



รายงานการวิจัย

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุด
และการรวมยีนต้านทานในถั่วเขียว ระยะที่ 2

Development of molecular markers linked to powdery mildew
and leaf spot resistance and pyramiding multiple resistance
genes in mungbean phase 2

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลการวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุด
และการรวมยีนต้านทานในถั่วเขียว ระยะที่ 2

Development of molecular markers linked to powdery mildew
and leaf spot resistance and pyramiding multiple resistance
genes in mungbean phase 2

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา อลิมาณ์ ตันตสวัสดิ์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. ดร.อ้อยทิพย์ พูลสวัสดิ์
2. ดร.ชิตพันธ์ คติวัฒน์
3. นางสาวกิตติยา อาษากิจ
4. นายพิชชากร พาพันธ์
5. นายวิศรุต เชื้อขุนทด
6. นายภควัตร ภูคำศักดิ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558-2560

ผลการวิจัยเป็นความลับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2562

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยโครงการการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุด และการรวมยีนต้านทานในถั่วเขียว ระยะที่ 2 นี้ สำเร็จได้ด้วยดี คณะวิจัยใคร่ขอขอบคุณ ขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน และศูนย์วิจัยพืชไร่ชัชวาท ที่เอื้อเพื่อเมล็ดพันธุ์ถั่วเขียวในการวิจัย ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร. ไพศาล เหล่าสุวรรณ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฐิติพร มะชิโกวา เป็นอย่างสูงที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ และให้คำปรึกษาด้านการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีดั้งเดิม ขอขอบคุณฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่เอื้อเพื่อสถานที่สำหรับงานวิจัย นอกจากนี้คณะวิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาการวิจัย รวมทั้งนักศึกษาบัณฑิตและผู้ช่วยวิจัยหลายท่านที่ช่วยจัดเตรียมรายงานการวิจัยฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558-2560

ผู้วิจัย



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุด และการรวมยีนต้านทานในถั่วเขียว ระยะที่ 2 นี้ ประกอบด้วย 4 ส่วนหลัก คือ (1) การประเมินโรค (2) การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล (3) การปรับปรุงสายพันธุ์ต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุดโดยวิธีการรวมยีนต้านทานหลายยีนไว้ในสายพันธุ์เดียวกัน และ (4) การคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเขียวที่มีศักยภาพในการต้านทานโรคและให้ผลผลิตสูงจากวิธีการรวมยีนต้านทานหลายยีนไว้ในสายพันธุ์เดียวกัน ซึ่งในส่วนของ 1 พบว่ายีนที่ถ่ายทอดลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4758 และ CN72 × V4785 รวมทั้งยีนที่ถ่ายทอดลักษณะต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4718 ถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 คู่ (single major gene) ส่วนที่ 2 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4758 โดยใช้ไพรเมอร์ inter-simple sequence repeat (ISSR) จำนวน 63 ไพรเมอร์ และ ISSR-resistance gene analog (RGA) จำนวน 338 คู่ไพรเมอร์ พบว่าได้เครื่องหมาย I41tP379 เพียง 1 เครื่องหมาย ซึ่งน่าจะเชื่อมโยงกับยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคราแป้งอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($R^2 = 0.26$; $P < 0.001$) ในทำนองเดียวกัน การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4785 โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 63 ไพรเมอร์ และ ISSR-RGA จำนวน 241 คู่ไพรเมอร์ พบว่าเครื่องหมาย I27R565 เชื่อมโยงกับยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคราแป้งอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($R^2 = 0.30$; $P < 0.001$) ส่วนการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4718 โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR, ISSR-RGA และ SSR จำนวน 63, 48 และ 47 ไพรเมอร์/คู่ไพรเมอร์ ตามลำดับ ได้ 2 เครื่องหมาย (VR393 และ I16274) ที่มีความสัมพันธ์กับความต้านทานโรคใบจุดอย่างมีนัยสำคัญ โดยเครื่องหมาย VR393 และ I16274 มีตำแหน่งอยู่ 2 ด้านของยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคใบจุด (*qCLSC72V18-1*) และอยู่ใกล้มากที่สุด 12 และ 6 cM ตามลำดับ ซึ่งหากใช้ทั้งสองเครื่องหมายในการคัดเลือกจะให้ค่า recombination เพียง 1.44% ส่วนการประเมินความเหมาะสมในการใช้ไพรเมอร์ RGA ร่วมกับ ISSR เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมายชนิดใหม่ พบว่าเครื่องหมาย ISSR-RGA เป็นประโยชน์และมีประสิทธิภาพสูง และในส่วนของ 3 กับ 4 การรวมยีนต้านทาน 4 ยีนเข้าไว้ในสายพันธุ์เดียวกัน (ยีนต้านทานโรคราแป้งจาก V4718, V4758 และ V4785 และยีนต้านทานโรคใบจุดจาก V4718) โดยวิธีผสมกลับและคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล ได้ต้นลูกผสมกลับชั่ว BC₃F₃ ที่มียีนครบทั้ง 4 ยีน จำนวน 25 สายพันธุ์ ซึ่งอยู่ระหว่างการปลูกขยายเมล็ดเพื่อทดสอบโรคราแป้งและโรคใบจุด ซึ่งข้อมูลจากการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์และเป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกสายพันธุ์ต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุดในถั่วเขียวต่อไป

Abstract

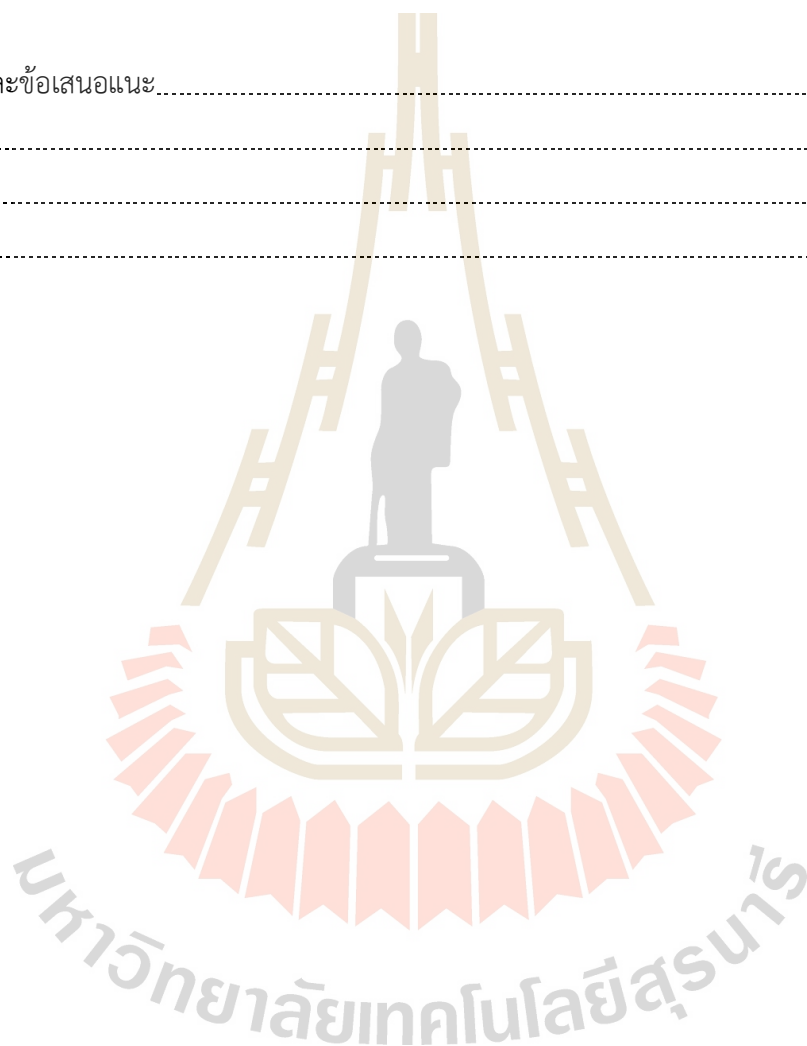
The development of molecular markers linked to powdery mildew and leaf spot resistance and pyramiding multiple resistance genes in mungbean phase 2 research project consists of 4 major parts (1) Evaluation of disease in mungbean (2) development of molecular markers (3) breeding for powdery mildew and leaf spot resistant lines by pyramiding multiple resistance genes and (4) selection of the potential mungbean lines with disease resistance and high yield from pyramiding multiple resistance genes. It was found that (1) powdery mildew resistant response in the CN72 x V4758 and CN72 x V4785 cross including leaf spot resistant response in the CN72 x V4718 cross were controlled by a single major gene. (2) The development of molecular markers linked to powdery mildew in the CN72 x V4758 cross with 63 inter-simple sequence repeat (ISSR) primers and 338 ISSR-resistance gene analog (RGA) primer pairs to find highly significant only one marker (I41tP379) possible linkage of gene controlling powdery mildew resistance ($R^2 = 0.26$; $P < 0.001$). In the same way, the development of molecular markers linked to powdery mildew in the CN72 x V4785 cross with 63 ISSR primers and 241 ISSR-RGA primer pairs found marker I27R565 highly significant linked to powdery mildew resistance gene ($R^2 = 0.30$; $P < 0.001$). In part of the development of molecular markers linked to leaf spot resistance in the CN72 x V4718 cross with 68 ISSR, 48 ISSR-RGA and 47 simple sequence repeat (SSR) primers/primer pairs were found 2 markers (VR393 and I16274) significantly linked to leaf spot resistance. VR393 and I16274 flanked and were closest to the gene encoding leaf spot resistance (*qCLSC72V18-1*) with the distance of 12 and 6 cM, respectively. Only 1.44% recombination was achieved if both markers were used for selection. For the evaluation of using RGA primers in combination with ISSR primers to develop new marker types were useful and high efficient. (3) and (4) pyramiding 4 resistance gene (gene controlling powdery mildew resistance from V4718, V4758 and V4785 and gene controlling leaf spot resistance from V4718) using backcross method and marker selection found 25 BC₃F₃ lines for propagation to evaluate powdery mildew and leaf spot resistance. These results suggested that the development of these molecular markers were useful and can be effectively used for selection of powdery mildew and leaf spot resistance in mungbean.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญตารางภาคผนวก.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	6
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....	7
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
ส่วนที่ 1 การประเมินโรคในถั่วเขียว	
1.1 การประเมินโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4758 และ CN72 × V4785.....	9
1.2 การประเมินโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4718.....	10
ส่วนที่ 2 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล	
2.1 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล ISSR และ ISSR-RGA ที่บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้ง ในถั่วเขียว.....	11
2.2 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่บ่งชี้ลักษณะความต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียว.....	13
ส่วนที่ 3 การปรับปรุงสายพันธุ์ต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุด โดยวิธีการรวมยีน ต้านทานหลายยีนไว้ในสายพันธุ์เดียวกัน.....	16
ส่วนที่ 4 การคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเขียวที่มีศักยภาพในการต้านทานโรคและให้ผลผลิตสูงจาก วิธีการรวมยีนต้านทานหลายยีนไว้ในสายพันธุ์เดียวกัน.....	16
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล	
ส่วนที่ 1 การประเมินโรคในถั่วเขียว	
1.1 การประเมินโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4758 และ CN72 × V4785.....	17
1.2 การประเมินโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4718.....	18
ส่วนที่ 2 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล	
2.1 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล ISSR และ ISSR-RGA ที่บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้ง ในถั่วเขียว.....	23

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่บ่งชี้ลักษณะความต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียว.....	107
ส่วนที่ 3 การปรับปรุงสายพันธุ์ต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุด โดยวิธีการรวมยีนต้านทานหลายยีนไว้ในสายพันธุ์เดียวกัน.....	120
ส่วนที่ 4 การคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเขียวที่มีศักยภาพในการต้านทานโรคและให้ผลผลิตสูงจากวิธีการรวมยีนต้านทานหลายยีนไว้ในสายพันธุ์เดียวกัน.....	123
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	124
บรรณานุกรม.....	125
ภาคผนวก.....	132
ประวัติผู้วิจัย.....	147



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 การกระจายตัวของประชากร $F_{2:9}$ และ $F_{2:10}$ ต่อการเกิดโรคราแป้งของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4758.....	20
2 การกระจายตัวของประชากร $F_{2:9}$ ต่อการเกิดโรคราแป้งของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4785	21
3 การกระจายตัวของประชากร $F_{2:9}$ ต่อการเกิดโรคใบจุดของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4718.....	22
4 ลำดับเบส ขนาดของแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 63 ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°ซ.....	27
5 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR และลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4758 จำนวน 4 เครื่องหมาย.....	29
6 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (GLPLAL 1) จำนวน 56 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°ซ.....	30
7 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (Pto kin1) จำนวน 53 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°ซ.....	35
8 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (P-Loop) จำนวน 60 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°ซ.....	39
9 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (PMR1R) จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°ซ.....	44

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
10 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ด้านทาน และประชากรรวมด้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (PMR5R) จำนวน 56 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°ซ.....	49
11 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ด้านทาน และประชากรรวมด้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (RLK for) จำนวน 55 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°ซ.....	54
12 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR-RGA และลักษณะด้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 จำนวน 11 เครื่องหมาย.....	58
13 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR และ ISSR-RGA ต่อลักษณะด้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 จำนวน 1 เครื่องหมาย.....	58
14 ลำดับเบส ขนาดของแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ด้านทานและประชากรรวมด้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 63 ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°ซ.....	60
15 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR และลักษณะด้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 จำนวน 2 เครื่องหมาย.....	62
16 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ด้านทาน และประชากรรวมด้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (GLPLAL 1) จำนวน 61 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°ซ.....	63
17 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ด้านทาน และประชากรรวมด้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (Pto kin1) จำนวน 63 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°ซ.....	68

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
18 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ทำให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้นทาน และประชากรรวมต้นทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโครมาเป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (P-Loop) จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°ซ.....	73
19 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ทำให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้นทาน และประชากรรวมต้นทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโครมาเป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (RLK for) จำนวน 59 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°ซ.....	78
20 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR-RGA และลักษณะต้นทานโครมาเป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 จำนวน 37 เครื่องหมาย.....	83
21 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR และ ISSR-RGA ต่อลักษณะต้นทานโครมาเป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 จำนวน 4 เครื่องหมาย.....	84
22 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (GLPLAL 1) จำนวน 56 คู่ไพรเมอร์.....	87
23 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (Pto kin 1) จำนวน 53 คู่ไพรเมอร์.....	89
24 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (P-Loop) จำนวน 60 คู่ไพรเมอร์.....	91
25 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (PMR1R) จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์.....	93
26 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (PMR5R) จำนวน 56 คู่ไพรเมอร์.....	95
27 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (RLK for) จำนวน 55 คู่ไพรเมอร์.....	97
28 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (GLPLAL 1) จำนวน 61 คู่ไพรเมอร์.....	99
29 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (Pto kin 1) จำนวน 63 คู่ไพรเมอร์.....	101
30 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (P-Loop) จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์.....	103

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
31 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (RLK for) จำนวน 59 คู่ไพรเมอร์.....	105
32 ลำดับเบส ขนาดของแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4718; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคใบจุด เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 68 ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C.....	110
33 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR และลักษณะต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 จำนวน 14 เครื่องหมาย.....	113
34 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA จำนวน 48 คู่ไพรเมอร์.....	114
35 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR-RGA และลักษณะต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 จำนวน 7 เครื่องหมาย.....	115
36 อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์ SSR.....	116
37 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SSR และลักษณะต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 จำนวน 9 เครื่องหมาย.....	117
38 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR และลักษณะต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 จำนวน 7 เครื่องหมาย.....	118
39 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR-RGA และลักษณะต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 จำนวน 4 เครื่องหมาย.....	118
40 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SSR และลักษณะต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 จำนวน 5 เครื่องหมาย.....	118
41 ตำแหน่ง QTL ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคใบจุดในประชากร F _{2.9} ของคู่ผสม CN72 x V4718 จากการวิเคราะห์ multiple interval mapping (MIM).....	119
42 ประวัติพันธุ์พ่อแม่ ลูกผสม F ₁ x F ₁ และลูกผสมกลับในชั่ว BC ₃ F ₃	121

สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
1 คະແນນการเกิดโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2558.....	135
2 คະແນນการเกิดโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2561	136
3 คະແນນการเกิดโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2556.....	137
4 คະແນນการเกิดโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2559.....	139
5 คະແນນการเกิดโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2559.....	141
6 คະແນນการเกิดโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2560.....	143
7 ค่าการวิเคราะห์ของคະແນນการเกิดโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2558.....	145
8 ค่าการวิเคราะห์ของคະແນນการเกิดโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2561.....	145
9 ค่าการวิเคราะห์ของคະແນນการเกิดโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2556.....	145
10 ค่าการวิเคราะห์ของคະແນນการเกิดโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2559.....	145
11 ค่าการวิเคราะห์ของคະແນນการเกิดโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2559.....	146
12 ค่าการวิเคราะห์ของคະແນນการเกิดโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2560.....	146

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การกระจายตัวของประชากร $F_{2:9}$ ปี พ.ศ. 2558 (a) และประชากร $F_{2:10}$ ปี พ.ศ. 2561 (b) ต่อการเกิดโรคราแป้งของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4758 ที่อายุ 65 วัน.....	20
2 การกระจายตัวของประชากร $F_{2:9}$ ปี พ.ศ. 2556 (a) และปี พ.ศ. 2559 (b) ต่อการเกิดโรคราแป้งของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4785 ที่อายุ 65 วัน.....	21
3 การกระจายตัวของประชากร $F_{2:9}$ ปี พ.ศ. 2559 (a) และปี พ.ศ. 2560 (b) ต่อการเกิดโรคใบจุดของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4718 ที่อายุ 65 วัน.....	22
4 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอในถั่วเขียวพันธุ์ต้านทาน V4758 (RP) พันธุ์อ่อนแอ CN72 (SP) ลูกผสมที่ต้านทาน (R) และลูกผสมที่อ่อนแอ (S) ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ISSR841t ร่วมกับ Pto kin 1; M = 100 bp DNA ladder.....	59
5 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอในถั่วเขียวพันธุ์ต้านทาน V4785 (RP) พันธุ์อ่อนแอ CN72 (SP) ลูกผสมที่อ่อนแอ (S) และลูกผสมที่ต้านทาน (R) ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ISSR827 ร่วมกับ RLK for; M = 100 bp DNA ladder.....	85
6 ตำแหน่งยีนต้านทานโรคใบจุดอยู่ระหว่างเครื่องหมาย VR393 กับ I16274.....	119
7 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอในถั่วเขียวพันธุ์แม่ CN72 พันธุ์พ่อ A388 ลูกผสมกลับชั่วที่ 3 (BC_3F_3) จำนวน 25 สายพันธุ์ ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ CEDG174; M = 100 bp DNA ladder.....	122
8 สายพันธุ์ถั่วเขียวที่เกิดจากการรวมยีนต้านทานหลายยีนไว้ในสายพันธุ์เดียวกัน ซึ่งเป็นลูกผสมกลับชั่ว BC_3F_3 เปรียบเทียบกับพันธุ์แม่ CN72 ที่อายุ 50 วัน.....	123

บทที่ 1

บทนำ

คำนำ

การวิจัยโครงการ “การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุด และการรวมยีนต้านทานในถั่วเขียว ระยะที่ 2” นี้ ได้ดำเนินงานต่อเนื่องจากโครงการการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้ง และการรวมยีนต้านทานในถั่วเขียว ซึ่งได้คัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเขียว จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ V4718, V4758 และ V4785 ซึ่งทั้งสามสายพันธุ์มีปฏิกิริยาและระดับความต้านทานโรคราแป้งแตกต่างกัน ความต้านทานโรคถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 คู่ และเป็นยีนต่างตำแหน่ง (non-allelic) (Khajudparn et al., 2007) ส่วนพันธุ์อ่อนแอต่อโรคใช้พันธุ์ชยันนาท 72 (CN72) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงต้านทานต่อหนอนแมลงวันเจาะลำต้น แต่อ่อนแอต่อโรคราแป้ง (ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี, 2553) โครงการวิจัยนี้จะใช้ประโยชน์จากการพบแหล่งของยีนต้านทานโรคราแป้งใหม่ โดยการรวมยีนต้านทานเข้ามาไว้ในพันธุ์เดียวกัน ซึ่งอาจสามารถเพิ่มระดับความต้านทานโรคให้สูงขึ้น ด้านงานเชื้อสาเหตุของโรคราแป้งได้หลายสายพันธุ์ อาจให้ความต้านทานต่อเชื้อราแป้งในหลากหลายท้องถิ่น และมีศักยภาพในการต้านทานโรครายาวนานขึ้น อีกทั้งจะทำการถ่ายทอดยีนต้านทานโรคราแป้งนี้ไปยังพันธุ์ชยันนาท 72 ซึ่งเป็นพันธุ์ส่งเสริมให้มีความต้านทานต่อโรคราแป้ง โดยทำการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียว คู่ผสม CN72 × V4718 ด้วยวิธีดั้งเดิม เพื่อผลิตประชากร recombinant inbred lines; RILs ช่วง F_{2:7} และ F_{2:8} สำหรับใช้ในการประเมินโรคราแป้งและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้ง และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการต้านทานโรคและให้ผลผลิตสูงเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการรวมยีนต้านทาน ส่วนงานวิจัยในโครงการการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุด และการรวมยีนต้านทานในถั่วเขียว ระยะที่ 2 นี้ได้ปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียว คู่ผสม CN72 × V4758 เพื่อผลิตประชากร RILs ช่วง F_{2:9} และ F_{2:10} และคู่ผสม CN72 × V4785 เพื่อผลิตประชากร RILs ช่วง F_{2:9} โดยมีวัตถุประสงค์เดียวกันคือ พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้ง และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการต้านทานโรคและให้ผลผลิตสูงเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการรวมยีนต้านทาน ส่วนคู่ผสม CN72 × V4718 ในโครงการนี้ใช้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคใบจุด ทำการผสมพันธุ์สายพันธุ์ที่มียีนครบทั้ง 4 ยีน (ยีนต้านทานโรคราแป้งจาก V4718, V4758 และ V4785 และยีนต้านทานโรคใบจุดจาก V4718) เข้าไว้ในสายพันธุ์เดียวกัน และผสมกลับไปยังพันธุ์ CN72 เพื่อให้มีศักยภาพในการต้านทานโรครายาวนานขึ้น

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ถั่วเขียว (*Vigna radiata* L.) เป็นพืชตระกูลถั่วที่มีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจ และการเกษตร เพราะมีอายุสั้นประมาณ 85 วัน ทนแล้งและขึ้นในเขตร้อนได้ดี สามารถปลูกได้ในทุกภาคของประเทศไทย ปลูกได้ในดินทุกชนิด และปลูกได้ตลอดปี เป็นพืชบำรุงดิน ทั้งยังสามารถตรึงไนโตรเจนได้ดี เกษตรกรจึงนิยม

ปลูกสลับกับพืชชนิดอื่นทั้งก่อนหรือหลังฤดูปลูกพืชหลักหรือปลูกร่วมกับพืชชนิดอื่น นอกจากจะมีปริมาณโปรตีนที่สูงแล้ว (21-28%) ถั่วเขียวยังมี phytoestrogen, antimicrobial และ antioxidant activities ซึ่งอาจช่วยป้องกันโรค เช่น มะเร็ง (Women's Health Letter, 2003) สำหรับสถานการณ์การผลิตถั่วเขียวในประเทศไทย มีพื้นที่ปลูกในปี พ.ศ. 2558 ทั้งสิ้น 849,000 ไร่ ได้ผลผลิต 99,301 ตัน คิดเป็นผลผลิตเฉลี่ย 116.96 กิโลกรัมต่อไร่ โดยความต้องการใช้ในประเทศอยู่ที่ 84,554 ตัน (ศรีสุตา เตชะสาน, 2558) สถิติการส่งออกสินค้ามาตรฐานถั่วเขียวของประเทศไทยตั้งแต่ 2555-2558 อยู่ที่ 3,286.36, 527.57, 1,436.86 และ 1,704.00 ตัน คิดเป็นมูลค่า 86.58, 15.26, 57.09 และ 69.46 ล้านบาท ตามลำดับ (สำนักงานมาตรฐานสินค้า, 2558) ปัจจัยสำคัญที่จำกัดผลผลิตของถั่วเขียว ได้แก่ การไม่ทนต่อสภาพแวดล้อม การอ่อนแอต่อโรค เช่น โรคราแป้ง (powdery mildew) เป็นโรคที่สร้างความเสียหายให้กับถั่วเขียวมากที่สุดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Tsou et al., 1979) โดยทำให้ผลผลิตลดลงถึง 40 เปอร์เซ็นต์ (Asian Vegetable Research and Development Center, 2009) เกิดจากเชื้อรา *Sphaerotheca phaseoli* ซึ่งจะพบเส้นใยของเชื้อรา ลักษณะคล้ายผงแป้งโรยอยู่บนใบล่าง ๆ สามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า การระบาดจะพบในถั่วเขียวที่ปลูกในช่วงฤดูแล้งที่มีอากาศค่อนข้างเย็น ระบาดได้ง่ายโดยอาศัยลม และเมื่อสปอร์ของเชื้อราตกลงบนผิวใบ จะอาศัยความชื้นในบรรยากาศและบนผิวใบเข้าสู่เนื้อใบ สร้างหอสหออเรีย (haustoria) ดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์ผิวใบทำให้เซลล์ตาย ใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงและแห้งตายในที่สุด ถ้าเกิดในระยะติดฝักและเมล็ดเริ่มเต่งแล้ว ความเสียหายด้านผลผลิตจะมีไม่มาก แต่หากเกิดในระยะออกดอก พบว่าถั่วเขียวจะแคระแกร็น การติดฝักไม่ดี ฝักและเมล็ดขนาดเล็ก (สำนักพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร, 2552) การลดความเสียหายของถั่วเขียวจากโรคราแป้งนั้นอาจทำได้หลายวิธี เช่น การใช้สารเคมี ได้แก่ triadimefon และ triazoles เป็นต้น (Zhang, 1999; Khunti et al., 2002) ป้องกันกำจัด หรือการใช้พันธุ์ต้านทานโรคราแป้ง

การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวให้ต้านทานต่อโรคราแป้งและใบจุดสามารถทำได้โดยวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบดั้งเดิม (conventional breeding) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้เวลานาน และประสบความสำเร็จช้าในการคัดเลือกต้นต้านทานโรค ต้องรอให้มีการระบาดของโรค (ซึ่งระบาดเฉพาะในฤดูหนาวสำหรับโรคราแป้ง และเฉพาะในฤดูฝนสำหรับโรคใบจุด และแสดงอาการชัดเจนในระยะที่ติดฝักแล้ว) และการคัดเลือกต้นที่มีการรวมยีนต้านทานหลายยีนนั้นทำได้ยาก เนื่องจากต้นที่มียีนต้านทาน 1 ยีน หรือหลายยีนอาจแสดงระดับความต้านทานไม่แตกต่างกันมาก Reddy et al. (1994) ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว พบว่าความต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวถูกควบคุมด้วยยีนแบบข่ม 2 ยีน ได้แก่ *Pm-1* และ *Pm-2* ซึ่งผลของยีนแบบข่มและแบบข่มมีความสำคัญต่อการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคราแป้งสู่รุ่นลูก (Gawande and Patil, 2003) นอกจากนี้ Khajudparn et al. (2007) พบยีนต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว 3 สายพันธุ์ ซึ่งยีนต้านทานโรคราแป้งในทั้ง 3 สายพันธุ์เป็นยีนเดี่ยวแบบข่มที่มีตำแหน่งต่างกันบนโครโมโซม (non-allelic) และมีการกระจายตัวเป็นอิสระต่อกัน หากสามารถนำยีนต้านทานโรคราแป้งทั้ง 3 ยีนมารวมไว้ในพันธุ์เดียวกัน (pyramiding) อาจทำให้ได้พันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรคราหลายสายพันธุ์ (races) ขึ้น และยากต่อการเสื่อมสลายของความต้านทาน (resistance break down) มากขึ้น นอกจากนี้หากยีนเหล่านี้ทำงานเสริมกัน อาจทำให้ระดับความต้านทานโรคราสูงขึ้นด้วย อย่างไรก็ตาม การปรับปรุงพันธุ์พืชแบบดั้งเดิมเป็นวิธีที่ใช้

เวลานาน และประสบความสำเร็จช้า จึงมีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลขึ้นหลายชนิด และใช้กันอย่างกว้างขวางในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นตอนต่าง ๆ ของการปรับปรุงพันธุ์ เช่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชและโรคพืช การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือกลูกผสม โดยใช้ศึกษาทั้งลักษณะคุณภาพ (Fazio et al., 1999) และลักษณะปริมาณ (Veldboom and Lee, 1994) โดยเฉพาะการนำยีนต้านทานโรค (disease resistance genes; R genes) มาใช้ปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ต้านทานโรค ทำให้การปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานโรคพัฒนาไปอย่างรวดเร็ว

มีการนำเครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่าง ๆ เช่น simple sequence repeat (SSR), inter-simple sequence repeat (ISSR), amplified fragment length polymorphisms (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) และ restriction fragment length polymorphisms (RFLP) มาใช้ศึกษาความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarities) และการจำแนกพันธุ์ถั่วสกุล *Vigna* spp. หลายชนิดรวมทั้งถั่วเขียวที่ระดับดีเอ็นเอ (Fatokun et al., 1993; Fatokun et al., 1997; Mignouna et al., 1998; Yee et al., 1999; Tantasawat et al., 2010; Khajudparn et al., 2012; Singh et al., 2014) และมีการพัฒนาเครื่องหมาย AFLP และ RFLP ที่มี linkage กับยีนต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว (บุปผา ใจเที่ยง, 2545; Zhang et al., 2008) อย่างไรก็ตาม AFLP เป็นเครื่องหมายโมเลกุลแบบข่ม และแม้ว่าจะให้ผลการทดลองที่มีความแน่นอนกว่า RAPD แต่วิธีการทดลองยุ่งยากกว่า ใช้เวลานานกว่า และใช้ต้นทุนสูงกว่า RAPD, ISSR และ SSR สำหรับการันใช้ RAPD ทำได้ง่าย รวดเร็ว และใช้ต้นทุนต่ำ แต่บางตำแหน่ง (locus) อาจได้ผลที่ไม่แน่นอน ส่วน RFLP เป็นวิธีการที่ต้องใช้ดีเอ็นเอเป็นปริมาณมากกว่าวิธีอื่น และมีวิธีการทดลองยุ่งยากและใช้ค่าใช้จ่ายมากกว่าวิธีอื่น (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2546) ในขณะที่ SSR มีคุณสมบัติหลายประการ เช่น ให้ข้อมูลความแตกต่างสูง มีการกระจายตัวทั่วทั้งจีโนม ได้ผลที่แน่นอน เป็นเครื่องหมายโมเลกุลแบบข่มร่วม และมีวิธีการวิเคราะห์ที่ง่าย รวดเร็ว และใช้ต้นทุนไม่มาก จึงเป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบัน แต่ข้อเสียของวิธีการนี้คือจะต้องมีการโคลนและหาลำดับเบสของ microsatellites (SSR) ก่อนจึงจะนำไปใช้ได้ (Wang et al., 1994; Cregan et al., 1999) ดังนั้นจึงมีการพัฒนา ISSR ขึ้นโดยใช้ประโยชน์จากลำดับเบสของ SSR นำมาใช้สร้างไพรเมอร์ขนาดประมาณ 20 นิวคลีโอไทด์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง microsatellites โดยตรง ทำให้ไม่จำเป็นต้องมีการโคลนและหาลำดับเบสก่อน นอกจากนี้ วิธีการนี้จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่หลายตำแหน่งของจีโนม (multilocus) เช่นเดียวกับ RAPD จึงได้ข้อมูลมากกว่า SSR ที่มีตำแหน่งจำเพาะในจีโนม (single locus) มีการนำ ISSR มาใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายของพืชจีนัส *Vigna* 18 สปีชีส์ รวมทั้งถั่วเขียว (Ajibade et al., 2000; Tantasawat et al., 2010) และเนื่องจากถั่วเขียวมีการกระจายตัวของ SSR อยู่ทั่วจีโนม เช่น พบจำนวนซ้ำของนิวคลีโอไทด์ (AT)_n หรือ (ATT)_n ในทุก ๆ 34.6 kb ของจีโนมิกดีเอ็นเอ (Wang et al., 1994) ดังนั้นการนำเครื่องหมายชนิดนี้มาประยุกต์ใช้เพื่อบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคในถั่วเขียวจึงน่าจะมีโอกาสประสบความสำเร็จสูง นอกจากนี้ การนำ ISSR มาประยุกต์ใช้ร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนต้านทานโรคเพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมายชนิดใหม่ ซึ่งจะเรียกว่า ISSR-resistance gene analog (RGA) อาจยิ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการ target หาเครื่องหมายที่มีลิงค์เกจ (linkage) กับยีนต้านทานโรค

การคัดเลือกประชากรที่มีการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่มีลิงค์เกจกับยีนต้านทานเป็นวิธีการที่ใช้ระยะเวลาสั้น มีประสิทธิภาพ และแม่นยำ (Sanchez et al., 2000) โดยเฉพาะในการรวมยีนต้านทานหลายยีน ซึ่งไม่สามารถคัดเลือกต้นที่มียีนต้านทานจำนวน 1 ยีน หรือหลายยีนได้โดยตรงจากการประเมินระดับความต้านทาน วิธีการนี้ประสบความสำเร็จในการรวมยีนต้านทานในพืชหลายชนิด เช่น รวมยีนต้านทานโรคใบไหม้ (*xa5*, *xa13* และ *Xa21*) ในข้าว จำนวน 3 ยีน (Sanchez et al., 2000) รวมยีนต้านทานโรคใบไหม้ (*ra1* และ *AbR1*) และแอนแทรกโนสใน lentil จำนวน 3 ยีน และรวมยีนต้านทานโรคราแป้ง (*Run1*) และราน้ำค้าง (*Rpv1*) ในถั่วเขียวจำนวน 2 ยีน (Eibach et al., 2007) เป็นต้น แต่ในถั่วเขียวยังไม่มีการคัดเลือกใช้มาก่อน แม้ว่าจะมีผู้ค้นพบเครื่องหมาย RFLP และ AFLP ที่มีลิงค์เกจกับยีนต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว (บุปผา ใจเที่ยง, 2545; Zhang et al., 2008) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเครื่องหมาย RFLP และ AFLP มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก และต้นทุนสูง จึงอาจไม่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้คัดเลือกประชากรถั่วเขียวลูกผสมจำนวนมาก แม้มีการนำ SSR มาใช้ในการบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งในประชากรถั่วเขียว (Kasettranon et al., 2010) แต่ก็ยังมีความยุ่งยากในเรื่องการโคลนและลำดับเบสของ microsatellites (SSR) ก่อนจึงจะนำไปใช้ได้อย่าง จึงจำเป็นต้องพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่นที่ง่าย รวดเร็ว และใช้ต้นทุนน้อยกว่า เช่น ISSR และ ISSR-RGA เป็นต้น โดย Bainade et al. (2014) นำ ISSR มาใช้หาความแตกต่างของถั่วเขียวในการต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุด แต่ยีนต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุดในแต่ละสายพันธุ์ต้านทานอาจมีตำแหน่งแตกต่างกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนาเครื่องหมายที่จำเพาะกับยีนต้านทานแต่ละยีน ในโครงการวิจัยนี้จะทำการตรวจหาเครื่องหมาย ISSR และ ISSR-RGA ที่มีลิงค์เกจกับยีนต้านทานโรคราแป้ง และเครื่องหมาย SSR, ISSR และ ISSR-RGA ที่มีลิงค์เกจกับยีนต้านทานโรคใบจุด และใช้เครื่องหมายดังกล่าวในการคัดเลือกเพื่อรวมยีนต้านทานเข้าไว้ในถั่วเขียวพันธุ์เดียวกัน คือ พันธุ์ชยันต 72 (CN72) เพื่อให้ได้พันธุ์ถั่วเขียวที่มีความต้านทานโรคอย่างยั่งยืน สามารถต้านทานโรคได้หลากหลายสายพันธุ์ หรือในหลายท้องที่ และให้ผลผลิตสูง ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการผลิต และลดผลกระทบจากการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวให้ต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุดโดยวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบดั้งเดิมนิยมใช้วิธีการผสมกลับ เนื่องจากวิธีนี้มีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดลักษณะที่ควบคุมด้วยยีน 1-2 คู่ จากพันธุ์ให้ไปยังพันธุ์รับ (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง, 2550) การศึกษาพันธุกรรมและการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคราแป้ง พบการควบคุมด้วยยีนเด่น 1 คู่ ในสายพันธุ์ VC1560A (AVRDC, 1981) สายพันธุ์ PHLV18 (Poehlman, 1991) และสายพันธุ์ ATF-3640 (Humphry et al., 2003) หรือ 2 คู่ ในสายพันธุ์ RUM (*Pm-1* และ *Pm-2*; Reddy et al., 1994) ในปี พ.ศ. 2545 บุปผา ใจเที่ยง ศึกษาการแสดงออกของยีนต้านทานโรคราแป้งในคู่ผสม CN36 x SUT4, CN36 x VC1210A, KPS1 x SUT4 และ KPS1 x VC1210A พบว่าความต้านทานโรคในแต่ละคู่ผสมถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 คู่ มีอิทธิพลของยีนทั้งแบบบวกและแบบข่ม ซึ่งมีผลต่อลักษณะความต้านทานโรคในระดับเดียวกัน และไม่พบการข่มข้ามคู่ของยีน อย่างไรก็ตาม ความ

ต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวบางสายพันธุ์ อาจถูกควบคุมโดยยีนหลายคู่ (AVRDC, 1981; Gawade and Patil, 2003) เมื่อพิจารณา ยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคใบจุด Chankaew et al. (2011) พบว่าความต้านทานต่อโรคใบจุดถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 คู่ (single dominant gene) สอดคล้องกับการรายงานของ Thakur et al. (1977) อย่างไรก็ตาม ในถั่วเขียวบางสายพันธุ์ลักษณะต้านทานโรคใบจุดอาจถูกควบคุมโดยยีนด้อย 1 คู่ (single recessive gene) (Mishra et al., 1988)

การทดสอบอัลลีล (allelic testing) ใช้ศึกษาจำนวนคู่ของยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรค การเป็นยีนเด่นหรือยีนด้อย และการเป็นอัลลีลของยีนต้านทานเดียวกัน หรือเป็นยีนต่างตำแหน่งกัน ดังเช่นในการทดลองของ Zhang et al. (1998) ได้ค้นพบยีนต้านทานโรค bacterial blight ของข้าวอินใหม่ใน *Oryza rufipogon* accession WBB1 และ WBB2 โดยสังเกตจากลักษณะความต้านทานโรคของข้าวทั้ง 2 accessions นี้แตกต่างกัน และแตกต่างจากพันธุ์ต้านทานเดิม เมื่อทำการผสมทดสอบอัลลีล พบว่ามีการกระจายตัวระหว่างต้นต้านทานและอ่อนแอต่อโรคในอัตราส่วน 3:1 ในทั้ง 2 accessions ซึ่งสรุปผลได้ว่ายีนต้านทานเป็นยีนเด่น 1 คู่ ดังนั้นการรวมยีนต้านทานโรคหลายยีนเข้าไว้ในพันธุ์เดียว (pyramiding) จึงอาจเพิ่มระดับความต้านทานโรคให้สูงขึ้นได้ ดังเช่นในการทดลองของ Liu et al. (2000) ได้ทำการรวมยีนต้านทานโรคราแป้ง ได้แก่ *Pm2+Pm4a*, *Pm2+Pm21*, *Pm4a+Pm21* เข้าสู่พันธุ์ข้าวสายพันธุ์ Yangli 58 ได้สำเร็จ ทำให้ได้พันธุ์ข้าวสายพันธุ์ที่มีระดับความต้านทานโรคราแป้งสูง

มีการใช้ประโยชน์จากเครื่องหมายโมเลกุล ISSR อย่างหลากหลาย เช่น Ratnaparkhe et al. (1998) ได้พัฒนาเครื่องหมาย ISSR ที่อยู่ใกล้กับยีนต้านทานโรคเหี่ยวในพริกหวาน พบว่าไพรเมอร์ UBC825 (AC)₈T ให้แถบดีเอ็นเอที่อยู่ห่างจากยีนต้านทานโรคเพียง 5 cm ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้สามารถตรวจพบยีนต้านทานโรคได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ และสามารถให้ข้อมูลที่สำคัญในการวิเคราะห์จีโนมพืช ในปีเดียวกัน Fang et al. (1998) ได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุล ISSR และ RAPD ในการคัดเลือกส้มที่ต้านทานโรค citrus tristeza virus (CTV) ซึ่งควบคุมโดยยีนเด่น (*Ctv*) 1 คู่ โดยใช้วิธี bulk segregant analysis (BSA) พบว่ามี 10 เครื่องหมายที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรค เมื่อนำเครื่องหมายดังกล่าวไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุล RFLP พบว่ามี 3 เครื่องหมายที่อยู่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานมากที่สุด คือ Z16 ซึ่งมีการกระจายตัวร่วม (co-segregate) ไปกับ *Ctv* ส่วน C19 และ AD08 อยู่ห่างจากยีน 0.5 และ 0.8 cm ตามลำดับ ต่อมา Gold et al. (1999) ได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล ISSR เพื่อช่วยคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคราสนิมบนลำต้นและบนใบในข้าวสาลี โดยใช้ประชากรที่เป็น near isogenic line ที่มียีนต้านทานโรคราสนิมบนลำต้น (*Sr39*) และบนใบ (*Lr35*) ซึ่งได้มาจากการผสมข้าวสาลีพันธุ์ป่า (*Aegilops speltoides* L.) กับ *Triticum monococcum* L. โดยวิธีการผสมกลับ สามารถคัดเลือกต้นข้าวสาลีที่มีทั้งยีน *Sr39* และ *Lr35* ได้สำเร็จ นอกจากนี้ เครื่องหมาย ISSR ยังถูกนำไปใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม การยืนยันความเป็นลูกผสมชั่วที่หนึ่ง (F_1) และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม เช่น Ajibade et al. (2000) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชตระกูลถั่วสปีชีส์ต่าง ๆ โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 19 ไพรเมอร์ พบว่า *Vigna unguiculata* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอย่างมากกับ *V. triphylla* และ *V. reticulata* ต่อมา Carvalho et al. (2005) สามารถใช้เครื่องหมาย ISSR เพื่อยืนยันความเป็นลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) ในการผสม

ข้ามสปีชีส์ของพืชวงศ์ *Triticeae* ได้สำเร็จ และ Khajudparn et al. (2012) ประสบความสำเร็จในการใช้เครื่องหมาย ISSR ยืนยันความเป็นลูกผสมชั่วที่ 1 ในถั่วเขียว จำนวน 6 คู่ผสม ที่มีลักษณะคล้ายพันธุ์แม่มาก และไม่สามารถจำแนกได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

มีการนำยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายยีนต้านทานโรค (resistance gene analog; RGA) ไปใช้ประโยชน์ในการหาตำแหน่งของยีนต้านทานโรค และคัดเลือกต้นต้านทานโรค อาทิเช่น Donald et al. (2002) พบว่าเครื่องหมาย RFLP ที่พัฒนาจาก RGAs จำนวน 3 เครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับยีนต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวต้านทานโรคราแป้งได้ ต่อมา Van der Linden et al. (2004) ได้ใช้ไพรเมอร์ที่เป็นคู่สมกับบริเวณ NBS region ในการตรวจสอบยีนต้านทานโรคในมันฝรั่ง มะเขือเทศ ข้าวบาร์เลย์ และกะหล่ำ พบว่ายีนต้านทานโรคที่พบในพืชเหล่านี้มีความคล้ายคลึง 80-100% กับยีนต้านทานโรคต่าง ๆ หลายชนิด และมีการดัดแปลงใช้ RGA ร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่นตรวจสอบบริเวณของยีนต้านทานโรค อาทิเช่น Hayes et al. (2000) ได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุล RGA-AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นคู่สมกับบริเวณ P-loop ใน NBS region ของ *N* gene, *L6* gene และ *RPS2* gene ในการพัฒนาเครื่องหมาย RGA-AFLP ที่อยู่ใกล้ตำแหน่งของยีนต้านทานโรค mosaic virus ในถั่วเหลือง (*Rsv1*) ได้เครื่องหมายโมเลกุล 4 เครื่องหมายคือ R11, R12, R13 และ R14 ที่มีลิงค์เกจกับยีนต้านทานโรค *Rsv1* เช่นเดียวกัน Mingpei et al. (2005) พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล AntjM2 ซึ่งพัฒนาจาก AFLP ร่วมกับ degenerate primers ที่เป็นคู่สมกับบริเวณ NBS region ของยีนต้านทานโรคมีลิงค์เกจกับยีนต้านทานโรคแอนแทรกโนสใน Lupin fruit งานวิจัยเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าลำดับเบสของ NBS-LRR ที่มีลิงค์เกจ หรือเป็นส่วนหนึ่งของยีนต้านทาน เมื่อใช้ตามลำดับ หรือใช้ร่วมกับเครื่องหมายชนิดอื่นมีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะนำมาใช้ตรวจหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคสำหรับนำมาใช้โคลนยีนต้านทานโรค (map-based cloning) หรือใช้สำหรับคัดเลือกพันธุ์ได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล ISSR หรือ ISSR-RGA ที่บ่งชี้ลักษณะความต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุดในถั่วเขียว และใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการคัดเลือกพันธุ์ ซึ่งอาจนำไปสู่การโคลนยีนต้านทานต่อโรคราแป้งและโรคใบจุดของถั่วเขียวในอนาคต
2. เพื่อถ่ายทอดยีนต้านทานโรคราแป้งจากถั่วเขียวสายพันธุ์ V4758 และ V4785 และยีนต้านทานโรคใบจุด 1 ยีน จากถั่วเขียวสายพันธุ์ V4718 รวมเข้าไว้ในสายพันธุ์ต้านทานโรคราแป้งที่มียีนต้านทานโรคราแป้งจากถั่วเขียวสายพันธุ์ V4718 ซึ่งได้จากโครงการวิจัยในระยะที่ 1 เพื่อรวมยีนต้านทานทั้ง 4 ยีนเข้าไว้ในพันธุ์เดียวกัน คือ พันธุ์ CN72 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือก ซึ่งจะทำได้พันธุ์ต้านทานโรคราแป้งที่ยั่งยืนและสามารถต้านทานต่อโรคใบจุดด้วย สำหรับส่งเสริมเกษตรกรในอนาคต
3. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเขียวที่มีศักยภาพในการต้านทานโรคและให้ผลผลิตสูงจากประชากร RILs ของคู่ผสม CN72 x V4718, CN72 x V4758 และ/หรือ CN72 x V4785 เพื่อนำไปใช้ในการรวมยีนต้านทาน และใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวในอนาคต

ขอบเขตของการวิจัย

1. ถั่วเขียวสายพันธุ์ต้านทานโรคราแป้งที่คัดเลือกได้จากโครงการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวเพื่อเพิ่มผลผลิตในระยะที่ 2 จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ V4718, V4758 และ V4785 ซึ่งทั้งสามสายพันธุ์มีปฏิกิริยาและระดับความต้านทานโรคราแป้งแตกต่างกัน ความต้านทานโรคของแต่ละสายพันธุ์ถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 คู่ และเป็นยีนต่างตำแหน่งกัน (Khajudparn et al., 2007) ส่วนพันธุ์อ่อนแอต่อโรคใช้พันธุ์ CN72 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง และต้านทานต่อหนอนแมลงวันเจาะลำต้น (ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์-เทคโนโลยี, 2553) นอกจากนี้ ใช้ถั่วเขียวสายพันธุ์ที่มีการรวมยีนต้านทานโรคราแป้งจากสายพันธุ์ V4718 ซึ่งพัฒนาได้จากโครงการวิจัยระยะที่ 1

