นิพนธ์ต้นฉบับ

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอตรวจสอบถั่วลิสงลูกผสม ในงานปรับปรุงพันธุ์ต้านทานต่อโรคราสนิม

สุนทรีย์ สุรศร[1] สุวิทย์ เลาหศิริวงศ์[2] ปรีชา ประเทพา[3] และ โสภณ วงศ์แก้ว[4]

Abstract

Surson, S.[1], Loahasiriwong, S.[1], Prathepha, P.[2] and Wongkeaw, S.[3]

Using DNA marker to identify groundnut hybrid in groundnut rust resistance research

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2004, 26(2) : 139-152

There are many important steps in breeding for rust resistant groundnut cultivar e.g. evaluation of resistance levels, and population building. Groundnut is self-pollinated crop, it has a high rate of self- pollination in the breeding program. The use of DNA to classify hybridization would help to make more accurate selection and speed up the progress of work. The population of this study was from crosses of susceptible cultivars (KKU1 and Tainan 9) and resistant cultivar (NC Ac 17090). It was found that in F_1, hybrids had many characteristics in between the parentsícharacters. For example, hybrid of Tainan 9 × NC Ac 17090 had no difference from Tainan 9 in seed weight per plant, width and length of pod, but pod per plant and pod weight per plant had higher values than those of Tainan 9 (high yield cultivar). However, hybrid of KKU2 ×

[1]Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002 Thailand. [2]Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Maha Sarakham University, Maha Sarakham, 44000 Thailand. [3]School of Crop Production Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Rachasima, 30000 Thailand.

[1]นักศึกษาปริญญาเอกสาขาพืชไร่ [2]Ph.D.(Plant Science) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002 [3]Ph.D.(Biology) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000 [4]Ph.D.(Plant Pathology) สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

Corresponding e-mail: sundawn990@hotmail.com

รับต้นฉบับ 17 มิถุนายน 2546 รับลงพิมพ์ 5 กันยายน 2546

NC Ac 17090 had seed weight per plant, width and length of pod values in between those of parents e.g. lower than KKU 1 but higher than NC Ac 17090.

From RAPD technique, 120 primers have been screened. Only one primer (OPO11) showed a difference between NC Ac 17090 and susceptible cultivars (KKU1 and Tainan 9) at 1000 base. So, it was introduced as a tool to select F_1 hybrid. The results indicated that F_1 hybrids were 56.25 and 57.69% from crosses of Tainan 9 × NC Ac 17090 and KKU 1 × NC Ac 17090 respectively. Results from morphological study confirmed that those plants were from hybridization. Correlation of pustule diameter and number of pustules were significant. Results from F_2 indicated that the ratio of susceptible to resistant plants was 15: 1 (p>0.05). However, only 50% of plant with small pustule showed $O11_{1000}$ maker.

Key words : RAPD, groundnut, hybrid, rust, resistance

บทคัดย่อ

สุนทรีย์ สุรศร สุวิทย์ เลาหศิริวงศ์ ปรีชา ประเทพา และ โสภณ วงศ์แก้ว

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอตรวจสอบถั่วลิสงลูกผสม ในงานปรับปรุงพันธุ์ต้านทานต่อโรคราสนิม

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2547 26(2) : 139-152

ในการสร้างพันธุ์ถั่วลิสงเพื่อให้ต้านทานต่อโรคราสนิมมีหลายขั้นตอนที่มีความสำคัญ อาทิ การประเมินระดับความต้านทานและการสร้างประชากร การที่ถั่วลิสงเป็นพืชผสมตัวเองโดยธรรมชาติจึงมีโอกาสที่จะเกิดการผสมตัวเองสูง การใช้เครื่องหมายเอ็นเอในการวินิจฉัยความเป็นลูกผสมจะช่วยให้คัดเลือกลูกผสมได้แม่นยำ และใช้เวลาสั้นลง ในการศึกษานี้ได้ทำการสร้างประชากรถั่วลิสงลูกผสมจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์อ่อนแอผลผลิตสูง (มข.1 และไทนาน 9) กับพันธุ์ต้านทาน (NC Ac 17090) จากการศึกษาลักษณะองค์ประกอบผลผลิตของถั่วลูกผสมเปรียบเทียบกับพ่อแม่ พบว่าลูกผสมชั่วที่ 1 มีองค์ประกอบผลผลิตกึ่งกลางระหว่างพันธุ์พ่อแม่ในหลายลักษณะ จากการคัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 120 ชนิด ด้วยเทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) พบว่ามีไพรเมอร์เพียง 1 ชนิดคือ OPO11 ที่แสดงความแตกต่างระหว่างถั่วลิสงพันธุ์ต้านทาน (NC Ac 17090) และพันธุ์อ่อนแอ (มข.1 และไทนาน 9) โดยแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 1000 คู่เบส จึงกำหนดให้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ($O11_{1000}$) และใช้ในการคัดเลือกลูกผสมชั่วที่ 1 ผลจากการตรวจสอบเพื่อคัดเลือกลูกผสมชั่วที่ 1 พบว่าดอกถั่วลิสงที่ได้ทำการผสมข้ามให้เมล็ดที่เป็นลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างไทนาน 9 × NC Ac 17090 และ มข.1 × NC Ac 17090 เป็น 56.25% และ 57.69% ตามลำดับ และจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกผสมชั่วที่ 1 ในลักษณะดอก สีเข็ม (peg) ลายฝัก และองค์ประกอบผลผลิต พบว่าลูกผสมดังกล่าวมีลักษณะกึ่งกลางระหว่างพ่อแม่สอดคล้องกับการปรากฏแถบเครื่องหมาย $O11_{1000}$ สนับสนุนว่าต้นลูกผสมดังกล่าวเกิดจากการผสมข้าม เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดแผลในแต่ละลำดับใบกับขนาดของแผล และจำนวนแผลกับขนาดแผล พบว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ บ่งถึงว่าควรประเมินระดับความต้านทานต่อโรคราสนิมในลำดับใบเดียวกัน และเมื่อทำการจำแนก และศึกษาอัตราส่วนระดับความต้านทานต่อโรคราสนิมในลูกผสมชั่วที่ 2 ในลักษณะขนาดของแผลจากลำดับใบที่ 4 พบว่ามีสัดส่วนระหว่างต้นอ่อนแอต่อต้นต้านทานไม่แตกต่างจากสัดส่วน 15:1 (P> 0.05) เมื่อพิจารณาจำนวนต้นที่มีขนาดแผลเล็ก พบว่ามีการปรากฏเครื่องหมาย $O11_{1000}$ 50%

โรคราสนิม (*Puccinia arachidis* Spagaziini) ของถั่วลิสงมีการระบาดทั่วโลก ทำให้ผลผลิตฝักของถั่วลิสงลดลงมากกว่า 50% (ปรีชา, 2533) จัดเป็นโรคที่มีความรุนแรงทุกแหล่งปลูก แม้ว่าจะมีวิธีการในการควบคุมโรคราสนิมได้หลายวิธี เช่น การใช้สารเคมี (Jadeja *et al*., 1999) การควบคุมด้วยชีววิธี (Gowdu and Balasubramanian,

