



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนส
(*Colletotrichum capsici*) และการพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมาย
เพื่อใช้คัดเลือกลักษณะต้านทานโรคในพริก

Mapping genes conferring resistance to anthracnose
(*Colletotrichum capsici*) and development of molecular markers
for the selection of anthracnose resistance trait in chili

โดย รศ. ดร. อรรรัตน์ มงคลพร

พฤษภาคม 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนส
(*Colletotrichum capsici*) และการพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมาย
เพื่อใช้คัดเลือกลักษณะต้านทานโรคในพริก

Mapping genes conferring resistance to anthracnose
(*Colletotrichum capsici*) and development of molecular markers
for the selection of anthracnose resistance trait in chili

ผู้วิจัย รศ. ดร. อรรรัตน์ มงคลพร
ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยผู้ให้ทุนสนับสนุนโครงการงานวิจัยนี้ และ
สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ผู้ร่วมให้ทุนสมทบ

ขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ ทำการทดลองในแปลง และโรงเรือน และแรงงาน ศูนย์เทคโนโลยี
ชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติ
และ เครื่องมือวิจัยด้านชีววิทยาโมเลกุล

อรรรัตน์ มงคลพร

15 พฤษภาคม 2551

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA4780019

ชื่อโครงการ : การหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนส (*Colletotrichum capsici*) และ
การพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อใช้คัดเลือกลักษณะต้านทานโรคในพริก

ชื่อนักวิจัย : อรรรัตน์ มงคลพร
ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม

Email Address : orarat.m@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 31 สิงหาคม 2547 – 30 สิงหาคม 2550

การศึกษครั้งนี้ต้องการสร้างแผนที่เพื่อหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนส และพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใกล้ชิด เพื่อนำไปใช้ช่วยคัดเลือกลักษณะต้านทานในโครงการปรับปรุงพันธุ์พริกให้ต้านทานโรคแอนแทรคโนส โดยใช้ประชากรลูกผสมกลับ $BC_1F_1P_2$ ($F_1 \times P_2$) จากการผสมข้ามชนิด ระหว่าง *Capsicum annuum* พันธุ์ 'บางช้าง' (P_1) ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ และ *C. chinense* Jacq. 'PBC932' (P_2) ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานต่อโรคแอนแทรคโนส จำนวน 140 ต้น ร่วมกับ microsatellite 139 ตำแหน่ง (ใช้สร้างแผนที่ได้เพียง 35 ตำแหน่ง) expressed sequenced tags (EST) ที่ได้จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในพริก 'PBC932' 11 ตำแหน่ง และลักษณะทางสัณฐาน 8 ลักษณะ ประเมินความต้านทานโรคแอนแทรคโนสในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี microinjection ฉีดเชื้อ *Colletotrichum capsici* isolate 158ci เข้าสู่ผลพริก แล้วประเมินอาการโรคที่ 7 วันหลังปลูกเชื้อ ประเมินขนาดแผลต่อขนาดผล เป็น % สัดส่วนโรค ลักษณะต้านทานมีสัดส่วนโรค 0% แผลที่เกิดขึ้นมีขนาด $>1\%$ ซึ่งจัดว่าเป็นลักษณะ อ่อนแอ

ผลการวิเคราะห์ linkage group ด้วยโปรแกรม MAPMAKER version 3.0 LOD 4.0 recombination frequency 0.4 แผนที่ที่ได้ประกอบด้วย 11 linkage group ครอบคลุม 770.8 cM ยีน *co1* ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนส อยู่ใน linkage group 1 และมี microsatellite PMC3 อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ห่างกัน 36.9 cM จากการวิเคราะห์ QTL พบว่า PMC3 มีความสัมพันธ์กับลักษณะเชิงปริมาณของลักษณะต้านทานมากที่สุด การคัดเลือกสายพันธุ์พริกที่ต้านทานโรคแอนแทรคโนสในประชากรผสมกลับกับพันธุ์บางช้าง ได้คัดเลือกถึงประชากรรุ่นที่ 3 สามารถคัดเลือกต้นต้านทาน ด้วยวิธีการปลูกเชื้อ (microinjection) จาก $BC_1F_3P_1$ ได้ 18 ต้น

คำหลัก : โรคกุ้งแห้ง, microsatellite, simple sequence repeat, expressed sequenced tags,
Capsicum annuum, *Capsicum chinense*

Abstract

Project Code: RSA4780019

Project Title : Mapping genes conferring resistance to anthracnose (*Colletotrichum capsici*) and development of molecular markers for the selection of anthracnose resistance trait in chili

Investigator : Orarat Mongkolporn
Department of Horticulture, Kasetsart University
Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pthom

Email Address : orarat.m@ku.ac.th

Project Period : 31 August 2004 – 30 August 2007

The study was aimed to locate the gene that conferred resistance to anthracnose in chili and to develop molecular markers linked to the resistance, to be used in chili breeding program for the selection of the anthracnose resistance trait. Backcrossed $BC_1F_1P_2$ ($F_1 \times P_2$) population (containing 140 plants) derived from an interspecific cross between *Capsicum annuum* cv. 'Bangchang' (P_1 , susceptible parent) and *C. chinense* Jacq. 'PBC932' (P_2 , resistant parent), was used as mapping population. Two molecular marker types including microsatellite and expressed sequenced tags (EST), and morphological traits were used in mapping. Of total 139 microsatellite loci, only 39 could be used to map, combined with 11 ESTs and eight morphological traits. Anthracnose resistance assessment was conducted by a lab based microinjection method, whereby each mature green fruit was detached and injected with *Colletotrichum capsici* isolate 158ci through its pericarp, and followed by disease evaluation at 7 days. % lesion was evaluated from lesion size to fruit size, which 0% (no infection) was classified as 'resistant' and % lesion greater than 1% were classified as 'susceptible'.

Linkage analysis was performed using MAPMAKER version 3.0 with LOD 4.0 and recombination frequency 4.0. A map was created containing 11 linkage groups covering 770.8 cM. The *co1* gene that conferred the resistance to anthracnose was located in group 1 with microsatellite PMC3 36.9 cM apart. QTL analysis suggested PMC3 also quantitatively affected the resistance. Resistant plants were selected using microinjection through population backcrossed to 'Bangchang'. The backcross population was advanced to the third generation $BC_1F_3P_1$ and 18 resistant plants were selected.