2. ประชากร RILs ของคู่ผสม CN72 x V4758 และ/หรือ CN72 x V4785 มีการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคราแป้ง และคู่ผสม CN72 x V4718 มีการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคใบจุด สำหรับทดสอบเครื่องหมาย SSR ที่เคยมีรายงานว่ามัลติค็อกกับยีนต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียว และพัฒนาเครื่องหมาย ISSR หรือ ISSR-RGA ที่สามารถบ่งชี้ลักษณะความต้านทานโรคราแป้งและ/หรือโรคใบจุด

3. ปลูกพืชและประเมินโรคในแปลงทดลอง ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในฤดูซึ่งมีการระบาดของโรค (ฤดูหนาว) และโรคใบจุด (ฤดูฝน) และทำการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลในห้องปฏิบัติการปรับปรุงพันธุ์พืช อาคารศูนย์เครื่องมือและวิทยาศาสตร์ 3

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

1.1 ได้เครื่องหมาย ISSR และ/หรือ ISSR-RGA ที่สามารถบ่งชี้ลักษณะความต้านทานโรคราแป้งและ/หรือโรคใบจุดในถั่วเขียว และสามารถคัดเลือกต้นที่ได้รับการรวมยีนต้านทานโรคหลายยีนเข้าไว้ในพันธุ์/สายพันธุ์เดียวกันได้ และอาจสามารถบ่งชี้ต้นต้านทานโรคในพันธุ์/สายพันธุ์ อื่น ๆ ได้ในเวลาอันรวดเร็ว โดยไม่ต้องรอให้มีการระบาดของโรค คัดเลือกได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าก่อนการผสมพันธุ์ สามารถย่นระยะเวลาในการคัดเลือก และประหยัดค่าใช้จ่ายในการจัดการพื้นที่เพาะปลูกและการดูแลรักษา

1.2 ได้พันธุ์ปรับปรุงที่มีพันธุกรรมและลักษณะคล้าย CN72 ที่มีความต้านทานโรคราแป้งสูงขึ้นจากการรวมยีนต้านทานโรคราแป้งทั้ง 3 ยีน และมียีนต้านทานโรคใบจุดเพิ่มอีก 1 ยีนด้วย

1.3 ได้สายพันธุ์ปรับปรุงที่มียีนต้านทานโรคราแป้ง 2 หรือ 3 ยีน และมียีนต้านทานโรคใบจุด 1 ยีน และ/หรือให้ผลผลิตสูง ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการถ่ายทอดยีนไปสู่พันธุ์รับรองอื่นที่อ่อนแอต่อโรคราแป้งได้

2. นำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์ หลังจากทำการทดสอบพันธุ์ปรับปรุงดังกล่าวหลายสภาพแวดล้อมแล้ว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีอาจทำการจดทะเบียนพันธุ์ และผลิตเมล็ดพันธุ์ในเชิงพาณิชย์ หรืออาจส่งต่อให้กรมวิชาการเกษตรทำการทดสอบพันธุ์ต่อในระดับชาติ และส่งเสริมแก่เกษตรกรในอนาคต เพื่อลดการนำเข้าถั่วเขียวจากต่างประเทศ และเพิ่มอัตราการส่งออก

3. เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตถั่วเขียว โดยให้ผลผลิตต่อหน่วยลงทุนสูงขึ้น

4. เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย เกษตรกรผู้ปลูกถั่วเขียวได้รายได้เพิ่มขึ้นจากการปลูกถั่วเขียว เป็นการแก้ปัญหาความยากจน ลดการใช้สารเคมีกำจัดโรคแมลง ที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพเกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม และลดต้นทุนการผลิตและส่งเสริมให้มีการปลูกถั่วเขียวเป็นพืชหมุนเวียนเพื่อบำรุงดินร่วมกับการปลูกพืชอื่น จึงลดการใช้ปุ๋ยเคมีและเพิ่มประสิทธิภาพการปลูกพืชชนิดอื่นด้วย

5. ได้นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาซึ่งมีความรู้และประสบการณ์ทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีดั้งเดิม และด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลซึ่งเป็นสาขาวิชาที่ขาดแคลน 1 คน

6. ได้ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ 2 เรื่อง



บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

ส่วนที่ 1 การประเมินโรคในถั่วเขียว

1.1 การประเมินโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4758 และ CN72 × V4785

ทำการผลิตประชากรที่มีการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคราแป้ง (RILs) โดยการผสมระหว่างถั่วเขียวพันธุ์ CN72 (พันธุ์อ่อนแอ) กับ V4758 (สายพันธุ์ต้านทาน) และพันธุ์ CN72 กับ V4785 (สายพันธุ์ต้านทาน) เพื่อผลิตเมล็ดลูกผสมชั่วที่หนึ่ง (F_1) ปลูกเมล็ด F_1 ผสมตัวเองเพื่อผลิตประชากร F_2 ปลูก F_2 จำนวน 180-200 ต้น ผสมตัวเองแล้วเก็บหนึ่งเมล็ดต่อต้นเพื่อปลูกในชั่วถัดไป ทำเช่นเดียวกันจนถึงประชากร $F_{2.6}$ ผสมตัวเอง และปลูกประเมินโรคราแป้งในช่วงปี พ.ศ. 2556 ถึง 2561 โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก (randomized complete block design; RCBD) จำนวน 3 แถว แต่ละแถวยาว 2 เมตร ระยะระหว่างแถว 50 เซนติเมตร และระยะระหว่างหลุม 20 เซนติเมตร โดยปลูกพันธุ์เปรียบเทียบ (CN72, V4758 และ V4785) ทุก 10 แถว ถอนแยกให้เหลือ 3 ต้นต่อหลุม ใส่ปุ๋ย N-P-K สูตร 12-24-12 อัตรา 30 กก./ไร่ และคาร์โบฟูแรน (carbofuran; 3% G) รองพื้นอัตรา 10 ก./หลุม ก่อนปลูกทำการพ่นสารเคมีป้องกันวัชพืชด้วยอะลาคลอร์ (alachlor) หลังจากงอกได้ 10 วัน ทำการถอนแยกให้เหลือ 2 ต้น/หลุม เมื่อถั่วเขียวอายุ 25-30 วัน ทำการใส่ปุ๋ย N-P-K สูตร 12-24-12 อัตรา 30 กก./ไร่ พร้อมพูนโคน แล้วทำการฉีดพ่นสารโมนโครโทฟอส (monocrotophos) อัตรา 15-20 ซีซี./น้ำ 20 ลิตร เพื่อป้องกันหนอนแมลงวันเจาะลำต้นถั่ว จนถั่วเขียวอายุได้ 2 เดือน พ่นสารโมนโครโทฟอส อัตรา 40 ซีซี./น้ำ 20 ลิตร เพื่อป้องกันหนอนเจาะฝักถั่วเขียว ใช้แรงงานกำจัดวัชพืชเมื่อขึ้นหนาแน่น ให้น้ำสัปดาห์ละ 1 ครั้ง และประเมินระดับความต้านทานโรคราแป้งของต้น RIL ทุกต้น โดยใช้วิธีการของปริญญา ขจัดพาล (2552) ซึ่งแบ่งเป็นระดับคะแนน 1-9 ดังนี้

- 1 คะแนน = ไม่มีอาการโรค
- 2 คะแนน = พบแผล 2-3 แผลบนใบตอนล่าง
- 3 คะแนน = พบแผล 2-3 แผลบนใบตอนล่าง เชื้อเริ่มสร้างสปอร์
- 4 คะแนน = พบแผลจำนวนมากบนใบตอนล่างและตอนกลาง เชื้อเริ่มสร้างสปอร์
- 5 คะแนน = เหมือนระดับที่ 4 ใบเริ่มเหลืองหรือแห้งกรอบ เชื้อสร้างสปอร์มาก
- 6 คะแนน = เหมือนระดับที่ 5 สามารถมองเห็นอาการได้ในระยะไกล เชื้อสร้างสปอร์มาก
- 7 คะแนน = พบแผลบนใบทั่วทั้งต้น ใบแห้งกรอบแต่ไม่เกิน 25%
- 8 คะแนน = เหมือนระดับที่ 7 ใบแห้งกรอบ 25-50%
- 9 คะแนน = ใบแห้งกรอบมากกว่า 50%

นำค่าเฉลี่ยคะแนนการเกิดโรคราแป้งมาจัดอันดับความต้านทานดังนี้ ช่วงคะแนน 1-4.9 เป็นสายพันธุ์ต้านทาน และ 5-9 เป็นสายพันธุ์อ่อนแอ วิเคราะห์ค่าไคสแควร์ (χ^2) เพื่อศึกษาการกระจายตัวของประชากรต่อโรคราแป้ง

และใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดโรคราแป้งทั้งสองปี พร้อมทั้งวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของระดับความรุนแรงในการเกิดโรค โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ซึ่งแปลงค่า (transform) คะแนนการเกิดโรคราแป้งโดยใช้สูตร $X' = (X + 1)^{1/2}$ และวิเคราะห์อัตราพันธุกรรมแบบกว้าง (broad sense heritability) ทั้งสองปีตามวิธีการของปริญญา ขจัดพาล (2552)

1.2 การประเมินโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4718

ทำการผลิตประชากรที่มีการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคราแป้ง (RILs) โดยการผสมระหว่างถั่วเขียวพันธุ์ CN72 (พันธุ์อ่อนแอ) กับ V4718 (สายพันธุ์ต้านทาน) เพื่อผลิตเมล็ดลูกผสมชั่วที่หนึ่ง (F_1) ปลูกเมล็ด F_1 ผสมตัวเองเพื่อผลิตประชากร F_2 ปลูก F_2 จำนวน 180-200 ต้น ผสมตัวเองแล้วเก็บหนึ่งเมล็ดต่อต้นเพื่อปลูกในชั่วถัดไป ทำเช่นเดียวกันจนถึงประชากร $F_{2.9}$ เพื่อประเมินโรคใบจุดในปี พ.ศ. 2559 และ 2560 ตามลำดับ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก (randomized complete block design; RCBD) จำนวน 3 แถว แต่ละแถวยาว 2 เมตร ระยะระหว่างแถว 50 เซนติเมตร และระยะระหว่างหลุม 20 เซนติเมตร โดยปลูกพันธุ์เปรียบเทียบ (CN72 และ V4718) ทุก 10 แถว ถอนแยกให้เหลือ 3 ต้นต่อหลุม ใส่ปุ๋ย N-P-K สูตร 12-24-12 อัตรา 30 กก./ไร่ และคาร์โบฟูแรน (carbofuran; 3% G) รองพื้นอัตรา 10 ก./หลุม ก่อนปลูกทำการพ่นสารเคมีป้องกันวัชพืชด้วยอะลาคลอร์ (alachlor) หลังจากงอกได้ 10 วัน ทำการถอนแยกให้เหลือ 2 ต้น/หลุม เมื่อถั่วเขียวอายุ 25-30 วัน ทำการใส่ปุ๋ย N-P-K สูตร 12-24-12 อัตรา 30 กก./ไร่ พร้อมพูนโคน แล้วทำการฉีดพ่นสารโมนโครโทฟอส (monocrotophos) อัตรา 15-20 ซีซี./น้ำ 20 ลิตร เพื่อป้องกันหนอนแมลงวันเจาะลำต้นถั่ว จนถั่วเขียวอายุได้ 2 เดือน พ่นสารโมนโครโทฟอส อัตรา 40 ซีซี./น้ำ 20 ลิตร เพื่อป้องกันหนอนเจาะฝักถั่วเขียว ใช้แรงงานกำจัดวัชพืชเมื่อขึ้นหนาแน่น ให้น้ำสัปดาห์ละ 1 ครั้ง และประเมินระดับความต้านทานโรคใบจุดของต้น $F_{2.9}$ ทุกต้น โดยใช้วิธีการของสมพงษ์ จันท์แก้ว (2552) ซึ่งแบ่งเป็นระดับคะแนน 1-5 ดังนี้

- 1 คะแนน = 0 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค
- 2 คะแนน = 1-25 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค
- 3 คะแนน = 26-50 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค
- 4 คะแนน = 51-75 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค
- 5 คะแนน = 76-100 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค

นำค่าเฉลี่ยคะแนนการเกิดโรคใบจุดมาจัดอันดับความต้านทานดังนี้ ช่วงคะแนน 1-2.9 เป็นสายพันธุ์ต้านทาน และ 3-5 เป็นสายพันธุ์อ่อนแอ วิเคราะห์ค่าไคสแควร์ (χ^2) เพื่อศึกษาการกระจายตัวของประชากรต่อโรคใบจุด และใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดโรคใบจุดทั้งสองปี พร้อมทั้งวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของระดับความรุนแรงในการเกิดโรค โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ซึ่งแปลงค่า (transform) คะแนนการเกิดโรคใบจุดโดยใช้สูตร $X' = (X + 1)^{1/2}$ และวิเคราะห์อัตราพันธุกรรมแบบกว้าง (broad sense heritability) ทั้งสองปีตามวิธีการของปริญญา ขจัดพาล (2552)

ส่วนที่ 2 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล

2.1 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล ISSR และ ISSR-RGA ที่บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว

2.1.1 ใช้วิธี bulk segregant analysis (BSA) ในการทดลองเพื่อประหยัดเวลา แรงงาน และค่าใช้จ่ายในการตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุล ISSR และ/หรือ ISSR-RGA ที่มีลิงค์เกจกับยีนต้านทานโรคราแป้ง โดยจะทำการ screen เครื่องหมายเบื้องต้นด้วยดีเอ็นเอจาก 4 แหล่งก่อนคือ 1) พันธุ์แม่ที่อ่อนแอ CN72 2) สายพันธุ์พ่อที่ต้านทานโรค (V4758 และ V4785) 3) ดีเอ็นเอประชากรรวมต้านทาน (resistant bulk DNA) และ 4) ดีเอ็นเอประชากรรวมอ่อนแอ (susceptible bulk DNA) คัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพันธุ์อ่อนแอ และสายพันธุ์ต้านทาน และจาก polymorphic markers กลุ่มนี้ คัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายที่ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอเหมือนกันระหว่างพันธุ์อ่อนแอ และดีเอ็นเอประชากรรวมอ่อนแอ และระหว่างสายพันธุ์ต้านทานโรค และดีเอ็นเอประชากรรวมต้านทาน นำเครื่องหมายดังกล่าวไปทดสอบในประชากรที่มีการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคราแป้งเป็นรายต้น เพื่อตรวจหาเครื่องหมายที่มีลิงค์เกจกับยีนต้านทานโรคราแป้ง และประเมินระยะห่างระหว่างเครื่องหมายและยีนต้านทานโรคราแป้งต่อไป โดยมีรายละเอียดของแต่ละขั้นตอนดังนี้

2.1.2 การผลิตประชากรที่มีการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคราแป้งตามข้อมูลใน ส่วนที่ 1 โดยใช้คะแนนการเกิดโรคราแป้งที่ 65 วัน

2.1.3 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction)

ทำการเก็บใบอ่อนของถั่วเขียวแต่ละต้น และพ่อแม่พันธุ์ เพื่อสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Lodhi et al. (1994) นำดีเอ็นเอของต้นที่ต้านทานโรค จำนวน 10 ต้น มารวมในสัดส่วนที่เท่ากัน เป็นดีเอ็นเอประชากรรวมต้านทาน (resistant bulk DNA) และนำดีเอ็นเอของต้นที่อ่อนแอต่อโรค จำนวน 10 ต้น มารวมในสัดส่วนที่เท่ากัน เป็นดีเอ็นเอประชากรรวมอ่อนแอ (susceptible bulk DNA)

2.1.4 การวิเคราะห์ ISSR (ISSR analysis)

ทำการวิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวนประมาณ 63 ไพรเมอร์จาก University of British Columbia โดยมีวิธีการดังนี้

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้องค์ประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอ 150 ng, 1x buffer [10 mM Tris-HCl (pH 9.1), 0.01% Triton™X-100 และ 50 mM KCl], 250 μ M dNTP, 3.5 mM MgCl₂, 0.4 μ M ไพรเมอร์ ISSR และ Taq DNA polymerase 1 unit โดยใช้ขั้นตอนอุณหภูมิดังนี้

Denaturing step:	อุณหภูมิ 95 °ซ	5 นาที	จำนวน 1 รอบ
Denaturing step:	อุณหภูมิ 95 °ซ	1 นาที	} จำนวน 35 รอบ
Annealing step:	อุณหภูมิ 50 °ซ	1 นาที	
Elongation step:	อุณหภูมิ 72 °ซ	1 นาที	
Elongation step:	อุณหภูมิ 72 °ซ	10 นาที	จำนวน 1 รอบ

(อาจจำเป็นต้องปรับ annealing temperature ให้เหมาะสมสำหรับแต่ละไพรเมอร์) หลังจากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ไปแยกขนาดภายใต้สนามไฟฟ้า 200 โวลต์ บน denaturing polyacrylamide gel 6% เป็นเวลา 70 นาที แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ตามวิธีการของ Sambrook and Russell (2001)

2.1.5 การวิเคราะห์ ISSR-RGA

คัดเลือกเฉพาะไพรเมอร์ ISSR ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนจากข้อ 2.1.4 และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนต้านทานโรค 4 ชนิด คือ ไพรเมอร์ GLPLAL 1 และ P-Loop (Mahanil, 2007) ไพรเมอร์ Pto kin-1 (Chen et al., 1998) และ RLK-for (Feuillet et al., 1997) และค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ powdery mildew resistance gene ของถั่วเขียว (*Vigna radiata*) จากเว็บไซต์ National Center for Biotechnology Information (NCBI) จำนวน 10 รหัส (LOC106769116, LOC106778864, LOC106774555, LOC106771308, LOC106771113, LOC106764014, LOC106763934, LOC106763034, LOC106759013 และ LOC106756406) จากนั้นดาวน์โหลดลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบ fasta format มาใช้ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้โปรแกรม Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_www.cgi) และส่งวิเคราะห์ไพรเมอร์จากบริษัท THEERA TRADING co., LTD. จำนวน 2 ไพรเมอร์ ประกอบด้วย PMR1R และ PMR5R โดยมีวิธีการดังนี้

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้องค์ประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอ 150 ng, 1x buffer [10 mM Tris-HCl (pH 9.1), 0.01% TritonTMX-100 และ 50 mM KCl], 250 μ M dNTP, 3.5 mM MgCl₂, 0.4 μ M ไพรเมอร์ ISSR, 1 μ M RGA primer และ Taq DNA polymerase 1 unit โดยใช้ขั้นตอนอุณหภูมิดังนี้

Denaturing step:	อุณหภูมิ 95°ซ	5 นาที	จำนวน 1 รอบ
Denaturing step:	อุณหภูมิ 95°ซ	1 นาที	} จำนวน 35 รอบ
Annealing step:	อุณหภูมิ 50°ซ	1 นาที	
Elongation step:	อุณหภูมิ 72°ซ	1 นาที	
Elongation step:	อุณหภูมิ 72°ซ	10 นาที	จำนวน 1 รอบ

หลังจากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ไปแยกขนาดภายใต้สนามไฟฟ้า 200 โวลต์ บน denaturing polyacrylamide gel 6% เป็นเวลา 70 นาที แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ตามวิธีการของ Sambrook and Russell (2001)

2.1.6 การตรวจหาเครื่องหมายที่มีลิงค์เกจ (linkage) กับยีนต้านทานโรค

วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ ISSR หรือ ISSR-RGA โดยนับจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดของพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ในแต่ละไพรเมอร์ (number of scorable bands; NB) จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of polymorphic bands between resistant and susceptible parents; NPB) ตรวจหาการมีลิงค์เกจระหว่างเครื่องหมาย ISSR หรือ ISSR-RGA กับยีนต้านทานโรคด้วยวิธี BSA โดยสังเกตการมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอดังกล่าวระหว่างสายพันธุ์พ่อที่ต้านทาน (resistant parent) และประชากรรวมที่ต้านทาน (resistant bulk DNA) และระหว่างพันธุ์แม่ที่อ่อนแอ (susceptible parent) และประชากรรวมที่อ่อนแอ

(susceptible bulk DNA) โดยถ้าพบแถบดีเอ็นเอดังกล่าวในสายพันธุ์พ่อที่ต้านทานและประชากรรวมที่ต้านทานเหมือนกัน แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าวในพันธุ์แม่ที่อ่อนแอและประชากรรวมที่อ่อนแอ หรือไม่พบแถบดีเอ็นเอในสายพันธุ์พ่อที่ต้านทานและประชากรรวมที่ต้านทาน แต่พบในทั้งพันธุ์แม่ที่อ่อนแอและประชากรรวมที่อ่อนแอ แสดงว่าน่าจะมีลิงค์เกจระหว่างเครื่องหมายนั้นกับยีนต้านทานโรค นำเครื่องหมายดังกล่าวไปศึกษาต่อไป

ตรวจสอบเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่น่าจะมีลิงค์เกจกับยีนต้านทานโรคราแป้ง โดยวิเคราะห์แยกต้น ใช้ต้นที่ต้านทาน (resistant individual RIL) และอ่อนแอ (susceptible individual RIL) อย่างละ 10 ต้น บันทึกการมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอ คัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายที่ให้แถบ/ไม่ให้แถบดีเอ็นเอตามที่คาดไว้ในต้นอย่างน้อย 16 จาก 20 ต้น สำหรับใช้ทดสอบในประชากรขนาด 100 ต้นต่อไป

2.1.7 การหาระยะห่างระหว่างเครื่องหมาย ISSR หรือ ISSR-RGA และยีนต้านทานโรคราแป้ง นำเครื่องหมาย ISSR หรือ ISSR-RGA ที่คัดเลือกจากข้อ 2.1.6 มาประเมินระยะห่างกับยีนต้านทานโรคราแป้ง โดยใช้ต้นที่ต้านทาน (resistant individual RIL) และอ่อนแอ (susceptible individual RIL) อย่างละ 50 ต้น บันทึกการมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอ นับจำนวนต้นที่เกิด recombination ระหว่างเครื่องหมาย ISSR หรือ ISSR-RGA และยีนต้านทานโรค แล้วนำมาคำนวณ % recombination ดังนี้

$$\% \text{ recombination} = \frac{\text{จำนวนต้นที่เกิด recombination}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$$

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุลด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006) และวิเคราะห์ลิงค์เกจด้วยโปรแกรม MAPMAKER 3.0 (Lander et al., 1978)

2.1.8 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR หรือ ISSR-RGA และยีนต้านทานโรคราแป้ง

นำข้อมูลการเกิดโรคราแป้งเฉลี่ยแต่ละต้น และข้อมูลของเครื่องหมายโมเลกุลมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลและยีนต้านทานโรคราแป้งแบบ multiple interval mapping (MIM) (Kao et al., 1999) ด้วยโปรแกรม WinQTLcart 2.5 (Wang et al., 2007) โดยวิเคราะห์จากผลของ composite interval mapping (CIM) กำหนดค่า permutation ที่ 1,000 รอบ และค่าความเชื่อมั่นที่ 95.0% เพื่อคำนวณหา significance threshold ของค่า LOD ที่สามารถแยกตำแหน่ง major QTL ออกมาจากบริเวณอื่นๆ ได้

2.2 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่บ่งชี้ลักษณะความต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียว

2.2.1 ใช้วิธี BSA ในการทดลองเพื่อประหยัดเวลา แรงงาน และค่าใช้จ่ายในการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่เคยมีรายงานว่ามิลิงค์เกจกับยีนต้านทานโรคใบจุด ได้แก่ เครื่องหมาย CEDC031, CEDG044, CEDG084, CEDG117, CEDG305, VR108 และ VR393 (Chankaew et al., 2011) โดยจะทำการ screen เครื่องหมายเบื้องต้นด้วยดีเอ็นเอจาก 4 แหล่งก่อนคือ 1) พันธุ์แม่ที่อ่อนแอ CN72 2) สายพันธุ์พ่อที่ต้านทานโรค (V4718) 3) ดีเอ็นเอประชากรรวมต้านทาน (resistant bulk DNA) 4) ดีเอ็นเอประชากรรวม

อ่อนแอ (susceptible bulk DNA) คัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่าง พันธุ์อ่อนแอ และสายพันธุ์ต้านทาน และจาก polymorphic markers กลุ่มนี้ คัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายที่ให้ รูปแบบแถบดีเอ็นเอเหมือนกันระหว่าง พันธุ์อ่อนแอ และดีเอ็นเอประชากรรวมอ่อนแอ และระหว่างสายพันธุ์ต้านทานโรค และดีเอ็นเอประชากรรวมต้านทาน นำเครื่องหมายดังกล่าวไปทดสอบในประชากรที่มีการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคเป็นรายต้น เพื่อตรวจหาเครื่องหมายที่มีลิงค์เกจกับยีนต้านทานโรค และประเมินระยะห่างระหว่างเครื่องหมายและยีนต้านทานโรคต่อไป โดยมีรายละเอียดของแต่ละขั้นตอนดังนี้

2.2.2 การผลิตประชากรที่มีการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคใบจุด

ทำการผลิตประชากรที่มีการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคใบจุด RILs โดยการผสมระหว่างถั่วเขียวพันธุ์ CN 72 (พันธุ์อ่อนแอ) กับ V4718 (สายพันธุ์ต้านทาน) เพื่อผลิตเมล็ดลูกผสมชั่วที่หนึ่ง (F₁) ปลูกเมล็ด F₁ ผสมตัวเองเพื่อผลิตประชากร F₂ ปลูก F₂ จำนวน 180-200 ต้น ผสมตัวเองแล้วเก็บหนึ่งเมล็ดต่อต้นเพื่อปลูกในชั่วถัดไป ทำเช่นเดียวกันจนถึงประชากร F_{2.9} ปลูกถั่วเขียวพันธุ์ CN72, V4718 และประชากร F_{2.9} ของ CN72 x V4718 จำนวน 180-200 ต้น ในช่วงที่มีโรคใบจุดระบาด ประเมินระดับความต้านทานโรคใบจุดของต้น F_{2.9} ทุกต้น โดยใช้วิธีการของสมพงษ์ จันทร์แก้ว (2552)

2.2.3 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการเก็บยอดอ่อน ฝักอ่อน หรือดอกอ่อนของถั่วเขียวแต่ละต้น และพ่อแม่พันธุ์ เพื่อสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Lodhi et al. (1994) นำดีเอ็นเอของต้นที่ต้านทานโรค 10 ต้น มารวมในสัดส่วนที่เท่ากัน เป็นดีเอ็นเอประชากรรวมต้านทานและนำดีเอ็นเอของต้นอ่อนแอต่อโรค 10 ต้น มารวมในสัดส่วนที่เท่ากัน เป็นดีเอ็นเอประชากรรวมอ่อนแอ

2.2.4 การวิเคราะห์ SSR (SSR analysis)

ทำการวิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ SSR จำนวน 7 เครื่องหมาย จาก Chankaew et al. (2011) โดยมีวิธีการดังนี้

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้องค์ประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอ 2 ng, 1x buffer [20 mM Tris-HCl (pH 8.4) และ 50 mM KCl], 0.2 mM dNTP, 2 mM MgCl₂, 0.5 μM ไพรเมอร์ SSR และ Taq DNA polymerase 1 unit โดยใช้ขั้นตอนอุณหภูมิดังนี้

Denaturing step:	อุณหภูมิ 94 °ซ	2 นาที	จำนวน 1 รอบ
Denaturing step:	อุณหภูมิ 94 °ซ	30 วินาที	
Annealing step:	อุณหภูมิ 50-65 °ซ	30 วินาที	จำนวน 35 รอบ
Elongation step:	อุณหภูมิ 72 °ซ	1 นาที	
Elongation step:	อุณหภูมิ 72 °ซ	10 นาที	

(อาจจำเป็นต้องปรับ annealing temperature ให้เหมาะสมสำหรับแต่ละไพรเมอร์)

หลังจากนั้นนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ไปแยกขนาดภายใต้สนามไฟฟ้า 1,000 โวลต์ บน denaturing polyacrylamide gel 6% เป็นเวลานาน 50 นาที แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ตามวิธีการของ Sambrook and Russell (2001)

2.2.5 การตรวจหาเครื่องหมายที่มีลิงค์เกจ (linkage) กับยีนต้านทานโรค

วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอจากไพโรเมอร์ SSR ตรวจหาการมีลิงค์เกจระหว่างเครื่องหมาย SSR กับยีนต้านทานโรคด้วยวิธี BSA โดยสังเกตการมีแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากันระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ที่ต้านทาน และประชากรรวมที่ต้านทาน แต่มีขนาดแถบดีเอ็นเอต่างกับกับพันธุ์แม่ที่อ่อนแอ และประชากรรวมที่อ่อนแอ แสดงว่าน่าจะมีลิงค์เกจระหว่างเครื่องหมายนั้น ๆ กับยีนต้านทานโรค นำเครื่องหมายดังกล่าวไปศึกษาต่อไป

ตรวจสอบเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่น่าจะมีลิงค์เกจกับยีนต้านทานโรคใบจุด โดยวิเคราะห์แยกต้น ใช้ต้นที่ต้านทานและต้นที่อ่อนแออย่างละ 10 ต้น บันทึกการมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอ คัดเลือกเฉพาะเครื่องหมายที่ให้แถบ/ไม่ให้แถบดีเอ็นเอตามที่คาดไว้ในต้นอย่างน้อย 19 จาก 20 ต้น สำหรับใช้ทดสอบในประชากรขนาด 100 ต้นต่อไป

2.2.6 การหาระยะห่างระหว่างเครื่องหมาย SSR และยีนต้านทานโรคใบจุด

นำเครื่องหมาย SSR ที่คัดเลือกจากข้อ 2.2.5 มาประเมินระยะห่างกับยีนต้านทานโรคใบจุด โดยใช้ต้นที่ต้านทานและต้นที่อ่อนแออย่างละ 50 ต้น บันทึกการมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอ นับจำนวนต้นที่เกิด recombination ระหว่างเครื่องหมาย SSR และยีนต้านทานโรค แล้วนำมาคำนวณ % recombination ดังนี้

$$\% \text{ recombination} = \frac{\text{จำนวนต้นที่เกิด recombination}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$$

วิเคราะห์สหสัมพันธ์ของการกระจายตัวของเครื่องหมายโมเลกุลด้วย SPSS version 14.0 (Levesque and SPSS Inc., 2006) และวิเคราะห์ลิงค์เกจด้วยโปรแกรม MAPMAKER 3.0 (Lander et al., 1978)

หมายเหตุ: หากไม่พบเครื่องหมาย SSR ที่มีลิงค์เกจกับยีนต้านทานโรคใบจุดใกล้ชิดพอ (≤ 5 cM) จะทำการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล ISSR และ ISSR-RGA ที่บ่งชี้ลักษณะความต้านทานโรคใบจุดโดยใช้วิธีการเดียวกับข้อ 2.1 แต่ใช้ประชากรที่มีการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคใบจุด และประเมินระดับความต้านทานโรคใบจุดตามข้อ 2.2.2

2.2.7 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR หรือ ISSR-RGA และยีนต้านทานโรคใบจุด

นำข้อมูลการเกิดโรคใบจุดเฉลี่ยแต่ละต้น และข้อมูลของเครื่องหมายโมเลกุลมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลและยีนต้านทานโรคใบจุดแบบ multiple interval mapping (MIM) (Kao et al. 1999) ด้วยโปรแกรม WinQTLcart 2.5 (Wang et al., 2007) โดยวิเคราะห์จากผลของ composite interval mapping (CIM) กำหนดค่า permutation ที่ 1,000 รอบ และค่าความเชื่อมั่นที่ 95.0% เพื่อคำนวณหา significance threshold ของค่า LOD ที่สามารถแยกตำแหน่ง major QTL ออกมาจากบริเวณอื่นๆ ได้

ส่วนที่ 3 การปรับปรุงสายพันธุ์ต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุด โดยวิธีการรวมยีนต้านทานหลายยีนไว้ในสายพันธุ์เดียวกัน

การรวมยีนต้านทานหลายยีนเข้าไว้ในสายพันธุ์เดียวกันมีวัตถุประสงค์เพื่อให้สามารถต้านทานเชื้อสาเหตุของโรคราแป้งและโรคใบจุดได้หลายสายพันธุ์มากขึ้น หรือเพิ่มระดับความต้านทานโรคให้สูงขึ้น โดยจะทำการรวมยีนต้านทาน ซึ่งการรวมยีนต้านทาน 4 ยีนมีขั้นตอนดังนี้

1. คัดเลือกต้น RILs ในแต่ละประชากรที่มีความต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุดสูงสุด นำมาผสมพันธุ์กันระหว่างประชากรดังนี้

คู่ผสมที่ 1 $F_{2,9}$ (CN72 × V4785) × $F_{2,7}$ (CN72 × V4718)

คู่ผสมที่ 2 $F_{2,9}$ (CN72 × V4785) × $F_{2,8}$ (CN72 × V4758)

คู่ผสมที่ 3 $F_{2,7}$ (CN72 × V4718) × $F_{2,8}$ (CN72 × V4758)

2. นำลูกผสม F_1 ที่ได้จากข้อ 1. มาผสมพันธุ์กัน โดยผสมระหว่าง F_1 จากคู่ผสมที่ 1 กับคู่ผสมที่ 2 และระหว่าง F_1 จากคู่ผสมที่ 1 กับ คู่ผสมที่ 3 ดังนี้

คู่ผสมที่ 1 F_1 (CN72; V4785; V4718) × F_1 (CN72; V4785; V4758)

คู่ผสมที่ 2 F_1 (CN72; V4718; V4758) × F_1 (CN72; V4718; V4785)

3. ปลูกลูกผสมที่มีการกระจายตัวของยีนต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุดที่ได้จากข้อ 2. และเก็บใบมาสกัดดีเอ็นเอ เพื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีลิงค์เกากับยีนต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุดซึ่งได้จากงานวิจัยส่วนที่ 2 คัดเลือกเฉพาะต้นที่มียีนต้านทานโรค

4. นำลูกผสมที่มียีนต้านทานโรคไปผสมกลับ (backcross) ไปยัง CN72 จนกระทั่งได้ต้นที่มีลักษณะคล้ายกับ CN72 แต่มียีนต้านทานโรคจากการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลในทุกชั่ว

5. นำลูกผสม BC ที่ได้จากข้อ 4. มาผสมตัวเอง เพื่อให้ได้ต้นที่มียีนต้านทานในสภาพ homozygous

6. ปลูกลูกผสม BCF_2 ที่ได้จากข้อ 5. คัดเลือกต้น BCF_2 ที่มีลักษณะดี และให้ผลผลิตสูง (จากการประเมินด้วยสายตา) และมียีนต้านทาน (จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยคัดเลือก) ผสมตัวเอง และเก็บเมล็ด BCF_3

7. ปลูกเมล็ด BCF_3 แบบต้นต่อแถว ในฤดูที่มีการระบาดของโรค คัดเลือกเฉพาะแถวที่ไม่มีการกระจายตัวของความต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุด แล้วตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลอีกครั้งว่ามียีนต้านทาน แถวดังกล่าวน่าจะเป็นสายพันธุ์ที่มียีนต้านทานในสภาพ homozygous

ส่วนที่ 4 การคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวเขียวที่มีศักยภาพในการต้านทานโรคและให้ผลผลิตสูงจากวิธีการรวมยีนต้านทานหลายยีนไว้ในสายพันธุ์เดียวกัน

นำสายพันธุ์ที่มียีนต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุดมาปลูกทดสอบผลผลิต และความต้านทานโรค โดยทดสอบหลายสภาพแวดล้อม เปรียบเทียบกับพันธุ์ CN72, SUT1, KPS1, V4718, V4758 และ V4785 โดยใช้แผนการทดลองแบบ RCBD และการดูแลรักษาเช่นเดียวกับส่วนที่ 1

บทที่ 3

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและอภิปรายผล

ส่วนที่ 1 การประเมินโรคในถั่วเขียว

1.1 การประเมินโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4758 และ CN72 × V4785

จากการประเมินโรคราแป้งในถั่วเขียวในประชากร $F_{2:9}$ และ $F_{2:10}$ ของคู่ผสม CN72 × V4758 ที่อายุ 65 วัน ในปี พ.ศ. 2558 และ 2561 ตามลำดับ พบว่าปี พ.ศ. 2558 มีความรุนแรงในการเกิดโรคราแป้งใกล้เคียงกับปี พ.ศ. 2561 โดยมีความสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.51 ($P < 0.001$) ซึ่งปี พ.ศ. 2558 พันธุ์พ่อ V4758 ที่ต้านทานต่อโรคราแป้งมีคะแนนเฉลี่ย 3.33 ส่วนพันธุ์แม่ CN72 ที่อ่อนแอมีคะแนนเฉลี่ย 6.00 ขณะที่ปี พ.ศ. 2561 พันธุ์พ่อแม่ (V4758 และ CN72) มีคะแนนเฉลี่ย 4.00 และ 6.67 ตามลำดับ (ภาพที่ 1; ตารางภาคผนวกที่ 1 และ 2) เมื่อพิจารณาการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคราแป้งในประชากรนี้ จากการใช้จำนวนลูกผสม 64 ต้น ปี พ.ศ. 2558 มีต้นต้านทานมากกว่าพันธุ์พ่อ V4758 จำนวน 6 ต้น ต้านทานเท่ากับพันธุ์พ่อ จำนวน 2 ต้น อ่อนแอเท่ากับพันธุ์แม่ CN72 จำนวน 38 ต้น และกระจายอยู่ในขอบเขตการเกิดโรคของพันธุ์พ่อแม่ จำนวน 18 ต้น ส่วนปี พ.ศ. 2561 มีต้นต้านทานมากกว่าพันธุ์พ่อ V4758 จำนวน 2 ต้น ต้านทานเท่ากับพันธุ์พ่อ จำนวน 11 ต้น อ่อนแอเท่ากับพันธุ์แม่ CN72 จำนวน 5 ต้น และกระจายอยู่ในขอบเขตการเกิดโรคของพันธุ์พ่อแม่ จำนวน 46 ต้น แสดงว่าปี พ.ศ. 2558 ประชากร $F_{2:9}$ ส่วนใหญ่แสดงความต้านทานและอ่อนแอต่อการเกิดโรคราแป้งให้เห็นอย่างชัดเจน โดยกลุ่มต้านทานจะอยู่ระหว่าง 1-4.9 คะแนน และอ่อนแอ 5-9 คะแนน ส่วนปี พ.ศ. 2561 (ประเมินห่างกัน 3 ปี) การกระจายการเกิดโรคส่วนใหญ่อยู่ระหว่างพันธุ์พ่อแม่ ซึ่งพบว่าเป็นไปตามอัตราส่วนต้นต้านทานต่อต้นอ่อนแอ 1:1 ทั้งสองปี โดยปี พ.ศ. 2558 มีอัตราส่วนต้นต้านทาน 25 ต้น ต่อต้นอ่อนแอ 39 ต้น ($\chi^2 = 3.06, P > 0.05$) และปี พ.ศ. 2561 มีอัตราส่วนต้นต้านทาน 29 ต้น ต่อต้นอ่อนแอ 35 ต้น ($\chi^2 = 0.56, P > 0.05$) (ตารางที่ 1) ซึ่งความสามารถในการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากพ่อแม่ไปสู่รุ่นลูกหลานในชั่ว $F_{2:9}$ และ $F_{2:10}$ คิดเป็นอัตราพันธุกรรมแบบกว้างเท่ากับ 96.4 และ 82.4% ตามลำดับ ในทำนองเดียวกัน จากการประเมินโรคราแป้งในถั่วเขียวในประชากร $F_{2:9}$ ของคู่ผสม CN72 × V4785 ที่อายุ 65 วัน ในปี พ.ศ. 2556 และ 2559 ตามลำดับ พบว่าปี พ.ศ. 2556 มีความรุนแรงในการเกิดโรคราแป้งใกล้เคียงกับปี พ.ศ. 2559 โดยมีความสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.61 ($P < 0.001$) ซึ่งปี พ.ศ. 2556 พันธุ์พ่อ V4785 ที่ต้านทานต่อโรคราแป้งมีคะแนนเฉลี่ย 1.33 ส่วนพันธุ์แม่ CN72 ที่อ่อนแอมีคะแนนเฉลี่ย 6.33 ขณะที่ปี พ.ศ. 2559 พันธุ์พ่อแม่ (V4785 และ CN72) มีคะแนนเฉลี่ย 1.00 และ 6.00 ตามลำดับ (ภาพที่ 2; ตารางภาคผนวกที่ 3 และ 4) เมื่อพิจารณาการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคราแป้งในประชากรนี้ จากการใช้จำนวนลูกผสม 126 ต้น โดยปี พ.ศ. 2556 มีต้นต้านทานเท่ากับพันธุ์พ่อ V4785 จำนวน 14 ต้น อ่อนแอเท่ากับพันธุ์แม่ CN72 จำนวน 11 ต้น อ่อนแอมากกว่าพันธุ์แม่ จำนวน 12 ต้น และกระจายอยู่ในขอบเขตการเกิดโรคของพันธุ์พ่อแม่ จำนวน 89 ต้น ส่วนปี พ.ศ. 2559 มีต้นต้านทานเท่ากับพันธุ์

พ่อ V4785 จำนวน 14 ต้น อ่อนแอเท่ากับพันธุ์แม่ CN72 จำนวน 27 ต้น อ่อนแอกว่าพันธุ์แม่ จำนวน 16 ต้น และกระจายอยู่ในขอบเขตการเกิดโรคของพันธุ์พ่อแม่ จำนวน 69 ต้น แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของการเกิดโรคราแป้งทั้งสองปีเป็นแบบปกติ โดยพบว่าเป็นไปตามอัตราส่วนต้นต้านทานต่อต้นอ่อนแอ 1:1 ทั้งสองปี ซึ่งปี พ.ศ. 2556 มีอัตราส่วนต้นต้านทาน 61 ต้น ต่อต้นอ่อนแอ 65 ต้น ($\chi^2 = 0.13, P > 0.05$) และปี พ.ศ. 2559 มีอัตราส่วนต้นต้านทาน 53 ต้น ต่อต้นอ่อนแอ 73 ต้น ($\chi^2 = 3.17, P > 0.05$) (ตารางที่ 2) ซึ่งความสามารถในการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากพ่อแม่ไปสู่รุ่นลูกหลานในชั่ว $F_{2,9}$ คิดเป็นอัตราพันธุกรรมแบบกว้างเท่ากับ 79.6 และ 89.4% ตามลำดับ ซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าวมานี้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการทดสอบอัตราส่วน 1:1 คือ เพื่อศึกษาการกระจายตัวของยีนต้านทานต่อยีนอ่อนแอโรคราแป้งในประชากร recombinant inbred line เป็นสัดส่วน 1:1 หรือไม่จากการปล่อยให้ผสมตัวเองในแต่ละชั่วจนกระทั่งยีนทั้งหมดหยุดการกระจายตัว ถึงแม้ว่าอาจจะมีบางยีนที่คงกระจายตัวอยู่ ซึ่งจากการทดสอบด้วยโคสแควร์พบว่า ทั้งสองกลุ่มผสม (CN72 \times V4758 และ CN72 \times V4785) มีค่าโคสแควร์ที่เปิดจากตารางสูงกว่าค่าโคสแควร์ที่ได้จากการคำนวณ (ตารางที่ 1 และ 2) แสดงว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติทำให้ยอมรับสมมุติฐานที่ว่าอัตราส่วนต้นต้านทานต่อต้นอ่อนแอเท่ากับ 1:1 ซึ่งสัมพันธ์กับอัตราพันธุกรรมแบบกว้างที่มีค่าสูงกว่า 70% ทั้งสองประชากร แสดงว่ายีนที่ถ่ายทอดลักษณะต้านทานโรคราแป้งของทั้งสองกลุ่มผสมนี้ถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 คู่ (single major gene) สอดคล้องกับงานวิจัยในโครงการการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้ง และการรวมยีนต้านทานในถั่วเขียวกลุ่มผสม CN72 \times V4718 ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 คู่ และงานวิจัยของ Khajudparn et al. (2007) ที่พบว่าสายพันธุ์ถั่วเขียว 3 สายพันธุ์ คือ V4718, V4758 และ V4785 เป็นสายพันธุ์ต้านทานต่อโรคราแป้งที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบข่มด้วยยีนเด่น 1 คู่ เช่นเดียวกับการศึกษาความต้านทานโรคราแป้งใน 6 ประชากร (P_1, P_2, F_1, F_2, BC_1 และ BC_2) ของกลุ่มผสม KPS1 \times V4758, KPS1 \times V2106 และ KPS2 \times V2106 (ปริญญา ขจัดพาล, 2552) อย่างไรก็ตาม Kasettran et al. (2010) พบว่าความสามารถในการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวกลุ่มผสม KPS1 \times VC6468-11-1A จากการใช้ประชากร F_7 เป็นลักษณะปริมาณซึ่งควบคุมด้วยยีนหลายคู่ และเมื่อพิจารณาตำแหน่ง QTL ของลักษณะต้านทานโรคราแป้ง พบว่าอยู่บนโครโมโซมที่ 3, 4, 6, 7, 8 และ 9 (Young et al. 1993; Chankaew et al. 2013) แสดงให้เห็นว่ายีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวจากกลุ่มผสมที่แตกต่างกัน มีความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกัน และ/หรือมีตำแหน่งของยีนอยู่บนโครโมโซมที่แตกต่างกัน ดังนั้นรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphism) ของพันธุ์พ่อแม่ อาจเป็นข้อจำกัดในการระบุเครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง และการสร้างแผนที่ยีนในแต่ละกลุ่มผสมอาจจำเป็นต้องทำแยกกัน

1.2 การประเมินโรคใบจุดในถั่วเขียวกลุ่มผสม CN72 \times V4718

จากการประเมินโรคใบจุดถั่วเขียวในประชากร $F_{2,9}$ ของกลุ่มผสม CN72 \times V4718 ที่อายุ 65 วัน ในปี พ.ศ. 2559 และ 2560 ตามลำดับ พบว่าปี พ.ศ. 2559 มีความรุนแรงในการเกิดโรคใบจุดใกล้เคียงกับปี พ.ศ. 2560 โดยมีความสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.60 ($P < 0.001$) ซึ่งปี พ.ศ. 2559 พันธุ์พ่อ V4718 ที่ต้านทานต่อโรคใบจุดมีคะแนนเฉลี่ย 1.67 ส่วนพันธุ์แม่ CN72 ที่อ่อนแอมีคะแนนเฉลี่ย 4.00 ขณะที่ปี พ.ศ. 2560 พันธุ์พ่อ

แม่ (V4718 และ CN72) มีคะแนนเฉลี่ย 2.67 และ 3.67 ตามลำดับ (ภาพที่ 3; ตารางภาคผนวกที่ 5 และ 6) เมื่อพิจารณาการกระจายตัวของลักษณะต้านทานโรคใบจุดในประชากรนี้ จำนวน 147 ต้น พบว่าปี พ.ศ. 2559 มีต้นต้านทานมากกว่าพันธุ์พ่อ V4718 จำนวน 30 ต้น ต้านทานเท่ากับพันธุ์พ่อ จำนวน 40 ต้น อ่อนแอเท่ากับพันธุ์แม่ CN72 จำนวน 23 ต้น อ่อนแอมากกว่าพันธุ์แม่ จำนวน 2 ต้น และกระจายอยู่ในขอบเขตการเกิดโรคของพันธุ์พ่อแม่ จำนวน 52 ต้น ส่วนปี พ.ศ. 2560 มีต้นต้านทานมากกว่าพันธุ์พ่อ V4718 จำนวน 46 ต้น ต้านทานเท่ากับพันธุ์พ่อ จำนวน 37 ต้น อ่อนแอเท่ากับพันธุ์แม่ CN72 จำนวน 36 ต้น อ่อนแอมากกว่าพันธุ์แม่ จำนวน 2 ต้น และกระจายอยู่ในขอบเขตการเกิดโรคของพันธุ์พ่อแม่ จำนวน 26 ต้น แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวการเกิดโรคใบจุดทั้งสองปีเป็นแบบปกติ โดยเป็นไปตามอัตราส่วนต้นต้านทานต่อต้นอ่อนแอ 1:1 ทั้งสองปี ซึ่งปี พ.ศ. 2559 มีอัตราส่วนต้นต้านทาน 84 ต้น ต่อต้นอ่อนแอ 63 ต้น ($\chi^2 = 3.00, P > 0.05$) และปี พ.ศ. 2560 มีอัตราส่วนต้นต้านทาน 64 ต้น ต่อต้นอ่อนแอ 83 ต้น ($\chi^2 = 2.46, P > 0.05$) (ตารางที่ 3) ซึ่งความสามารถในการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากพ่อแม่ไปสู่รุ่นลูกหลานในชั่ว $F_{2.9}$ ของทั้งสองปีคิดเป็นอัตราพันธุกรรมแบบกว้างเท่ากับ 73.9 และ 82.4% ตามลำดับ ซึ่งจากการทดสอบด้วยไคสแควร์พบว่าค่าไคสแควร์ที่เปิดจากตารางสูงกว่าค่าไคสแควร์ที่ได้จากการคำนวณ (ตารางที่ 3) แสดงว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติทำให้ยอมรับสมมุติฐานที่ว่าอัตราส่วนต้นต้านทานต่อต้นอ่อนแอเท่ากับ 1:1 ซึ่งสัมพันธ์กับอัตราพันธุกรรมแบบกว้างที่มีค่าสูงมากกว่า 70% ทั้งสองปี แสดงว่ายีนที่ถ่ายทอดลักษณะต้านทานโรคใบจุดในประชากรนี้ถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 คู่ เช่นเดียวกับยีนที่ถ่ายทอดลักษณะต้านทานโรคราแป้ง ซึ่งสมพงษ์ จันท์แก้ว (2552) ได้ศึกษาพันธุกรรมการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียว พบว่าความต้านทานต่อโรคใบจุดถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 คู่ สอดคล้องกับการรายงานของ Thakur et al. (1977) ซึ่งในการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียว หากสามารถนำยีนดังกล่าวเข้ามารวมไว้ในพันธุ์เดียวกันกับต้นที่ต้านทานโรคราแป้งได้ก็จะเป็นประโยชน์อย่างมาก