1993) การจัดการเกี่ยวกับการปลูก (Naidu and Chandrika,1997) และการใช้พันธุ์ต้านทาน ซึ่งการใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีการที่มีศักยภาพในการลดความรุนแรงของโรคมากที่สุด เพราะเป็นวิธีที่ง่าย และใช้ต้นทุนต่ำ ด้วยเหตุดังกล่าว งานปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงเพื่อการต้านทานต่อโรคราสนิมจึงเกิดขึ้น (Manoharan *et al*., 1990; Reddy *et al*., 1992; Husng *et al*., 1999) ในประเทศไทยมีรายงานว่าถั่วลิสงพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคราสนิม มีลักษณะทางการเกษตรไม่ดีหลายประการ เช่น พันธุ์ NC Ac 17090 มีจงอยฝักแข็ง เปลือกหนา ฝักมีลายเป็นร่างแห เมล็ดมีขนาดเล็กและลีบมาก ในขณะเดียวกันพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงเพื่อให้ต้านทานต่อโรคราสนิมยังคงไม่มีความก้าวหน้ามากนัก เนื่องจากผลผลิตของพันธุ์มีเสถียรภาพต่ำกว่าพันธุ์ส่งเสริม (อารันต์ และคณะ, 2533) จากการศึกษาหลายรายงาน พบว่าลักษณะการต้านทานต่อโรคราสนิมในถั่วลิสงถูกควบคุมด้วยยีนด้อย จำนวน 2 คู่ (Bromfiled and Bailey, 1972 quoted in Hammon, 1987; Cook, 1975 quoted in Hammon, 1987; Kischores, 1981 quoted in Reddy *et al*., 1987; Knauft, 1987) จึงมีความเป็นไปได้สูงในการนำลักษณะการต้านทานจากพันธุ์ต้านทานเข้ามาในพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง อย่างไรก็ตามการปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงมีประเด็นปัญหาหลายประการ อาทิ ประเด็นปัญหาและอุปสรรคในการผสมเกสรเพื่อสร้างประชากร เนื่องจากถั่วลิสงมีลักษณะการออกดอก และการติดฝักแตกต่างจากพืชทั่วไปคือ มีการผสมเกสรเหนือดินแต่ติดฝักใต้ดิน (สนั่น, 2533) อีกทั้งการประเมินระดับความต้านทานต่อโรคราสนิมมีองค์ประกอบหลายปัจจัยที่มีผลต่อการจำแนกระดับความต้านทาน เช่น ความแม่นยำขององค์ประกอบความต้านทานต่อโรคราสนิมที่ใช้ในการประเมินมาตรฐานและความเชี่ยวชาญของผู้ประเมิน เทคนิคที่เลือกใช้ในการประเมิน และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคราสนิม เป็นต้น

การนำเอาเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยเทคนิคเหล่านี้ได้เปิดโอกาสให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชได้ค้นหาเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับลักษณะที่สนใจได้เป็นผลสำเร็จ และใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลเหล่านี้ เป็นเสมือนตัวแทนของลักษณะที่สนใจเพื่อใช้ในการคัดเลือกต้นพืชได้โดยง่าย (Williamson *et al*., 1994; Jin *et al*., 1996; Concibido *et al*., 1997; Melotto *et al*., 1996) เนื่องจากความได้เปรียบของเทคนิค RAPD ในหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคทางโมเลกุลดีเอ็นเออื่นๆ เช่น เทคนิค RAPD เป็นเทคนิคที่ใช้ต้นทุนต่ำ สามารถทำได้ง่าย มีขั้นตอนไม่ซับซ้อน ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย ไม่จำเป็นต้องทำลายต้นพืช (Karp *et al*., 1997) มีการนำเอาเทคนิค RAPD ในการศึกษาและค้นพบเครื่องหมายที่เป็นประโยชน์ในหลายรายงาน เช่น จากการศึกษาในมันแกว พบว่าเครื่องหมาย $OPI17_{1700}$ มีตำแหน่งที่อยู่ใกล้ยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรค anthracnose 2.3 cM (Mignouna *et al*., 2002) จากการศึกษาด้วยเทคนิค RAPD ใน *Phaseolus vulgaris* L. เพื่อค้นหาเครื่องหมายที่สัมพันธ์กับการต้านทานต่อ mosaic virus พบว่าเครื่องหมาย ROC11/350/420 เป็น co-dominant marker กับ *bc-3* และ ROC20/460 เป็น dominant marker กับ *bc-3* แบบ *trans* (Johnson *et al*., 1997) และการศึกษาเพื่อค้นหาเครื่องหมายมีความสัมพันธ์กับความหอมของข้าว พบว่าไพรเมอร์ B (*Jas 1.5*) แสดงแถบขนาด 1.5 กิโลเบส ในพันธุ์ข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม (Jin *et al*., 1996) ดังนั้นจึงเลือกเทคนิค RAPD ในการศึกษาครั้งนี้ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาเครื่องหมาย RAPD และลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของถั่วลิสงในการแสดงการโยกย้ายพันธุกรรม และตรวจสอบความเป็นลูกผสมระหว่างถั่วลิสงพันธุ์ต้านทานต่อโรคราสนิม (NC Ac 17090) กับถั่วลิสงพันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม (มข.1 และไทนาน 9) ที่ไม่ต้านทานต่อโรคราสนิม เพื่อใช้ในการติดตามการถ่ายทอดทางพันธุกรรม และเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

พันธุ์ และการสร้างประชากร

ถั่วลิสงที่ได้รับการคัดเลือกมาใช้ในการศึกษานี้ได้มีการศึกษาเป็นพันธุ์รับรอง และมีข้อมูลพื้นฐานบางส่วนในลักษณะปริมาณมาพอสมควร (วิบูล, 2535; รัชนี, 2536; วิสิทธิ์, 2539) นำไปสู่การตัดสินใจในการเลือกเพื่อใช้ในการศึกษานี้ โดยถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 ได้รับมาจากไต้หวันเป็นถั่วลิสง Spanish type มีลักษณะทรงพุ่มตั้งตรง สีเยื่อ

หุ้มเมล็ดสีชมพู ลายฝักเรียบ มี 2 เมล็ด/ฝัก ให้ผลผลิตสูง อายุการเก็บเกี่ยว 90-100 วัน อ่อนแอต่อโรคราสนิม (สนั่น, 2533) ถั่วลิสงพันธุ์มข.1 ขนาดเมล็ดและฝักโตกว่าไทนาน 9 มีลายฝักชัดเจน มี 2 เมล็ด/ฝัก ให้ผลผลิตสูง อายุ 95-105 วัน อ่อนแอต่อโรคราสนิม ถั่วลิสงพันธุ์ NC Ac 17090 มี ICG number 1697 ถิ่นกำเนิดในเปรู botanical variety อยู่ใน fastigiata เยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลอ่อน เป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรคราสนิม (Subrahyan *et al*., 1980 quoted in Rao, 1987) ในการทดลองนี้ถั่วลิสงที่ใช้เป็นต้นแม่ ได้แก่ ถั่วพันธุ์รับรอง ไทนาน 9 และ มข.1 ใช้ NC Ac 17090 เป็นแหล่งให้ละอองเกสร ทำการผสมข้ามเพื่อให้ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 เพื่อใช้การตรวจสอบความเป็นลูกผสม หลังจากนั้นปล่อยให้ลูกชั่วที่ 1 เกิดการผสมตัวเองเพื่อสร้างประชากรชั่วที่ 2 เพื่อใช้ในการศึกษาหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับการต้านทานต่อโรค