Keywords : microsatellite, simple sequence repeat, expressed sequenced tags, *Capsicum annuum*, *Capsicum chinense*

Executive Summary

พริก (*Capsicum annuum* L.) เป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลกชนิดหนึ่ง เป็นอาหาร เครื่องเทศ และสมุนไพร ประเทศไทยสามารถปลูกพริกได้ดี แต่ประสบปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ โรคแอนแทรคโนส (*Colletotrichum* spp.) ซึ่งเป็นโรคที่ระบาดได้ดีในเขตร้อนชื้น และกึ่งร้อนชื้นทั่วโลก ในประเทศไทย เมื่อการระบาดของโรครุนแรง ทำให้ผลผลิตพริกเสียหายได้มากกว่า 50 จนถึง 100% การศึกษานี้ต้องการสร้างแผนที่เพื่อหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนส และ พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใกล้ชิด เพื่อนำไปใช้ช่วยคัดเลือกลักษณะต้านทานในโครงการปรับปรุงพันธุ์พริกให้ต้านทานโรคแอนแทรคโนส โดยใช้ประชากรลูกผสมกลับ $BC_1F_1P_2$ ($F_1 \times P_2$) จากการผสมข้ามชนิดระหว่าง *Capsicum annuum* พันธุ์ 'บางช้าง' (P_1) ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ และ *C. chinense* Jacq. 'PBC932' (P_2) ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานต่อโรคแอนแทรคโนส จำนวน 140 ต้น ร่วมกับ microsatellite 139 ตำแหน่ง (ใช้สร้างแผนที่ได้เพียง 35 ตำแหน่ง) expressed sequenced tags (EST) ที่ได้จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในพริก 'PBC932' 11 ตำแหน่ง และลักษณะทางสัณฐาน 8 ลักษณะ ประเมินความต้านทานโรคแอนแทรคโนสในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี microinjection นีดเชื้อ *Colletotrichum capsici* isolate 158ci เข้าสู่ผลพริก แล้วประเมินอาการโรคที่ 7 วันหลังปลูกเชื้อ ประเมินขนาดแผลต่อขนาดผลเป็น % สัดส่วนโรค ลักษณะต้านทานมีสัดส่วนโรค 0% แผลที่เกิดขึ้นมีขนาด $>1\%$ ซึ่งจัดว่าเป็นลักษณะอ่อนแอ

ผลการวิเคราะห์ linkage group ด้วยโปรแกรม MAPMAKER version 3.0 LOD 4.0 recombination frequency 0.4 แผนที่ที่ได้ประกอบด้วย 11 linkage group ครอบคลุม 770.8 cM ยีน *co1* ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนส อยู่ใน linkage group 1 และมี microsatellite PMC3 อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ห่างกัน 36.9 cM จากการวิเคราะห์ QTL พบว่า PMC3 มีความสัมพันธ์กับลักษณะเชิงปริมาณของลักษณะต้านทานมากที่สุด

การคัดเลือกสายพันธุ์พริกที่ต้านทานโรคแอนแทรคโนสในประชากรผสมกลับกับพันธุ์บางช้าง ได้คัดเลือกถึงประชากรรุ่นที่ 3 สามารถคัดเลือกต้นต้านทานด้วยวิธีการปลูกเชื้อ (microinjection) จาก $BC_1F_3P_1$ ได้ 18 ต้น

คำนำ

พริก (*Capsicum annuum* L.) เป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลกชนิดหนึ่ง เป็นอาหาร เครื่องเทศ และสมุนไพร ประเทศไทยสามารถปลูกพริกได้ดี แต่ประสบปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่ง คือ โรคแอนแทรคโนส ซึ่งเป็นโรคที่ระบาดได้ดีในเขตร้อนชื้น และกึ่งร้อนชื้นทั่วโลก ในประเทศไทย เมื่อมีการระบาดของโรครุนแรง สามารถทำให้ผลผลิตพริกเสียหายได้มากกว่า 50% จนถึง 100% สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ซึ่งในประเทศไทยพบ 3 ชนิด ได้แก่ *C. capsici*, *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* (Than et al., 2008) จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคในแถบภาคตะวันตก เมื่อปี 2547 พบเชื้อ *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* และพบว่า *C. capsici* เป็นเชื้อที่พบมากที่สุด และมีความรุนแรงกว่า *C. gloeosporioides* (Taylor et al., 2007; Montri et al., submitted)

เนื่องจากไม่พบลักษณะต้านทานโรคในพริก *Capsicum annuum* จากการ screen หาคความต้านทานใน germplasm พริกที่รวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน รวมทั้งจากรายงานในต่างประเทศ (Yoon et al., 2004) จึงมีความจำเป็นต้องใช้แหล่งพันธุกรรมความต้านทานจากพริกชนิดอื่น จากรายงานของ AVRDC The World Vegetable Center, former name Asian Vegetable Research and Development Center) ปี 1998 พบว่ามีความต้านทานโรคแอนแทรคโนสระดับสูง (immune) ในพริก *C. baccatum* สายพันธุ์ 'PBC80' และ 'PBC81' และ *C. chinense* 'PBC932' Pakdeevaporn et al. (2005) ได้นำ *C. chinense* 'PBC932' ผสมข้ามกับพริกพันธุ์การค้าของไทย *C. annuum* พันธุ์บางช้าง ซึ่งสามารถผสมข้ามได้ และให้ลูกที่ปกติ พบว่าลักษณะต้านทานโรคจาก 'PBC932' ถูกควบคุมด้วยยีนเดี่ยว 1 ตำแหน่ง คือ *co1* (Pakdeevaporn et al., 2005)

การศึกษครั้งนี้ต้องการสร้างแผนที่เพื่อหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคแอนแทรคโนส และพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใกล้ชิด เพื่อนำไปใช้ช่วยคัดเลือกลักษณะต้านทานในโครงการปรับปรุงพันธุ์พริกให้ต้านทานโรคแอนแทรคโนส

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ประชากรพริก

สร้างประชากร $BC_1F_1P_2$ ($F_1 \times P_2$) จากการผสมข้ามชนิดระหว่าง *Capsicum annuum* พันธุ์ 'บางช้าง' (P_1) ซึ่งเป็นพันธุ์อ่อนแอ และ *C. chinense* Jacq. 'PBC932' (P_2) ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานต่อโรคแอนแทรคโนส จำนวน 140 ต้น ที่แปลงทดลองของศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน ในช่วงพฤศจิกายน 2549 ถึง มีนาคม 2550

2. การประเมินลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนส

2.1 การเตรียมผลพริกสำหรับปลูกเชื้อ

เก็บเกี่ยวผลพริกที่ระยะผลแก่เต็มที่ (อายุประมาณ 30 วันหลังดอกบาน) ตันละ 5 ผล จากพริกทุกต้นของประชากร BC₁F₁P₂ 'บางช้าง' 'PBC932' และ F₁ ปลิดขั้วผลออก ล้างทำความสะอาดผลพริกด้วยน้ำเปล่า แล้วแช่ใน 1% (w/v) sodium hypochlorite เป็นเวลา 5 นาที ล้างผลพริกด้วยน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ครึ่งละ 2 นาที ซับผลพริกให้แห้ง วางผลพริกบนกระดาษเพื่อรอการปลูกเชื้อ

2.2 การเตรียม spore suspension

เตรียมเชื้อ *Colletotrichum capsici* isolate 158ci (ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. สมศิริ แสงโชติ ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน) เลี้ยงเชื้อบนอาหาร potato dextrose agar (PDA; DifcoTM, Becton, Dickinson and Company, MD USA) ที่อุณหภูมิ 27°C ภายใต้แสง fluorescence 12 ชั่วโมง สลับมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลาประมาณ 7 วัน เมื่อเชื้อเจริญเติบโตสร้างเส้นใยและสปอร์ จึงเก็บเกี่ยว spore มาเตรียม spore suspension ให้ได้ความเข้มข้น 10⁶ spore/ml

2.3 การปลูกเชื้อ

ฉีดสปอร์เข้าสู่ผลพริก ด้วยวิธี microinjection (Kanchana-udomkan et al., 2004) อุปกรณ์ที่ใช้ประกอบด้วย Micro SyringeTM รุ่น 1705 TLL กับ dispenser PB600-1 (Hamilton, Switzerland) ที่มีเข็มขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 mm และยาว 1 mm dispenser ทำหน้าที่ควบคุมปริมาตรของ spore suspension ในการฉีด inoculum เข้าสู่ผลพริกแต่ละครั้ง ให้มีปริมาตร 1 µl เท่ากัน ฉีด spore suspension ที่เตรียมไว้ลงบนผลพริกบริเวณกลางผล ผลละ 1 ผล (ประมาณ 1,000 spore) จากนั้นนำผลพริกที่ปลูกเชื้อแล้ว บ่มไว้ในกล่องพลาสติกที่หล่อด้วยน้ำเปล่าปิดฝา เพื่อควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ให้ใกล้เคียง 100% และวางกล่องพลาสติกที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 - 30°C) เมื่อครบ 3 วัน เปิดฝากล่อง เพื่อลดความชื้น

2.4 การประเมินอาการโรคแอนแทรคโนส

ประเมินอาการโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก ในวันที่ 7 หลังจากปลูกเชื้อ โดยประเมินขนาดแผลที่เกิดขึ้นจากการปลูกเชื้อ ต่อขนาดผล เป็น % สัดส่วนโรค โดยเปรียบเทียบกับ disease diagram (ภาพที่ 1 และตารางที่ 1) (Montri et al., submitted) คำนวณค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์สัดส่วน โรคจากผลพริกทั้ง 5 ผล ในแต่ละต้น แบ่งระดับความต้านทานโรคแอนแทรคโนสเป็น 2 ระดับ ซึ่ง ดัดแปลงจาก Pakdeevaporn et al. (2005) ดังนี้ ต้านทาน (R) ไม่พบอาการโรคเกิดขึ้น และ อ่อนแอ (S) มีสัดส่วนโรคมมากกว่า 1%

3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาระหว่างพริก 'บางช้าง' และ 'PBC932' จำนวน 8 ลักษณะ ได้แก่

1) สีม่วงบริเวณข้อ (ยีน A, Bosland et al., 2006) บันทึกลักษณะสีม่วงบริเวณข้อของต้นพริกเมื่อต้นพริกอายุ 2 เดือน หลังย้ายปลูก

2) จำนวนดอกต่อข้อ (ยีน Mf, Bosland et al., 2006) นับจำนวนดอกต่อข้อ โดยสุ่ม 5 ตำแหน่งบริเวณรอบต้นพริก

- 3) ความเรียบของใบ (ยีน *Sm*, Bosland *et al.*, 2006) บันทึกลักษณะความเรียบของใบแก่บริเวณกลางต้น
- 4) ลักษณะสีขึ้นของก้านชูดอก หรือผล (ยีน *up-2*, Bosland *et al.*, 2006) บันทึกลักษณะสีขึ้นของก้านชูดอก หรือผล โดยสุ่ม 5 ตำแหน่ง บริเวณรอบต้นพริก
- 5) สีผลแก่เต็มที่ (ยีน *cl*, Bosland *et al.*, 2006) บันทึกลักษณะสีของผลพริกที่ระยะผลเขียวแก่เต็มที่ (30 วัน หลังจากดอกบาน) จำนวน 5 ผลต่อต้น
- 6) สีอับเรณู (ยีน *ya*, Bosland *et al.*, 2006) บันทึกลักษณะสีอับเรณู ในขณะที่ดอกตูมใกล้บาน
- 7) มุมระหว่างดอกกับก้านชูดอก (ยีน *Af*, Bosland *et al.*, 2006) บันทึกความกว้างของมุมระหว่างดอกกับก้านชูดอก โดยสุ่ม 5 ตำแหน่ง บริเวณรอบต้นพริก
- 8) ความยาวของยอดเกสรเพศเมีย (stigma length) (ยีน *StL*, Bosland *et al.*, 2006) บันทึกลักษณะความยาวของยอดเกสรเพศเมีย โดยสุ่ม 5 ตำแหน่ง บริเวณรอบต้นพริก

ตารางที่ 1 ระดับคะแนน % สัดส่วนโรค และ ระดับความต้านทานโรคแอนแทรคโนส (Montri *et al.*, submitted)

Scores	% Lesion size to fruit size and symptom description	Resistance level
0	no infection	R
1	1-2% of the fruit shows necrotic lesion or a larger water soaked lesion surrounding the infection site	
3	2-5% of the fruit shows necrotic lesion, acervuli may be present /or water lesion up to 5% of the fruit surface	S
5	5-15% of the fruit shows necrotic lesion, acervuli present/or water soaked lesion up to 25% of the fruit surface	
7	15-25% of the fruit shows necrotic lesion with acervuli	
9	>25% of the fruit shows necrosis, lesion often encircling the fruit, abundant acervuli	