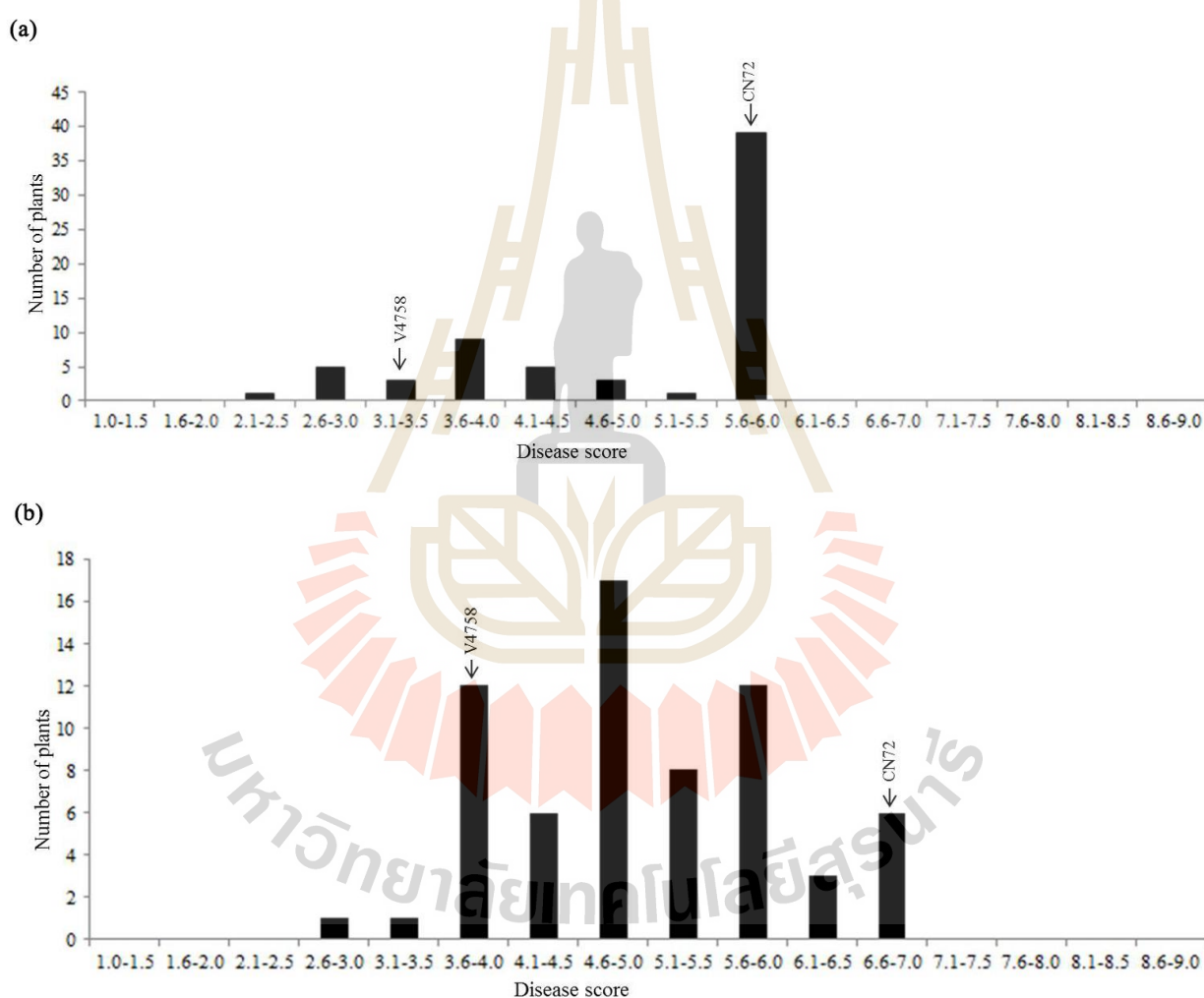
จากแนวโน้มการกระจายตัวการเกิดโรคราแป้งและโรคใบจุดต่างปี แต่คู่ผสมเดียวกัน จะมีแนวโน้มไปในทำนองเดียวกันทั้งสองปี ส่วนต่างคู่ผสมกันมีการกระจายตัวการเกิดโรคราแป้งและโรคใบจุดแตกต่างกัน เนื่องจากความสามารถในการต้านทานโรคแตกต่างกัน ซึ่งจากข้อมูลการกระจายตัวการเกิดโรคราแป้งและโรคใบจุดจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการคัดเลือกต้นลูกผสมที่มีความต้านทานมากกว่าหรือเท่ากับพันธุ์พ่อมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ ดังเช่น ภาพที่ 1 และ 3 จะพบสายพันธุ์ที่ต้านทานมากกว่าพันธุ์พ่อ V4758 และ V4785 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 การกระจายตัวของประชากร $F_{2:9}$ และ $F_{2:10}$ ต่อการเกิดโรคราแป้งของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4758

ประชากร	ปี	จำนวนต้น	จำนวนต้นด้านทาน:	ทดสอบไคสแควร์ (χ^2) ¹		
				ต้นอ่อนแอ	ค่าคาดหวัง	χ^2 (calculated)
$F_{2:9}$	2558	64	25:39	1:1	3.06	3.84
$F_{2:10}$	2561	64	29:35	1:1	0.56	3.84

¹ ค่าทดสอบไคสแควร์ (χ^2) ในประชากร RILs มีอัตราส่วนต้นด้านทาน: ต้นอ่อนแอ = 1:1

² ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการทดสอบไคสแควร์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



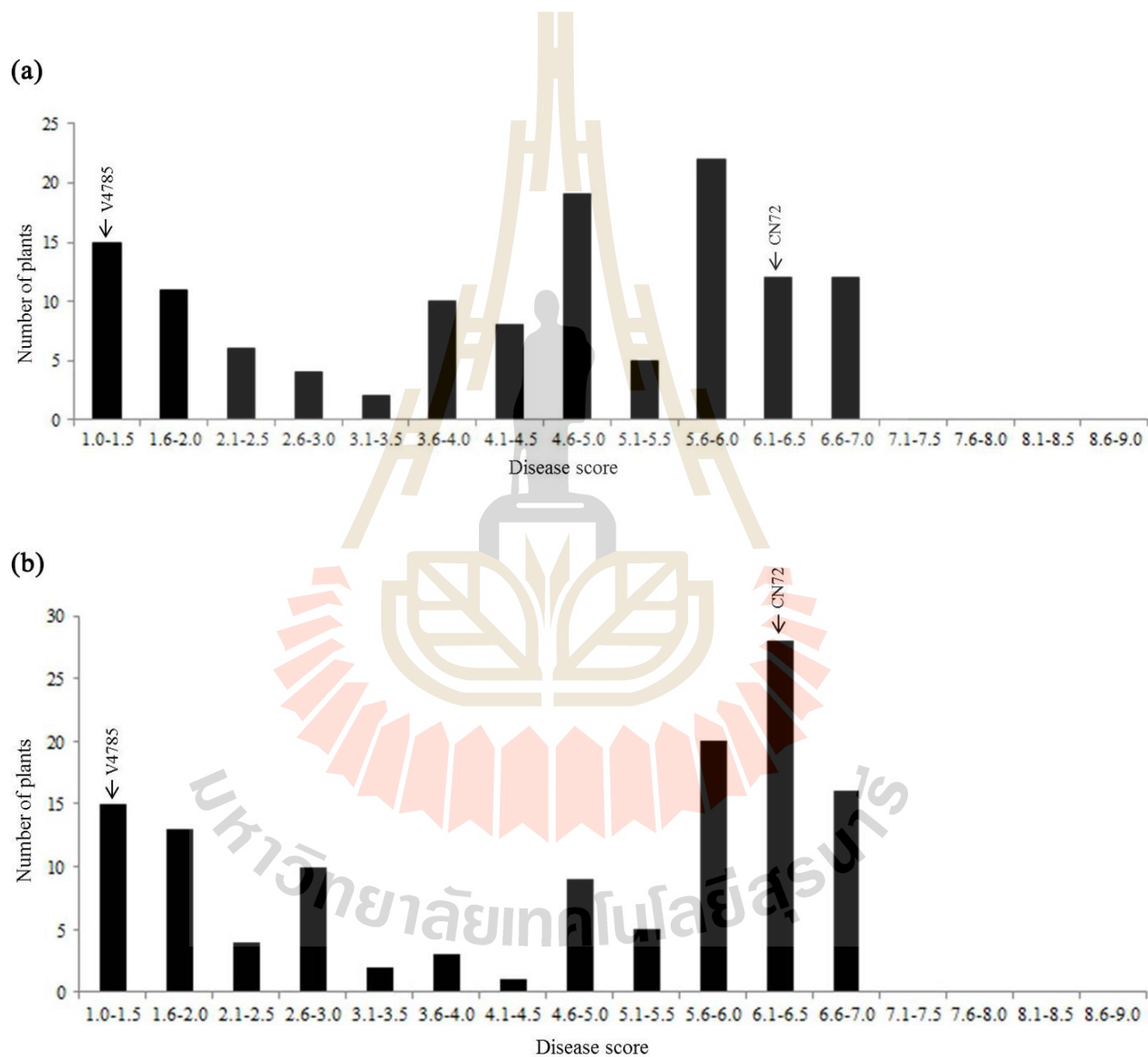
ภาพที่ 1 การกระจายตัวของประชากร $F_{2:9}$ ปี พ.ศ. 2558 (a) และประชากร $F_{2:10}$ ปี พ.ศ. 2561 (b) ต่อการเกิดโรคราแป้งของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4758 ที่อายุ 65 วัน

ตารางที่ 2 การกระจายตัวของประชากร $F_{2,9}$ ต่อการเกิดโรคราแป้งของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4785

ประชากร	ปี	จำนวนต้น	จำนวนต้นต้านทาน:	ทดสอบไคสแควร์ (χ^2) ¹		
				ต้นอ่อนแอ	ค่าคาดหวัง	χ^2 (calculated)
$F_{2,9}$	2556	126	61:65	1:1	0.13	3.84
$F_{2,9}$	2559	126	53:73	1:1	3.17	3.84

¹ ค่าทดสอบไคสแควร์ (χ^2) ในประชากร RILs มีอัตราส่วนต้นต้านทาน: ต้นอ่อนแอ = 1:1

² ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการทดสอบไคสแควร์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



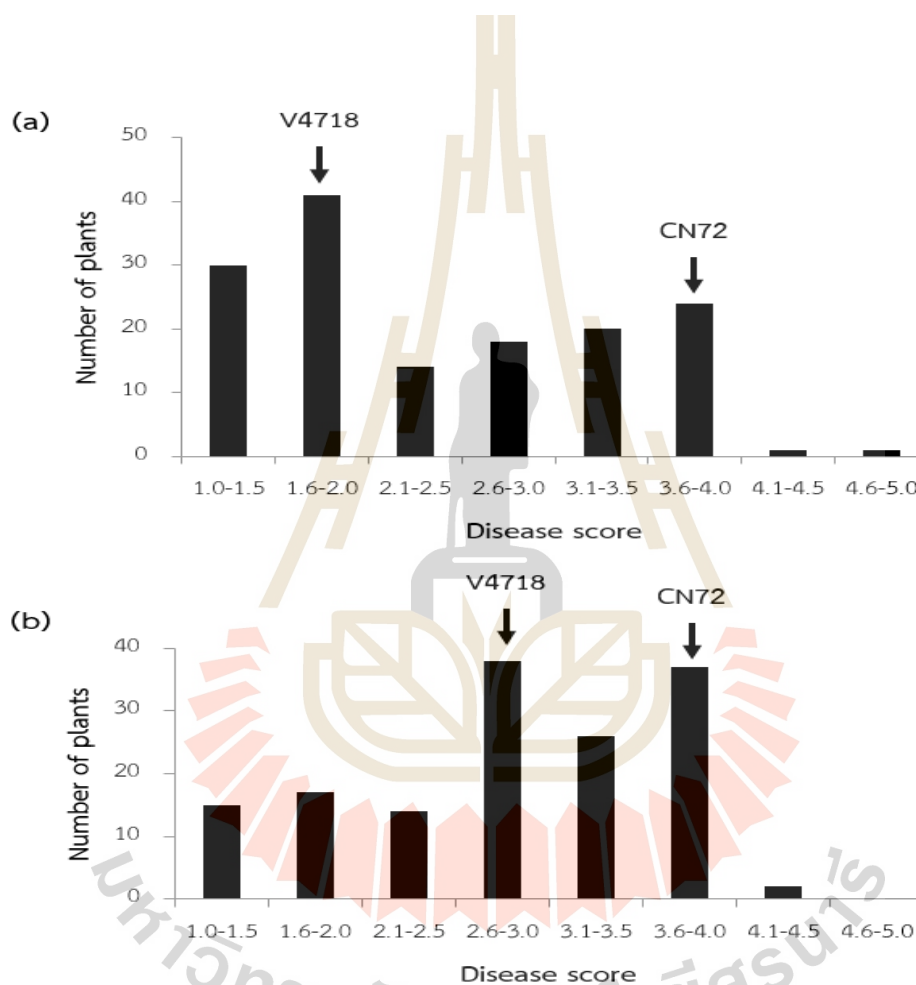
ภาพที่ 2 การกระจายตัวของประชากร $F_{2,9}$ ปี พ.ศ. 2556 (a) และปี พ.ศ. 2559 (b) ต่อการเกิดโรคราแป้งของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4785 ที่อายุ 65 วัน

ตารางที่ 3 การกระจายตัวของประชากร $F_{2,9}$ ต่อการเกิดโรคใบจุดของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4718

ประชากร	ปี	จำนวนต้น	จำนวนต้นต้านทาน:	ทดสอบไคสแควร์ (χ^2) ¹		
				ต้นอ่อนแอ	ค่าคาดหวัง	χ^2 (calculated)
$F_{2,9}$	2559	147	84:63	1:1	3.00	3.84
$F_{2,9}$	2560	147	64:83	1:1	2.46	3.84

¹ ค่าทดสอบไคสแควร์ (χ^2) ในประชากร RILs มีอัตราส่วนต้นต้านทาน: ต้นอ่อนแอ = 1:1

² ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของการทดสอบไคสแควร์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 3 การกระจายตัวของประชากร $F_{2,9}$ ปี พ.ศ. 2559 (a) และปี พ.ศ. 2560 (b) ต่อการเกิดโรคใบจุดของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4718 ที่อายุ 65 วัน

ส่วนที่ 2 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล

2.1 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล ISSR และ ISSR-RGA ที่บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งใน ถั่วเขียว

2.1.1 คู่ผสม CN72 × V4758

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบลูกโซ่ (PCR) ของประชากร RILs (F_{2:9}) ถั่วเขียว (*V. radiata* L.) คู่ผสม CN72 × V4758 โดยทดสอบด้วยวิธี BSA ซึ่งใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 63 ไพรเมอร์ เพื่อค้นหาไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758) และพันธุ์แม่ (CN72) ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคราแป้ง ตามลำดับ แล้วนับจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่พบในพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of scorable bands; NB) จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of polymorphic bands between resistant and susceptible parents; NPB) และจำนวนตำแหน่งของเครื่องหมาย ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง (I linked) พบว่าไพรเมอร์ ISSR ทั้งหมด 63 ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแต่ละไพรเมอร์ (annealing temperature) อยู่ที่ 50°C เมื่อนับจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดของไพรเมอร์ ISSR ทั้ง 63 ไพรเมอร์พบว่าจำนวน 1,302 แถบ เริ่มตั้งแต่ 11 แถบต่อไพรเมอร์ (ISSR 813, 815 และ 844) จนถึง 29 แถบต่อไพรเมอร์ (ISSR 889) เฉลี่ย 20.7 แถบต่อไพรเมอร์ และพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์พ่อแม่รวม 207 แถบ อยู่ระหว่าง 0-11 แถบต่อไพรเมอร์ เฉลี่ย 3.3 แถบต่อไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ ISSR 888 พบความแตกต่างมากที่สุด จำนวน 11 แถบ และพบแถบดีเอ็นเอหรือจำนวนตำแหน่งของเครื่องหมาย ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง จำนวน 4 แถบ (4 เครื่องหมาย) จากไพรเมอร์ ISSR จำนวน 3 ไพรเมอร์ (ISSR 818, 866 และ 868) เมื่อนำไพรเมอร์ ISSR ทั้ง 3 ไพรเมอร์จากการทดสอบด้วยวิธี BSA มาวิเคราะห์กับดีเอ็นเอรายต้นจำนวน 20 ต้น เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR กับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง โดยการวิเคราะห์สมการเส้นตรง simple linear regression เพื่อประมาณค่าความน่าจะเป็นที่เครื่องหมายโมเลกุลจะอยู่ใกล้กับยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคราแป้ง และตรวจหาเครื่องหมายที่เหมาะสมที่มีค่า recombination ไม่เกิน 20% สำหรับนำไปวิเคราะห์รายต้น จำนวน 100 ต้น พบว่าทุกเครื่องหมายให้ค่า recombination เกิน 20% (ตารางที่ 5)

อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายโมเลกุล ISSR ที่พัฒนาขึ้นมานี้อาจไม่มีความสัมพันธ์หรือมีความสัมพันธ์น้อยกับลักษณะต้านทานโรคราแป้งในประชากรถั่วเขียวกลุ่มนี้เมื่อนำไปประเมินรายต้น จำนวน 100 ต้น ดังนั้นการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดใหม่ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งเพิ่มเติมจึงมีความจำเป็น เพื่อค้นหาตำแหน่งเครื่องหมายที่ใกล้กับยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคราแป้งมากที่สุด งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาเครื่องหมาย ISSR-RGA โดยนำไพรเมอร์ resistance gene analog (RGA) ที่มีความจำเพาะต่อยีนต้านทานโรครา 4 ไพรเมอร์ ซึ่งได้มาจากบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) NBS จำนวน 2 ไพรเมอร์ (GLPLAL 1 และ P-Loop) และ kinase domain จำนวน 2 ไพรเมอร์ (Pto kin 1 และ RLK for) และออกแบบไพรเมอร์ จำนวน 2 ไพรเมอร์ (PMR1R และ PMR5R) จากการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ powdery mildew resistance gene ของถั่วเขียว (*Vigna radiata*) จากเว็บไซต์ National Center for

Biotechnology Information (NCBI) มาใช้ร่วมกับไพรเมอร์ ISSR เรียกว่าไพรเมอร์ ISSR-RGA และใช้หลักการทดลองในทำนองเดียวกันกับการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล ISSR ที่บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว

จากการนำไพรเมอร์ ISSR จำนวน 63 ไพรเมอร์ มาใช้ร่วมกับไพรเมอร์ RGA จำนวน 6 ไพรเมอร์ (GLPLAL 1, Pto kin 1, P-Loop, RLK for, PMR1R และ PMR5R) รวมทั้งหมด 378 คู่ไพรเมอร์ พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวน 40 คู่ไพรเมอร์ ส่วนคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แสดงในตารางที่ 6-11 โดยคู่ไพรเมอร์ ISSR + GLPLAL 1 มี 56 คู่ไพรเมอร์จำนวน 1,382 แถบ เฉลี่ย 24.7 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์พ่อแม่รวม 155 แถบ เฉลี่ย 2.8 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ แต่ไม่พบเครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง (ตารางที่ 6) คู่ไพรเมอร์ ISSR + Pto kin 1 มี 53 คู่ไพรเมอร์จำนวน 1,086 แถบ เฉลี่ย 20.5 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์พ่อแม่รวม 80 แถบ เฉลี่ย 1.5 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และพบเครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง จำนวน 2 เครื่องหมายจากไพรเมอร์ ISSR841P และ ISSR841tP (ตารางที่ 7) คู่ไพรเมอร์ ISSR + P-Loop มี 60 คู่ไพรเมอร์จำนวน 1,508 แถบ เฉลี่ย 25.1 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์พ่อแม่รวม 266 แถบ เฉลี่ย 4.4 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และพบเครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง จำนวน 2 เครื่องหมายจากไพรเมอร์ ISSR815PL และ ISSR826PL (ตารางที่ 8) คู่ไพรเมอร์ ISSR + PMR1R มี 58 คู่ไพรเมอร์จำนวน 1,224 แถบ เฉลี่ย 21.1 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์พ่อแม่รวม 74 แถบ เฉลี่ย 1.3 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และพบเครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง จำนวน 2 เครื่องหมายจากไพรเมอร์ ISSR884PMR1R และ ISSR890PMR1R (ตารางที่ 9) คู่ไพรเมอร์ ISSR + PMR5R มี 56 คู่ไพรเมอร์จำนวน 1,240 แถบ เฉลี่ย 22.1 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์พ่อแม่รวม 101 แถบ เฉลี่ย 1.8 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และพบเครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง จำนวน 3 เครื่องหมายจากไพรเมอร์ ISSR812PMR5R, ISSR830PMR5R และ ISSR840PMR5R (ตารางที่ 10) และคู่ไพรเมอร์ ISSR + RLK for มี 55 คู่ไพรเมอร์จำนวน 1,421 แถบ เฉลี่ย 25.8 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์พ่อแม่รวม 124 แถบ เฉลี่ย 2.3 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และพบเครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง จำนวน 2 เครื่องหมายจากไพรเมอร์ ISSR840R และ ISSR859R (ตารางที่ 11) รวมเครื่องหมาย ISSR-RGA ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง จำนวน 11 เครื่องหมาย (ตารางที่ 12)

เมื่อทำการวิเคราะห์เครื่องหมาย ISSR-RGA ทั้งหมด 11 เครื่องหมาย (ISSR + Pto kin 1, ISSR + P-Loop, ISSR + PMR1R, ISSR + PMR5R และ ISSR + RLK for จำนวน 2, 2, 2, 3 และ 2 เครื่องหมาย ตามลำดับ) กับประชากรรวมต้านทานและอ่อนแอเป็นรายต้น จำนวน 20 ต้น และหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR-RGA กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งโดยการวิเคราะห์สมการเส้นตรง และตรวจหาเครื่องหมายที่ให้ค่า recombination ไม่เกิน 20% เพื่อนำไปวิเคราะห์รายต้น จำนวน 100 ต้น พบว่ามีเพียง 1 เครื่องหมาย คือ I41tP379 ที่มีค่า recombination ไม่เกิน 20% (ตารางที่ 12; ภาพที่ 4) และเมื่อนำเครื่องหมายดังกล่าวนี้มาทดสอบกับประชากรจำนวน 64 ต้น พบว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งมากที่สุด ($R^2 = 0.26$; $P < 0.001$) (ตารางที่ 13)

2.1.2 คู่ผสม CN72 × V4785

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของประชากร RILs ($F_{2:9}$) ถั่วเขียว (*V. radiata* L.) คู่ผสม CN72 × V4785 โดยทดสอบด้วยวิธี BSA ซึ่งใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 63 ไพรเมอร์ เพื่อค้นหาไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785) และพันธุ์แม่ (CN72) ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคราแป้ง ตามลำดับ แล้วนับจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่พบในพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of scorable bands; NB) จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of polymorphic bands between resistant and susceptible parents; NPB) และจำนวนตำแหน่งของเครื่องหมาย ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง (I linked) พบว่าไพรเมอร์ ISSR ทั้งหมด 63 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแต่ละไพรเมอร์ อยู่ที่ 50°C เมื่อนับจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดของไพรเมอร์ ISSR ทั้ง 63 ไพรเมอร์พบว่าจำนวน 1,260 แถบ เริ่มตั้งแต่ 7 แถบต่อไพรเมอร์ (ISSR 900) จนถึง 34 แถบต่อไพรเมอร์ (ISSR 807) เฉลี่ย 20 แถบต่อไพรเมอร์ และพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์พ่อแม่รวม 75 แถบ อยู่ระหว่าง 0-6 แถบต่อไพรเมอร์ เฉลี่ย 1.2 แถบต่อไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ ISSR 846 พบความแตกต่างมากที่สุด จำนวน 6 แถบ และพบแถบดีเอ็นเอหรือจำนวนตำแหน่งของเครื่องหมาย ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง จำนวน 2 เครื่องหมาย จากไพรเมอร์ ISSR จำนวน 2 ไพรเมอร์ (ISSR 808 และ 827) (ตารางที่ 14) เมื่อนำไพรเมอร์ ISSR ทั้ง 2 ไพรเมอร์ จากการทดสอบด้วยวิธี BSA มาวิเคราะห์กับดีเอ็นเอรายต้นจำนวน 20 ต้น เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR กับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง โดยการวิเคราะห์สมการเส้นตรง simple linear regression เพื่อประมาณค่าความน่าจะเป็นที่เครื่องหมายโมเลกุลจะอยู่ใกล้กับยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคราแป้ง และตรวจหาเครื่องหมายที่เหมาะสมที่มีค่า recombination ไม่เกิน 20% สำหรับนำไปวิเคราะห์รายต้น จำนวน 100 ต้น พบว่าเครื่องหมาย I27565 มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งมากที่สุด ($R^2 = 0.56$; $P < 0.001$) และให้ค่า recombination 10% (ตารางที่ 15)

อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายโมเลกุล ISSR ที่พัฒนาขึ้นมานี้มีจำนวนน้อยเกินไป ดังนั้นการพัฒนาระบบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดใหม่ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งเพิ่มเติมจึงมีความจำเป็น เพื่อค้นหาตำแหน่งเครื่องหมายที่ใกล้กับยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคราแป้งมากที่สุด งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาเครื่องหมาย ISSR-RGA เช่นเดียวกับคู่ผสม CN72 × V4785 โดยนำไพรเมอร์ RGA ที่มีความจำเพาะต่อยีนต้านทานโรครา 4 ไพรเมอร์ ซึ่งได้มาจากบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) NBS จำนวน 2 ไพรเมอร์ (GLPLAL 1 และ P-Loop) และ kinase domain จำนวน 2 ไพรเมอร์ (Pto kin 1 และ RLK for) และใช้หลักการทดลองในทำนองเดียวกันกับการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล ISSR ที่บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว

จากการนำไพรเมอร์ ISSR จำนวน 63 ไพรเมอร์ มาใช้ร่วมกับไพรเมอร์ RGA จำนวน 4 ไพรเมอร์ (GLPLAL 1, Pto kin 1, P-Loop และ RLK for) รวมทั้งทั้งหมด 252 คู่ไพรเมอร์ พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวน 11 คู่ไพรเมอร์ ส่วนคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แสดงในตารางที่ 16-19 โดยคู่ไพรเมอร์ ISSR + GLPLAL 1 มี 61 คู่ไพรเมอร์จำนวน 1,704 แถบ เฉลี่ย 27.9 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และ

พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์พ่อแม่รวม 188 แถบ เฉลี่ย 3.1 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และพบเครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง จำนวน 14 เครื่องหมายจากไพรเมอร์ ISSR807G, ISSR811G, ISSR827G, ISSR840G, ISSR841G, ISSR849G, ISSR856G, ISSR866G, ISSR884G, ISSR889G, ISSR891G และ ISSR900G (ตารางที่ 16) คู่ไพรเมอร์ ISSR + Pto kin 1 มี 63 คู่ไพรเมอร์จำนวน 1,517 แถบ เฉลี่ย 24.1 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์พ่อแม่รวม 85 แถบ เฉลี่ย 1.3 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และพบเครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง จำนวน 4 เครื่องหมายจากไพรเมอร์ ISSR810P, ISSR842P, ISSR851P และ ISSR860P (ตารางที่ 17) คู่ไพรเมอร์ ISSR + P-Loop มี 58 คู่ไพรเมอร์จำนวน 1,155 แถบ เฉลี่ย 19.9 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์พ่อแม่รวม 94 แถบ เฉลี่ย 1.6 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และพบเครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง จำนวน 6 เครื่องหมายจากไพรเมอร์ ISSR827PL, ISSR834PL, ISSR835PL, ISSR856PL และ ISSR873PL (ตารางที่ 18) และคู่ไพรเมอร์ ISSR + RLK for มี 59 คู่ไพรเมอร์จำนวน 1,766 แถบ เฉลี่ย 29.9 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์พ่อแม่รวม 188 แถบ เฉลี่ย 3.2 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ และพบเครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง จำนวน 13 เครื่องหมายจากไพรเมอร์ ISSR827R, ISSR828R, ISSR829R, ISSR835R, ISSR840R, ISSR841R และ ISSR857R (ตารางที่ 19) รวมเครื่องหมาย ISSR-RGA ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง จำนวน 37 เครื่องหมาย (ตารางที่ 20)

เมื่อทำการวิเคราะห์เครื่องหมาย ISSR-RGA ทั้งหมด 37 เครื่องหมาย (ISSR + GLPLAL 1, ISSR + Pto kin 1, ISSR + P-Loop และ ISSR + RLK for จำนวน 14, 4, 6 และ 13 เครื่องหมายตามลำดับ) กับประชากรรวมต้านทานและอ่อนแอเป็นรายต้น จำนวน 20 ต้น (ภาพที่ 5) และหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR-RGA กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งโดยการวิเคราะห์สมการเส้นตรง และตรวจหาเครื่องหมายที่ให้ค่า recombination ไม่เกิน 20% เพื่อนำไปวิเคราะห์รายต้น จำนวน 100 ต้น พบว่าเครื่องหมาย I27R211 มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งมากที่สุด ($R^2 = 0.72$; $P < 0.001$) ส่วนเครื่องหมาย I27G229 มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งน้อยที่สุด ($R^2 = 0.00$; $P > 0.05$) และจากการตรวจหาเครื่องหมายที่มีค่า recombination ไม่เกิน 20% พบว่ามี 3 เครื่องหมาย (I10P321, I27R211 และ I27R565) และเมื่อนำเครื่องหมายดังกล่าวนี้มาทดสอบกับประชากรจำนวน 80 ต้น พบว่าเครื่องหมาย I27R565 มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งมากที่สุด ($R^2 = 0.30$; $P < 0.001$) (ตารางที่ 21)

ตารางที่ 4 ลำดับเบส ขนาดของแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 63 ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3') ¹	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	NB ²	NPB ³	I-linked ⁴
807	(AG) ₈ T	300-1,500	22	3	0
808	(AG) ₈ C	250-1,500	25	3	0
809	(AG) ₈ G	250-1,500	16	1	0
810	(GA) ₈ T	200-1,500	26	7	0
811	(GA) ₈ C	200-1,200	19	2	0
812	(GA) ₈ A	200-1,200	26	8	0
813	(CA) ₈ T	250-1,500	11	2	0
814	(CA) ₈ A	200-1,500	13	0	0
815	(CT) ₈ G	250-1,500	11	2	0
816	(CA) ₈ T	200-1,500	21	1	0
817	(CA) ₈ A	300-1,500	20	0	0
818	(CA) ₈ G	250-1,200	19	2	2
819	(GT) ₈ A	200-1,200	20	3	0
820	(GT) ₈ C	200-1,200	15	8	0
821	(GT) ₈ T	250-1,200	15	4	0
823	(TC) ₈ C	300-1,200	13	4	0
825	(AC) ₈ T	200-1,500	23	0	0
826	(AC) ₈ C	200-1,500	18	2	0
827	(AC) ₈ G	200-1,500	21	6	0
828	(TG) ₈ A	200-1,500	23	4	0
829	(TG) ₈ C	200-1,500	18	0	0
830	(TG) ₈ G	200-1,500	23	8	0
834	(AG) ₈ YT	200-1,500	24	4	0
835	(AG) ₈ YC	200-1,200	20	4	0
836	(AG) ₈ YA	200-1,500	20	2	0
840	(GA) ₈ YT	250-1,500	25	4	0
841	(GA) ₈ YC	200-1,200	27	6	0
841c	(GA) ₈ CC	200-1,500	24	2	0
841t	(GA) ₈ TC	250-1,500	18	5	0

ตารางที่ 4 ลำดับเบส ขนาดของแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 63 ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB ³	I linked ⁴
842	(GA) ₈ YG	300-1,200	26	4	0
844	(CT) ₈ RC	200-1,000	11	2	0
846	(CA) ₈ AT	200-1,500	24	5	0
847	(CA) ₈ RC	200-1,500	18	1	0
848	(CA) ₈ RG	300-1,500	19	3	0
849	(GT) ₈ YA	200-1,500	18	5	0
850	(GT) ₈ YC	200-1,200	21	5	0
851	(GT) ₈ YG	200-1,500	21	7	0
853	(TC) ₈ RT	250-1,500	18	4	0
855	(AC) ₈ YT	250-1,200	20	2	0
856	(AC) ₈ YA	250-1,500	17	1	0
857	(AC) ₈ YG	200-1,000	26	5	0
858	(TG) ₈ RT	200-1,500	22	4	0
859	(TG) ₈ RC	200-1,500	24	2	0
860	(TG) ₈ RA	250-1,500	26	7	0
862	(AGC) ₆	200-1,000	13	0	0
864	(ATG) ₆	200-2,072	18	1	0
866	(CTC) ₆	250-1,500	16	2	1
867	(GGC) ₆	200-1,500	16	2	0
868	(GAA) ₆	200-1,100	28	10	1
873	(GACA) ₄	200-1,100	25	4	0
876	(GATA) ₂ (GACA) ₂	200-1,200	19	8	0
878	(GGAT) ₄	300-1,500	20	5	0
880	(GGAGA) ₃	200-1,200	27	0	0
881	(GGGT) ₃ G	200-1,200	25	0	0
884	HBH (AG) ₇	200-1,500	25	3	0
885	BHB (GA) ₇	250-1,500	20	1	0
886	VDV (CT) ₇	200-1,000	18	4	0
887	DVD (TC) ₇	200-1,200	23	0	0
888	BDB (CA) ₇	200-1,200	28	11	0

ตารางที่ 4 ลำดับเบส ขนาดของแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 63 ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB ³	I linked ⁴
889	DBD (AC) ₇	200-1,500	29	1	0
890	VHV (GT) ₇	200-1,500	25	0	0
891	HVH (TG) ₇	200-1,500	26	1	0
900	ACTTCCC(CA) ₂ GGTTAA(CA) ₂	300-1,000	14	0	0
ผลรวม			1,302	207	4
ค่าเฉลี่ย			20.7	3.3	0.1

¹ B = C, G, T; D = A, G, T; H = A, C, T; N = A, G, C, T; R = พิวรีน (A, G); V = A, C, G; Y = ไพริมิดีน (C, T)

² NB = จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่นับได้ในสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of scorable bands)

³ NPB = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of polymorphic bands between resistant and susceptible parents)

⁴ I linked = จำนวนตำแหน่งของเครื่องหมาย ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR และลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 จำนวน 4 เครื่องหมาย

เครื่องหมาย	จำนวนต้น	Beta	t-value	P-value	R ²	ระยะห่าง (cM)	LOD
I18359	19	-0.420	-1.907	0.074	0.18	32	0.573
I18366	19	0.425	1.938	0.069	0.18	26	0.964
I66318	19	0.368	1.631	0.121	0.14	26	0.964
I68394	20	-0.004	-0.019	0.985	0.00	55	0.044

ตารางที่ 6 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (GLPLAL 1) จำนวน 56 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3') ¹	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	NB ²	NPB ³	-R linked ⁴
ISSR809G ⁵	ISSR809 GLPLAL 1	(AG) ₈ G IAGIGCIAGIGGIAGICC	200-2,072	26	2	0
ISSR811G	ISSR811 GLPLAL 1	(GA) ₈ C IAGIGCIAGIGGIAGICC	200-2,072	20	4	0
ISSR812G	ISSR812 GLPLAL 1	(GA) ₈ A IAGIGCIAGIGGIAGICC	200-2,072	29	4	0
ISSR813G	ISSR813 GLPLAL 1	(CA) ₈ T IAGIGCIAGIGGIAGICC	200-2,072	26	1	0
ISSR814G	ISSR814 GLPLAL 1	(CA) ₈ A IAGIGCIAGIGGIAGICC	200-2,072	27	2	0
ISSR815G	ISSR815 GLPLAL 1	(CT) ₈ G IAGIGCIAGIGGIAGICC	200-2,072	25	6	0
ISSR816G	ISSR816 GLPLAL 1	(CA) ₈ T IAGIGCIAGIGGIAGICC	200-2,072	30	5	0
ISSR817G	ISSR817 GLPLAL 1	(CA) ₈ A IAGIGCIAGIGGIAGICC	200-2,072	22	1	0
ISSR818G	ISSR818 GLPLAL 1	(CA) ₈ G IAGIGCIAGIGGIAGICC	200-2,072	18	1	0
ISSR819G	ISSR819 GLPLAL 1	(GT) ₈ A IAGIGCIAGIGGIAGICC	200-2,072	26	3	0
ISSR820G	ISSR820 GLPLAL 1	(GT) ₈ C IAGIGCIAGIGGIAGICC	200-2,072	24	2	0
ISSR821G	ISSR821 GLPLAL 1	(GT) ₈ T IAGIGCIAGIGGIAGICC	200-2,072	26	5	0
ISSR823G	ISSR823 GLPLAL 1	(TC) ₈ C IAGIGCIAGIGGIAGICC	200-2,072	15	0	0
ISSR825G	ISSR825 GLPLAL 1	(AC) ₈ T IAGIGCIAGIGGIAGICC	200-2,072	28	6	0

ตารางที่ 6 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ทำให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (GLPLAL 1) จำนวน 56 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR826G	ISSR826	(AC) ₈ C	200-2,072	27	2	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR827G	ISSR827	(AC) ₈ G	200-2,072	21	6	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR828G	ISSR828	(TG) ₈ A	200-2,072	19	2	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR829G	ISSR829	(TG) ₈ C	200-2,072	22	1	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR830G	ISSR830	(TG) ₈ G	200-2,072	24	0	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR834G	ISSR834	(AG) ₈ YT	200-2,072	19	1	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR835G	ISSR835	(AG) ₈ YC	200-2,072	29	6	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR836G	ISSR836	(AG) ₈ YA	200-2,072	29	2	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR840G	ISSR840	(GA) ₈ YT	200-2,072	23	5	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR841G	ISSR841	(GA) ₈ YC	200-2,072	29	3	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR841cG	ISSR841c	(GA) ₈ CC	200-2,072	27	6	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR841tG	ISSR841t	(GA) ₈ TC	200-2,072	32	6	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR842G	ISSR842	(GA) ₈ YG	200-2,072	31	4	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR844G	ISSR844	(CT) ₈ RC	200-2,072	22	3	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				

ตารางที่ 6 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (GLPLAL 1) จำนวน 56 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR846G	ISSR846	(CA) ₈ AT	200-2,072	16	4	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR847G	ISSR847	(CA) ₈ RC	200-2,072	18	3	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR848G	ISSR848	(CA) ₈ RG	200-2,072	22	8	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR849G	ISSR849	(GT) ₈ YA	200-2,072	26	0	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR850G	ISSR850	(GT) ₈ YC	200-2,072	23	5	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR856G	ISSR856	(AC) ₈ YA	200-2,072	21	3	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR857G	ISSR857	(AC) ₈ YG	200-2,072	24	3	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR858G	ISSR858	(TG) ₈ RT	200-2,072	22	0	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR859G	ISSR859	(TG) ₈ RC	200-2,072	26	3	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR860G	ISSR860	(TG) ₈ RA	200-2,072	20	2	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR862G	ISSR862	(AGC) ₆	200-2,072	23	0	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR864G	ISSR864	(ATG) ₆	200-2,072	28	3	0
	Pto kin 1	GCATTGGAACAAGGTGAA				
ISSR866G	ISSR866	(CTC) ₆	200-2,072	29	0	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR867G	ISSR867	(GGC) ₆	200-2,072	16	3	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				

ตารางที่ 6 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ทำให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (GLPLAL 1) จำนวน 56 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR868G	ISSR868	(GAA) ₆	200-2,072	24	0	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR873G	ISSR873	(GACA) ₄	200-2,072	22	3	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR876G	ISSR876	(GATA) ₂ (GACA) ₂	200-2,072	21	0	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR878G	ISSR878	(GGAT) ₄	200-2,072	21	3	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR880G	ISSR880	(GGAGA) ₃	200-2,072	30	5	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR881G	ISSR881	(GGGT) ₃ G	200-2,072	28	1	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR884G	ISSR884	HBH (AG) ₇	200-2,072	31	4	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR885G	ISSR885	BHB (GA) ₇	200-2,072	30	3	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR886G	ISSR886	VDV (CT) ₇	200-2,072	24	0	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR888G	ISSR888	BDB (CA) ₇	200-2,072	27	2	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR889G	ISSR889	DBD (AC) ₇	200-2,072	31	4	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR890G	ISSR890	VHV (GT) ₇	200-2,072	27	1	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR891G	ISSR891	HVH (TG) ₇	200-2,072	26	2	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				

ตารางที่ 6 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (GLPLAL 1) จำนวน 56 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR900G	ISSR900	ACTTCCC(CA) ₂ GGTTA	200-2,072	30	1	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ผลรวม				1,382	155	0
ค่าเฉลี่ย				24.7	2.8	0

¹ B = C, G, T; D = A, G, T; H = A, C, T; I = inosine; N = A, G, C, T; R = พิวรีน (A, G); V = A, C, G; Y = ไพริมิดีน (C, T)

² NB = จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่นับได้ในสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of scorable bands)

³ NPB = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of polymorphic bands between resistant and susceptible parents)

⁴ I-R linked = จำนวนตำแหน่งของเครื่องหมาย ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง

⁵ G = ไพรเมอร์ GLPLAL 1

ตารางที่ 7 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (Pto kin1) จำนวน 53 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3') ¹	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB ²	NPB ³	-R linked ⁴
ISSR807P ⁵	ISSR807 Pto kin 1	(AG) ₈ T GCATTGGAACAAGGTGAA	150-1,200	19	1	0
ISSR809P	ISSR809 Pto kin 1	(AG) ₈ G GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,200	23	2	0
ISSR810P	ISSR810 Pto kin 1	(GA) ₈ T GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,500	22	0	0
ISSR811P	ISSR811 Pto kin 1	(GA) ₈ C GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,500	21	2	0
ISSR812P	ISSR812 Pto kin 1	(GA) ₈ A GCATTGGAACAAGGTGAA	150-1,200	21	0	0
ISSR813P	ISSR813 Pto kin 1	(CA) ₈ T GCATTGGAACAAGGTGAA	150-1,500	13	0	0
ISSR815P	ISSR815 Pto kin 1	(CT) ₈ G GCATTGGAACAAGGTGAA	100-2,072	18	1	0
ISSR816P	ISSR816 Pto kin 1	(CA) ₈ T GCATTGGAACAAGGTGAA	150-1,500	15	0	0
ISSR817P	ISSR817 Pto kin 1	(CA) ₈ A GCATTGGAACAAGGTGAA	100-2,072	16	0	0
ISSR818P	ISSR818 Pto kin 1	(CA) ₈ G GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,200	16	2	0
ISSR819P	ISSR819 Pto kin 1	(GT) ₈ A GCATTGGAACAAGGTGAA	150-1,500	21	10	0
ISSR820P	ISSR820 Pto kin 1	(GT) ₈ C GCATTGGAACAAGGTGAA	150-1,200	17	7	0
ISSR825P	ISSR825 Pto kin 1	(AC) ₈ T GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,500	17	0	0
ISSR826P	ISSR826 Pto kin 1	(AC) ₈ C GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,500	17	0	0

ตารางที่ 7 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ทำให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (Pto kin 1) จำนวน 53 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR827P	ISSR827 Pto kin 1	(AC) ₈ G GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,500	14	2	0
ISSR829P	ISSR829 Pto kin 1	(TG) ₈ C GCATTGGAACAAGGTGAA	150-1,500	20	2	0
ISSR830P	ISSR830 Pto kin 1	(TG) ₈ G GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,500	18	0	0
ISSR834P	ISSR834 Pto kin 1	(AG) ₈ YT GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,200	13	0	0
ISSR835P	ISSR835 Pto kin 1	(AG) ₈ YC GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,500	19	1	0
ISSR836P	ISSR836 Pto kin 1	(AG) ₈ YA GCATTGGAACAAGGTGAA	150-1,500	14	0	0
ISSR840P	ISSR840 Pto kin 1	(GA) ₈ YT GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,500	26	0	0
ISSR841P	ISSR841 Pto kin 1	(GA) ₈ YC GCATTGGAACAAGGTGAA	100-2,072	30	4	1
ISSR841cP	ISSR841c Pto kin 1	(GA) ₈ CC GCATTGGAACAAGGTGAA	100-2,072	28	3	0
ISSR841tP	ISSR841t Pto kin 1	(GA) ₈ TC GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,500	23	5	1
ISSR842P	ISSR842 Pto kin 1	(GA) ₈ YG GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,500	26	2	0
ISSR844P	ISSR844 Pto kin 1	(CT) ₈ RC GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,500	20	0	0
ISSR846P	ISSR846 Pto kin 1	(CA) ₈ AT GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,500	24	0	0
ISSR847P	ISSR847 Pto kin 1	(CA) ₈ RC GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,200	19	2	0

ตารางที่ 7 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (Pto kin 1) จำนวน 53 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR848P	ISSR848	(CA) ₈ RG	100-1,500	16	0	0
	Pto kin 1	GCATTGGAACAAGGTGAA				
ISSR850P	ISSR850	(GT) ₈ YC	100-1,200	17	0	0
	Pto kin 1	GCATTGGAACAAGGTGAA				
ISSR851P	ISSR851	(GT) ₈ YG	100-1,500	19	0	0
	Pto kin 1	GCATTGGAACAAGGTGAA				
ISSR853P	ISSR853	(TC) ₈ RT	150-1,000	16	2	0
	Pto kin 1	GCATTGGAACAAGGTGAA				
ISSR855P	ISSR855	(AC) ₈ YT	100-2,072	26	0	0
	Pto kin 1	GCATTGGAACAAGGTGAA				
ISSR856P	ISSR856	(AC) ₈ YA	100-1,500	24	1	0
	Pto kin 1	GCATTGGAACAAGGTGAA				
ISSR857P	ISSR857	(AC) ₈ YG	100-1,200	24	4	0
	Pto kin 1	GCATTGGAACAAGGTGAA				
ISSR858P	ISSR858	(TG) ₈ RT	100-2,072	21	0	0
	Pto kin 1	GCATTGGAACAAGGTGAA				
ISSR859P	ISSR859	(TG) ₈ RC	100-2,072	19	2	0
	Pto kin 1	GCATTGGAACAAGGTGAA				
ISSR860P	ISSR860	(TG) ₈ RA	100-2,072	19	1	0
	Pto kin 1	GCATTGGAACAAGGTGAA				
ISSR862P	ISSR862	(AGC) ₆	100-1,500	20	0	0
	Pto kin 1	GCATTGGAACAAGGTGAA				
ISSR864P	ISSR864	(ATG) ₆	100-1,500	22	1	0
	Pto kin 1	GCATTGGAACAAGGTGAA				
ISSR866P	ISSR866	(CTC) ₆	100-1,200	16	1	0
	Pto kin 1	GCATTGGAACAAGGTGAA				
ISSR867P	ISSR867	(GGC) ₆	100-1,500	19	3	0
	Pto kin 1	GCATTGGAACAAGGTGAA				