การสกัดดีเอ็นเอ และการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของถั่วลิสงทั้ง 3 พันธุ์ ด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1987) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของของดีเอ็นเอ จากการวัดค่า OD ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร โดยเลือกใช้ดีเอ็นเอที่มีค่าความบริสุทธิ์อยู่ระหว่าง 1.55-2.00 ส่วนระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอปรับระดับความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

การคัดเลือกไพรเมอร์เพื่อใช้ตรวจสอบลูกผสมชั่วที่ 1

คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมจากไพรเมอร์จำนวน 6 ชุด ได้แก่ OPA, OPB, OPAM, OPAS, OPK และ OPO ไพรเมอร์ รวม 120 ชนิด แต่ละชนิดมีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ โดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ซึ่งมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา (reaction mixture) ประกอบด้วย 20 ng DNA template, 1×PCR buffer 3 mM $MgCl_2$ 0.4 mM dNTP และ 0.5 U *Taq* โดยใช้อุณหภูมิก่อนปฏิกิริยา PCR 94ºC เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ และปฏิกริยา PCR จำนวน 45 รอบ ประกอบด้วยขั้นตอน denaturation อุณหภูมิที่ใช้ 94ºC เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน annealing อุณหภูมิที่ใช้ 36ºC เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอน extension อุณหภูมิ 72ºC เป็นเวลา 1 นาที และอุณหภูมิเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา 72ºC เป็นเวลา 5 นาที และตรวจสอบความแตกต่างของ PCR product จากดีเอ็นเอของถั่วลิสงทั้ง 3 พันธุ์ (ไทนาน 9, มข.1 และ NC Ac 17090) ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟอรีซิส (electrophoresis techniques) ให้กระแสไฟฟ้าที่ใช้ความต่างศักย์ 75 โวลท์ ใช้เวลา 150 นาที โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 2% เป็นตัวกลางในการแยก และย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide ตรวจสอบแบบแผนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสง UV เพื่อหาความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอที่เป็นพ่อแม่

การตรวจสอบลักษณะผลผลิต และสัณฐานของถั่วลิสง

หลังจากปลูก และสังเกตลักษณะทางทางสัณฐานวิทยา ทำการผสมถั่วพันธุ์อ่อนแอที่ให้ผลผลิตสูงคือ ไทนาน 9 และมข.1 กับถั่วลิสงพันธุ์ต้านทาน NC Ac 17090 แล้ว เมื่อมีอายุ 110 วัน ทำการเก็บเกี่ยว และตากผลผลิตฝักถั่วลิสง เก็บเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้งสองคู่ผสม (มข.1 กับ NC Ac 17090 และ ไทนาน 9 กับ NC Ac 17090) หลังจากนั้นทำการปลูกเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ศึกษาลักษณะองค์ประกอบผลผลิตของถั่วลิสงเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของฝักและเมล็ด ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และองค์ประกอบผลผลิตของถั่วลิสงทั้ง 3 พันธุ์ และลูกผสมชั่วที่ 1 โดยการตรวจสอบลักษณะต่างๆ ของพันธุ์ที่ทำการศึกษาดังนี้

1. บรรยายลักษณะทางสัณฐาน และผลผลิต
2. เปรียบเทียบผลผลิตของถั่วลิสงทั้ง 3 พันธุ์ และลูกผสมชั่วที่ 1

การตรวจสอบลูกผสมชั่วที่ 1 โดยใช้เทคนิค RAPD-PCR

หลังจากทำการผสมเกสรถั่วลิสงระหว่างไทนาน 9 กับ NC Ac 17090 และ มข.1 กับ NC Ac 17090 เก็บเมล็ด ให้ชื่อลูกผสมเหล่านี้ว่า TN1 และ KN1 ตามลำดับ หลังจากนั้นได้นำเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 เพาะในถุงพลาสติกสีดำขนาดเล็กเพื่อลดการสูญเสียจากการทำลายของศัตรูพืช และเพื่อความมั่นใจว่าไม่มีเมล็ดจากที่อื่นปลอมปน เมื่อต้นกล้าถั่วลิสงมีอายุ 10 วัน ได้ทำการย้ายต้นกล้าลงปลูกใน

แปลงเพาะ หลังจากนั้นเมื่อต้นกล้าถั่วลิสงมีอายุประมาณ 1 เดือน สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของแต่ละต้น และนำดีเอ็นเอของถั่วลิสงเหล่านั้นไปตรวจสอบความเป็นลูกผสม โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ผ่านการคัดเลือกคือ OPO11 (จากการศึกษาทั้งหมด 120 ไพรเมอร์) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 5/GAC AGG AGG T3/ และเป็นไพรเมอร์ที่สามารถระบุความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างพันธุ์ต้านทาน (NC Ac 17090) และอ่อนแอ (ไทนาน 9 และมข.1) ที่ใช้สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ได้ โดยไพร์เมอร์ OPO11 สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 1000 คู่เบส ในพันธุ์ต้านทานแต่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเครื่องหมายดังกล่าวในพันธุ์อ่อนแอ ถั่วลิสงลูกผสมระหว่างพันธุ์ต้านทาน และอ่อนแอในชั่วที่ 1 ที่เกิดจากการผสมข้ามที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเครื่องหมายของพันธุ์พ่อ $O11_{1000}$ ทุกต้นจะนำไปสร้างประชากรชั่วที่ 2 ต่อไป

การจำแนกระดับความต้านทานตามขนาดของแผล และการกระจายตัวของถั่วลิสงชั่วที่ 2

หลังจากตรวจสอบความเป็นลูกผสมของลูกผสมชั่วที่ 1 ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ $O11_{1000}$ และลักษณะทางสัณฐานแล้ว ได้สร้างประชากรชั่วที่ 2 จากลูกผสมดังกล่าว เมื่อมีอายุ 110 วัน ทำการศึกษาลักษณะความต้านทานจากขนาดแผลของประชากรชั่วที่ 2 ที่สร้างขึ้นในลำดับใบต่างๆ (4-6) ในสภาพแปลงที่เกิดโรคตามธรรมชาติ และทำการจำแนกระดับการต้านทานต่อโรคของถั่วลิสงแต่ละต้นจากขนาดแผล ซึ่งพบว่าขนาดของแผลของลูกผสมในแต่ละต้นจากทั้ง 2 คู่ผสม (ไทนาน 9 × NC Ac 17090 และ มข.1 × NC Ac 17090) มีความใกล้เคียงกัน และใกล้เคียงกับขนาดแผลในพันธุ์ต้านทาน (NC Ac 17090) ที่เคยรายงานไว้ (0.407 มม. และ 0.42 มม.) (วิสิทธิ์, 2539; รัชนี, 2536) ทำให้การจำแนกความต้านทานในลักษณะขนาดแผลทำได้ลำบาก ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้จึงได้จำแนกระดับความต้านทานใหม่ด้วยการใช้ขนาดของแผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้เป็นเกณฑ์ โดยกำหนดให้ต้นต้านทาน คือต้นถั่วลิสงที่มีขนาดแผลขนาดเล็กกว่าหรือเท่ากับขนาดแผลในพันธุ์ต้านทาน NC Ac 17090 (ขนาดแผล $\leq$ 0.31 มม.) และต้นถั่วลิสงที่มีขนาดแผลใหญ่กว่าถั่วลิสง พันธุ์ NC Ac 17090 (ขนาดแผล > 0.31 มม.) กำหนดให้เป็นต้นอ่อนแอ ตามขั้นตอนดังนี้

