



รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่วางตัวอยู่ติดกับยีนควบคุมลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่โดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม

Identification of Molecular Markers Linked to the Gene (s) Resistant to Field Weathering of Soybean Seeds using Bulked Segregant Analysis

โดย

RCH

SB

205

157

0648ก

นายอารมย์ ศรีพิจิตต์¹

นางวิภา หงษ์ตระกูล²

นางประภา ศรีพิจิตต์³

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน..... 78078

วัน,เดือน,ปี..... 2.11.2551

1. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
3. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสาร

11814607

ได้รับแจ้งการนำไปใช้.....

บทคัดย่อ

ในการศึกษาเพื่อค้นหาเครื่องหมายโมโลกุลที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่โดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม ประกอบด้วย 3 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาหาความแปรปรวน (variation) ในลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ของถั่วเหลือง จำนวน 28 สายพันธุ์/พันธุ์ที่รวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ พบว่า ถั่วเหลืองทั้ง 28 สายพันธุ์/พันธุ์มีความแปรปรวนในลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ โดยสายพันธุ์ที่มีความต้านทานสูงต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่มีจำนวน 4 สายพันธุ์/พันธุ์ ได้แก่ สจ 1, GC 2796, GC 10848 และ GC 10981

การทดลองที่ 2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลายพิมพ์ RAPD และ AFLP ของถั่วเหลือง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลือง พบว่า จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา 10 ลักษณะ สามารถจัดแบ่งถั่วเหลืองออกเป็น 3 กลุ่ม ในขณะที่การศึกษาลายพิมพ์ RAPD และ AFLP โดยใช้ 206 RAPD marker และ 437 AFLP marker สามารถแบ่งถั่วเหลืองออกเป็น 5 กลุ่ม ซึ่งจะเห็นได้ว่า ลายพิมพ์ RAPD และ AFLP สามารถนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ละเอียดกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา นอกจากนี้การแบ่งกลุ่มถั่วเหลืองโดยใช้ลายพิมพ์ RAPD และ AFLP ยังสอดคล้องกับแหล่งที่มาของถั่วเหลืองแต่ละสายพันธุ์/พันธุ์ และประวัติของการผสมพันธุ์

การทดลองที่ 3 การศึกษาหาเครื่องหมาย RAPD และ AFLP ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่โดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม (bulk segregant analysis) พบว่า เครื่องหมาย AFLP 2 ตัว คือ Eaag/Mcac-233 และ Eact/Mctt-157 วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับกลุ่มยีน (QTL) ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ โดยกลุ่มยีนนี้อยู่ห่างจากเครื่องหมาย Eaag/Mcac-233 ประมาณ 14 cM และเครื่องหมาย AFLP ทั้งสองอยู่ในกลุ่ม linkage เดียวกัน โดยอยู่ห่างกัน 25.8 cM เครื่องหมาย AFLP ที่ได้นี้สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ (marker assisted selection) ต่อไป

ABSTRACT

Identification of DNA markers linked to genes controlling field weathering resistance in soybean using bulk segregant analysis was conducted by 3 serial experiments.

Experiment 1 Variation in field weathering resistance was investigated among the 28 soybean lines/varieties collected from various sources. It was found that all soybean lines/varieties showed variation in field weathering resistance. There were 4 soybean lines/varieties having high resistance to field weathering involving SJ 1, GC 2796, GC 10848 and GC 10981.

Experiment 2 Genetic diversity was evaluated in 28 soybean lines/varieties using morphological characters and DNA banding pattern (RAPD and AFLP marker). It was revealed that the 10 morphological characters could classify 28 soybean lines/varieties into 3 groups while the DNA banding patterns could identify soybean lines/varieties into 5 distinct groups. The results clearly showed that DNA banding patterns could be used to identify genetic diversity in more detail than morphological characters. Moreover, the clusters of soybean verified by DNA banding pattern were corresponded with their germplasm sources and pedigree.

Experiment 3 Identification of DNA markers (RAPD and AFLP markers) linked to genes controlling field weathering resistance was conducted using bulk segregant analysis. It was manifested that two AFLP markers (Eaag/Mcac-233 and Eact/Mctt-157) were linked to a major QTL (quantitative trait loci) controlling field weathering resistant character. This QTL was located with a genetic distance of 14 cM from Eaag/Mcac-233 marker. Both markers were in the same linkage group with a genetic distance of 25.8 cM. The AFLP markers obtained can be used for assisting selection of soybean resistant to field weathering in breeding program.

คำนิยม

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่จำเป็นในการทำวิจัย ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ใช้แปลงทดลองเพื่อปลูกถั่วเหลือง นอกจากนี้ ขอขอบคุณ นายรัฐ เกวานันท์ นางสาวศิริขวัญ สวัสดิ์ชิตังค์ นางสาวพีรยา ชนะโรจน์ นางสาวปทุมวีร์ เดชครอง และ Mr. Ye changrong นิสิตและนักศึกษาปริญญาโทและเอก ที่มีส่วนช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัย เก็บข้อมูล และวิเคราะห์ผลการวิจัย จนทำให้งานวิจัยนี้มีความสมบูรณ์ และสำเร็จลงด้วยดี

นายอารมย์ ศรีพิจิตร
นางวิภา หงษ์ตระกูล
นางประภา ศรีพิจิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	I
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	11
ผลการทดลอง	17
วิจารณ์	58
สรุป	70
เอกสารอ้างอิง	71



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	Soybean genotypes, origin and seed coat color.	12
2	Standard germination and field emergence of seeds of 28 soybean varieties/lines following three weathering treatments.	18
3	Average values of electrical conductivity ($\mu\text{s/cm/g}$ seed) and imbibition (mg/seed) in seeds of 28 soybean varieties/lines following three weathering treatments.	20
4	Average values of seed size, hard seed, seed coat weight and percent of seed coat of 28 soybean varieties/lines collected at harvest maturity.	22
5	Correlation coefficient between seed quality and physical characters of seeds of 28 soybean varieties/lines from control and field weathering (SG = standard germination, FE = field emergence, IMB = imbibition, EC = electrical conductivity, ET = eccentricity, PHS = percent hard seed, SW = 100 seed weight, SCW = seed coat weight, PSC = percent seed coat).	23
6	Data of 10 morphological characters used for cluster analysis of 28 soybean varieties/lines.	25
7	Morphological classification used for cluster analysis.	26
8	Nucleotide sequence, total DNA bands, polymorphic bands from DNA banding patterns of 28 soybean varieties/lines by RAPD technique.	28
9	DNA bands of 28 soybean varieties/lines analysed by RAPD technique using 30 primers.	31
10	DNA amplification of soybean varieties CM 60, GC10848 and GC10981 by AFLP technique.	34
11	Total DNA bands, polymorphic bands of soybean identified by AFLP technique with various combination of primers.	34
12	Germination of the bulked F2 progenies resistant and susceptible to field Weathering.	44
13	The sequencs of the cloned DNA fragments.	51
14	Sequence similarity of the clone DNA fragments and the accessions	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	Registering information of cloned and sequenced DNA fragments.	52
16	SCAR markers designed from the sequence of cloned DNA fragments.	54
17	One way ANOVA test on marker segregation and field weathering resistance of 139 F2 progenies.	55



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	Phylogenetic tree showing the relationship among 28 soybean varieties/line based on the similarity in morphological characters.	24
2	Segregation pattern of 28 soybean varieties/lines identified by principal component analysis (PCA) using genetic similarity of 10 morphological characters.	26
3	DNA banding patterns of 28 soybean varieties/lines analysed by RAPD technique with primer OPC 14 (M = standard DNA bands, 1-28 = SJ 1, SJ 2, SJ 4, SJ 5, ST 1, ST 2, CM 2, CM 3, CM 60, NW 1, GC2679, GC2796, GC3318, GC4120, GC4637, GC4796, GC7231, GC9822, GC9948, GC10215, GC10848, GC10950, GC10981, GC10992, GC11101, GC11254, pk462 and kusl20004, respectively).	29
4	DNA banding patterns of 28 soybean varieties/lines analysed by RAPD technique with primer OPC 19 (M = standard DNA bands, 1-28 = SJ 1, SJ 2, SJ 4, SJ 5, ST1, ST 2, CM 2, CM 3, CM 60, NW 1, GC2679, GC2796, GC3318, GC4120, GC4637, GC4796, GC7231, GC9822, GC9948, GC10215, GC10848, GC10950, GC10981, GC10992, GC11101, GC11254, pk462 and kusl20004, respectively).	29
5	DNA banding patterns of 28 soybean varieties/lines analysed by RAPD technique with primer OPE 18 (M = standard DNA bands, 1-28 = SJ 1, SJ 2, SJ 4, SJ 5, ST1, ST 2, CM 2, CM 3, CM 60, NW 1, GC2679, GC2796, GC3318, GC4120, GC4637, GC4796, GC7231, GC9822, GC9948, GC10215, GC10848, GC10950, GC10981, GC10992, GC11101, GC11254, pk462 and kusl20004, respectively).	30
6	DNA banding patterns of 28 soybean varieties/lines analysed by RAPD technique with primer OPE 20 (M = standard DNA bands, 1-28 = SJ 1, SJ 2, SJ 4, SJ 5, ST1, ST 2, CM 2, CM 3, CM 60, NW 1, GC2679, GC2796, GC3318, GC4120, GC4637, GC4796, GC7231, GC9822, GC9948, GC10215, GC10848, GC10950, GC10981, GC10992, GC11101, GC11254, pk462 and kusl20004, respectively).	30
7	Phylogenetic tree manifesting the relationship among 28 soybean varieties/lines based on genetic similarity identified by RAPD technique.	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
8	Distribution of polymorphic information content (PICs) for 206 RAPD markers of 28 soybean varieties/lines.	32
9	Distribution pattern of 28 soybean varieties/lines identified by principal component analysis (PCA) using genetic similarity of 206 RAPD markers.	33
10	DNA banding patterns of 28 soybean varieties/lines analysed by AFLP technique with primer E-AAC/M-CAT (M = standard DNA bands, 1-28 = SJ 1, SJ 2, SJ 4, SJ 5, ST1, ST 2, CM 2, CM 3, CM 60, NW 1, GC2679, GC2796; GC3318, GC4120, GC4637, GC4796, GC7231, GC9822, GC9948, GC10215, GC10848, GC10950, GC10981, GC10992, GC11101, GC11254, pk462 and kusl20004, respectively).	35
11	DNA banding patterns of 28 soybean varieties/lines analysed by AFLP technique with primer E-AAC/M-CTC (M = standard DNA bands, 1-28 = SJ 1, SJ 2, SJ 4, SJ 5, ST1, ST 2, CM 2, CM 3, CM 60, NW 1, GC2679, GC2796, GC3318, GC4120, GC4637, GC4796, GC7231, GC9822, GC9948, GC10215, GC10848, GC10950, GC10981, GC10992, GC11101, GC11254, pk462 and kusl20004, respectively).	36
12	Phylogenetic tree exhibiting the relationship among 28 soybean varieties/lines based on genetic similarity identified by AFLP technique.	37
13	Distribution of polymorphic information contents (PICs) for 437 AFLP markers of 28 soybean varieties/lines.	38
14	Distribution pattern of 28 soybean varieties/lines identified by principal component analysis (PCA) using genetic similarity of 437 AFLP markers.	38
15	Phylogenetic tree showing the relationship among 28 soybean varieties/lines based on genetic similarity identified by RAPD and AFLP techniques.	39
16	Distribution pattern of 28 soybean varieties/lines identified by principal component analysis (PCA) using genetic similarity of 643 RAPD and	40

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์สงขลา ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	Hybridty of F_1 plants identified by SSR primer. The PCR amplification was carried out by SSR primer SOYPRO 1. PCR products were separated by 6% denatured polyacrylamide gel and visualized by silver stain.	41
18	The distribution of seed germination of F_2 progenies of the cross CM 60/ GC 10848 after being subjected to incubator weathering.	42
19	The distribution of seed germination of F_2 progenies of the cross CM 60/GC10981 after being subjected to incubator weathering.	43
20	DNA banding pattern analysed by AFLP technique using various combination of primers (M = bands of standard DNA, 1 = GC10848, 2 = CM 60, 3 = resistant bulk, 4 = susceptible bulk).	46
21	An example of detecting linked polymorphism by bulk segregant analysis using AFLP primer combination Eaag/Mcac. Lanes from the left to right are GC10981, CM 60, resistant bulk and susceptible bulk. The arrow indicates the linked polymorphism that GC10981 and resistant bulk showed DNA band, but CM60 and susceptible bulk showed no band.	50
22	An example of the sequence similarity compared by BLAST. The sequence (1-118) of Eact/Mctt-157 is overlapped with the sequence (260-374) of Bu765372. One hundred and two bases (86%) are the same.	53
23	Boxplot of the field weathering resistance of different genotypes of markers Eact/Mctt-157 and Eaag/Mcac-233. Mean is the average of the germination and viability by incubator weathering. Genotype 1 indicates both markers presented bands (AABB, AABb, AaBB or AaBb); 2 indicates one of the markers presented bands (AAAb, Aabb, aaBB or aaBb); 3 indicates neither markers presented bands (aabb). N is the number of the F_2 progenies in same genotype.	56
24	The co-segregation of the bulked F_2 progenies by marker Eaag/Mcac-233. CM = CM60, GC = GC10981, S = susceptible plant, R = resistant plant.	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ปัจจุบันถั่วเหลือง [*Glycine max* (L.) Merr.] เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมากพืชหนึ่งของโลก โดยพิจารณาจากปริมาณการผลิต พื้นที่ปลูก และการค้าระหว่างประเทศ ปริมาณการผลิตถั่วเหลืองของโลกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วนับตั้งแต่ปี 1960 เป็นต้นมา(Hinson and Hartwig, 1982) จนถึงปี 2005 ทั่วโลกมีปริมาณการผลิตถั่วเหลืองรวมทั้งหมด 214 ล้านตัน (FAO, 2007) ทั้งนี้มีสาเหตุมาจากปริมาณการบริโภคถั่วเหลืองของประชากรโลกเพิ่มขึ้นอย่างมาก โดยถั่วเหลืองเป็นแหล่งอาหารที่ให้โปรตีนและน้ำมันที่มีราคาถูกที่สุด จึงทำให้เกิดการขยายตัวของอุตสาหกรรม การผลิตและการแปรรูปถั่วเหลืองเป็นน้ำมันและอาหารชนิดต่าง ๆ อย่างรวดเร็ว

สำหรับประเทศไทยรัฐบาลได้มองเห็นความสำคัญดังกล่าว จึงได้สนับสนุนให้มีการผลิตถั่วเหลืองโดยบรรจุไว้ในแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมตั้งแต่ปี 2510 เป็นต้นมา ความต้องการใช้ถั่วเหลืองภายในประเทศได้เพิ่มขึ้นจาก 13,000 ตันในปี 2510 เป็น 1.15 ล้านตัน ในปี 2532 (Na Lampang, 1993) และยังเพิ่มขึ้นมาโดยตลอด อย่างไรก็ตามปริมาณการผลิตถั่วเหลืองยังต่ำกว่าเป้าหมายอยู่มาก ในปี 2548 ประเทศไทยผลิตถั่วเหลืองได้ในปริมาณ 221,000 ตัน ซึ่งไม่เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค ทำให้ต้องมีการนำเข้าถั่วเหลืองจากต่างประเทศในปริมาณสูงถึง 1,607,784 ตัน (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, 2549) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเพิ่มปริมาณการผลิตถั่วเหลืองให้สูงขึ้น ซึ่งสามารถทำได้โดยการขยายพื้นที่เพาะปลูกและเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่ แต่การขยายพื้นที่เพาะปลูกอาจทำได้ยาก ดังนั้นการเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่จึงเป็นแนวทางที่ควรได้รับการสนับสนุนเป็นอย่างยิ่ง

อุปสรรคสำคัญที่เป็นข้อจำกัดในการเพิ่มผลผลิตของถั่วเหลืองของประเทศไทย ซึ่งอยู่ในเขตร้อนชื้น คือ ความยากลำบากในการผลิตเมล็ดพันธุ์ให้มีคุณภาพสูงหรือมีความงอกและความแข็งแรงสูง (Pascal and Ellis, 1978; Nangju *et al.*, 1980) ซึ่งเป็นปัจจัยพื้นฐานสำคัญที่จะทำให้ต้นกล้าที่งอกเร็ว สม่าเสมอ ตั้งตัวดีและให้ผลผลิตสูงในที่สุด เป็นที่ทราบกันดีว่าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่สุกแก่ภายใต้สภาพอากาศที่เย็นและแห้งหรือฝนตกน้อยและมีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ เมื่อเก็บเกี่ยวจะทำให้ได้เมล็ดพันธุ์ที่คุณภาพสูงสุด ดังนั้นเกษตรกรที่ปลูกถั่วเหลืองในช่วงฤดูฝน จึงควรเก็บเกี่ยวเมล็ดพันธุ์หลังจากที่หมดฤดูฝนแล้ว อย่างไรก็ตาม บ่อยครั้งที่ฝนนยังคงอยู่ที่หมดฤดูฝนแล้ว ดังนั้นสภาพการมีฝนตกบ่อยหรือยาวนานสลับกับอากาศร้อนที่เกิดขึ้นในระหว่างระยะภายหลังการสุกแก่ก่อนการเก็บเกี่ยว (postmaturation preharvest period) จะทำให้ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองลดลงอย่างรวดเร็ว การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดในสภาพดังกล่าวนี้ เรียกว่า การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ (field weathering) (Tekrony *et al.*, 1980) ศูนย์ขยายพันธุ์พืชที่ 4 จังหวัดชัยนาทได้รายงานความสูญเสียของการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในฤดูฝนปี 2542 ซึ่งเกิดจากการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์ในสภาพไร่เป็นปริมาณถึง 638 ต้น คิดเป็นมูลค่า 6 ล้านบาท ถ้าความสูญเสียดังกล่าวเกิดขึ้นทั่วประเทศซึ่งมีการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในฤดูฝนทั้งหมด 4,595 ต้น/ปี (กองขยายพันธุ์พืช, 2540) จะคิดเป็นมูลค่าความเสียหายสูงถึงประมาณ 69 ล้านบาท (ราคาซื้อขายเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง 15 บาท/กิโลกรัม)

ทราบได้ว่าการผลิตถั่วเหลืองในเขตร้อนชื้นยังต้องอาศัยน้ำฝนเป็นหลัก การหลีกเลี่ยงไปจากสภาพอากาศที่ร้อนและชื้นที่เกิดขึ้นในระยะหลังการสุกแก่ก่อนการเก็บเกี่ยวของเมล็ดซึ่งทำให้เมล็ดเสื่อมคุณภาพ จึงอาจจะไม่สามารถทำได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เกษตรกรที่นิยมใช้ปลูกกันมากที่สุดนั้น เมล็ดมีลักษณะอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ (รัฐ, 2546) แนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 คือ การปรับปรุงพันธุ์ให้เมล็ดมีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่โดยยังคงลักษณะที่ดีอื่น ๆ ของถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ไว้ ทั้งนี้จะช่วยให้เกษตรกรได้ใช้เมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพดีซึ่งจะส่งผลให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นได้

ปัจจุบันนักปรับปรุงพันธุ์พืชได้นำเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ชนิดต่าง ๆ เช่น RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) และ SSR (Simple Sequence Repeat) มาใช้ในการคัดเลือกต้นพืชที่มีพันธุกรรม (genotype) ที่ต้องการจากประชากรพืชที่รวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ หรือประชากรพืชที่ได้จากการผสมกลับ (marker assisted selection หรือ MAS) โดยไม่ต้องอาศัยการดูจากลักษณะภายนอก (phenotype) จึงช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายเนื่องจากไม่ต้องทดสอบโรคและแมลงในแปลงปลูกหรือไม่ต้องรอจนถึงระยะสุกแก่หรือเก็บเกี่ยวผลผลิต นอกจากนี้ยังช่วยให้การคัดเลือกพืชมีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจากการคัดเลือกโดยดูจากพันธุกรรม จึงไม่มีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง แต่ก่อนที่จะนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ในการคัดเลือกพืช จะต้องตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการก่อน ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ตรวจหาจากสายพันธุ์RIL (recombinant inbred line) หรือจากสายพันธุ์ NIL (near isogenic line) หรือจากการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม (bulk segregant analysis หรือ BSL) อย่างไรก็ตาม การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่สนใจ โดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมนั้นเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าลักษณะที่เราสนใจนั้นซับซ้อนและไม่ทราบข้อมูลเกี่ยวกับพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะมาก่อน (Michelmore *et al.*, 1991 ; Poulsen *et al.*, 1995 ; Tragoonrung *et al.*, 1996 ; Mackay and Caligari, 2000 ; Murai *et al.*, 2001) เช่น ลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่ ซึ่งจากการตรวจเอกสารยังไม่พบรายงานว่ามีการศึกษาเกี่ยวกับพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะ

ดังกล่าวนี้เลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหาความแปรปรวน (variation) ในลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ของสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลืองที่รวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ และคัดเลือกสายพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่สำหรับใช้เป็นพันธุ์พ่อและแม่ในการผสมพันธุ์
2. เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลือง โดยการใช้ค่าความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมที่ได้จากการทำลายพิมพ์ RAPD และ AFLP
3. เพื่อติดตามหายีน (gene tagging) ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ของถั่วเหลือง โดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมของประชากรลูกชั่วที่ 2 (F_2) ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ต้านทานและพันธุ์ อ่อนแอ
4. เพื่อหาลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (DNA fragments) จากเครื่องหมาย RAPD และ AFLP ที่วางอยู่ชิดกับยีนต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดในสภาพไร่ นำ วิเคราะห์ลำดับเบสเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank และพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจงขึ้นมาใหม่ สำหรับใช้ในการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่

การตรวจเอกสาร

การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่

การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่จนทำให้เมล็ดพันธุ์สูญเสียความงอกและความแข็งแรง อาจเกิดจากการเสื่อมสภาพของเมมเบรน (membrane degradation) ของเซลล์ เมื่อเมล็ดเริ่มมีการเสื่อมคุณภาพเมมเบรนจะสูญเสียความสามารถในการควบคุมการเก็บกักสารต่าง ๆ ภายในเมล็ด กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง อัตราการหายใจลดลง กรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตและพัฒนาของต้นกล้าลดลง สูญเสียความทนทานต่อสภาพที่แปรปรวน เมล็ดพันธุ์เปลี่ยนสีและผลผลิตลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งความเสียหายที่เกิดจากเมมเบรนของไมโทคอนเดรีย อาจเป็นสาเหตุเบื้องต้นของการเสื่อมคุณภาพ (Schoettle and Leopold, 1984 ; Ferguson *et al.*, 1990 a, b) Woodstock *et al.* (1985) ได้เปรียบเทียบการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ฝ้ายซึ่งเก็บเกี่ยวหลังจากปล่อยให้สุกแก่ภายใต้สภาพอากาศที่ไม่เหมาะสมในไร่หรือการเสื่อมคุณภาพในไร่ กับเมล็ดฝ้ายที่สุกแก่ในสภาพอากาศที่ควบคุมให้เหมาะสม (control) พบว่าความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ฝ้ายซึ่งสุกแก่ในสภาพไร่ลดลงอย่างมาก การสูญเสียเช่นนี้มีความสัมพันธ์กับการรั่วไหลของสารออกจากเมมเบรน การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่หรือแปลงปลูกจะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับสภาพอากาศในระยะสุกแก่ก่อนเก็บเกี่ยวของเมล็ด (วันชัย และคณะ, 2539)

ความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่

ความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่ อาจเกิดจากลักษณะทางกายภาพของเมล็ด เช่น ขนาด รูปร่าง สี และเปลือกหุ้มเมล็ด วันชัย และคณะ (2539) ได้ศึกษาการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง 10 พันธุ์ในสภาพไร่ พบว่าเมล็ดที่มีขนาดเล็ก รูปร่างยาวรี และมีเปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ดสูง มีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพมากกว่าเมล็ดที่มีขนาดใหญ่ รูปร่างกลม และมีเปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ดต่ำ Horling *et al.* (1994) รายงานว่าเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีสีเขียวมีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดมากกว่าเมล็ดพันธุ์สีเหลือง เนื่องจากเปลือกของเมล็ดพันธุ์ที่มีสีเหลืองมีลักษณะค่อนข้างบาง ทำให้เอมบริโอ (embryo) ถูกกระทบกระเทือนได้ง่าย ส่งผลให้เมล็ดเสื่อมคุณภาพได้ง่าย นอกจากเมล็ดพันธุ์ที่มีสีเขียวแล้ว เมล็ดพันธุ์ที่มีสีดำก็มีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพมากกว่าเมล็ดพันธุ์ที่มีสีเหลืองอีกด้วย (Dassou and Kueneman, 1984) ถั่วเหลืองที่มีเปอร์เซ็นต์เปลือกหุ้มเมล็ดสูงสามารถต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ได้ เนื่องจากเปลือกหุ้มเมล็ดที่หนาสามารถชะลอการซึมผ่านเข้าออกของน้ำได้ (Kuo, 1989) และการมีสารออกซิเจนที่ยึดอยู่ที่ฝักถั่วเหลือง จะอาจช่วยให้น้ำไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปยังเมล็ดส่งผลให้เมล็ดสามารถ

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ (Kru, 1978) ในถั่วเหลืองพันธุ์ปลูกทั่ว ๆ ไปไม่ค่อยพบลักษณะเมล็ดแข็ง แต่จะพบในถั่วเหลืองพันธุ์ป่า การที่ถั่วเหลืองมีลักษณะเมล็ดแข็งนั้นทำให้เมล็ดถั่วเหลืองมีการเสื่อมคุณภาพช้า แต่การมีลักษณะแบบนี้ถือได้ว่าเป็นการพักตัวอย่างหนึ่งและลักษณะเมล็ดแข็งสามารถถ่ายทอดพันธุกรรมได้

เครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือต่างสปีชีส์ และเป็นตำแหน่งของดีเอ็นเอที่อยู่บนโครโมโซม หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ (คลอโรพลาสต์ หรือไมโทคอนเดรีย) การที่เราสามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์หรือเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ วิธีตรวจสอบโพลิมอร์ฟิซึมของดีเอ็นเอ (DNA polymorphism) สามารถทำได้ 2 วิธี คือ 1) วิธีไฮบริไดเซชัน (hybridization) เป็นวิธีการตรวจสอบความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ (restriction enzyme) โดยอาศัยการไฮบริไดซ์ (hybridize) ระหว่างโพรบ (probe) กับดีเอ็นเอเป้าหมายในจีโนม (genome) ซึ่งได้แก่เครื่องหมาย RFLP มีขั้นตอนดังนี้ ย่อยดีเอ็นเอจากแผ่นเจลไปไว้บนเมมเบรนฟิลเตอร์ จากนั้นนำโพรบ (probe) มาไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอที่อยู่บนแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ เพื่อหาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่มีเบสเป็นคู่สมกับโพรบ โดยวิธี Southern blotting (สุรินทร์, 2545) และ 2) วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction หรือ PCR) ปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้ได้ปริมาณมากขึ้น โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวหรือเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพร้อมกันได้หลายตำแหน่ง เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว วิธีนี้มีหลายเทคนิคด้วยกัน เช่น เทคนิค RAPD และเทคนิค AFLP เป็นต้น

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD พัฒนาขึ้นโดย Williams *et al.* ในปี 1990 เป็นวิธีวิเคราะห์หลายพิกัดดีเอ็นเอโดยอาศัยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด ข้อดีของเทคนิคนี้คือ ทำได้ง่าย รวดเร็ว และให้ข้อมูลได้มาก แต่มีข้อเสียในเรื่องของการทำซ้ำบางครั้งได้ผลที่แตกต่างจากเดิม เนื่องจากเทคนิคนี้มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ และแถบดีเอ็นเอที่ไดยังแสดงการข่ม (dominant) ต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกต (homozygote) และเฮเทอโรไซโกต (heterozygote) ได้ ดังนั้น Vos *et al.* (1995) จึงได้พัฒนาเทคนิค AFLP ซึ่งได้มีการรวมเอาหลักการของเทคนิค RAPD และ RFLP เข้าด้วยกัน วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ทำได้โดย

การนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจากนั้นเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับ adapter เข้าที่ปลายทั้งสองข้างของดีเอ็นเอ adapter เป็นดีเอ็นเอสายคู่สั้น ๆ ที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นปลายเหนียวเหมือนกับปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนั้น adapter จึงสามารถเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอที่ตัดไว้ได้โดยใช้ปลายเหนียว (sticky and ligation) และที่ปลายนี้จะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ หลังจากเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อไป (สุรินทร์, 2545) เทคนิค AFLP มีข้อดีหลายอย่างคือ สามารถตรวจสอบความแปรปรวนของดีเอ็นเอได้เป็นจำนวนมาก ประมาณ 50-100 แถบต่อ 1 เจล ทำให้รวดเร็วและเสียค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธีอื่น ๆ (Morgante, 1994)

การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนควบคุมลักษณะต่าง ๆ โดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม

การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม (bulk segregant analysis) หมายถึงการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอโดยการรวมกลุ่มดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่มีอัลลีล (allele) ตรงกันไว้ด้วยกัน การวิเคราะห์แบบนี้จะรวมกลุ่มดีเอ็นเอโดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มนี้จะมีลักษณะที่แตกต่างกัน เช่น กลุ่มที่ต้านทานโรคและกลุ่มที่อ่อนแอต่อโรค

Michelmore et al. (1990) ได้เสนอวิธีการหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการศึกษา โดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมในประชากรลูกชั่วที่ 2 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์พ่อแม่ที่มีพันธุกรรม (genotype) อยู่ในสภาพที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) และพันธุ์พ่อกับพันธุ์แม่ต้องแสดงลักษณะที่ตรงกันข้าม เช่น ต้านทานต่อโรคกับอ่อนแอต่อโรค ซึ่งทำได้โดยการสกัดดีเอ็นเอจากประชากรลูกชั่วที่ 2 แล้วนำมารวมกันเป็นกลุ่มดีเอ็นเอ 2 กลุ่ม การสร้างกลุ่มดีเอ็นเอสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. สร้างกลุ่มดีเอ็นเอจากข้อมูลลักษณะที่แสดงออก (phenotype) ตัวอย่างเช่นการทดลองของ Michelmore et al. (1991) ได้ทำการรวมกลุ่มดีเอ็นเอจากลักษณะที่แสดงออกของผักกาดหอม โดยกลุ่มหนึ่งแสดงความต้านทานต่อโรคราน้ำค้าง ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งอ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง

2. การสร้างกลุ่มดีเอ็นเอจากข้อมูลพันธุกรรม โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอคัดเลือกพันธุกรรมที่ต้องการ ตัวอย่างเช่น Giovannoni et al. (1991) ได้ศึกษาหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะการหลุดร่วงของผล (joinless) และยีนที่ควบคุมไม่ให้ผลสุก (non-ripening) ในมะเขือเทศ โดยศึกษาจากประชากรลูกชั่วที่ 2 ซึ่งเกิดจากการผสมข้ามระหว่างมะเขือเทศ 2 ชนิด คือ *Lycopersicon esculentum* กับ *Lycopersicon pennellii* จากนั้นได้แบ่งกลุ่มดีเอ็นเอออกเป็น 2 กลุ่มโดยใช้เทคนิค RFLP ดังนี้ 1) กลุ่มที่มีพันธุกรรมเป็นโฮโมไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซกัสกับ *Lycopersicon esculentum* และ 2) กลุ่มที่มีพันธุกรรมเป็นโฮโมไซกัสกับ *Lycopersicon pennellii* ทำการรวมดีเอ็นเอในแต่ละกลุ่มเป็นกลุ่ม A และ B ตามลำดับ จากนั้นนำกลุ่มดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจหา polymorphism โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่ามีเครื่องหมายดีเอ็นเอ 2 เครื่องหมาย คือ 38J และ 148J วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมการหลุดร่วงของผลซึ่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 11 และเครื่องหมาย 307N วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมการสุกของผลซึ่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 10

การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมจัดว่าเป็นวิธีการที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพในการตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะที่สลับซับซ้อน น่าสนใจหรือไม่รู้ข้อมูลการควบคุมพันธุกรรมมาก่อน ปัจจุบันได้มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านนำวิธีการดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ควบคุมลักษณะต่าง ๆ ในถั่วเหลือง ดังเช่น Demirbas *et al.* (2001) ใช้เทคนิค SSR ในการหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีน *Rps* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora megasperma* ในถั่วเหลืองโดยศึกษาในประชากรลูกชั่วที่ 2 ร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม พบว่า เทคนิค SSR สามารถจัดกลุ่มของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีน *Rps* ได้ Chowdhury *et al.* (2000) ได้ศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานโรคราน้ำค้าง (*Pernospora manshurica*) ในถั่วเหลืองโดยศึกษาในประชากรลูกชั่วที่ 5 และประชากร BC₂F₃ ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ AGS 129 ที่ต้านทานต่อโรคราน้ำค้างและพันธุ์นครสวรรค์ 1 ที่อ่อนแอต่อโรคราน้ำค้างร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมและเทคนิค RAPD พบว่ามีเครื่องหมาย RAPD 2 เครื่องหมายคือ OPH-2 และ OPP-10 ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์ AGS 129 กับกลุ่มลูกที่ต้านทาน แต่ไม่ให้แถบดีเอ็นเอในพันธุ์นครสวรรค์ 1 กับกลุ่มลูกที่อ่อนแอ และเครื่องหมาย RAPD ทั้ง 2 มีระยะห่างจากยีน 4.9 และ 23.1 cM ตามลำดับ Alec *et al.* (2002) พบเครื่องหมาย AFLP ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีน *Rsv 4* ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรค mosaic virus ในถั่วเหลืองโดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม และเครื่องหมายนี้มีระยะห่างจากยีน *Rsv 4* ประมาณ 4.8 cM Zheng *et al.* (2003) ใช้เทคนิค RAPD ในการศึกษาหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อโรค mosaic virus ในถั่วเหลือง โดยศึกษาในประชากรลูกชั่วที่ 2 ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ ICGR 95-5383 ที่ต้านทานต่อโรคกับพันธุ์ HB1, Tiefeng 21, Amsoy และ Williams ที่อ่อนแอต่อโรคร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม พบว่ามีเครื่องหมาย RAPD 2 เครื่องหมาย คือ OPN 11₉₈₀ กับ OPN 11₁₀₇₀ โดย OPN 11₉₈₀ สามารถให้แถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์ ICGR 95-5383 กับกลุ่มลูกที่ต้านทาน แต่ไม่ให้แถบดีเอ็นเอในพันธุ์ HB1, Tiefeng 21, Amsoy และ Williams กับกลุ่มลูกที่อ่อนแอและ OPN 11₁₀₇₀ สามารถให้แถบดีเอ็นเอระหว่างพันธุ์ HB1 กับกลุ่มลูกที่อ่อนแอ แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอ

เอโนพันธุ์ ICGR 95-5383 กับกลุ่มลูกที่ต้านทาน และ Cervigni *et al.* (2004) ได้หาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 3 (cyst nematode race 3) ในถั่วเหลืองโดยศึกษาในประชากร BC₁F₂ ร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมและใช้ SSR ไพรมเมอร์ จำนวน 200 คู่ไพรมเมอร์ พบว่ามี SSR 2 เครื่องหมาย คือ Satt038 และ Satt163 ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อไส้เดือนฝอย

นอกจากนี้ยังมีการนำวิธีการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมมาใช้ศึกษาในพืชอื่น เช่น Poulsen *et al.* (1995) ได้ตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ต้านทานโรคราสนิมในข้าวบาร์เลย์โดยใช้เทคนิค RAPD ร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมในประชากรลูกชั่วที่ 2 พบว่าเครื่องหมาย OUO2 ที่มีขนาดประมาณ 2.7 กิโลเบสวางตัวอยู่ใกล้กับยีน *RphQ* ซึ่งควบคุมลักษณะความต้านทานโรคราสนิมโดยมีระยะห่างประมาณ 12 cM Miklas *et al.* (1993, 1996) ใช้เทคนิค RAPD วิเคราะห์ลักษณะความต้านทานโรคราสนิมในถั่ว common bean และพบเครื่องหมาย OA141100 วางตัวอยู่ใกล้กับยีน *Up 2* ซึ่งเป็นยีนควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรคราสนิม Lanceras (2000) ใช้เทคนิค AFLP เพื่อหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมปริมาณอะมิโลสในข้าวร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม พบว่ามีเครื่องหมาย AFLP 4 เครื่องหมายที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมปริมาณอะมิโลสในข้าวคือ AC5 (AC/CTA) กับ AC3 (AA/CTA) อยู่บนโครโมโซมที่ 3 และ AC11 (CT/CTA) กับ AC12 (CT/CTC) อยู่บนโครโมโซมที่ 6 วารุณี (2544) ศึกษาหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียวโดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมร่วมกับการใช้เทคนิค AFLP และสามารถคัดเลือกเครื่องหมาย AFLP ได้ 2 เครื่องหมายซึ่งแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่ทนทานและอ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก คือ เครื่องหมาย CGT/CTG และ CAG/TAC4 ซึ่งเครื่องหมายทั้ง 2 อยู่ในกลุ่มยีน (quantitative trait loci หรือ QTL) ที่ควบคุมลักษณะการขาดคลอโรฟิลล์ เครื่องหมายทั้ง 2 มีระยะห่างจากยีน 2.9 และ 3.0 cM ตามลำดับ และเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งสองอยู่บนโครโมโซมเดียวกัน Ouedraga *et al.* (2002) ได้ใช้เทคนิค AFLP ร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมเพื่อหาตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อไส้เดือนฝอย (*Rsg2-1*) ในถั่ว cowpea โดยศึกษาในประชากรลูกชั่วที่ 2 พบเครื่องหมาย AFLP 3 เครื่องหมาย คือ E-AAC/M-CAA₃₀₀, E-ACT/M-CAA₂₄, และ E-ACA/M-CAT_{140/150} ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีน *Rsg2-1* ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อไส้เดือนฝอย เครื่องหมายนี้มีระยะห่างจากยีนประมาณ 2.6 cM, 0.9 cM และ 0.9 cM ตามลำดับ และเครื่องหมายเหล่านี้จะพัฒนาเพื่อนำไปใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก (marker assisted selection) เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป อุไรวรรณ (2547) ศึกษาหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมการตอบสนองต่อช่วงแสงในถั่วเขียวนางแดง โดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมร่วมกับการใช้เทคนิค AFLP พบเครื่องหมาย TAC/CAG 1 อยู่ในกลุ่มยีน

(QTL) ที่ควบคุมการตอบสนองต่อช่วงแสงในถั่วนี้วนางแดง และ Giovanni et al. (2004) ตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรคราแป้ง (ol-2) ในมะเขือเทศโดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมในประชากรลูกชั่วที่ 2 ร่วมกับการใช้เทคนิค RAPD และ AFLP พบว่าไพรเมอร์ OPU 3 ของเทคนิค RAPD ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1500 คู่เบส ในกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแอต่อโรค ซึ่งได้นำแถบดีเอ็นเอที่พบนั้นไปพัฒนาเป็น CAPS marker เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายสำหรับช่วยในการคัดเลือกเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป และใช้เทคนิค AFLP ในการแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแอต่อโรคและต้านทานต่อโรค พันธุ์พ่อและพันธุ์แม่พบว่ามียีนไพรเมอร์จำนวน 26 ไพรเมอร์ที่สามารถบอกความแตกต่างได้

เครื่องหมายดีเอ็นเอกับการปรับปรุงพันธุ์พืช

การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นหนทางหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและความแม่นยำในการคัดเลือกพืชที่ต้องการได้ เนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยทำให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถคัดเลือกพืชได้ลึกลงไปจนถึงระดับดีเอ็นเอหรือยีน โดยดูจากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่เราต้องการ โดยตรงแทนการดูจากลักษณะภายนอก จึงไม่มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง (สมวงษ์ และอภิชาติ, 2538) ปัจจุบันนักปรับปรุงพันธุ์พืชได้เริ่มนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ในการคัดเลือกพืชเพื่อปรับปรุงลักษณะต่าง ๆ ของพืช ตัวอย่างเช่น Li et al. (2001) ได้ใช้เครื่องหมาย SSR 4 เครื่องหมาย คือ Satt 492, Satt358, Satt021 และ Satt 505 คัดเลือกถั่วเหลืองที่มียีนควบคุมลักษณะความต้านทานต่อโรครากปม (southern root-knot) โดยคัดเลือกในประชากรลูกผสมกลับ BC₂F₂ Schuster et al. (2001) ได้หาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ 14 ในถั่วเหลือง โดยศึกษาในประชากรลูกผสมกลับ BC₂F₂ ร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม พบว่าได้เครื่องหมาย SSR 4 เครื่องหมายคือ Satt 082, Satt001, Satt 574 และ Satt 301 และเครื่องหมาย RAPD 4 เครื่องหมายคือ OPAA-11, OPAE-08, OPR-7 และ OPY-07 จากนั้นนำเครื่องหมายที่ได้ไปใช้ในการคัดเลือกต้นที่มียีนต้านทานต่อไส้เดือนฝอยในประชากร F_{2:3} จำนวน 183 ต้น ซึ่งการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือกมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับการใช้วิธีคัดเลือกโดยวิธีปกติและ Walker et al. (2002) ได้ใช้เครื่องหมาย SSR ในการคัดเลือกถั่วเหลืองที่มียีนต้านทานต่อแมลงพวก Lepidopteran โดยคัดเลือกในประชากรลูกผสมกลับ BC₂F₃

นอกจากนี้นักปรับปรุงพันธุ์ได้นำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาคัดเลือกพืชเพื่อปรับปรุงลักษณะต่าง ๆ ในพืชอื่นๆ เช่น อภิชาติ และคณะ (2537) ได้นำเครื่องหมาย RFLP มาใช้ในการปรับปรุงข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ให้มีลักษณะไม่ไวต่อช่วงแสงในขั้นตอนการคัดเลือกต้นลูกผสมกลับชั่วที่ 1 (BC₁F₁) ที่เป็นเฮตเทอโรไซกัส (heterozygous) ได้โดยตรงก่อนทำการผสมกลับไปยังต้นข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ทำให้ย่นระยะเวลาในการทำการผสมกลับลงได้มาก

Hansen *et al.* (1997) ได้ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ 5 เครื่องหมาย (AA16, D13, F06, Y17 และ AJ05) ที่พัฒนามาจากเทคนิค RAPD ร่วมกับการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม มาใช้ในการคัดเลือกต้นที่มียีนแก้ความเป็นหมัน (R_f) ในประชากร BC_1F_2 ของ *Brassica napus* พบว่าสามารถคัดเลือกต้นที่มียีนแก้ความเป็นหมันได้ 906 ต้น จากประชากรทั้งหมด 4605 ต้น ซึ่งทั้ง 906 ต้นมีถิ่นอยู่ในสภาพโฮโมไซกัส Davierwala *et al.* (2001) ได้ใช้เครื่องหมาย STMS จำนวน 11 เครื่องหมายและเครื่องหมาย STS จำนวน 6 เครื่องหมายในการคัดเลือกสายพันธุ์ข้าว ที่มียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง (bacterial leaf blight) ($xa5$ และ $xa4$) ในประชากรลูกชั่วที่ 3 จำนวน 59 สายพันธุ์ซึ่งได้จากการผสมข้ามระหว่าง IR-64 x IET-14444 พบว่ามี 8 สายพันธุ์ที่มียีนต้านทานต่อโรคนี้ Ramalingam *et al.* (2002) ได้ใช้เครื่องหมาย SSR 2 เครื่องหมาย คือ 484 และ W2R ในการคัดเลือกข้าวที่มียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง ($Xa-21$) และยีนควบคุมลักษณะข้าวเหนียว (wx) ในประชากรลูกชั่วที่ 2 ผลปรากฏว่าสามารถคัดเลือกต้นลูกชั่วที่ 2 ที่มียีนทั้งสองได้จำนวน 20 ต้น และยีนทั้งสองอยู่ในสภาพโฮโมไซกัส และ Singh *et al.* (2001) ได้ปรับปรุงข้าวพันธุ์ PR106 ซึ่งอ่อนแอต่อโรคขอบใบแห้งโดยผสมข้ามกับพันธุ์ IRBB62 ที่มียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง ($xa5$, $xa13$ และ $xa21$) เมื่อได้ลูกผสมชั่วที่ 1 ทำการผสมกลับไปหาพันธุ์ PR106 ได้ลูกผสมกลับ BC_1F_1 และทำการผสมกลับครั้งที่ 2 ได้เป็น BC_2F_1 และให้ลูก BC_2F_1 ผสมตัวเอง 2 ครั้ง จนได้เป็น BC_2F_3 ในลูกผสมกลับแต่ละชั่วได้ทำการคัดเลือกเฉพาะต้นที่มียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้งเท่านั้นมาทำการผสมกลับในแต่ละครั้ง ซึ่งในขั้นตอนการคัดเลือกได้ใช้เครื่องหมาย STS จำนวน 3 เครื่องหมาย (RG556, RG136 และ pTA248) มาช่วยในการคัดเลือก ทำให้สามารถคัดเลือกต้นที่มียีนต้านทานต่อโรคขอบใบแห้ง และพบว่ายีนทั้งสามอยู่ในสภาพโฮโมไซกัส

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การศึกษาความแปรปรวนในลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของ เมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ของสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลือง

นำสายพันธุ์/พันธุ์ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตร และจาก AVRDC จำนวน 28 พันธุ์ (Table 1) มาดำเนินการดังนี้

1.1 การปลูกและการเก็บเกี่ยว

ปลูกถั่วเหลืองดังกล่าวที่ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จ. นครราชสีมา ในช่วงฤดูฝน ปี 2547 วางแผนการทดลองแบบ split plot ใน randomized complete block design โดยมีวิธีการทำให้เมล็ดเสื่อมคุณภาพ (weathering treatment) เป็น main plot ส่วนสายพันธุ์/พันธุ์เป็น sub plot

1.2. การทำให้เมล็ดเสื่อมคุณภาพ (weathering treatment)

เป็นวิธีการที่ทำให้เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่สุกแก่แล้วเสื่อมคุณภาพภายใต้สภาพที่ไม่เหมาะสมที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (field weathering) เช่น การมีฝนตกสลับกับอากาศร้อน และสภาพที่สร้างขึ้นในตู้อบ (incubator weathering) โดยวิธีการนี้เมล็ดพันธุ์ที่อ่อนแอจะเสื่อมคุณภาพได้ง่าย วิธีการทดสอบดังกล่าวใช้วิธีของ Dassou and Kueneman (1984) ดังนี้

1.2.1 Control สุ่มเก็บฝักถั่วเหลืองเมื่อฝักเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือก่อนที่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งเป็นระยะที่เมล็ดสุกแก่ทางสรีรวิทยา (physiological maturity, PM) โดยเด็ดฝักจากต้นมาฝั้ลงในห้องปฏิบัติการ โดยใช้พัดลมช่วยเป่าจนกระทั่งฝักแห้ง นวดเมล็ดด้วยมือ แล้วฝั้จนกระทั่งความชื้นของเมล็ดลดลงเหลือประมาณ 12 %

1.2.2 การเสื่อมคุณภาพในตู้อบ (incubator weathering) สุ่มเก็บฝักถั่วเหลืองในลักษณะเดียวกันกับ control นำฝักถั่วเหลืองมาวางให้อยู่ในแนวตั้งฉากในช่องของชั้นที่สร้างขึ้น โดยวางอยู่เหนือระดับน้ำในกล่องพลาสติก ปิดฝากล่องให้แน่นสนิทเพื่อควบคุมให้มีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 90 % เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 10 วัน จึงนำฝักมาฝั้ลมให้แห้ง นวดเมล็ดด้วยมือ และฝั้เมล็ดจนกระทั่งความชื้นของเมล็ดลดลงเหลือประมาณ 12 %

1.2.3 การเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ (field weathering) สุ่มเก็บฝักถั่วเหลืองหลังจากสุกแก่ทางสรีรวิทยาแล้ว 14 วัน นำฝักมาฝั้ลมให้แห้ง นวดเมล็ดแล้วฝั้ลมต่อไป จนกว่าเมล็ดจะมีความชื้นเหลือประมาณ 12 %

นำเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบในแต่ละวิธีดังกล่าวมาทำการตรวจสอบความงอก ความแข็งแรง ค่าการนำไฟฟ้า และลักษณะทางกายภาพของเมล็ดบางประการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 1 Soybean genotypes, origin and seed coat color.