ตารางที่ 7 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (Pto kin 1) จำนวน 53 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR868P	ISSR868 Pto kin 1	(GAA) ₆ GCATTGGAACAAGGTGAA	100-2,072	29	1	0
ISSR878P	ISSR878 Pto kin 1	(GGAT) ₄ GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,200	12	2	0
ISSR880P	ISSR880 Pto kin 1	(GGAGA) ₃ GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,200	24	1	0
ISSR881P	ISSR881 Pto kin 1	(GGGT) ₃ G GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,200	24	3	0
ISSR884P	ISSR884 Pto kin 1	HBH (AG) ₇ GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,200	23	0	0
ISSR885P	ISSR885 Pto kin 1	BHB (GA) ₇ GCATTGGAACAAGGTGAA	100-2,072	25	1	0
ISSR886P	ISSR886 Pto kin 1	VDV (CT) ₇ GCATTGGAACAAGGTGAA	100-2,072	27	0	0
ISSR887P	ISSR887 Pto kin 1	DVD (TC) ₇ GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,500	24	3	0
ISSR888P	ISSR888 Pto kin 1	BDB (CA) ₇ GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,500	24	2	0
ISSR889P	ISSR889 Pto kin 1	DBD (AC) ₇ GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,500	21	4	0
ISSR890P	ISSR890 Pto kin 1	VHV (GT) ₇ GCATTGGAACAAGGTGAA	100-1,500	25	2	0
ผลรวม				1,086	80	2
ค่าเฉลี่ย				20.5	1.5	0

¹ B = C, G, T; D = A, G, T; H = A, C, T; I = inosine; N = A, G, C, T; R = พิวรีน (A, G); V = A, C, G; Y = ไพริมิดีน (C, T)

² NB = จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่นับได้ในสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of scorable bands)

³ NPB = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of polymorphic bands between resistant and susceptible parents)

⁴ I-R linked = จำนวนตำแหน่งของเครื่องหมาย ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง; ⁵ P = ไพรเมอร์ Pto kin 1

ตารางที่ 8 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (P-Loop) จำนวน 60 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3') ¹	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB ²	NPB ³	I-R linked ⁴
ISSR807PL ⁵	ISSR807 P-Loop	(AG) ₈ T (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	20	4	0
ISSR808PL	ISSR808 P-Loop	(AG) ₈ C (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	20	0	0
ISSR809PL	ISSR809 P-Loop	(AG) ₈ G (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	22	2	0
ISSR810PL	ISSR810 P-Loop	(GA) ₈ T (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	22	5	0
ISSR811PL	ISSR811 P-Loop	(GA) ₈ C (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,200	19	6	0
ISSR812PL	ISSR812 P-Loop	(GA) ₈ A (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	21	7	0
ISSR814PL	ISSR814 P-Loop	(CA) ₈ A (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	100-1,500	30	8	0
ISSR815PL	ISSR815 P-Loop	(CT) ₈ G (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	100-1,500	23	6	1
ISSR816PL	ISSR816 P-Loop	(CA) ₈ T (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	100-1,500	28	8	0
ISSR817PL	ISSR817 P-Loop	(CA) ₈ A (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	24	8	0
ISSR818PL	ISSR818 P-Loop	(CA) ₈ G (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	14	2	0
ISSR819PL	ISSR819 P-Loop	(GT) ₈ A (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	19	1	0
ISSR820PL	ISSR820 P-Loop	(GT) ₈ C (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	20	2	0
ISSR821PL	ISSR821 P-Loop	(GT) ₈ T (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	20	0	0

ตารางที่ 8 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (P-Loop) จำนวน 60 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR823PL	ISSR823 P-Loop	(TC) ₈ C (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	19	2	0
ISSR825PL	ISSR825 P-Loop	(AC) ₈ T (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	100-1,500	32	8	0
ISSR826PL	ISSR826 P-Loop	(AC) ₈ C (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	100-1,500	38	9	1
ISSR827PL	ISSR827 P-Loop	(AC) ₈ G (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	23	4	0
ISSR828PL	ISSR828 P-Loop	(TG) ₈ A (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	22	0	0
ISSR829PL	ISSR829 P-Loop	(TG) ₈ C (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	100-1,500	36	8	0
ISSR830PL	ISSR830 P-Loop	(TG) ₈ G (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	29	3	0
ISSR834PL	ISSR834 P-Loop	(AG) ₈ YT (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	25	5	0
ISSR835PL	ISSR835 P-Loop	(AG) ₈ YC (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,200	25	4	0
ISSR836PL	ISSR836 P-Loop	(AG) ₈ YA (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	100-1,500	35	9	0
ISSR840PL	ISSR840 P-Loop	(GA) ₈ YT (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	22	1	0
ISSR841PL	ISSR841 P-Loop	(GA) ₈ YC (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	100-1,500	39	10	0
ISSR841cPL	ISSR841c P-Loop	(GA) ₈ CC (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	21	1	0
ISSR841tPL	ISSR841t P-Loop	(GA) ₈ TC (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	100-1,500	44	13	0

ตารางที่ 8 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (P-Loop) จำนวน 60 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR842PL	ISSR842 P-Loop	(GA) ₈ YG (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	100-1,500	34	4	0
ISSR844PL	ISSR844 P-Loop	(CT) ₈ RC (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	100-1,500	34	5	0
ISSR846PL	ISSR846 P-Loop	(CA) ₈ AT (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	100-1,500	30	1	0
ISSR847PL	ISSR847 P-Loop	(CA) ₈ RC (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	100-1,500	30	3	0
ISSR848PL	ISSR848 P-Loop	(CA) ₈ RG (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	100-1,500	26	4	0
ISSR849PL	ISSR849 P-Loop	(GT) ₈ YA (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,000	17	5	0
ISSR850PL	ISSR850 P-Loop	(GT) ₈ YC (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	21	1	0
ISSR851PL	ISSR851 P-Loop	(GT) ₈ YG (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	23	5	0
ISSR855PL	ISSR855 P-Loop	(AC) ₈ YT (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	100-1,500	34	3	0
ISSR856PL	ISSR856 P-Loop	(AC) ₈ YA (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	100-1,500	33	4	0
ISSR857PL	ISSR857 P-Loop	(AC) ₈ YG (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	100-1,500	38	6	0
ISSR858PL	ISSR858 P-Loop	(TG) ₈ RT (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	25	6	0
ISSR859PL	ISSR859 P-Loop	(TG) ₈ RC (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	24	5	0
ISSR860PL	ISSR860 P-Loop	(TG) ₈ RA (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	15	0	0

ตารางที่ 8 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (P-Loop) จำนวน 60 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR862PL	ISSR862 P-Loop	(AGC) ₆ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	19	0	0
ISSR864PL	ISSR864 P-Loop	(ATG) ₆ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	26	3	0
ISSR866PL	ISSR866 P-Loop	(CTC) ₆ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-800	12	0	0
ISSR867PL	ISSR867 P-Loop	(GGC) ₆ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	22	0	0
ISSR868PL	ISSR868 P-Loop	(GAA) ₆ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	25	2	0
ISSR873PL	ISSR873 P-Loop	(GACA) ₄ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	20	9	0
ISSR878PL	ISSR878 P-Loop	(GGAT) ₄ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-800	13	2	0
ISSR880PL	ISSR880 P-Loop	(GGAGA) ₃ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,000	14	4	0
ISSR881PL	ISSR881 P-Loop	(GGGT) ₃ G (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,000	17	6	0
ISSR884PL	ISSR884 P-Loop	HBH (AG) ₇ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	100-1,500	28	7	0
ISSR885PL	ISSR885 P-Loop	BHB (GA) ₇ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	100-1,500	35	5	0
ISSR886PL	ISSR886 P-Loop	VDV (CT) ₇ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	100-1,200	35	15	0
ISSR887PL	ISSR887 P-Loop	DVD (TC) ₇ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	27	6	0
ISSR888PL	ISSR888 P-Loop	BDB (CA) ₇ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	21	2	0

ตารางที่ 8 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (P-Loop) จำนวน 60 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR889PL	ISSR889 P-Loop	DBD (AC) ₇ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	27	2	0
ISSR890PL	ISSR890 P-Loop	VHV (GT) ₇ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	300-1,500	23	3	0
ISSR891PL	ISSR891 P-Loop	HVH (TG) ₇ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	28	7	0
ISSR900PL	ISSR900 P-Loop	ACTTCCC(CA) ₂ GGTTAA(CA) ₂ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,300	20	5	0
ผลรวม				1,508	266	2
ค่าเฉลี่ย				25.1	4.4	0

¹ B = C, G, T; D = A, G, T; H = A, C, T; I = inosine; N = A, G, C, T; R = พิวรีน (A, G); V = A, C, G; Y = ไพริมิดีน (C, T)

² NB = จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่นับได้ในสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of scorable bands)

³ NPB = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of polymorphic bands between resistant and susceptible parents)

⁴ I-R linked = จำนวนตำแหน่งของเครื่องหมาย ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง

⁵ PL = ไพรเมอร์ P-Loop

ตารางที่ 9 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (PMR1R) จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3') ¹	ขนาดของ แถบดีเอ็นเอ (bp)	NB ²	NPB ³	I-R linked ⁴
ISSR807PMR1R ⁵	ISSR807 PMR1R	(AG) ₈ T AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	30	7	0
ISSR808PMR1R	ISSR808 PMR1R	(AG) ₈ C AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	16	2	0
ISSR809PMR1R	ISSR809 PMR1R	(AG) ₈ G AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,200	28	0	0
ISSR810PMR1R	ISSR810 PMR1R	(GA) ₈ T AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,200	26	0	0
ISSR811PMR1R	ISSR811 PMR1R	(GA) ₈ C AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,200	25	5	0
ISSR812PMR1R	ISSR812 PMR1R	(GA) ₈ A AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,200	29	0	0
ISSR813PMR1R	ISSR813 PMR1R	(CA) ₈ T AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,000	21	4	0
ISSR814PMR1R	ISSR814 PMR1R	(CA) ₈ A AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,000	17	2	0
ISSR815PMR1R	ISSR815 PMR1R	(CT) ₈ G AGCAAGAAATCACTCCATGT	250-900	17	1	0
ISSR816PMR1R	ISSR816 PMR1R	(CA) ₈ T AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	16	2	0
ISSR817PMR1R	ISSR817 PMR1R	(CA) ₈ A AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-900	15	2	0
ISSR818PMR1R	ISSR818 PMR1R	(CA) ₈ G AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-2,072	24	0	0
ISSR819PMR1R	ISSR819 PMR1R	(GT) ₈ A AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-900	14	4	0
ISSR820PMR1R	ISSR820 PMR1R	(GT) ₈ C AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-900	22	0	0

ตารางที่ 9 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (PMR1R) จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°ซ (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ ใช้ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของ แถบดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR821PMR1R	ISSR821 PMR1R	(GT) ₈ T AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,200	25	2	0
ISSR825PMR1R	ISSR825 PMR1R	(AC) ₈ T AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	24	2	0
ISSR826PMR1R	ISSR826 PMR1R	(AC) ₈ C AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,200	22	0	0
ISSR827PMR1R	ISSR827 PMR1R	(AC) ₈ G AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	22	2	0
ISSR828PMR1R	ISSR828 PMR1R	(TG) ₈ A AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	16	0	0
ISSR829PMR1R	ISSR829 PMR1R	(TG) ₈ C AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	23	2	0
ISSR830PMR1R	ISSR830 PMR1R	(TG) ₈ G AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,200	21	4	0
ISSR834PMR1R	ISSR834 PMR1R	(AG) ₈ YT AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	23	3	0
ISSR835PMR1R	ISSR835 PMR1R	(AG) ₈ YC AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	10	0	0
ISSR836PMR1R	ISSR836 PMR1R	(AG) ₈ YA AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	23	2	0
ISSR840PMR1R	ISSR840 PMR1R	(GA) ₈ YT AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	20	1	0
ISSR841PMR1R	ISSR841 PMR1R	(GA) ₈ YC AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,200	25	2	0
ISSR841cPMR1R	ISSR841c PMR1R	(GA) ₈ CC AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	21	1	0
ISSR841tPMR1R	ISSR841t PMR1R	(GA) ₈ TC AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	22	1	0

ตารางที่ 9 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (PMR1R) จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของ แถบดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR842PMR1R	ISSR842 PMR1R	(GA) ₈ YG AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	21	0	0
ISSR844PMR1R	ISSR844 PMR1R	(CT) ₈ RC AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	21	1	0
ISSR846PMR1R	ISSR846 PMR1R	(CA) ₈ AT AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-900	12	3	0
ISSR847PMR1R	ISSR847 PMR1R	(CA) ₈ RC AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	21	0	0
ISSR848PMR1R	ISSR848 PMR1R	(CA) ₈ RG AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	17	0	0
ISSR849PMR1R	ISSR849 PMR1R	(GT) ₈ YA AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,200	19	0	0
ISSR850PMR1R	ISSR850 PMR1R	(GT) ₈ YC AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,200	22	4	0
ISSR851PMR1R	ISSR851 PMR1R	(GT) ₈ YG AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	21	1	0
ISSR853PMR1R	ISSR853 PMR1R	(TC) ₈ RT AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,200	7	0	0
ISSR855PMR1R	ISSR855 PMR1R	(AC) ₈ YT AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,200	20	0	0
ISSR856PMR1R	ISSR856 PMR1R	(AC) ₈ YA AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	20	2	0
ISSR857PMR1R	ISSR857 PMR1R	(AC) ₈ YG AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	23	0	0
ISSR858PMR1R	ISSR858 PMR1R	(TG) ₈ RT AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	25	1	0
ISSR859PMR1R	ISSR859 PMR1R	(TG) ₈ RC AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	16	0	0

ตารางที่ 9 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (PMR1R) จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของ แถบดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR860PMR1R	ISSR860 PMR1R	(TG) ₈ RA AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	20	0	0
ISSR862PMR1R	ISSR862 PMR1R	(AGC) ₆ AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	20	0	0
ISSR864PMR1R	ISSR864 PMR1R	(ATG) ₆ AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	28	1	0
ISSR866PMR1R	ISSR866 PMR1R	(CTC) ₆ AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	15	1	0
ISSR867PMR1R	ISSR867 PMR1R	(GGC) ₆ AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	17	0	0
ISSR868PMR1R	ISSR868 PMR1R	(GAA) ₆ AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	26	2	0
ISSR880PMR1R	ISSR880 PMR1R	(GGAGA) ₃ AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	28	1	0
ISSR881PMR1R	ISSR881 PMR1R	(GGGT) ₃ G AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	22	2	0
ISSR884PMR1R	ISSR884 PMR1R	HBH (AG) ₇ AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	27	1	1
ISSR885PMR1R	ISSR885 PMR1R	BHB (GA) ₇ AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	29	1	0
ISSR886PMR1R	ISSR886 PMR1R	VDV (CT) ₇ AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-2,072	22	0	0
ISSR887PMR1R	ISSR887 PMR1R	DVD (TC) ₇ AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-2,072	18	0	0
ISSR888PMR1R	ISSR888 PMR1R	BDB (CA) ₇ AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	21	0	0

ตารางที่ 9 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (PMR1R) จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของ แถบดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR889PMR1R	ISSR889 PMR1R	DBD (AC) ₇ AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	20	0	0
ISSR890PMR5R	ISSR890 PMR1R	VHV (GT) ₇ AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-1,500	24	1	1
ISSR891PMR1R	ISSR891 PMR1R	HVH (TG) ₇ AGCAAGAAATCACTCCATGT	200-2,072	25	1	0
ผลรวม				1,224	74	2
ค่าเฉลี่ย				21.1	1.3	0

¹ B = C, G, T; D = A, G, T; H = A, C, T; I = inosine; N = A, G, C, T; R = พิวรีน (A, G); V = A, C, G; Y = ไพริมิดีน (C, T)

² NB = จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่นับได้ในสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of scorable bands)

³ NPB = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of polymorphic bands between resistant and susceptible parents)

⁴ I-R linked = จำนวนตำแหน่งของเครื่องหมาย ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง

⁵ PMR1R = ไพรเมอร์ PMR1R

ตารางที่ 10 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (PMR5R) จำนวน 56 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3') ¹	ขนาดของ แถบดีเอ็นเอ (bp)	NB ²	NPB ³	I-R linked ⁴
ISSR808PMR5R ⁵	ISSR808 PMR5R	(AG) ₈ C TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	16	0	0
ISSR809PMR5R	ISSR809 PMR5R	(AG) ₈ G TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	21	0	0
ISSR810PMR5R	ISSR810 PMR5R	(GA) ₈ T TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	22	1	0
ISSR811PMR5R	ISSR811 PMR5R	(GA) ₈ C TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-1,500	17	1	0
ISSR812PMR5R	ISSR812 PMR5R	(GA) ₈ A TACTCTCACTGTGCGTTCTG	150-2,072	31	2	1
ISSR813PMR5R	ISSR813 PMR5R	(CA) ₈ T TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	15	1	0
ISSR814PMR5R	ISSR814 PMR5R	(CA) ₈ A TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	19	1	0
ISSR815PMR5R	ISSR815 PMR5R	(CT) ₈ G TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-1,500	16	4	0
ISSR816PMR5R	ISSR816 PMR5R	(CA) ₈ T TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	20	0	0
ISSR817PMR5R	ISSR817 PMR5R	(CA) ₈ A TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	23	3	0
ISSR819PMR5R	ISSR819 PMR5R	(GT) ₈ A TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-1,500	21	2	0
ISSR820PMR5R	ISSR820 PMR5R	(GT) ₈ C TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	27	0	0
ISSR821PMR5R	ISSR821 PMR5R	(GT) ₈ T TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	18	4	0
ISSR823PMR5R	ISSR823 PMR5R	(TC) ₈ C TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-1,500	13	0	0

ตารางที่ 10 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (PMR5R) จำนวน 56 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ ใช้ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของ แถบดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR825PMR5R	ISSR825 PMR5R	(AC) ₈ T TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	25	5	0
ISSR826PMR5R	ISSR826 PMR5R	(AC) ₈ C TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	21	2	0
ISSR827PMR5R	ISSR827 PMR5R	(AC) ₈ G TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	25	4	0
ISSR828PMR5R	ISSR828 PMR5R	(TG) ₈ A TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	27	1	0
ISSR829PMR5R	ISSR829 PMR5R	(TG) ₈ C TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	25	1	0
ISSR830PMR5R	ISSR830 PMR5R	(TG) ₈ G TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	21	3	1
ISSR834PMR5R	ISSR834 PMR5R	(AG) ₈ YT TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	28	4	0
ISSR835PMR5R	ISSR835 PMR5R	(AG) ₈ YC TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	19	1	0
ISSR840PMR5R	ISSR840 PMR5R	(GA) ₈ YT TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-1,500	20	4	1
ISSR841PMR5R	ISSR841 PMR5R	(GA) ₈ YC TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	22	4	0
ISSR841cPMR5R	ISSR841c PMR5R	(GA) ₈ CC TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-1,500	25	1	0
ISSR841tPMR5R	ISSR841t PMR5R	(GA) ₈ TC TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	20	2	0
ISSR842PMR5R	ISSR842 PMR5R	(GA) ₈ YG TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-1,500	32	2	0
ISSR844PMR5R	ISSR844 PMR5R	(CT) ₈ RC TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-1,200	16	2	0

ตารางที่ 10 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ตัวหนาน และประชากรรวมตัวหนาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโครมาโซม X เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (PMR5R) จำนวน 56 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของ แถบดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR846PMR5R	ISSR846 PMR5R	(CA) ₈ AT TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	27	0	0
ISSR847PMR5R	ISSR847 PMR5R	(CA) ₈ RC TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	20	2	0
ISSR848PMR5R	ISSR848 PMR5R	(CA) ₈ RG TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	21	6	0
ISSR849PMR5R	ISSR849 PMR5R	(GT) ₈ YA TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	24	2	0
ISSR850PMR5R	ISSR850 PMR5R	(GT) ₈ YC TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	26	1	0
ISSR851PMR5R	ISSR851 PMR5R	(GT) ₈ YG TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-1,500	25	2	0
ISSR853PMR5R	ISSR853 PMR5R	(TC) ₈ RT TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-1,500	17	2	0
ISSR855PMR5R	ISSR855 PMR5R	(AC) ₈ YT TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	27	1	0
ISSR856PMR5R	ISSR856 PMR5R	(AC) ₈ YA TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	26	1	0
ISSR857PMR5R	ISSR857 PMR5R	(AC) ₈ YG TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	28	1	0
ISSR858PMR5R	ISSR858 PMR5R	(TG) ₈ RT TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	28	4	0
ISSR859PMR5R	ISSR859 PMR5R	(TG) ₈ RC TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	22	2	0
ISSR860PMR5R	ISSR860 PMR5R	(TG) ₈ RA TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	18	1	0
ISSR862PMR5R	ISSR862 PMR5R	(AGC) ₆ TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-1,500	21	4	0

ตารางที่ 10 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (PMR5R) จำนวน 56 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของ แถบดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR864PMR5R	ISSR864 PMR5R	(ATG) ₆ TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	25	1	0
ISSR866PMR5R	ISSR866 PMR5R	(CTC) ₆ TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	19	4	0
ISSR867PMR5R	ISSR867 PMR5R	(GGC) ₆ TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-1,500	15	0	0
ISSR868PMR5R	ISSR868 PMR5R	(GAA) ₆ TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	29	1	0
ISSR878PMR5R	ISSR878 PMR5R	(GGAT) ₄ TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-1,200	15	1	0
ISSR880PMR5R	ISSR880 PMR5R	(GGAGA) ₃ TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	19	1	0
ISSR881PMR5R	ISSR881 PMR5R	(GGGT) ₃ G TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-1,500	21	0	0
ISSR885PMR5R	ISSR885 PMR5R	BHB (GA) ₇ TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	22	0	0
ISSR886PMR5R	ISSR886 PMR5R	VDV (CT) ₇ TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	23	0	0
ISSR887PMR5R	ISSR887 PMR5R	DVD (TC) ₇ TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	23	0	0
ISSR888PMR5R	ISSR888 PMR5R	BDB (CA) ₇ TACTCTCACTGTGCGTTCTG	300-2,072	16	1	0
ISSR889PMR5R	ISSR889 PMR5R	DBD (AC) ₇ TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	27	2	0
ISSR890PMR5R	ISSR890 PMR5R	VHV (GT) ₇ TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	24	4	0

ตารางที่ 10 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (PMR5R) จำนวน 56 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของ แถบดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR891PMR5R	ISSR891 PMR5R	HVH (TG) ₇ TACTCTCACTGTGCGTTCTG	200-2,072	27	2	0
ผลรวม				1,240	101	3
ค่าเฉลี่ย				22.1	1.8	0.1

¹ B = C, G, T; D = A, G, T; H = A, C, T; I = inosine; N = A, G, C, T; R = พิวรีน (A, G); V = A, C, G; Y = ไพริมิดีน (C, T)

² NB = จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่นับได้ในสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of scorable bands)

³ NPB = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of polymorphic bands between resistant and susceptible parents)

⁴ I-R linked = จำนวนตำแหน่งของเครื่องหมาย ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง

⁵ PMR5R = ไพรเมอร์ PMR5R

ตารางที่ 11 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (RLK for) จำนวน 55 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3') ¹	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB ²	NPB ³	-R linked ⁴
ISSR807R ⁵	ISSR807 RLK for	(AG) ₈ T GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	32	10	0
ISSR808R	ISSR808 RLK for	(AG) ₈ C GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	36	11	0
ISSR809R	ISSR809 RLK for	(AG) ₈ G GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	36	9	0
ISSR810R	ISSR810 RLK for	(GA) ₈ T GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	29	7	0
ISSR811R	ISSR811 RLK for	(GA) ₈ C GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,200	17	0	0
ISSR812R	ISSR812 RLK for	(GA) ₈ A GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,500	26	0	0
ISSR815R	ISSR815 RLK for	(CT) ₈ G GAYGTNAARCCIGARAA	200-2,072	20	0	0
ISSR816R	ISSR816 RLK for	(CA) ₈ T GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,500	21	3	0
ISSR817R	ISSR817 RLK for	(CA) ₈ A GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,500	25	2	0
ISSR819R	ISSR819 RLK for	(GT) ₈ A GAYGTNAARCCIGARAA	100-2,072	26	9	0
ISSR820R	ISSR820 RLK for	(GT) ₈ C GAYGTNAARCCIGARAA	100-2,072	28	5	0
ISSR821R	ISSR821 RLK for	(GT) ₈ T GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	16	2	0
ISSR825R	ISSR825 RLK for	(AC) ₈ T GAYGTNAARCCIGARAA	100-2,072	25	0	0
ISSR826R	ISSR826 RLK for	(AC) ₈ C GAYGTNAARCCIGARAA	200-2,072	26	1	0
ISSR827R	ISSR827 RLK for	(AC) ₈ G GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	20	1	0

ตารางที่ 11 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (RLK for) จำนวน 55 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°ซ (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR828R	ISSR828 RLK for	(TG) ₈ A GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	27	5	0
ISSR830R	ISSR830 RLK for	(TG) ₈ G GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	19	0	0
ISSR834R	ISSR834 RLK for	(AG) ₈ YT GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	32	3	0
ISSR835R	ISSR835 RLK for	(AG) ₈ YC GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,200	30	4	0
ISSR836R	ISSR836 RLK for	(AG) ₈ YA GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	34	0	0
ISSR840R	ISSR840 RLK for	(GA) ₈ YT GAYGTNAARCCIGARAA	100-2,072	30	2	1
ISSR841R	ISSR841 RLK for	(GA) ₈ YC GAYGTNAARCCIGARAA	100-2,072	36	5	0
ISSR841cR	ISSR841c RLK for	(GA) ₈ CC GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	17	0	0
ISSR841tR	ISSR841t RLK for	(GA) ₈ TC GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,500	18	1	0
ISSR842R	ISSR842 RLK for	(GA) ₈ YG GAYGTNAARCCIGARAA	200-2,072	30	3	0
ISSR844R	ISSR844 RLK for	(CT) ₈ RC GAYGTNAARCCIGARAA	100-2,072	39	0	0
ISSR846R	ISSR846 RLK for	(CA) ₈ AT GAYGTNAARCCIGARAA	100-2,072	31	1	0
ISSR847R	ISSR847 RLK for	(CA) ₈ RC GAYGTNAARCCIGARAA	100-2,072	24	2	0
ISSR848R	ISSR848 RLK for	(CA) ₈ RG GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	24	0	0
ISSR849R	ISSR849 RLK for	(GT) ₈ YA GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,000	10	0	0

ตารางที่ 11 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (RLK for) จำนวน 55 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°ซ (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR850R	ISSR850 RLK for	(GT) ₈ YC GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	25	1	0
ISSR851R	ISSR851 RLK for	(GT) ₈ YG GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	21	0	0
ISSR853R	ISSR853 RLK for	(TC) ₈ RT GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	23	1	0
ISSR855R	ISSR855 RLK for	(AC) ₈ YT GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,500	22	2	0
ISSR856R	ISSR856 RLK for	(AC) ₈ YA GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	20	0	0
ISSR857R	ISSR857 RLK for	(AC) ₈ YG GAYGTNAARCCIGARAA	100-2,072	32	4	0
ISSR858R	ISSR858 RLK for	(TG) ₈ RT GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	25	4	0
ISSR859R	ISSR859 RLK for	(TG) ₈ RC GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	21	2	1
ISSR860R	ISSR860 RLK for	(TG) ₈ RA GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	29	3	0
ISSR862R	ISSR862 RLK for	(AGC) ₆ GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,500	20	0	0
ISSR864R	ISSR864 RLK for	(ATG) ₆ GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,500	20	0	0
ISSR866R	ISSR866 RLK for	(CTC) ₆ GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	23	2	0
ISSR867R	ISSR867 RLK for	(GGC) ₆ GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,000	23	1	0
ISSR868R	ISSR868 RLK for	(GAA) ₆ GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	22	3	0

ตารางที่ 11 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4758; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (RLK for) จำนวน 55 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR878R	ISSR878 RLK for	(GGAT) ₄ GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	21	0	0
ISSR880R	ISSR880 RLK for	(GGAGA) ₃ GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	31	0	0
ISSR881R	ISSR881 RLK for	(GGGT) ₃ G GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	25	2	0
ISSR884R	ISSR884 RLK for	HBH (AG) ₇ GAYGTNAARCCIGARAA	100-2,072	37	5	0
ISSR885R	ISSR885 RLK for	BHB (GA) ₇ GAYGTNAARCCIGARAA	100-2,072	35	1	0
ISSR886R	ISSR886 RLK for	VDV (CT) ₇ GAYGTNAARCCIGARAA	100-2,072	26	2	0
ISSR887R	ISSR887 RLK for	DVD (TC) ₇ GAYGTNAARCCIGARAA	100-2,072	36	3	0
ISSR888R	ISSR888 RLK for	BDB (CA) ₇ GAYGTNAARCCIGARAA	200-2,072	26	0	0
ISSR889R	ISSR889 RLK for	DBD (AC) ₇ GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	26	0	0
ISSR890R	ISSR890 RLK for	VHV (GT) ₇ GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,500	25	2	0
ISSR891R	ISSR891 RLK for	HVH (TG) ₇ GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,500	23	0	0
ผลรวม				1,421	124	2
ค่าเฉลี่ย				25.8	2.3	0

¹ B = C, G, T; D = A, G, T; H = A, C, T; I = inosine; N = A, G, C, T; R = พิวรีน (A, G); V = A, C, G; Y = ไพริมิดีน (C, T)

² NB = จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่นับได้ในสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of scorable bands)

³ NPB = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of polymorphic bands between resistant and susceptible parents)

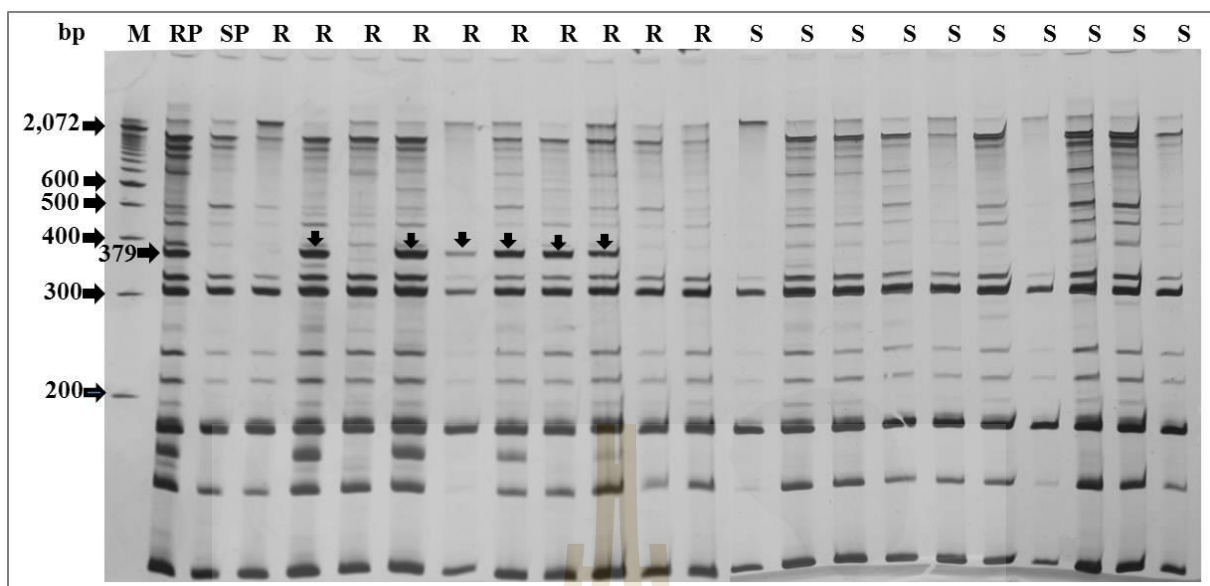
⁴ I-R linked = จำนวนตำแหน่งของเครื่องหมาย ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง; ⁵ R = ไพรเมอร์ RLK for

ตารางที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR-RGA และลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 จำนวน 11 เครื่องหมาย

เครื่องหมาย	จำนวนต้น	Beta	t-value	P-value	R ²	ระยะห่าง (cM)	LOD
I15PL457	19	-0.438	-2.011	0.060	0.19	33	0.443
I26PL250	20	0.075	0.320	0.752	0.01	45	0.044
I40R211	20	-0.519	-2.578	0.019	0.27	25	1.136
I59R818	18	-0.450	-2.016	0.061	0.20	28	0.800
I41P252	19	0.458	2.122	0.049	0.21	32	0.573
I41tP379	20	-0.520	-2.585	0.019	0.27	20	1.674
I84PMR1R600	19	-0.546	-2.686	0.016	0.30	26	0.964
I90PMR1R400	20	-0.452	-2.152	0.045	0.21	30	0.715
I12PMR5R160	20	-0.287	-1.270	0.220	0.08	40	0.175
I30PMR5R656	19	-0.171	-0.717	0.483	0.03	42	0.103
I40PMR5R471	20	-0.382	-1.754	0.096	0.15	35	0.397

ตารางที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR และ ISSR-RGA ต่อลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 จำนวน 1 เครื่องหมาย

เครื่องหมาย	จำนวนต้น	Beta	t-value	P-value	R ²	ระยะห่าง (cM)	LOD
I41tP379	64	-0.510	-4.673	0.000	0.260	19	5.853



ภาพที่ 4 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอในถั่วเขียวพันธุ์ต้านทาน V4758 (RP) พันธุ์อ่อนแอ CN72 (SP) ลูกผสมที่ต้านทาน (R) และลูกผสมที่อ่อนแอ (S) ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ISSR841t ร่วมกับ Pto kin 1; M = 100 bp DNA ladder

ตารางที่ 14 ลำดับเบส ขนาดของแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความ-
 แตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่
 เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและ
 ประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 63 ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ
 annealing 50°C

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3') ¹	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	NB ²	NPB ³	I linked ⁴
807	(AG) ₈ T	200-1,500	34	1	0
808	(AG) ₈ C	200-1,500	29	1	1
809	(AG) ₈ G	200-1,500	29	1	0
810	(GA) ₈ T	200-1,500	22	2	0
811	(GA) ₈ C	250-1,200	20	0	0
812	(GA) ₈ A	200-1,500	29	1	0
813	(CA) ₈ T	300-2,072	14	0	0
814	(CA) ₈ A	300-1,500	12	0	0
815	(CT) ₈ G	200-1,500	17	1	0
816	(CA) ₈ T	200-1,500	19	1	0
817	(CA) ₈ A	200-1,500	16	0	0
818	(CA) ₈ G	200-1,500	22	0	0
819	(GT) ₈ A	200-1,500	19	1	0
820	(GT) ₈ C	200-1,500	12	2	0
821	(GT) ₈ T	500-1,500	8	0	0
823	(TC) ₈ C	200-1,200	13	1	0
825	(AC) ₈ T	200-1,500	21	3	0
826	(AC) ₈ C	200-1,500	15	0	0
827	(AC) ₈ G	200-1,500	18	2	1
828	(TG) ₈ A	200-1,500	14	1	0
829	(TG) ₈ C	200-1,500	23	5	0
830	(TG) ₈ G	200-1,500	25	3	0
834	(AG) ₈ YT	200-1,500	22	2	0
835	(AG) ₈ YC	200-1,200	25	3	0
836	(AG) ₈ YA	200-1,500	21	0	0
840	(GA) ₈ YT	200-1,500	25	0	0
841	(GA) ₈ YC	200-1,500	22	1	0
841c	(GA) ₈ CC	200-1,500	27	2	0
841t	(GA) ₈ TC	200-1,200	19	1	0

ตารางที่ 14 ลำดับเบส ขนาดของแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความ-
 แตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความ-
 เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและ
 ประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 63 ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ
 annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB ³	I linked ⁴
842	(GA) ₈ YG	200-1,200	24	0	0
844	(CT) ₈ RC	500-2,072	10	0	0
846	(CA) ₈ AT	200-2,072	21	6	0
847	(CA) ₈ RC	200-2,072	18	3	0
848	(CA) ₈ RG	200-1,500	21	2	0
849	(GT) ₈ YA	200-2,072	20	2	0
850	(GT) ₈ YC	300-2,072	14	1	0
851	(GT) ₈ YG	200-1,500	15	2	0
853	(TC) ₈ RT	300-2,072	15	0	0
855	(AC) ₈ YT	200-2,072	22	0	0
856	(AC) ₈ YA	200-1,500	18	0	0
857	(AC) ₈ YG	200-1,500	24	1	0
858	(TG) ₈ RT	200-2,072	20	0	0
859	(TG) ₈ RC	200-2,072	22	1	0
860	(TG) ₈ RA	200-2,072	21	0	0
862	(AGC) ₆	300-1,500	11	0	0
864	(ATG) ₆	200-2,072	23	1	0
866	(CTC) ₆	200-2,072	18	0	0
867	(GGC) ₆	200-2,072	11	0	0
868	(GAA) ₆	200-2,072	29	0	0
873	(GACA) ₄	200-1,500	17	1	0
876	(GATA) ₂ (GACA) ₂	200-1,500	23	4	0
878	(GGAT) ₄	200-2,072	16	1	0
880	(GGAGA) ₃	200-2,072	19	0	0
881	(GGGT) ₃ G	600-2,072	10	0	0
884	HBH (AG) ₇	200-2,072	28	3	0
885	BHB (GA) ₇	200-2,072	25	1	0
886	VDV (CT) ₇	200-2,072	27	3	0
887	DVD (TC) ₇	200-2,072	21	1	0
888	BDB (CA) ₇	200-1,200	22	0	0

ตารางที่ 14 ลำดับเบส ขนาดของแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 63 ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB ³	I linked ⁴
889	DBD (AC) ₇	200-1,500	29	1	0
890	VHV (GT) ₇	200-1,500	26	2	0
891	HVH (TG) ₇	200-1,500	21	2	0
900	ACTTCCC(CA) ₂ GGTTAA(CA) ₂	600-2,072	7	2	0
ผลรวม			1,260	75	2
ค่าเฉลี่ย			20	1.2	0

¹ B = C, G, T; D = A, G, T; H = A, C, T; N = A, G, C, T; R = พิวรีน (A, G); V = A, C, G; Y = ไพริมิดีน (C, T)

² NB = จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่นับได้ในสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of scorable bands)

³ NPB = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of polymorphic bands between resistant and susceptible parents)

⁴ I linked = จำนวนตำแหน่งของเครื่องหมาย ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง

ตารางที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR และลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 จำนวน 2 เครื่องหมาย

เครื่องหมาย	จำนวนต้น	Beta	t-value	P-value	R ²	ระยะห่าง (cM)	LOD
108214	20	-0.494	-2.408	0.027	0.244	25	1.136
127565	20	-0.748	-4.786	0.000	0.560	10	3.197

ตารางที่ 16 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (GLPLAL 1) จำนวน 61 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°ซ

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3') ¹	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB ²	NPB ³	-R linked ⁴
ISSR807G ⁵	ISSR807	(AG) ₈ T	150-2,072	35	9	2
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR808G	ISSR808	(AG) ₈ C	150-2,072	29	5	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR809G	ISSR809	(AG) ₈ G	150-2,072	28	1	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR810G	ISSR810	(GA) ₈ T	150-1,500	22	2	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR811G	ISSR811	(GA) ₈ C	200-1,200	22	3	1
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR812G	ISSR812	(GA) ₈ A	150-1,500	38	4	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR813G	ISSR813	(CA) ₈ T	150-1,000	24	1	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR814G	ISSR814	(CA) ₈ A	150-1,200	19	1	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR815G	ISSR815	(CT) ₈ G	200-1,500	24	0	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR816G	ISSR816	(CA) ₈ T	200-1,500	22	1	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR817G	ISSR817	(CA) ₈ A	200-1,500	24	1	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR818G	ISSR818	(CA) ₈ G	200-1,500	33	3	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR819G	ISSR819	(GT) ₈ A	150-1,500	24	6	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR820G	ISSR820	(GT) ₈ C	200-1,500	30	4	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				

ตารางที่ 16 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (GLPLAL 1) จำนวน 61 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°ซ (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR821G	ISSR821	(GT) ₈ T	200-1,500	29	2	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR823G	ISSR823	(TC) ₈ C	150-1,500	28	2	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR825G	ISSR825	(AC) ₈ T	200-1,500	27	5	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR826G	ISSR826	(AC) ₈ C	200-2,072	34	11	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR827G	ISSR827	(AC) ₈ G	200-2,072	26	3	1
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR828G	ISSR828	(TG) ₈ A	200-1,500	20	3	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR829G	ISSR829	(TG) ₈ C	200-1,200	19	1	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR830G	ISSR830	(TG) ₈ G	200-2,072	31	7	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR834G	ISSR834	(AG) ₈ YT	200-1,500	23	2	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR835G	ISSR835	(AG) ₈ YC	200-2,072	27	1	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR836G	ISSR836	(AG) ₈ YA	200-2,072	35	2	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR840G	ISSR840	(GA) ₈ YT	200-1,500	26	3	1
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR841G	ISSR841	(GA) ₈ YC	200-1,500	27	1	1
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR841cG	ISSR841c	(GA) ₈ CC	200-1,500	33	6	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				

ตารางที่ 16 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (GLPLAL 1) จำนวน 61 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR841tG	ISSR841t	(GA) ₈ TC	200-2,072	34	1	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR842G	ISSR842	(GA) ₈ YG	200-2,072	28	1	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR844G	ISSR844	(CT) ₈ RC	200-1,500	29	1	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR846G	ISSR846	(CA) ₈ AT	200-2,072	19	2	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR847G	ISSR847	(CA) ₈ RC	200-2,072	25	0	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR848G	ISSR848	(CA) ₈ RG	200-2,072	23	3	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR849G	ISSR849	(GT) ₈ YA	200-2,072	25	4	1
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR850G	ISSR850	(GT) ₈ YC	200-1,500	32	1	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR851G	ISSR851	(GT) ₈ YG	200-2,072	31	4	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR853G	ISSR853	(TC) ₈ RT	200-1,500	24	3	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR855G	ISSR855	(AC) ₈ YT	200-2,072	32	4	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR856G	ISSR856	(AC) ₈ YA	200-1,200	19	3	1
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR857G	ISSR857	(AC) ₈ YG	150-2,072	32	7	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR858G	ISSR858	(TG) ₈ RT	150-2,072	31	3	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				

ตารางที่ 16 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (GLPLAL 1) จำนวน 61 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR859G	ISSR859	(TG) ₈ RC	200-2,072	24	0	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR862G	ISSR862	(AGC) ₆	200-2,072	27	4	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR864G	ISSR864	(ATG) ₆	200-2,072	24	2	0
	Pto kin 1	GCATTGGAACAAGGT GAA				
ISSR866G	ISSR866	(CTC) ₆	150-2,072	35	7	1
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR868G	ISSR868	(GAA) ₆	200-2,072	21	1	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR873G	ISSR873	(GACA) ₄	200-2,072	21	6	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR876G	ISSR876	(GATA) ₂ (GACA) ₂	200-2,072	35	7	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR878G	ISSR878	(GGAT) ₄	200-1,500	24	4	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR880G	ISSR880	(GGAGA) ₃	150-1,200	36	5	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR881G	ISSR881	(GGGT) ₃ G	150-2,072	29	5	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR884G	ISSR884	HBH (AG) ₇	150-2,072	34	7	1
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR885G	ISSR885	BHB (GA) ₇	150-2,072	34	0	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR886G	ISSR886	VDV (CT) ₇	200-2,072	30	0	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR887G	ISSR887	DVD (TC) ₇	200-2,072	33	3	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				

ตารางที่ 16 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (GLPLAL 1) จำนวน 61 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR888G	ISSR888	BDB (CA) ₇	200-1,500	25	1	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR889G	ISSR889	DBD (AC) ₇	150-1,500	35	2	2
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR890G	ISSR890	VHV (GT) ₇	150-1,500	31	3	0
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR891G	ISSR891	HVH (TG) ₇	150-1,500	34	2	1
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ISSR900G	ISSR900	ACTTCCC(CA) ₂ GGTTA	150-1,500	29	2	1
		A(CA) ₂				
	GLPLAL 1	IAGIGCIAGIGGIAGICC				
ผลรวม				1,704	188	14
ค่าเฉลี่ย				27.9	3.1	0.2

¹ B = C, G, T; D = A, G, T; H = A, C, T; I = inosine; N = A, G, C, T; R = พิวรีน (A, G); V = A, C, G; Y = ไพริมิดีน (C, T)

² NB = จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่นับได้ในสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of scorable bands)

³ NPB = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of polymorphic bands between resistant and susceptible parents)

⁴ I-R linked = จำนวนตำแหน่งของเครื่องหมาย ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง

⁵ G = ไพรเมอร์ GLPLAL 1

ตารางที่ 17 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (Pto kin1) จำนวน 63 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3') ¹	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB ²	NPB ³	-R linked ⁴
ISSR807P ⁵	ISSR807 Pto kin 1	(AG) ₈ T GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,200	24	3	0
ISSR808P	ISSR808 Pto kin 1	(AG) ₈ C GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	24	2	0
ISSR809P	ISSR809 Pto kin 1	(AG) ₈ G GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	23	1	0
ISSR810P	ISSR810 Pto kin 1	(GA) ₈ T GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	25	2	1
ISSR811P	ISSR811 Pto kin 1	(GA) ₈ C GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	24	1	0
ISSR812P	ISSR812 Pto kin 1	(GA) ₈ A GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	21	1	0
ISSR813P	ISSR813 Pto kin 1	(CA) ₈ T GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	22	0	0
ISSR814P	ISSR814 Pto kin 1	(CA) ₈ A GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	26	2	0
ISSR815P	ISSR815 Pto kin 1	(CT) ₈ G GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	27	1	0
ISSR816P	ISSR816 Pto kin 1	(CA) ₈ T GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	23	1	0
ISSR817P	ISSR817 Pto kin 1	(CA) ₈ A GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	23	1	0
ISSR818P	ISSR818 Pto kin 1	(CA) ₈ G GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	24	1	0
ISSR819P	ISSR819 Pto kin 1	(GT) ₈ A GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	23	1	0
ISSR820P	ISSR820 Pto kin 1	(GT) ₈ C GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	26	4	0

ตารางที่ 17 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (Pto kin 1) จำนวน 63 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR821P	ISSR821 Pto kin 1	(GT) ₈ T GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	21	5	0
ISSR823P	ISSR823 Pto kin 1	(TC) ₈ C GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	30	1	0
ISSR825P	ISSR825 Pto kin 1	(AC) ₈ T GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	27	1	0
ISSR826P	ISSR826 Pto kin 1	(AC) ₈ C GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	27	0	0
ISSR827P	ISSR827 Pto kin 1	(AC) ₈ G GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	21	3	0
ISSR828P	ISSR828 Pto kin 1	(TG) ₈ A GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	17	0	0
ISSR829P	ISSR829 Pto kin 1	(TG) ₈ C GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	30	3	0
ISSR830P	ISSR830 Pto kin 1	(TG) ₈ G GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	19	1	0
ISSR834P	ISSR834 Pto kin 1	(AG) ₈ YT GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	24	2	0
ISSR835P	ISSR835 Pto kin 1	(AG) ₈ YC GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	24	1	0
ISSR836P	ISSR836 Pto kin 1	(AG) ₈ YA GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	21	0	0
ISSR840P	ISSR840 Pto kin 1	(GA) ₈ YT GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	23	0	0
ISSR841P	ISSR841 Pto kin 1	(GA) ₈ YC GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	24	1	0
ISSR841cP	ISSR841c Pto kin 1	(GA) ₈ CC GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	30	3	0