4. การสร้าง DNA เครื่องหมาย

4.1 การสกัด DNA พริก

สกัด genomic DNA ของพริก ‘บางช้าง’ ‘PBC932’ F₁ และประชากร BC₁F₁P₂ จากยอดอ่อนสด

ด้วยวิธี CTAB ดัดแปลง (Mongkolporn et al., 2004) วัดความบริสุทธิ์ และความเข้มข้นของ DNA ด้วย uv/vis spectrophotometer รุ่น GeneQuant pro (Amersham Biosciences, UK) วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 nm (A_{260}) และความยาวคลื่น 280 nm (A_{280}) ความบริสุทธิ์ของ DNA ควรมีค่า A_{260}/A_{280} ratio อยู่ในช่วง 1.8 – 2.0 (Sambrook and Russell, 2001) คำนวณความเข้มข้นของ DNA ($\mu\text{g/ml}$) จาก $A_{260} \times 50 \times \text{dilution factor}$

4.2 การสร้างเครื่องหมาย microsatellite

การศึกษานี้ใช้ microsatellite 139 ตำแหน่ง โดยที่ 76 ตำแหน่ง มาจาก GeneBank (Lee et al., 2004) และอีก 63 ตำแหน่ง มาจากการเข้าร่วม International Consortium of Pepper Microsatellite (อรรถัน มงคลพร, ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) ปฏิบัติ PCR แต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย DNA ต้นแบบ 50 ng, 0.2 μM microsatellite primer, 0.45 unit DNA polymerase, 0.24 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl_2 และ 10 mM buffer ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 15 μl ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Whatman Biometra, Germany หรือ Corbett Research, Australia) โดยกำหนดอุณหภูมิ และรอบของปฏิกิริยา ดังนี้ predenature ที่ 94°C 3 นาที, DNA denaturation 94°C 30 วินาที, annealing $55-65^\circ\text{C}$ 30 วินาที, extension 72°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension 72°C เป็นเวลา 7 นาที นำ PCR products ไปตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วย 1.5% (w/v) agarose gel electrophoresis ปฏิบัติ PCR ที่สมบูรณ์ จึงนำ PCR products ที่เหลือไปแยกความแตกต่างของ DNA ด้วย 4.5% (w/v) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

4.3 การสร้างเครื่องหมาย EST (expressed sequenced tags)

EST ที่ใช้ในการศึกษานี้ มี 11 ตำแหน่ง โดยที่ 10 ตำแหน่ง ได้จากการศึกษาแสดงออกของยีนในพริกสายพันธุ์ 'PBC932' ภายหลังจากปลูกเชื้อ *C. capsici* isolate 158ci เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค microarrays โดยใช้ Affymetrix® *Arabidopsis* DNA chip (อรรถัน มงคลพร, ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) ผลการศึกษาได้พัฒนา EST ที่ได้เป็น sequence-characterized amplified region (SCAR) 7 ตำแหน่ง และ cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) 3 ตำแหน่ง ส่วน EST อีก 1 ตำแหน่ง ได้จาก การออกแบบไพรเมอร์จากยีนที่เกี่ยวข้องกับ defense mechanisms ในพริก *C. annuum* จากฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) ได้แก่ pathogenesis-related protein 10 mRNA (ชัชมาศ กาญจนอุดมการ, ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์)

4.3.1 SCAR จำนวนทั้งหมด 8 ตำแหน่ง ปฏิบัติ PCR ประกอบด้วย DNA ต้นแบบ 50 ng, 0.2 μM SCAR primer, 0.45 unit DNA polymerase, 0.24 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl_2 และ 10 mM buffer ปริมาตรรวม 15 μl อุณหภูมิ และรอบของปฏิกิริยา ดังนี้ DNA denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 1 นาที annealing $55-65^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 1 นาที extension 72°C เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension 72°C เป็นเวลา 5 นาที นำ PCR products ไปตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วย 1.5% (w/v) agarose gel electrophoresis

4.3.2 CAPS จำนวน 3 ตำแหน่ง ใช้ปฏิบัติ PCR เช่นเดียวกับ SCAR ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาด้วย 1% (w/v) agarose gel electrophoresis หากเกิดปฏิกิริยา PCR สมบูรณ์ จึงนำ PCR products ที่เหลืออีก 10 μl ตัดด้วย enzyme *Tru* 1I (เป็น isoshizomer กับ *Mse* I) (Fermentas,

Canada) ซึ่งจดจำลำดับเบส T/TAA ความเข้มข้น 0.5 unit/ μ l, 1x buffer R⁺ (Fermentas, Canada) จากนั้น incubate ที่ 65°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงตรวจสอบ PCR products หลังจากการตัดด้วย enzyme อีกครั้งหนึ่งด้วย 1.5% (w/v) agarose gel electrophoresis

5. การสร้างแผนที่

5.1 การแปลงข้อมูล DNA เครื่องหมาย และลักษณะพื้นฐาน

กำหนด genotypes 3 แบบ ได้แก่ A, B, H โดยให้ A = 'PBC932'; B = 'บางช้าง'; H = heterozygous

การแปลงข้อมูลสำหรับ codominant marker (STMS และ CAPS) : มีแถบ DNA ปรากฏใน 'PBC932' = A; มีแถบ DNA ปรากฏใน 'บางช้าง' = B; มีแถบ DNA ปรากฏทั้งใน 'PBC932' และ 'บางช้าง' = H

การแปลงข้อมูลสำหรับ dominant marker (SCAR) : ไม่มีแถบ DNA ปรากฏใน 'PBC932' = A; ไม่มีแถบ DNA ปรากฏใน 'บางช้าง' = B; มีแถบ DNA ปรากฏเหมือน 'PBC932' หรือ 'บางช้าง' = H

การแปลงข้อมูลสำหรับลักษณะพื้นฐาน และความต้านทานโรคแอนแทรคโนส : มีลักษณะปรากฏ เหมือน 'PBC932' = A; มีลักษณะปรากฏเหมือน 'บางช้าง' = H