Genotype	Origin	Seed coat color
SJ 1	Unknown	Yellow
SJ 2	Unknown	Yellow
SJ 4	Acadian x Tainung4	Yellow
SJ 5	Tainung4 x SJ.2	Yellow
Sukhothai 1	Shih Shin x SRF400	Yellow
Sukhothai 2	7016 x Sukhothai 1	Yellow
CM 2	CM 60 x IAC13	Yellow
CM 3	G9946 x AGS17	Yellow
CM 60	Willkiams x SJ 4	Yellow
Nakhon Sawan 1	Doteung x Santa Maria	Yellow
GC2679	AVRDC, Taiwan	Yellow
GC2796	AVRDC, Taiwan	Yellow
GC3318	AVRDC, Taiwan	Brown
GC4120	AVRDC, Taiwan	Yellow
GC4637	AVRDC, Taiwan	Yellow
GC4796	AVRDC, Taiwan	Green
GC7231	AVRDC, Taiwan	Yellow
GC9822	AVRDC, Taiwan	Brown
GC9984	AVRDC, Taiwan	Yellow
GC10215	AVRDC, Taiwan	Yellow
GC10848	AVRDC, Taiwan	Brown
GC10981	AVRDC, Taiwan	Green
GC10992	AVRDC, Taiwan	Brown
GC11101	AVRDC, Taiwan	Green
GC11254	AVRDC, Taiwan	Green
PK462	Korea	Yellow
KUSL20004	Clark63 x Orba	Yellow

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 การตรวจสอบความงอกมาตรฐาน (standard germination)

เพาะเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองบนกระดาษที่ทำให้ชื้นด้วยน้ำกลั่น ม้วนกระดาษหลวม ๆ วางในแนวตั้งในบีกเกอร์ (1 ลิตร) เติมน้ำกลั่นลงในบีกเกอร์ประมาณ 10 มล. นำถุงพลาสติกหุ้มปากบีกเกอร์เพื่อให้สภาพอากาศในบีกเกอร์ชื้นอยู่เสมอ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25°C ประเมินความงอก 2 ครั้งตามวิธีการของ ISTA (1985)

1.4 การตรวจสอบความแข็งแรง (vigor test)

วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ได้แก่

1.4.1 การตรวจสอบความงอกในไร่ (field emergence test) เพาะเมล็ดในกระบะเพาะที่มีดินผสม ปลูกเป็นหลุมลึกประมาณ 2-3 ซม. ใช้ระยะปลูกระหว่างแถว 10 ซม. ระหว่างหลุม 5 ซม. ปลูกหลุมละ 1 เมล็ด ประเมินความงอกหลังเพาะได้ 10 วัน

1.4.2 การเร่งอายุเมล็ดพันธุ์ (accelerated aging) นำเมล็ดไปอบที่อุณหภูมิ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 100 % นาน 72 ชั่วโมง (AOSA, 1983) แล้วจึงนำมาเพาะเพื่อตรวจสอบความงอกมาตรฐานตามวิธีการที่กล่าวมาแล้ว

1.4.3 ตรวจสอบการนำไฟฟ้า (electrical conductivity test) ชั่งน้ำหนักเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง แล้วนำไปแช่ในน้ำกลั่น 75 มล. ที่อุณหภูมิ 20°C นาน 24 ชั่วโมง (AOSA, 1983) วัดค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกมาจากเมล็ดด้วยเครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย (conductivity meter)

1.5 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ

ลักษณะทางกายภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ตรวจสอบมีดังนี้

1.5.1 น้ำหนักเมล็ด ชั่งน้ำหนัก 100 เมล็ด ที่ความชื้นประมาณ 12 %

1.5.2 สีของเยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat color) บันทึกสีเยื่อหุ้มเมล็ดของสายพันธุ์/พันธุ์ ต่าง ๆ ที่ศึกษา

1.5.3 ค่า eccentricity นำเมล็ดมาวัดความกว้าง ยาว และหนาด้วย dial caliper ตามวิธีของ Kuo (1989) แล้วคำนวณหาค่า eccentricity ดังนี้

$$e = \frac{(a^2 - b^2)^{0.5}}{a}$$

โดย a = ครึ่งหนึ่งของความยาวเมล็ด

b = ครึ่งหนึ่งของค่าเฉลี่ยระหว่างความกว้างและความหนาของเมล็ด

ค่า eccentricity เป็นค่าที่บ่งบอกรูปร่างหรือความกลมของเมล็ด มีค่าตั้งแต่ 0

ถึง 1 ค่าที่ใกล้ 0 แสดงว่ารูปร่างเมล็ดเข้าใกล้ทรงกลม ค่าที่ใกล้ 1 แสดงว่าเมล็ดยาวรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5.4 นำหนักเยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat) ซึ่งนำหนักเมล็ดแล้วนำไปแช่ในน้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 5 °C นาน 15-16 ชั่วโมง แยกเยื่อหุ้มเมล็ดออก นำเมล็ดและเยื่อหุ้มไปอบที่อุณหภูมิ 103 °C นาน 24 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ดและน้ำหนักเมล็ด

1.5.5 เปอร์เซนต์เยื่อหุ้มเมล็ด คำนวณหาได้ดังนี้

$$\% \text{ เยื่อหุ้มเมล็ด} = \frac{\text{น้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ด}}{\text{น้ำหนักแห้งเมล็ด}} \times 100$$

การทดลองที่ 2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลือง

2.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลืองโดยอาศัย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของถั่วเหลือง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ ซึ่งปลูกที่ศูนย์วิจัย ข้าวโพดข้าวฟ่าง จำนวน 10 ลักษณะ ได้แก่ การหักล้ม ติดดอก สีเยื่อหุ้มเมล็ด ขนาดเมล็ด คุณภาพเมล็ด สี hilum วันที่ออกดอก วันที่สุกแก่ วันที่เก็บเกี่ยว และความสูงของลำต้น ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลือง โดยใช้ค่าความคล้ายคลึงกัน ในลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสร้าง dendrogram หรือ phylogenetic tree

2.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลืองโดยอาศัยลายพิมพ์ RAPD และ AFLP

สร้างลายพิมพ์ RAPD และ AFLP ของถั่วเหลือง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ซึ่งประกอบด้วย พันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ รวมทั้งพันธุ์ที่จะใช้เป็นพันธุ์พ่อแม่ในการผสมข้าม และประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม ของสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลืองโดยใช้ค่าความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมที่ได้จากการทำลายพิมพ์ RAPD และ AFLP ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

2.2.1 การปลูกและการเตรียมดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์

ปลูกถั่วเหลือง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ นำใบถั่วเหลืองมาสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีการของ Web band Knapp (1990) โดยนำไปอ่อนประมาณ 5 กรัมมาล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด บดในไนโตรเจนเหลวจนละเอียด ใส่ extraction buffer (CTAB: cetyl trimethyl ammonium bromide 5%, Tris-HCL pH 8.0 2.5 mM, NaCl 0.098 M, EDTA: ethylene diamine tetraacetate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.2 mM, 2-mercaptoethanol 1%) ปุ่มที่ 60 °C ประมาณ 1 ชั่วโมง กำจัดสิ่งเจือปนและกากโดยการสกัดกับ chloroform: octanol (24:1) แล้วตกตะกอนด้วย precipitation buffer (CTAB 5%, Tris-HCl pH 8.0 2.5 mM, EDTA 0.2 mM) ละลายตะกอนด้วย 1 M NaCl จากนั้นนำไปกำจัดโปรตีนด้วย phenol และ chloroform:octanol อีกครั้ง จึงตกตะกอน nucleic acids ด้วย isopropanol ที่เย็นจัด ล้าง nucleic acids ที่ได้ด้วย 65% และ 85% ethanol ทิ้งให้แห้งก่อนละลายตะกอนใน Tris-EDTA หรือ DNA buffer จากนั้นกำจัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ RNase ก่อนตกตะกอนดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ด้วย 1/10 เท่าโดยปริมาตรของ 3M sodium acetate และ 1 เท่าโดยปริมาตรของ isopropanol ที่เย็นจัด ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 65% และ 85% ethanol ทิ้งให้แห้งก่อนละลายตะกอนใน DNA buffer แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer

2.2.2 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ของสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลืองด้วยเทคนิค RAPD และ AFLP

ก. ลายพิมพ์ RAPD

ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลืองด้วยเทคนิค RAPD ตามวิธีการของ Williams *et al.* (1990) โดยการเตรียม Polymerase Chain Reaction (PCR) 15 μ l reaction ที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 100 ng, 1X PCR buffer, MgCl₂ 2.5 mM, dNTP 160 μ M, random primer ขนาด 10 nucleotides 5 pmole และ Taq polymerase 0.5 unit และใช้โปรแกรม PCR ดังนี้ 1 รอบของ 94 °C 3 นาที, 40 รอบของ 94 °C 1 นาที : 35 °C 1 นาที: 72 °C 1-2 นาที, 1 รอบของ 72 °C 5 นาที และรักษาอุณหภูมิที่ 4 °C จนถึงเวลาวิเคราะห์ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis และย้อมเจลด้วย ethidium bromide

ข. ลายพิมพ์ AFLP

ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลืองด้วยเทคนิค AFLP ตามวิธีการซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Vos *et al.* (1995) ประกอบด้วยขั้นตอนต่อไปนี้

- 1) นำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอ็นไซม์ ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ที่อุณหภูมิ 37 °C 2 ชั่วโมง และเชื่อมดีเอ็นเอ กับ adapter ที่อุณหภูมิ 37 °C 1 ชั่วโมง และอุณหภูมิห้อง หรือ 20 °C 2 ชั่วโมง
- 2) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ด้วย primer จำเพาะ 2 ขั้นตอน โดยใช้ primer ที่เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกรายงานมากขึ้น คือ preselective amplification (20 รอบของ 94 °C 30 วินาที, 56 °C 1 นาที, 72 °C 1 นาที) และ selective amplification [1 รอบของ 94 °C 30 วินาที, 65 °C 30 วินาที, 72 °C 1 นาที; 12 รอบ โดยลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65 °C) ลงรอบละ 0.7 °C; และ 23 รอบของ 94 °C 30 วินาที, 56 °C 30 วินาที, 72 °C 1 นาที] และรักษาอุณหภูมิที่ 4 °C จนถึงเวลาวิเคราะห์ PCR product

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) ทำอิลีคโตรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel โดยย้อมเจดด้วย silver nitrate (silver staining) ตามวิธีการของ Lin *et al.* (1997)

2.2.3 ประเมินค่าความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม และระยะทางทางพันธุกรรม (genetic distance)

จากการทำลายพิมพ์ RAPD และ AFLP ระหว่างสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลือง นำมาหาความสัมพันธ์ สร้าง dendrograms และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ เช่น principal component analysis (Gower, 1966)

การทดลองที่ 3 การศึกษาหาเครื่องหมาย RAPD และ AFLP ที่วางตัวอยู่กับยีนที่ควบคุม ลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่

3.1 การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม

ผสมข้ามพันธุ์ระหว่างถั่วเหลืองพันธุ์ต้านทานที่คัดเลือกได้กับพันธุ์เชียงใหม่ 60 ซึ่งเป็นพันธุ์การค้าแต่ก่อนต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ จำนวน 2 คู่ผสม ปลูกผสมชั่วที่ 1 ประมาณ 10-15 ต้นจากแต่ละคู่ผสม พิสูจน์ความเป็นลูกผสมโดยใช้เครื่องหมาย SSR ซึ่งเป็น codominant markers จากนั้นปล่อยให้ผสมตัวเองเพื่อสร้างประชากรลูกชั่วที่ 2 ประมาณ 500 ต้นจากแต่ละคู่ผสม เก็บเมล็ดของลูกชั่วที่ 2 แต่ละต้นเพื่อตรวจสอบระดับความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ และเก็บใบมาสกัดดีเอ็นเอ แบ่งประชากรลูกชั่วที่ 2 ออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ต้านทาน และกลุ่มที่อ่อนแอ รวมดีเอ็นเอจากแต่ละกลุ่มเข้าด้วยกัน สร้างลายพิมพ์ RAPD และ AFLP โดยใช้ RAPD primers 500 primers และ AFLP markers ประมาณ 500 markers สืบหา polymorphism ระหว่าง 2 กลุ่ม

3.2 การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจง

รวบรวม polymorphic bands จาก RAPD และ AFLP gel โดยการตัด bands จาก agarose gel และ polyacrylamide gel นำมาทำให้บริสุทธิ์และเพิ่มปริมาณ ก่อนนำไปหาดำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่น่าจะวางตัวอยู่ชิดกับยีนควบคุมต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่ วิเคราะห์ลำดับเบสเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank และสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจงขึ้นมาใหม่เพื่อใช้สำหรับการคัดเลือก (MAS) เพื่อปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ในประชากรลูกผสมกลับชั่วต่างๆ (BC₁, BC₂, BC₃,) ต่อไป

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาความแปรปรวนในลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของ เมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ของสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลือง

1.1 คุณภาพของเมล็ดพันธุ์

1.1.1 ความงอกมาตรฐานของเมล็ดพันธุ์

ความงอกมาตรฐานของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ หลังจากผ่านการทำให้การเสื่อมคุณภาพโดยทั้ง 3 วิธีการดังกล่าว มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 2) ความงอกของเมล็ดพันธุ์ในสภาพควบคุม (control) หรือ เมื่อเมล็ดสุกแก่ทางสรีรวิทยาจะสูงกว่าการทำให้เมล็ดเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ (field weathering) และในสภาพตู้อบ (incubator weathering) ซึ่งก็เป็นไปตามความคาดหมายเนื่องจากเป็นระยะที่เมล็ดพันธุ์มีคุณภาพสูงสุด พันธุ์ต่าง ๆ ในสภาพควบคุมมีความผันแปรในความงอกของเมล็ดพันธุ์สูง โดยมีความงอกอยู่ในช่วง 40-100% พันธุ์ที่มีความงอกสูงที่สุดคือ สจ.5 (100%) ส่วนสายพันธุ์ที่มีความงอกต่ำที่สุด คือ GC10992 (40%)

ความงอกมาตรฐานของเมล็ดพันธุ์ภายหลังการทำให้เสื่อมคุณภาพในแปลง (field weathering) ลดลงทุกพันธุ์เมื่อเปรียบเทียบกับสภาพควบคุม โดยเมล็ดพันธุ์มีความงอกผันแปรอยู่ในช่วง 16.00-90.67% สายพันธุ์ที่เสื่อมความงอกน้อยที่สุด คือ GC9984 ส่วนพันธุ์ที่เสื่อมความงอกมากที่สุด คือ สท.1 เมื่อเปรียบเทียบกับความงอกของ เมล็ดในสภาพควบคุมแล้ว จะเห็นได้ว่าความงอกที่เกิดจากการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในแปลง มีช่วงความผันแปรกว้างกว่าซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นถึงการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ของสายพันธุ์/พันธุ์ต่างๆ ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

ความงอกมาตรฐานของเมล็ดพันธุ์จะลดลงมากที่สุดภายหลังผ่านการทำให้เสื่อมคุณภาพในตู้อบ เมล็ดพันธุ์ที่สามารถงอกได้มีเพียง 4 สายพันธุ์/พันธุ์เท่านั้น โดยความงอกมาตรฐานอยู่ในช่วง 26.67-69.33% สายพันธุ์ที่เสื่อมความงอกน้อยที่สุด คือ GC10848 รองลงมาได้แก่ GC10981, GC2796 และ สจ.1 ตามลำดับ สายพันธุ์/พันธุ์อื่นๆ นอกจากนี้ไม่สามารถนำมาตรวจสอบความงอกได้เนื่องจากเมื่อนำฝักออกมาจากตู้เพาะแล้ว พบว่าแทบทุกฝักมีเส้นใยสีขาวของเชื้อราปกคลุมอยู่ เมื่อแกะฝักออกดูพบว่า เมล็ดมีสีดำคล้ำ ฝ่อ เล็กถีบ และมีเส้นใยของเชื้อราขึ้นอยู่ด้วยอย่างเห็นได้ชัด

Table 2 Standard germination and field emergence of seeds of 28 soybean varieties/lines following three weathering treatments.

Varieties/lines	Standard germination (%)			Field emergence (%)		
	Control	Field weathering	Incubator weathering	Control	Field weathering	Incubator weathering
GC10848	96.0	77.3	69.3	84.0	50.7	40.0
GC2796	93.3	49.3	36.0	69.3	42.7	29.3
SJ 1	93.3	86.7	26.7	82.7	77.3	38.7
GC10981	82.7	65.3	46.7	72.0	57.3	45.3
ST 2	89.3	77.3	0.0 ¹	85.3	70.7	0.0 ¹
CM 2	94.7	88.0	0.0	93.3	86.7	0.0
GC11254	49.3	20.0	0.0	52.0	26.7	0.0
CM 3	82.7	29.3	0.0	78.7	28.0	0.0
GC4796	94.7	84.0	0.0	76.0	53.3	0.0
GC11101	77.3	52.0	0.0	73.3	48.0	0.0
NW 1	57.3	34.67	0.0	53.3	33.3	0.0
ST 1	88.0	16.0	0.0	82.7	33.3	0.0
CM 60	89.3	84.0	0.0	82.7	81.3	0.0
SJ 2	88.0	65.3	0.0	90.7	56.0	0.0
SJ 4	97.3	82.7	0.0	90.7	72.0	0.0
SJ 5	100.0	89.3	0.0	90.7	82.7	0.0
GC9984	98.7	90.7	0.0	85.3	80.0	0.0
GC4120	76.0	42.7	0.0	69.3	34.7	0.0
GC2679	50.7	38.7	0.0	54.7	36.0	0.0
GC4637	66.7	57.3	0.0	62.7	40.0	0.0
GC10215	62.7	33.3	0.0	70.7	29.3	0.0
GC7231	57.3	37.3	0.0	56.0	33.3	0.0
PK462	85.3	65.3	0.0	82.7	65.3	0.0
KUSL-20004	74.7	28.0	0.0	69.3	29.3	0.0
GC10992	40.0	25.3	0.0	50.7	29.3	0.0
GC9822	60.0	40.0	0.0	60.0	42.7	0.0
GC10950	81.3	40.0	0.0	78.7	36.0	0.0
GC3318	88.0	49.3	0.0	86.7	42.7	0.0
Average	79.1	55.3	6.4	74.4	49.9	5.5
LSD (0.05)						
Weathering means within a variety (A)		21.7			16.5	
Variety means within a weathering (B)		17.4			15.2	
C.V. (%) (A)		19.9			16.9	
C.V. (%) (B)		22.9			21.7	

¹ Seeds were not in testing condition due to heavily damage caused by fungi.

เอกสารนี้เป็นเอกสารสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่ควรเผยแพร่ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1.2 ความงอกในสภาพไร่หรือความแข็งแรง

ความงอกในสภาพไร่ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 28 สายพันธุ์/พันธุ์หลังจากผ่านการทำให้เสื่อมคุณภาพ โดยทั้ง 3 วิธีการดังกล่าว มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 2) สำหรับความงอกในสภาพไร่หรือความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ในสภาพควบคุมก็เป็นไปในการทำงานเดียวกันกับความงอกมาตรฐาน คือ จะมีความแข็งแรงสูงกว่าเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านการทำให้เสื่อมคุณภาพในสภาพไร่และสภาพตู้อบ โดยมีความแข็งแรงผันแปรอยู่ในช่วง 50.67-93.99% พันธุ์ที่มีความแข็งแรงสูงสุด คือ ชม 2 ส่วนสายพันธุ์ที่มีความแข็งแรงต่ำที่สุด คือ GC10992

ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์จะลดลงเร็วกว่าความงอก เมื่อเมล็ดพันธุ์ผ่านการทำให้เสื่อมคุณภาพ ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ หลังจากผ่านการทำให้เสื่อมคุณภาพในแปลงมาแล้วผันแปรอยู่ในช่วง 26.67-86.67% พันธุ์ที่มีความแข็งแรงสูงสุด คือ ชม 2 ส่วนสายพันธุ์ที่ให้ความแข็งแรงต่ำที่สุด คือ GC11254

ความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ หลังจากผ่านการทำให้เสื่อมคุณภาพในตู้อบแล้ว ผันแปรอยู่ในช่วง 29.33-45.33% สายพันธุ์ที่มีความแข็งแรงสูงสุด คือ GC10981 รองลงมาได้แก่ GC10848, สจ 1 และ GC2796 ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์/พันธุ์อื่น ๆ นอกเหนือไปจากนี้ไม่สามารถนำมาตรวจได้ โดยมีเหตุผลเช่นเดียวกับที่ได้กล่าวมาแล้วในการศึกษาความงอกมาตรฐาน

1.2.3 ค่าการนำไฟฟ้า

ค่าการนำไฟฟ้าหรือการรั่วไหลของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ หลังจากผ่านการทำให้เสื่อมคุณภาพ โดยทั้ง 3 วิธีการดังกล่าว มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 3) โดยสายพันธุ์/พันธุ์ต่าง ๆ ในสภาพควบคุมจะมีค่าการนำไฟฟ้าต่ำที่สุด ส่วนค่าการนำไฟฟ้าของสายพันธุ์/พันธุ์ต่าง ๆ ที่ผ่านการทำให้เสื่อมคุณภาพในสภาพตู้อบมีค่ามากที่สุด ค่าการนำไฟฟ้าของสายพันธุ์/พันธุ์ต่าง ๆ ในสภาพควบคุมมีความผันแปรสูงอยู่ในช่วง 32.51-97.13 $\mu\text{s/cm/g seed}$ ค่าการนำไฟฟ้าของสายพันธุ์ GC10848 ต่ำสุด ในขณะที่ค่าการนำไฟฟ้าของสายพันธุ์ GC4120 สูงสุด ทั้งนี้เมล็ดพันธุ์ที่มีค่าการนำไฟฟ้าสูงจะมีความแข็งแรงต่ำหรือเมล็ดเสื่อมคุณภาพมาก

ถั่วเหลืองทั้ง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ที่ผ่านการทำให้เสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ มีความผันแปรของค่าการนำไฟฟ้าสูง โดยอยู่ในช่วง 42.99-155.30 $\mu\text{s/cm/g seed}$ สายพันธุ์ที่มีค่าการนำไฟฟ้าต่ำที่สุดยังคงเป็น GC10848 ส่วนพันธุ์ที่มีค่าการนำไฟฟ้าสูงสุด คือ CM3

ถั่วเหลืองสายพันธุ์/พันธุ์ต่าง ๆ ที่ผ่านการทำให้เสื่อมคุณภาพในตู้อบมาแล้ว จะเหลืออยู่เพียง 4 สายพันธุ์/พันธุ์ ทั้ง 4 สายพันธุ์/พันธุ์มีความผันแปรของค่าการนำไฟฟ้าต่ำ โดยอยู่ในช่วง 106.75-175.38 $\mu\text{s/cm/g seed}$ สายพันธุ์ที่มีค่าการนำไฟฟ้าต่ำที่สุด คือ GC2796 มิใช่ GC10848 ซึ่งมีค่าการนำไฟฟ้าสูงกว่า ส่วนสายพันธุ์ GC10981 มีค่าการนำไฟฟ้าสูงสุด

Table 3 Average values of electrical conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$ seed) and imbibition (mg/seed) in seeds of 28 soybean varieties/lines following three weathering treatments.