ตารางที่ 17 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (Pto kin 1) จำนวน 63 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR841tP	ISSR841t Pto kin 1	(GA) ₈ TC GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	22	0	0
ISSR842P	ISSR842 Pto kin 1	(GA) ₈ YG GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	29	2	1
ISSR844P	ISSR844 Pto kin 1	(CT) ₈ RC GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,200	18	0	0
ISSR846P	ISSR846 Pto kin 1	(CA) ₈ AT GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,200	22	0	0
ISSR847P	ISSR847 Pto kin 1	(CA) ₈ RC GCATTGGAACAAGGTGAA	250-1,500	23	2	0
ISSR848P	ISSR848 Pto kin 1	(CA) ₈ RG GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,200	23	0	0
ISSR849P	ISSR849 Pto kin 1	(GT) ₈ YA GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	18	1	0
ISSR850P	ISSR850 Pto kin 1	(GT) ₈ YC GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	23	1	0
ISSR851P	ISSR851 Pto kin 1	(GT) ₈ YG GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	23	2	1
ISSR853P	ISSR853 Pto kin 1	(TC) ₈ RT GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	20	0	0
ISSR855P	ISSR855 Pto kin 1	(AC) ₈ YT GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	25	5	0
ISSR856P	ISSR856 Pto kin 1	(AC) ₈ YA GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	27	1	0
ISSR857P	ISSR857 Pto kin 1	(AC) ₈ YG GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	31	3	0
ISSR858P	ISSR858 Pto kin 1	(TG) ₈ RT GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	24	2	0

ตารางที่ 17 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (Pto kin 1) จำนวน 63 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR859P	ISSR859 Pto kin 1	(TG) ₈ RC GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	31	2	0
ISSR860P	ISSR860 Pto kin 1	(TG) ₈ RA GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	28	2	1
ISSR862P	ISSR862 Pto kin 1	(AGC) ₆ GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	23	2	0
ISSR864P	ISSR864 Pto kin 1	(ATG) ₆ GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	28	2	0
ISSR866P	ISSR866 Pto kin 1	(CTC) ₆ GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	25	0	0
ISSR867P	ISSR867 Pto kin 1	(GGC) ₆ GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	14	0	0
ISSR868P	ISSR868 Pto kin 1	(GAA) ₆ GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	25	0	0
ISSR873P	ISSR873 Pto kin 1	(GACA) ₄ GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	30	1	0
ISSR876P	ISSR876 Pto kin 1	(GATA) ₂ (GACA) ₂ GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	26	5	0
ISSR878P	ISSR878 Pto kin 1	(GGAT) ₄ GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	16	0	0
ISSR880P	ISSR880 Pto kin 1	(GGAGA) ₃ GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	27	1	0
ISSR881P	ISSR881 Pto kin 1	(GGGT) ₃ G GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	22	0	0
ISSR884P	ISSR884 Pto kin 1	HBH (AG) ₇ GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	28	0	0
ISSR885P	ISSR885 Pto kin 1	BHB (GA) ₇ GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	27	2	0

ตารางที่ 17 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (Pto kin 1) จำนวน 63 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR886P	ISSR886 Pto kin 1	VDV (CT) ₇ GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	22	0	0
ISSR887P	ISSR887 Pto kin 1	DVD (TC) ₇ GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	28	1	0
ISSR888P	ISSR888 Pto kin 1	BDB (CA) ₇ GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	22	0	0
ISSR889P	ISSR889 Pto kin 1	DBD (AC) ₇ GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	19	2	0
ISSR890P	ISSR890 Pto kin 1	VHV (GT) ₇ GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	26	1	0
ISSR891P	ISSR891 Pto kin 1	HVH (TG) ₇ GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	27	2	0
ISSR900P	ISSR900 Pto kin 1	ACTTCCC(CA) ₂ GGTTAA(CA) ₂ GCATTGGAACAAGGTGAA	200-1,500	22	1	0
ผลรวม				1,517	85	4
ค่าเฉลี่ย				24.1	1.3	0.1

¹ B = C, G, T; D = A, G, T; H = A, C, T; I = inosine; N = A, G, C, T; R = พิวรีน (A, G); V = A, C, G; Y = ไพริมิดีน (C, T)

² NB = จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่นับได้ในสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of scorable bands)

³ NPB = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of polymorphic bands between resistant and susceptible parents)

⁴ I-R linked = จำนวนตำแหน่งของเครื่องหมาย ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง

⁵ P = ไพรเมอร์ Pto kin 1

ตารางที่ 18 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (P-Loop) จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3') ¹	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB ²	NPB ³	I-R linked ⁴
ISSR807PL ⁵	ISSR807 P-Loop	(AG) ₈ T (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	28	1	0
ISSR808PL	ISSR808 P-Loop	(AG) ₈ C (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	17	4	0
ISSR809PL	ISSR809 P-Loop	(AG) ₈ G (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	22	0	0
ISSR810PL	ISSR810 P-Loop	(GA) ₈ T (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	22	5	0
ISSR811PL	ISSR811 P-Loop	(GA) ₈ C (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	16	3	0
ISSR812PL	ISSR812 P-Loop	(GA) ₈ A (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	18	3	0
ISSR813PL	ISSR813 P-Loop	(CA) ₈ T (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	12	1	0
ISSR815PL	ISSR815 P-Loop	(CT) ₈ G (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	13	0	0
ISSR816PL	ISSR816 P-Loop	(CA) ₈ T (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	22	0	0
ISSR817PL	ISSR817 P-Loop	(CA) ₈ A (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	18	0	0
ISSR818PL	ISSR818 P-Loop	(CA) ₈ G (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	15	1	0
ISSR819PL	ISSR819 P-Loop	(GT) ₈ A (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	12	0	0
ISSR820PL	ISSR820 P-Loop	(GT) ₈ C (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	18	1	0
ISSR821PL	ISSR821 P-Loop	(GT) ₈ T (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	23	3	0

ตารางที่ 18 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (P-Loop) จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°ซ (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR825PL	ISSR825 P-Loop	(AC) ₈ T (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	11	0	0
ISSR826PL	ISSR826 P-Loop	(AC) ₈ C (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	19	1	0
ISSR827PL	ISSR827 P-Loop	(AC) ₈ G (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	150-1,500	30	4	1
ISSR828PL	ISSR828 P-Loop	(TG) ₈ A (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	21	2	0
ISSR829PL	ISSR829 P-Loop	(TG) ₈ C (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	24	0	0
ISSR830PL	ISSR830 P-Loop	(TG) ₈ G (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	23	1	0
ISSR834PL	ISSR834 P-Loop	(AG) ₈ YT (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,200	25	3	1
ISSR835PL	ISSR835 P-Loop	(AG) ₈ YC (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,200	28	3	2
ISSR836PL	ISSR836 P-Loop	(AG) ₈ YA (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	27	5	0
ISSR840PL	ISSR840 P-Loop	(GA) ₈ YT (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	22	2	0
ISSR841PL	ISSR841 P-Loop	(GA) ₈ YC (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	23	6	0
ISSR841cPL	ISSR841c P-Loop	(GA) ₈ CC (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	25	3	0
ISSR841tPL	ISSR841t P-Loop	(GA) ₈ TC (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	22	8	0
ISSR842PL	ISSR842 P-Loop	(GA) ₈ YG (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	28	1	0

ตารางที่ 18 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (P-Loop) จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR846PL	ISSR846 P-Loop	(CA) ₈ AT (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	20	2	0
ISSR847PL	ISSR847 P-Loop	(CA) ₈ RC (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	17	2	0
ISSR848PL	ISSR848 P-Loop	(CA) ₈ RG (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	20	2	0
ISSR849PL	ISSR849 P-Loop	(GT) ₈ YA (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	16	0	0
ISSR850PL	ISSR850 P-Loop	(GT) ₈ YC (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	19	0	0
ISSR851PL	ISSR851 P-Loop	(GT) ₈ YG (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	18	0	0
ISSR855PL	ISSR855 P-Loop	(AC) ₈ YT (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	13	0	0
ISSR856PL	ISSR856 P-Loop	(AC) ₈ YA (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	150-1,500	27	4	1
ISSR857PL	ISSR857 P-Loop	(AC) ₈ YG (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	27	2	0
ISSR858PL	ISSR858 P-Loop	(TG) ₈ RT (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	22	0	0
ISSR859PL	ISSR859 P-Loop	(TG) ₈ RC (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	24	1	0
ISSR860PL	ISSR860 P-Loop	(TG) ₈ RA (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	24	0	0
ISSR862PL	ISSR862 P-Loop	(AGC) ₆ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	17	0	0
ISSR864PL	ISSR864 P-Loop	(ATG) ₆ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	21	0	0

ตารางที่ 18 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (P-Loop) จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR866PL	ISSR866 P-Loop	(CTC) ₆ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	300-1,000	8	1	0
ISSR867PL	ISSR867 P-Loop	(GGC) ₆ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	11	2	0
ISSR868PL	ISSR868 P-Loop	(GAA) ₆ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	20	0	0
ISSR873PL	ISSR873 P-Loop	(GACA) ₄ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	18	2	1
ISSR876PL	ISSR876 P-Loop	(GATA) ₂ (GACA) ₂ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	13	3	0
ISSR878PL	ISSR878 P-Loop	(GGAT) ₄ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	4	0	0
ISSR880PL	ISSR880 P-Loop	(GGAGA) ₃ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	23	2	0
ISSR881PL	ISSR881 P-Loop	(GGGT) ₃ G (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	20	1	0
ISSR884PL	ISSR884 P-Loop	HBH (AG) ₇ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	25	3	0
ISSR885PL	ISSR885 P-Loop	BHB (GA) ₇ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	17	0	0
ISSR886PL	ISSR886 P-Loop	VDV (CT) ₇ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	14	0	0
ISSR888PL	ISSR888 P-Loop	BDB (CA) ₇ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	25	3	0
ISSR889PL	ISSR889 P-Loop	DBD (AC) ₇ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	26	1	0
ISSR890PL	ISSR890 P-Loop	VHV (GT) ₇ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	21	1	0

ตารางที่ 18 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (P-Loop) จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR891PL	ISSR891 P-Loop	HVH (TG) ₇ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	26	0	0
ISSR900PL	ISSR900 P-Loop	ACTTCCC(CA) ₂ GGTTAA(CA) ₂ (GGI) ₂ GTIGGIAAIACIAC	200-1,500	15	1	0
ผลรวม				1,155	94	6
ค่าเฉลี่ย				19.9	1.6	0.1

¹ B = C, G, T; D = A, G, T; H = A, C, T; I = inosine; N = A, G, C, T; R = พิวรีน (A, G); V = A, C, G; Y = ไพริมิดีน (C, T)

² NB = จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่นับได้ในสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of scorable bands)

³ NPB = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of polymorphic bands between resistant and susceptible parents)

⁴ I-R linked = จำนวนตำแหน่งของเครื่องหมาย ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง

⁵ PL = ไพรเมอร์ P-Loop

ตารางที่ 19 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (RLK for) จำนวน 59 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3') ¹	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB ²	NPB ³	-R linked ⁴
ISSR807R ⁵	ISSR807 RLK for	(AG) ₈ T GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,500	26	1	0
ISSR808R	ISSR808 RLK for	(AG) ₈ C GAYGTNAARCCIGARAA	150-2,072	24	1	0
ISSR810R	ISSR810 RLK for	(GA) ₈ T GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,500	24	3	0
ISSR811R	ISSR811 RLK for	(GA) ₈ C GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,000	25	1	0
ISSR812R	ISSR812 RLK for	(GA) ₈ A GAYGTNAARCCIGARAA	150-1,500	27	6	0
ISSR813R	ISSR813 RLK for	(CA) ₈ T GAYGTNAARCCIGARAA	150-2,072	31	3	0
ISSR814R	ISSR814 RLK for	(CA) ₈ A GAYGTNAARCCIGARAA	150-1,500	25	3	0
ISSR815R	ISSR815 RLK for	(CT) ₈ G GAYGTNAARCCIGARAA	150-2,072	27	4	0
ISSR816R	ISSR816 RLK for	(CA) ₈ T GAYGTNAARCCIGARAA	200-2,072	18	0	0
ISSR817R	ISSR817 RLK for	(CA) ₈ A GAYGTNAARCCIGARAA	100-2,072	32	2	0
ISSR818R	ISSR818 RLK for	(CA) ₈ G GAYGTNAARCCIGARAA	200-2,072	27	1	0
ISSR819R	ISSR819 RLK for	(GT) ₈ A GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,500	19	5	0
ISSR820R	ISSR820 RLK for	(GT) ₈ C GAYGTNAARCCIGARAA	150-1,500	22	1	0
ISSR823R	ISSR823 RLK for	(TC) ₈ C GAYGTNAARCCIGARAA	150-1,500	34	2	0

ตารางที่ 19 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (RLK for) จำนวน 59 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°ซ (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR825R	ISSR825 RLK for	(AC) ₈ T GAYGTNAARCCIGARAA	150-2,072	34	2	0
ISSR826R	ISSR826 RLK for	(AC) ₈ C GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,500	28	2	0
ISSR827R	ISSR827 RLK for	(AC) ₈ G GAYGTNAARCCIGARAA	150-2,072	38	3	2
ISSR828R	ISSR828 RLK for	(TG) ₈ A GAYGTNAARCCIGARAA	150-2,072	18	3	1
ISSR829R	ISSR829 RLK for	(TG) ₈ C GAYGTNAARCCIGARAA	200-2,072	31	7	1
ISSR830R	ISSR830 RLK for	(TG) ₈ G GAYGTNAARCCIGARAA	100-2,072	38	3	0
ISSR834R	ISSR834 RLK for	(AG) ₈ YT GAYGTNAARCCIGARAA	150-1,500	26	7	0
ISSR835R	ISSR835 RLK for	(AG) ₈ YC GAYGTNAARCCIGARAA	150-1,500	34	5	3
ISSR836R	ISSR836 RLK for	(AG) ₈ YA GAYGTNAARCCIGARAA	150-2,072	35	0	0
ISSR840R	ISSR840 RLK for	(GA) ₈ YT GAYGTNAARCCIGARAA	150-1,500	36	11	2
ISSR841R	ISSR841 RLK for	(GA) ₈ YC GAYGTNAARCCIGARAA	150-2,072	37	6	1
ISSR841cR	ISSR841c RLK for	(GA) ₈ CC GAYGTNAARCCIGARAA	150-1,500	32	4	0
ISSR841tR	ISSR841t RLK for	(GA) ₈ TC GAYGTNAARCCIGARAA	150-1,500	40	4	0
ISSR842R	ISSR842 RLK for	(GA) ₈ YG GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,500	25	5	0

ตารางที่ 19 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (RLK for) จำนวน 59 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR844R	ISSR844 RLK for	(CT) ₈ RC GAYGTNAARCCIGARAA	200-2,072	36	1	0
ISSR846R	ISSR846 RLK for	(CA) ₈ AT GAYGTNAARCCIGARAA	150-2,072	29	4	0
ISSR847R	ISSR847 RLK for	(CA) ₈ RC GAYGTNAARCCIGARAA	150-2,072	29	6	0
ISSR848R	ISSR848 RLK for	(CA) ₈ RG GAYGTNAARCCIGARAA	200-2,072	28	0	0
ISSR849R	ISSR849 RLK for	(GT) ₈ YA GAYGTNAARCCIGARAA	150-2,072	33	5	0
ISSR850R	ISSR850 RLK for	(GT) ₈ YC GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,500	20	10	0
ISSR851R	ISSR851 RLK for	(GT) ₈ YG GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,000	14	2	0
ISSR853R	ISSR853 RLK for	(TC) ₈ RT GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,500	20	6	0
ISSR855R	ISSR855 RLK for	(AC) ₈ YT GAYGTNAARCCIGARAA	200-2,072	32	3	0
ISSR856R	ISSR856 RLK for	(AC) ₈ YA GAYGTNAARCCIGARAA	150-1,500	24	2	0
ISSR857R	ISSR857 RLK for	(AC) ₈ YG GAYGTNAARCCIGARAA	150-2,072	36	3	3
ISSR858R	ISSR858 RLK for	(TG) ₈ RT GAYGTNAARCCIGARAA	150-2,072	36	3	0
ISSR859R	ISSR859 RLK for	(TG) ₈ RC GAYGTNAARCCIGARAA	150-2,072	29	2	0
ISSR860R	ISSR860 RLK for	(TG) ₈ RA GAYGTNAARCCIGARAA	150-2,072	34	2	0

ตารางที่ 19 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทาน และประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้ง เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (RLK for) จำนวน 59 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR864R	ISSR864 RLK for	(ATG) ₆ GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,500	31	2	0
ISSR866R	ISSR866 RLK for	(CTC) ₆ GAYGTNAARCCIGARAA	150-2,072	26	2	0
ISSR868R	ISSR868 RLK for	(GAA) ₆ GAYGTNAARCCIGARAA	150-2,072	38	2	0
ISSR873R	ISSR873 RLK for	(GACA) ₄ GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	36	2	0
ISSR876R	ISSR876 RLK for	(GATA) ₂ (GACA) ₂ GAYGTNAARCCIGARAA	150-1,500	31	8	0
ISSR878R	ISSR878 RLK for	(GGAT) ₄ GAYGTNAARCCIGARAA	150-2,072	31	3	0
ISSR880R	ISSR880 RLK for	(GGAGA) ₃ GAYGTNAARCCIGARAA	200-2,072	30	6	0
ISSR881R	ISSR881 RLK for	(GGGT) ₃ G GAYGTNAARCCIGARAA	150-2,072	39	3	0
ISSR884R	ISSR884 RLK for	HBH (AG) ₇ GAYGTNAARCCIGARAA	200-2,072	30	3	0
ISSR885R	ISSR885 RLK for	BHB (GA) ₇ GAYGTNAARCCIGARAA	100-2,072	39	2	0
ISSR886R	ISSR886 RLK for	VDV (CT) ₇ GAYGTNAARCCIGARAA	100-2,072	38	0	0
ISSR887R	ISSR887 RLK for	DVD (TC) ₇ GAYGTNAARCCIGARAA	100-2,072	37	1	0
ISSR888R	ISSR888 RLK for	BDB (CA) ₇ GAYGTNAARCCIGARAA	100-1,500	33	1	0
ISSR889R	ISSR889 RLK for	DBD (AC) ₇ GAYGTNAARCCIGARAA	200-2,072	29	2	0

ตารางที่ 19 ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4785; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคราแป้งเมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (RLK for) จำนวน 59 คู่ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ไพรเมอร์ที่ใช้ ออกแบบ	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบ ดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB	I-R linked
ISSR890R	ISSR890 RLK for	VHV (GT) ₇ GAYGTNAARCCIGARAA	200-2,072	28	3	0
ISSR891R	ISSR891 RLK for	HVH (TG) ₇ GAYGTNAARCCIGARAA	150-2,072	30	1	0
ISSR900R	ISSR900 RLK for	ACTTCCC(CA) ₂ GGTTAA(CA) ₂ GAYGTNAARCCIGARAA	200-1,500	27	3	0
ผลรวม				1,766	188	13
เฉลี่ย				29.9	3.2	0.2

¹ B = C, G, T; D = A, G, T; H = A, C, T; I = inosine; N = A, G, C, T; R = พิวรีน (A, G); V = A, C, G; Y = ไพริมิดีน (C, T)

² NB = จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่นับได้ในสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of scorable bands)

³ NPB = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of polymorphic bands between resistant and susceptible parents)

⁴ I-R linked = จำนวนตำแหน่งของเครื่องหมาย ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง

⁵ R = ไพรเมอร์ RLK for

ตารางที่ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR-RGA และลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 จำนวน 37 เครื่องหมาย

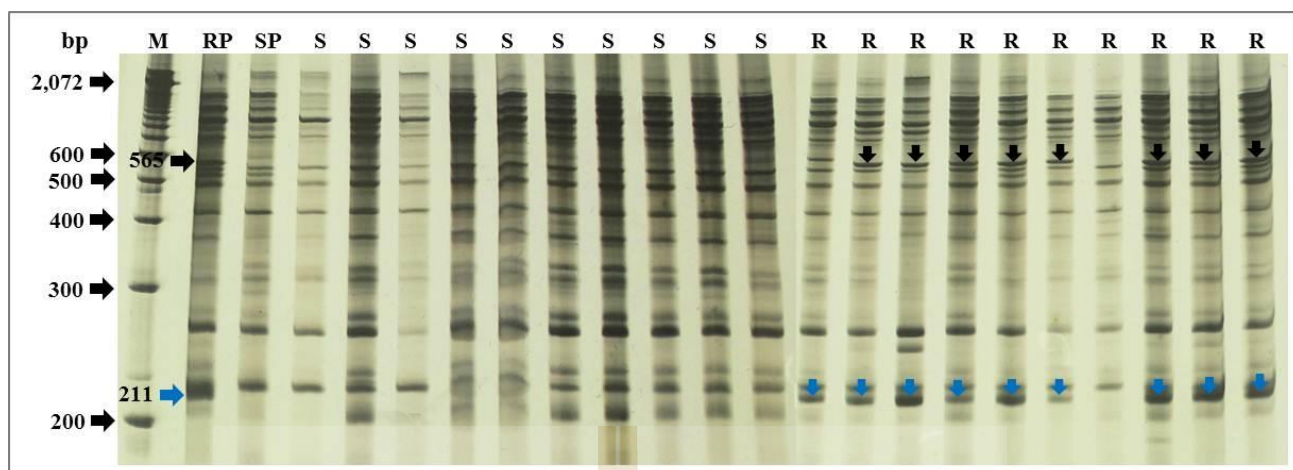
เครื่องหมาย	จำนวนต้น	Beta	t-value	P-value	R ²	ระยะห่าง (cM)	LOD
I07G181	20	0.206	0.895	0.383	0.043	60	0.175
I07G275	20	-0.447	-2.120	0.048	0.200	35	0.397
I11G430	20	-0.505	-2.482	0.023	0.255	25	1.136
I27G229	20	-0.007	-0.031	0.976	0.000	50	0.000
I40G251	20	0.347	1.572	0.133	0.121	40	0.175
I41G338	20	-0.368	-1.678	0.111	0.135	35	0.397
I49G428	20	-0.543	-2.744	0.013	0.295	25	1.136
I56G222	20	0.352	1.596	0.128	0.124	35	0.397
I66G226	20	0.347	1.572	0.133	0.121	40	0.175
I84G206	20	-0.332	-1.492	0.153	0.110	40	0.175
I89G175	20	-0.341	-1.538	0.141	0.116	35	0.397
I89G1420	20	-0.053	-0.225	0.824	0.003	50	0.000
I91G647	20	-0.411	-1.911	0.072	0.169	30	0.715
I00G353	20	-0.427	-2.001	0.061	0.182	30	0.715
I10P321	20	-0.692	-4.070	0.001	0.479	15	2.349
I42P319	19	-0.412	-1.866	0.079	0.170	26	0.964
I51P263	20	-0.050	-0.212	0.834	0.002	45	0.044
I60P260	19	-0.400	-1.798	0.090	0.160	26	0.964
I27PL600	20	-0.478	-2.309	0.033	0.229	25	1.136
I34PL210	20	-0.492	-2.400	0.027	0.242	25	1.136
I35PL200	20	-0.543	-2.744	0.013	0.295	25	1.136
I35PL461	20	-0.527	-2.629	0.017	0.277	25	1.136
I56PL166	20	-0.507	-2.494	0.023	0.257	25	1.136
I73PL414	20	-0.283	-1.250	0.227	0.080	45	0.044
I27R211	19	-0.850	-6.664	0.000	0.723	5	4.018
I27R565	20	-0.748	-4.786	0.000	0.560	10	3.197

ตารางที่ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR-RGA และลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 จำนวน 37 เครื่องหมาย (ต่อ)

เครื่องหมาย	จำนวนต้น	Beta	t-value	P-value	R ²	ระยะห่าง (cM)	LOD
I28R306	20	-0.107	-0.459	0.652	0.012	40	0.175
I29R240	20	-0.215	-0.934	0.362	0.046	45	0.044
I35R305	20	-0.429	-2.013	0.059	0.184	25	1.136
I35R311	20	0.258	1.132	0.272	0.067	40	0.175
I35R349	20	0.451	2.146	0.046	0.204	30	0.715
I40R206	19	-0.519	-2.506	0.023	0.270	21	1.473
I40R337	19	0.457	2.116	0.049	0.208	32	0.573
I41R457	20	0.076	0.324	0.750	0.006	55	0.044
I57R174	20	0.609	3.261	0.004	0.371	25	1.136
I57R569	20	0.348	1.572	0.133	0.121	40	0.175
I57R865	20	0.031	0.133	0.896	0.001	50	0.000

ตารางที่ 21 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR และ ISSR-RGA ต่อลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 จำนวน 4 เครื่องหมาย

เครื่องหมาย	จำนวนต้น	Beta	t-value	P-value	R ²	ระยะห่าง (cM)	LOD
I27565	80	-0.397	-3.817	0.000	0.157	36	1.331
I10P321	77	-0.437	-4.207	0.000	0.191	35	1.515
I27R211	80	-0.397	-3.817	0.000	0.157	36	1.331
I27R565	80	-0.548	-5.784	0.000	0.300	26	4.082



ภาพที่ 5 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอในถั่วเขียวพันธุ์ต้านทาน V4785 (RP) พันธุ์อ่อนแอ CN72 (SP) ลูกผสมที่อ่อนแอ (S) และลูกผสมที่ต้านทาน (R) ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ISSR827 ร่วมกับ RLK for; M = 100 bp DNA ladder



และจากการประเมินความเหมาะสมในการนำไพรเมอร์ RGA มาใช้ร่วมกับไพรเมอร์ ISSR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหัวเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 เพื่อหาเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้ง ซึ่งใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 63 ไพรเมอร์ ร่วมกับไพรเมอร์ RGA จำนวน 6 ไพรเมอร์ (GLPLAL 1, Pto kin 1, P-Loop, PMR1R, PMR5R และ RLK for) รวมทั้งหมด 338 คู่ไพรเมอร์ โดยการเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้ระหว่างไพรเมอร์ ISSR กับ ISSR-RGA พบว่ามีไพรเมอร์ ISSR-RGA จำนวน 11 คู่ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอแถบใหม่ (ไม่พบในไพรเมอร์ ISSR) ที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานกับประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอกับประชากรรวมอ่อนแอ (I-R linked) รวมทั้งหมด 11 แถบ ซึ่งกำหนดให้แต่ละแถบคือแต่ละเครื่องหมาย (ตารางที่ 22-27) โดยพบว่าเครื่องหมาย ISSR-RGA ทั้ง 11 เครื่องหมายนี้เป็นเครื่องหมายใหม่ คิดเป็น 100% ส่วนคู่ผสม CN72 x V4785 ใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 63 ไพรเมอร์ ร่วมกับไพรเมอร์ RGA จำนวน 4 ไพรเมอร์ (GLPLAL 1, Pto kin 1, P-Loop และ RLK for) รวมทั้งหมด 241 คู่ไพรเมอร์ โดยการเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้ระหว่างไพรเมอร์ ISSR กับ ISSR-RGA พบว่ามีไพรเมอร์ ISSR-RGA จำนวน 28 คู่ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอแถบใหม่ (ไม่พบในไพรเมอร์ ISSR) ที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานกับประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอกับประชากรรวมอ่อนแอ (I-R linked) อยู่ระหว่าง 1-3 แถบ รวมทั้งหมด 36 แถบ โดยไพรเมอร์ ISSR835 ร่วมกับ RLK for และ ISSR857 ร่วมกับ RLK for ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด จำนวน 3 แถบ ซึ่งกำหนดให้แต่ละแถบคือแต่ละเครื่องหมาย (ตารางที่ 28-31) โดยพบว่าเครื่องหมาย ISSR-RGA ทั้ง 36 เครื่องหมายนี้เป็นเครื่องหมายใหม่ คิดเป็น 97.3% จากทั้งหมด 37 เครื่องหมาย แสดงว่าการนำไพรเมอร์ RGA มาใช้ร่วมกับไพรเมอร์ ISSR เป็นประโยชน์และมีประสิทธิภาพสูง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Smolik (2012) ซึ่งสร้างเครื่องหมายโมเลกุลชนิดใหม่ R-ISSR ที่เกิดจากไพรเมอร์ RAPD กับ ISSR เพื่อใช้ในการหาดำแหน่ง QTL ที่สัมพันธ์กับความทนทานต่อการขาดธาตุอาหารในสภาพเครียดของข้าวไรน์ โดยพบว่าเครื่องหมาย R-ISSR จำนวน 28 คู่ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอแถบใหม่ จำนวน 114 แถบจาก 207 แถบ และในทำนองเดียวกัน Patil et al. (2014) พบว่าการใช้เครื่องหมาย AFLP ร่วมกับ RGA ทำให้มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างจีโนไทป์ของถั่วแระ (pigeon pea) สูงถึง 90.7% ซึ่งเป็นประโยชน์ในการเลือกจีโนไทป์ที่เหมาะสมสำหรับเป็นพ่อแม่พันธุ์ที่ต้านทานโรคเหี่ยว (Fusarium wilt) และ sterility mosaic

ตารางที่ 22 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (GLPLAL 1) จำนวน 56 คู่ไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I ¹	I-R ²	I-R new ³	I-R linked ⁴
ISSR809G	250-1,500	16	17	1	0
ISSR811G	200-1,200	19	15	2	0
ISSR812G	200-1,200	26	23	4	0
ISSR813G	250-1,500	11	10	1	0
ISSR814G	200-1,500	13	13	0	0
ISSR815G	250-1,500	11	11	0	0
ISSR816G	200-1,500	21	21	4	0
ISSR817G	300-1,500	20	14	0	0
ISSR818G	250-1,200	19	10	1	0
ISSR819G	200-1,200	20	20	0	0
ISSR820G	200-1,200	15	15	0	0
ISSR821G	250-1,200	15	14	2	0
ISSR823G	300-1,200	13	10	0	0
ISSR825G	200-1,500	23	25	2	0
ISSR826G	200-1,500	18	18	0	0
ISSR827G	200-1,500	21	21	3	0
ISSR828G	200-1,500	23	16	0	0
ISSR829G	200-1,500	18	19	1	0
ISSR830G	200-1,500	23	24	1	0
ISSR834G	200-1,500	24	22	0	0
ISSR835G	200-1,200	20	19	0	0
ISSR836G	200-1,500	20	23	1	0
ISSR840G	250-1,500	25	19	0	0
ISSR841G	200-1,200	27	25	0	0
ISSR841cG	200-1,500	24	24	0	0
ISSR841tG	250-1,500	18	19	3	0
ISSR842G	300-1,200	26	20	0	0
ISSR844G	200-1,000	11	12	3	0
ISSR846G	200-1,500	24	12	0	0
ISSR847G	200-1,500	18	17	0	0
ISSR848G	300-1,500	19	15	0	0
ISSR849G	200-1,500	18	22	4	0

ตารางที่ 22 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (GLPLAL 1) จำนวน 56 คู่ไพรเมอร์ (ต่อ)

ไพรเมอร์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I ¹	I-R ²	I-R new ³	I-R linked ⁴
ISSR850G	200-1,200	21	20	0	0
ISSR856G	250-1,500	17	17	0	0
ISSR857G	200-1,000	26	21	0	0
ISSR858G	200-1,500	22	22	0	0
ISSR859G	200-1,500	24	24	0	0
ISSR860G	250-1,500	26	17	0	0
ISSR862G	200-1,000	13	13	0	0
ISSR864G	200-2,072	18	22	4	0
ISSR866G	250-1,500	16	19	3	0
ISSR867G	200-1,500	16	15	0	0
ISSR868G	200-1,100	28	23	0	0
ISSR873G	200-1,100	25	18	0	0
ISSR876G	200-1,200	19	19	0	0
ISSR878G	300-1,500	20	16	0	0
ISSR880G	200-1,200	27	28	1	0
ISSR881G	200-1,200	25	25	0	0
ISSR884G	200-1,500	25	21	0	0
ISSR885G	250-1,500	20	20	0	0
ISSR886G	200-1,000	18	21	3	0
ISSR888G	200-1,200	28	22	0	0
ISSR889G	200-1,500	29	26	0	0
ISSR890G	200-1,500	25	23	0	0
ISSR891G	200-1,500	26	25	0	0
ISSR900G	300-1,000	14	19	5	0

¹ จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR; ² จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่เหมือนกับไพรเมอร์ ISSR; ³ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA, ⁴ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว, ⁵ G = ไพรเมอร์ GLPLAL 1

ตารางที่ 23 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (Pto kin 1) จำนวน 53 คู่ไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I ¹	I-R ²	I-R new ³	I-R linked ⁴
ISSR807P	300-1,500	22	10	0	0
ISSR809P	250-1,500	16	15	1	0
ISSR810P	200-1,500	26	15	0	0
ISSR811P	200-1,200	19	13	1	0
ISSR812P	200-1,200	26	18	0	0
ISSR813P	250-1,500	11	11	2	0
ISSR815P	250-1,500	11	8	2	0
ISSR816P	200-1,500	21	13	0	0
ISSR817P	300-1,500	20	10	1	0
ISSR818P	250-1,200	19	11	2	1
ISSR819P	200-1,200	20	14	1	0
ISSR820P	200-1,200	15	11	1	0
ISSR825P	200-1,500	23	13	1	0
ISSR826P	200-1,500	18	16	3	0
ISSR827P	200-1,500	21	12	1	1
ISSR829P	200-1,500	18	15	1	0
ISSR830P	200-1,500	23	14	0	0
ISSR834P	200-1,500	24	10	0	0
ISSR835P	200-1,200	20	14	0	0
ISSR836P	200-1,500	20	13	0	0
ISSR840P	250-1,500	25	18	0	0
ISSR841P	200-1,200	27	19	1	1
ISSR841cP	200-1,500	24	21	0	0
ISSR841tP	250-1,500	18	13	2	1
ISSR842P	300-1,200	26	13	0	0
ISSR844P	200-1,000	11	11	1	0
ISSR846P	200-1,500	24	17	0	0
ISSR847P	200-1,500	18	14	0	0
ISSR848P	300-1,500	19	9	1	0
ISSR850P	200-1,200	21	11	0	0
ISSR851P	200-1,500	21	15	0	0
ISSR853P	250-1,500	18	13	0	0
ISSR855P	250-1,200	20	18	2	0

ตารางที่ 23 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (Pto kin 1) จำนวน 53 คู่ไพรเมอร์ (ต่อ)

ไพรเมอร์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I ¹	I-R ²	I-R new ³	I-R linked ⁴
ISSR856P	250-1,500	17	13	0	0
ISSR857P	200-1,000	26	17	0	0
ISSR858P	200-1,500	22	17	1	0
ISSR859P	200-1,500	24	13	0	0
ISSR860P	250-1,500	26	15	0	0
ISSR862P	200-1,000	13	11	1	0
ISSR864P	200-2,072	18	16	0	0
ISSR866P	250-1,500	16	9	0	0
ISSR867P	200-1,500	16	11	0	0
ISSR868P	200-1,100	28	15	0	0
ISSR878P	300-1,500	20	7	0	0
ISSR880P	200-1,200	27	16	0	0
ISSR881P	200-1,200	25	18	0	0
ISSR884P	200-1,500	25	18	2	0
ISSR885P	250-1,500	20	17	0	0
ISSR886P	200-1,000	18	20	2	0
ISSR887P	200-1,200	23	18	2	0
ISSR888P	200-1,200	28	17	0	0
ISSR889P	200-1,500	29	17	0	0
ISSR890P	200-1,500	25	18	1	0

¹ จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR; ² จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่เหมือนกับไพรเมอร์ ISSR; ³ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA, ⁴ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว, ⁵ P = ไพรเมอร์ Pto kin 1

ตารางที่ 24 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (P-Loop) จำนวน 60 คู่ไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I ¹	I-R ²	I-R new ³	I-R linked ⁴
ISSR807PL ⁵	300-1,500	22	13	0	0
ISSR808PL	250-1,500	25	18	0	0
ISSR809PL	250-1,500	16	17	1	0
ISSR810PL	200-1,500	26	23	0	0
ISSR811PL	200-1,200	19	19	0	0
ISSR812PL	200-1,200	26	19	0	0
ISSR814PL	200-1,500	13	17	4	0
ISSR815PL	250-1,500	11	12	1	1
ISSR816PL	200-1,500	21	18	0	0
ISSR817PL	300-1,500	20	18	0	0
ISSR818PL	250-1,200	19	17	0	0
ISSR819PL	200-1,200	20	16	0	0
ISSR820PL	200-1,200	15	17	2	0
ISSR821PL	250-1,200	15	16	1	0
ISSR823PL	300-1,200	13	12	0	0
ISSR825PL	200-1,500	23	19	0	0
ISSR826PL	200-1,500	18	20	2	1
ISSR827PL	200-1,500	21	23	2	0
ISSR828PL	200-1,500	23	22	0	0
ISSR829PL	200-1,500	18	20	2	0
ISSR830PL	200-1,500	23	29	6	0
ISSR834PL	200-1,500	24	25	1	0
ISSR835PL	200-1,200	20	25	5	0
ISSR836PL	200-1,500	20	22	2	0
ISSR840PL	250-1,500	25	19	0	0
ISSR841PL	200-1,200	27	26	0	0
ISSR841cPL	200-1,500	24	21	0	0
ISSR841tPL	250-1,500	18	25	7	0
ISSR842PL	300-1,200	26	15	0	0
ISSR844PL	200-1,000	11	14	3	0
ISSR846PL	200-1,500	24	20	0	0
ISSR847PL	200-1,500	18	24	6	0

ตารางที่ 24 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (P-Loop) จำนวน 60 คู่ไพรเมอร์ (ต่อ)

ไพรเมอร์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I	I-R	I-R new	I-R linked
ISSR-RGA					
ISSR848PL	300-1,500	19	14	0	0
ISSR849PL	200-1,500	18	17	1	1
ISSR850PL	200-1,200	21	21	0	0
ISSR851PL	200-1,500	21	23	2	0
ISSR855PL	250-1,200	20	19	0	0
ISSR856PL	250-1,500	17	18	1	0
ISSR857PL	200-1,000	26	22	0	0
ISSR858PL	200-1,500	22	25	3	0
ISSR859PL	200-1,500	24	24	0	0
ISSR860PL	250-1,500	26	13	0	0
ISSR862PL	200-1,000	13	15	2	0
ISSR864PL	200-2,072	18	19	1	0
ISSR866PL	250-1,500	16	10	0	0
ISSR867PL	200-1,500	16	22	6	0
ISSR868PL	200-1,100	28	21	0	0
ISSR873PL	200-1,100	25	19	0	0
ISSR878PL	300-1,500	20	8	0	0
ISSR880PL	200-1,200	27	14	2	2
ISSR881PL	200-1,200	25	17	0	0
ISSR884PL	200-1,500	25	21	0	0
ISSR885PL	250-1,500	20	24	4	0
ISSR886PL	200-1,000	18	21	1	1
ISSR887PL	200-1,200	23	27	4	0
ISSR888PL	200-1,200	28	21	0	0
ISSR889PL	200-1,500	29	27	0	0
ISSR890PL	200-1,500	25	30	5	0
ISSR891PL	200-1,500	26	28	2	0
ISSR900PL	300-1,000	14	11	0	0

¹ จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR; ² จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่เหมือนกับไพรเมอร์ ISSR; ³ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA; ⁴ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว; ⁵ PL = ไพรเมอร์ P-Loop

ตารางที่ 25 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (PMR1R) จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์

ไพรเมอร์ ISSR-RGA	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I ¹	I-R ²	I-R new ³	I-R linked ⁴
ISSR807PMR1R ⁵	300-1,500	22	20	4	0
ISSR808PMR1R	250-1,500	25	16	0	0
ISSR809PMR1R	250-1,500	16	23	7	0
ISSR810PMR1R	200-1,500	26	21	0	0
ISSR811PMR1R	200-1,200	19	25	6	0
ISSR812PMR1R	200-1,200	26	29	3	0
ISSR813PMR1R	250-1,500	11	18	7	0
ISSR814PMR1R	200-1,500	13	16	3	0
ISSR815PMR1R	250-1,500	11	17	6	0
ISSR816PMR1R	200-1,500	21	16	0	0
ISSR817PMR1R	300-1,500	20	13	0	0
ISSR818PMR1R	250-1,200	19	20	1	0
ISSR819PMR1R	200-1,200	20	13	3	0
ISSR820PMR1R	200-1,200	15	22	7	0
ISSR821PMR1R	250-1,200	15	17	7	0
ISSR825PMR1R	200-1,500	23	24	1	0
ISSR826PMR1R	200-1,500	18	20	6	0
ISSR827PMR1R	200-1,500	21	22	1	0
ISSR828PMR1R	200-1,500	23	16	0	0
ISSR829PMR1R	200-1,500	18	21	3	0
ISSR830PMR1R	200-1,500	23	16	0	0
ISSR834PMR1R	200-1,500	24	23	0	0
ISSR835PMR1R	200-1,200	20	10	0	0
ISSR836PMR1R	200-1,500	20	23	3	0
ISSR840PMR1R	250-1,500	25	15	0	0
ISSR841PMR1R	200-1,200	27	25	0	0
ISSR841cPMR1R	200-1,500	24	21	0	0
ISSR841tPMR1R	250-1,500	18	22	4	0
ISSR842PMR1R	300-1,200	26	14	0	0
ISSR844PMR1R	200-1,000	11	19	8	0
ISSR846PMR1R	200-1,500	24	12	0	0
ISSR847PMR1R	200-1,500	18	21	3	0
ISSR848PMR1R	300-1,500	19	17	0	0

ตารางที่ 25 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (PMR1R) จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์ (ต่อ)

ไพรเมอร์ ISSR-RGA	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I ¹	I-R ²	I-R new ³	I-R linked ⁴
ISSR849PMR1R	200-1,500	18	19	1	0
ISSR850PMR1R	200-1,200	21	22	1	0
ISSR851PMR1R	200-1,500	21	21	0	0
ISSR853PMR1R	250-1,500	18	7	0	0
ISSR855PMR1R	250-1,200	20	17	0	0
ISSR856PMR1R	250-1,500	17	15	0	0
ISSR857PMR1R	200-1,000	26	20	1	0
ISSR858PMR1R	200-1,500	22	25	3	0
ISSR859PMR1R	200-1,500	24	16	0	0
ISSR860PMR1R	250-1,500	26	19	0	0
ISSR862PMR1R	200-1,000	13	18	5	0
ISSR864PMR1R	200-2,072	18	27	9	0
ISSR866PMR1R	250-1,500	16	14	5	0
ISSR867PMR1R	200-1,500	16	17	1	0
ISSR868PMR1R	200-1,100	28	23	0	0
ISSR880PMR1R	200-1,200	27	25	0	0
ISSR881PMR1R	200-1,200	25	20	0	0
ISSR884PMR1R	200-1,500	25	27	2	1
ISSR885PMR1R	250-1,500	20	25	5	0
ISSR886PMR1R	200-1,000	18	20	2	0
ISSR887PMR1R	200-1,200	23	16	0	0
ISSR888PMR1R	200-1,200	28	16	0	0
ISSR889PMR1R	200-1,500	29	20	0	0
ISSR890PMR1R	200-1,500	25	24	1	1
ISSR891PMR1R	200-1,500	26	25	0	0

¹ จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR; ² จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่เหมือนกับไพรเมอร์ ISSR; ³ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA, ⁴ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว, ⁵ PMR1R = ไพรเมอร์ PMR1R

ตารางที่ 26 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (PMR5R) จำนวน 56 คู่ไพรเมอร์

ไพรเมอร์ ISSR-RGA	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I ¹	I-R ²	I-R new ³	I-R linked ⁴
ISSR808PMR5R ⁵	250-1,500	25	15	0	0
ISSR809PMR5R	250-1,500	16	19	3	0
ISSR810PMR5R	200-1,500	26	19	2	0
ISSR811PMR5R	200-1,200	19	15	0	0
ISSR812PMR5R	200-1,200	26	24	0	0
ISSR813PMR5R	250-1,500	11	10	1	0
ISSR814PMR5R	200-1,500	13	15	2	0
ISSR815PMR5R	250-1,500	11	11	4	0
ISSR816PMR5R	200-1,500	21	18	0	0
ISSR817PMR5R	300-1,500	20	16	0	0
ISSR819PMR5R	200-1,200	20	19	2	0
ISSR820PMR5R	200-1,200	15	20	5	0
ISSR821PMR5R	250-1,200	15	14	3	0
ISSR823PMR5R	300-1,200	13	11	2	0
ISSR825PMR5R	200-1,500	23	18	2	0
ISSR826PMR5R	200-1,500	18	17	2	0
ISSR827PMR5R	200-1,500	21	22	1	0
ISSR828PMR5R	200-1,500	23	22	0	0
ISSR829PMR5R	200-1,500	18	25	7	0
ISSR830PMR5R	200-1,500	23	20	0	0
ISSR834PMR5R	200-1,500	24	28	4	0
ISSR835PMR5R	200-1,200	20	19	0	0
ISSR840PMR5R	250-1,500	25	15	2	0
ISSR841PMR5R	200-1,200	27	20	4	0
ISSR841cPMR5R	200-1,500	24	25	1	0
ISSR841tPMR5R	250-1,500	18	18	2	0
ISSR842PMR5R	300-1,200	26	22	0	0
ISSR844PMR5R	200-1,000	11	13	2	0
ISSR846PMR5R	200-1,500	24	25	1	0
ISSR847PMR5R	200-1,500	18	16	3	0
ISSR848PMR5R	300-1,500	19	14	4	0
ISSR849PMR5R	200-1,500	18	22	4	0
ISSR850PMR5R	200-1,200	21	21	0	0

ตารางที่ 26 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (PMR5R) จำนวน 56 คู่ไพรเมอร์ (ต่อ)

ไพรเมอร์ ISSR-RGA	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I ¹	I-R ²	I-R new ³	I-R linked ⁴
ISSR851PMR5R	200-1,500	21	25	4	0
ISSR853PMR5R	250-1,500	18	17	1	0
ISSR855PMR5R	250-1,200	20	19	0	0
ISSR856PMR5R	250-1,500	17	18	1	2
ISSR857PMR5R	200-1,000	26	20	3	0
ISSR858PMR5R	200-1,500	22	25	3	0
ISSR859PMR5R	200-1,500	24	16	3	0
ISSR860PMR5R	250-1,500	26	13	0	0
ISSR862PMR5R	200-1,000	13	15	4	0
ISSR864PMR5R	200-2,072	18	22	9	0
ISSR866PMR5R	250-1,500	16	11	1	0
ISSR867PMR5R	200-1,500	16	15	0	0
ISSR868PMR5R	200-1,100	28	20	2	0
ISSR878PMR5R	300-1,500	20	14	2	0
ISSR880PMR5R	200-1,200	27	18	0	0
ISSR881PMR5R	200-1,200	25	22	0	0
ISSR885PMR5R	250-1,500	20	23	3	0
ISSR886PMR5R	200-1,000	18	22	4	0
ISSR887PMR5R	200-1,200	23	20	1	0
ISSR888PMR5R	200-1,200	28	13	0	0
ISSR889PMR5R	200-1,500	29	27	0	0
ISSR890PMR5R	200-1,500	25	18	1	0
ISSR891PMR5R	200-1,500	26	13	1	0

¹ จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR; ² จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่เหมือนกับไพรเมอร์ ISSR; ³ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA, ⁴ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว, ⁵ PMR5R = ไพรเมอร์ PMR5R

ตารางที่ 27 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (RLK for) จำนวน 55 คู่ไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I ¹	I-R ²	I-R new ³	I-R linked ⁴
ISSR807R	300-1,500	22	15	1	0
ISSR808R	250-1,500	25	20	1	0
ISSR809R	250-1,500	16	19	3	0
ISSR810R	200-1,500	26	16	1	0
ISSR811R	200-1,200	19	17	0	0
ISSR812R	200-1,200	26	23	0	0
ISSR815R	250-1,500	11	11	3	0
ISSR816R	200-1,500	21	20	1	0
ISSR817R	300-1,500	20	18	1	0
ISSR819R	200-1,200	20	14	0	0
ISSR820R	200-1,200	15	20	5	0
ISSR821R	250-1,200	15	13	1	0
ISSR825R	200-1,500	23	18	0	0
ISSR826R	200-1,500	18	19	1	0
ISSR827R	200-1,500	21	14	0	0
ISSR828R	200-1,500	23	21	0	0
ISSR830R	200-1,500	23	16	0	0
ISSR834R	200-1,500	24	22	0	0
ISSR835R	200-1,200	20	20	0	0
ISSR836R	200-1,500	20	20	1	0
ISSR840R	250-1,500	25	19	0	0
ISSR841R	200-1,200	27	21	0	0
ISSR841cR	200-1,500	24	18	1	0
ISSR841tR	250-1,500	18	19	1	0
ISSR842R	300-1,200	26	19	0	0
ISSR844R	200-1,000	11	16	5	0
ISSR846R	200-1,500	24	22	0	0
ISSR847R	200-1,500	18	20	2	0
ISSR848R	300-1,500	19	16	0	0
ISSR849R	200-1,500	18	10	0	0
ISSR850R	200-1,200	21	19	0	0
ISSR851R	200-1,500	21	15	0	0
ISSR853R	250-1,500	18	13	0	0

