนิดนี้สู่ *P. sativum* เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์

การคัดเลือกพืชที่ต้านทานโรคโดยการสังเกตลักษณะปรากฏเป็นสิ่งที่ค่อนข้างยากมากในงานปรับปรุงพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าสภาพอากาศไม่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายของโรคพืช (Janila and Sharma, 2004) การใช้ประโยชน์จากเครื่องหมายโมเลกุลถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อช่วยค้นหาพันธุ์ที่ต้องการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเทคนิค SCAR ที่มีรายงานในการศึกษายีนต้านทานโรคราแป้งในถั่วลิสง (Janila and Sharma, 2004; Fondevilla et al., 2008; Katoch et al., 2010) อัญชัญ (2555) ได้รายงานการคัดเลือกเครื่องหมาย SCAR เพื่อใช้ตรวจสอบลักษณะต้านทานโรคราแป้งที่เหมาะสมกับถั่วลิสงในประเทศไทย พบว่าไพรเมอร์ ScOPD10 สามารถตรวจสอบลักษณะต้านทานโดยแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 850 คู่เบส

ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกต้นถั่วลิสงโดยการประเมินลักษณะการเกิดโรคและใช้เครื่องหมาย SCAR จากไพรเมอร์ ScOPD10 เพื่อช่วยคัดเลือกต้นถั่วลิสงที่ต้านทานโรคราแป้งในงานพัฒนาพันธุ์ถั่วลิสง

อุปกรณ์และวิธีการ

การประเมินลักษณะปรากฏการณืต้านทานโรคราแป้งในรุ่นพ่อแม่

เมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงจากมูลนิธิโครงการหลวง 2 พันธุ์ คือพันธุ์ฝาง 7 รุ่น BC₁F₅ ที่ได้จากการพัฒนาพันธุ์ฝาง 7 ให้ต้านทานโรคราแป้งโดยผสมกับพันธุ์ P 309 ซึ่ง

เป็นพันธุ์ต้านทาน (อัญชัย, 2550) และพันธุ์หนองอุกจาก ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงปางอุ๋ง ซึ่งมีลักษณะต้นเตี้ย ใบ พัฒนาเป็นมือจับ (tendrils) และมีการแตกกิ่งแขนงบริเวณ ข้อล่างของลำต้น ปลูกถั่วลิสงเตาทั้งสองพันธุ์เพื่อคัดเลือก ต้นที่ต้านทานต่อโรคราแป้งเพื่อใช้เป็นคู่ผสมโดยการ ประเมินเปรียบเทียบกับพันธุ์ฝาง 7 (พันธุ์อ่อนแอ) และ พันธุ์ P 309 (พันธุ์ต้านทาน) ซึ่งแต่ละพันธุ์มีการปลูก จำนวน 100 ต้น แยกกันในแต่ละแปลง ทดสอบในเดือน ธันวาคม พ.ศ. 2552 – มีนาคม พ.ศ. 2553 ณ สถานี เกษตรหลวงปางดะ อ. สะเมิง จ. เชียงใหม่ ซึ่งเป็นสถานี วิจัยที่มีการพัฒนาพันธุ์ถั่วลิสงเตาและเป็นพื้นที่ที่เคยมีการ ระบาดของโรคราแป้ง บันทึกวันที่เริ่มมีการเข้าระบาดของ โรคราแป้งหลังจากเพาะเมล็ด และคัดเลือกต้นถั่วลิสงเตาที่ แสดงลักษณะต้านทานต่อโรคราแป้งแต่ละสายพันธุ์โดย สังเกตลักษณะปรากฏในระยะออกดอก เปรียบเทียบกับ พันธุ์ฝาง 7 (พันธุ์อ่อนแอ) และพันธุ์ P 309 (พันธุ์ ต้านทาน) โดยประเมินเปรียบเทียบการเกิดโรคตลอดทั้ง ต้น ซึ่งต้นที่ต้านทานโรคนั้น จะมีลักษณะเช่นเดียวกับ พันธุ์ P 309 สุ่มเก็บตัวอย่างใบอ่อนของพืชบริเวณปลาย ยอดที่ยังไม่มีการเข้าทำลายจากโรคราแป้ง เพื่อตรวจสอบ ยีนต้านทานโรคราแป้งด้วยเครื่องหมาย SCAR เพื่อช่วย ยืนยันลักษณะต้านทานโรคราแป้ง