Varieties/lines	Electrical conductivity			Imbibition		
	Control	Field weathering	Incubator weathering	Control	Field weathering	Incubator weathering
GC10848	32.5	42.9	129.3	41.0	33.7	94.7
GC2796	85.5	91.6	106.8	158.7	170.7	168.3
SJ 1	78.7	101.4	132.4	165.0	170.7	171.7
GC10981	69.0	109.1	175.4	125.3	135.7	131.3
ST 2	58.9	74.6	0.0 ¹	188.0	202.3	0.0 ¹
CM 2	55.9	59.4	0.0	191.0	193.0	0.0
GC11254	65.3	114.5	0.0	184.7	202.3	0.0
CM 3	81.3	155.3	0.0	198.0	204.7	0.0
GC4796	64.8	128.9	0.0	180.7	180.7	0.0
GC11101	78.4	151.4	0.0	96.7	128.3	0.0
NW 1	65.5	80.4	0.0	245.7	244.0	0.0
ST 1	59.9	136.5	0.0	171.3	190.3	0.0
CM 60	56.3	75.9	0.0	231.7	210.3	0.0
SJ 2	55.2	81.8	0.0	177.7	196.7	0.0
SJ 4	50.6	60.7	0.0	184.0	183.7	0.0
SJ 5	43.5	61.5	0.0	163.3	172.0	0.0
GC9984	42.4	58.0	0.0	160.7	180.3	0.0
GC4120	97.1	97.7	0.0	194.7	221.7	0.0
GC2679	72.6	106.3	0.0	215.7	238.3	0.0
GC4637	58.0	64.1	0.0	252.7	253.7	0.0
GC10215	64.7	119.4	0.0	76.3	123.3	0.0
GC7231	40.8	92.1	0.0	156.3	198.7	0.0
PK462	81.7	99.6	0.0	183.3	193.7	0.0
KUSL-20004	84.8	132.9	0.0	228.0	246.3	0.0
GC10992	93.8	101.2	0.0	186.7	197.3	0.0
GC9822	73.8	98.3	0.0	136.3	133.0	0.0
GC10950	32.8	92.2	0.0	68.0	145.3	0.0
GC3318	43.8	125.3	0.0	166.3	174.0	0.0
Average	63.9	96.9	19.4	168.2	182.8	20.2
LSD (0.05)						
Weathering means within a variety (A)		23.4			19.0	
Variety means within a weathering (B)		19.3			17.2	
C.V. (%) (A)		17.2			6.8	
C.V. (%) (B)		19.9			8.6	

¹ Seeds were not in testing condition due to heavily damaged by fungi.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของโรงเรียนเพื่อใช้ภายในโรงเรียน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.4 อัตราการดูดน้ำ

อัตราการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ หลังจากผ่านการทำให้เสื่อมคุณภาพทั้ง 3 วิธีดังกล่าว มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 3) อัตราการดูดน้ำของสายพันธุ์/พันธุ์ต่าง ๆ ในสภาพควบคุมเป็นไปในลักษณะที่ช้ากว่าในสภาพไร้ออกซิเจนและสภาพตู้อบ อัตราการดูดน้ำของสายพันธุ์/พันธุ์ต่าง ๆ ในสภาพควบคุมมีความผันแปรสูงอยู่ในช่วง 41.00-252.67 มก./เมล็ด โดยสายพันธุ์ที่มีอัตราการดูดน้ำช้าที่สุด คือ GC10848 ส่วนสายพันธุ์ที่มีอัตราการดูดน้ำเร็วที่สุด คือ GC4637 ทั้งนี้สายพันธุ์ที่มีอัตราการดูดน้ำช้าจะมีความแข็งแรงสูงกว่าสายพันธุ์ที่มีอัตราการดูดน้ำเร็ว โดยส่วนใหญ่แล้วสายพันธุ์ที่มีอัตราการดูดน้ำช้าจะมีค่าการนำไฟฟ้าต่ำด้วย ยกเว้นบางสายพันธุ์ เช่น GC10950 มีค่าการนำไฟฟ้าต่ำใกล้เคียงกับ GC10848 แต่กลับมีอัตราการดูดน้ำที่เร็วกว่า

ถั่วเหลืองสายพันธุ์/พันธุ์ต่าง ๆ ที่ผ่านการทำให้เสื่อมคุณภาพในสภาพไร้ออกซิเจนมีความผันแปรในอัตราการดูดน้ำสูง โดยอยู่ในช่วง 33.67-253.67 มก./เมล็ด สายพันธุ์ที่มีอัตราการดูดน้ำช้าที่สุดก็ยังคงเป็นสายพันธุ์เดียวกับในสภาพควบคุม คือ GC10848 ส่วนสายพันธุ์ที่มีอัตราการดูดน้ำเร็วที่สุดก็ยังคงเป็นสายพันธุ์เดียวกับในสภาพควบคุม คือ GC4637

ถั่วเหลืองสายพันธุ์/พันธุ์ต่าง ๆ ที่ผ่านการทำให้เสื่อมคุณภาพในตู้อบมาแล้ว จะเหลืออยู่เพียง 4 สายพันธุ์/พันธุ์ ที่สามารถนำมาตรวจสอบได้ สายพันธุ์/พันธุ์ดังกล่าวนี้มีอัตราการดูดน้ำผันแปรอยู่ระหว่าง 94.7-171.7 $\mu\text{s}/\text{cm}/\text{g. seed}$ โดยที่สายพันธุ์ GC10848 ยังคงมีอัตราการดูดน้ำช้าที่สุด ส่วนอีก 3 สายพันธุ์/พันธุ์ที่เหลือมีอัตราการดูดน้ำเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับสภาพควบคุม

1.2 ลักษณะทางกายภาพของเมล็ดพันธุ์

ถั่วเหลืองทั้ง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ โดยส่วนใหญ่จะมีเชื้อหุ้มเมล็ดเป็นสีเหลืองซึ่งมีทั้งหมด 19 สายพันธุ์/พันธุ์ ส่วนที่เหลืออีก 9 สายพันธุ์/พันธุ์มีสีเขียวและน้ำตาล (Table 4)

น้ำหนัก 100 เมล็ดและเปอร์เซ็นต์เมล็ดแข็งของถั่วเหลืองทั้ง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ที่เก็บเกี่ยวเมื่อระยะสุกแก่เก็บเกี่ยวหรือผ่านการทำให้เสื่อมคุณภาพในสภาพไร้ออกซิเจนแล้ว มีความแตกต่างกันทางสถิติในทั้งสองลักษณะ โดยน้ำหนัก 100 เมล็ดของถั่วเหลืองทั้ง 28 สายพันธุ์/พันธุ์มีค่าผันแปรอยู่ระหว่าง 10.2-17.9 กรัม สายพันธุ์ GC10848 เมล็ดมีขนาดเล็กที่สุด ในขณะที่พันธุ์ชม. 60 มีขนาดใหญ่ที่สุด ส่วนเปอร์เซ็นต์เมล็ดแข็งนั้นผันแปรตั้งแต่ 0-69.3% พันธุ์ที่ไม่มีเมล็ดแข็งเลยมีจำนวนถึง 15 สายพันธุ์/พันธุ์ ส่วนสายพันธุ์ที่มีเมล็ดแข็งมากที่สุด คือ GC10848

น้ำหนักเชื้อหุ้มเมล็ดและเปอร์เซ็นต์เชื้อหุ้มเมล็ดของถั่วเหลืองทั้ง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ มีความแตกต่างกันทางสถิติ น้ำหนักเชื้อหุ้มเมล็ดมีค่าผันแปรตั้งแต่ 9.3-13.8 มก./เมล็ด พันธุ์ ชม. 60 มีน้ำหนักเชื้อหุ้มเมล็ดสูงที่สุดเช่นเดียวกับมีน้ำหนักเมล็ดมากที่สุด ในขณะที่สายพันธุ์ GC2796 มีน้ำหนักเชื้อหุ้มเมล็ดต่ำที่สุด ส่วนเปอร์เซ็นต์เชื้อหุ้มค่าผันแปรตั้งแต่ 6.8-11.2%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนสายพันธุ์ GC10848 มีเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดสูงที่สุด ถึงแม้ว่าจะมีน้ำหนักเมล็ดน้อยที่สุดในขณะที่พันธุ์ สท 2 มีเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดต่ำที่สุด

Table 4 Average values of seed size, hard seed, seed coat weight and percent of seed coat of 28 soybean varieties/lines collected at harvest maturity.

Varieties/lines	Seed coat color	Seed size (g/100 seeds)	Hard seed (%)	Seed coat wt.(mg/seed)	Percent of seed coat	Eccentricity
GC10848	Brown	10.2	69.3	10.2	11.2	0.5638
GC2796	Yellow	15.9	0.0	9.3	8.4	0.5467
SJ 1	Yellow	10.8	0.0	10.9	8.4	0.7099
GC10981	Brown	10.2	14.7	9.7	8.7	0.4729
ST 2	Yellow	14.2	0.0	11.3	6.8	0.5578
CM 2	Yellow	17.1	0.0	11.6	7.7	0.6642
GC11254	Green	16.7	0.0	11.5	8.3	0.6969
CM 3	Yellow	14.0	0.0	11.5	7.4	0.6016
GC4796	Green	13.6	5.3	9.7	7.9	0.6012
GC11101	Green	11.5	15.3	10.3	8.9	0.6936
NW 1	Yellow	16.5	1.3	12.6	7.0	0.6220
ST 1	Yellow	10.4	0.0	12.2	8.4	0.5449
CM 60	Yellow	17.9	0.0	13.8	7.2	0.5728
SJ 2	Yellow	13.5	0.0	11.6	7.7	0.6096
SJ 4	Yellow	14.3	0.0	12.1	8.4	0.6285
SJ 5	Yellow	17.3	1.3	11.8	8.6	0.6361
GC9984	Yellow	11.6	0.0	12.8	8.4	0.6876
GC4120	Yellow	16.8	6.7	13.2	7.9	0.6834
GC2679	Yellow	15.2	0.0	12.4	7.2	0.5255
GC4637	Yellow	17.4	2.7	13.5	7.3	0.5731
GC10215	Yellow	11.6	25.3	9.8	9.9	0.7740
GC7231	Yellow	15.1	8.0	13.0	9.0	0.6113
PK462	Yellow	10.2	0.0	10.9	7.6	0.6809
KUSL-20004	Yellow	14.9	0.0	12.9	7.3	0.6540
GC10992	Green	14.7	0.0	10.4	8.5	0.6145
GC9822	Brown	14.7	26.7	12.1	8.6	0.6726
GC10950	Green	13.9	17.3	10.9	8.8	0.6209
GC3318	Brown	13.6	5.3	10.9	8.8	0.6988
LSD (0.05)		0.6	7.4	0.6	0.4	0.0161
C.V. (%)		3.6	63.9	4.8	4.6	2.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่า eccentricity ของถั่วเหลืองทั้ง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าผันแปรตั้งแต่ 0.4729-0.7740 สายพันธุ์ G10981 มีค่า eccentricity ต่ำที่สุด ซึ่งแสดงว่าเป็นสายพันธุ์ที่เมล็ดมีรูปร่างกลมกว่าสายพันธุ์/พันธุ์อื่น ๆ ส่วนสายพันธุ์ GC10215 มีค่า eccentricity สูงที่สุด (มีค่าใกล้ 1) แสดงว่าเป็นสายพันธุ์ที่เมล็ดมีรูปร่างค่อนข้างรี

1.3 ความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพของเมล็ดพันธุ์กับลักษณะทางกายภาพของเมล็ดถั่วเหลือง

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพเมล็ดพันธุ์กับลักษณะทางกายภาพของเมล็ดถั่วเหลืองทั้ง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ ในสภาพควบคุม และหลังจากที่ผ่านการทำให้เสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ พบว่า เมล็ดแข็งมีความสัมพันธ์ทั้งกับค่าการนำไฟฟ้าและอัตราการดูดน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมล็ดแข็งมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับอัตราการดูดน้ำ ($r = -0.841^{**}$) นอกจากนี้เมล็ดแข็งแล้วขนาดเมล็ดและน้ำหนักเยื่อหุ้มเมล็ดก็มีความสัมพันธ์กับอัตราการดูดน้ำด้วย (0.521^* และ 0.552^{**}) สำหรับเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดนั้นมีความสัมพันธ์กับทั้งค่าการนำไฟฟ้าและอัตราการดูดน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับอัตราการดูดน้ำ ($r = -0.809^{**}$)

Table 5 Correlation coefficient between seed quality and physical characters of seeds of 28 soybean varieties/lines from control and field weathering (SG = standard germination, FE = field emergence, IMB = imbibition, EC = electrical conductivity, ET = eccentricity, PHS = percent hard seed, SW = 100 seed weight, SCW = seed coat weight, PSC = percent seed coat).

	ET	PHS	SW	SCW	PSC
SG	-0.062	0.070	-0.094	-0.133	0.035
FE	0.016	0.027	-0.077	-0.075	-0.036
EC	0.106	-0.299**	-0.121	-0.100	-0.153*
IMB	-0.103	-0.841**	0.521**	0.552**	-0.809**

*, ** Significant difference at 0.05 and 0.01 level of confidence, respectively.

การทดลองที่ 2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลือง

2.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลืองโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของถั่วเหลือง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ โดยบันทึกลักษณะต่างๆ ได้แก่ การหักล้ม สีดอก สีเยื่อหุ้มเมล็ด ขนาดเมล็ด คุณภาพเมล็ด สี hilum วันที่ออกดอก วันที่สุกแก่ วันที่เก็บเกี่ยว และความสูงของลำต้น (Table 6) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาจัดแบ่งกลุ่มตามลักษณะความใกล้เคียงกัน (Table 7) จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา 10 ลักษณะที่ศึกษา แล้วนำมาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี cluster analysis โดยคำนวณความเหมือนของถั่วเหลืองทีละคู่ นำค่าความเหมือนที่ได้ไปเขียนแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ phylogenetic tree โดย UPGMA พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มถั่วเหลืองออกได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สจ 1, สจ 2, GC9984, สจ 4, สจ 5, ชม 3, Kusl20004, สท 2, ชม 60, สท 1, pk462, GC3318, GC10992 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ GC2679, GC7231, นว 1, GC4637, GC9822, GC11254, GC4120, GC2796, GC10950, ชม 2, GC10215, GC4796, GC11101 และ กลุ่มที่ 3 คือ GC10848 (Figure 1)

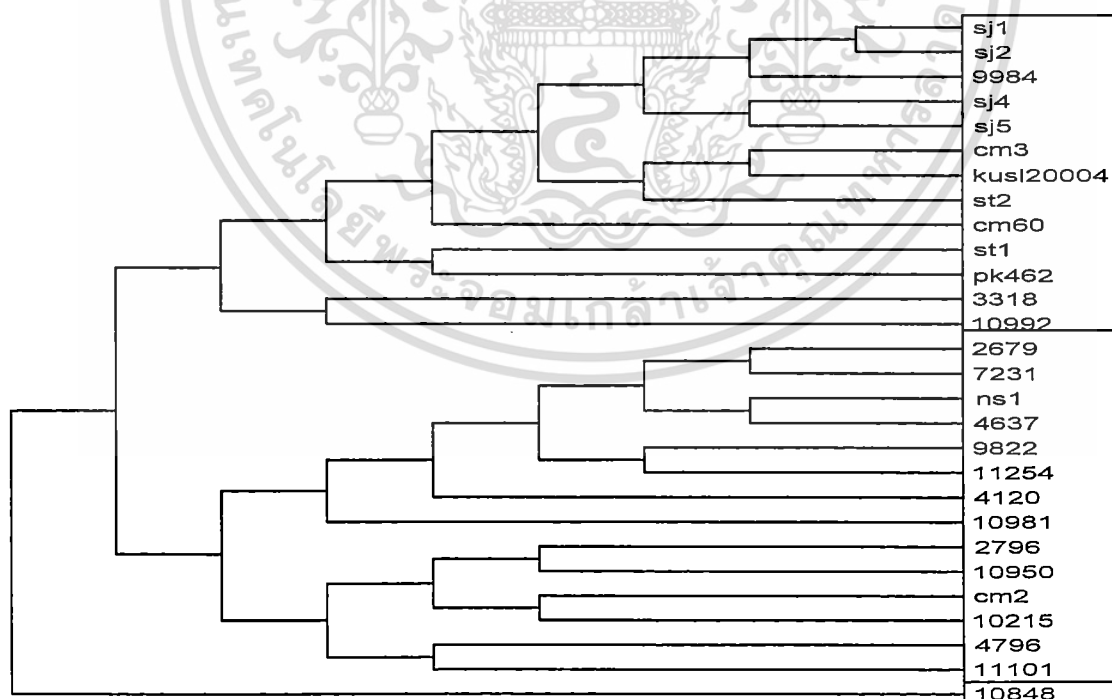


Figure 1 Phylogenetic tree showing the relationship among 28 soybean varieties/line based

on the similarity in morphological characters. หากท่านนั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 6 Data of 10 morphological characters used for cluster analysis of 28 soybean varieties/lines.

Varieties/ lines	Morphological characters									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SJ 1	Non-lodging	Purple	Yellow	Medium	4.51	Black	40	103	112	116.4
SJ 2	Non-lodging	Purple	Yellow	Medium	4.43	Dark brown	41	103	112	103.8
SJ 4	Non-lodging	Purple	Yellow	Medium	4.65	Light brown	40	103	112	83.0
SJ 5	Non-lodging	Purple	Yellow	Large	4.69	Light brown	39	103	112	105.6
ST 1	Non-lodging	Purple	Yellow	Small	4.43	Light brown	36	90	112	107.4
ST 2	Non-lodging	Purple	Yellow	Medium	4.61	Black	34	94	112	83.0
CM 2	Non-lodging	Purple	Yellow	Large	4.67	Dark brown	30	73	85	45.2
CM 3	Non-lodging	Purple	Yellow	Medium	4.51	Dark brown	40	94	112	114.0
CM 60	Non-lodging	White	Yellow	Large	4.63	Dark brown	34	103	112	86.6
NW 1	Non-lodging	Purple	Yellow	Medium	4.63	Light brown	30	81	103	49.2
GC2679	Non-lodging	Purple	Yellow	Medium	4.31	Colorless	31	81	103	35.2
GC2796	Non-lodging	White	Yellow	Medium	4.73	Colorless	31	73	85	32.4
GC3318	Non-lodging	Purple	Brown	Medium	4.60	Light brown	33	90	112	38.8
GC4120	Non-lodging	White	Yellow	Medium	4.43	Dark brown	31	81	103	71.2
GC4637	Non-lodging	Purple	Yellow	Large	4.49	Light brown	31	81	103	30.8
GC4796	Lodging	White	Green	Medium	4.52	Dark brown	31	73	85	42.0
GC7231	Non-lodging	Purple	Yellow	Medium	4.33	Colorless	31	94	103	41.6
GC9822	Non-lodging	Purple	Brown	Medium	4.60	Light brown	31	81	103	31.0
GC9948	Non-lodging	Purple	Yellow	Medium	4.75	Light brown	45	103	112	99.6
GC10215	Non-lodging	Purple	Yellow	Medium	4.53	Light brown	32	73	85	25.2
GC10848	Non-lodging	Purple	Brown	Small	4.57	Colorless	41	73	85	22.4
GC10950	Non-lodging	Purple	Green	Medium	4.61	Colorless	31	73	85	32.6
GC10981	Non-lodging	White	Green	Medium	4.78	Black	31	81	103	27.4
GC10992	Non-lodging	White	Brown	Medium	4.49	Black	36	94	112	38.4
GC11101	Non-lodging	White	Green	Medium	4.60	Black	32	73	85	49.2
GC11254	Non-lodging	Purple	Green	Medium	4.43	Light brown	32	81	103	29.2
pk462	Non-lodging	Purple	Yellow	Small	4.27	Light brown	38	103	112	44.4
kusl20004	Non-lodging	Purple	Yellow	Medium	4.49	Light brown	33	90	112	88.6

¹ Morphological characters : 1 = stem lodging, 2 = flower color, 3 = seed coat

color, 4 = seed size, 5 = visual seed quality, 6 = hilum color,

7 = days to flowering, 8 = days to maturity, 9 = days to harvest,

10 = plant height (cm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในงานวิจัยของนักศึกษานี้ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลืองโดยเทคนิค RAPD

จากการทดลองใช้ไพรเมอร์ RAPD จำนวน 194 ชนิดที่มีความยาว 10-15 นิวคลีโอไทด์ กับถั่วเหลืองพันธุ์ pk462 เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของถั่วเหลืองได้ พบว่ามี 132 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอคิดเป็น 68.04 เปอร์เซ็นต์ของไพรเมอร์ทั้งหมด จากนั้นคัดเลือกไพรเมอร์ที่เกิดแถบดีเอ็นเอชัดเจนมากกว่า 4 แถบมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในถั่วเหลืองทั้ง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ จำนวน 30 ไพรเมอร์ (Table 8) จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เข้มชัดเจนและเข้มปานกลางจากแต่ละไพรเมอร์พบอยู่ระหว่าง 4-11 แถบ (Figure 3-6) เฉลี่ยประมาณ 7 แถบต่อไพรเมอร์ ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 206 แถบ โดยไพรเมอร์ AI14 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ มากที่สุดคือ 11 แถบ และไพรเมอร์ OPC18 และ OPB08 ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดคือ 4 แถบ (Table 9) ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่พบอยู่ในช่วง 0.2-1.8 กิโลเบส โดยเปรียบเทียบกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Ladder Mix, Fermentas, USA.) ซึ่งมีขนาด 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.03, 1.2, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 และ 10.0 กิโลเบส

จากจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้ง 206 แถบ ที่แสดงความแตกต่างในถั่วเหลืองทั้ง 28 พันธุ์ / สายพันธุ์ ซึ่งบันทึกข้อมูลโดยกำหนดสัญลักษณ์ “1” กับการเกิดแถบดีเอ็นเอ และ “0” กับการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี cluster analysis ด้วยโปรแกรม NTSYSpc2.02i โดยคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองทีละคู่ จากนั้นเขียนแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ phylogenetic tree โดย UPGMA พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มถั่วเหลืองออกได้เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สจ 1, สจ 2, สจ 4, สจ 5, ชม 60, GC3318, GC9984, GC2679, GC7231, สท 2, GC10848, ชม 2, นว 1 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ชม 3, GC4637, GC10215, GC10950, GC2796, GC4796, GC10981, GC9822, GC11254, GC10992, GC11101, kusl20004 กลุ่มที่ 3 ได้แก่ สท 1, pk462 และกลุ่มที่ 4 (Figure 7) คือ GC4120 ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 0.81-0.95

จากการคำนวณค่า Polymorphic Information Contents (PICs) ซึ่งเป็นค่าที่บอกลักษณะโอกาสที่จะพบตัวอย่างที่สุ่มมา 2 ตัวอย่างว่ามีความแตกต่างกันมากน้อยเท่าใด โดยค่าสูงสุดสำหรับเครื่องหมาย RAPD และ AFLP คือ 0.5 ซึ่งหมายความว่าครึ่งหนึ่งของตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมดให้แถบดีเอ็นเอ และอีกครึ่งหนึ่งของตัวอย่างไม่ให้แถบดีเอ็นเอ ค่า PICs นี้อยู่ในช่วง 0.00-0.50 (Figure 8) โดยพบค่าที่อยู่ในช่วง 0.00-0.05 มากที่สุดคือ 109 แถบ คิดเป็น 52.91% ของจำนวนแถบทั้งหมด ค่าเฉลี่ยของ PICs คือ 0.148

การวิเคราะห์ค่า PCA โดยคำนวณจากค่าความเหมือนทางพันธุกรรมสำหรับแถบดีเอ็นเอ 206 แถบ ที่ได้จากเครื่องหมาย RAPD เพื่อพิจารณาการกระจายตัวของถั่วเหลืองทั้ง 28

พันธุ์ พบว่า PCA1, 2 และ 3 มีค่า 29.44, 20.30 และ 14.98 เปอร์เซ็นต์ของความแปรปรวนทั้งหมดตามลำดับ (Figure 9) ข้อมูล

Table 8 Nucleotide sequence, total DNA bands, polymorphic bands from DNA banding patterns of 28 soybean varieties/lines by RAPD technique.