ตารางที่ 27 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (RLK for) จำนวน 55 คู่ไพรเมอร์ (ต่อ)

ไพรเมอร์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I ¹	I-R ²	I-R new ³	I-R linked ⁴
ISSR855R	250-1,200	20	17	0	0
ISSR856R	250-1,500	17	14	0	0
ISSR857R	200-1,000	26	22	2	0
ISSR858R	200-1,500	22	23	1	0
ISSR859R	200-1,500	24	16	0	0
ISSR860R	250-1,500	26	22	0	0
ISSR862R	200-1,000	13	14	1	0
ISSR864R	200-2,072	18	16	0	0
ISSR866R	250-1,500	16	16	0	0
ISSR867R	200-1,500	16	11	0	0
ISSR868R	200-1,100	28	15	0	0
ISSR878R	300-1,500	20	13	0	0
ISSR880R	200-1,200	27	20	0	0
ISSR881R	200-1,200	25	18	2	0
ISSR884R	200-1,500	25	27	2	0
ISSR885R	250-1,500	20	22	2	0
ISSR886R	200-1,000	18	18	0	0
ISSR887R	200-1,200	23	24	1	0
ISSR888R	200-1,200	28	25	0	0
ISSR889R	200-1,500	29	17	0	0
ISSR890R	200-1,500	25	25	0	0
ISSR891R	200-1,500	26	18	1	0

¹ จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR; ² จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่เหมือนกับไพรเมอร์ ISSR; ³ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA, ⁴ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว, ⁵ R = ไพรเมอร์ RLK for

ตารางที่ 28 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (GLPLAL 1) จำนวน 61 คู่ไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I ¹	I-R ²	I-R new ³	I-R linked ⁴
ISSR807G	200-1,500	34	27	2	2
ISSR808G	200-1,500	29	24	0	0
ISSR809G	200-1,500	29	24	0	0
ISSR810G	200-1,500	22	18	0	0
ISSR811G	250-1,200	20	20	2	1
ISSR812G	200-1,500	29	29	4	0
ISSR813G	300-2,072	14	14	0	0
ISSR814G	300-1,500	12	12	0	0
ISSR815G	200-1,500	17	17	7	0
ISSR816G	200-1,500	19	19	3	0
ISSR817G	200-1,500	16	16	8	0
ISSR818G	200-1,500	22	22	11	0
ISSR819G	200-1,500	16	16	4	0
ISSR820G	200-1,500	12	12	18	0
ISSR821G	500-1,500	8	8	2	0
ISSR823G	200-1,200	13	13	9	0
ISSR825G	200-1,500	21	21	6	0
ISSR826G	200-1,500	15	15	19	0
ISSR827G	200-1,500	18	18	8	1
ISSR828G	200-1,500	14	14	6	0
ISSR829G	200-1,500	23	19	0	0
ISSR830G	200-1,500	25	25	6	0
ISSR834G	200-1,500	22	22	1	0
ISSR835G	200-1,200	25	25	2	0
ISSR836G	200-1,500	21	21	9	0
ISSR840G	200-1,500	25	25	1	1
ISSR841G	200-1,500	22	22	5	1
ISSR841cG	200-1,500	27	27	6	0
ISSR841tG	200-1,200	19	19	0	0
ISSR842G	200-1,200	24	24	0	0
ISSR844G	500-2,072	10	10	4	0
ISSR846G	200-2,072	21	19	0	0
ISSR847G	200-2,072	18	18	7	0

ตารางที่ 28 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (GLPLAL 1) จำนวน 61 คู่ไพรเมอร์ (ต่อ)

ไพรเมอร์ ISSR-RGA	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I ¹	I-R ²	I-R new ³	I-R linked ⁴
ISSR848G	200-1,500	21	21	2	0
ISSR849G	200-2,072	20	20	5	1
ISSR850G	300-2,072	14	14	14	0
ISSR851G	200-1,500	15	15	14	0
ISSR853G	300-2,072	15	15	3	0
ISSR855G	200-2,072	22	22	10	0
ISSR856G	200-1,500	18	18	1	1
ISSR857G	200-1,500	24	24	2	0
ISSR858G	200-2,072	20	20	6	0
ISSR859G	200-2,072	22	22	2	0
ISSR862G	300-1,500	11	11	9	0
ISSR864G	200-2,072	23	23	1	0
ISSR866G	200-2,072	18	18	10	1
ISSR868G	200-2,072	29	21	0	0
ISSR873G	200-2,072	17	17	3	0
ISSR876G	200-1,500	23	23	10	0
ISSR878G	200-1,500	16	16	8	0
ISSR880G	200-2,072	19	19	10	0
ISSR881G	200-2,072	10	10	0	0
ISSR884G	600-2,072	28	28	1	1
ISSR885G	200-2,072	25	25	3	0
ISSR886G	200-2,072	27	27	3	0
ISSR887G	200-2,072	21	21	12	0
ISSR888G	200-2,072	22	21	0	0
ISSR889G	200-800	29	29	2	2
ISSR890G	200-1,500	26	26	1	0
ISSR891G	200-1,500	21	21	8	1
ISSR900G	600-2,072	7	7	2	1

¹ จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR; ² จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่เหมือนกับไพรเมอร์ ISSR; ³ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA, ⁴ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว, ⁵ G = ไพรเมอร์ GLPLAL 1

ตารางที่ 29 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (Pto kin 1) จำนวน 63 คู่ไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I ¹	I-R ²	I-R new ³	I-R linked ⁴
ISSR807P	200-1,500	34	24	0	0
ISSR808P	200-1,500	29	24	0	0
ISSR809P	200-1,500	29	23	0	0
ISSR810P	200-1,500	22	22	3	1
ISSR811P	250-1,200	20	20	0	0
ISSR812P	200-1,500	29	21	0	0
ISSR813P	300-2,072	14	14	4	0
ISSR814P	300-1,500	12	12	7	0
ISSR815P	200-1,500	17	17	10	0
ISSR816P	200-1,500	19	19	4	0
ISSR817P	200-1,500	16	16	7	0
ISSR818P	200-1,500	22	22	2	0
ISSR819P	200-1,500	16	16	7	0
ISSR820P	200-1,500	12	12	14	0
ISSR821P	500-1,500	8	8	0	0
ISSR823P	200-1,200	13	13	14	0
ISSR825P	200-1,500	21	21	6	0
ISSR826P	200-1,500	15	15	17	0
ISSR827P	200-1,500	18	18	3	0
ISSR828P	200-1,500	14	14	3	0
ISSR829P	200-1,500	23	23	7	0
ISSR830P	200-1,500	25	19	0	0
ISSR834P	200-1,500	22	22	2	0
ISSR835P	200-1,200	25	24	0	0
ISSR836P	200-1,500	21	21	0	0
ISSR840P	200-1,500	25	23	0	0
ISSR841P	200-1,500	22	22	2	0
ISSR841cP	200-1,500	27	27	3	0
ISSR841tP	200-1,200	19	19	3	0
ISSR842P	200-1,200	24	24	5	1
ISSR844P	500-2,072	10	10	8	0
ISSR846P	200-2,072	21	21	1	0
ISSR847P	200-2,072	18	18	5	0

ตารางที่ 29 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (Pto kin 1) จำนวน 63 คู่ไพรเมอร์ (ต่อ)

ไพรเมอร์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I ¹	I-R ²	I-R new ³	I-R linked ⁴
ISSR848P	200-1,500	21	21	2	0
ISSR849P	200-2,072	20	18	0	0
ISSR850P	300-2,072	14	14	2	0
ISSR851P	200-1,500	15	15	8	1
ISSR853P	300-2,072	15	15	0	0
ISSR855P	200-2,072	22	22	3	0
ISSR856P	200-1,500	18	18	9	0
ISSR857P	200-1,500	24	24	7	0
ISSR858P	200-2,072	20	20	4	0
ISSR859P	200-2,072	22	22	9	0
ISSR860P	200-2,072	21	21	7	1
ISSR862P	300-1,500	11	11	8	0
ISSR864P	200-2,072	23	23	5	0
ISSR866P	200-2,072	18	18	7	0
ISSR867P	200-2,072	11	11	3	0
ISSR868P	200-2,072	29	25	0	0
ISSR873P	200-1,500	17	17	13	0
ISSR876P	200-1,500	23	23	3	0
ISSR878P	200-2,072	16	16	0	0
ISSR880P	200-2,072	19	19	8	0
ISSR881P	600-2,072	10	6	0	0
ISSR884P	200-2,072	28	28	0	0
ISSR885P	200-2,072	25	25	2	0
ISSR886P	200-2,072	27	22	0	0
ISSR887P	200-2,072	21	21	7	0
ISSR888P	200-800	22	22	0	0
ISSR889P	200-1,500	29	19	0	0
ISSR890P	200-1,500	26	26	0	0
ISSR891P	200-1,500	21	21	6	0
ISSR900P	600-2,072	7	7	0	0

¹ จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR; ² จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่เหมือนกับไพรเมอร์ ISSR; ³ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA, ⁴ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว, ⁵ P = ไพรเมอร์ Pto kin 1

ตารางที่ 30 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (P-Loop) จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I ¹	I-R ²	I-R new ³	I-R linked ⁴
ISSR807PL ⁵	200-1,500	34	28	0	0
ISSR808PL	200-1,500	29	17	0	0
ISSR809PL	200-1,500	29	22	0	0
ISSR810PL	200-1,500	22	22	0	0
ISSR811PL	250-1,200	20	16	0	0
ISSR812PL	200-1,500	29	18	0	0
ISSR813PL	300-2,072	14	12	0	0
ISSR815PL	200-1,500	17	13	0	0
ISSR816PL	200-1,500	19	19	3	0
ISSR817PL	200-1,500	16	16	2	0
ISSR818PL	200-1,500	22	15	0	0
ISSR819PL	200-1,500	16	12	0	0
ISSR820PL	200-1,500	12	12	6	0
ISSR821PL	500-1,500	8	8	2	0
ISSR825PL	200-1,500	21	11	0	0
ISSR826PL	200-1,500	15	15	4	0
ISSR827PL	200-1,500	18	18	9	1
ISSR828PL	200-1,500	14	14	7	0
ISSR829PL	200-1,500	23	23	1	0
ISSR830PL	200-1,500	25	23	0	0
ISSR834PL	200-1,500	22	22	3	1
ISSR835PL	200-1,200	25	25	3	2
ISSR836PL	200-1,500	21	21	6	0
ISSR840PL	200-1,500	25	22	0	0
ISSR841PL	200-1,500	22	22	1	0
ISSR841cPL	200-1,500	27	25	0	0
ISSR841tPL	200-1,200	19	19	3	0
ISSR842PL	200-1,200	24	24	0	0
ISSR846PL	200-2,072	21	20	0	0
ISSR847PL	200-2,072	18	17	0	0
ISSR848PL	200-1,500	21	20	0	0
ISSR849PL	200-2,072	20	16	0	0

ตารางที่ 30 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (P-Loop) จำนวน 58 คู่ไพรเมอร์ (ต่อ)

ไพรเมอร์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I	I-R	I-R new	I-R linked
ISSR-RGA					
ISSR850PL	300-2,072	14	14	1	0
ISSR851PL	200-1,500	15	15	3	0
ISSR855PL	200-2,072	22	13	0	0
ISSR856PL	200-1,500	18	18	6	1
ISSR857PL	200-1,500	24	24	3	0
ISSR858PL	200-2,072	20	20	2	0
ISSR859PL	200-2,072	22	22	2	0
ISSR860PL	200-2,072	21	21	3	0
ISSR862PL	300-1,500	11	11	3	0
ISSR864PL	200-2,072	23	21	0	0
ISSR866PL	200-2,072	18	8	0	0
ISSR867PL	200-2,072	11	11	0	0
ISSR868PL	200-2,072	29	20	0	0
ISSR873PL	200-1,500	17	17	1	1
ISSR876PL	200-1,500	23	13	0	0
ISSR878PL	200-2,072	16	4	0	0
ISSR880PL	200-2,072	19	19	4	0
ISSR881PL	600-2,072	10	10	0	0
ISSR884PL	200-2,072	28	25	0	0
ISSR885PL	200-2,072	25	17	0	0
ISSR886PL	200-2,072	27	14	0	0
ISSR888PL	200-800	22	22	0	0
ISSR889PL	200-1,500	29	26	0	0
ISSR890PL	200-1,500	26	21	0	0
ISSR891PL	200-1,500	21	21	5	0
ISSR900PL	600-2,072	7	7	0	0

¹ จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR; ² จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่เหมือนกับไพรเมอร์ ISSR; ³ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA; ⁴ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว; ⁵ PL = ไพรเมอร์ P-Loop

ตารางที่ 31 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (RLK for) จำนวน 59 คู่ไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I ¹	I-R ²	I-R new ³	I-R linked ⁴
ISSR807R	200-1,500	34	26	0	0
ISSR808R	200-1,500	29	24	0	0
ISSR810R	200-1,500	22	22	2	0
ISSR811R	200-1,200	20	20	5	0
ISSR812R	200-1,500	29	27	0	0
ISSR813R	300-2,072	14	14	13	0
ISSR814R	300-1,500	12	12	8	0
ISSR815R	200-1,500	17	17	8	0
ISSR816R	200-1,500	19	18	0	0
ISSR817R	200-1,500	16	16	6	0
ISSR818R	200-1,500	22	22	5	0
ISSR819R	200-1,500	16	16	3	0
ISSR820R	200-1,500	12	12	6	0
ISSR823R	200-1,200	13	13	15	0
ISSR825R	200-1,500	21	21	9	0
ISSR826R	200-1,500	15	15	13	0
ISSR827R	200-1,500	18	18	13	1
ISSR828R	200-1,500	14	18	4	1
ISSR829R	200-1,500	23	23	7	1
ISSR830R	200-1,500	25	25	0	0
ISSR834R	200-1,500	22	22	0	0
ISSR835R	200-1,200	25	25	3	3
ISSR836R	200-1,500	21	21	10	0
ISSR840R	200-1,500	25	25	3	2
ISSR841R	200-1,500	22	22	10	1
ISSR841cR	200-1,500	27	27	0	0
ISSR841tR	200-1,200	19	19	17	0
ISSR842R	200-1,200	24	24	1	0
ISSR844R	500-2,072	10	10	5	0
ISSR846R	200-2,072	21	21	5	0
ISSR847R	200-2,072	18	18	8	0
ISSR848R	200-1,500	21	21	0	0
ISSR849R	200-2,072	20	20	5	0

ตารางที่ 31 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA (RLK for) จำนวน 59 คู่ไพรเมอร์ (ต่อ)

ไพรเมอร์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I ¹	I-R ²	I-R new ³	I-R linked ⁴
ISSR850R	300-2,072	14	13	0	0
ISSR851R	200-1,500	15	14	0	0
ISSR853R	300-2,072	15	14	0	0
ISSR855R	200-2,072	22	22	10	0
ISSR856R	200-1,500	18	18	6	0
ISSR857R	200-1,500	24	24	7	3
ISSR858R	200-2,072	20	20	13	0
ISSR859R	200-2,072	22	22	3	0
ISSR860R	200-2,072	21	21	10	0
ISSR864R	200-2,072	23	23	8	0
ISSR866R	200-2,072	18	18	7	0
ISSR868R	200-2,072	29	29	5	0
ISSR873R	200-1,500	17	17	9	0
ISSR876R	200-1,500	23	23	4	0
ISSR878R	200-2,072	16	16	11	0
ISSR880R	200-2,072	19	19	11	0
ISSR881R	600-2,072	10	10	0	0
ISSR884R	200-2,072	28	28	2	0
ISSR885R	200-2,072	25	25	9	0
ISSR886R	200-2,072	27	27	2	0
ISSR887R	200-2,072	21	21	10	0
ISSR888R	200-800	22	22	5	0
ISSR889R	200-1,500	29	29	0	0
ISSR890R	200-1,500	26	26	0	0
ISSR891R	200-1,500	21	21	5	0
ISSR900R	600-2,072	7	7	0	0

¹ จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR; ² จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่เหมือนกับไพรเมอร์ ISSR; ³ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA, ⁴ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว, ⁵ R = ไพรเมอร์ RLK for

2.2 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่บ่งชี้ลักษณะความต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียว

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของประชากร RILs ($F_{2,9}$) ถั่วเขียว (*V. radiata* L.) คู่ผสม CN72 × V4718 โดยทดสอบด้วยวิธี BSA ซึ่งใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 68 ไพรเมอร์ เพื่อค้นหาไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันระหว่างพันธุ์พ่อ (V4718) และพันธุ์แม่ (CN72) ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคใบจุดตามลำดับ แล้วยับจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่พบในพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of scorable bands; NB) จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of polymorphic bands between resistant and susceptible parents; NPB) และจำนวนตำแหน่งของเครื่องหมาย ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคใบจุด (I linked) พบว่าไพรเมอร์ ISSR ทั้งหมด 68 ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแต่ละไพรเมอร์อยู่ที่ 50°C เมื่อนับจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดของไพรเมอร์ ISSR ทั้ง 68 ไพรเมอร์พบว่ามีความถี่ 1,344 แถบ เริ่มตั้งแต่ 11 แถบต่อไพรเมอร์ (ISSR 815, 819 และ 843) จนถึง 38 แถบต่อไพรเมอร์ (ISSR 841) เฉลี่ย 19.8 แถบต่อไพรเมอร์ และพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์พ่อแม่รวม 68 แถบ อยู่ระหว่าง 0-6 แถบต่อไพรเมอร์ เฉลี่ย 1 แถบต่อไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ ISSR 884 พบความแตกต่างมากที่สุด จำนวน 6 แถบ และพบแถบดีเอ็นเอหรือจำนวนตำแหน่งของเครื่องหมาย ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคใบจุดจำนวน 14 เครื่องหมาย จากไพรเมอร์ ISSR จำนวน 9 ไพรเมอร์ (ISSR 814, 816, 818, 827, 830, 835, 841, 884 และ 888) (ตารางที่ 32) เมื่อนำไพรเมอร์ ISSR ทั้ง 9 ไพรเมอร์จากการทดสอบด้วยวิธี BSA มาวิเคราะห์กับดีเอ็นเอรายต้นจำนวน 20 ต้น เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR กับลักษณะต้านทานโรคใบจุด โดยการวิเคราะห์สมการเส้นตรง simple linear regression เพื่อประมาณค่าความน่าจะเป็นที่เครื่องหมายโมเลกุลจะอยู่ใกล้กับยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคใบจุด และตรวจหาเครื่องหมายที่เหมาะสมที่มีค่า recombination ไม่เกิน 20% สำหรับนำไปวิเคราะห์รายต้น จำนวน 90 ต้น พบว่ามี 7 เครื่องหมาย (I14749, I16274, I18363, I41203, I88656, I88302 และ I88305) ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคใบจุด โดยเครื่องหมาย I41203 มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคใบจุดมากที่สุด ($R^2 = 0.84$; $P < 0.001$) และให้ค่า recombination 5% ส่วนเครื่องหมาย I35196 มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคใบจุดน้อยที่สุด ($R^2 = 0.18$; $P > 0.05$) (ตารางที่ 33)

ในส่วนของการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล ISSR-RGA ใช้ไพรเมอร์ RGA ที่มีความจำเพาะต่อยีนต้านทานโรค จำนวน 4 ไพรเมอร์ (GLPLAL 1, P-Loop, Pto kin 1 และ RLK for) เช่นเดียวกับคู่ผสม CN72 × V4785 และใช้หลักการทดลองในทำนองเดียวกันกับการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล ISSR ที่บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว โดยนำไพรเมอร์ ISSR จำนวน 12 ไพรเมอร์ มาใช้ร่วมกับไพรเมอร์ RGA ทั้ง 4 ไพรเมอร์ รวมทั้ง 48 คู่ไพรเมอร์ พบว่าเครื่องหมายที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคใบจุดมีจำนวน 7 เครื่องหมาย ประกอบด้วยเครื่องหมาย I08G247, I27PL177, I35P716, I35P414, I35R407, I56P166 และ I56P169 (ตารางที่ 34) เมื่อทดสอบเครื่องหมาย ISSR-RGA ทั้ง 7 เครื่องหมายนี้กับประชากรรวมต้านทานและอ่อนแอเป็นรายต้น จำนวน 20 ต้น (ตารางที่ 35) และหาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR-RGA กับลักษณะต้านทานโรคใบจุดโดยการวิเคราะห์สมการเส้นตรง และตรวจหาเครื่องหมายที่ให้ค่า recombination

ไม่เกิน 20% เพื่อนำไปวิเคราะห์รายต้น จำนวน 90 ต้น พบว่ามี 4 เครื่องหมาย (I27PL177, I35P716, I56P166 และ I56P169) ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคใบจุด $R^2 = 0.59, 0.52, 0.66$ และ 0.52 ตามลำดับ และมีค่า recombination ไม่เกิน 20%

นอกจากเครื่องหมายโมเลกุล ISSR และ ISSR-RGA ที่พัฒนาขึ้นมาใช้คัดเลือกลักษณะต้านทานโรคใบจุดในประชากรถั่วเขียวกลุ่มนี้ ยังมีเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่นที่น่าสนใจ ดังนั้นการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดใหม่ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคใบจุดเพิ่มเติมจึงมีความจำเป็น เพื่อค้นหาตำแหน่งเครื่องหมายที่ใกล้กับยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคใบจุดมากที่สุด งานวิจัยนี้จึงนำเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่มีรายงานว่าสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคใบจุด จำนวน 47 เครื่องหมายมาใช้ในการทดสอบ ซึ่งไพรเมอร์ SSR เหล่านี้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ annealing อยู่ในช่วง 42-65°C (ตารางที่ 36) จากการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุล SSR โดยใช้วิธี BSA ที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อที่ต้านทานและพันธุ์แม่ที่อ่อนแอ และระหว่างประชากรรวมที่ต้านทาน และประชากรรวมที่อ่อนแอ พบว่ามี 6 เครื่องหมาย คือ CEDAAG004, CEDC031, CEDG063, CEDG117, CEDG294 และ CEDG323 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างสม่ำเสมอจึงถูกตัดทิ้งในการศึกษาขั้นต่อไป และมีเพียง 17 เครื่องหมาย คือ CEDAAG002, CEDC050, CEDC055, CEDG002, CEDG006, CEDG008, CEDG014, CEDG024, CEDG044, CEDG051, CEDG056, CEDG070, CEDG084, CEDG154, CEDG304, VR108 และ VR393 ที่สามารถแสดงความแตกต่างในการเกิดแถบดีเอ็นเอ (polymorphic band) ระหว่างพันธุ์พ่อที่ต้านทานและพันธุ์แม่ที่อ่อนแอ แต่มีเพียง 9 เครื่องหมาย คือ CEDAAG002, CEDC050, CEDC055, CEDG008, CEDG051, CEDG070, CEDG084, VR108 และ VR393 ที่คาดว่าจะเชื่อมโยงกับความต้านทานโรคใบจุดเพราะสามารถแยกความแตกต่างระหว่างประชากรรวมที่ต้านทาน และประชากรรวมที่อ่อนแอ จึงนำทั้ง 9 เครื่องหมายไปทดสอบกับสายพันธุ์อ่อนแอและสายพันธุ์เป็นรายต้นจำนวน 20 ต้น พบว่ามี 5 เครื่องหมาย (CEDG008, CEDG051, CEDG084, VR108 และ VR393) ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคใบจุด โดยเครื่องหมาย CEDG084 มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคใบจุดมากที่สุด ($R^2 = 0.80; P < 0.001$) และให้ค่า recombination 5% (ตารางที่ 37)

ในส่วนของการสร้างแผนที่บนโครโมโซมเพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคใบจุดในประชากร จำนวน 90 ต้น โดยการใช้เครื่องหมาย ISSR, ISSR-RGA และ SSR จำนวน 7, 4 และ 5 เครื่องหมาย ตามลำดับ (ตารางที่ 38-40) ทำการตรวจสอบคุณภาพของข้อมูลจีโนไทป์ โดยตรวจสอบข้อมูลสูญหาย (missing data) ของแต่ละเครื่องหมาย พบว่าทุกเครื่องหมายมีค่าไม่เกิน 10% และเมื่อทดสอบค่าไคสแควร์กับเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้ พบว่ามีเพียง 6 เครื่องหมายที่มีการกระจายตัวในอัตราส่วน 1:1 ซึ่งเป็นค่าคาดหวังของประชากร RILs แสดงว่าเครื่องหมายเหล่านี้สามารถนำมาใช้ในการสร้างแผนที่บนโครโมโซม งานวิจัยนี้พบว่าทั้ง 6 เครื่องหมายนี้มีค่า LOD > 3.0 โดยเครื่องหมาย VR393 และ I16274 มีค่า LOD สูงสุด 8.385 และ 12.335 ตามลำดับ และอยู่ใกล้กับยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคใบจุดมากที่สุด 12 และ 6 cM ตามลำดับ สามารถอธิบายความต้านทานโรคได้ 34.0 และ 51.7% ตามลำดับ (ตารางที่ 38 และ 40) ซึ่งหากใช้ทั้งสองเครื่องหมายในการคัดเลือกจะให้ค่า recombination เพียง 1.4%

และจากการวิเคราะห์หาตำแหน่ง QTL ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคใบจุดแบบ MIM ด้วยโปรแกรม WinQTLcart 2.5 โดยวิเคราะห์จากผลของ CIM ซึ่งกำหนดค่า permutation ที่ 2,000 รอบ และค่าความเชื่อมั่นที่ 99.0% เพื่อคำนวณหา significance threshold ของค่า LOD ที่สามารถแยกตำแหน่ง major QTL ออกมาจากบริเวณอื่นๆ ได้ในประชากร $F_{2:9}$ ของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 พบว่าตำแหน่ง major QTL (*qCLSC72V18-1*) วางตัวอยู่ระหว่างเครื่องหมาย VR393 และ I16274 โดยมีค่า LOD และ phenotypic variance explained (PVE) ในปี พ.ศ. 2559 และ 2560 เท่ากับ 3.76, 75.90 และ 0.82, 44.80 ตามลำดับ (ตารางที่ 41; ภาพที่ 6)

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของความพยายามในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ประสบความสำเร็จในระยะเวลาอันสั้น โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดต่าง ๆ ช่วยในการคัดเลือก ซึ่งพบว่ามีมานานมากกว่า 10 ปี (Rivkin et al., 1999; Huang et al., 2000) ในปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ประโยชน์เพิ่มมากขึ้น เช่น sequence characterized amplified region (SCAR) (Sowmini and Jayamani, 2014; Binyamin et al., 2015), secale cereal microsatellite (SCM) (Zhuang et al., 2011), SSR (Chankaew et al., 2013) และ ISSR (Souframanien and Gopalakrishna, 2006; Bainade et al., 2014) เป็นต้น รวมทั้งได้มีการนำลำดับเบสของ RGA มาใช้ประโยชน์เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน เพื่อช่วยในการคัดเลือกพันธุ์พืชที่ต้านทานโรค (Basak et al., 2004; Mutlu et al., 2006; Kundagrami et al., 2009; Tantasawat et al., 2012; Yi et al., 2013; Patil et al., 2014; Suneeta et al., 2014; Wang et al., 2014) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นประโยชน์และแนวทางในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุดในถั่วเขียวต่อไปในอนาคต ซึ่งการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 ได้เครื่องหมาย I42PL229 และ I85420 ที่พบว่ายู่ใกล้กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งมากที่สุดจากโครงการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้ง และการรวมยีนต้านทานในถั่วเขียว ระยะที่ 1 และเครื่องหมาย VR393 และ I16274 ที่พบว่ายู่ใกล้กับลักษณะต้านทานโรคใบจุดมากที่สุดจากโครงการระยะที่ 2 นี้ ส่วนการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 และ CN72 x V4785 ได้เครื่องหมาย I41tP379 และ I27R565 ตามลำดับ จะช่วยย่นระยะเวลาและประหยัดค่าใช้จ่าย เนื่องจากการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวให้ต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุดแบบดั้งเดิมต้องใช้ระยะเวลานาน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เชื้อสาเหตุโรคราแป้งไม่สามารถเก็บรักษาในสภาพอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ จึงสามารถประเมินโรคได้เพียงปีละ 1 ครั้งในช่วงฤดูหนาวซึ่งมีการแพร่ระบาดของโรค หรือช่วงที่สภาพอากาศมีความร้อนขึ้นเพียงพอต่อการเกิดโรคเท่านั้น

ตารางที่ 32 ลำดับเบส ขนาดของแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4718; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคใบจุด เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 68 ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3') ¹	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	NB ²	NPB ³	I-linked ⁴
807	(AG) ₈ T	200-1500	28	1	0
808	(AG) ₈ C	200-1500	26	0	0
809	(AG) ₈ G	200-1500	27	2	0
810	(GA) ₈ T	200-1500	30	1	0
811	(GA) ₈ C	200-1000	22	3	0
812	(GA) ₈ A	200-1200	19	1	0
813	(CT) ₈ T	300-2072	16	1	0
814	(CT) ₈ A	200-1200	12	1	1
815	(CT) ₈ G	250-1200	11	0	0
816	(CA) ₈ T	200-1500	23	2	1
817	(CA) ₈ A	250-1500	16	1	0
818	(CA) ₈ G	200-1500	20	5	2
819	(GT) ₈ A	500-1400	11	0	0
820	(GT) ₈ C	200-2072	17	0	0
821	(GT) ₈ T	300-1500	14	1	0
823	(TC) ₈ C	250-2072	15	0	0
824	(TC) ₈ G	200-2072	13	0	0
825	(AC) ₈ T	250-1500	26	2	0
826	(AC) ₈ C	200-1200	19	0	0
827	(AC) ₈ G	200-1500	22		1
828	(TG) ₈ A	300-1200	12	1	0
829	(TG) ₈ C	300-1200	13	0	0
830	(TG) ₈ G	200-1500	27	2	1
834	(AG) ₈ YT	200-1200	24	1	0
835	(AG) ₈ YC	150-1000	27	4	2
836	(AG) ₈ YA	200-1000	23	1	0
841	(GA) ₈ YC	200-1500	38	2	1
841c	(GA) ₈ CC	200-1000	23	2	0
841t	(GA) ₈ TC	250-1200	18	0	0
842	(GA) ₈ YG	200-1300	32	0	0
843	(CT) ₈ RA	200-2072	11	1	0

ตารางที่ 32 ลำดับเบส ขนาดของแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4718; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคใบจุด เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 68 ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB ³	I linked ⁴
844	(CT) ₈ RC	300-1200	14	0	0
846	(CA) ₈ AT	200-1500	14	0	0
847	(CA) ₈ RC	300-1200	15	1	0
848	(CA) ₈ RG	400-1200	14	0	0
849	(GT) ₈ YA	150-2072	14	2	0
850	(GT) ₈ YC	250-1000	19	0	0
851	(GT) ₈ YG	200-1000	19	0	0
853	(TC) ₈ RT	200-1200	12	1	0
854	(TC) ₈ RG	200-2072	12	0	0
855	(AC) ₈ YT	350-1200	15	0	0
856	(AC) ₈ YA	250-1500	24	0	0
857	(AC) ₈ YG	200-1500	25	1	0
858	(TG) ₈ RT	200-1500	20	1	0
859	(TG) ₈ RC	200-1200	19	1	0
860	(TG) ₈ RA	200-2072	29	1	0
861	(ACC) ₆	100-2072	18	0	0
862	(AGC) ₆	150-1000	12	0	0
864	(ATG) ₆	200-1000	20	1	0
865	(CCG) ₆	200-2072	15	0	0
866	(CTC) ₆	200-1300	15	2	0
867	(GGC) ₆	100-1000	12	0	0
868	(GAA) ₆	200-1500	24	1	0
869	(GTT) ₆	200-2072	17	0	0
873	(GACA) ₄	350-1200	15	0	0
876	(GATA) ₂ (GACA) ₂	400-1200	14	2	0
878	(GGAT) ₄	300-1500	16	1	0
880	(GGAGA) ₃	200-1200	24	2	0
881	(GGGTG) ₃	200-2072	20	0	0
884	HBH (AG) ₇	200-2072	31	6	2
885	BHB (GA) ₇	200-1000	23	1	0

ตารางที่ 32 ลำดับเบส ขนาดของแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ (V4718; R) และพันธุ์แม่ (CN72; S) และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันระหว่างพันธุ์ต้านทานและประชากรรวมต้านทาน หรือระหว่างพันธุ์อ่อนแอและประชากรรวมอ่อนแอต่อโรคใบจุด เมื่อใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 68 ไพรเมอร์ ที่อุณหภูมิ annealing 50°C (ต่อ)

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	NB	NPB ³	I linked ⁴
886	VDV (CT) ₇	250-2072	25	2	0
887	DVD (TC) ₇	250-2072	26	1	0
888	BDB (CA) ₇	200-1000	23	3	3
889	DBD (AC) ₇	200-1200	16	0	0
890	VHV (GT) ₇	200-1500	29	1	0
891	HVH (TG) ₇	200-1000	24	0	0
900	ACTTCCC(CA) ₂ GGTTA(CA) ₂	200-2072	25	0	0
ผลรวม			1344	68	14
ค่าเฉลี่ย			19.76	1.00	0.21

¹ B = C, G, T; D = A, G, T; H = A, C, T; N = A, G, C, T; R = พิวรีน (A, G); V = A, C, G; Y = ไพริมิดีน (C, T)

² NB = จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่นับได้ในสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of scorable bands)

³ NPB = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ (number of polymorphic bands between resistant and susceptible parents)

⁴ I linked = จำนวนตำแหน่งของเครื่องหมาย ISSR ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคใบจุด

ตารางที่ 33 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR และลักษณะต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 จำนวน 14 เครื่องหมาย

เครื่องหมาย	จำนวนต้น ¹	Beta	t-value	P-value	R ²	ระยะห่าง (cM)	LOD
I14749	20	-0.723	-4.443	0.000	0.523	15	2.349
I16274	20	-0.812	-5.904	0.000	0.659	10	3.197
I18363	20	-0.812	-5.904	0.000	0.659	10	3.197
I18407	20	-0.493	-2.401	0.027	0.243	25	1.136
I27557	20	-0.483	-2.341	0.031	0.233	30	0.715
I30265	20	-0.480	-2.323	0.032	0.231	25	1.136
I35196	20	-0.422	-1.974	0.064	0.178	35	0.128
I35198	20	-0.571	-2.951	0.009	0.326	75	1.136
I41203	20	-0.917	-9.783	0.000	0.842	5	4.296
I84282	17	-0.520	-2.359	0.032	0.271	24	1.089
I84267	17	-0.382	-1.602	0.130	0.146	24	0.973
I88656	18	-0.761	-0.470	0.000	0.579	11	2.692
I88302	20	-0.908	-9.208	0.000	0.825	5	4.296
I88305	20	-0.908	-9.208	0.000	0.825	5	4.296

¹ จำนวนต้น = จำนวนต้นทั้งหมดที่ได้จากประชากรรวมที่ต้านทาน (resistant bulk DNA) และประชากรรวมที่อ่อนแอ (susceptible bulk DNA) อย่างละ 10 ต้น



ตารางที่ 34 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA จำนวน 48 คู่ไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I ¹	I-R ²	I-R new ³	I-R linked ⁴
ISSR807G ⁵	200-1500	28	24	0	0
ISSR807PL	200-1500	28	19	1	0
ISSR807P	200-1500	28	19	0	0
ISSR807R	200-1500	28	23	0	0
ISSR808G	200-1500	26	26	3	1
ISSR808PL	200-1500	26	21	1	0
ISSR808P	200-1500	26	30	6	0
ISSR808R	200-1500	26	25	3	0
ISSR809G	200-1500	27	29	3	0
ISSR809PL	200-1500	27	20	0	0
ISSR809P	200-1200	25	29	4	0
ISSR809R	200-1500	27	24	2	0
ISSR810G	200-1500	30	24	0	0
ISSR810PL	200-1500	30	31	3	0
ISSR810P	200-1500	30	29	6	0
ISSR810R	200-1500	30	28	2	0
ISSR827G	200-1500	22	18	1	0
ISSR827PL	200-1500	22	22	1	1
ISSR827P	200-1500	22	21	3	0
ISSR827R	200-1500	22	17	1	0
ISSR835G	150-1000	27	25	2	0
ISSR835PL	150-1000	27	24	1	0
ISSR835P	150-1000	27	20	3	2
ISSR835R	150-1000	27	18	1	1
ISSR836G	200-1000	23	23	1	0
ISSR836PL	200-1000	23	23	1	0
ISSR836P	200-1000	23	16	0	0
ISSR836R	200-1000	23	23	1	0
ISSR841cG	200-1000	23	25	5	0
ISSR841cPL	200-1000	23	21	0	0
ISSR841cP	200-1000	23	23	2	0
ISSR841cR	200-1000	23	20	2	0
ISSR856G	250-1500	24	17	0	0

ตารางที่ 34 รูปแบบแถบดีเอ็นเอของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ ISSR-RGA จำนวน 48 คู่ไพรเมอร์ (ต่อ)

ไพรเมอร์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			
		I ¹	I-R ²	I-R new ³	I-R linked ⁴
ISSR856PL	250-1500	24	21	2	0
ISSR856P	250-1500	24	23	3	2
ISSR856R	250-1500	24	21	0	0
ISSR857G	200-1500	25	22	2	0
ISSR857PL	200-1500	25	24	5	0
ISSR857P	200-1500	25	24	3	0
ISSR857R	200-1500	25	22	3	0
ISSR888G	200-1000	23	20	1	0
ISSR888PL	200-1000	23	16	1	0
ISSR888P	200-1000	23	19	3	0
ISSR888R	200-1000	23	24	1	0
ISSR891G	200-1000	24	22	1	0
ISSR891PL	200-1000	24	19	0	0
ISSR891P	200-1000	24	19	0	0
ISSR891R	200-1000	24	21	0	0

¹ จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR; ² จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่เหมือนกับไพรเมอร์ ISSR; ³ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA, ⁴ จำนวนแถบดีเอ็นเอใหม่ของไพรเมอร์ ISSR-RGA ที่สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว, ⁵ G = ไพรเมอร์ GLPLAL 1; PL = ไพรเมอร์ P-Loop; P = ไพรเมอร์ Pto kin 1; R = ไพรเมอร์ RLK for

ตารางที่ 35 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR-RGA และลักษณะต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 จำนวน 7 เครื่องหมาย

เครื่องหมาย	จำนวนต้น ¹	Beta	t-value	P-value	R ²	ระยะห่าง (cM)	LOD
I08G247	20	-0.515	-2.552	0.020	0.266	25	1.136
I27PL177	18	-0.765	-4.748	0.000	0.585	11	2.692
I35P716	20	-0.723	-4.443	0.000	0.523	15	2.349
I35P414	20	-0.483	-2.341	0.031	0.233	30	0.715
I35R407	20	-0.528	-2.637	0.017	0.279	25	1.136
I56P166	20	-0.812	-5.904	0.000	0.659	10	3.197
I56P169	20	-0.723	-4.443	0.000	0.523	15	2.349

¹ จำนวนต้น = จำนวนต้นทั้งหมดที่ได้จากประชากรรวมที่ต้านทาน (resistant bulk DNA) และประชากรรวมที่อ่อนแอ (susceptible bulk DNA) อย่างละ 10 ต้น

ตารางที่ 36 อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์ SSR

ไพรเมอร์	Forward sequence (5' - 3')	Reverse sequence (5' - 3')	อุณหภูมิ annealing (°ซ)
CEDAAG002	GCAGCAACGCACAGTTTCATGG	GCAAACTTTTCACCGGTACGACC	65
CEDAAG004	GGAGGAGAAGTCTCGGACC	GAGCGTTTTGCACAGTGTTCAC	60
CEDC008	GGAATTAGAGATGATTGGAC	CACCACTTCATTATGTATGG	55
CEDC031	GGGAATAATAAACCTTTCC	TCTCAAATCACATTGCCAC	50
CEDC050	TCCCACTTCTCCATTACCTCCAC	GAGATTATCTTCTGGGCAGCAAGG	60
CEDC055	CAAACACTTTTTGTAACCCC	GCTTCTAACCTTGATCCTTC	55
CEDG002	AACTGGACCTGTACCACTGG	TACAGCCTTCTTGACCATG	60
CEDG006	AATTGCTCTCGAACCGCTC	GGTGTACAAGTGTGTGCAAG	60
CEDG008	AGGCGAGTTTTCGTTTCAAG	GCCCATATTTTTACGCCAC	60
CEDG010	TGGGCTACCAACTTTTCCTC	TGAGCGACATCTTCAACACG	60
CEDG014	GCTTGCATCACCCATGATTC	AAGTGATACGGTCTGGTTCC	60
CEDG021	GCAGAATTTTAGCCACCGAG	AAAGGATGCGAGAGTGTAGC	60
CEDG024	CATCTTCTCACCTGCATTC	TTTGGTGAAGATGACAGCCC	60
CEDG037	GAAGAAGAACCCTACCACAG	CACCAAAAACGTTCCCTCAG	50
CEDG040	CGGGGTATAACTTTAGCAGC	TAACTCAGGCAAAGGTAGCC	60
CEDG043	AGGATTGTGGTTGGTGCATG	ACTATTTCCAACCTGCTGGG	60
CEDG044	TCAGCAACCTTGCATTGCAG	TTTCCCGTCACTCTTCTAGG	60
CEDG051	AAACATACCCCTGGCAGTTCC	TTCTGACCTAAGAAAGAGCCTGG	60
CEDG056	TTCCATCTATAGGGGAAGGGAG	GCTATGATGGAAGAGGGCATGG	60
CEDG059	AGAAAAGGGTGGCCTCGTTG	GCAGGCATTTCCATCGCAG	60
CEDG063	TTGGAACAATTATTGGAGGTGC	GGTGCTCTTGGACGGCTGG	55
CEDG070	CCGATCAAACCTCCATGCTCG	TAATTTCACTGCTTTTCCCTCC	55
CEDG084	ATCAACTGAGGAGCATCATCGA	CAACATTTCAACCTTGGGACAG	50
CEDG117	GTACACTTCCACTAATCCAAAATT	TGGTACCTTCCTTATCTGAAATTA	42
CEDG121	CTTTCAAATAATGTTGAGGCATA	CAATACATAAATAACCTTTTCTGC	50
CEDG150	GAAGGGAATGAAAATGAAACCC	GTTCAATCCATTCACTCTCC	50
CEDG154	GTCCTTGTTTTCTCTCCATGG	CATCAGCTGTTCAACACCCTGTG	55
CEDG169	CAATGCGCGTCTGCAAGTTG	CAAGGAACCTGTGGGTCC	55
CEDG176	GGTAACACGGGTTGAGATGCC	CAAGGTGGAGGACAAGATCGG	50
CEDG186	GGATGGGAGAGTAAGAAG	GCATGGCATGATGACTTG	60
CEDG205	GTGGTGGTGACAGTAGCAGTAG	CAGCCACCACAAGACAACCTC	55
CEDG232	GATGACCAAGGTAACGTG	GGACAGATCCAAAACGTG	50
CEDG259	GATCATCGGACAGAGCTTCC	CACTCTGCGAACTCAATCG	55
CEDG287	CCTTATACTAAAGATGTTGGTGG	GTGATACGCATATAGGTTAC	50
CEDG290	GACACTCTTTGTTGTAGG	CAGTGATCACTCTGGTTG	60

ตารางที่ 36 อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์ SSR (ต่อ)

ไพรเมอร์	Forward sequence (5' - 3')	Reverse sequence (5' - 3')	อุณหภูมิ annealing (°ซ)
CEDG294	CACCTTCTTAATCTCTTCACC	GGGTTTCTCTTAATTCATTGAGTC	55
CEDG295	CAAAGGTTAGATCCAACATCG	GGTTAGTCATCAACAACCTCC	60
CEDG304	ACCACTTCATAATCCCTGAG	GTTGCATGCTATATTTTGGTTCAC	50
CEDG305	GCAGCTTCACATGCATAGTAC	GAAGTTAACTTGGGTTGTCTGC	55
CEDGAT008	GGATGTGAAAGACTTAACTTC	GAGGAATCTAAGTAAAACGAG	55
cp03802	ATGTTATGAATGCACCTGCACGAT	CTGCAAGAAGCTAGTGTGCTCCA	55
DMB-SSR 167	TGGGACTCAAACCACACTTTC	GAAGTATGAAGGTTTCACAGAAATCA	55
DMB-SSR 199	AGAAATTAATCCCCGTCTGCT	AGAGACAGAAGCTCTGGATGTTTT	55
DMB-SSR 59	TGCCAGATTTGAGAAGAAAGGT	CATGCATGTGGATAAGAATTCAG	55
VR10	GAAAGGCTATGACCAAATCCAA	CGGGAAGAGAACATAAGGGAAT	55
VR108	GCTCCAACACTCACTCACAAC	CAGAAATGCAGGAAAAGAGAGG	55
VR393	TGGCACTTCCATAACGAATAC	ATCAGCCAAAAGCTCAGAAAAC	50

ตารางที่ 37 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SSR และลักษณะต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 จำนวน 9 เครื่องหมาย

เครื่องหมาย	จำนวนต้น ¹	Beta	t-value	P-value	R ²	ระยะห่าง (cM)	LOD
CEDAAG002	20	0.428	2.006	0.060	0.183	30	0.715
CEDC050	20	0.428	2.006	0.060	0.183	30	0.715
CEDC055	20	0.432	2.031	0.057	0.186	30	0.715
CEDG008	16	0.758	4.342	0.001	0.574	13	2.198
CEDG051	18	0.787	0.5095	0.000	0.619	11	2.692
CEDG070	20	0.504	2.476	0.023	0.254	25	1.136
CEDG084	20	0.891	8.342	0.000	0.795	5	4.296
VR108	20	0.800	5.648	0.000	0.639	10	3.197
VR393	20	0.731	4.311	0.000	0.508	15	2.349

¹ จำนวนต้น = จำนวนต้นทั้งหมดที่ได้จากประชากรรวมที่ต้านทาน (resistant bulk DNA) และประชากรรวมที่อ่อนแอ (susceptible bulk DNA) อย่างละ 10 ต้น

ตารางที่ 38 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR และลักษณะต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 จำนวน 7 เครื่องหมาย

เครื่องหมาย	จำนวนต้น	Beta	t-value	P-value	R ²	LOD
I16274	89	-0.719	-9.643	0.000	0.517	12.335
I41203	83	-0.631	-7.321	0.000	0.398	6.136
I88656	88	-0.538	-5.925	0.000	0.290	7.128
I88302	88	-0.544	-6.009	0.000	0.296	7.128
I88305	88	0.555	6.192	0.000	0.308	7.733
I18363	86	-0.533	-5.771	0.000	0.284	3.375
I14749	83	-0.580	-6.411	0.000	0.337	5.081

ตารางที่ 39 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย ISSR-RGA และลักษณะต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 จำนวน 4 เครื่องหมาย

เครื่องหมาย	จำนวนต้น	Beta	t-value	P-value	R ²	LOD
I56P166	88	-0.546	-6.047	0.000	0.298	3.683
I56P169	88	-0.548	-6.079	0.000	0.301	4.097
I27PL177	86	-0.379	-3.759	0.000	0.144	2.321
I35P716	84	-0.540	-5.814	0.000	0.292	5.263

ตารางที่ 40 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย SSR และลักษณะต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 จำนวน 5 เครื่องหมาย