การผสมพันธุ์ถั่วลิสงเตาพันธุ์ฝาง 7 รุ่น BC₁F₅ และ พันธุ์หนองอุก

หลังจากการประเมินลักษณะต้านทานโรครา แป้งในรุ่นพ่อแม่แล้ว คัดเลือกต้นที่ต้านทานโรคราแป้งมา ผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ฝาง 7 รุ่น BC₁F₅ และพันธุ์หนองอุก เก็บเมล็ดลูกผสมแล้วปลูกรุ่นที่ 1 ในเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2553 – สิงหาคม พ.ศ. 2553 ณ ศูนย์พัฒนาโครงการ หลวงขุนวาง อ. แม่จาง จ. เชียงใหม่ ปล่อยให้ผสมตัวเอง (selfing) เก็บเมล็ดรุ่นที่ 2 นำเมล็ดปลูกต่อ ณ สถานี เกษตรหลวงปางดะ อ. สะเมิง จ. เชียงใหม่ ในเดือน ตุลาคม พ.ศ. 2554 – มกราคม พ.ศ. 2555 โดยปลูกพันธุ์ ฝาง 7 รุ่น BC₁F₅, พันธุ์หนองอุกจากต้นที่ให้ลักษณะ ต้านทานโรคราแป้ง พันธุ์ฝาง 7 (พันธุ์อ่อนแอ) และพันธุ์ P 309 (พันธุ์ต้านทาน) เพื่อใช้เปรียบเทียบลักษณะการ ต้านทานโรคราแป้งในลูกผสมระยะออกดอก โดยวาง

แผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (randomized complete block design; RCBD) ปลูกพันธุ์ละ 26 ต้น จำนวน 5 บล็อก (แปลง) เตรียมแปลงขนาดกว้าง 50 เซนติเมตร ยาว 21.6 เมตร ภายในโรงเรือน แล้วคลุมแปลง ด้วยพลาสติกสีดำ เจาะรูในระยะปลูกห่าง 10 เซนติเมตร ซึ่งแต่ละแปลงปลูกเป็นสองแถว ซึ่งตาข่ายบริเวณ กลางแปลง ให้น้ำด้วยระบบน้ำหยด และใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ไม่มีการใช้ยากำจัดเชื้อรา เพื่อให้ เชื้อสาเหตุโรคราแป้งเกิดได้อย่างสมบูรณ์ นับสัดส่วนการ กระจายตัวระหว่างต้นที่ต้านทานโรคและไม่ต้านทานโรค และสุ่มคัดเลือกต้นถั่วลิสงเตาที่ต้านทานโรคราแป้งเพื่อเก็บ ตัวอย่างใบอ่อนบริเวณที่ยังไม่มีการเข้าทำลายจากโรครา แป้งจากรุ่นที่ 2 จำนวน 20 ต้น เพื่อยืนยันลักษณะการ ต้านทานโรคด้วยเครื่องหมาย SCAR

การตรวจสอบลักษณะการต้านทานโรคราแป้งด้วย เครื่องหมาย SCAR

สุ่มตัวอย่างถั่วลิสงเตารุ่นพ่อแม่และลูกผสมรุ่นที่ 2 เพื่อสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อน โดยใช้ Plant DNAzol® reagent (DNAzol ES) เตรียมส่วนผสมปริมาตร 20 µl ต่อ 1 ตัวอย่าง ประกอบด้วย 8 ng DNA template, 1X reaction buffer, 0.5 mM dNTPs, 80 ng ScOPD10 primer ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถตรวจสอบ ยีนต้านทานโรคราแป้งได้ที่ตำแหน่ง 850 bp ซึ่งมีลำดับ นิวคลีโอไทด์ดังนี้ : forward 5' GGTCTACACCTCATCTTGATGA 3' และ reverse 5' GGTCTACACCTAAACAGTGTCCGT 3' (อัญชัย, 2555), 1 Unit *i-Taq*TM DNA polymerase (iNtRON Biotechnology, Inc.) และน้ำกลั่น จากนั้นนำไปเพิ่ม ปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR ตามเงื่อนไขดังนี้ อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 42 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 44 รอบ และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ นำ ผลผลิต PCR ไปแยกขนาดด้วย 1% gel electrophoresis ที่ 100 โวลต์ ใน 1X TBE buffer จากนั้นนำแผ่นเจลไป ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วบันทึกภาพภายใต้แสง UV โดยใช้ BIO DOC-ItTM M-20 system (Gibthai Co.Ltd.)