Primers	Nucleotides	Total no. of DNA bands	No. of polymorphic bands	%polymorphic bands
AB11	5'GTGCGCAATG ^{3'}	6	2	33.34
AI05	5'GTCGTAGCGG ^{3'}	5	2	40
AI14	5'TGGTGCACTC ^{3'}	11	7	63.64
OPA01	5'CAGGCCCTTC ^{3'}	5	2	40
OPA10	5'GTGATCGCAG ^{3'}	10	7	70
OPA20	5'GTTGCGATCC ^{3'}	6	3	50
OPB06	5'TGCTCTGCC ^{3'}	5	2	40
OPB08	5'GTCCACACGG ^{3'}	4	1	25
OPC14	5'TGCGTGCTTG ^{3'}	7	4	57.14
OPC16	5'CACTCCAG ^{3'}	6	3	50
OPC18	5'TGAGTGGGTG ^{3'}	4	3	75
OPC19	5'GTTGCCAGCC ^{3'}	5	3	60
OPD07	5'TTGGCACGGG ^{3'}	7	2	28.57
OPD18	5'GAGAGCCAAC ^{3'}	6	3	50
OPD20	5'ACCCGGTCAC ^{3'}	6	3	50
OPE01	5'CCCAAGGTCC ^{3'}	10	4	40
OPE04	5'GTGACATGCC ^{3'}	9	2	22.22
OPE07	5'AGATGCAGCC ^{3'}	9	7	77.78
OPE15	5'ACGCACAACC ^{3'}	6	1	16.67
OPE18	5'GGACTGCAGA ^{3'}	10	5	50
OPE20	5'AACGGTGACC ^{3'}	7	5	71.43
OPF01	5'ACGGATCCTG ^{3'}	5	3	60
OPF03	5'CCTGATCACC ^{3'}	6	3	50
OPF07	5'CCGATATCCC ^{3'}	8	6	75
OPI03	5'CAGAAGCCCA ^{3'}	9	5	55.56
OPY02	5'CATCGCCGCA ^{3'}	5	1	20
RS1	5'AAGTTGGTGATGTAT ^{3'}	8	1	12.5
RSR2	5'AGCGGACCAG ^{3'}	7	4	57.14
U.B.C.04	5'CCTGGGCCTC ^{3'}	6	1	16.67
U.B.C.05	5'CCTGGGCTGG ^{3'}	8	2	25
Total		206	97	47.09

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรณีพิเศษเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่ในวงกว้างโดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

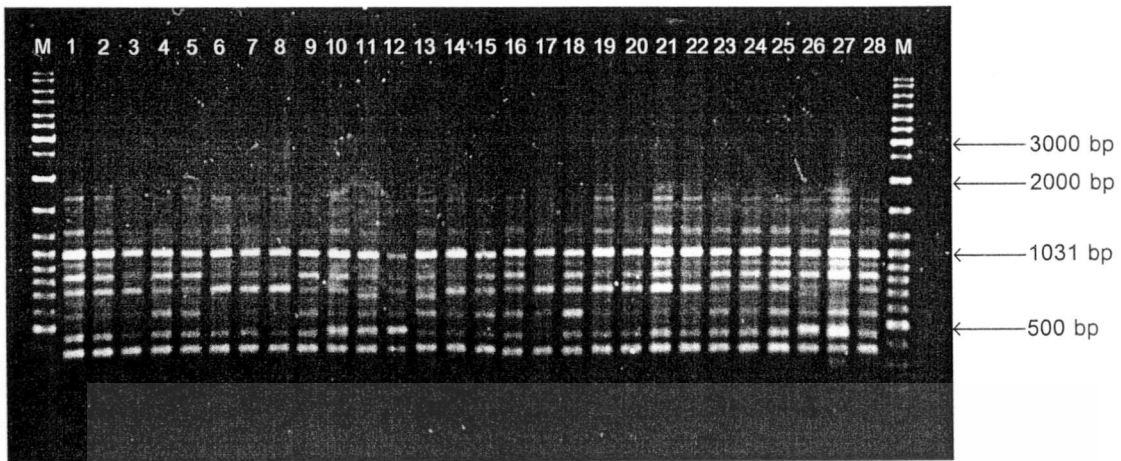


Figure 3 DNA banding patterns of 28 soybean varieties/lines analysed by RAPD technique with primer OPC 14 (M = standard DNA bands, 1-28 = SJ 1, SJ 2, SJ 4, SJ 5, ST 1, ST 2, CM 2, CM 3, CM 60, NW 1, GC2679, GC2796, GC3318, GC4120, GC4637, GC4796, GC7231, GC9822, GC9948, GC10215, GC10848, GC10950, GC10981, GC10992, GC11101, GC11254, pk462 and kusl20004, respectively).

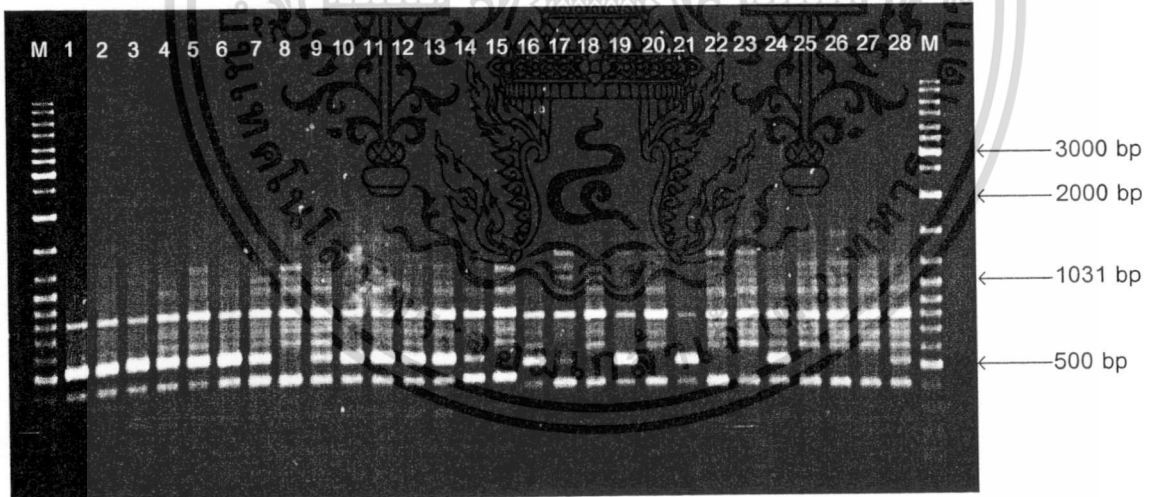


Figure 4 DNA banding patterns of 28 soybean varieties/lines analysed by RAPD technique with primer OPC 19 (M = standard DNA bands, 1-28 = SJ 1, SJ 2, SJ 4, SJ 5, ST1, ST 2, CM 2, CM 3, CM 60, NW 1, GC2679, GC2796, GC3318, GC4120, GC4637, GC4796, GC7231, GC9822, GC9948, GC10215, GC10848, GC10950, GC10981, GC10992, GC11101, GC11254, pk462 and kusl20004, respectively).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

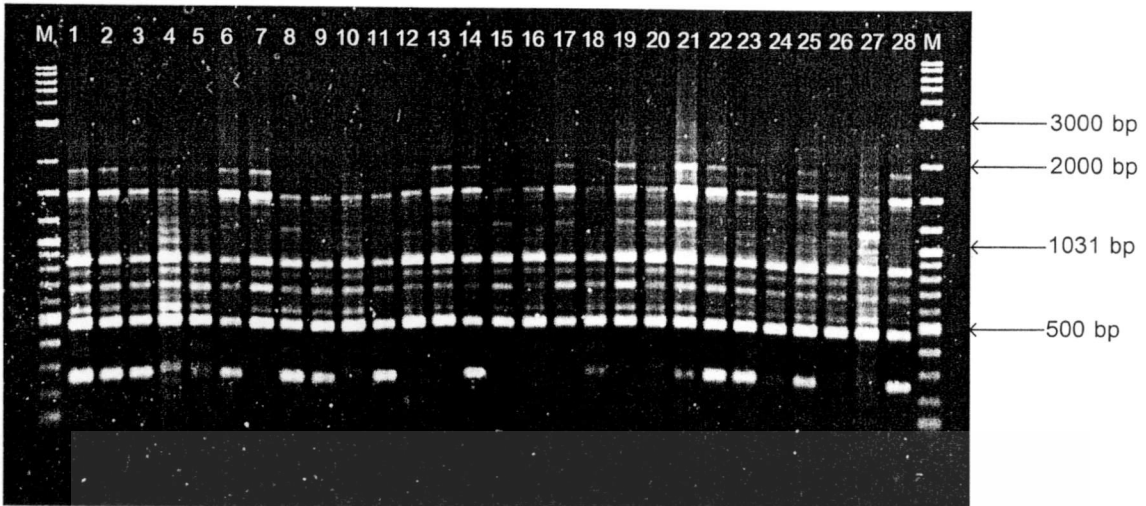


Figure 5 DNA banding patterns of 28 soybean varieties/lines analysed by RAPD technique with primer OPE 18 (M = standard DNA bands, 1-28 = SJ 1, SJ 2, SJ 4, SJ 5, ST1, ST 2, CM 2, CM 3, CM 60, NW 1, GC2679, GC2796, GC3318, GC4120, GC4637, GC4796, GC7231, GC9822, GC9948, GC10215, GC10848, GC10950, GC10981, GC10992, GC11101, GC11254, pk462 and kusl20004, respectively).

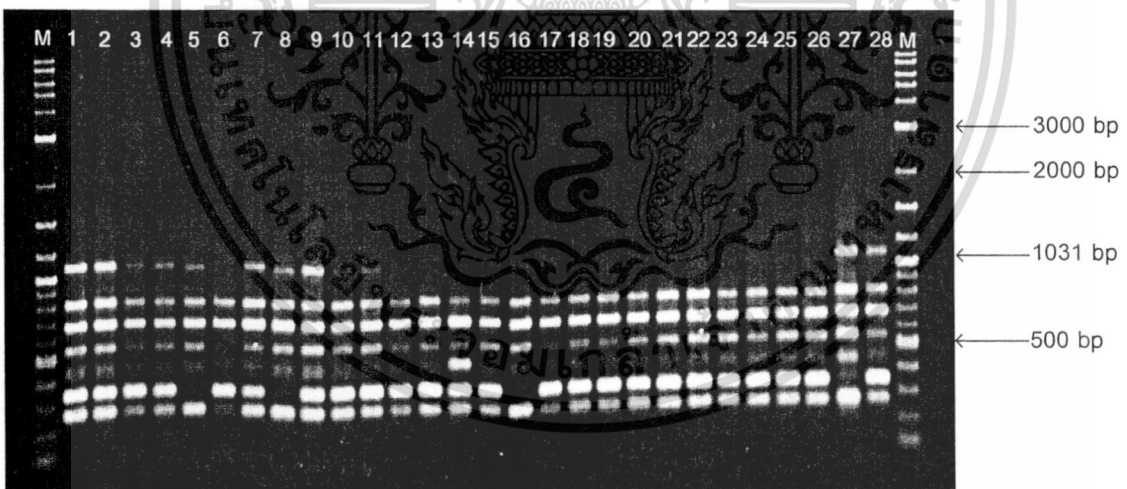


Figure 6 DNA banding patterns of 28 soybean varieties/lines analysed by RAPD technique with primer OPE 20 (M = standard DNA bands, 1-28 = SJ 1, SJ 2, SJ 4, SJ 5, ST1, ST 2, CM 2, CM 3, CM 60, NW 1, GC2679, GC2796, GC3318, GC4120, GC4637, GC4796, GC7231, GC9822, GC9948, GC10215, GC10848, GC10950, GC10981, GC10992, GC11101, GC11254, pk462 and kusl20004, respectively).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 9 DNA bands of 28 soybean varieties/lines analysed by RAPD technique using 30 primers.

Primers	No. of DNA bands	Size of DNA bands (kb)
AB11	6	0.50, 0.80, 0.85, 1.10, 1.20, 1.50
AI05	5	0.55, 0.70, 0.90, 1.10, 1.50
AI14	11	0.40, 0.55, 0.70, 0.90, 1.31, 1.20, 1.35, 1.80, 2.00, 2.20, 2.40
OPA01	5	0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.05
OPA10	10	0.35, 0.60, 0.65, 0.70, 0.80, 0.85, 0.95, 1.50, 1.75, 1.80
OPA20	6	0.30, 0.40, 0.50, 1.10, 1.20, 1.50
OPB06	5	0.70, 0.95, 1.00, 1.40, 1.60
OPB08	4	0.70, 0.90, 1.10, 1.30
OPC14	7	0.35, 0.45, 0.55, 0.70, 0.80, 0.90, 0.95
OPC16	6	0.25, 0.35, 0.75, 1.00, 1.20, 1.45
OPC18	4	0.40, 0.55, 1.20, 1.50
OPC19	5	0.40, 0.50, 0.60, 0.70, 0.80
OPD07	7	0.30, 0.40, 0.65, 0.75, 0.85, 0.95, 1.03
OPD18	6	0.60, 0.75, 1.10, 1.15, 1.20, 1.30
OPD20	6	0.45, 0.50, 0.60, 0.70, 0.95, 1.15
OPE01	10	0.30, 0.45, 0.50, 0.65, 0.75, 0.80, 0.85, 1.10, 1.20, 1.40
OPE04	9	0.25, 0.35, 0.50, 0.60, 0.70, 0.85, 1.10, 1.30, 1.45
OPE07	9	0.30, 0.35, 0.60, 0.70, 0.95, 1.18, 1.20, 1.50, 1.60
OPE15	6	0.45, 0.60, 0.70, 0.90, 1.10, 1.20
OPE18	10	0.25, 0.45, 0.50, 0.65, 0.75, 0.80, 0.95, 1.00, 1.50, 1.80
OPE20	7	0.25, 0.35, 0.45, 0.50, 0.65, 0.80, 1.10
OPF01	5	0.40, 0.55, 0.80, 0.90, 0.95
OPF03	6	0.50, 0.55, 0.70, 0.95, 1.10, 1.20
OPF07	8	0.30, 0.35, 0.70, 0.75, 0.90, 1.00, 1.10, 1.15
OPI03	9	0.30, 0.50, 0.55, 0.60, 0.90, 1.10, 1.30, 1.40, 1.70
OPY02	5	0.65, 0.80, 1.25, 1.30, 1.75
RS1	8	0.50, 0.60, 0.70, 0.90, 0.95, 1.05, 1.10, 1.20
RSR2	7	0.20, 0.35, 0.55, 0.60, 0.70, 0.80, 0.90
U.B.C.04	6	0.80, 0.90, 1.00, 1.20, 1.45, 1.60
U.B.C.05	8	0.45, 0.55, 0.70, 0.80, 0.95, 1.10, 1.20, 1.35

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาของกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ กรุงเทพมหานคร

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ได้สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้แตกต่างจาก UPGMA เล็กน้อย โดยจะแยกพันธุ์ สท 2 ออกจากพันธุ์อื่น ๆ อย่างชัดเจน พันธุ์ GC4796, GC10981, GC9822, GC11254, GC11101 สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย และแยกพันธุ์ GC2796, GC10215 ออกจากกลุ่มที่ 2 ที่จัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA ส่วนพันธุ์ GC4120 นั้น เมื่อจัดกลุ่มโดยวิธี PCA พบว่าอยู่ใกล้ชิดกับพันธุ์ GC4637

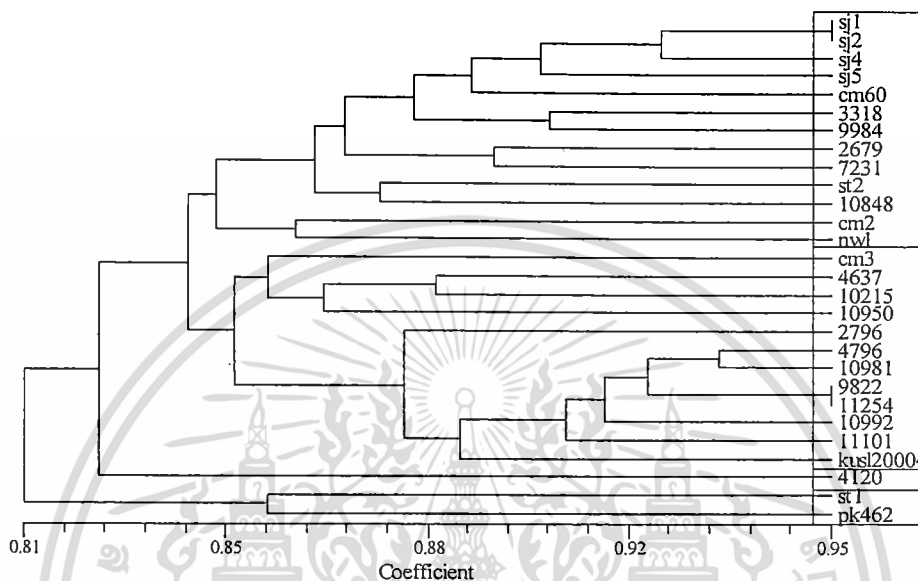


Figure 7 Phylogenetic tree manifesting the relationship among 28 soybean varieties/lines based on genetic similarity identified by RAPD technique.

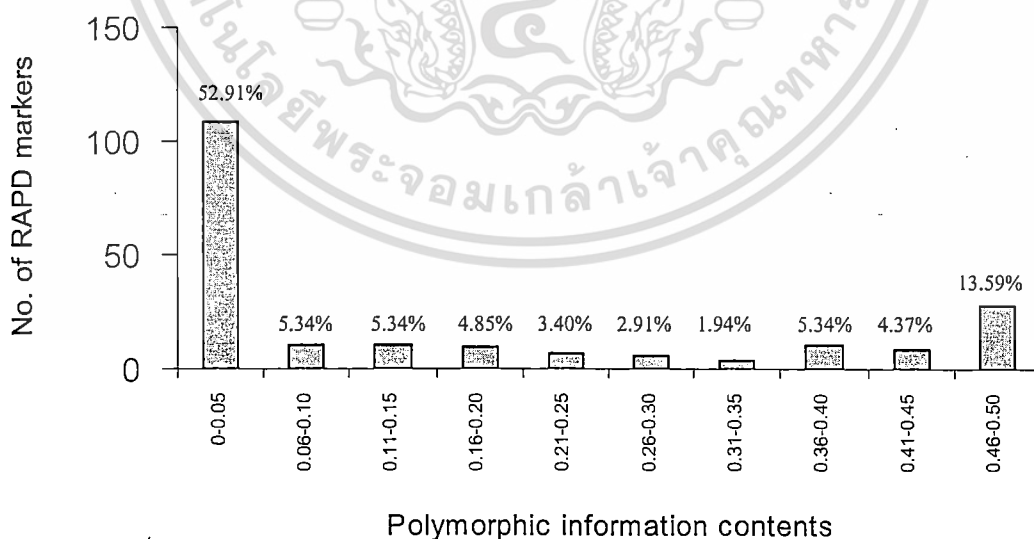


Figure 8 Distribution of polymorphic information content (PICs) for 206 RAPD markers of 28 soybean varieties/lines.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

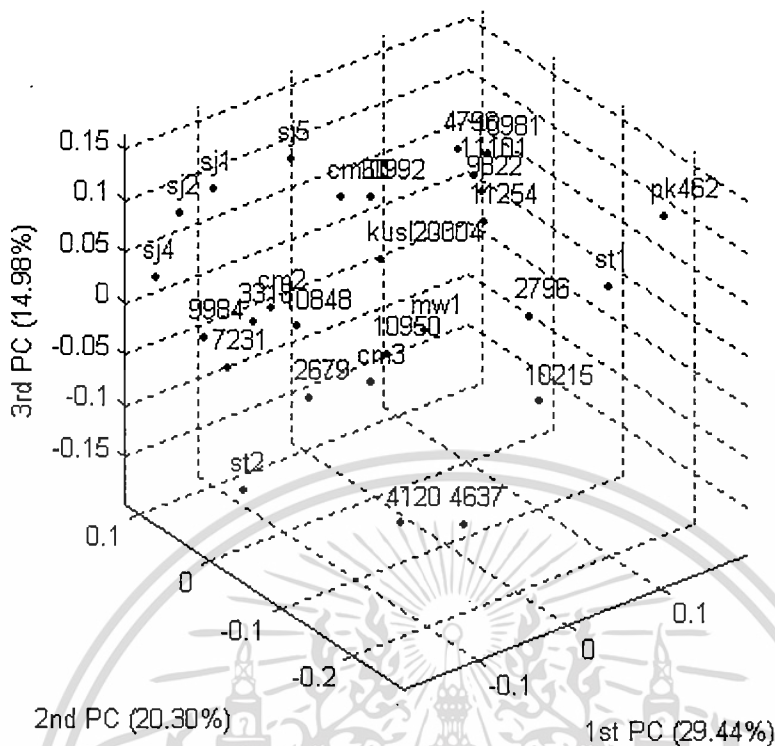


Figure 9 Distribution pattern of 28 soybean varieties/lines identified by principal component analysis (PCA) using genetic similarity of 206 RAPD markers.

2.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลืองโดยเทคนิค AFLP

จากการใช้ไพรมอร์ AFLP จำนวน 48 คู่กับถั่วเหลืองพันธุ์ ชม 60 GC10848 และ GC10981 เพื่อคัดเลือกไพรมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนระหว่างถั่วเหลืองทั้ง 3 พันธุ์ แล้วจึงคัดเลือกไพรมอร์จำนวน 10 ไพรมอร์มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในถั่วเหลืองทั้ง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ (Table 10) จำนวนแถบดีเอ็นเอจากแต่ละไพรมอร์อยู่ระหว่าง 23-62 แถบ เฉลี่ยประมาณ 44 แถบต่อไพรมอร์ ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 437 แถบ โดยไพรมอร์ E-AAC/M-CAT ให้แถบดีเอ็นเอมากที่สุดคือ 62 แถบ และไพรมอร์ E-ACG/M-CTA ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดคือ 23 แถบ (Table 11, Figure 10-11) ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่พบอยู่ในช่วง 0.1-10.0 กิโลเบส โดยเปรียบเทียบกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Ladder Mix, Fermentas, USA.)

จากจำนวนแถบดีเอ็นเอ 437 แถบ ในถั่วเหลืองทั้ง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ บันทึกข้อมูลโดยกำหนดสัญลักษณ์ “1” กับการเกิดแถบดีเอ็นเอ และ “0” กับการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี cluster analysis ด้วยโปรแกรม NTSYSpc2.02i โดยคำนวณค่า

Table 10 DNA amplification of soybean varieties CM 60, GC10848 and GC10981 by AFLP technique.

Primers	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E-AAC	O	X	O	Y	O	Y	O	X
E-AAG	O	X	X	O	O	O	Y	O
E-ACA	X	X	X	O	Y	Y	O	O
E-ACC	Y	Y	O	X	Y	O	X	X
E-ACG	O	O	X	O	Y	O	X	O
E-ACT	X	X	X	O	O	O	Y	O

X = Primers that could amplify DNA

O = Primer that could not amplify DNA

Y = Selected primers

Table 11 Total DNA bands, polymorphic bands of soybean identified by AFLP technique with various combination of primers.