เครื่องหมาย	จำนวนต้น	Beta	t-value	P-value	R ²	LOD
VR108	88	0.499	5.186	0.000	0.238	4.999
VR393	85	0.583	6.544	0.000	0.340	8.385
CEDG084	85	0.535	5.770	0.000	0.286	7.115
CEDG008	90	0.457	4.820	0.000	0.209	5.355
CEDG051	90	0.426	4.420	0.000	0.182	3.596

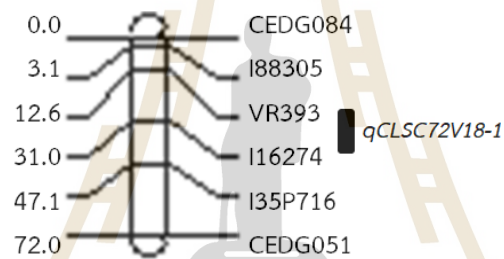
ตารางที่ 41 ตำแหน่ง QTL ที่เชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคใบจุดในประชากร $F_{2:9}$ ของคู่ผสม CN72 x V4718 จากการวิเคราะห์ multiple interval mapping (MIM)

ประชากร	ปี	ชื่อ QTL	Marker interval	ตำแหน่ง ¹ (cM)	LOD score ²	PVE ³ (%)	ผลแบบ บวก
$F_{2:9}$	2559	<i>qCLSC72V18-1</i>	VR393-I16274	24.6	3.76	75.90	-0.847
$F_{2:9}$	2560	<i>qCLSC72V18-1</i>	VR393-I16274	22.6	0.82	44.80	-0.5461

¹ ตำแหน่งบนกลุ่มลิงค์เกจ (linkage group)

² LOD, log of add ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ QTL

³ เปอร์เซ็นต์ความแปรปรวนของฟีโนไทป์ซึ่งได้จากการวิเคราะห์ QTL



ภาพที่ 6 ตำแหน่งยีนต้านทานโรคใบจุดอยู่ระหว่างเครื่องหมาย VR393 กับ I16274

ส่วนที่ 3 การปรับปรุงสายพันธุ์ต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุด โดยวิธีการรวมยีนต้านทานหลายยีนไว้ในสายพันธุ์เดียวกัน

การรวมยีนต้านทานหลายยีนเข้าไว้ในสายพันธุ์เดียวกันมีวัตถุประสงค์เพื่อให้สามารถต้านทานเชื้อสาเหตุของโรคราแป้งและโรคใบจุดได้หลายสายพันธุ์มากขึ้น หรือเพิ่มระดับความต้านทานโรคให้สูงขึ้น โดยการนำต้นลูกผสมที่ต้านทานโรคราแป้งและให้ผลผลิตสูง รวมทั้งลูกผสมที่ได้จากการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลในกลุ่มผสม CN72 × V4718 จากโครงการการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้ง และการรวมยีนต้านทานในถั่วเขียว มาผสมพันธุ์กัน โดยสร้างลูกผสม F_1 จำนวน 3 คู่ ประกอบด้วยคู่ผสมที่ 1 $F_{2:9}$ (CN72 × V4785) × $F_{2:7}$ (CN72 × V4718) คู่ผสมที่ 2 $F_{2:9}$ (CN72 × V4785) × $F_{2:8}$ (CN72 × V4758) และคู่ผสมที่ 3 $F_{2:7}$ (CN72 × V4718) × $F_{2:8}$ (CN72 × V4758) จากนั้นนำลูกผสม F_1 ที่ได้มาผสม-พันธุ์กัน โดยผสมระหว่าง F_1 จากคู่ผสมที่ 1 กับคู่ผสมที่ 2 และระหว่าง F_1 จากคู่ผสมที่ 1 กับคู่ผสมที่ 3 ได้ลูกผสมที่คาดว่าจะมียีนต้านทานครบ 3 ยีน จำนวน 105 ลูกผสม และนำลูกผสมเหล่านี้มาคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลที่บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งที่ได้จากคู่ผสม CN72 × V4718 (I85420 และ I42PL222) พบว่ามี 17 ลูกผสมที่มียีนต้านทานโรคราแป้ง หลังจากนั้นนำลูกผสมดังกล่าวผสมกลับ (backcross; BC) ไปยังพันธุ์แม่ CN72 และนำเมล็ด BC_1F_1 จำนวน 112 ต้น มาคัดเลือกด้วยเครื่องหมาย I85420 พบว่ามี 49 ต้นที่มียีนต้านทานโรคราแป้ง คิดเป็น 43.8% ซึ่งต้นเหล่านี้เป็นตัวแทนของ 11 ลูกผสม (A230, A242, A264, A266, A290, A324, A334, A335, A368, A375 และ A388) (ตารางที่ 42) จาก 17 ลูกผสม จากนั้นผสมกลับไปยังพันธุ์ CN72 จนถึงชั่ว BC_3F_1 และได้ทำการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งในกลุ่มผสม CN72 × V4758 และ CN72 × V4785 และพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคใบจุดในกลุ่มผสม CN72 × V4718 ควบคู่กันไปด้วย ซึ่งได้เครื่องหมายโมเลกุลที่น่าจะเชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้งคู่ผสมละ 1 เครื่องหมาย (I41tP379 จากคู่ผสม CN72 × V4758 และ I27R565 จากคู่ผสม CN72 × V4785) และได้เครื่องหมายโมเลกุลที่น่าจะเชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคใบจุดจากคู่ผสม CN72 × V4718 จำนวน 2 เครื่องหมาย (VR393 และ I16274) และเครื่องหมายโมเลกุลที่น่าจะเชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้งจากคู่ผสม CN72 × V4718 จากโครงการระยะที่ 1 จำนวน 2 เครื่องหมาย (I85420 และ I42PL222) รวมทั้งหมด 6 เครื่องหมาย (เครื่องหมายที่น่าจะเชื่อมโยงกับลักษณะต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุด 4 และ 2 เครื่องหมาย ตามลำดับ)

นำลูกผสมในชั่ว BC_3F_1 จำนวน 403 ต้น จาก 11 ลูกผสม มาทดสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 6 เครื่องหมาย พบว่ามีต้นที่มียีนครบทั้ง 4 ยีน (ยีนต้านทานโรคราแป้งจาก V4718, V4758 และ V4785 และยีนต้านทานโรคใบจุดจาก V4718) จำนวน 3 ต้น จากลูกผสม A388 เพียงสายพันธุ์เดียว ซึ่งเป็นลูกผสม $F_1 \times F_1$ จาก (71B×182C) × (37A×71B) คิดเป็นสัดส่วนได้ 0.74% จากทั้งหมด 403 ต้น จากนั้นปลูกผสมตัวเองทั้ง 3 ต้น เป็นชั่ว BC_3F_2 จำนวน 87 ต้น และคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 6 เครื่องหมาย พบว่ามีต้นที่มียีนครบทั้ง 4 ยีน จำนวน 10 ต้น คิดเป็นสัดส่วนได้ 11.5% และปลูกผสมตัวเองทั้ง 10 ต้น เป็นชั่ว BC_3F_3 จำนวน 198 ต้น และคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 6 เครื่องหมาย พบว่ามีต้นที่มียีนครบทั้ง 4 ยีน จำนวน 25 ต้น คิดเป็นสัดส่วนได้ 12.6% จากนั้นนำไพรเมอร์ SSR (CEDG174) ซึ่ง Isemura

et al. (2012) รายงานว่าเชื่อมโยงกับลักษณะความกว้างเมล็ด ความยาวเมล็ด และความยาวฝักในถั่วเขียว (*Vigna radiata*) พบว่าลูกผสมทั้งหมด 25 ต้นมีความเหมือนกันทางพันธุกรรมกับพันธุ์แม่ CN72 (ภาพที่ 7) เกือบเมล็ด BC₃F₄ และปลูกขยายเมล็ดเป็น BC₃F₅ เพื่อปลูกทดสอบโรคราแป้งต้นปี พ.ศ. 2562

ตารางที่ 42 ประวัติพันธุ์พ่อแม่ ลูกผสม F₁ × F₁ และลูกผสมกลับในชั่ว BC₃F₃

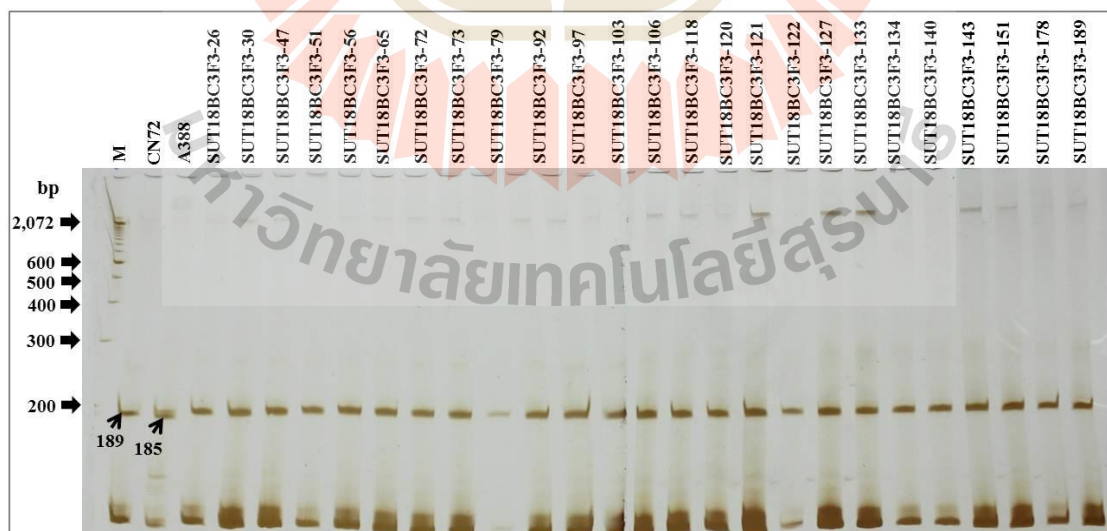
พันธุ์/สายพันธุ์	ประวัติสายพันธุ์ ¹
CN72	ให้ผลผลิตสูง แต่อ่อนแอต่อโรคราแป้งและโรคใบจุด
V4718	ต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุด
V4758	ต้านทานโรคราแป้ง
V4785	ต้านทานโรคราแป้ง
A230 ²	(37A×71B) × (71B×41C)
A242	(55A×71B) × (27B×41C)
A264	(67A×27B) × (27B×41C)
A266	(67A×27B) × (71B×14C)
A290	(181A×27B) × (71B×41C)
A324	(27B×41C) × (55A×71B)
A334	(27B×182C) × (55A×71B)
A335	(27B×182C) × (67A×27B)
A368	(71B×14C) × (37A×71B)
A375	(71B×19C) × (37A×71B)
A388	(71B×182C) × (37A×71B)
SUT18BC3F3-26	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-30	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-47	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-51	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-56	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-65	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-72	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-73	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-79	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-92	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-97	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))

ตารางที่ 42 ประวัติพันธุ์พ่อแม่ ลูกผสม $F_1 \times F_1$ และลูกผสมกลับในชั่ว BC_3F_3 (ต่อ)

พันธุ์/สายพันธุ์	ประวัติสายพันธุ์ ¹
SUT18BC3F3-103	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-106	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-118	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-120	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-121	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-122	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-127	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-133	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-134	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-140	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-143	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-151	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-178	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))
SUT18BC3F3-189	CN72 × ((71B×182C) × (37A×71B))

¹ สายพันธุ์ 37A, 55A, 67A และ 181A เป็นลูกผสมในประชากร $F_{2.8}$ ของคู่ผสม CN72 × V4758; สายพันธุ์ 27B และ 71B เป็นลูกผสมในประชากร $F_{2.7}$ ของคู่ผสม CN72 × V4718; สายพันธุ์ 14C, 19C, 41C และ 182C เป็นลูกผสมในประชากร $F_{2.9}$ ของคู่ผสม CN72 × V4785

² ลูกผสม $F_1 \times F_1$



ภาพที่ 7 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอในแก้วเขียวพันธุ์แม่ CN72 พันธุ์พ่อ A388 ลูกผสมกลับชั่วที่ 3 (BC_3F_3) จำนวน 25 สายพันธุ์ ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ CEDG174; M = 100 bp DNA ladder

ส่วนที่ 4 การคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเขียวที่มีศักยภาพในการต้านทานโรคและให้ผลผลิตสูงจากวิธีการรวมยีนต้านทานหลายยีนไว้ในสายพันธุ์เดียวกัน

นำสายพันธุ์ที่มียีนต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุดในชั่ว BC_3F_3 ที่ผ่านการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล จำนวน 25 ต้นมาปลูกขยายเมล็ดในกระถางเพื่อปลูกทดสอบผลผลิตและความต้านทานโรค โดยทดสอบหลายสภาพแวดล้อม เปรียบเทียบกับพันธุ์ CN72, SUT1, KPS1, V4718, V4758 และ V4785 ใช้แผนการทดลองแบบ RCBD และการดูแลรักษาเช่นเดียวกับส่วนที่ 1 ซึ่งขณะนี้กำลังปลูกขยายเมล็ดเพื่อประเมินโรคราแป้งต้นปี พ.ศ. 2562 ดังแสดงในภาพที่ 8

จากการวิจัยนี้การรวมยีนโดยพิจารณา 4 ยีนหลัก (ยีนต้านทานโรคราแป้งจากสายพันธุ์ V4718, V4758 และ V4785 และยีนต้านทานโรคใบจุดจากสายพันธุ์ V4718) ร่วมกับการผสมกลับไปยังพันธุ์รับ CN72 จะทำให้ผู้วิจัยมีโอกาสได้ลักษณะของพันธุ์ CN72 ที่แสดงความต้านทานของยีนหลักต่าง ๆ เหล่านี้ได้ตามวัตถุประสงค์ แต่อาจสูญเสียความต้านทานของยีนรอง (minor gene) ที่อาจได้มาจากการเกิด recombination อย่างสุ่มบางส่วนไป ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำสายพันธุ์ที่มีความต้านทานเกินพันธุ์ V4758 และ V4718 จากภาพที่ 1 และ 3 ตามลำดับ มาเข้าสู่กระบวนการปรับปรุงพันธุ์ที่ไม่ใช่การผสมกลับเพื่อให้ได้ทั้งการรวมยีนที่สนใจทั้ง 4 ยีนหลัก ร่วมกับยีนรองอื่น ๆ ที่พบการแสดงออกของความต้านทานเพื่อใช้ในการสร้างหรือพัฒนาพันธุ์อื่น ๆ ต่อไป ซึ่งงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวให้ต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุด และเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดอื่นในอนาคต



ภาพที่ 8 สายพันธุ์ถั่วเขียวที่เกิดจากการรวมยีนต้านทานหลายยีนไว้ในสายพันธุ์เดียวกัน ซึ่งเป็นลูกผสมกลับชั่ว BC_3F_3 เปรียบเทียบกับพันธุ์แม่ CN72 ที่อายุ 50 วัน

บทที่ 4

บทสรุป

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. ยีนที่ถ่ายทอดลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4758 และ CN72 × V4785 รวมทั้งยีนที่ถ่ายทอดลักษณะต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4718 ถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 คู่
2. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล ISSR และ ISSR-RGA ที่บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งในประชากร RILs ของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4758 จากการทดสอบด้วยวิธี BSA โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 63 ไพรเมอร์ และ ISSR-RGA จำนวน 338 คู่ไพรเมอร์ พบว่าได้เครื่องหมาย ISSR และ ISSR-RGA จำนวน 4 และ 11 เครื่องหมาย ตามลำดับ ส่วนคู่ผสม CN72 × V4785 จากการทดสอบด้วยวิธี BSA โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 63 ไพรเมอร์ และ ISSR-RGA จำนวน 241 คู่ไพรเมอร์ พบว่าได้เครื่องหมาย ISSR และ ISSR-RGA จำนวน 2 และ 37 เครื่องหมาย ตามลำดับที่น่าจะเชื่อมโยงกับยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคราแป้ง
3. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล ISSR, ISSR-RGA และ SSR ที่บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคใบจุดในประชากร RILs ของถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4718 จากการทดสอบด้วยวิธี BSA โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR, ISSR-RGA และ SSR จำนวน 68, 48 และ 47 ไพรเมอร์/คู่ไพรเมอร์ ตามลำดับ พบว่าได้เครื่องหมาย ISSR, ISSR-RGA และ SSR จำนวน 7, 4 และ 5 เครื่องหมาย ตามลำดับที่น่าจะเชื่อมโยงกับยีนควบคุมลักษณะต้านทานโรคใบจุด
4. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4758 และ CN72 × V4785 ได้เครื่องหมาย I41tP379 และ I27R565 ตามลำดับที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคราแป้งมากที่สุด
5. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 × V4718 ได้ 2 เครื่องหมาย (VR393 และ I16274) ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคใบจุดมากที่สุด
6. การประเมินความเหมาะสมในการใช้ไพรเมอร์ RGA ร่วมกับ ISSR พบว่าเครื่องหมาย ISSR-RGA เป็นประโยชน์และมีประสิทธิภาพสูง
7. การรวมยีนต้านทาน 4 ยีนเข้าไว้ในสายพันธุ์เดียวกัน (ยีนต้านทานโรคราแป้งจาก V4718, V4758 และ V4785 และยีนต้านทานโรคใบจุดจาก V4718) โดยวิธีผสมกลับและคัดเลือกด้วยเครื่องหมายโมเลกุล ได้ต้นลูกผสมกลับชั่ว BC₃F₃ ที่มียีนครบทั้ง 4 ยีน จำนวน 25 สายพันธุ์ ซึ่งอยู่ระหว่างการปลูกขยายเมล็ดเพื่อทดสอบโรคราแป้งและโรคใบจุด

บรรณานุกรม

- บุปผา ใจเที่ยง. (2545). การถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียวและการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายสำหรับการคัดเลือก. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ปริญญา ขจัดพาล. (2552). ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับศักยภาพการให้ผลผลิตและการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะความต้านทานโรคราแป้งในถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ไพศาล เหล่าสุวรรณ และปิยะดา ทิพยผ่อง. (2550). หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 369 หน้า.
- ไพศาล เหล่าสุวรรณ, อารีย์ วรรณวัฒน์ และปิยะดา ทิพยผ่อง. (2546). หลักการปรับปรุงพันธุ์พืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา. 271 หน้า.
- สมพงศ์ จันท์แก้ว. (2552). พันธุกรรมการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานโรคใบจุดสีน้ำตาลในถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การปรับปรุงพันธุ์พืช) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สำนักงานมาตรฐานสินค้า. (2558). สถิติการส่งออกสินค้ามาตรฐานถั่วเขียวตามใบรับรองมาตรฐานสินค้า. กรมการค้าต่างประเทศ [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.dft.go.th/Default.aspx?tabid=164&ctl=DetailUserContent&mid=689&contentID=7879>
- สำนักพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร. (2552). โรคราแป้ง (powdery mildew). กรมส่งเสริมการเกษตร [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://agriqua.doae.go.th/plantclinic/clinic/plant/mungbean/powd.htm>
- ศรีสุดา เตชะसान. (2558). ถั่วเขียว. กรมส่งเสริมการเกษตร [ออนไลน์]. ได้จาก: http://ssnet.doae.go.th/wp-content/uploads/2015/04/036_green-gram.pdf
- ศูนย์บริการฉายรังสีแกมมาและวิจัยนิวเคลียร์เทคโนโลยี. (2553). พืชพันธุ์กลายในประเทศไทย: ถั่วเขียวพันธุ์ชยันต 72. อ้างถึงใน เอกสารทางวิชาการพันธุ์พืชขั้นทะเบียนและพืชรับรอง ตามพระราชบัญญัติพันธุ์พืช พ.ศ. 2518. (2543). ฝ่ายพันธุ์พืช กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.sci.ku.ac.th/Gamma/database/Greenbean/Gbean.htm>
- Ajibade, S.R., Weeden, N.F. and Chite, S.M. (2000). Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. *Euphytica* 11: 47-55.
- Asian Vegetable Research and Development Center. (2009). Disease control-mungbean production. The World Vegetable Center [Online]. Available from: <http://www.avrdc.org/LC/mungbean/production/disease.html>
- AVRDC. (1981). Progress Report 1980. Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhua, Taiwan, pp. 40-50.

- Bainade, P.S., Kale, A.A., Kumbhar, S.D. and Deshmukh, S.G. (2014). Inter simple sequence repeats (ISSR) based polymorphism for powdery mildew resistance in green gram (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *J. Cell Tissue Res.* 14(3): 4547-4550.
- Basak, J., Kundagrami, S., Ghose, T.K. and Pal, A. (2004). Development of yellow mosaic virus (YMV) resistance linked DNA marker in *Vigna mungo* from populations segregating for YMV-reaction. *Mol. Breeding* 14: 375-383.
- Binyamin, R., Khan, M.A., Khan, N.A. and Khan, A.I. (2015). Application of SCAR markers linked with mungbean yellow mosaic virus disease-resistance gene in Pakistan mungbean germplasm. *Genet. Mol. Res.* 14(1): 2825-2830.
- Carvalho, A., Manuela, M., Jose, L., Guedes-pinto, H. and Cesar, B. (2005). DNA fingerprint of F₁ interspecific hybrids from the *Triticeae* tribe using ISSRs. *Euphytica* 143: 93-99.
- Chankaew, S., Somta, P., Isemura, T., Tomooka, N., Kaga, A., Vaughan, D.A. and Srinives, P. (2013). Quantitative trait locus mapping reveals conservation of major and minor loci for powdery mildew resistance in four sources of resistance in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek.]. *Mol. Breeding* 32: 121-130.
- Chankaew, S., Somta, P., Sorajjapinun, W. and Srinives, P. (2011). Quantitative trait loci mapping of *Cercospora* leaf spot resistance in mungbean, *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Mol. Breeding* 28: 255-264.
- Chen, X.M., Line, R.F. and Leung, H. (1998). Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley and wheat by high-resolution electrophoresis. *Theor. Appl. Genet.* 97: 345-355.
- Cregan, P.B., Mudge, J., Fickus, E.W., Marek, L.F., Danesh, D., Denny, R., Shoemaker, R.C., Matthews, B.F., Jarvik, T. and Young, N.D. (1999). Targeted isolation of simple sequence repeat markers through the use of bacterial artificial chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 98: 919-928.
- Donald, T.M., Pellerone, F., Adom-Blondon, A.F., Bouquet, A., Thomas, M.R. and Dry, I. B. (2002). Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 104: 610-618.
- Eibach, R., Zyprian, E., Welter, L. and Töpfer, R. (2007). The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. *Vitis* 46(2): 120-124.
- Fang, D.Q., Federici, C.T. and Roose, M.L. (1998). A high resolution linkage map of citrus triteza virus resistance gene region in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Genetics* 150: 883-890.

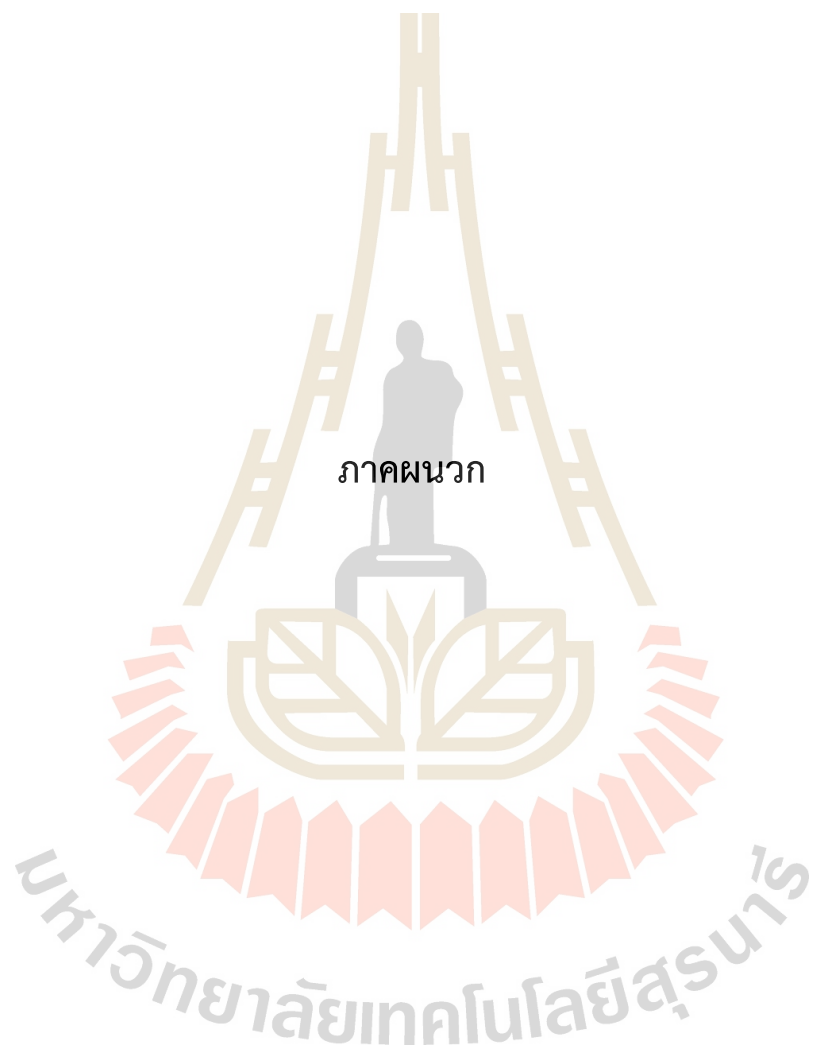
- Fatokun, C.A., Danesh, D. and Young, N.D. (1993). Molecular taxonomic relationships in the genus *Vigna* based on RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.* 86: 97-104.
- Fatokun, C.A., Mignouna, H.D., Knox, M.R. and Ellis, T.H.N. (1997). AFLP variation among cowpea varieties. p. 156. *In Agronomy Abstracts*. ASA, Madison, WI Quoted in Li C.-D., Fatokun, C.A., Ubi, F.B., Singh, B.B. and Scoles, G.J. (2001). Determining genetic similarities and relationships among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. *Crop Sci.* 41: 189-197.
- Fazio, G., Stevens, M.R. and Scott, J.W. (1999). Identification of RAPD linked to *Fusarium* crown and root rot resistance (*Fr1*) in tomato. *Euphytica* 105: 205-210.
- Feuillet, C., Schachermayr, G. and Keller, B. (1997). Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encoded at the Lr10 disease resistance locus of wheat. *Plant J.* 11: 45-52.
- Gawande, V.L. and Patil, J.V. (2003). Genetics of powdery mildew (*Erysiphe polygoni* DC) resistance in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Crop Prot.* 22: 567-571.
- Gold, J., Harder, D., Townley-Smith, F., Aung, T. and Procnunier, J. (1999). Development of a molecular marker for rust resistance gene *Sr39* and *Lr35* in wheat breeding lines. *J. Biotech.* 2 (1): 35-40.
- Hayes, A.J. and Saghai Maroof, M.A. (2000). Targeted resistance gene mapping in soybean using modified AFLPs. *Theor Appl Genet.* 100: 1279-1283.
- Huang, X.Q., Hsam, S.L.K., Zeller, F.J., Wenzel, G. and Mohler, V. (2000). Molecular mapping of the wheat powdery mildew resistance gene *Pm24* and marker validation for molecular breeding. *Theor. Appl. Genet.* 101: 407-414.
- Humphry, M.E., Magner, T., McIntyre, C.L., Aitken, E.A.B. and Liu, C.J. (2003). Identification of a major locus conferring resistance to powdery mildew (*Erysiphe polygoni* DC) in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) by QTL. *Genome* 46(5): 738-744.
- Isemura, T., Kaga, A., Tabata, S., Somta, P., Srinives, P., Shimizu, T., Jo, U., Vaughan, D.A. and Tomooka, N. (2012). Construction of a genetic linkage map and genetic analysis of domestication related traits in mungbean (*Vigna radiata*). *PLoS ONE.* 7(8): 1-14.
- Kao, C.H., Zeng, Z.B. and Teasdale, R.D. (1999). Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 152: 1203-1216.
- Kasettranan, W., Somta, P. and Srinives, P. (2010). Mapping of quantitative trait loci controlling powdery mildew resistance in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *J. Crop Sci. Biotech.* 13(3): 155-161.

- Khajudparn, P., Prajongjai, T., Poolsawat, O. and Tantasawat, P.A. (2012). Application of ISSR markers for verification of F₁ hybrids in mungbean (*Vigna radiata*). Genet. Mol. Res. 11(3): 3329-3338.
- Khajudparn, P., Wongkaew, S. and Thipyapong, P. (2007). Mungbean powdery mildew resistance. Identification of genes for powdery mildew resistance in mungbean. Afr. Crop Sci. Conf. Proc. 8: 743-745.
- Khunti, J.P., Bhoraniya, M.F. and Vora, V.D. (2002). Management of powdery mildew and cercospora leaf spot of mungbean by some systemic fungicides. J. Mycol. Plant Pathol. 32(1).
- Kundagrami, S., Basak, J., Maiti, S., Kundu, A., Das, B., Ghose, T.K. and Pal, A. (2009). Agronomic, genetic and molecular characterization of MYMIV-tolerant mutant lines of *Vigna mungo*. Int. J. Plant Breed. Gen. 3(1): 1-10.
- Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, J.M., Lincoln, S.E. and Newberg, L. (1978). Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1: 174-181.
- Levesque, R. and SPSS Inc. (2006). SPSS Programming and Data Management, 3rd Edition. SPSS Institute, United State of America.
- Liu, J., Liu, D., Tao, W., Li, W., Wang, S., Chen, P. and Gao, D. (2000). Molecular marker facilitated pyramiding of different genes for powdery mildew resistance in wheat. Plant Breeding 119: 21-24.
- Lodhi, M.A., Ye, G., Weeden, N.F. and Reisch, B.I. (1994). A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. Plant Mol. Biol. 12: 6-13.
- Mahanil, S. (2007). Inheritance and cloning of candidate resistance gene analogs (RGAs) for downy mildew in grapevine (*Vitis* spp.). Nakhon Ratchasima, Thailand, Suranaree University of Technology, PhD Thesis.
- Mignouna, H.D., Ng, N.Q., Ikca, J. and Thottapilly, G. (1998). Genetic diversity in cowpea as revealed by random amplified polymorphic DNA. J. Genet. Breed. 52: 151-159.
- Mingpei, Y., Jeffrey, G.B., Bevan, J.B., Mark, W.S., Kadambot, H.M.S. and Huaan, Y. (2005). A PCR-based molecular marker applicable for marker-assisted selection anthracnose disease resistance in lupin breeding. Cell. Mol. Biol. Lett. 10: 123-134.
- Mishra, S.P., Asthana, A.N. and Yadav, L. (1988). Inheritance of *Cercospora* leaf spot resistance in mungbean, *Vigna radiata* (L.) Wilczek. Plant Breed. 100(3): 228-229.

- Mutlu, N., Miklas, P.N. and Coyne, D.P. (2006). Resistance gene analog polymorphism (RGAP) markers co-localize with disease resistance genes and QTL in common bean. *Mol. Breeding* 17: 127-135.
- Patil, P.G., Datta, S., Agbagwa, I.O., Singh, I.P., Soren, K.R., Das, A., Choudhary, A.K. and Chaturvedi, S.K. (2014). Using AFLP-RGA markers to assess genetic diversity among pigeon pea (*Cajanus cajan*) genotypes in relation to major diseases. *Acta Bot. Brasilica* 28(2): 198-205.
- Poehlman, J.M. (1991). *The Mungbean*. New Delhi: Oxford & IBH publishing.
- Ratnaparkhe, M.B., Tekeoglu, M. and Muehlbauer, F.J. (1998). Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphism are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theor. Appl. Genet.* 97: 515-519.
- Reddy, K. S., Pawar, S. E. and Bhatia, C. R. (1994). Inheritance of powdery mildew (*Erysiphe polygoni* DC) resistance in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *Theor. Appl. Genet.* 88: 945-948.
- Rivkin, M.I., Vallejos, C.E. and McClean, P.E. (1999). Disease-resistance related sequences in common bean. *Genome* 42: 41-47.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanchez, A.C., Brar, D.S., Haung, N., Li, Z. and Khush, G.S. (2000). Sequence tagged site marker -assisted selection for three bacterial blight resistance gene in rice. *Crop Sci.* 40: 792-797.
- Singh, A. Dikshit, H.K., Jain, N., Singh, D. and Yadav, R.V. (2014). Efficiency of SSR, ISSR and RAPD markers in molecular characterization of mungbean and other *Vigna* species. *Indian. J. Biotechnol.* 13: 81-88.
- Smolik, M. (2012). R-ISSR-tool for generation of a new type of products, applied for the identification of putative molecular marker linked to QTL determined tolerance to nutrient deprivation stress in rye (*Secale cereal* L.). *Not. Bot. Horti. Agrobi.* 40(2): 238-246.
- Souframanien, J. and Gopalakrishna, T. (2006). ISSR and SCAR markers linked to the mungbean yellow mosaic virus (MYMV) resistance gene in blackgram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. *Plant Breed.* 125: 619-622.
- Sowmini, K. and Jayamani, P. (2014). Validation of molecular markers linked with yellow mosaic disease resistance in blackgram (*Vigna mungo* (L.) Hepper). *Legume Genomics Genet.* 5(4): 25-30.

- Suneetha, T.B., Gopinath, S.M. and Naik, S.L. (2014). Identification of resistance gene analogs (RGAs) linked to powdery mildew resistance in peas. *Int. J. Innov. Res. Adv. Eng.* 1(6): 33-36.
- Tantasawat, P.A., Poolsawat, O., Prajongjai, T., Chaowiset, W. and Tharapreuksapong, A. (2012). Association of RGA-SSCP markers with resistance to downy mildew and anthracnose in grapevines. *Genet. Mol. Res.* 11: 1799-1809.
- Tantasawat, P., Trongchuen, J., Prajongjai, T., Thongpae, J., Petkhum, C., Seehalak, W. and Machikowa, T. (2010). Variety identification and genetic relationships of mungbean and blackgram in Thailand based on morphological characters and ISSR analysis. *Afr. J. Biotechnol.* 9(27): 4452-4464.
- Thakur, R.P., Patel, P.N. and Verma, J.P. (1977). Genetical relationships between reactions to bacterial leaf spot, yellow mosaic and *Cercospora* leaf spot diseases in mungbean (*Vigna radiata*). *Euphytica* 26: 765-774.
- Tsou, C.S., Hsu, M.S., Tan, S.T. and Park, H.G. (1979). The protein quality of mungbean and its improvement. *Acta Hort. (ISHS)* 93: 279-288.
- Van der Linden, C.G., Wouters, D.C.A.E., Mihalka, V., Kochieva, E.Z., Smulders, M.J.M. and Vosman, B. (2004). Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. *Theor. Appl. Genet.* 109: 384-393.
- Veldboom, L.R. and Lee, M. (1994). Molecular-marker facilitated studies of morphological trait in maize. II: determination of QTLs for grain yield and yield components. *Theor. Appl. Genet.* 89: 451-458.
- Wang, S., Basten, C.J., Zeng, Z.B. (2007). *Windows QTL Cartographer 2.5*. North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Wang, X., Xu, L., Song, Z., Zhu, X., Wang, Y., Wang, R., Gong, Y., Limera, C. and Liu, L. (2014). Resistance gene analogue isolation and RGA-based marker development for identifying downy mildew resistance in radish (*Raphanus sativus* L.) *Euphytica* 198: 289-303.
- Wang, Z., Weber, J.L., Zhang, G. and Tanksley, S.D. (1994). Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor. Appl. Genet.* 88: 1-6.
- Women's Health Letter. (2003). Nutrition Detective: Bean sprouts and breast cancer treatment. *Women's Health Letter*. Dec 1, 2003. [Online] Available from: <http://www.thefreelibrary.com/Bean+sprouts+and+breast+cancer+treatment-a0135118900>

- Yee, E., Kidwell, K.K., Sills, G.R. and Lumpkin, T.A. (1999). Diversity among selected *Vigna angularis* (Azuki) accessions on the basis of RAPD and AFLP markers. *Crop Sci.* 39: 268-275.
- Yi, Y., Li, R., Xu, H., Wu, X., Li, S., Zhang, J. and Yin, Y. (2013). Identification of SRAP and RGA markers linked to powdery mildew (*Blumeria graminis*) resistance gene *PmZB90* in common wheat. *Aust. J. Crop Sci.* 7(3): 454-459.
- Young, N.D., Danesh, D., Menancio-Hautea, D. and Kumar, L. (1993). Mapping oligogenic resistance to powdery mildew in mungbean with RFLP's. *Theor. Appl. Genet.* 87: 243-249.
- Zhang, M.C., Wang, D.M., Zheng, Z., Humphry, M. and Liu, C.J. (2008). Development of PCR-based markers for a major locus conferring powdery mildew resistance in mungbean (*Vigna radiata*). *Plant breed.* 127: 429-432.
- Zhang, Q., Zhao, C.L., Wang, C.L., Zhou, Y.L., and Leung, H. (1998). Two new genes for resistance to bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) were indentified from wild rice [Online]. Available from: <http://www.bspp.org.uk/icpp98/6/131.html>
- Zhang, T.M. (1999). Chemical control of powdery mildew of mungbean. Asian Regional Center –AVRDC. Report 1999 The World Vegetable Center. [Online] Available from: [http://www.arc-avrdoc.org/pdf_files/Zhangtia\(17-N\).pdf](http://www.arc-avrdoc.org/pdf_files/Zhangtia(17-N).pdf)
- Zhuang, L.F., Sun, L., Li, A.X., Chen, T.T. and Qi, Z.J. (2011). Identification and development of diagnostic markers for a powdery mildew resistance gene on chromosome 2R of Chinese rye cultivar Jingzhouheimai. *Mol. Breeding* 27: 455-465.



ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การประเมินโรคราแป้งในถั่วเขียว

เกณฑ์การให้คะแนนการเกิดโรคราแป้งในถั่วเขียว เมื่อถั่วเขียวมีอายุ 55-65 วัน (ประเมินทั้งแถว) ตามวิธีการของปริญญา ขจัดพาล (2552) ซึ่งแบ่งเป็นระดับคะแนน 1-9 ดังนี้

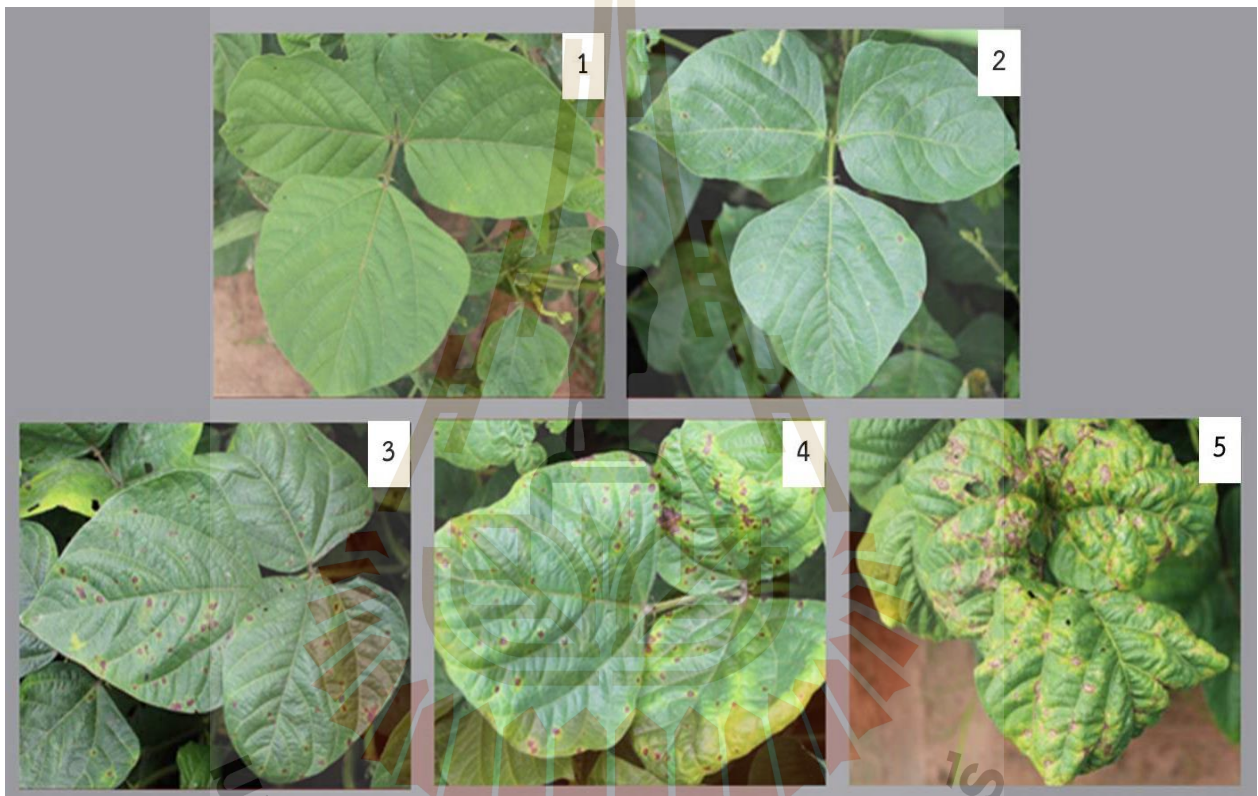
- 1 คะแนน = ไม่มีอาการโรค
- 2 คะแนน = พบแผล 2-3 แผลบนใบตอนล่าง
- 3 คะแนน = พบแผล 2-3 แผลบนใบตอนล่าง เชื้อเริ่มสร้างสปอร์
- 4 คะแนน = พบแผลจำนวนมากบนใบตอนล่างและตอนกลาง เชื้อเริ่มสร้างสปอร์
- 5 คะแนน = เหมือนระดับที่ 4 ใบเริ่มเหลืองหรือแห้งกรอบ เชื้อสร้างสปอร์มาก
- 6 คะแนน = เหมือนระดับที่ 5 สามารถมองเห็นอาการได้ในระยะไกล เชื้อสร้างสปอร์มาก
- 7 คะแนน = พบแผลบนใบทั่วทั้งต้น ใบแห้งกรอบแต่ไม่เกิน 25%
- 8 คะแนน = เหมือนระดับที่ 7 ใบแห้งกรอบ 25-50%
- 9 คะแนน = ใบแห้งกรอบมากกว่า 50%



การประเมินโรคใบจุดในถั่วเขียว

เกณฑ์การให้คะแนนการเกิดโรคใบจุดในถั่วเขียว เมื่อถั่วเขียวมีอายุ 55-65 วัน (ประเมินทั้งแถว) ตามวิธีการของสมพงษ์ จันทรแก้ว (2552) ซึ่งแบ่งเป็นระดับคะแนน 1-5 ดังนี้

- 1 คะแนน = 0 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค
- 2 คะแนน = 1-25 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค
- 3 คะแนน = 26-50 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค
- 4 คะแนน = 51-75 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค
- 5 คะแนน = 76-100 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค



ตารางภาคผนวกที่ 1 คะแนนการเกิดโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2558

พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE	พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE	พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE
CN72	6.000 ± 0.000 a ¹	57A	4.333 ± 0.334 cde	106A	4.333 ± 0.883 cde
V4758	3.333 ± 0.334 e-h	65A	6.000 ± 0.000 a	107A	5.667 ± 0.334 ab
2A	3.667 ± 0.334 d-g	66A	3.667 ± 0.334 d-g	109A	6.000 ± 0.000 a
12A	4.667 ± 0.334 a-d	67A	3.000 ± 0.000 fgh	112A	5.667 ± 0.334 ab
13A	6.000 ± 0.000 a	69A	5.667 ± 0.334 ab	113A	4.000 ± 0.000 def
14A	6.000 ± 0.000 a	70A	6.000 ± 0.000 a	116A	6.000 ± 0.000 a
18A	6.000 ± 0.000 a	71A	6.000 ± 0.000 a	119A	6.000 ± 0.000 a
20A	5.667 ± 0.334 ab	74A	6.000 ± 0.000 a	120A	5.667 ± 0.334 ab
21A	6.000 ± 0.000 a	75A	6.000 ± 0.000 a	123A	5.667 ± 0.334 ab
22A	6.000 ± 0.000 a	77A	3.000 ± 0.000 fgh	127A	2.667 ± 0.334 gh
23A	5.667 ± 0.334 ab	82A	3.667 ± 0.334 d-g	128A	5.667 ± 0.334 ab
28A	6.000 ± 0.000 a	84A	5.667 ± 0.334 ab	134A	6.000 ± 0.000 a
29A	6.000 ± 0.000 a	85A	6.000 ± 0.000 a	151A	6.000 ± 0.000 a
30A	6.000 ± 0.000 a	86A	6.000 ± 0.000 a	152A	3.333 ± 1.334 e-h
35A	6.000 ± 0.000 a	87A	6.000 ± 0.000 a	153A	6.000 ± 0.000 a
37A	3.333 ± 0.334 e-h	88A	4.667 ± 0.883 a-d	154A	5.667 ± 0.334 ab
38A	4.333 ± 0.667 cde	89A	4.333 ± 0.667 cde	155A	4.333 ± 0.334 cde
42A	5.333 ± 0.334 abc	90A	4.000 ± 0.000 def	156A	3.667 ± 0.334 d-g
47A	6.000 ± 0.000 a	91A	6.000 ± 0.000 a	157A	4.000 ± 0.578 def
49A	4.000 ± 0.578 def	92A	6.000 ± 0.000 a	178A	4.667 ± 0.334 a-d
55A	2.667 ± 0.334 gh	94A	6.000 ± 0.000 a	181A	2.667 ± 0.334 gh
56A	4.000 ± 1.156 def	104A	6.000 ± 0.000 a	185A	2.333 ± 0.334 h

¹ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์/คอลัมน์ หมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางภาคผนวกที่ 2 คะแนนการเกิดโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2561

พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE	พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE	พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE
CN72	6.667 ± 0.334 ab ¹	57A	4.667 ± 0.667 a-f	106A	4.667 ± 0.334 a-f
V4758	4.000 ± 0.000 c-f	65A	4.333 ± 0.334 b-f	107A	6.333 ± 0.334 abc
2A	3.667 ± 0.334 def	66A	3.333 ± 0.334 ef	109A	4.667 ± 0.883 a-f
12A	4.667 ± 1.203 a-f	67A	3.667 ± 0.334 def	112A	4.000 ± 0.000 c-f
13A	4.667 ± 0.334 a-f	69A	5.333 ± 0.334 a-e	113A	4.333 ± 0.334 b-f
14A	4.667 ± 0.883 a-f	70A	5.333 ± 1.667 a-e	116A	6.667 ± 0.334 ab
18A	4.333 ± 0.334 b-f	71A	5.000 ± 1.000 a-f	119A	6.000 ± 0.578 a-d
20A	5.667 ± 0.667 a-e	74A	4.667 ± 0.883 a-f	120A	5.000 ± 0.000 a-f
21A	5.500 ± 1.500 a-e	75A	4.667 ± 0.883 a-f	123A	5.000 ± 0.578 a-f
22A	5.000 ± 1.156 a-f	77A	4.000 ± 0.000 c-f	127A	5.000 ± 1.000 a-f
23A	4.667 ± 0.883 a-f	82A	5.333 ± 0.334 a-e	128A	5.667 ± 0.883 a-e
28A	5.333 ± 0.667 a-e	84A	5.333 ± 0.334 a-e	134A	3.667 ± 0.334 def
29A	6.000 ± 0.578 a-d	85A	6.667 ± 0.334 ab	151A	5.667 ± 0.334 a-e
30A	4.000 ± 0.578 c-f	86A	5.667 ± 0.883 a-e	152A	4.000 ± 1.000 c-f
35A	6.000 ± 0.000 a-d	87A	6.333 ± 0.334 abc	153A	5.000 ± 0.578 a-f
37A	3.667 ± 0.334 def	88A	5.000 ± 0.578 a-f	154A	5.333 ± 0.334 a-e
38A	4.333 ± 0.883 b-f	89A	6.667 ± 0.334 ab	155A	4.000 ± 0.000 c-f
42A	6.000 ± 1.000 a-d	90A	5.000 ± 1.000 a-f	156A	4.500 ± 0.500 a-f
47A	7.000 ± 0.000 a	91A	4.667 ± 0.883 a-f	157A	4.000 ± 0.000 c-f
49A	5.667 ± 0.883 a-e	92A	6.667 ± 0.334 ab	178A	5.667 ± 0.667 a-e
55A	3.000 ± 0.578 f	94A	6.333 ± 0.334 abc	181A	4.333 ± 0.334 b-f
56A	5.667 ± 0.883 a-e	104A	5.667 ± 0.883 a-e	185A	4.000 ± 0.000 c-f