วิเคราะห์ผลโดยตรวจสอบการปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 850 คู่เบส

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การประเมินลักษณะปรากฏการณ์ด้านทานโรคราแป้งในรุ่นพ่อแม่

จากการคัดเลือกลักษณะด้านทานโรคราแป้งในถั่วลันเตารุ่นพ่อแม่สามารถคัดเลือกต้นที่ด้านทานโรคได้อย่างชัดเจนจากการสังเกตลักษณะการเกิดโรคเมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ด้านทานและพันธุ์อ่อนแอ (ภาพที่ 1) ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคราแป้ง ที่มีสภาพอากาศร้อนและแห้งในตอนกลางวัน แต่อากาศเย็น

ในตอนกลางคืน (Cousin, 1997; Mc Phee, 2004; Fondevilla *et al.*, 2006) ซึ่ง conidia ของเชื้อมีการงอก germ tube เข้าทำลายพืชได้ดีในช่วงที่มีอากาศแห้ง (นุชจารี, 2550) ทำให้เชื้อสาเหตุโรคพืชมีความสามารถในการเข้าทำลายพืชที่อ่อนแอต่อโรคได้อย่างสมบูรณ์ซึ่งพบว่าโรคราแป้งเริ่มมีการเข้าระบาดในวันที่ 38 หลังจากเพาะเมล็ด และประเมินการเกิดโรคในระยะออกดอกอีก 7 วันต่อมา โดยพันธุ์ฝาง 7 รุ่น BC₁F₅ ปรากฏลักษณะด้านทานโรคราแป้ง 42 ต้น และอ่อนแอต่อโรคราแป้ง 58 ต้น พันธุ์หนองอูกปรากฏลักษณะด้านทานโรคราแป้ง 46 ต้น และอ่อนแอต่อโรคราแป้ง 54 ต้น เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์ฝาง 7 ซึ่งอ่อนแอโรคราแป้ง ในขณะที่พันธุ์ P 309 ด้านทานโรคราแป้งทั้งหมด (ตารางที่ 1)

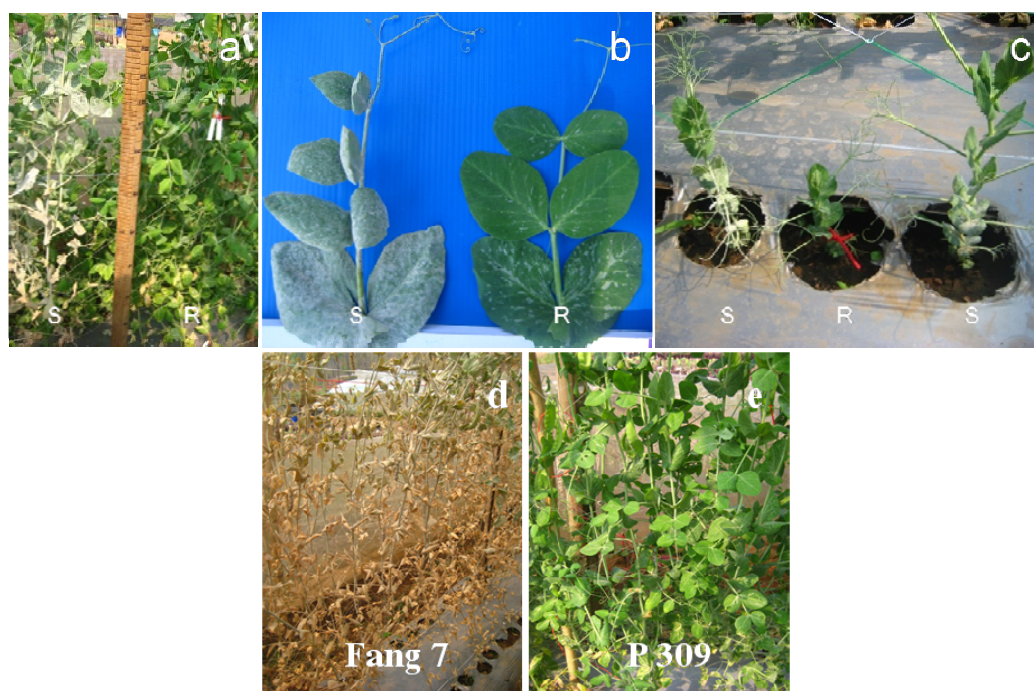


Figure 1 Characteristics of powdery mildew disease between resistant (R) and susceptible (S) peas; (a) resistant and susceptible peas in Fang 7 (BC₁F₅); (b) resistant and susceptible appearance on leaves of Fang 7 (BC₁F₅); (c) resistant and susceptible peas in Nong-ook variety; (d) susceptible peas in Fang 7; (e) resistant peas in P 309