Primers	Total no. of DNA bands	Polymorphic bands	%polymorphic bands
E-AAC/M-CAT	62	26	41.94
E-AAC/M-CTC	41	19	46.34
E-AAG/M-CTG	40	15	37.50
E-ACA/M-CTA	47	14	29.79
E-ACA/M-CTC	42	12	28.57
E-ACC/M-CAA	41	7	17.07
E-ACC/M-CAC	41	11	26.83
E-ACC/M-CTA	51	22	43.14
E-ACG/M-CTA	23	8	34.78
E-ACT/M-CTG	49	21	42.86
Total	437	155	35.47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Figure 10 DNA banding patterns of 28 soybean varieties/lines analysed by AFLP technique with primer E-AAC/M-CAT (M = standard DNA bands, 1-28 = SJ 1, SJ 2, SJ 4, SJ 5, ST1, ST 2, CM 2, CM 3, CM 60, NW 1, GC2679, GC2796, GC3318, GC4120, GC4637, GC4796, GC7231, GC9822, GC9948, GC10215, GC10848, GC10950, GC10981, GC10992, GC11101, GC11254, pk462 and kusl20004, respectively).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

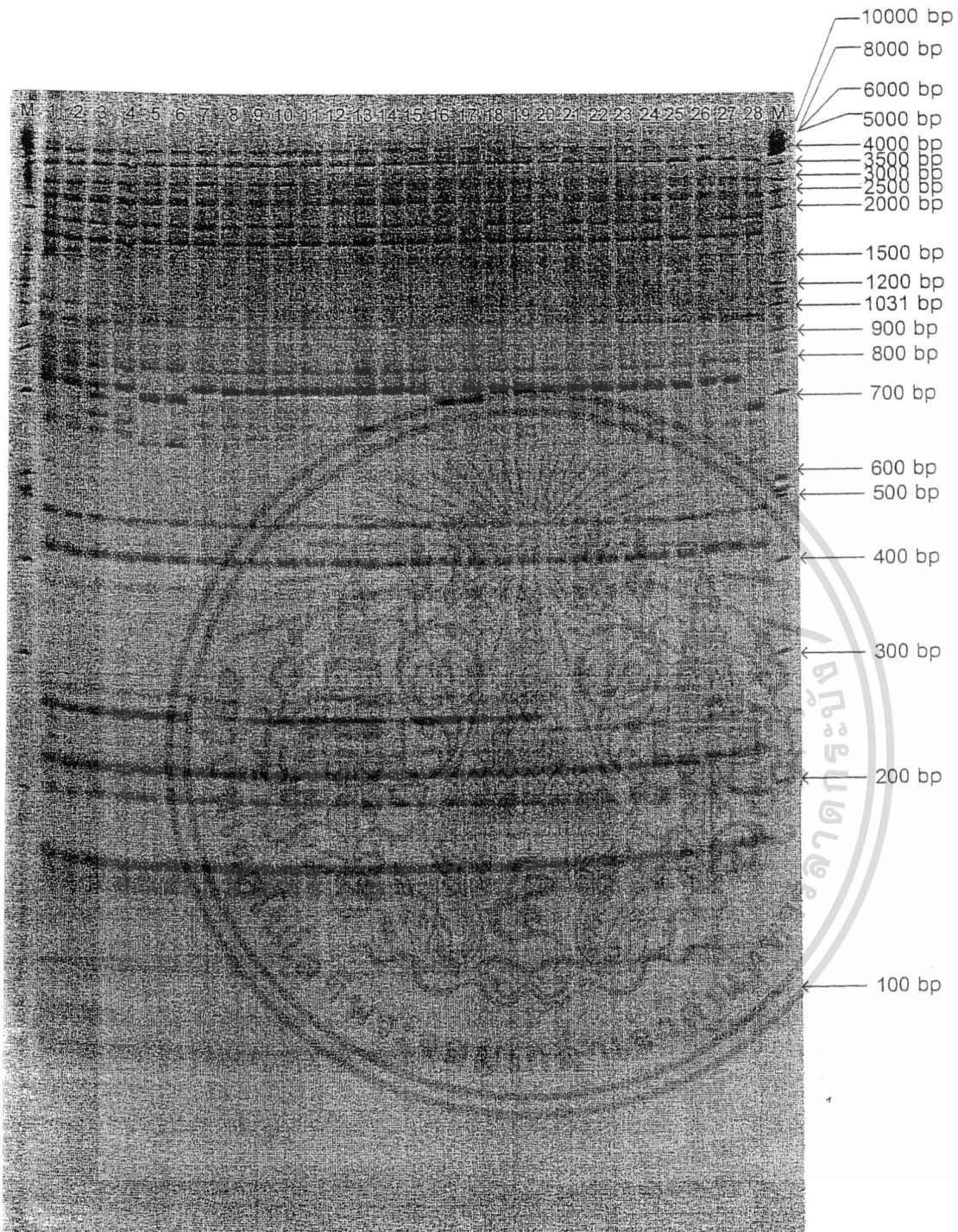


Figure 11 DNA banding patterns of 28 soybean varieties/lines analysed by AFLP technique with primer E-AAC/M-CTC (M = standard DNA bands, 1-28 = SJ 1, SJ 2, SJ 4, SJ 5, ST1, ST 2, CM 2, CM 3, CM 60, NW 1, GC2679, GC2796, GC3318, GC4120, GC4637, GC4796, GC7231, GC9822, GC9948, GC10215, GC10848, GC10950, GC10981, GC10992, GC11101, GC11254, pk462 and kusl20004, respectively).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเหมือนทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองที่ละคู่ จากนั้นเขียนแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ phylogenetic tree โดย UPGMA พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มถั่วเหลืองออกได้เป็น 3 กลุ่มหลัก ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สจ 1, สจ 2, สจ 4, สจ 5, ชม 60, นว 1, GC9984, สท 1, ชม 3, ชม 2, pk462, kusl20004 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สท 2, GC2679, GC2796, GC4637, GC4796, GC7231, GC3318, GC9822, GC4120 และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ GC10215, GC10950, GC10981, GC11254, GC10848, GC10992, GC11101 ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่ได้อยู่ในช่วง 0.90-1.00 (Figure 12) โดยที่พันธุ์ GC10950 และ GC10981 มีความเหมือนทางพันธุกรรมมากที่สุด

จากการคำนวณค่า PICs พบว่าอยู่ในช่วง 0.00-0.50 (Figure 13) โดยพบค่าที่อยู่ในช่วง 0.00-0.05 มากที่สุดคือ 282 แถบ คิดเป็น 64.53 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนแถบทั้งหมด ค่าเฉลี่ยของ PICs คือ 0.094 การวิเคราะห์ค่า PCA โดยคำนวณจากค่าความเหมือนทางพันธุกรรมสำหรับแถบดีเอ็นเอ 473 แถบ ที่ได้จากเครื่องหมาย AFLP เพื่อพิจารณาการกระจายตัวของถั่วเหลืองทั้ง 28 พันธุ์ พบว่า PCA1, 2 และ 3 มีค่าครอบคลุม 29.39, 13.27 และ 12.16 เปอร์เซ็นต์ ของความแปรปรวนทั้งหมดตามลำดับ (Figure 14) ข้อมูลที่ได้สามารถแบ่งกลุ่มถั่วเหลืองได้สอดคล้องกับวิธี UPGMA โดยสามารถแยกกลุ่มถั่วเหลืองพันธุ์ไทยและยังสามารถจัดกลุ่มพันธุ์ GC10981 และ GC10950 อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งเหมือนกับ phylogenetic tree ที่พบว่าทั้ง 2 พันธุ์นี้มีความเหมือนทางพันธุกรรมมากที่สุด

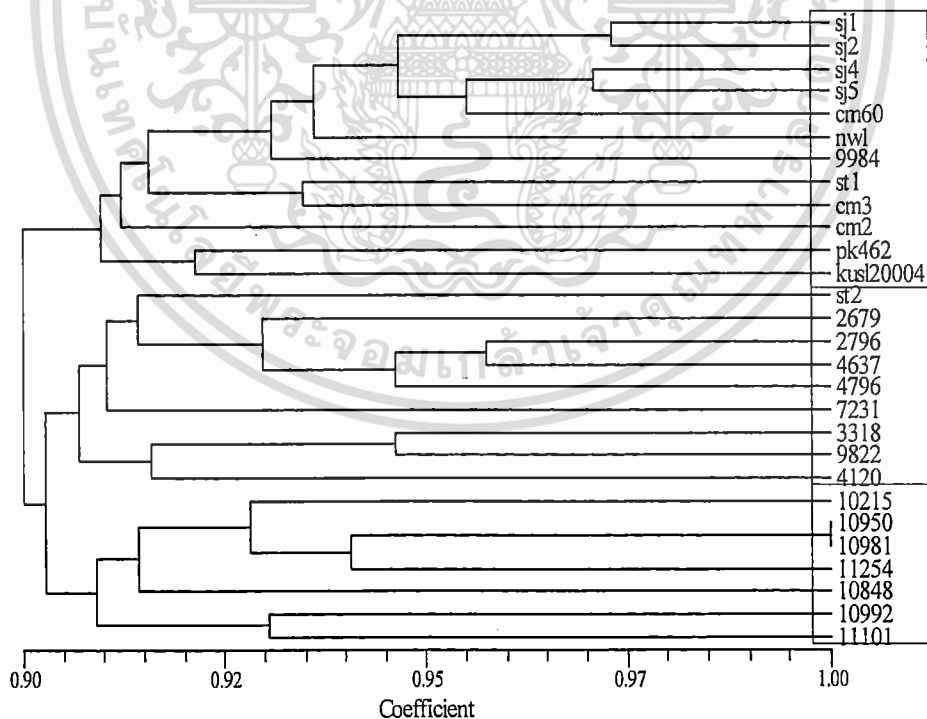


Figure 12 Phylogenetic tree exhibiting the relationship among 28 soybean varieties/lines

based on genetic similarity identified by AFLP technique.

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

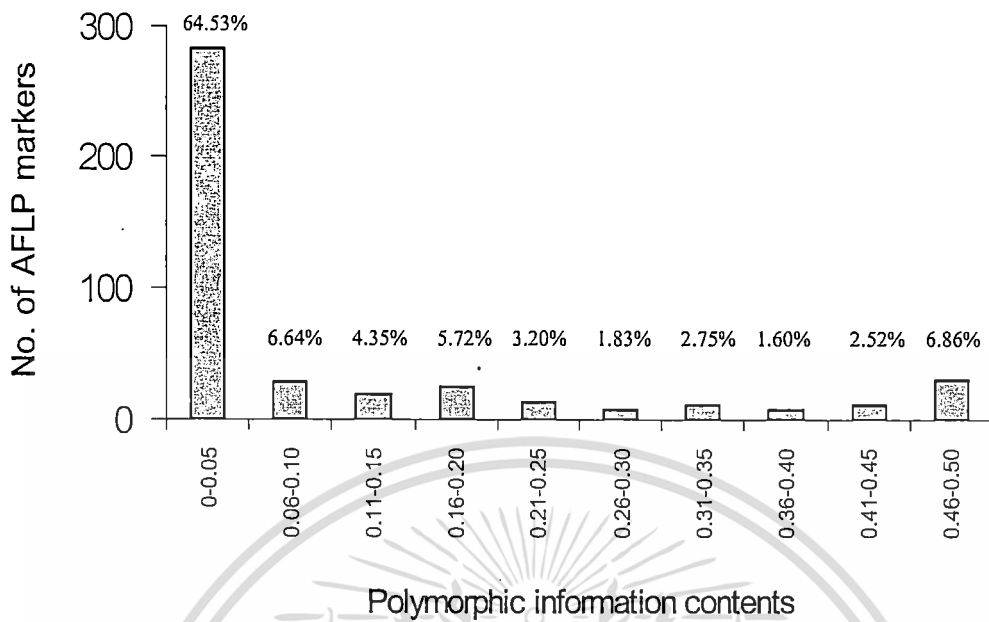


Figure 13 Distribution of polymorphic information contents (PICs) for 437 AFLP markers of 28 soybean varieties/lines.

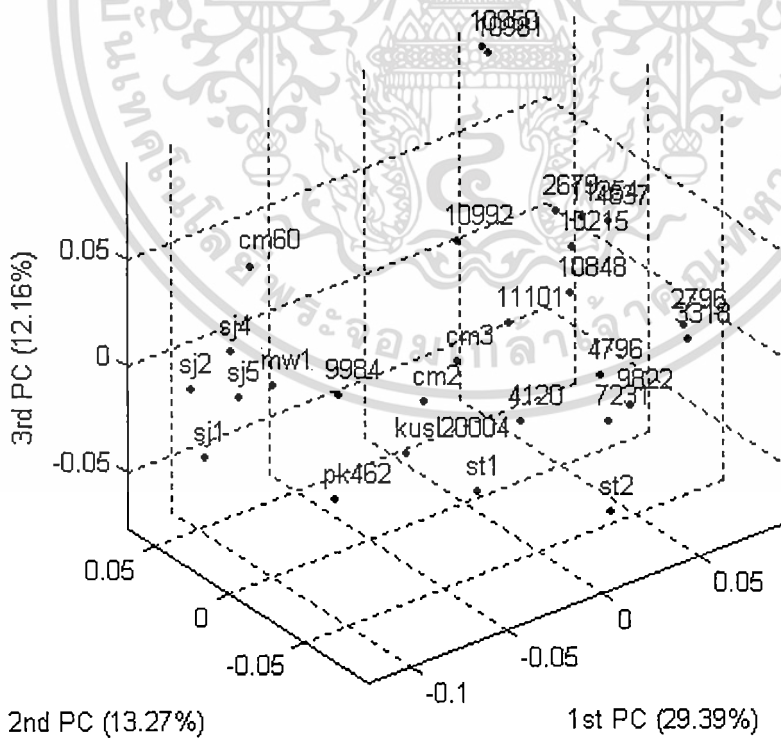


Figure 14 Distribution pattern of 28 soybean varieties/lines identified by principal component analysis (PCA) using genetic similarity of 437 AFLP markers.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลืองโดยเทคนิค RAPD และ AFLP

จากการนำข้อมูลจากเครื่องหมาย RAPD และ AFLP ซึ่งเป็น dominant marker และให้พบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลือง จำนวน 206 และ 437 แถบมารวมกันและวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี cluster analysis ด้วยโปรแกรม NTSYSpc2.02i โดยคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองทีละคู่ จากนั้นเขียนแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ phylogenetic tree โดย UPGMA พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มถั่วเหลืองออกได้เป็น 5 กลุ่มหลัก ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สจ 1, สจ 2, สจ 4, สจ 5, ชม 60, GC9984, นว 1, ชม 2, kusl20004, สท 1, ชม 3 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ GC2679, GC3318, GC7231, GC2796, GC4796, GC4637 กลุ่มที่ 3 ได้แก่ GC9822, GC11254, GC10215, GC10950, GC10981, GC10992, GC11101, GC10848 กลุ่มที่ 4 ได้แก่ สท 2 และ GC4120 กลุ่มที่ 5 คือ pk462 ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่ได้มีค่าอยู่ในช่วง 0.87-0.96 (Figure 15)

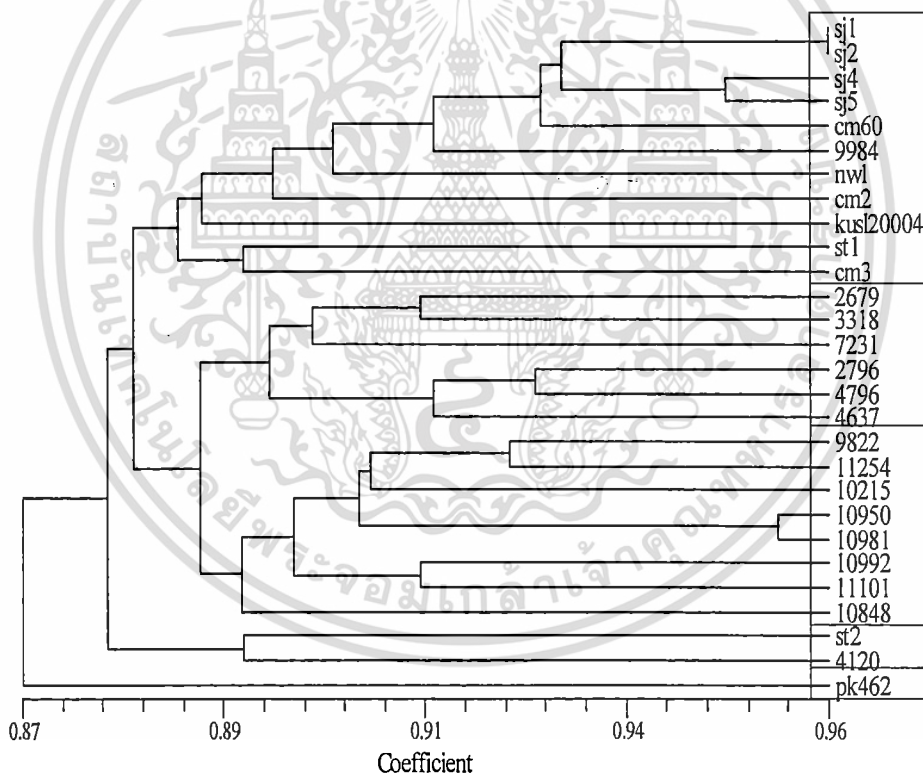


Figure 15 Phylogenetic tree showing the relationship among 28 soybean varieties/lines based on genetic similarity identified by RAPD and AFLP techniques.

การวิเคราะห์ค่า PCA โดยคำนวณจากค่าความเหมือนทางพันธุกรรมสำหรับแถบดีเอ็นเอจำนวน 643 แถบที่ได้จากเครื่องหมาย RAPD และ AFLP เพื่อพิจารณาการกระจายตัวของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตเห็นว่าเป็นการละเมิดลิขสิทธิ์ของเอกสารฉบับนี้ หากมีข้อสงสัยหรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติม กรุณาติดต่อฝ่ายบริการลูกค้าของกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ โทร. 0-2-645-4200 หรือ 0-2-645-4201 ในวันและเวลาราชการ

ถั่วเหลืองทั้ง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ พบว่า PCA1, 2 และ 3 มีค่าครอบคลุม 27.17, 12.20 และ 11.56 เปอร์เซ็นต์ ของความแปรปรวนทั้งหมดตามลำดับ (Figure 16) ข้อมูลที่ได้สามารถแบ่งกลุ่มถั่วเหลืองได้สอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA โดยสามารถแยกพันธุ์ pk462 ซึ่งเป็นพันธุ์จากประเทศเกาหลีออกจากกลุ่มอื่นๆ ได้อย่างชัดเจน และสามารถแยกกลุ่มพันธุ์ GC จากประเทศไต้หวันออกจากกลุ่มพันธุ์มาตรฐานของไทย ยกเว้นพันธุ์ GC9984 เท่านั้นที่จัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ไทย

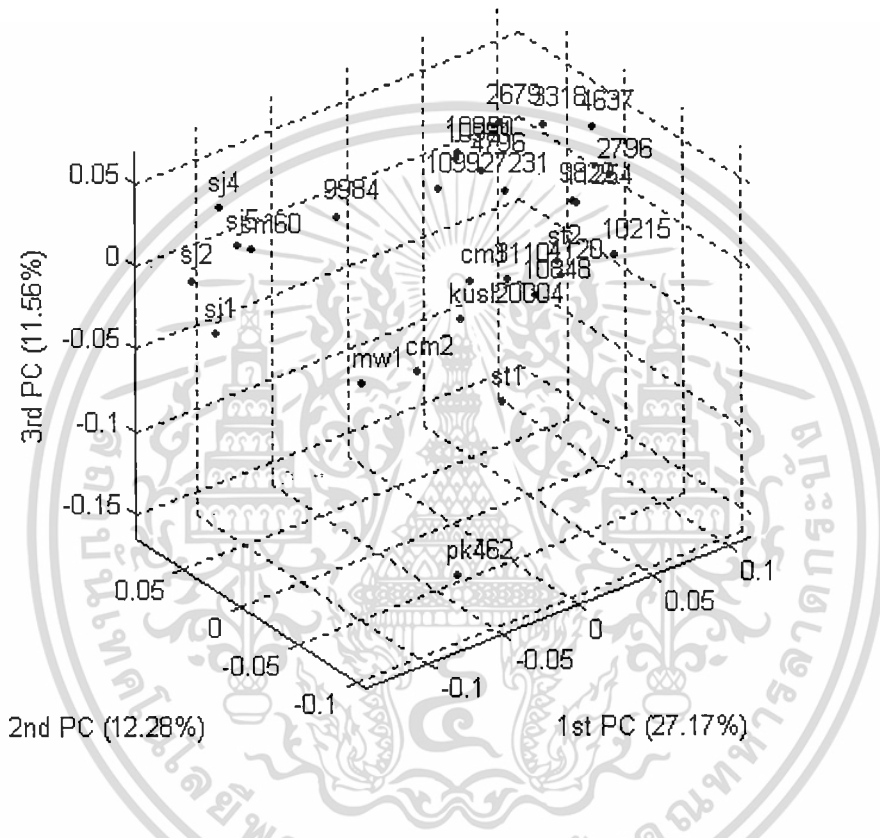


Figure 16 Distribution pattern of 28 soybean varieties/lines identified by principal component analysis (PCA) using genetic similarity of 643 RAPD and AFLP markers.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3 การศึกษาหาเครื่องหมาย RAPD และ AFLP ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่

3.1 ลูกผสมชั่วที่ 1

จากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์แม่ ชม. 60 ที่มีลักษณะอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่กับพันธุ์พ่อที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 จำนวน 2 พันธุ์ ได้แก่ GC10848 และ GC10981 ได้เมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 จากทั้งสองกลุ่มผสม นำเมล็ดไปปลูกเป็นต้นลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 33 ต้น จากกลุ่มผสม ชม 60/GC10848 และ 6 ต้น จากกลุ่มผสม ชม 60/GC10981 ตรวจสอบความเป็นลูกผสมของต้นลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ระยะต้นกล้าเพื่อให้แน่ใจว่าลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้งหมดเป็นลูกผสมจริงโดยใช้เครื่องหมาย SSR ซึ่งเป็น codominant marker ประกอบด้วยไพรเมอร์ 4 คู่ ได้แก่ SOYHSP 176, SOYSC 514, SOYPRO1 และ SAT 43 ผลการทดลองพบว่ามีไพรเมอร์ 3 คู่ที่สามารถให้ความแตกต่าง (polymorphism) ของแถบดีเอ็นเอระหว่างพ่อแม่ได้ คือ SOYHSP 176, SOYSC 514 และ SOYPRO 1 แสดงว่า ต้นลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้งหมดที่นำมาปลูกนั้นเป็นลูกผสมจริง ซึ่งคู่ได้จากแถบดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อจะปรากฏเพียงแถบเดียว ส่วนในต้นลูกผสมชั่วที่ 1 นั้นปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้ง 2 แถบที่พบทั้งในพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ (Figure 17)



Figure 17 Hybridity of F_1 plants identified by SSR primer. The PCR amplification was carried out by SSR primer SOYPRO 1. PCR products were separated by 6% denatured polyacrylamide gel and visualized by silver stain.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การกระจายตัวในลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ของประชากรลูกชั่วที่ 2