1. เก็บใบถั่วลิสงที่ปลูกในแปลงจากถั่วลิสงพันธุ์พ่อ แม่ และลูกผสมชั่วที่ 2 ในลำดับใบที่ 4, 5 และ 6 ทำการวัดขนาดของแผลเฉพาะที่เป็นแผลแตกภายใต้กล้องสเตอรีโอ (stereo microscope) โดยวัดจากทุกแผลที่ปรากฏแต่ไม่เกิน 40 แผล

2. หาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดแผลของโรคราสนิมกับลำดับใบถั่วลิสงที่ทำการเก็บตัวอย่าง

3. ศึกษาอัตราส่วนระหว่างความต้านทาน และอ่อนแอจากขนาดของแผลจากค่า χ^2 ในอัตราส่วน 1:15

การตรวจสอบความสัมพันธ์ของเครื่องหมายกับลักษณะต้านทาน

หลังจากตรวจสอบลักษณะขนาดของแผล และลักษณะการปรากฏของแถบแล้วจึงทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างแถบดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายกับขนาดของแผลดังนี้

1. หาความสัมพันธ์ระหว่างการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ และความต้านทานจากลักษณะขนาดของแผล โดยตรวจสอบขนาดของแผลร่วมกับการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ $O11_{1000}$

2. หาค่าร้อยละที่ทำนายได้ถูกต้องจากการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ ในต้นที่มีแผลขนาดเล็ก

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลผลิตและลักษณะสัณฐานของถั่วลิสงพันธุ์มข.1 ไทนาน 9 และ NC Ac 17090 และลูกผสมชั่วที่ 1

จากการศึกษาองค์ประกอบผลผลิต และลักษณะสัณฐานของถั่วลิสงพันธุ์มข.1, ไทนาน 9, NC Ac 17090 และลูกผสมชั่วที่ 1 พบว่าถั่วลิสงพันธุ์มข.1 มีฝักขนาดใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับไทนาน 9 และ NC Ac 17090 มี 2 เมล็ด/ฝัก ลักษณะฝักของถั่วลิสงพันธุ์มข.1 และพันธุ์ NC Ac 17090 มีลายฝักชัดเจน แต่พันธุ์ไทนาน 9 ไม่มีลายฝัก (Figure 1) สีเยื่อหุ้มเมล็ดของถั่วลิสงพันธุ์มข.1 มีสีเข้มกว่าพันธุ์ไทนาน 9 ซึ่งมีสีชมพู มองเห็นลายเส้นตามยาว ส่วนพันธุ์ NC Ac 17090 มีสีเยื่อหุ้มเมล็ดอ่อนที่สุด (Figure 1) จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนขององค์ประกอบ

ผลผลิต พบว่าองค์ประกอบผลผลิตมีลักษณะกึ่งกลางระหว่างพันธุ์พ่อแม่ในหลายลักษณะ โดยลูกผสมระหว่างไทนาน 9 กับ NC Ac 17090 มีองค์ประกอบผลผลิต (น้ำหนักเมล็ด/ต้น ความกว้าง และความยาวฝัก) ไม่แตกต่างจากไทนาน 9 บ่งถึงลักษณะดังกล่าวอาจไม่มีความดีเด่นเหนือพ่อแม่ การไม่แต่มีบางลักษณะ (จำนวนฝัก/ต้น และน้ำหนักฝัก/ต้น) ของลูกผสมมีค่าเฉลี่ยสูงกว่าพันธุ์ไทนาน 9 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง บ่งถึงอาจมีความดีเด่นของลูกผสม (heterosis) ในลักษณะนี้ ในการศึกษาลูกผสมระหว่างมข.1 กับ NC Ac 17090 พบว่าองค์ประกอบผลผลิตของลูกผสม (น้ำหนักเมล็ด/ต้น ความกว้าง และความยาวฝัก) มีค่าอยู่ระหว่างพันธุ์พ่อแม่ โดยมีค่าของผลผลิตน้อยกว่ามข.1 แต่มากกว่า NC Ac 17090 (Table 1)

จากการสังเกตพบว่าลูกผสมชั่วที่ 1 มีความสูงมากกว่าต้นที่เป็นพ่อแม่ สีใบอ่อน ไม่เข้มเหมือนพันธุ์แม่ ใบค่อนข้างเรียวแหลมแตกต่างจากต้นแม่ที่มีลักษณะค่อนข้างมนที่ปลายใบ ลักษณะของถั่วลิสงมข.1 มีใบใหญ่ สีใบเข้ม จากการศึกษาในลักษณะดอก พบว่า มข.1 ดอกมีสีเหลืองเข้มเช่นเดียวกับไทนาน 9 มีลายสีแดงที่กลีบดอกชั้นนอก (standard) แต่ขนาดดอกของไทนาน 9 เล็กกว่ามข.1 เล็กน้อย ส่วนพันธุ์ NC Ac 17090 มีดอกสีเหลืองไม่ปรากฏลายสีแดงที่กลีบดอก ส่วนลูกผสมชั่วที่ 1 ของทั้ง 2 คู่ผสม มีดอกสีเหลือง และมีลายสีแดงที่กลีบดอกชั้นนอกชัดเจนเหมือนมข.1 และไทนาน 9 (Figure 2, 2a) ในลักษณะสีเข็ม (peg) ของมข.1 และไทนาน 9 มีสีม่วง ส่วนเข็มของ NC Ac 17090 มีสีเขียว ในลูกผสมชั่วที่ 1 จากทั้ง 2 คู่ผสมมีเข็มสีม่วงอ่อน (Figure 2, 2b) จากการสังเกตลายฝัก พบว่าลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง มข.1 กับ NC Ac 17090 มีลายฝักชัดเจนขนาดฝักเล็กลง ส่วนลูกผสมระหว่างไทนาน 9 กับ NC Ac 17090 มีลายฝักไม่ชัดเจน (Figure 3) และจากการศึกษาพบว่า สีเยื่อหุ้มเมล็ดของถั่วลิสงชั่วที่ 1 มีสีอ่อนลง

การตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอของถั่วลิสง

จากการสกัดดีเอ็นเอของถั่วลิสงจากชิ้นส่วนของใบอ่อนน้ำหนัก 0.2 กรัม ด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1987) เมื่อทำการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอถั่วลิสงจากการวัดค่า OD260 และ OD280 ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่าความบริสุทธิ์อยู่ระหว่าง 1.62-2.0 ปริมาณดีเอ็นเอของถั่วลิสงลูกผสม ไทนาน 9 × NC Ac 17090 มีค่าอยู่ระหว่าง 3.94-11.9 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และลูกผสมระหว่าง มข.1 × NC Ac 17090 มีค่าระหว่าง 4.57-13.76 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร

การคัดเลือกไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบลูกผสม

จากการศึกษาไพรเมอร์ชุดต่างๆ จำนวน 6 ชุด ได้แก่ OPA 1-20, OPB 1-20, OPAM 1-20, OPAS 1-20, OPK 1-20 และไพรเมอร์ OPO 1-20 พบว่าไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่างระหว่างถั่วลิสงพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอคือ ไพรเมอร์ OPO11 (5′GAC AGG AGG T3′) เท่านั้น แม้เคยมีผู้รายงานไว้ว่า ไพรเมอร์ A-02, A-07,

Table 1. Yield and yield components of groundnuts; KKU 1, Tainan 9, NC Ac17090, and F_1 hybrids (Tainan 9 × NC Ac 17090 (TN1) and KKU1 × NC Ac17090 (KN1)).