Table 1 Powdery mildew assessment in 4 pea varieties at 42 days after seedling

Appearance of powdery mildew	Number of plants			
	Fang 7 (BC ₁ F ₅)	Nong-ook	P 309	Fang 7
Resistance	42	46	100	-
Susceptible	58	54	-	100

การผสมพันธุ์ถั่วลิสงเตาพันธุ์ฝาง 7 รุ่น BC₁F₅ และพันธุ์หนองอู

จากการผสมพันธุ์ระหว่างพันธุ์ฝาง 7 รุ่น BC₁F₅ และพันธุ์หนองอูจากต้นที่ปรากฏลักษณะต้านทานโรคราแป้งจำนวน 28 คู่ผสม ปลูกปลูกผสมรุ่นที่ 1 จำนวน 50 ต้น เพื่อปล่อยให้ลูกผสมเกิดการผสมตัวเอง พบว่าลูกผสมรุ่นที่ 1 ทุกต้นแสดงอาการอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เนื่องจากยีนที่ควบคุมการต้านทานโรคราแป้งเป็นยีนด้อย (Vaid and Tyagi, 1997) นำเมล็ดที่ได้จากการผสมตัวเองในรุ่นนี้จำนวน 130 เมล็ดไปปลูกเพื่อดูการกระจายตัวของรุ่นที่ 2 พร้อมกับพันธุ์เปรียบเทียบกับคือ พันธุ์ฝาง 7 (พันธุ์อ่อนแอ), พันธุ์ P 309 (พันธุ์ต้านทาน) และพันธุ์พ่อแม่คือ พันธุ์ฝาง 7 รุ่น BC₁F₅ และพันธุ์หนองอู ที่ผ่านการประเมินว่าต้านทานโรค พบว่ามีการระบาดของโรคในวันที่ 57 หลังจากเพาะเมล็ด ในระยะที่ถั่วลิสงเตายังไม่มีการติดดอกและฝัก โดยลูกผสมทั้งหมดมีการเข้าทำลายของโรคราแป้ง สามารถแบ่งตำแหน่งของการเข้าทำลายได้ 2 กลุ่ม คือ 1) เกิดทั้งบริเวณใบและลำต้น 2) เกิดเฉพาะบริเวณใบ แต่ไม่เกิดที่ลำต้น โดยในพันธุ์พ่อแม่คือพันธุ์ฝาง 7 รุ่น BC₁F₅ และพันธุ์หนองอู ที่ได้ผ่านการประเมินว่าเป็นต้นต้านทานโรคและพันธุ์ P 309 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานโรคมีการเข้าทำลายของโรคเกิดขึ้นที่ใบแต่ไม่ปรากฏบริเวณลำต้น (ตารางที่ 2) Janila and Sharma (2004) รายงานว่าถั่วลิสงเตาที่ต้านทานโรค ราแป้งสามารถเกิดโรคได้แต่ไม่