จากการปลูกต้นลูกชั่วที่ 2 ของกลุ่มผสม ชม 60/GC10848 จำนวน 135 ต้น และกลุ่มผสม ชม 60/GC10981 จำนวน 139 ต้น แล้วเก็บเกี่ยวเมล็ดจากต้นลูกชั่วที่ 2 มาทำให้เสื่อมคุณภาพในตู้อบ จากนั้นนำเมล็ดมาตรวจสอบความงอกมาตรฐาน พบว่าเมล็ดจากประชากรลูกชั่วที่ 2 ของกลุ่มผสม ชม 60/GC10848 มีค่าความงอกมาตรฐานผันแปรอยู่ระหว่าง 0-76% ส่วนพันธุ์แม่ ชม 60 และพันธุ์พ่อ GC10848 มีค่าความงอกมาตรฐานเฉลี่ย 0 และ 69.3% ตามลำดับ (Figure 18) ส่วนเมล็ดจากประชากรลูกชั่วที่ 2 ของกลุ่มผสม ชม 60/GC10981 มีค่าความงอกมาตรฐานผันแปรอยู่ระหว่าง 21.3 – 81.6% ส่วนพันธุ์แม่ ชม 60 และพันธุ์พ่อ GC10981 มีค่าความงอกมาตรฐานเฉลี่ย 34.7 และ 75% ตามลำดับ (Figure 19)

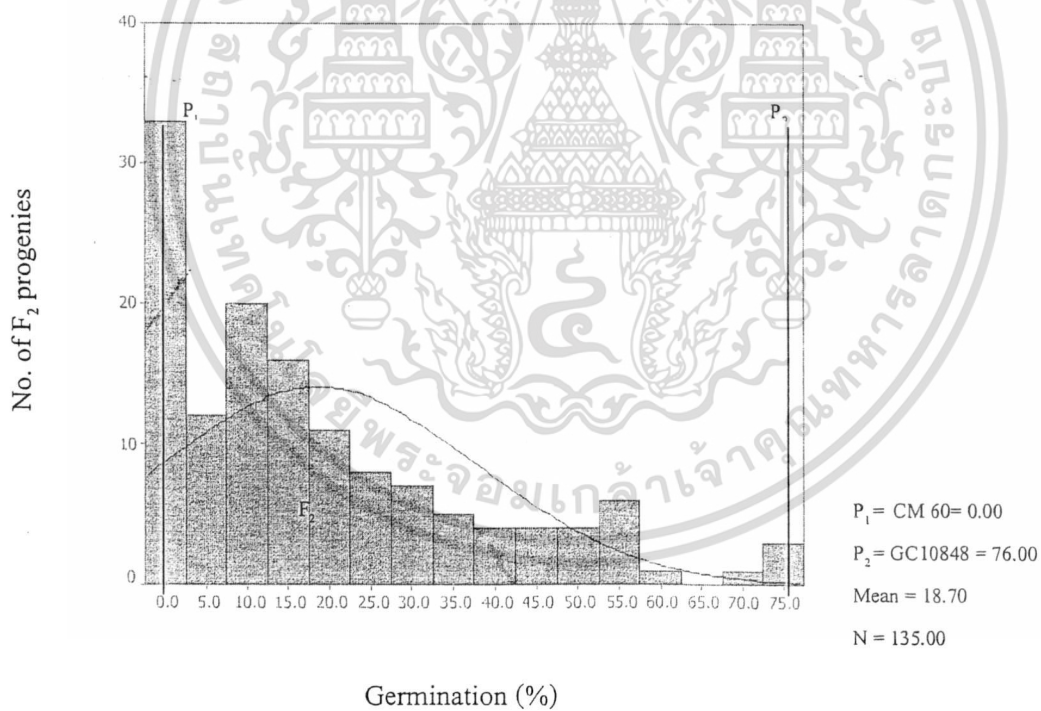


Figure 18 The distribution of seed germination of F₂ progenies of the cross CM 60/ GC 10848 after being subjected to incubator weathering.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

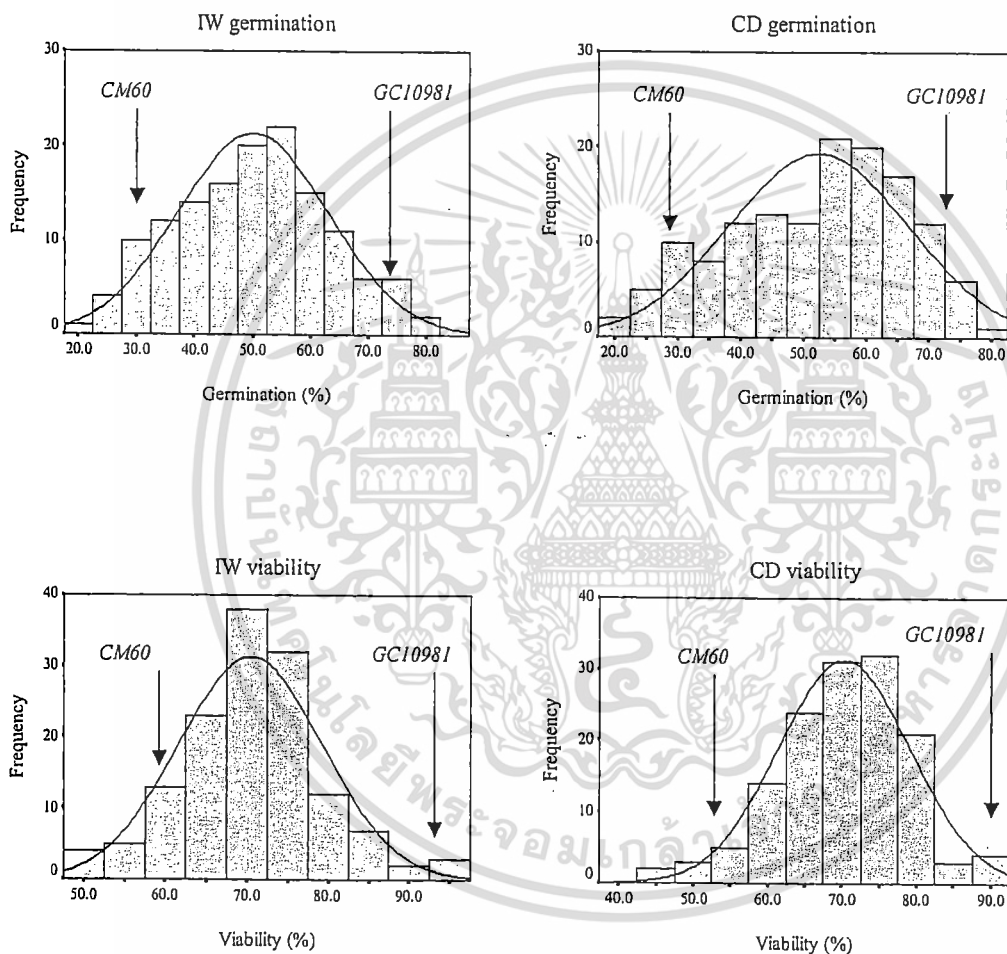


Figure 19 The distribution of seed germination of F_2 progenies of the cross CM 60/GC10981 after being subjected to incubator weathering.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การแบ่งกลุ่มประชากรลูกชั่วที่ 2 ตามลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่

จากการศึกษาการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ของประชากรลูกชั่วที่ 2 ของคู่ผสม ชม 60/GC10848 จำนวน 135 ต้น ทำให้สามารถแบ่งประชากรลูกชั่วที่ 2 ออกได้เป็น 2 กลุ่มที่แตกต่างกันอย่างมา คือ 1) กลุ่มที่มีความต้านทานสูงต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (bulk resistant) จำนวน 12 ต้น ซึ่งเมล็ดของต้นในกลุ่มนี้มีความงอกมาตรฐานสูงอยู่ระหว่าง 51.5 – 76.0% (Table 12) และ 2) กลุ่มที่ไม่ต้านทานหรืออ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (bulk susceptible) จำนวน 12 ต้น ซึ่งเมล็ดของต้นในกลุ่มนี้มีความงอกมาตรฐานต่ำอยู่ระหว่าง 0 -8.1% ส่วนประชากรลูกชั่วที่ 2 ของคู่ผสม ชม 60/GC10981 ซึ่งมีจำนวน 139 ต้นนั้น สามารถออกได้เป็น 2 กลุ่มที่แตกต่างกันอย่างมา ดังนี้ 1) กลุ่มที่มีความต้านทานสูงต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ จำนวน 6 ต้น ซึ่งเมล็ดของต้นในกลุ่มนี้มีความงอกมาตรฐานสูงอยู่ระหว่าง 67.7 – 81.6% และ 2) กลุ่มที่ไม่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ จำนวน 7 ต้น ซึ่งเมล็ดของต้นในกลุ่มนี้มีความงอกมาตรฐานต่ำอยู่ระหว่าง 21.3 - 32.3%

Table 12 Germination of the bulked F₂ progenies resistant and susceptible to field weathering.

Crosses	No. of F ₂ plants		Germination (%)
	Resistant	Susceptible	
CM 60/GC10848	12	-	51.0-71.0
	-	12	0.0-8.1
CM 60/GC10981	6	-	67.7-81.6
	-	7	21.3-32.3

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบของต้นลูกชั่วที่ 2 มารวมกันในแต่ละกลุ่ม คือ กลุ่มต้านทานและกลุ่มอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ ทั้งนี้เพื่อนำดีเอ็นเอของแต่ละกลุ่มมาศึกษาโดยพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย RAPD และ AFLP ต่อไป

3.4 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของประชากรลูกชั่วที่ 2 โดยเทคนิค RAPD

จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ในถั่วเหลือง 4 กลุ่มของกลุ่มผสม ชม 60/GC10848 คือ พันธุ์พ่อ GC10848 และพันธุ์แม่ ชม 60 กลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่ด้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ กลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 200 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและแม่ได้ทั้งหมด 32 ชนิด ได้แก่ OPA 10, OPA 11, OPA 18, OPC 7, OPC 14, OPC 15, OPC 16, OPC 17, OPC 19, OPD 15, OPD 18, OPD 19, OPD 20, OPE 6, OPE 9, OPE 10, OPE 12, OPF 2, OPF 6, OPE 11, OPF 16, OPI 12, OPI 18, OPK 14, OPN 3, AC 7, OPB 8, AH 01, AH 11, AA-01, AB-04 และ 52 ซึ่งคิดเป็นไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและแม่เท่ากับ 16.0% ของไพรเมอร์ทั้งหมด แต่ไม่มีไพรเมอร์ใดที่ให้ความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่ด้านทาน และ กลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (Figure 20, 21)

จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย RAPD ในถั่วเหลือง 4 กลุ่มของกลุ่มผสม ชม 60 /GC10981 คือ พันธุ์พ่อ GC 10981 พันธุ์แม่ ชม 60 กลุ่มชั่วที่ 2 ที่ด้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ และกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 198 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ได้ทั้งหมด 39 ชนิด ได้แก่ OPA 05, OPA 16, OPB 06, OPC 07, OPD 01, OPD 04, OPD 11, OPD 12, OPD 15, OPD 16, OPD 19, OPE 10, OPE 11, OPE 16, OPE 20, OPE 03, OPF 05, OPF 07, OPF 09, OPF 10, OPF 16, OPH 02, OPI 04, OPI 14, OPN 3, OPZ 05, OPAA 16, OPAA 19, OPAB 01, OPAC 02, OPAC 03, OPAC 05, OPAC 15, OPAC 19, OPAD 05, OPAF 07, OPAI 08, OPAI 12 และ OPAI 13 ซึ่งคิดเป็นไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อกับพันธุ์แม่เท่ากับ 19.7% ของไพรเมอร์ทั้งหมด แต่ไม่พบไพรเมอร์ใดที่ให้ความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่ด้านทานและกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

3.5 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของประชากรลูกชั่วที่ 2 โดยเทคนิค AFLP

จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ในถั่วเหลือง 4 กลุ่มของกลุ่มผสม ชม 60/GC10848 คือ พันธุ์พ่อ GC10848 กับพันธุ์แม่ ชม 60 กลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่ด้านทานและกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ ทั้งหมด 82 คู่ พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 53 คู่ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจนทำให้มองเห็นเป็นแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ GC 10848 และพันธุ์แม่ ชม 60 ซึ่งคิดเป็น 64.6% ของไพรเมอร์ทั้งหมด และไพรเมอร์ ทั้ง 53 คู่นี้ให้แถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 2,846 แถบ แต่พบแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ GC 10848 และพันธุ์แม่ ชม 60 (Figure 22) จำนวน

เอนไซม์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อ GC 10848 และพันธุ์แม่ ชม 60 (Figure 22) จำนวน

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

209 แถบ ซึ่งคิดเป็น 7.3 % ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่เกิดขึ้น เมื่อนำไพรเมอร์ทั้งหมดนี้ไปตรวจหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกที่ต้านทานและกลุ่มลูกที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ พบว่าไม่มีไพรเมอร์ใดที่สามารถให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มที่ต้านทานและอ่อนแอนี้ได้

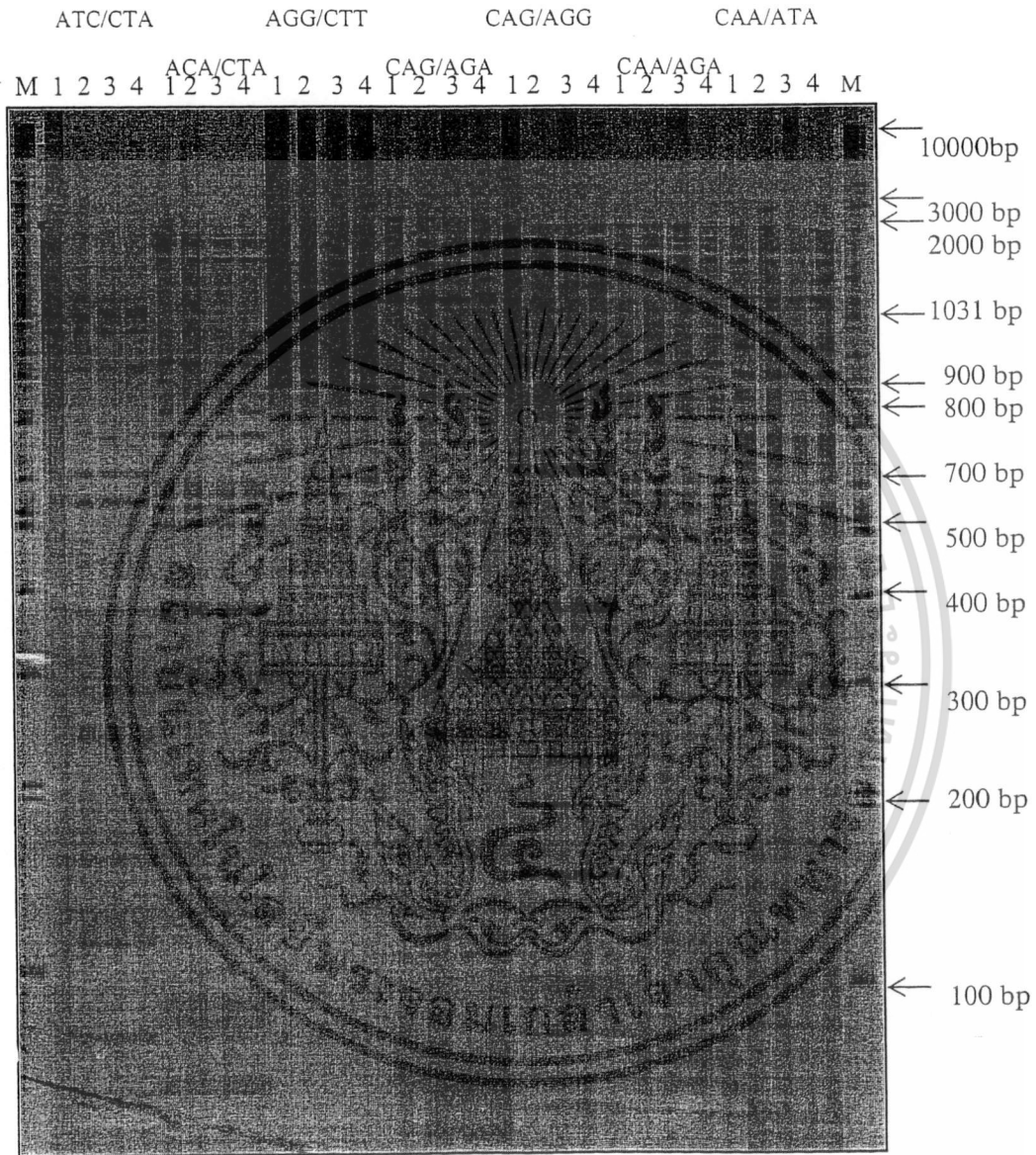


Figure 20 DNA banding pattern analysed by AFLP technique using various combination of primers (M = bands of standard DNA, 1 = GC10848, 2 = CM 60, 3 = resistant bulk, 4 = susceptible bulk).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