¹ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์/คอลัมน์ หมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางภาคผนวกที่ 3 คะแนนการเกิดโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2556

พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE	พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE	พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE
CN72	6.333 ± 0.334 a-d	40C	1.333 ± 0.334 lm	77C	7.000 ± 0.000 a
V4785	1.333 ± 0.334 lm	41C	1.667 ± 0.334 j-m	78C	6.333 ± 0.667 a-d
1C	6.000 ± 1.003 a-e	42C	5.333 ± 0.883 a-g	79C	7.000 ± 0.000 a
2C	4.000 ± 2.006 a-l	43C	1.000 ± 0.000 m	80C	4.667 ± 1.455 a-j
4C	3.500 ± 2.507 a-m	44C	2.000 ± 0.578 i-m	81C	6.333 ± 0.334 a-d
5C	4.500 ± 2.507 a-j	45C	2.333 ± 0.667 g-m	82C	4.667 ± 1.203 a-j
7C	6.000 ± 1.003 a-e	46C	2.333 ± 0.667 g-m	83C	6.667 ± 0.334 ab
8C	1.500 ± 0.501 klm	47C	5.667 ± 0.334 a-f	86C	6.333 ± 1.203 a-d
9C	3.500 ± 1.504 a-m	48C	6.000 ± 0.578 a-e	87C	6.667 ± 0.334 ab
10C	1.000 ± 0.000 m	49C	6.667 ± 0.883 ab	94C	2.333 ± 0.334 g-m
11C	2.000 ± 1.003 i-m	51C	1.333 ± 0.334 lm	95C	5.000 ± 1.001 a-h
12C	5.000 ± 3.009 a-h	52C	5.667 ± 1.203 a-f	96C	5.667 ± 0.883 a-f
14C	1.667 ± 0.667 j-m	53C	1.333 ± 0.334 lm	97C	5.667 ± 1.335 a-f
15C	5.000 ± 0.578 a-h	54C	1.000 ± 0.000 m	99C	4.000 ± 0.000 a-l
16C	4.667 ± 1.203 a-j	55C	5.333 ± 0.883 a-g	102C	5.000 ± 2.006 a-h
17C	3.667 ± 0.883 a-m	56C	5.000 ± 0.578 a-h	106C	2.333 ± 0.667 g-m
18C	4.000 ± 0.578 a-l	57C	5.000 ± 1.156 a-h	107C	6.333 ± 1.203 a-d
19C	2.000 ± 0.578 i-m	58C	1.333 ± 0.334 lm	108C	5.667 ± 0.883 a-f
20C	6.000 ± 0.578 a-e	59C	1.667 ± 0.334 j-m	110C	5.667 ± 0.883 a-f
21C	6.000 ± 1.001 a-e	60C	2.333 ± 0.667 g-m	113C	5.667 ± 0.883 a-f
22C	1.667 ± 0.667 j-m	63C	5.000 ± 0.817 a-h	114C	5.000 ± 1.156 a-h
24C	1.000 ± 0.000 m	64C	5.667 ± 0.334 a-f	115C	6.000 ± 1.003 a-e
25C	1.000 ± 0.000 m	67C	6.500 ± 1.226 a-d	116C	2.333 ± 0.334 g-m
27C	5.333 ± 0.334 a-g	69C	1.667 ± 0.667 j-m	118C	5.000 ± 0.578 a-h
29C	5.667 ± 0.667 a-f	70C	5.667 ± 0.334 a-f	120C	6.000 ± 1.156 a-e
32C	4.000 ± 1.529 a-l	71C	7.000 ± 0.000 a	121C	3.667 ± 1.203 a-m
33C	4.667 ± 0.883 a-j	72C	7.000 ± 0.578 a	122C	6.500 ± 0.501 a-d
35C	1.000 ± 0.000 m	73C	7.000 ± 0.578 a	124C	4.000 ± 1.156 a-l
37C	1.667 ± 0.667 j-m	74C	6.000 ± 0.578 a-e	125C	5.000 ± 2.006 a-h
38C	5.000 ± 0.578 a-h	75C	7.000 ± 0.578 a	127C	4.500 ± 1.504 a-j
39C	2.667 ± 0.883 e-m	76C	6.667 ± 0.334 ab	128C	4.000 ± 2.006 a-l

ตารางภาคผนวกที่ 3 คะแนนการเกิดโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2556 (ต่อ)

พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE	พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE	พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE
129C	3.000 ± 1.003 c-m	145C	6.500 ± 0.501 a-d	163C	7.000 ± 0.000 a
130C	5.000 ± 2.006 a-h	147C	7.000 ± 1.003 a	164C	1.667 ± 0.667 j-m
131C	1.000 ± 0.000 m	150C	5.500 ± 0.501 a-g	166C	1.333 ± 0.334 lm
132C	4.500 ± 1.504 a-j	151C	5.667 ± 0.667 a-f	168C	6.333 ± 0.334 a-d
133C	1.500 ± 0.501 klm	152C	4.667 ± 1.203 a-j	169C	5.667 ± 0.883 a-f
135C	3.000 ± 0.000 c-m	153C	5.333 ± 1.203 a-g	171C	6.000 ± 0.578 a-e
136C	6.500 ± 0.501 a-d	154C	1.333 ± 0.334 lm	173C	4.000 ± 1.156 a-l
139C	5.000 ± 2.006 a-h	155C	5.000 ± 1.529 a-h	175C	3.667 ± 1.669 a-m
140C	4.500 ± 2.507 a-j	156C	4.333 ± 1.858 a-l	182C	2.000 ± 0.578 i-m
141C	6.500 ± 0.501 a-d	157C	4.500 ± 2.507 a-j	183C	4.500 ± 2.507 a-j
142C	6.500 ± 1.504 a-d	159C	6.000 ± 1.003 a-e	186C	2.667 ± 0.667 e-m
144C	4.500 ± 1.504 a-j	160C	6.500 ± 0.501 a-d		

¹ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์/คอลัมน์ หมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางภาคผนวกที่ 4 คะแนนการเกิดโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2559

พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE	พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE	พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE
CN72	6.000 ± 0.000 abc	40C	6.667 ± 0.334 ab	77C	7.000 ± 0.000 a
V4785	1.000 ± 0.000 q	41C	5.667 ± 0.883 a-d	78C	6.333 ± 0.667 ab
1C	6.667 ± 0.334 ab	42C	6.000 ± 0.578 abc	79C	6.333 ± 0.334 ab
2C	6.333 ± 0.334 ab	43C	3.000 ± 0.578 h-q	80C	6.333 ± 0.334 ab
4C	5.000 ± 1.156 a-j	44C	2.000 ± 1.003 n-q	81C	6.667 ± 0.334 ab
5C	3.000 ± 1.156 h-q	45C	2.667 ± 1.669 j-q	82C	5.667 ± 0.334 a-d
7C	3.500 ± 0.501 c-o	46C	2.000 ± 1.001 n-q	83C	6.333 ± 0.334 ab
8C	6.000 ± 0.578 abc	47C	2.667 ± 0.883 j-q	86C	6.333 ± 0.667 ab
9C	6.000 ± 0.578 abc	48C	6.667 ± 0.334 ab	87C	6.333 ± 0.667 ab
10C	1.000 ± 0.000 q	49C	6.333 ± 0.334 ab	94C	3.667 ± 1.203 c-o
11C	2.000 ± 0.578 n-q	51C	1.500 ± 0.501 opq	95C	6.333 ± 0.334 ab
12C	5.667 ± 0.334 a-d	52C	6.667 ± 0.334 ab	96C	5.667 ± 0.883 a-d
14C	2.333 ± 1.335 m-q	53C	1.333 ± 0.334 pq	97C	5.667 ± 1.335 a-d
15C	6.500 ± 0.501 ab	54C	1.000 ± 0.000 q	99C	2.667 ± 0.334 j-q
16C	1.000 ± 0.000 q	55C	1.000 ± 0.000 q	102C	3.000 ± 1.001 h-q
17C	4.667 ± 0.883 a-k	56C	5.000 ± 1.529 a-j	106C	1.333 ± 0.334 pq
18C	5.333 ± 0.667 a-g	57C	6.333 ± 0.334 ab	107C	6.667 ± 0.334 ab
19C	1.000 ± 0.000 q	58C	3.000 ± 0.000 e-p	108C	6.667 ± 0.334 ab
20C	4.667 ± 0.883 a-k	59C	1.000 ± 0.000 q	110C	7.000 ± 0.000 a
21C	6.500 ± 0.501 ab	60C	1.667 ± 0.667 opq	113C	5.667 ± 0.334 a-d
22C	2.667 ± 0.883 j-q	63C	2.667 ± 0.883 j-q	114C	5.667 ± 0.883 a-d
24C	2.333 ± 1.335 m-q	64C	2.333 ± 1.335 m-q	115C	1.000 ± 0.000 q
25C	2.000 ± 0.578 n-q	67C	6.667 ± 0.334 ab	116C	1.000 ± 0.000 q
27C	3.000 ± 1.156 h-q	69C	3.667 ± 1.203 c-o	118C	5.000 ± 0.578 a-j
29C	5.667 ± 0.334 a-d	70C	7.000 ± 0.000 a	120C	6.333 ± 0.334 ab
32C	6.000 ± 0.000 abc	71C	6.667 ± 0.334 ab	121C	4.667 ± 0.883 a-k
33C	4.667 ± 1.203 a-k	72C	6.000 ± 1.001 abc	122C	6.000 ± 0.000 abc
35C	1.667 ± 0.667 opq	73C	6.000 ± 0.578 abc	124C	6.000 ± 0.578 abc
37C	2.000 ± 0.578 n-q	74C	6.333 ± 0.334 ab	125C	6.000 ± 0.578 abc
38C	2.000 ± 0.578 n-q	75C	6.333 ± 0.334 ab	127C	6.333 ± 0.334 ab
39C	6.333 ± 0.334 ab	76C	6.000 ± 0.578 abc	128C	4.333 ± 0.883 a-m

ตารางภาคผนวกที่ 4 คะแนนการเกิดโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2559 (ต่อ)

พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE	พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE	พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE
129C	5.000 ± 1.001 a-j	145C	6.333 ± 0.334 ab	163C	6.333 ± 0.334 ab
130C	4.000 ± 0.578 b-n	147C	6.333 ± 0.334 ab	164C	1.333 ± 0.334 pq
131C	1.000 ± 0.000 q	150C	6.333 ± 0.667 ab	166C	2.000 ± 1.001 n-q
132C	2.333 ± 0.667 m-q	151C	6.333 ± 0.334 ab	168C	6.333 ± 0.334 ab
133C	3.333 ± 0.667 d-p	152C	6.333 ± 0.334 ab	169C	7.000 ± 0.000 a
135C	5.000 ± 0.000 a-j	153C	4.667 ± 1.335 a-k	171C	6.667 ± 0.334 ab
136C	1.000 ± 0.000 q	154C	2.000 ± 0.578 n-q	173C	5.667 ± 1.335 a-d
139C	5.333 ± 0.583 a-g	155C	1.667 ± 0.334 opq	175C	1.000 ± 0.000 q
140C	5.333 ± 0.883 a-g	156C	5.667 ± 0.883 a-d	182C	2.000 ± 0.578 n-q
141C	6.333 ± 0.334 ab	157C	6.333 ± 0.334 ab	183C	6.333 ± 0.334 ab
142C	7.000 ± 0.000 a	159C	6.667 ± 0.334 ab	186C	6.333 ± 0.334 ab
144C	5.333 ± 1.203 a-g	160C	2.000 ± 0.578 n-q		

¹ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์/คอลัมน์ หมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางภาคผนวกที่ 5 คะแนนการเกิดโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ.
2559

พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE	พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE	พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE
CN72	4.000 ± 0.000 abc	34B	1.667 ± 0.333 efg	70B	1.333 ± 0.333 fg
V4718	1.667 ± 0.333 efg	35B	1.333 ± 0.333 fg	71B	2.000 ± 0.000 d-g
2B	2.333 ± 0.333 b-g	36B	1.000 ± 0.000 g	73B	3.667 ± 0.333 a-d
4B	3.333 ± 0.667 a-e	37B	3.667 ± 0.882 a-d	74B	3.000 ± 0.577 a-f
5B	1.333 ± 0.333 fg	42B	2.333 ± 0.333 b-g	77B	2.333 ± 0.882 b-g
6B	2.000 ± 0.577 d-g	43B	1.333 ± 0.333 fg	78B	1.667 ± 0.333 efg
7B	1.667 ± 0.667 efg	44B	3.000 ± 0.577 a-f	80B	2.333 ± 0.882 b-g
8B	2.333 ± 0.333 b-g	45B	3.333 ± 0.667 a-e	81B	3.333 ± 0.667 a-e
10B	1.333 ± 0.333 fg	46B	4.000 ± 0.000 abc	82B	2.000 ± 0.577 d-g
11B	1.333 ± 0.333 fg	47B	3.333 ± 0.667 a-e	83B	2.000 ± 1.000 d-g
12B	2.000 ± 0.577 d-g	48B	3.000 ± 0.577 a-f	84B	1.667 ± 0.333 efg
13B	2.000 ± 0.577 d-g	50B	3.333 ± 0.333 a-e	85B	1.000 ± 0.000 g
15B	1.333 ± 0.333 fg	51B	3.000 ± 1.000 a-f	86B	2.000 ± 0.000 d-g
16B	1.667 ± 0.333 efg	52B	3.000 ± 0.577 a-f	87B	3.000 ± 0.000 a-f
17B	2.333 ± 0.333 b-g	53B	1.667 ± 0.333 efg	88B	2.000 ± 0.000 d-g
19B	1.667 ± 0.667 efg	54B	2.333 ± 0.333 b-g	89B	2.333 ± 0.882 b-g
20B	2.000 ± 0.577 d-g	55B	1.667 ± 0.333 efg	90B	1.333 ± 0.333 fg
21B	1.000 ± 0.000 g	57B	1.667 ± 0.333 efg	91B	1.333 ± 0.333 fg
22B	1.000 ± 0.000 g	58B	2.000 ± 0.000 d-g	92B	3.333 ± 0.667 a-e
23B	3.333 ± 0.667 a-e	59B	2.000 ± 0.577 d-g	94B	1.000 ± 0.000 g
24B	3.000 ± 0.577 a-f	60B	2.333 ± 0.333 b-g	95B	1.000 ± 0.000 g
25B	3.000 ± 0.577 a-f	61B	3.667 ± 0.882 a-d	96B	2.000 ± 0.577 d-g
27B	2.000 ± 0.577 d-g	62B	3.333 ± 0.667 a-e	97B	1.333 ± 0.333 fg
28B	1.333 ± 0.333 fg	63B	3.333 ± 0.667 a-e	98B	1.000 ± 0.000 g
29B	1.667 ± 0.333 efg	64B	4.000 ± 0.000 abc	99B	3.667 ± 0.333 a-d
30B	1.333 ± 0.000 fg	66B	1.667 ± 0.667 efg	100B	1.667 ± 0.333 efg
31B	3.667 ± 0.667 a-d	67B	2.000 ± 0.577 d-g	101B	3.333 ± 0.882 a-e
32B	4.000 ± 0.000 abc	68B	1.000 ± 0.000 g	102B	1.667 ± 0.333 efg
33B	2.000 ± 1.000 d-g	69B	4.000 ± 0.577 abc	104B	3.333 ± 0.333 a-e

ตารางภาคผนวกที่ 5 คะแนนการเกิดโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2559 (ต่อ)

พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE	พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE	พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE
105B	3.000 ± 0.577 a-f	133B	4.000 ± 0.577 abc	162B	3.667 ± 0.882 a-d
106B	4.000 ± 0.000 abc	134B	2.333 ± 0.333 b-g	164B	3.667 ± 0.333 a-d
107B	3.667 ± 0.882 a-d	135B	3.667 ± 0.882 a-d	165B	3.000 ± 0.577 a-f
109B	3.667 ± 0.333 a-d	137B	3.667 ± 0.333 a-d	166B	1.000 ± 0.000 g
110B	3.000 ± 0.577 a-f	140B	1.333 ± 0.333 fg	167B	1.667 ± 0.333 efg
111B	2.333 ± 0.333 b-g	141B	3.333 ± 0.667 a-e	168B	1.333 ± 0.333 fg
112B	3.000 ± 0.577 a-f	143B	3.333 ± 0.667 a-e	169B	1.333 ± 0.333 fg
114B	3.667 ± 0.333 a-d	144B	4.000 ± 0.000 abc	170B	1.000 ± 0.000 g
115B	2.333 ± 0.882 b-g	145B	3.333 ± 0.667 a-e	172B	2.333 ± 0.882 b-g
118B	3.000 ± 0.577 a-f	147B	2.000 ± 0.000 d-g	173B	1.667 ± 0.333 efg
119B	3.667 ± 0.882 a-d	148B	2.000 ± 0.577 d-g	174B	1.333 ± 0.333 fg
120B	3.333 ± 0.333 a-e	151B	4.000 ± 0.000 abc	175B	3.000 ± 1.000 a-f
121B	4.000 ± 0.000 abc	152B	3.667 ± 0.333 a-d	177B	3.333 ± 0.333 a-e
123B	1.333 ± 0.333 fg	153B	3.000 ± 0.577 a-f	181B	3.000 ± 1.000 a-f
124B	1.667 ± 0.333 efg	155B	1.333 ± 0.333 fg	182B	3.333 ± 0.667 a-e
125B	2.333 ± 0.333 b-g	156B	1.333 ± 0.333 fg	183B	4.333 ± 0.333 ab
126B	3.333 ± 1.202 a-e	157B	1.667 ± 0.333 efg	184B	1.667 ± 0.333 efg
127B	1.667 ± 0.667 efg	158B	3.000 ± 0.577 a-f	185B	1.667 ± 0.333 efg
130B	2.000 ± 0.577 d-g	159B	1.667 ± 0.333 efg	186B	1.000 ± 0.000 g
131B	3.333 ± 0.667 a-e	160B	2.000 ± 0.000 d-g	187B	3.333 ± 0.333 a-e
132B	4.667 ± 0.333 a	161B	3.000 ± 0.577 a-f		

¹ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์/คอลัมน์หมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางภาคผนวกที่ 6 คะแนนการเกิดโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ.
2560

พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE	พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE	พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE
CN72	3.667 ± 0.667 a-e	34B	3.000 ± 0.577 a-g	70B	2.667 ± 0.882 b-h
V4718	2.667 ± 0.333 b-h	35B	3.333 ± 0.333 a-e	71B	3.333 ± 0.333 a-e
2B	1.667 ± 0.667 hij	36B	1.333 ± 0.333 ij	73B	3.333 ± 0.882 a-e
4B	3.667 ± 0.667 a-e	37B	4.000 ± 0.000 abc	74B	3.667 ± 0.333 a-e
5B	2.500 ± 0.500 d-h	42B	1.333 ± 0.333 ij	77B	3.667 ± 0.667 a-e
6B	2.500 ± 0.500 d-h	43B	1.333 ± 0.882 ij	78B	2.500 ± 0.500 d-h
7B	3.667 ± 0.667 a-e	44B	3.333 ± 0.882 a-e	80B	2.667 ± 0.667 b-h
8B	3.667 ± 0.667 a-e	45B	4.333 ± 0.333 a	81B	3.667 ± 0.667 a-e
10B	2.000 ± 0.577 g-j	46B	3.667 ± 0.667 a-e	82B	3.000 ± 0.000 a-g
11B	4.000 ± 0.577 abc	47B	3.333 ± 0.333 a-e	83B	3.667 ± 0.667 a-e
12B	3.667 ± 0.667 a-e	48B	3.333 ± 0.333 a-e	84B	1.333 ± 0.333 ij
13B	2.667 ± 0.333 b-h	50B	3.667 ± 0.333 a-e	85B	1.667 ± 0.333 hij
15B	3.333 ± 0.333 a-e	51B	3.333 ± 0.333 a-e	86B	2.667 ± 0.333 b-h
16B	2.667 ± 0.333 b-h	52B	3.667 ± 0.667 a-e	87B	3.667 ± 0.667 a-e
17B	2.667 ± 0.333 b-h	53B	3.000 ± 0.577 a-g	88B	3.000 ± 0.000 a-g
19B	2.500 ± 0.500 d-h	54B	2.333 ± 0.333 d-i	89B	2.333 ± 0.333 d-i
20B	3.333 ± 0.333 a-e	55B	2.667 ± 0.882 b-h	90B	1.667 ± 0.333 hij
21B	2.333 ± 0.333 d-i	57B	2.333 ± 0.333 d-i	91B	2.333 ± 0.667 d-i
22B	2.667 ± 0.667 b-h	58B	3.667 ± 0.882 a-e	92B	3.333 ± 0.333 a-e
23B	3.333 ± 0.882 a-e	59B	3.000 ± 0.000 a-g	94B	1.000 ± 0.000 j
24B	2.667 ± 0.333 b-h	60B	4.000 ± 0.577 abc	95B	1.000 ± 0.000 j
25B	3.000 ± 0.000 a-g	61B	4.000 ± 0.577 abc	96B	2.333 ± 0.333 d-i
27B	3.333 ± 0.333 a-e	62B	1.333 ± 0.333 ij	97B	2.000 ± 0.000 g-j
28B	2.667 ± 0.333 b-h	63B	3.000 ± 0.000 a-g	98B	1.000 ± 0.000 j
29B	1.333 ± 0.333 ij	64B	3.000 ± 0.000 a-g	99B	2.333 ± 0.333 d-i
30B	1.333 ± 0.333 ij	66B	3.000 ± 0.577 a-g	100B	2.000 ± 0.577 g-j
31B	3.667 ± 0.333 a-e	67B	3.000 ± 0.577 a-g	101B	3.333 ± 0.882 a-e
32B	3.333 ± 0.333 a-e	68B	2.667 ± 0.333 b-h	102B	3.333 ± 0.882 a-e
33B	1.333 ± 0.333 ij	69B	3.333 ± 0.333 a-e	104B	3.333 ± 0.882 a-e

ตารางภาคผนวกที่ 6 คะแนนการเกิดโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ.
2560 (ต่อ)

พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE	พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE	พันธุ์/ สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ย ± SE
105B	3.667 ± 0.667 a-e	133B	3.333 ± 0.667 a-e	162B	3.000 ± 0.000 a-g
106B	4.000 ± 0.577 abc	134B	3.667 ± 0.667 a-e	164B	3.000 ± 0.000 a-g
107B	2.000 ± 0.000 g-j	135B	4.000 ± 0.577 abc	165B	3.000 ± 0.000 a-g
109B	4.000 ± 0.577 abc	137B	4.333 ± 0.333 a	166B	1.000 ± 0.000 j
110B	3.667 ± 0.667 a-e	140B	1.667 ± 0.333 hij	167B	1.667 ± 0.333 hij
111B	1.333 ± 0.333 ij	141B	3.333 ± 0.882 a-e	168B	2.667 ± 0.333 b-h
112B	3.000 ± 0.577 a-g	143B	3.000 ± 1.000 a-g	169B	2.667 ± 0.333 b-h
114B	3.667 ± 0.882 a-e	144B	3.333 ± 0.333 a-e	170B	2.667 ± 0.667 b-h
115B	2.333 ± 0.333 d-i	145B	3.333 ± 0.333 a-e	172B	2.667 ± 0.667 b-h
118B	2.667 ± 0.667 b-h	147B	2.000 ± 0.577 g-j	173B	2.667 ± 0.333 b-h
119B	3.333 ± 0.333 a-e	148B	2.667 ± 0.333 b-h	174B	1.667 ± 0.667 hij
120B	3.667 ± 0.333 a-e	151B	3.667 ± 0.667 a-e	175B	2.000 ± 0.577 g-j
121B	3.000 ± 0.577 a-g	152B	3.000 ± 0.000 a-g	177B	3.667 ± 0.667 a-e
123B	1.667 ± 0.333 hij	153B	3.667 ± 0.667 a-e	181B	3.667 ± 0.667 a-e
124B	2.000 ± 0.000 g-j	155B	1.667 ± 0.333 hij	182B	4.000 ± 0.577 abc
125B	2.333 ± 0.667 d-i	156B	2.333 ± 0.667 d-i	183B	3.667 ± 0.667 a-e
126B	3.667 ± 0.667 a-e	157B	1.667 ± 0.333 hij	184B	3.333 ± 0.333 a-e
127B	3.333 ± 0.333 a-e	158B	3.333 ± 0.333 a-e	185B	1.333 ± 0.333 ij
130B	2.000 ± 0.000 g-j	159B	3.667 ± 0.667 a-e	186B	1.000 ± 0.000 j
131B	3.333 ± 0.333 a-e	160B	3.000 ± 0.000 a-g	187B	3.000 ± 0.000 a-g
132B	4.000 ± 0.577 abc	161B	4.000 ± 0.577 abc		

¹ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± SE ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในสดมภ์/คอลัมน์หมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางภาคผนวกที่ 7 ค่าการวิเคราะห์ของคะแนนการเกิดโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2558

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	65	12.501	0.192	9.559**	0.000
Block	2	0.120	0.060	2.976 ^{ns}	0.054
Error	130	2.616	0.020		
Corrected Total	197	15.237			

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 8 ค่าการวิเคราะห์ของคะแนนการเกิดโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4758 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2561

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	65	6.999	0.108	1.928**	0.001
Block	2	0.164	0.082	1.465 ^{ns}	0.235
Error	126	7.038	0.056		
Corrected Total	193	14.168			

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 9 ค่าการวิเคราะห์ของคะแนนการเกิดโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2556

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	127	70.736	0.557	4.893**	0.000
Block	2	0.755	0.378	3.316*	0.038
Error	215	24.474	0.114		
Corrected Total	344	95.958			

* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%; ** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางภาคผนวกที่ 10 ค่าการวิเคราะห์ของคะแนนการเกิดโรคราแป้งในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4785 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2559

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	127	89.220	0.703	9.438**	0.000
Block	2	0.024	0.012	0.161 ^{ns}	0.852
Error	247	18.385	0.074		
Corrected Total	376	107.654			

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%; ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 11 ค่าการวิเคราะห์ของคะแนนการเกิดโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2559

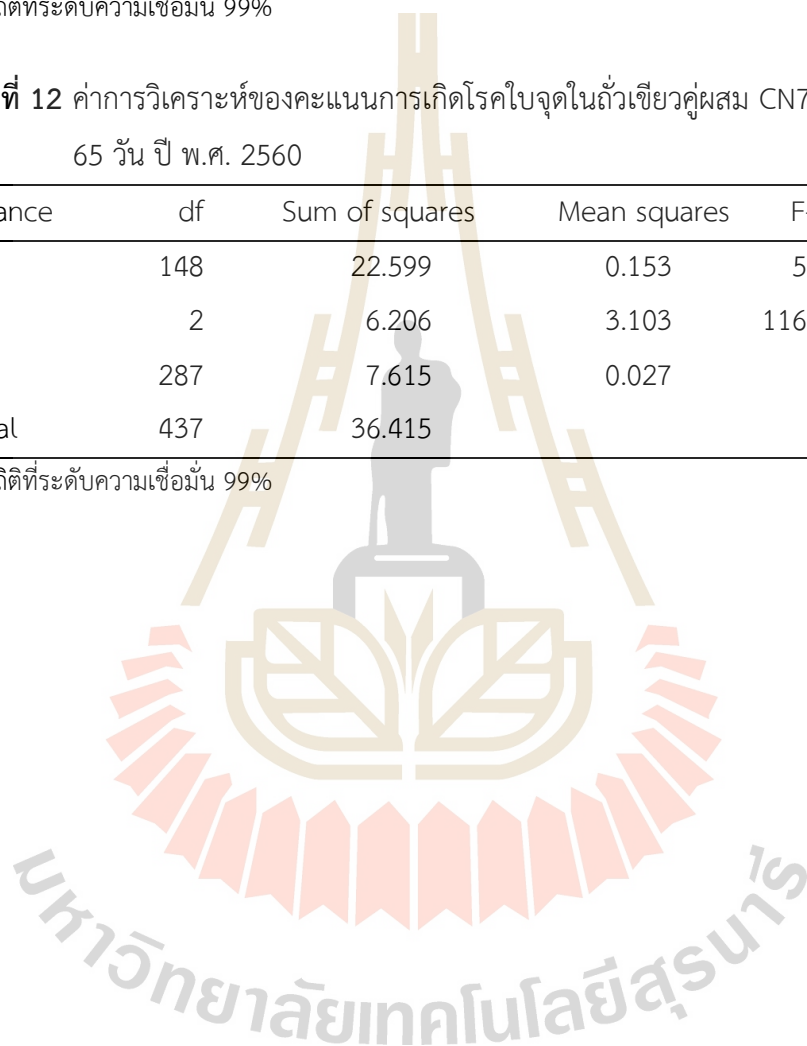
Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	148	30.687	0.207	3.787**	0.000
Block	2	1.044	0.522	9.532**	0.000
Error	295	16.151	0.055		
Corrected Total	445	47.825			

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางภาคผนวกที่ 12 ค่าการวิเคราะห์ของคะแนนการเกิดโรคใบจุดในถั่วเขียวคู่ผสม CN72 x V4718 ที่อายุ 65 วัน ปี พ.ศ. 2560

Source of variance	df	Sum of squares	Mean squares	F-value	Pr > F
Variety	148	22.599	0.153	5.755**	0.000
Block	2	6.206	3.103	116.953**	0.000
Error	287	7.615	0.027		
Corrected Total	437	36.415			

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%



ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาง ปิยะดา อลิมาณ์ นามสกุล ตันตสวัสดิ์ (นามสกุลเดิม ทิพยพ่อง)
(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Piyada Alisha Tantasawat (Thipyapong)
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3100900033308
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ.เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทร. 0-4422-4204 โทรสาร 0-4422-4150 E-mail: piyada@sut.ac.th
5. ประวัติการศึกษา
 - 1) ปริญญาตรี สาขาวิชาเกษตร สถาบัน ม. เกษตรศาสตร์
ปีที่สำเร็จ 1988 (เกียรตินิยมอันดับ 1)
 - 2) ปริญญาโท ไม่มี (เข้าศึกษาต่อปริญญาเอกหลังจบปริญญาตรี)
 - 3) ปริญญาเอก สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืช (Plant Breeding) สถาบัน Cornell University
สหรัฐอเมริกา ปีที่สำเร็จ 1997
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
Plant Biotechnology, Plant Molecular Biology, Plant Breeding
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยและงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ :
ระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่า เป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วม
วิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น
 - 7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย:
 - 1) การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) ดับเบิลแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร
 - 2) การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) สายพันธุ์แท้โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร
 - 3) บทบาทของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases) ในการต้านทานของมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* L.) ต่อการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* (F.))
 - 4) การจัดทำสายพันธุ์ดีเอ็นเอของถั่วฝักยาว ถั่วฝักยาวไร่ค้าง ถั่วเขียว และถั่วเหลือง
 - 5) การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวเพื่อเพิ่มผลผลิต

- 6) การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวเพื่อเพิ่มผลผลิต ระยะที่ 2
- 7) การปรับปรุงพันธุ์องุ่น (*Vitis* spp.) ให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง
- 8) การปรับปรุงพันธุ์องุ่น (*Vitis* spp.) ให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างและโรคสแคบ ระยะที่ 2
- 9) การพัฒนาพันธุ์แตงกวา (*Cucumis sativus* L.) ลูกผสมที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง
- 10) การพัฒนาพันธุ์ maintainer line ของทานตะวันโดยการรวมโปรโตพลาสต์
- 11) การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายด้วยวิธีการยาลายพันธุ์เพื่อให้ต้านทานโรคเน่าดำ
- 12) การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้ง และการรวมยีนต้านทานในถั่วเขียว
- 13) การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายด้วยวิธีการยาลายพันธุ์เพื่อให้ต้านทานโรคเน่าดำ ระยะที่ 2
- 14) การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคราแป้งและโรคใบจุด และการรวมยีนต้านทานในถั่วเขียว ระยะที่ 2

7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว: ชื่อแผนงานวิจัย และ/หรือโครงการวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และสถานภาพในการทำวิจัย

- 1) การโคลนกลุ่มของยีนต้านทานโรค (RGAs) เพื่อให้ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในองุ่น (*Vitis* spp.). (2547). การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 4, เชียงใหม่ หัวหน้าโครงการ (นศ. นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 2) การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วฝักยาว ถั่วฝักยาวไร้ค้ำ ถั่วเขียว และถั่วเหลือง. (2551). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. หัวหน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 3) การจำแนกพันธุ์ถั่วฝักยาวไร้ค้ำและถั่วฝักยาวโดยใช้ ISSR analysis. (2548). การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5, ชลบุรี. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 4) การตรวจสอบลูกผสมถั่วเขียวชั่วที่หนึ่งโดยเครื่องหมายโมเลกุล ISSR. (2549). การประชุมวิชาการพืชไร่วงศ์ถั่วแห่งชาติ ครั้งที่ 1, เชียงราย. หัวหน้าโครงการ (นศ. นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 5) การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบถั่วเขียว (*Vigna radiata*). (2547). การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 4, เชียงใหม่. หัวหน้าโครงการ (นศ. นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 6) การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) ดับเบิลแฮพลอยด์โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร. (2547). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. หน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 7) การผลิตข้าวโพด (*Zea mays* L.) สายพันธุ์แท้โดยการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร. (2547). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. หัวหน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 8) การแยกโปรโตพลาสต์ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) จากเนื้อเยื่อใบ (2551). การประชุมวิชาการ งานเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2551 “พลังงานทดแทน แก่นเกษตรยั่งยืน พันธุ์สิ่งแวดล้อม น้อมรับพระราชดำริ”, พิษณุโลก. หัวหน้าโครงการ (นศ. นำเสนอผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

- 9) การแยกโปรโตพลาสต์ทานตะวัน. (2550). การประชุมวิชาการ งาน ทานตะวัน ละหุ่ง และคำฝอย แห่งชาติ ครั้งที่ 5, น่าน. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอฟผลงาน) แหล่งทุน สำนักงาน คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 10) การส่งเสริมการเจริญเติบโตของต้นข้าวโพดภายใต้สภาพ photoautotrophic. (2546). การประชุมศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติประจำปี นครปฐม. หัวหน้าโครงการ (นศ. นำเสนอฟผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 11) การแสดงออกของยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสของมะเขือเทศในเซลล์ยีสต์. (2551). การประชุม วิชาการ งานเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2551 “พลังงานทดแทน แก่นเกษตรยั่งยืน พืชวี สิ่งแวดล้อม น้อมรับพระราชดำริ”, พิษณุโลก. ผู้ร่วมวิจัย (นศ.นำเสนอฟผลงาน) แหล่งทุน DUO-FRANCE
- 12) บทบาทของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidases) ในการต้านทานของมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* L.) ต่อการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* (F.)). (2548). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. หน้าโครงการ แหล่งทุน สำนักงานพัฒนา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
- 13) ผลของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในมะเขือเทศต่อความต้านทานของหนอนกระทู้หอม. (2548). การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5, ชลบุรี. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอฟ ผลงาน)
- 14) A simple and highly efficient protocol for somatic embryogenesis and plant regeneration from proembryonic mass suspension culture in ‘Autumn Royal Seedless’. (2007). *Vitis* 46(1): 45-46. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4
- 15) Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. (2004). *Planta* 220: 105-117. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
- 16) Application of ISSR markers for verification of F₁ hybrids in mungbean (*Vigna radiata*). (2012). *Genet. Mol. Res.* 11: 3329-3338. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 17) Assessment of *Phytophthora palmivora* culture filtrates from different media on *in vitro* selection of black rot resistance in *Dendrobium*. (2012). The 2nd Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation. Oct 28-Nov 1, Phuket, Thailand หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอฟผลงาน) แหล่งทุนสำนักงานกองทุนสนับสนุน การวิจัย
- 18) Association between root length density and seed yield in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). (2012). *Env. Res. J.* 6: 50-56. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 19) Association of ISSR markers with resistance to powdery mildew in mungbean. (2012). 10th International Congress on Plant Molecular Biology, October 21-26, ICC, Jeju Island, Republic of Korea หัวหน้าโครงการและผู้เสนอฟผลงาน แหล่งทุน สำนักงาน คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

- 20) Association of RGA-SSCP markers with resistance to downy mildew and anthracnose in grapevines. (2012). *Gen. Mol. Res.* 11: 1799-1809. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 21) Chitosan stimulates growth of micropropagated *Dendrobium* plantlets. (2010). *Acta Hort* 878: 205-212. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 22) Cloning of resistance gene analogs (RGAs) in grapevine (*Vitis cinerea*). (2005). International Grape Genomics Symposium, St. Louis, USA. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 23) Cloning of resistance gene analogs (RGAs) in grapevine hybrid. (2006). The 9th International Conference on Grape Genetics and Breeding, Udine, Italy. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 24) Correlation of total dry matter (TDM) with seed yield in mungbean. (2010). The International Conference on Sustainable Community Development. Jan 21-23, Nong Khai Campus Khon Kaen University and Vientiane, Lao PDR. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนองาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 25) Cultural characteristics of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grape anthracnose on different media. (2009). *Suranaree J. Sci. Technol.* 6(2): 149-157. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 26) Defensive role of polyphenol oxidases against *Pseudomonas syringae* pv. tomato. (1996). Annual Meeting of the American Society of Plant Physiologists, San Antonio, Texas. *Plant Physiol.* 111s: 168. ผู้ร่วมวิจัยและเสนองาน
- 27) Defensive role of tomato polyphenol oxidases against cotton bollworm (*Helicoverpa armigera* [Hübner]) and beet armyworm (*Spodoptera exigua* [Hübner]). (2009). *J Chem Ecol* 35: 28-38. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
- 28) Development of food safety software prototype. (2006). *Suranaree J. Sci. Tech.* 13: 101-111. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4
- 29) Development of ISSR-RGA markers linked to powdery mildew resistance in mungbean. (2013). The Convergence of Two Major Meetings Joint Conference of HGM 2013 and 21st International Congress of Genetics, April 13-18, The Sands Expo and Convention Center, Marina Bay Sands, Singapore หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 30) Differential expression and turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. (1997). *Plant Physiol.* 113: 707-718. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
- 31) Diversity of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grapevine anthracnose in Thailand. (2006). Proceedings of the International Workshop on Tropical and

- Subtropical Fruits (at Royal Flora Ratchaphruek 2006, International Horticultural Exposition for His Majesty the King). Nov 20-23, 2006, Chiang Mai, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอมผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 32) Effects of colchicine on aseptic culture of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). (1988). ปัญหาพิเศษ
 - 33) Evaluation of genetic variability in *in vitro* sodium azide-induced *Dendrobium* 'Earsakul' mutants. (2014). Genet. Mol. Res. 13(3): 5333-5342. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1
 - 34) Evaluation of grapevines for resistance to downy mildew (*Plasmopara viticola*) under laboratory and field conditions. (2014). S. Afr. J. Enol. Vitic. 35(1): 43-50. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1 แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 - 35) Functional analysis of polyphenol oxidases by antisense/sense technology. (2007). Molecules 12: 1569-1595. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1
 - 36) Genetic diversity and pathogenicity analysis of *Sphaceloma ampelinum* causing grape anthracnose in Thailand. (2010). J. Phytopathol. 158: 837-840. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 5 แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 - 37) Genetic diversity of *Sphaceloma ampelinum* causing grape anthracnose and pathogenicity in laboratory and field conditions. The 4th AG-BIO/PERDO Graduate Conference & UT-KU Joint Seminar, December 9-10, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอมผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 - 38) Genetic diversity of the *Vigna* germplasm from Thailand and neighboring regions revealed by AFLP analysis. (2006). Gen. Res. Crop Evol. 53: 1043-1059. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4
 - 39) Grapevine breeding and genetics. UNESCO-EOLSS (Online Encyclopedia) <http://www.eolss.net/ViewChapter.aspx?CategoryId=10> หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 - 40) Growth and downy mildew resistance of grapevine hybrids. (2010). The International Conference on Sustainable Community Development. Jan 21-23, Nong Khai Campus Khon Kaen University and Vientiane, Lao PDR. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอมผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัย-แห่งชาติ
 - 41) Growth enhancement of *in vitro* maize under photoautotrophic condition. (2003). Annual Meeting of the National Corn and Sorghum Research Center, Nakhon Pathom, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอมผลงาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
 - 42) Identification of chemical mutagen-induced *Dendrobium* 'Earsakul' mutants using ISSR markers. (2012). Molecular Mapping & Marker Assisted Selection International Conference, Feb 8-11, Vienna, Austria. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอมผลงาน แหล่งทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

- 43) Identification of dwarf yard-long bean and yard-long bean cultivars using ISSR analysis. (2005). The Fifth National Horticultural Congress. Apr 26-29, 2005, Chonburi, Thailand. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
- 44) Identification of genes for resistance to powdery mildew in mungbean. (2007). Proceedings of the 8th African Crop Science Society Conference. Oct 27-31, 2007, El-Minia, Egypt. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 45) Identification of genes for powdery mildew resistance in mungbean. (2010). J. Life Sci. 4: 25-29. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 3 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 46) Increasing resistance of tomato to Lepidopteran insects by overexpression of polyphenol oxidase. (2004). 6th World Congress on the Processing Tomato, Melbourne, Australia. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน. แหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
- 47) Induced mutagenesis and *in vitro* selection for black rot resistance in *Dendrobium*. (2014). International Conference on Life Science & Biological Engineering, July 22-24, Renaissance Sapporo Hotel, Hokkaido, Japan หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุนสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
- 48) Inheritance of downy mildew (*Plasmopara viticola*) and anthracnose (*Sphaceloma ampelinum*) resistance in grapevines. (2013). Gen. Mol. Res. 12(4): 6752-6761. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 49) Inhibition of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Phytophthora palmivora* with plant crude extracts. (2012). 2nd International Symposium of Bio-Pesticides and Ecotoxicological Network (2nd IS-BioPEN), September 24-26, Maruay Garden Hotel, Bangkok, Thailand. ผู้ร่วมวิจัย
- 50) Isolation of resistance gene analogs from grapevine resistant and susceptible to downy mildew and anthracnose. (2011). Sci. Hort. 128: 357-363. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 51) Laboratory and field evaluations of resistance to *Sphaceloma ampelinum* causing anthracnose in grapevine. (2012). Aust. Plant Pathol. 41: 263-269. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 5 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 52) Modification of polyphenol oxidase expression in transgenic tomato: role of PPO in disease resistance. (1997). Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Copper Mountain, Colorado. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
- 53) Molecular characterization of *Sphaceloma ampelinum*, causal pathogen of grapevine anthracnose in Thailand. (2007). Proceedings of the 5th International Table Grape Symposium. Nov 14-16, 2007, Cape Town, South Africa. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

- 54) Molecular, morphological and pathogenicity characterization of *Sphaceloma ampelinum* isolates from Thailand. (2006). The 9th International Conference on Grape Genetics and Breeding, Udine, Italy. หัวหน้าโครงการและผู้ยื่นเสนอผลงาน แล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 55) Morphological, pathogenicity and virulence characterization of *Sphaceloma ampelinum* the causal agent of grape anthracnose in Thailand. (2012). Afr. J. Microbiol. Res. 6(10): 2313-2320. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 2
- 56) NBS-LRR-type resistance gene analogs (RGAs) in *Vitis cinerea* B9, *V. rupestris* B38 and 'Horizon. (2006). Proceedings of the International Workshop on Tropical and Subtropical Fruits (at Royal Flora Ratchaphruek 2006, International Horticultural Exposition for His Majesty the King). Nov. 20-23, 2006, Chiang Mai, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 57) Optimization of factors for efficient isolation of protoplasts in sunflower (*Helianthus annuus* L.). (2012). Aust. J. Crop Sci. 6: 1004-1010. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 3 แล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 58) Overexpression of a bacterial branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex in Arabidopsis results in accumulation of branched-chain acyl-CoAs and alteration of free amino acid composition in seeds. (2003). Plant Sci. 165: 1213-1219. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 2
- 59) Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants increases resistance to common cutworm (*Spodoptera litura* (F.)). (2003). Plant Biology 2003, Honolulu, Hawaii. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน
- 60) Overexpression of tomato polyphenol oxidase increases resistance to common cutworm. (2008). Plant Sci.174: 456-466. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 4. แล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
- 61) Polyphenol oxidase gene family: differential expression during vegetative and reproductive development, and in response to injuries, and defensive functional analysis. (1997). Ph.D. thesis. Cornell University, Ithaca, NY. 132 p.
- 62) Polyphenol oxidase-mediated resistance to common cutworm. (2007). Proceedings of the 60th New Zealand Plant Protection Conference. Aug 13-16, 2007, Napia, New Zealand. หัวหน้าโครงการและผู้เสนอผลงาน แล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
- 63) PPO expression and accumulation during pollen germination and pollen tube growth. (2002). Fourteenth Annual Penn State Symposium in Plant Physiology: Plant Reproduction 2002, State College, Pennsylvania. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
- 64) Production of doubled haploid maize (*Zea mays* L.) by anther culture. (2004). AgBiotech Graduate Conference I, Bangkok, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน) แล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

- 65) Pronamide-induced polyploidy in *Rhynchosstylis gigantean* and *Dendrobium*. (2010). The 28th International Horticultural Congress. Aug 22-27, Lisbon, Portugal. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
- 66) Relationships and variability of agronomic and physiological characters in mungbean. (2011). Afr. J. Biotechnol. 10: 9992-10000. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 2 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 67) Resistance gene analogs from *Vitis cinerea*, *Vitis rupestris*, and *Vitis* hybrid Horizon. (2007). Am. J. Enol. Vitic. 58(4): 484-493. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 68) Role of tomato polyphenol oxidase in resistance against beet army worm. (2005). The Fifth National Horticultural Congress. Apr 26-29, 2005, Chonburi, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนอผลงาน)
- 69) Seed yield in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) is correlated with root length density and total dry matter. Popescu E, Golubev I (eds). Beans: Nutrition, Consumption and Health. Nova Science Publishers, New York. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 4 แหล่งทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 70) SSR analysis of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genetic relationship and variety identification in Thailand. (2011). Aust. J. Crop Sci. 5: 283-290. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1 แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 71) Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. (1997). 5th International Congress of Plant Molecular Biology, Singapore. ผู้ร่วมวิจัยและเสนอผลงาน
- 72) Suppression of polyphenol oxidases increases stress tolerance in tomato. (2004). Plant Sci. 167: 693-703. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
- 73) Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. (1995). Phytochemistry 40: 673-676. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
- 74) The effects of proline and coconut water on callus induction of cucumber (*Cucumis sativus* L.). (2010). Acta Hort. 871: 589-597. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1 แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 75) Tomato polyphenol oxidase B is spatially and temporally regulated during development and in response to ethylene. (2011). Molecules 16: 493-517. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 2
- 76) Tomato polyphenol oxidase (PPO) D expression. (in preparation).
- 77) Tomato polyphenol oxidase (PPO): differential response of the PPO F promoter to injuries and wound signals. (1997). Plant Physiol. 115: 409-418. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1
- 78) Tomato polyphenol oxidase (PPO): role of PPO during oxidative stress. (2004). Plant Sci. 167: 693-703. ผู้ร่วมวิจัยและผู้เขียนอันดับ 1

- 79) Variety identification and comparative analysis of genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) using morphological characters, SSR and ISSR analysis. (2010). *Sci. Hort.* 124:204-216. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1 แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 80) Variety identification and genetic relationships of mungbean and blackgram in Thailand based on morphological characters and ISSR analysis. (2010). *African Journal of Biotechnology.* 9(27): 4452-4464. หัวหน้าโครงการและผู้เขียนอันดับ 1 แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 81) Verification of F₁ hybrid using ISSR markers in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Proceedings of the First National Leguminosae Congress. Aug 28-30, 2006, Chiangrai, Thailand. หัวหน้าโครงการ (นศ.นำเสนองาน) แหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
- 82) Wound induction of polyphenol oxidases. (1994). Cornell Center for Advanced Technology, Ithaca, New York, USA. ผู้ร่วมวิจัยและเสนองาน