ปรากฏการเข้าทำลายบริเวณลำต้นและฝัก ส่วน Vaid and Tyagi (1997) ได้ประเมินการเกิดโรคราแป้งจากการสังเกต แล้วให้คะแนน 5 ระดับ ซึ่งได้จัดกลุ่มที่ 1-3 เท่านั้นที่ถือว่าเป็นต้นต้านทานโรคราแป้ง พันธุ์ฝาง 7 ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอมีการติดฝักก่อนการระบาดของโรคราแป้งในพื้นที่ปลูก ไม่พบการเกิดโรคในระยะแรกๆ ที่ทำการประเมินในวันที่ 64 หลังจากเพาะเมล็ด แต่พบการเกิดโรคในภายหลัง ซึ่งมีการระบาดที่ไม่รุนแรง โดยพบการเข้าทำลายทั้งบริเวณใบและลำต้น (ตารางที่ 2) ซึ่งการเข้าทำลายของเชื้อในระยะที่พืชมีโครงสร้างที่แข็งแรงทำให้เกิดโรคได้น้อยลง (ดำเนิน, 2545) นอกจากนั้นแล้วในระยะแรกของการปลูก สภาพอากาศมีความแปรปรวน เนื่องจากมีฝนตกมาก ทำให้สภาพอากาศมีความชื้นสูง จึงไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อสาเหตุ ซึ่งโรคราแป้งสามารถแพร่ระบาดได้ดีในสภาพอากาศร้อนและแห้งในตอนกลางวัน และอากาศเย็นในตอนกลางคืน (Cousin, 1997; Fondevilla et al., 2006; Mc Phee, 2004) ในขณะช่วงเวลาที่ศึกษามีอากาศเย็นในตอนกลางวัน ความแตกต่างของอุณหภูมิระหว่างช่วงกลางวันและกลางคืนไม่แตกต่างกันมากทำให้เกิดการระบาดของโรคช้าลง พันธุ์ฝาง 7 เป็นพันธุ์เบาให้ผลผลิตเร็ว ทำให้สามารถหลบหลีกการเข้าทำลายโรคได้ (ดำเนิน, 2545) ในขณะที่ยีนที่ปลูกทดสอบให้ผลผลิตช้ากว่าพันธุ์ฝาง 7

Table 2 Phenotypic appearance of powdery mildew within F₁ and F₂ populations in pea

Periods	Generation	Appearance of powdery mildew	
		Leaves	Stems
May 2010 – August 2010	F ₁	+	+
	Fang 7 (susceptible)	+	+
	P 309 (resistance)	-	-
October 2011 – January 2012	F ₂ (group 1)	+	+
	F ₂ (group 2)	+	-
	Fang 7 (BC ₁ F ₅)	+	-
	Nong-ook	+	-
	Fang 7 (susceptible)	+	+
	P 309 (resistance)	+	-

+: appearance of disease, - : no appearance of disease

การตรวจสอบลักษณะการต้านทานโรคราแป้งด้วยเครื่องหมาย SCAR

การตรวจสอบลักษณะการต้านทานโรคราแป้งโดยเทคนิค SCAR ด้วยไพรเมอร์ ScOPD10 จากการสุ่มตรวจต้นที่ปรากฏลักษณะต้านทานและต้นที่อ่อนในถั่วลิสงเตาแต่ละพันธุ์ พบว่าพันธุ์ฝาง 7 รุ่น BC₁F₅ ในต้นที่ปรากฏลักษณะต้านทานเกิดแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 850 คู่เบส ซึ่งเป็นเครื่องหมายของลักษณะการต้านทานโรคราแป้งในถั่วลิสงเตา (อัญชัญ, 2555) ให้ผลเช่นเดียวกับพันธุ์ P 309 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานโรค แต่ในต้นที่อ่อนแอของพันธุ์ฝาง 7 รุ่น BC₁F₅ และพันธุ์หนองอู๊ดทั้งต้นที่ถูกคัดเลือกว่าต้านทานและอ่อนแอไม่พบแถบเครื่องหมายดังกล่าว (ภาพที่ 2) ในรุ่นที่ 2 เนื่องจากสภาพอากาศมีฝนตกมากส่งผลให้การแสดงออกต่อการต้านทานโรคราแป้งของต้นที่ต้านทานไม่ชัดเจน จึงทำการสุ่มตรวจสอบในลูกผสมรุ่นที่ 2 ของต้นถั่วลิสงเตาจำนวน 20 ต้น ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 850 คู่เบส จำนวน 5 ต้น โดยให้ผลเช่นเดียวกับพันธุ์ P 309 และอีก 15 ต้นไม่ปรากฏแถบลักษณะดังกล่าว

ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับพันธุ์ฝาง 7 (ภาพที่ 3) แสดงให้เห็นว่าลักษณะการต้านทานโรคต่อลักษณะอ่อนแออยู่ในอัตราส่วน 1 : 3 ลักษณะการต้านทานโรคราแป้งในพันธุ์หนองอู๊ดอาจถูกควบคุมด้วยยีนที่แตกต่างจากที่พบในพันธุ์ฝาง 7 รุ่น BC₁F₅ จึงไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยไพรเมอร์ ScOPD10 ในพันธุ์หนองอู๊ดได้ อีกทั้งจากหลักฐานที่พบในรุ่นพ่อแม่ ถั่วลิสงเตาทั้งสองพันธุ์ปรากฏลักษณะการต้านทานโรคราแป้งอย่างชัดเจน จึงเป็นไปได้ว่าทั้งสองพันธุ์มียีนต้านทานโรคราแป้งอยู่ และลักษณะปรากฏในรุ่น F₁ ที่เกิดจากการผสมระหว่างทั้งสองพันธุ์ยังพบว่าปรากฏลักษณะไม่ต้านทานโรคทั้งหมด อันเนื่องมาจากยีนดังกล่าวอยู่คนละตำแหน่งกัน จึงปรากฏลักษณะอ่อนแอในรุ่น F₁ ทั้งนี้เพราะว่ายีนที่ควบคุมโรคราแป้งในถั่วลิสงเตามีถึง 3 ยีนคือ *er1*, *er2* เป็นยีนด้อย และ *Er3* เป็นยีนเด่น (Heringa *et al.*, 1969; Tiwari *et al.*, 1997; Fondevilla *et al.*, 2007) ซึ่งถั่วลิสงเตาที่รายงานไว้เป็นสายพันธุ์จากอินเดียและแคนาดา จึงจำเป็นต้องมีการค้นหายีนต้านทานโรคราแป้งในถั่วลิสงเตาของไทยเพิ่มเติมต่อไป

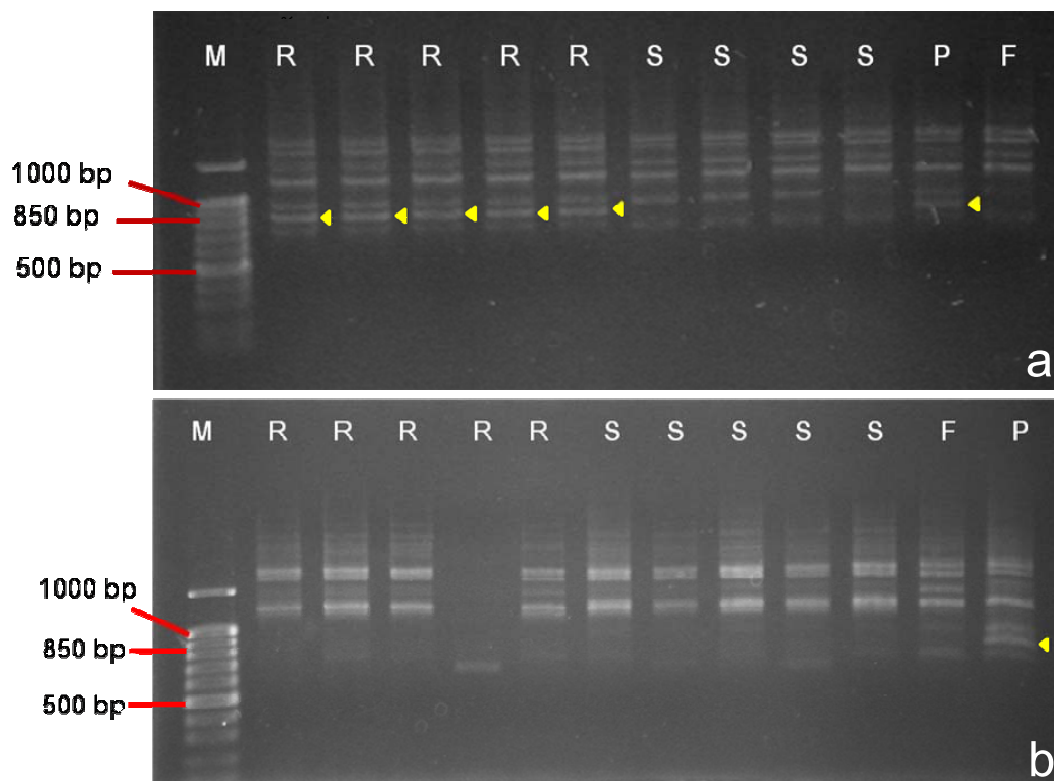


Figure 2 Banding patterns of PCR products of (a) Fang 7 (BC₁F₅) and (b) Nong-ook varieties; arrows : 850 bp fragments, M : molecular ladder, R : resistant plants, S : susceptible plants, F : Fang No. 7, P : P 309