Yield and yield components	Cultivars					F-test	C.V. (%)
	Tainan 9	KKU1	NC Ac 17090	TN1	KN1		
Pod no./plant	30.080[bc]	35.750[ab]	28.250[c]	38.690[a]	25.060[c]	**	10.25
Pod weight/plant	27.490[b]	46.940[a]	18.290[c]	33.640[b]	26.320[bc]	**	12.21
Seed weight/plant	18.880[bc]	30.780[a]	12.610[c]	18.770[bc]	23.600[ab]	**	16.72
Pod width	1.145[c]	1.320[a]	1.082[c]	1.105[c]	1.217[b]	**	2.11
Pod length	2.487[c]	2.795[a]	2.340[d]	2.505[c]	2.675[b]	**	2.02

[1/] Means followed by the same letter(s) in a row are not significantly different at 1% level
****significantly different at 1% level**

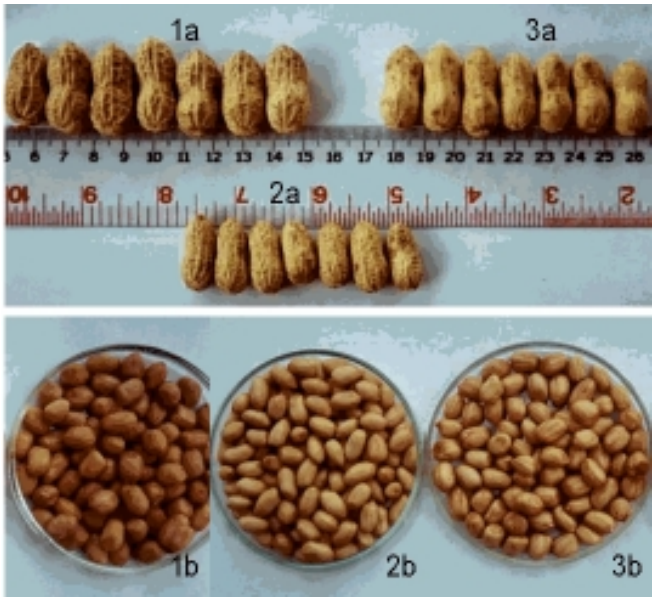

Figure 1. Groundnut pod shape and testa color.
1a & 1b = KKU1 2a & 2b = NC Ac 17090 3a & 3b = Tainan 9

Figure 2. Flower and pegs of groundnut used in this study.
1a & 1b = Tainan 9 2a & 2b = F_1 hybrid groundnut (Tainan 9 × NC Ac 17090) 3a & 3b = NC Ac 17090

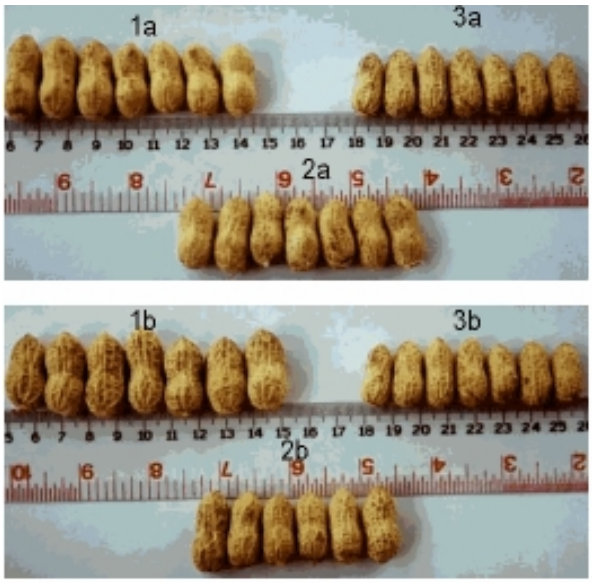

Figure 3. groundnut pod shape of parent and their F_1 hybrids.
1a = Tainan 9 2a = F_1 hybrid groundnut (Tainan 9 × NC Ac 17090) 3a = NC Ac 17090
1b = KKU1 2b = F_1 hybrid groundnut (KKU1 × NC Ac 17090) 3b = NC Ac 17090

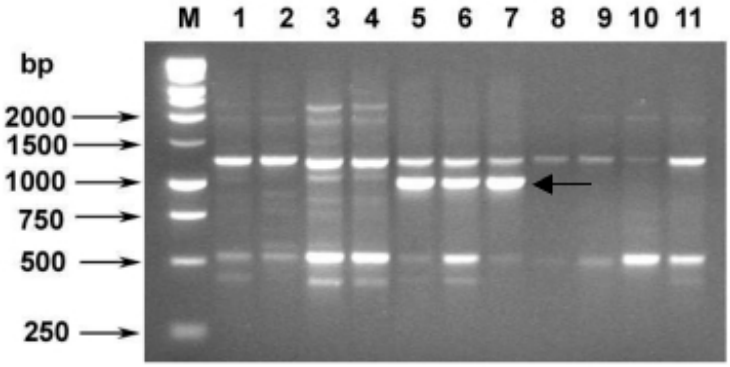

Figure 4. RAPD-PCR analysis of groundnut varieties using the primer OPO11. The $O11_{1000}$ band is indicated by arrow, found only in the resistant variety (NC Ac 17090).
M = marker, lane = 1-4 KKU1, lane 5-7 = NC Ac 17090, lane 8-11 = Tainan 9

A-09, A-18 และ A-20 สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ถั่วลิสงจำนวนหนึ่ง (Subramanian *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตาม พบว่าไพรเมอร์ A-02, A-07, A-09, A-18 และ A-20 และไพรเมอร์ อื่นๆ ที่ใช้การศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งกล่าวถึงข้างต้นไม่แสดงความแตกต่างระหว่างถั่วลิสงพันธุ์อ่อนแอต่อโรคราสนิม (พันธุ์มข.1, พันธุ์ไทนาน 9) และพันธุ์ต้านทานต่อโรคราสนิม (พันธุ์ NC Ac 17090) ยกเว้นไพรเมอร์ OPO11 จากการศึกษาโดยใช้ไพรเมอร์ OPO11 ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในถั่วลิสง 3 พันธุ์ ในการศึกษานี้ พบว่ามีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1000 คู่เบส ในพันธุ์ต้านทาน NC Ac 17090 แต่ไม่พบในพันธุ์อ่อนแอ (Figure 4) จึงได้ให้สัญลักษณ์เครื่องหมายนี้ว่า $O11_{1000}$ เพื่อได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

และผลจากการศึกษาที่ผ่านมา (Halward *et al*., 1992; Kochert *et al*., 1995) รวมถึงการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าถั่วลิสงพันธุ์ปลูก (2n = 4x) มีความผันแปรทางพันธุกรรมน้อย ความแปรปรวนของดีเอ็นเอต่ำ อาจเป็นเพราะว่าถั่วลิสงเป็นพืชผสมตัวเอง อีกทั้งเป็นพืชที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์มานานมีการปรับปรุง และคัดเลือกมาอย่างเข้มข้น ทำให้พันธุกรรมภายในของถั่วลิสงมีความคล้ายคลึงกันมาก จึงพบว่ามีความแตกต่างของถั่วลิสงต่ำทั้งในระดับสัณฐานและระดับดีเอ็นเอ

การตรวจสอบลูกผสมจากเครื่องหมาย RAPD

จากการตรวจสอบลูกผสมชั่วที่ 1 ด้วยไพรเมอร์ OP11 ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอ ในตำแหน่งเครื่องหมายดีเอ็นเอ $O11_{1000}$ ที่บ่งถึงความเป็นลูกผสม พบว่าในเมล็ดที่ทำการผสมข้าม KN1 26 ตัวอย่างปรากฏแถบที่สนใจ ($O11_{1000}$) 15 ตัวอย่าง (57.69%) ไม่ปรากฏแถบที่สนใจ 11 ตัวอย่าง ส่วนในเมล็ดที่ทำการผสมข้าม TN1 จาก 32 ตัวอย่าง ปรากฏแถบที่สนใจ 18 ตัวอย่าง (56.25%) และไม่ปรากฏแถบที่

Table 2. The groundnut F_1 hybrids with or without RAPD marker ($O11_{1000}$).