5.2 การสร้าง linkage group

สร้าง linkage map โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ MAPMAKER/EXP version3 (Lander et al., 1987) ใช้ mapping function ของ Kosambi กำหนดค่า LOD = 4.0 recombination frequency = 0.4

5.3 การวิเคราะห์ QTL

วิเคราะห์หาตำแหน่งของ DNA เครื่องหมาย และลักษณะทางสัณฐานวิทยา ที่เกี่ยวข้องกับ ลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait loci; QTL)

ของลักษณะความต้านทานโรคแอนแทรคโนสของพริก โดยใช้ single point analysis ระหว่าง DNA เครื่องหมาย และลักษณะทางสัณฐานวิทยา กับ % สัดส่วน โรค และใช้วิธี interval mapping เพื่อหาความสัมพันธ์ของตำแหน่งที่จัดวางอยู่บน linkage group กับ % สัดส่วนโรคแบบกลุ่ม โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ MapQTL[®] version 4.0 (Van Ooijen et al., 2002)

6. การคัดเลือกพริกสายพันธุ์ต้านทานในประชากรผสมกลับ

ผสมกลับ F₁ ไปยังพันธุ์ 'บางช้าง' เพื่อสร้างสายพันธุ์พริกที่เหมือน 'บางช้าง' มากขึ้น ในขณะที่เดียวกันคัดเลือกต้นที่มีลักษณะต้านทาน ด้วยวิธีการทดสอบโรคด้วย *Colletotrichum capsici* isolate 158ci ในห้องปฏิบัติการดังได้กล่าวแล้ว

ในช่วงปีแรก 2547-48 สร้างประชากรผสมกลับ BC₁F₁P₁ (F₁ ผสมกลับไป 'บางช้าง') เนื่องจาก ลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนสถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 ตำแหน่ง (co1) ประชากร BC₁F₁P₁ ซึ่งมี 62 ต้น จึงแสดงลักษณะอ่อนแอทั้งหมด ได้ทำการผสมตัวเองของประชากรชุดนี้ เพื่อสร้างประชากร BC₁F₂P₁ ซึ่งสามารถเก็บเมล็ดได้ 33 ต้น ประชากรชุดนี้คาดว่าจะมีการกระจายตัวของลักษณะต้านทาน จึงต้องมีการทดสอบโรคเพื่อคัดเลือกต้นที่มีลักษณะต้านทานไว้ โดยได้วางแผนการปลูกชุดแรก 16 line ก่อน จำนวน 40 ต้น/line

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การประเมินลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนส

ผลการประเมินลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนส ภายหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน พริก 'PBC932' ไม่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส (สัดส่วนโรค 0%) ซึ่งจัดอยู่ในระดับต้านทาน (R) ทั้ง 10 ต้น พริก 'บางช้าง' แสดงอาการโรค ผลพริกยุบตัวลง แผลมีสีดำจากเส้นใยของเชื้อราที่เจริญบนผล สัดส่วนโรค 15% ทั้ง 10 ต้น ซึ่งจัดอยู่ในระดับอ่อนแอ (S) ส่วน F_1 จำนวน 20 ต้น พบว่าลูกผสม F_1 แสดงอาการโรค 15-45% ซึ่งเป็นลักษณะอ่อนแอทั้งหมด (ตารางที่ 2)

ประชากร $BC_1F_1P_2$ 140 ต้น พบว่าแต่ละต้นมีระดับการเกิดโรคแตกต่างกัน การกระจายค่าเฉลี่ย สัดส่วนโรค 0-100% แบ่ง phenotypes เป็น 2 ลักษณะ คือ R และ S (ตารางที่ 1) พบว่า 74 ต้น แสดงลักษณะ R และ 66 ต้น แสดงลักษณะ S (ตารางที่ 2) การกระจายตัวของ R และ S เป็นไปในอัตราส่วน 1:1 สอดคล้องกับการศึกษาของ Pakdeevaporn et al. (2005) ลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนสในประชากรนี้ ถูกควบคุมด้วยยีนด้อย 1 ตำแหน่ง (*co1*)

ตารางที่ 2 ความถี่ของ % สัดส่วนโรคแอนแทรคโนส หลังจากการปลูกเชื้อ *Colletotrichum capsici* isolate 158ci เป็นเวลา 7 วัน ในพริก 'PBC932', 'บางช้าง', F_1 และ $BC_1F_1P_2$ ($PBC932 \times F_1$)

ประชากร	% สัดส่วนโรคแอนแทรคโนส						Expected Mendelian ratio	χ^2	Prob- ability
	0	>1-2	>2-5	>5-15	>15-25	>25			
'PBC932'	10	0	0	0	0	0			
'บางช้าง'	0	0	0	0	10	0			
F_1	0	0	0	0	9	11			
$BC_1F_1P_2$	74	3	5	2	13	43	1:1	0.457	0.499

2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะสัณฐานที่ศึกษา 8 ลักษณะ มี 3 ลักษณะ ได้แก่ สีม่วงบริเวณข้อ (A) ความเรียบของใบ (Sm) และ มุมระหว่างดอกกับก้านชูดอก (Af) ที่มีการกระจายตัวไม่เป็นไปตามกฎของ Mendel (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การกระจายตัวของลักษณะทางสัณฐานวิทยา 8 ลักษณะ ในประชากร BC₁F₁P₂

Gene loci	No. of plants observed	Phenotypes P ₁ : P ₂	Observed frequency	Expected Mendelian ratio	χ^2	Probability
A*	140	purple : green	117 : 23	1 : 0	-	-
Mf	140	single : multiple	0 : 140	0 : 1	-	-
Sm*	134	smooth : curly	29 : 105	1 : 0	-	-
up-2	134	down : up	57 : 77	1 : 1	2.99	0.084
cl	131	dark : light	56 : 75	1 : 1	2.76	0.097
ya	133	purple : yellow	61 : 72	1 : 1	0.91	0.340
Af*	135	>90° : 90°	50 : 85	-	-	-
StL	134	long : short	69 : 65	1 : 1	0.12	0.730

P₁ = บางช้าง ; P₂ = PBC932

* การกระจายตัวไม่เป็นไปตามกฎของ Mendel

3. DNA เครื่องหมาย

3.1 Microsatellite

จาก microsatellite 139 ตำแหน่ง พบว่ามี 65 ตำแหน่ง (47%) ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง 'PBC932' และ 'บางช้าง' ได้ ส่วนอีก 50 ตำแหน่ง (36%) ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ และอีก 24 ตำแหน่ง (17%) ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้