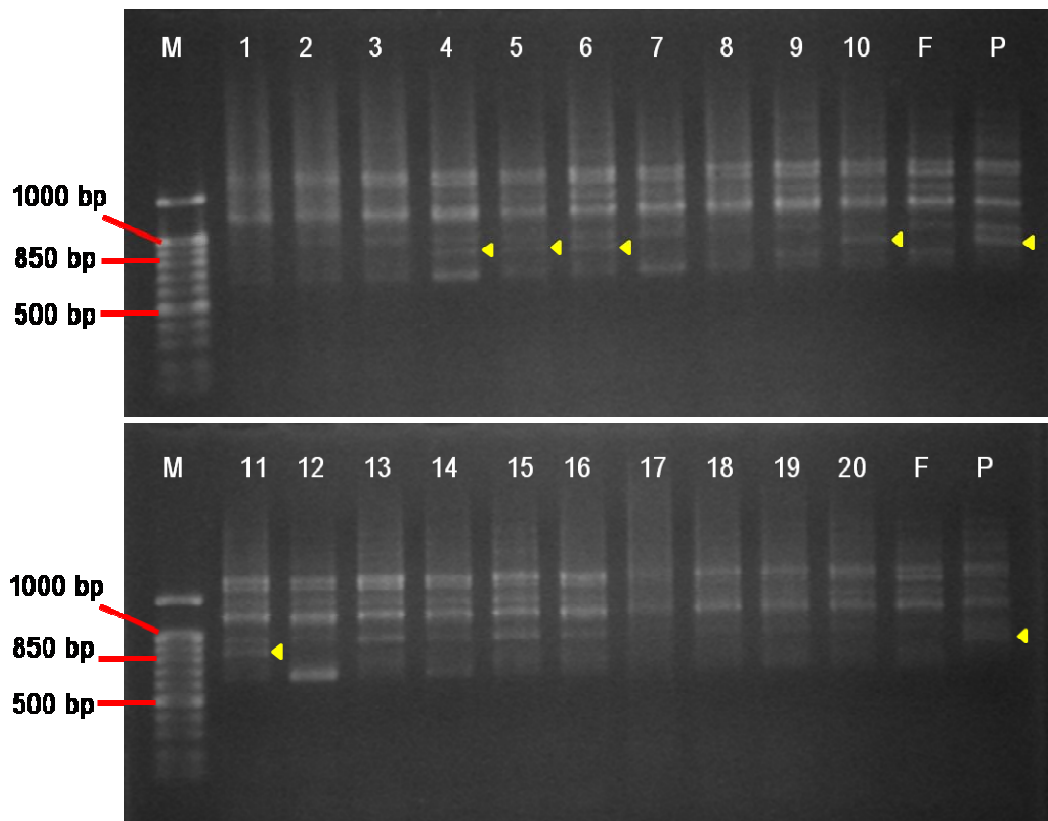


Figure 3 Banding patterns of PCR products of F_2 progenies; arrows : 850 bp fragments, M : molecular ladder, 1-20 : F_2 progenies, F : Fang No. 7, P : P 309

สรุป

การประเมินเพื่อคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วลิสงเตารุ่นพ่อแม่ 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ฝาง 7 รุ่น BC_1F_5 และพันธุ์หนองอู๊ดเพื่อใช้เป็นคู่ผสมในการพัฒนาพันธุ์ สามารถคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคได้อย่างชัดเจนจากการประเมินด้วยลักษณะปรากฏและผลของการคัดเลือก สอดคล้องกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค SCAR โดยไพรเมอร์ ScOPD10 ที่พบแถบดีเอ็นเอตำแหน่ง 850 คู่เบส ในพันธุ์ฝาง 7 รุ่น BC_1F_5 ของต้นที่ถูกคัดเลือกว่าต้านทานโรคราแป้ง แต่ไม่สามารถตรวจสอบความต้านทานโรคราแป้งในพันธุ์หนองอู๊ดได้ด้วยไพรเมอร์ดังกล่าวนี้ ส่วนการคัดเลือกความต้านทานโรคในลูกผสมรุ่นที่ 2 ไม่สามารถคัดเลือกได้จากลักษณะปรากฏเนื่องจากมีการระบาดของโรคที่รุนแรง โดยพบลูกผสมทุกต้นมีราแป้งขึ้นปกคลุม เครื่องหมาย SCAR สามารถช่วย