Groundnut F_1 hybrids	The number of plant showed the $O11_{1000}$ band (%)	The number of plant did not show the $O11_{1000}$ band (%)	The number of F_1 hybrids examined (n)
KKU 1 × NC Ac17090 (KN1)	57.69	42.31	26
Tainan 9 × NC Ac17090 (TN1)	56.25	43.75	32

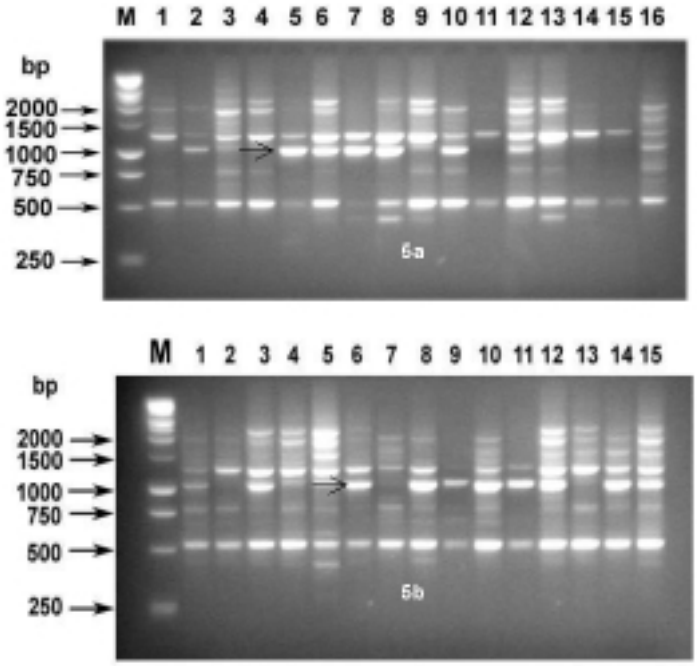

Figure 5. RAPD-PCR analysis of F_1 hybrids generated by primer OPO11. The $O11_{1000}$ bands are indicated by arrow.
5a. F_1 hybrid (Tainan 9 × NC Ac 17090), M = marker
5b. F_1 hybrid (KKU 1 × NC Ac 17090), M = marker

สนใจ 14 ตัวอย่าง (Table 2; Figure 5) ผลจากการศึกษาดีเอ็นเอของต้นถั่วลิสงที่ได้รับการผสมข้ามระหว่างถั่วลิสงพันธุ์ไทนาน 9 กับพันธุ์ NC Ac 17090 และพันธุ์มข.1 กับพันธุ์ NC Ac 17090 มีต้นถั่วลิสงจำนวนหนึ่งซึ่งไม่ปรากฏแถบที่สนใจบ่งชี้ว่าเมล็ดที่ได้รับการผสมข้ามเพื่อสร้างประชากรชั่วที่ 1 ไม่ใช่ลูกผสมระหว่างถั่วลิสงพันธุ์ มข.1 กับพันธุ์ NC Ac 17090 หรือ พันธุ์ไทนาน 9 กับพันธุ์ NC Ac 17090 ทั้งหมด (Figure 5; Table 2) ซึ่งเป็นไปได้ว่าเมล็ดส่วนหนึ่งเกิดจากการผสมตัวเอง หรืออาจเป็นไปได้ว่าเมล็ดส่วนหนึ่งมีการกลายพันธุ์ หรือมีการปลอมปนของเมล็ดจากพันธุ์อื่นมา จากหลักฐานที่ปรากฏการใช้เครื่องหมาย $O11_{1000}$ ช่วยในการพิจารณาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ลักษณะใบ สีดอก สีเข็ม และลายฝัก) ประกอบกัน สามารถใช้คัดเลือกเฉพาะต้นที่มั่นใจว่าเป็นลูกผสมที่เกิดจากพันธุ์ที่ต้องการอย่างแท้จริง

การจำแนกระดับความต้านทานตามขนาดของแผล และการกระจายตัวของถั่วลิสงชั่วที่ 2

หลังจากการคัดเลือกประชากรต้นชั่วที่ 1 จากเครื่องหมายดีเอ็นเอ $O11_{1000}$ เพื่อสร้างประชากรลูกผสมชั่วที่ 2 ได้ทำการศึกษาลักษณะการต้านทาน และตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายกับความต้านทานเพื่อทำการคัดเลือกลูกผสมชั่วที่ 2 จากลักษณะขนาดแผลในใบลำดับที่ 4, 5 และ 6 การปรากฏของแถบเครื่องหมาย $O11_{1000}$

1. ความสัมพันธ์ระหว่างลำดับใบกับลักษณะขนาดของแผลของโรคราสนิม

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับใบในลักษณะขนาด และจำนวนแผลที่เกิดจากโรคราสนิมในใบถั่วจำนวน 157 ตัวอย่าง ในใบลำดับที่ 4, 5 และ 6 ขนาดแผลในแต่ละลำดับใบมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยพบว่าขนาดของแผลในแต่ละลำดับใบมีความสัมพันธ์ทางบวกคือ เมื่อลำดับใบเพิ่มขึ้น (ใบอยู่ใกล้พื้นดิน) ขนาดแผลก็มีขนาดเพิ่มขึ้นด้วย (Table 3) เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับใบในลักษณะจำนวนแผล พบว่าจำนวนแผลในแต่ละลำดับใบมีความสัมพันธ์ทางบวกเช่นเดียวกัน (Table 4) จากผลการทดลองดังกล่าว บ่งชี้ว่าหากทำการวัดความต้านทานจากลักษณะขนาดแผลที่ลำดับใบเดียวกัน (หรือระดับความสูงจากแปลงใกล้เคียงกัน) มีความจำเป็นและเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการวัดขนาดของแผลและจำแนกเป็นระดับความต้านทานควรทำการวัดที่ลำดับใบเดียวกัน หรือระดับความสูงจากแปลงใกล้เคียงกัน

Table 3. The correlation of pustule diameter from different leaf order of groundnut rust disease.

	The fourth leaf	The fifth leaf	The sixth leaf
The fourth leaf	-		
The fifth leaf	0.335**	-	
The sixth leaf	0.403**	0.147	-

****significantly different at 1% level**

Table 4. The correlation of number of pustule from different leaf order groundnut rust disease.