Microsatellite 65 ตำแหน่ง ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง 'PBC932' และ 'บางช้าง' นำมาทดสอบในประชากร BC₁F₁P₂ การกระจายตัวของ marker ในประชากร ควรเป็น 1:1 ของแถบ DNA เหมือน 'PBC932' และแถบ DNA เหมือน 'บางช้าง' พบว่า มี 35 ตำแหน่ง มีการกระจายตัว 1:1 (ภาพที่ 1); 29 ตำแหน่ง ไม่เป็น 1:1; และ 1 ตำแหน่ง ไม่มีการกระจายตัว (ตารางที่ 4)

3.2 EST

SCAR 8 ตำแหน่ง เป็น dominant marker (ภาพที่ 2) พบว่า SCAR ทั้ง 8 ตำแหน่ง มีการกระจาย ตัว 1:1 (presence : absence) (ตารางที่ 5) สอดคล้องกับกฎของ Mendel

CAPS 3 ตำแหน่ง เป็น co-dominant marker (ภาพที่ 3) เช่นเดียวกับ microsatellite พบว่า 2 ตำแหน่ง กระจายตัวในอัตราส่วน 1:1 ส่วนอีก 1 ตำแหน่ง มีการกระจายตัวไม่เป็น 1:1 (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 4 การกระจายตัวของ microsatellite 65 ตำแหน่ง ในพริกประชากร BC₁F₁P₂ (PBC932 x F₁)

Microsatellite	No. plants	Frequency		Expected Mendelian ratio	χ^2	Probability
		H	A			
G1	120	56	64	1 : 1	0.53	0.467
G4	127	49	78	1 : 1	6.62	0.010*
G5	60	29	31	1 : 1	0.07	0.791
G6	137	50	87	1 : 1	9.99	0.002*
G10	113	49	64	1 : 1	1.99	0.158
G12	137	58	79	1 : 1	3.22	0.073
G13	67	39	28	1 : 1	1.81	0.179
G14	134	74	60	1 : 1	1.46	0.227
G25	104	54	50	1 : 1	0.15	0.699
G27	127	83	44	1 : 1	11.98	0.001*
G28	130	73	57	1 : 1	1.97	0.160
G30	133	85	48	1 : 1	10.29	0.001*
G31	127	52	75	1 : 1	4.17	0.041*
G33	132	72	60	1 : 1	1.09	0.296
G34	140	65	75	1 : 1	0.71	0.399
G35	131	60	71	1 : 1	0.92	0.337
G37	137	70	67	1 : 1	0.07	0.791
G39	140	68	72	1 : 1	0.11	0.740
G40	128	74	54	1 : 1	3.13	0.077
G41	132	76	56	1 : 1	3.03	0.082
G42	132	41	91	1 : 1	18.94	0*
G47	140	19	121	1 : 1	74.31	0*
G48	134	44	90	1 : 1	15.79	0*
G49	120	63	57	1 : 1	0.30	0.584
G50	127	62	65	1 : 1	0.07	0.791
G51	140	58	82	1 : 1	4.11	0.043*
G54	129	56	73	1 : 1	2.24	0.134
G55	106	38	68	1 : 1	8.49	0.004*
G57	96	61	35	1 : 1	7.04	0.008*
G58	137	56	81	1 : 1	4.56	0.033*

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Microsatellite	No. plants	Frequency		Expected Mendelian ratio	χ^2	Probability
		H	A			
G60	100	54	46	1 : 1	0.64	0.424
G61	117	40	77	1 : 1	11.70	0.001*
G64	132	49	83	1 : 1	8.76	0.003*
G65	140	36	104	1 : 1	33.03	0*
PMC1	94	60	34	1 : 1	7.19	0.007*
PMC3	140	61	79	1 : 1	2.31	0.129
PMC6	135	49	86	1 : 1	10.14	0.001*
PMC7	124	58	66	1 : 1	0.52	0.471
PMC9	140	62	78	1 : 1	1.83	0.176
PMC11	134	44	90	1 : 1	15.79	0*
PMC13	134	74	60	1 : 1	1.46	0.227
PMC17	100	52	48	1 : 1	0.16	0.689
PMC18	126	51	75	1 : 1	4.57	0.033*
PMC19	140	55	85	1 : 1	6.43	0.011*
PMC20	135	68	67	1 : 1	0.01	0.920
PMC21	140	68	73	1 : 1	0.19	0.663
PMC22	127	82	45	1 : 1	10.78	0.001*
PMC23	140	33	107	1 : 1	39.11	0*
PMC24	140	70	70	1 : 1	0.00	1
PMC25	132	52	80	1 : 1	5.94	0.015*
PMC26	126	40	86	1 : 1	16.79	0*
PMC29	131	68	63	1 : 1	0.19	0.663
PMC32	126	51	75	1 : 1	4.57	0.033*
PMC33	140	81	59	1 : 1	3.46	0.063
PMC39	140	58	82	1 : 1	4.11	0.043*
PMC45	138	74	64	1 : 1	0.72	0.396
PMC46	133	58	75	1 : 1	2.17	0.141
PMC49	138	0	138	1 : 1	na	-
PMC52	125	61	64	1 : 1	0.07	0.791
PMC54	131	60	71	1 : 1	0.92	0.337
PMC55	139	136	3	1 : 1	127.26	0*
PMC57	138	53	85	1 : 1	7.42	0.006*
PMC58	139	66	73	1 : 1	0.35	0.554
PMC63	138	69	69	1 : 1	0.00	1

na = non segregating marker

* = non Mendelian segregation linkage group

เครื่องหมายทั้งหมดจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ DNA ที่นำไปวิเคราะห์ linkage group มีเพียงจำนวน 53 ตำแหน่ง (ตารางที่ 7) โดยเลือกใช้เฉพาะเครื่องหมายที่มีการกระจายตัวสอดคล้องกับกฎของ Mendel สามารถสร้าง linkage group ได้ 11 กลุ่ม (ภาพที่ 4) ซึ่งครอบคลุมระยะทาง 770.8 cM และมีเครื่องหมายที่อยู่ใน unlinked group 15 ตำแหน่ง ดังนี้ PMC7 PMC21 PMC33 G1 G5 G10 G25 G50 G60 POM16 BOM25-1 BOM25-2 CA44 *StL* และ *A* โดยพบว่า ยีน *co1* ที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนส อยู่ในกลุ่มที่ 1 โดยมีเครื่องหมาย microsatellite PMC3 อยู่ห่างจากยีน 36.9 cM