คัดเลือกลูกผสมที่ต้านทานโรคได้ จากการสุ่มตรวจสอบลูกผสมรุ่นที่ 2 จำนวน 20 ต้นพบว่า มี 5 ต้นที่ต้านทานโรคราแป้ง ซึ่งเป็นไปตามสัดส่วนของลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 ยีน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าลักษณะการต้านทานโรคราแป้งในพันธุ์ฝาง 7 รุ่น BC_1F_5 อาจควบคุมด้วยยีนที่ต่างจากพันธุ์หนองอู๊ด จึงควรมีการศึกษาลักษณะต้านทานโรคราแป้งในพันธุ์หนองอู๊ดเพิ่มเติมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมูลนิธิโครงการหลวงที่สนับสนุนงานวิจัย อำนวยความสะดวกและเอื้อเฟื้อสถานที่การทำงานวิจัย ขอขอบคุณ คุณอภัยชัย ชมภูพวง และ คุณอัมศยา สุริยะวงศ์ตระกูล ที่ให้คำแนะนำต่าง ๆ และบัณฑิตวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนบางส่วนในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- ดำเนิน กาละดี. 2545. เทคโนโลยีการปรับปรุงพันธุ์. พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์เมือง, เชียงใหม่. 256 หน้า.
- นุชจาวี วนาศิริ. 2550. การจัดจำแนกเชื้อราแป้งบางชนิดโดยอาศัยลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศภายใต้กล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 130 หน้า.
- อัญชัญ ชมภูพวง. 2550. ปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงและถั่วหวานเพื่อให้ผลผลิตสูงและต้านทานโรคราแป้ง. รายงานวิจัย-ประจำปี/ฉบับสมบูรณ์ ประจำปี 2550, โครงการวิจัยที่ 3011-3618. มุลนิธิโครงการหลวง, เชียงใหม่. 32 หน้า.
- อัญชัญ ชมภูพวง. 2555. การตรวจสอบลูกผสมถั่วลิสงที่ต้านทานโรคราแป้งโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ. วารสารเกษตร 28 (2):155-163.
- Cousin, R. 1997. Pea (*Pisum sativum* L.). Field Crops Research 53: 111-130.
- Fondevilla, S., A. M. Torres, M. T. Moreno and D. Rubiales. 2007. Identification of a new gene for resistance to powdery mildew in *Pisum fulvum*, a wild relative of pea. Breeding Science 57: 181-184.
- Fondevilla, S., D. Rubiales, M. T. Moreno and A. M. Torres. 2008. Identification and validation of RAPD and SCAR markers linked to the gene Er3 conferring resistance to *Erysiphe pisi* DC in pea. Molecular Breeding 22: 193-200.
- Fondevilla, S., T. L. W. Carver, M. T. Moreno and D. Rubiales. 2006. Macroscopic and histological characterisation of genes er1 and er2 for powdery mildew resistance in pea. European Journal of Plant Pathology 115: 309-321.
- Heringa, R. J., A. Norel and M. F. Tazelaar. 1969. Resistance to powdery mildew (*Erysiphe polygoni* D.C.) in peas (*Pisum sativum* L.). Euphytica 18: 163-169.
- Janila, P. and B. Sharma. 2004. RAPD and SCAR markers for powdery mildew resistance gene *er* in pea. Plant Breeding 123: 271-274.
- Katoch, V., S. Sharma, S. Pathania, D. K. Banayal, S. K. Sharma and R. Rathour. 2010. Molecular mapping of pea powdery mildew resistance gene *er2* to pea linkage group III. Molecular Breeding 25: 229-237.
- Mc Phee, K., 2004. Garden pea. pp. 277-288. In: P.K. Singh, S.K. Dsdgupta and S.K. Tripathi (eds.). Hybrid Vegetable Development. Food Products Press, New York.
- Tiwari, K. R., G. A. Penner and T. D. Warkentin. 1997. Inheritance of powdery mildew resistance in pea. Canadian Journal of Plant Science 77: 307-310.
- Vaid, A. and P. D. Tyagi. 1997. Genetics of powdery mildew resistance in pea. Euphytica 96: 203-206.