	The fourth leaf	The fifth leaf	The sixth leaf
The fourth leaf	-		
The fifth leaf	0.509**	-	
The sixth leaf	0.377**	0.423**	-

****significantly different at 1% level**

2. ระดับความต้านทาน และการกระจายตัวของถั่วลิสงชั่วที่ 2 ในลักษณะขนาดแผลโรคราสนิม

จากการศึกษาขนาดของแผลของใบลำดับที่ 4-6 พบว่าจำนวนลูกที่มีลักษณะอ่อนแอ และต้านทานจากลูกผสมชั่วที่ 2 ใน TN มีจำนวนเท่ากับ 66 ต้น และ 8 ต้น ตามลำดับ ส่วน KN มีจำนวน 50 ต้น และ 5 ต้น ตามลำดับ (Table 5) เมื่อพิจารณาค่า χ^2 ของลูกชั่วที่ 2 จาก TN และ KN พบว่า χ^2 ของลูกผสมชั่วที่ 2 มีค่าไม่แตกต่างจากสัดส่วน 15:1 (ค่า P อยู่ระหว่าง 0.2-0.1 และ 0.5-0.3 ตามลำดับ) จากสัดส่วนดังกล่าวบ่งชี้ว่าขนาดแผลของราสนิมในลูกผสมอาจถูกควบคุมด้วยยีน 2 คู่ เช่นเดียวกับลักษณะค่าคะแนนการเป็นโรคในการศึกษาที่ผ่านมา และเมื่อรวมเอา TN และ KN เพื่อตรวจสอบค่า χ^2 พบว่าสัดส่วนระหว่างลักษณะอ่อนแอและต้านทานไม่แตกต่างจาก 15:1 เช่นกัน (ค่า P อยู่ระหว่าง 0.2-0.1) (Table 5)

จากการศึกษาความต้านทานจากถั่วลิสงจำนวน 21 ตัวอย่าง ในลักษณะขนาด และจำนวนแผลจากค่าเฉลี่ย 3 ลำดับใบ (ลำดับใบที่ 4, 5 และ 6) เพื่อจำแนกระดับความต้านทานพร้อมกับตรวจสอบการปรากฏเครื่องหมาย $O11_{1000}$ พบว่าเมื่อมีการปรากฏแถบเครื่องหมายจำนวนแผลจากโรคราสนิมในใบถั่วลิสงมีจำนวนน้อยลง (-0.433*) เมื่อระดับความต้านทานเพิ่มขนาดของแผลเล็กลง (-0.805**) (Table 6) เมื่อสังเกตจากความสัมพันธ์ระหว่างขนาดแผล และแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย $O11_{1000}$ พบว่าต้นถั่วลิสงที่มีแผลขนาดเล็ก และได้รับการจำแนกเป็นต้นต้านทานมักจะปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย ส่วนถั่วลิสงพันธุ์ที่มีแผลขนาดใหญ่ และได้รับการจำแนกว่าเป็นลักษณะอ่อนแอส่วนใหญ่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย (Figure 6) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากจำนวนต้นที่มีแผลขนาดเล็กทั้งหมดพบว่าเป็นต้นที่ปรากฏแถบเครื่องหมาย $O11_{1000}$ คิดเป็น 50% แสดงถึงว่าแถบเครื่องหมาย $O11_{1000}$ อาจไม่ใกล้ชิดกับลักษณะต้านทานต่อโรคราสนิม

สรุป

จากการคัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 120 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์เพียง 1 ชนิด คือ OPO11 (5′GAC AGG AGG T3′) ที่สามารถให้เครื่องหมายที่เป็นเอกลักษณ์ของลูกผสม

Table 5. The segregation of the rust resistance with pustule diameter in F_2 hybrids groundnut (Tainan 9 × NC Ac 17090, TN and KKU1 × NC Ac 17090, KN).

F_2 hybrids groundnut	Number (plant)		Ratio	χ^2	P-value
	Susceptible plant	Resistant plant			
TN	66	8	15:1	2.626	0.2-0.1
KN	50	5	15:1	0.918	0.5-0.3
TN+KN	116	13	15:1	3.230	0.2-0.1

Table 6. The correlation of pustule diameter, number of pustule, the presence band of $O11_{1000}$ marker and resistance level.

	pustule diameter	Number of pustule	presence of $O11_{1000}$ marker band	Resistance level
Pustule diameter	-			
Number of pustule	0.258	-		
The presence band of $O11_{1000}$	0.068	- 0.433*	-	
Resistance level	- 0.805**	- 0.040	0.023	-

*** significantly different at 5% level**
**** significantly different at 1% level**

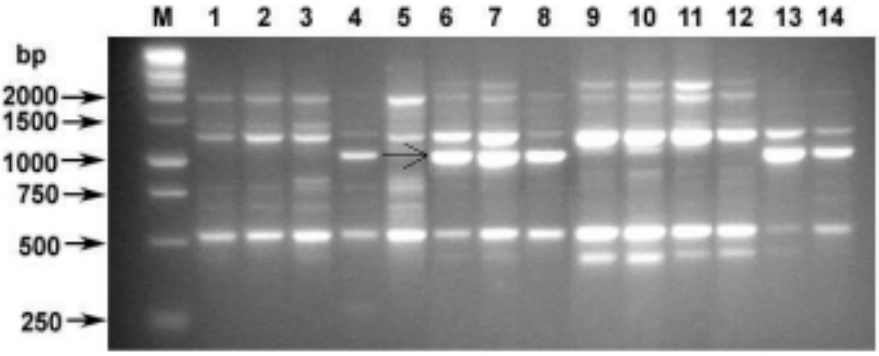

Figure 6. RAPD-PCR analysis of F_2 hybrids (KKU 1 × NC Ac 17090) generated by primer OPO11. The $O11_{1000}$ bands are indicated by arrow. marker band. M = DNA marker, lane 1-12 = susceptible plant with large pustule diameter and lane 13-14 = resistance plant with small pustule diameter.

จากพันธุ์ต้านทาน โดยปรากฏแถบขนาด 1000 คู่เบส และเมื่อใช้แถบดังกล่าวเป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกลูกผสมระหว่างพันธุ์ไทนาน 9 × พันธุ์ NC Ac 17090 และพันธุ์ มข.1 × พันธุ์ NC Ac 17090 คิดเป็นลูกผสมที่แท้จริง 56.25% และ 57.69% ตามลำดับ บ่งชี้ว่าดอกถั่วลิสงที่ได้ทำการผสมข้าม มีลูกผสมที่เกิดจากการผสมตัวเอง หรือมีการกลายพันธุ์ของ NC Ac 17090 หรืออาจมีการปลอมปนของเมล็ดอยู่ในกลุ่ม NC Ac 17090 ดังนั้นการใช้เครื่องหมาย $O11_{1000}$ ช่วยในการคัดเลือกช่วยให้มั่นใจในความเป็นลูกผสมได้มากขึ้น เมื่อทำการศึกษาถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาในลักษณะสีดอก สีเข็ม ลักษณะลายฝัก สีเยื่อหุ้มเมล็ด พบว่าลูกผสมที่ผ่านการตรวจสอบด้วยเครื่องหมาย $O11_{1000}$ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา และผลผลิตอยู่กึ่งกลางระหว่างพ่อแม่สนับสนุนความเป็นลูกผสมอย่างแท้จริง จากการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาการกระจายตัวของลูกผสมชั่วที่ 2 ในลักษณะการต้านทานจากขนาดของแผล ผลการศึกษาจากค่า χ^2 บ่งชี้ว่าอัตราส่วนระหว่างต้นที่มีความต้านทาน (ขนาดแผล $\leq$ 0.31 มม.) และต้นที่มีความอ่อนแอ (ขนาดแผล > 0.31) มีค่าไม่แตกต่างจาก 15:1 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในลักษณะค่าคะแนนการเป็นโรคในการศึกษาที่มีรายงานมาก่อน อย่างไรก็ตามแม้เครื่องหมาย $O11_{1000}$ สามารถแสดงถึงความเป็นลูกผสม แต่จากการที่ต้นที่มีแผลขนาดเล็กปรากฏเครื่องหมาย $O11_{1000}$ เพียงจำนวนหนึ่ง บ่งถึงเครื่องหมายดังกล่าวอาจไม่ใกล้ชิด (no linkage) กับลักษณะต้านทาน และผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่า จำนวนแผล และขนาดแผล ในใบลำดับต่างๆ มีความสัมพันธ์กันทางบวก (Table 3 และ 4) ดังนั้นจึงควรศึกษาเพื่อการจำแนกระดับความต้านทานในลำดับใบเดียวกัน