ตารางที่ 5 การกระจายตัวของ SCAR 8 ตำแหน่ง ในพริกประชากร BC₁F₁P₂ (PBC932 x F₁)

SCAR	No. plants	Frequency		Expected Mendelian ratio	χ^2	Probability
		H	A			
POM16	133	57	76	1 : 1	2.71	0.010
BOM18	113	56	57	1 : 1	0.01	0.920
POM18-2	110	55	55	1 : 1	0.00	1
BOM25-1	124	62	62	1 : 1	0.00	1
BOM25-2	140	70	70	1 : 1	0.00	1
BOM4	140	69	71	1 : 1	0.03	0.862
BOM32	114	57	57	1 : 1	0.00	1
CA44	116	50	66	1 : 1	2.21	0.137

ตารางที่ 6 การกระจายตัวของ CAPS 3 ตำแหน่ง ในพริกประชากร BC₁F₁P₂ (PBC932 x F₁)

CAPS	No. plants	Frequency		Expected Mendelian ratio	χ^2	Probability
		H	A			
POM9c	90	45	45	1 : 1	0.00	1
BOM24c	133	14	119	1 : 1	82.89	0*
POM14c	133	56	77	1 : 1	3.32	0.068

* = non Mendelian segregation

ตารางที่ 7 เครื่องหมายที่ได้จากลักษณะทางสัณฐาน และ โมเลกุลที่นำไปใช้ในการสร้างแผนที่

Marker types	Total number of markers	Number of markers to map
Morphological traits	8	8
STMS	139	35
EST- SCAR	8	8

EST-CAPS	3	2
Total	158	53

4. การวิเคราะห์ QTL

4.1 Single point analysis เพื่อหาตำแหน่งของเครื่องหมาย ที่มีความสัมพันธ์กับ *co1* โดยใช้ข้อมูลของเครื่องหมายทั้งหมด รวมทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทั้งหมด 74 ตำแหน่ง ผลการวิเคราะห์ พบ DNA เครื่องหมาย 11 ตำแหน่ง และ ความยาวของยอดเกสรเพศเมีย มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทาน โดยที่ 6 ตำแหน่ง ได้แก่ microsatellite PMC19 G6 G28 G31 SCAR POM18-2 และ CAPS BOM24c มีความสัมพันธ์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % อีก 5 ตำแหน่ง microsatellite PMC3 PMC13 PMC17 PMC20 G41 และความยาวของยอดเกสรเพศเมีย มีความสัมพันธ์ที่ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 99% (ตารางที่ 8)

4.2 Interval mapping พบว่า microsatellite PMC3 มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานมากที่สุด ที่ค่า LOD เท่ากับ 4.09 (ตารางที่ 8) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ single point

ตารางที่ 8 เครื่องหมายที่เกี่ยวข้องกับลักษณะเชิงปริมาณของลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนส (*co1*)

Marker types	Gene or marker loci	<i>P-value</i>	LOD	Location mapped
Microsatellite	PMC3	0.0001	4.09	LG1
Microsatellite	POM18-2	0.05	0.48	LG 2
Microsatellite	PMC13	0.01	0.53	LG 2
Microsatellite	PMC17	0.005	1.33	LG 2
Microsatellite	PMC20	0.01	1.07	LG 3
Microsatellite	G41	0.05	0.88	LG 3
Microsatellite	G28	0.05	0.73	LG 4
Microsatellite	PMC19	0.05	-	unmapped
Microsatellite	G6	0.05	-	unmapped
Microsatellite	G31	0.05	-	unmapped
Microsatellite	BOM24c	0.05	-	unmapped
Morphological	<i>StL</i>	0.001	-	unmapped

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

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

5. การคัดเลือกพริกสายพันธุ์ต้านทานในประชากรผสมกลับ

5.1 การคัดเลือกในประชากร BC₁F₂P₁

ผลการทดสอบการโรคในประชากร BC₁F₂P₁ จำนวน 16 line บนผลเขียวและแดง พบว่า บนผลเขียว มี 10 line มีการกระจายตัวของลักษณะต้านทาน อีก 6 line แสดงลักษณะอ่อนแอทั้งหมด (ตารางที่ 9) ส่วนบนผลแดง พบ 3 line มีการกระจายตัวของลักษณะต้านทาน อีก 13 line แสดงลักษณะอ่อนแอทั้งหมด (ตารางที่ 9)

ได้คัดเลือกและเก็บเมล็ดจากต้นที่มีลักษณะต้านทานทั้งหมด จำนวน 18 ต้น ซึ่งเป็นเมล็ดรุ่นประชากร BC₁F₃P₁ ทั้งนี้ มีต้นที่แสดงลักษณะต้านทานทั้งบนผลแดงและเขียว 2 ต้น ซึ่งได้ปลูกเพื่อทดสอบโรค และคัดเลือกในปีถัดมา (2550)

5.2 การคัดเลือกในประชากร BC₁F₃P₁

ปลูก BC₁F₃P₁ 18 line 20 ต้น/line ซึ่งมีประชากรทั้งหมด 360 ต้น สามารถทดสอบโรคได้ 227 ต้น และคัดเลือกต้นต้านทานได้ 18 ต้น ซึ่งมีลักษณะทางพืชสวนที่ได้ศึกษาไว้ ดังในตารางที่ 10

ตารางที่ 9 การประเมินโรคแอนแทรคโนสในประชากร BC₁F₂P₁ จำนวน 16 line

Line	Anthracnose evaluation on green fruits		
	% disease	No. R plants	No. S plants
1	13-40	0	26
2	0-62	2	37
3	15-60	0	34
4	15-47	0	22
5	0-42	4	15
6	12-51	0	19
7	0-40	4	28
8	0-54	1	21
9	13-43	0	24
10	16-100	0	16
11	0-45	2	27
12	0-42	1	23
13	0-40	1	31
14	0-36	1	20
15	0-57	1	29
16	0-86	1	19

ตารางที่ 10 ลักษณะทางพืชสวนของประชากร BC₁F₃P₁ ที่คัดเลือกไว้ จำนวน 18 ต้น: PH = plant height (cm); PW = plant width (cm); DF = days to flowering; FW = average fruit weight (g); FL = fruit length (cm); FD = fruit diameter (cm); FT = fruit thickness (mm); PL = pedicel length (cm); PD = pedicel diameter (mm)

No.	line	PH	PW	DF	FW	FL	FD	FT	PL	PD
1	5-11-3-2	49	51	47	4.05	6.11	1.55	1.55	2.60	2.57
2	5-11-3-7	48	49	45	4.18	6.21	1.60	1.62	2.60	2.67
3	5-11-3-13	49	51	47	4.21	6.11	1.57	1.60	2.61	2.60
4	5-20-4-3	49	50	45	5.11	5.48	1.84	1.87	3.52	2.97
5	5-20-4-7	48	49	46	5.36	5.45	1.82	1.84	3.30	2.95
6	5-31-5-8	48	49	45	6.3	6.80	2.00	2.08	3.25	2.75
7	5-35-6-2	49	50	47	4.28	5.85	1.67	1.52	3.55	3.20
8	5-35-6-8	49	50	45	4.36	5.86	1.68	1.54	3.45	3.05
9	5-35-6-16	48	49	47	4.33	5.89	1.66	1.53	3.50	3.11
10	7-3-7-1	60	56	42	3.8	5.46	1.50	1.27	2.76	3.27
11	7-27-8-20	59	55	41	3.83	6.11	1.25	1.48	2.68	2.76
12	7-40-10-5	60	56	42	4.80	6.21	1.42	1.53	3.24	3.41
13	7-40-10-8	60	56	42	4.90	6.19	1.40	1.55	3.14	3.43
14	7-40-10-13	60	56	42	4.86	6.27	1.44	1.53	3.21	3.47
15	7-40-10-14	60	55	42	4.82	6.24	1.47	1.56	3.13	3.45
16	11-36-13-1	53	55	45	1.88	4.20	1.45	1.25	3.84	2.69
17	11-36-13-13	51	51	45	1.98	4.18	1.44	1.27	3.80	2.67
18	11-36-13-15	53	55	45	2.00	4.21	1.46	1.23	3.88	2.68

References

- Bosland P.W. 2006. The genes of *Capsicum*. HortScience 41: 1169-1187.
- Kanchana-udomkan C., Taylor P.W.J. and Mongkolporn O. 2004. Development of a bioassay to study anthracnose infection of *Capsicum chinense* Jacq. fruit caused by *Colletotrichum capsici*. Thai Journal of Agricultural Science 37: 293-297
- Lander E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J., Lincoln S.E. and Newburg L. 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1: 174-181
- Lee J.M., Nahm S.H., Kim Y.M., and Kim B.D. 2004. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper: Theoretical and Applied Genetics 108: 619-627

- Mongkolporn O., Dokmaihom Y., Kanchana-Udomkan C., and Pakdeeveraporn P. 2004. Genetic purity test of F₁ hybrid *Capsicum* using molecular analysis. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79: 449-451
- Montri P., Taylor P.W.J. and Mongkolporn O. 2008. Pathotypes of *Colletotrichum capsici* the causal agent of chili anthracnose in Thailand. *Plant Disease*, submitted.
- Pakdeeveraporn P., Wasee S., Taylor P.W.J. and Mongkolporn O. 2005. Inheritance of resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum capsici* in *Capsicum*. *Plant Breeding* 124: 206-208
- Sambrook J. and Russell D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Taylor P., Mongkolporn O., Than P. P., Montri P., Ranathunge N., Kanchana-udomkan C., Ford R., Pongsupasamit S., Hyde K. 2007. Pathotypes of *Colletotrichum* spp. infecting chilli peppers and mechanisms of resistance, pp 29, *Proceedings of the First International Symposium on Chili Anthracnose*, Seoul, Korea
- Than P. P., Rajesh J., Hyde K. D., Pongsupasamit S., Mongkolporn O. and Taylor P. W. J. 2008. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose infection on chilli (*Capsicum* spp). *Plant Pathology (In Press)*
- Van Ooijen J., Boer M., Jansen R. and Maliepaard C. 2002. MapQTL 4.0, Software for the Calculation of QTL Positions on Genetic Maps. *Plant Research International*, Wageningen, The Netherlands.
- Yoon, J.B., Yang D.C., Lee W.P., Ahn S.Y. and Park H.G. 2004. Genetic resources resistant to anthracnose in the genus *Capsicum*. *Journal of Korean Society of Horticultural Science* 45: 318-323.

Project Outputs

1. International publications

- Kanchana-udomkan C., Taylor P.W.J. and **Mongkolporn O.** 2004. Development of a bioassay to study anthracnose infection of *Capsicum chinense* Jacq. fruit caused by *Colletotrichum capsici*. Thai Journal of Agricultural Science 37: 293-297
 - Reprint is attached
 - หมายเหตุ เอกสารตีพิมพ์ฉบับนี้ submit ในช่วงปีแรกของโครงการ และตอบรับแต่เพียงพิมพ์ออกเมื่อ 2007 โดยที่วารสารไม่ได้ปรับปรุงตามปัจจุบัน
 - Inheritance of resistance to anthracnose in chili at seedling and different fruit stages (in preparation)
2. สายพันธุ์ต้านทาน ที่ยังคงต้องพัฒนาต่อไป เพื่อให้ได้ลักษณะที่ดี และลักษณะต้านทานคงที่
 3. ความคืบหน้าในการพัฒนาเครื่องหมายเพื่อใช้คัดเลือกลักษณะต้านทานโรคแอนแทรคโนส

ภาคผนวก

เอกสารประกอบ

1. Reprint เรื่อง Development of a bioassay to study anthracnose infection of *Capsicum chinense* Jacq. fruit caused by *Colletotrichum capsici*
2. Proceedings of The 5th Taiwan-Thailand Bilateral Conference: Agriculture for improving human life-the international collaboration on tropical agriculture
 - Title of presentation 'Anthracnose disease of chili pepper – breeding and pathogenicity'.
3. Proceedings of the Asian Mycology Congress 2007
 - Title of presentation 'Anthracnose disease of chili pepper – diversity and pathotypes'
4. Proceedings of the First International Symposium on Chili Anthracnose
 - Title of presentation 'Pathotypes of *Colletotrichum* spp. infecting chili peppers and mechanisms of resistance'
 - 'Colletotrichum acutatum associated with anthracnose disease on chili (*Capsicum* spp.) in Thailand'