เอกสารอ้างอิง

รัชนี แฝงสีคำ. 2536. การใช้ลักษณะองค์ประกอบของความต้านทานในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานต่อโรคใบจุด และราสนิมของถั่วลิสง, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วิบูล เป็นสุข. 2535. พันธุกรรมการถ่ายทอดลักษณะต้านทานต่อโรคใบจุดสีดำและโรคราสนิม และลักษณะทางเกษตรของถั่วลิสง, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วิสิทธิ์ ตรีสุวรรณวัฒน์. 2539. พันธุกรรมการถ่ายทอดลักษณะความต้านทานต่อโรคราสนิม และลักษณะทางการเกษตรของถั่วลิสง, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สนั่น จอกลอย. 2533. ถั่วลิสง. ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ปรีชา สุรินทร์. 2533. โรคราสนิม โรคใบจุดสีน้ำตาล และโรคใบจุดสีดำของถั่วลิสง. *ใน* รายงานการสัมมนาถั่วลิสงแห่ง

ชาติ ครั้งที่ 9. หน้า 88-112 (อารันต์ พัฒโนทัย และคณะ บรรณาธิการ.) ขอนแก่น: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อารันต์ พัฒโนทัย, สนั่น จอกลอย และ สมจินตนา ทุมแสน. 2533. งานปรับปรุงพันธุ์ถั่วลิสงในประเทศไทยปี 2532. *ใน* รายงานการสัมมนาถั่วลิสงแห่งชาติ ครั้งที่ 9. หน้า 41-85 (อารันต์ พัฒโนทัย และคณะ บรรณาธิการ.) ขอนแก่น: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Concibido, V.C., Lange, D.A., Denny, R.L., Orf, J.H. and Young N.D. 1997. Genome mapping of soybean cyst nematode resistance genes in 'Peking', PI 90763, and PI 88788 using DNA markers. Crop Sci., 37: 258-264.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem.Bul., 19: 11-15.

Gowdu, B.J. and Balasubramanian, R. 1993. Biocontrol potential of rust of groundnut by *Acremonium obclavatum*. Can. J. Bot., 71: 639-643.

Hammon, R.O. 1987. Groundnut Rust Research in Americas, *In* D. McDonald, P. Subrahmanyam, and J.A. Wightman (eds.), pp. 65-71. Groundnut rust disease: Proceeding of A Discussion Group Meeting. ICRISAT: Patancheru, India

Halward, T., Stalker, T., LaRue, E. and Kochert, G. 1992. Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.). Plant Mol. Biol., 18: 315-325

Husng, H.J., Tsaur, W.L., Lin, S. F., Hsieh, J.S. and Tsai, J.N.1999. Identification and characteristic analysis of interspecific hybrids of peanut. J. Agric. Res. China, 48: 40-51.

Jadeja, K.B., Nandolia, D.M., Dhruj, I.U. and Khandar, R.R. 1999. Efficacy of four triazole fungicides in the control of leaf spots and rust of groundnut. Indian Phytopathol., 52: 421-422.

Jin, Q.S., Vanavichit, A. and Trakoolrung, S. 1996. Identification and potential use of a RAPD marker for aroma in rice. J. Genet. & Breed., 50: 367-370.

Johnson, W. C., Guzman, P., Mandala, D., Mkandawire, A.B.C., Temple, S., Gilberson, R.L. and Gepts, P. 1997. Molecular tagging of the *bc*-3 gene for introgression into Andean common bean. Crop Sci., 37: 248-254.

Knauft, D.A. 1987. Inheritance of rust resistance in groundnut, *In* D. McDonald, P. Subrahmanyam, and J.A. Wightman (eds.), pp.183-187. Groundnut rust disease: Proceeding of A Discussion Group Meeting. ICRISAT: Patancheru, India

Kochert, G., Stalker, T., Gimenes, M., Galgaro, L., Lopes, C.R. and Moore, K. 1995. RFLP and cytogenetic evidence on the origin and allotetraploid domesticated peanut, *Arachis hypogaea* (Leguminosae). Amer. J. Bot., 83: 1281-1291.

Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayad, W.G. and Hodgkin, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. International Plant Genetic Resources Institute, Italy.

Manoharan, V., Usman, M., Kalaimani, S. and Ramalingam, R.S. 1990. Screening of groundnut breeding lines for resistance to rust (*Puccinia arachidis* Speg.). Madras Agric. J., 77: 567-569.

Mignouna, H.D., Abang, M.M., Onasanya, A. and Asiedu, R. 2002. Identification and application of RAPD markers for anthracnose resistance in water yam (*Dioscorea alata*). Ann. Appl. Biol., 141: 61-66.

Melotto, M., Afanador, L. and Kelly, J.D. 1996. Development of a SCAR marker linked to the I gene in common bean. Genome 39: 1216-1219.

Naidu, P.H. and Chandrika, V. 1997. Effect of dates of sowing on the occurrence of tikka late leaf spot and rust on groundnut in southern zone of Andhra Pradesh. Journal of Oilseeds Research 14: 238-240.

Rao, V.R. 1987. Origin, distribution, and taxonomy of Arachis and sources of resistance to groundnut rust (*Puccinia arachidis* Speg.), In D. McDonald, P. Subrahmanyam, and J.A. Wightman (eds.), pp.3-15. Groundnut rust disease: Proceeding of A Discussion Group Meeting. ICRISAT: Patancheru, India

Reddy, L.J., Nigam, S.N., Dwivedi, S.L. and Gibbons, R.W. 1987. Breeding groundnut cultivars resistant to rust (*Puccinia arachidis* Speg.), In D. McDonald, P. Subrahmanyam, and J.A. Wightman (eds.), pp.17-28. Groundnut rust disease: Proceeding of A Discussion Group Meeting. ICRISAT: Patancheru, India

Reddy, L.J., Nigam, S.N., Subrahmanyam, P., Reddy, A.G.S., McDonald, D., Gibbons, R.W. and Pentaiah, V. 1992. Registration of 'ICGV 87160' peanut. Crop Sci., 32: 1075.

Subramanian, V., Gurtu, S., Rao, N., and Nigam, S.N. 2000. Identification of DNA polymorphism in cultivated groundnut using random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. Genome 43: 656-660.

Williamson, V.M., Ho, J.Y., Wu, F.F. Miller N. and Kaloshian, I. 1994. A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene *Mi*, in tomato. Theor. Appl. Genet., 87: 757-763.