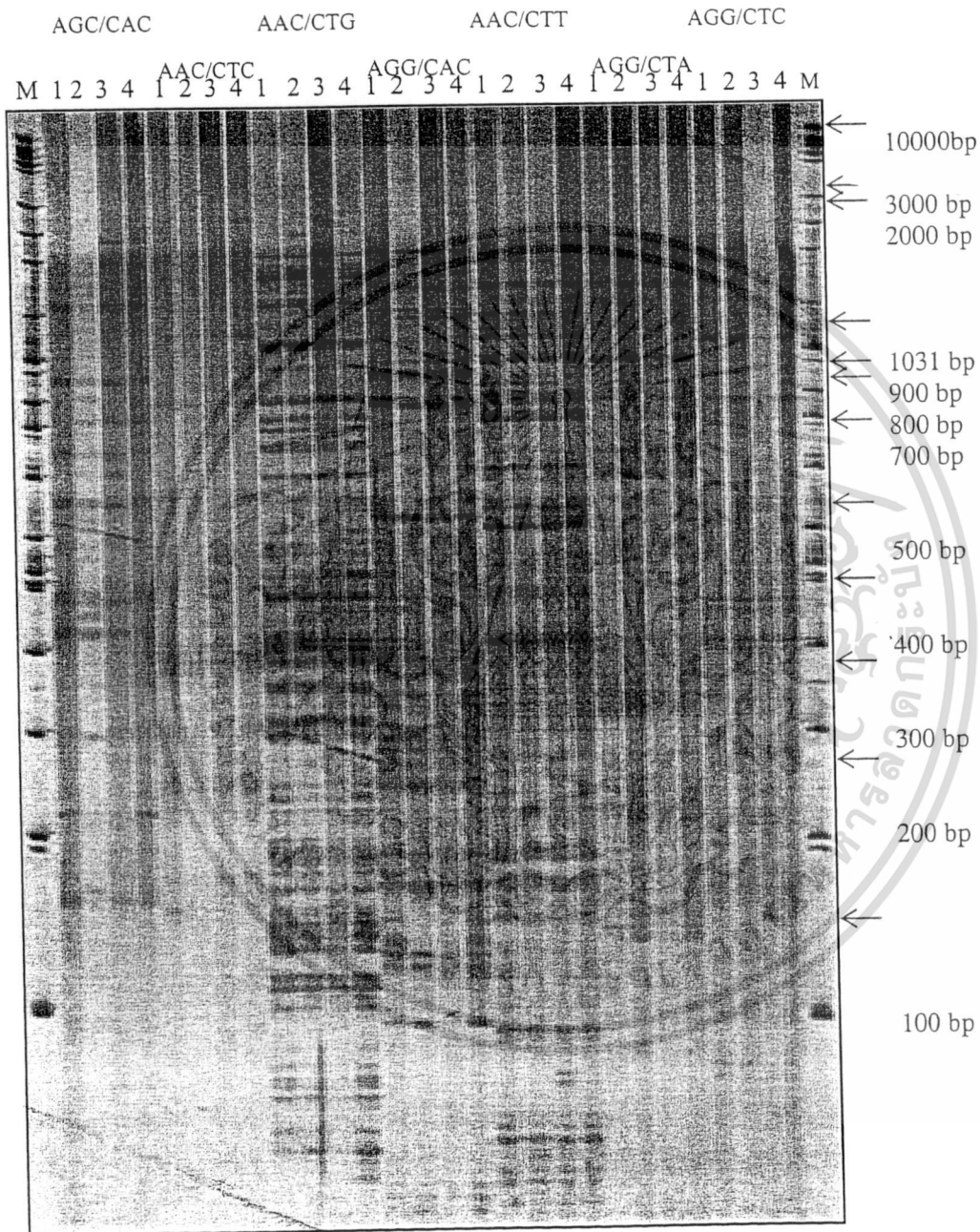


Figure 20 (Cont.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

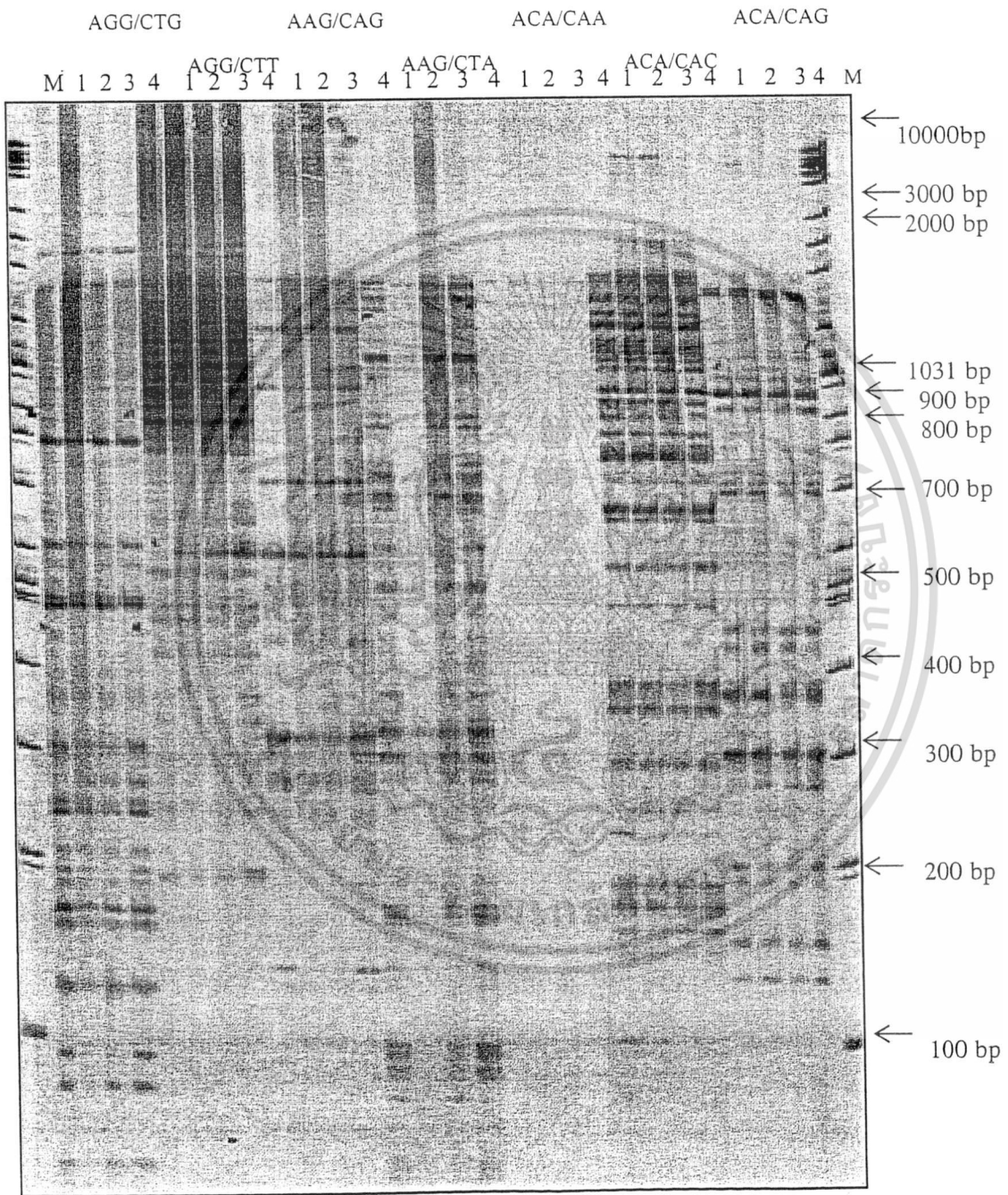


Figure 20 (Cont.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

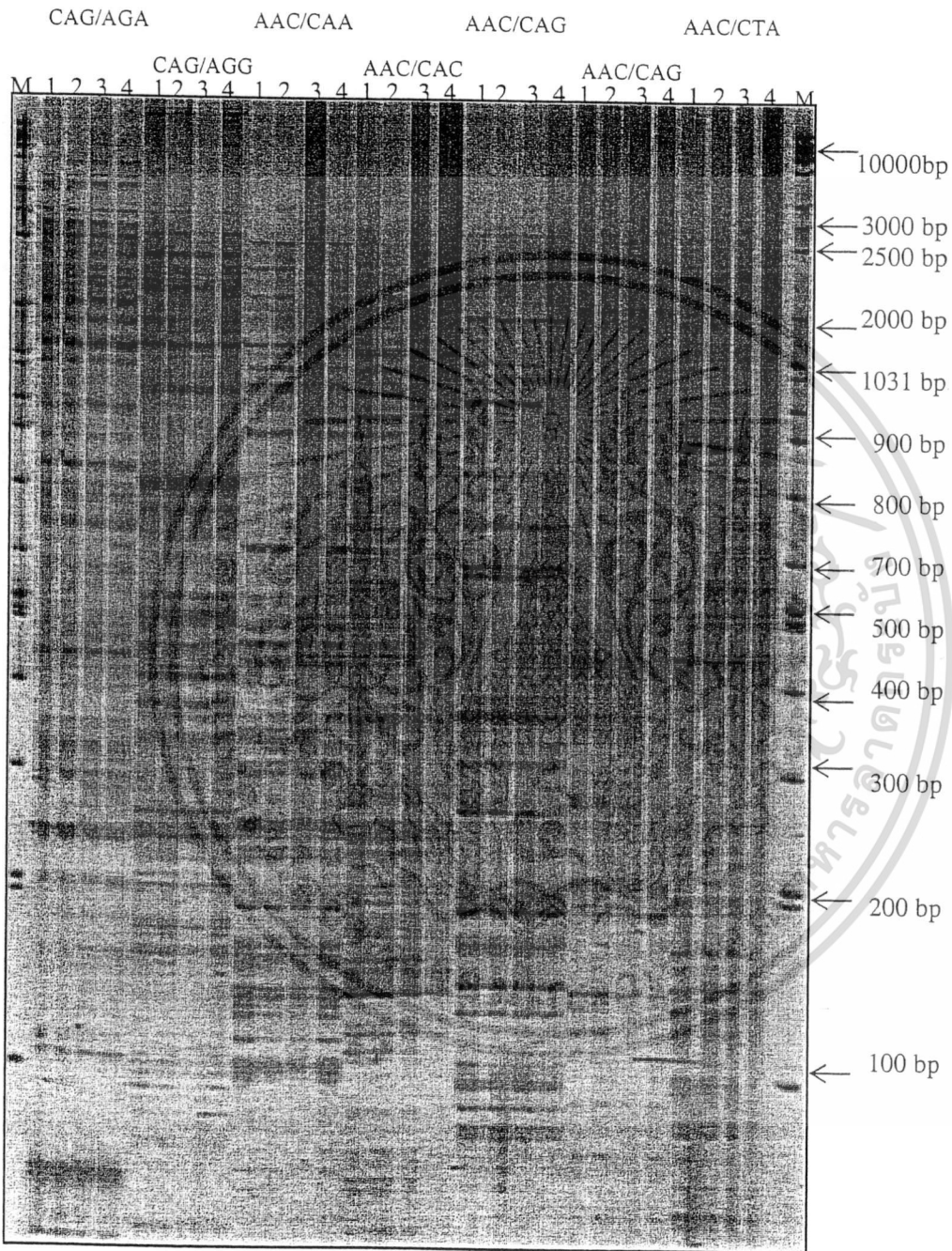


Figure 20 (Cont.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์หลายพีมอร์ฟิเคชันด้วยเครื่องหมาย AFLP ในถั่วเหลือง 4 กลุ่มของ คู่ผสม ชม 60/GC 10981 คือ พันธุ์พ่อ GC10981 พันธุ์แม่ ชม 60 กลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่ด้านทานและ กลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแอต่อความเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ ทั้งหมด 64 คู่ พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 44 คู่ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและแสดงความแตกต่างระหว่าง พันธุ์พ่อ GC10981 และพันธุ์แม่ ชม 60 ซึ่งคิดเป็น 68.8% ของไพรเมอร์ทั้งหมด และไพรเมอร์ ทั้ง 44 คู่นี้ให้แถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 2,162 แถบ แต่พบแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่าง พันธุ์พ่อ GC 10981 และพันธุ์แม่ ชม 60 จำนวน 120 แถบ ซึ่งคิดเป็น 5.6% ของแถบดีเอ็นเอ ทั้งหมดที่เกิดขึ้น เมื่อนำไพรเมอร์ ทั้งหมดนี้ไปตรวจหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกที่ ด้านทานและกลุ่มลูกที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ พบว่ามีไพรเมอร์ จำนวน 5 คู่ ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกที่ด้านทานและอ่อนแอต่อ การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ ซึ่งได้แก่ Eaag/Mcac-233, Eaag/Mcag-180, Eact/Mctt-157, Eagc/Mcag-140 และ Eagg/Mcac-115 (Figure 21) และแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่าง กลุ่มลูกที่ด้านทานและอ่อนแอมีจำนวน 5 แถบ ซึ่งคิดเป็น 0.2% ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมดหรือ อาจกล่าวได้ว่าไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่นี้มีแนวโน้มวางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทาน ต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์



Figure 21 An example of detecting linked polymorphism by bulk segregant analysis using AFLP primer combination Eaag/Mcac. Lanes from the left to right are GC10981, CM 60, resistant bulk and susceptible bulk. The arrow indicates the linked polymorphism that GC10981 and resistant bulk showed DNA band, but CM60 and susceptible bulk showed no band.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การหาลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอ

จากการตัดแถบดีเอ็นเอทั้ง 5 แถบที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนควบคุมลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ นำไปเพิ่มปริมาณและหาลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอ พบว่าแถบดีเอ็นเอทั้ง 5 มีลำดับเบสดังแสดงใน Table 13 แล้วเปรียบเทียบกับลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอกับลำดับเบสของยีนโนมถั่วเหลืองจากฐานข้อมูล DDBJ (DNA Database of Japan) โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี BLAST (Altschul *et al.*, 1997) และ FASTA (Pearson and Lipman, 1988) จากการวิเคราะห์โดย BLAST พบว่า ดีเอ็นเอ accession BU 765372 และ BU 549864 มีลำดับเบสจำนวน 102 คู่เบส ที่เหมือนกันกับลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างโดยคู่ไพรมอร์ Eact/Mctt-157 และมีลำดับเบสซ้อนกัน (overlap) จำนวน 118 คู่เบส (86.4%) จากการวิเคราะห์โดย FASTA พบว่า ดีเอ็นเอ accession AF 180335 และ AF 186186 มีลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันอย่างไม่ต่อเนื่อง (discontinuous similarity) (80 และ 129 คู่เบส) กับแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างโดยคู่ไพรมอร์ Eaag/Mcac-233 และ accession AF 243378 มีลำดับเบสบางส่วน

Table 13 The sequences of the cloned DNA fragments.

Clone name	Sequence
Eaag/Mcac-233	5'_gaattcaaggacccttactttagcctcccacacctatttatagcaaaacaaggcatttgggatgaaggtagct cgcctgggagctggttacttcatcatgaagtattctaggtggcaggggctgaaaaatgccccaaagagtgacc cttccccatttgggtatttgcgtatttacttcaaaaacgtcaaaaacctacggaatgcacgacaattggtgtaa_3'
Eaag/Mcag-180	5'_ttaacagcagctgcaacaacaataaactccccttctgccgtagattgagcaacaatgtctgtttttgagctccat gagaaacacctgatccaaagctaaaacaataaccctaaagtacttctcatatcatcaattgaaccacccaatcactgc Cagagaaactttagcttgaattc_3'
Eact/Mctt-157	5'_ttaactgtccagcatgataaacactcatgaaataatgtagtagttcactttatagacaacaaggcaattatagaaa gggttctgtatagctatcatcgggctgttgacaggacacaaattggtgatataatgtaacagctgagtgaattc_3'
Eagc/Mcag-104	5'_gaattcagcccttctgtgactctagatgatttcataaatattctcagcataaagcagttcataggaatgcgtcgatg tttgaatgtaccttctctgtaa_3'
Eagg/Mcac-115	5'_ttaacaccataagaggttataatcatagattcatcattcatatgttcatcacagatcatgaatccacagtatagtt caatagggtatagcaagacatttcaaacacctgaattc_3'

ที่คล้ายคลึงกันอย่างไม่ต่อเนื่อง (46 คู่เบส) กับแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างโดยคู่ไพรเมอร์ Eact/Mctt-157 (Table 14) ตัวอย่างของลำดับเบสที่คล้ายคลึงกันได้แสดงไว้ใน Figure 22 อย่างไรก็ตาม ไม่พบลำดับเบสของดีเอ็นเอในฐานข้อมูลที่คล้ายคลึงกันกับลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างโดยคู่ไพรเมอร์ Eaag/Mcag-180, Eagc/Mcag-104 และ Eagg/Mcac-155 โดยวิธี BLAST และ FASTA accession ทั้งหมดของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างโดยไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ดังกล่าวข้างต้นนั้นเป็นโคลนของซีดีเอ็นเอ (cDNA clone) จากถั่วเหลือง และลำดับเบสที่ได้ไม่เหมือนอย่างต่อเนื่อกับเบสที่เคยปรากฏมาก่อนในฐานข้อมูล จึงได้ลงทะเบียนลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอทั้ง 5 แถบที่ให้ความแตกต่างในฐานข้อมูล DDBJ โดยชื่อโคลนดีเอ็นเอ ความยาวของลำดับเบสและหมายเลข accession ได้แสดงไว้ใน Table 15

Table 14 Sequence similarity of the clone DNA fragments and the accessions searched from the database by BLAST and FASTA.

Clone name	Aligned accession	Overlap location (bp)	Similarity (%)
Eaag/Mcac-233	AF180335	107-224	67.2
	AF186186	3-225	54.9
Eact/Mctt-157	AF243378	1-59	78.0
	BU549864	1-118	86.4
	BU765372	1-118	86.4

Table 15 Registering information of cloned and sequenced DNA fragments.

Clone name	Origin	Length (bp)	Database accession no.
Eaag/Mcac-233	CM60	233	AB213662
Eaag/Mcag-180	CM60	180	AB213663
Eact/Mctt-157	CM60	157	AB213664
Eagc/Mcag-104	GC10981	104	AB213665
Eagg/Mcac-115	GC10981	115	AB213666

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```

>BU765372|BU765372.1 sasi7d06.y1 Gm-c1080 Glycine max cDNA clone
  SOYBEAN CLONE ID:TRANSFERASE, GST 10B ;, mRNA sequence.
  Length = 617

Score = 83.8 bits (42), Expect = 2e-14
Identities = 102/118 (86%), Gaps = 3/118 (2%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1   gaattcactcagctggttacattgatatcacccaaaatttgtgtcctgtcaacagccgcatg 60
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 260  gaattcactcagc-gttacattggcatcacccaaaatttggctcctag-agcagctgcatc
          317

Query: 61   atagctatacaagaaccctttctataaattgaccttggctctataaagtgaactacta 118
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 318  atagctctaaaagaacccttt-tgtaattgcatgttggctctagaaagtgaactacta 374

```

Figure 22 An example of the sequence similarity compared by BLAST. The sequence (1-118) of Eact/Mctt-157 is overlapped with the sequence (260-374) of Bu765372. One hundred and two bases (86%) are the same.

3.7 การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจง

จากลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างกันทั้ง 5 แถบ ได้ออกแบบไพรเมอร์ของเครื่องหมาย SCAR (sequence characterized amplified region) ที่เฉพาะเจาะจงกับลำดับเบสเพื่อเพิ่มปริมาณของแถบดีเอ็นเอทั้ง 5 ในยีนโนมของถั่วเหลือง (Table 16) พบว่าแถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ Eaag/Mcag-180 และ Eagg/Mcac-115 แสดงความแตกต่างเพียงเล็กน้อยกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ ของเครื่องหมาย SCAR ซึ่งทำให้ยากต่อการตรวจสอบการกระจายตัวในลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ของลูกชั่วที่ 2 ไพรเมอร์ของเครื่องหมาย SCAR ที่ออกแบบจากลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอของกลุ่ม primer Eage/Mcag-104 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน (แถบ) ดีเอ็นเอที่ถูกต้องได้ แถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ Eaag/Mcac-233 และ Eact/Mctt-157 แสดงความแตกต่างอย่างชัดเจนกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ ของเครื่องหมาย SCAR ดังนั้นไพรเมอร์ทั้งสองของเครื่องหมาย SCAR นี้สามารถใช้ตรวจสอบการกระจายตัวของลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ของลูกชั่วที่ 2 ได้

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 16 SCAR markers designed from the sequences of cloned DNA fragments.

Marker	Primer	Sequence
Eaag/Mcac-233	Forward	5' - ttaacaccaattgtcgtgcat-3'
	Reverse	5' - gaattcaaggaccctttact-3'
Eaag/Mcag-180	Forward	5' - gaattcaagctaacaagtttctct-3'
	Reverse	5' - ttaacagcagctgcaacaacaat-3'
Eact/Mctt-157	Forward	5' - gaattcactcagctgttacat-3'
	Reverse	5' - ttaactgtccagcatgat-3'
Eagc/Mcag-104	Forward	5' - ttaacaggaaaagggtacat-3'
	Reverse	5' - gaattcagcccttct-3'
Eagg/Mcac-115	Forward	5' - gaattcagggtgttgaat-3'
	Reverse	5' - ttaacaccataagagggtat-3'

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของลูกชั่วที่ 2 จำนวน 139 ต้น โดยใช้ไพรเมอร์ของเครื่องหมาย SCAR ที่ออกแบบจากคู่ไพรเมอร์ Eaag/Mcac-233 และ Eact/Mctt-157 พบว่า ไพรเมอร์จาก Eaag/Mcac-233 ทำให้ลูกชั่วที่ 2 จำนวน 108 ต้นแสดงแถบดีเอ็นเอหรือลูกชั่วที่ 2 เหล่านี้มีพันธุกรรม (genotype) เหมือนพันธุ์แม่ ชม 60 ส่วนลูกที่เหลืออีก 31 ต้นไม่แสดงแถบดีเอ็นเอหรือลูกชั่วที่ 2 เหล่านี้มีพันธุกรรมเหมือนพันธุ์พ่อ GC 10981 (3.48:1) ในขณะที่ไพรเมอร์จาก Eact/Mctt-157 นั้นทำให้ลูกชั่วที่ 2 จำนวน 102 ต้นแสดงแถบดีเอ็นเอหรือมีพันธุกรรมเหมือนพันธุ์แม่ ชม 60 ส่วนลูกที่เหลืออีก 37 ต้น ไม่แสดงแถบดีเอ็นเอหรือมีพันธุกรรมเหมือนพันธุ์พ่อ GC10981 (2.7:1) จึงอาจสรุปได้ว่าเครื่องหมาย SCAR ที่พัฒนามาจากเครื่องหมาย AFLP มีการถ่ายทอดพันธุกรรม (inherited) ตามกฎของ Mendel ในรูปแบบการกระจายตัวของยีนเด่น (dominant segregation pattern) โดยการมีแถบดีเอ็นเอข่มการไม่มีแถบดีเอ็นเอในอัตราส่วน 3:1 ($X^2 = 0.540$, $p = 0.463$ สำหรับ Eaag/Mcac-233 และ $X^2 = 0.194$, $p = 0.659$ สำหรับ Eact/Mctt-157) จากการใช้ t-test เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงระหว่างลูกชั่วที่ 2 ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ พบว่าค่า P (P value) ของทุกการทดสอบต่ำกว่า 0.001 แสดงว่าต้นที่ต้านทานและอ่อนแอมีความแตกต่างกันในเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงของพันธุ์พ่อ GC10981 สูงกว่าพันธุ์แม่ ชม. 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลูกที่อ่อนเอจำนวน 6 ต้น แสดงให้เห็นแถบดีเอ็นเอ 1 แถบเช่นเดียวกับพันธุ์แม่ ชม 60 ลูกที่อ่อนแอซึ่งเหลืออยู่อีก 1 ต้น (S4) ไม่แสดงแถบดีเอ็นเอให้เห็น (Figure 24) อย่างไรก็ตาม ลูกที่อ่อนแอต้นนี้ (S4) เพียงต้นเดียวรวมอยู่ในกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแออีก 6 ต้นซึ่งแสดงให้เห็นแถบดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงไม่มีผลต่อการบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกที่ต้านทานและอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

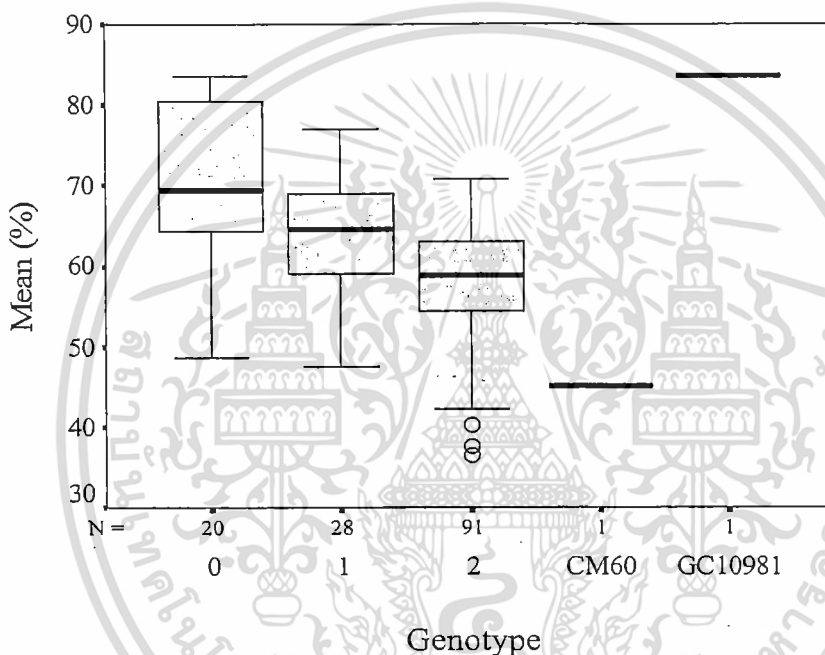


Figure 23 Boxplot of the field weathering resistance of different genotypes of markers Eact/Mcctt-157 and Eaag/Mcac-233. Mean is the average of the germination and viability by incubator weathering. Genotype 1 indicates both markers presented bands (AABB, AABb, AaBB or AaBb); 2 indicates one of the markers presented bands (AAbb, Aabb, aaBB or aaBb); 3 indicates neither markers presented bands (aabb). N is the number of the F2 progenies in same genotype.

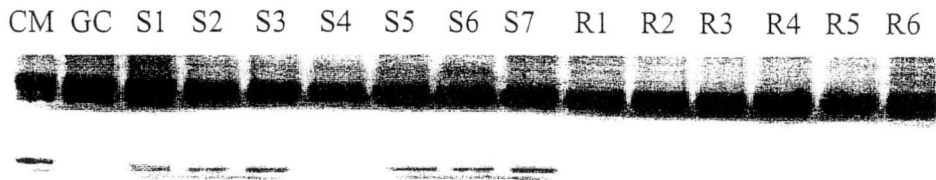


Figure 24 The co-segregation of the bulked F₂ progenies by marker Eaag/Mcac-233.

CM = CM60, GC = GC10981, S = susceptible plant, R = resistant plant.

3.8 การกำหนดตำแหน่งของกลุ่มยีนกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ

จากการกำหนดตำแหน่งของกลุ่มยีน (QTL) ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่และเครื่องหมายดีเอ็นเอในแผนที่ยีน (genetic map) โดยใช้ Mapmaker/EXP 3.0 พบว่า เครื่องหมาย Eaag/Mcac-233 และ Eact/Mcctt-157 วางตัวอยู่ในกลุ่มยีนเดียวกันหรืออยู่บนโครโมโซมเดียวกัน โดยอยู่ห่างกัน 25.8 cM และกลุ่มยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์วางตัวอยู่ห่างจากเครื่องหมาย Eaag/Mcac-233 เป็นระยะทาง 14 cM โดยมีค่า LOD score ของความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพเท่ากับ 3.4 และ 9.0 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนดไว้ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์

การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่

โดยปกติความงอก ความแข็งแรง และน้ำหนักแห้งของเมล็ดพันธุ์จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นในระหว่างการพัฒนาของเมล็ด และเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเมล็ดมีการสุกแก่ทางสรีรวิทยา ผลจากการทดลองนี้พบว่า ทั้งความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ที่ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยามีความผันแปรมาก (Table 2) สิ่งนี้แสดงให้เห็นว่า สภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศสูงและ/หรือการมีฝนตกบ่อย ไม่แต่เพียงทำให้คุณภาพของเมล็ดพันธุ์เสื่อมอย่างรวดเร็วภายหลังการสุกแก่ก่อนการเก็บเกี่ยวเท่านั้น (วันชัย จันทรประเสริฐ และคณะ, 2539; Delouche, 1980 ; Bhatia *et al.*, 1993 ; Horlings *et al.*, 1994) ยังมีผลต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์บางพันธุ์ในระหว่างการพัฒนาของเมล็ด หรือก่อนการสุกแก่ทางสรีรวิทยาอีกด้วย (Andrews, 1981 ; Dornbos, 1995) ความผันแปรในคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ที่เกิดขึ้นในสายพันธุ์/พันธุ์ต่าง ๆ น่าที่จะเป็นผลมาจากลักษณะทางพันธุกรรมที่ทำให้มีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในแปลงแตกต่างกัน (Paschal and Ellis, 1978; Dassou and Kueneman, 1984 ; Horlings *et al.*, 1994) การเสื่อมคุณภาพในแปลงของพันธุ์ที่อ่อนแอต่อสภาพอากาศร้อนชื้น ซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างการพัฒนาของเมล็ดอาจเกิดจากกลไกทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการงอกของเมล็ดพันธุ์ได้รับความเสียหาย (Smith and Berjak, 1995) ความบกพร่องที่เกิดขึ้นกับกลไกทางชีวเคมีนี้อาจเกิดจากมีการสังเคราะห์สารประกอบพวกไนโตรเจนไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดความสมบูรณ์ขององค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์เมมเบรนและ metabolite ซึ่งมีความสำคัญต่อกระบวนการมีชีวิตของเมล็ด (Chamma *et al.*, 1990) ดังนั้นปรากฏการณ์ดังกล่าวที่เกิดขึ้นในระหว่างการพัฒนาของเมล็ด จึงอาจมีผลทำให้ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ลดลงเมื่อเมล็ดสุกแก่ทางสรีรวิทยา Chamma *et al.* (1990) ได้สรุปว่า การมีคุณภาพสูงสุดของเมล็ดพันธุ์ที่ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยานั้น ขึ้นอยู่กับการมีทั้งสารพลังงานพวกคาร์โบไฮเดรต และการมีองค์ประกอบของเซลล์ในสภาพที่เหมาะสมทั้งปริมาณและคุณภาพ ดังนั้นองค์ประกอบสำคัญทั้งสองนี้ก็จะเป็นตัวผลักดันความงอกและความแข็งแรงให้เกิดขึ้นสูงสุดในเมล็ดพันธุ์ที่สุกแก่ทางสรีรวิทยา

ผลจากการศึกษาพบว่า การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในแปลง ซึ่งเกิดจากการมีสภาพอากาศร้อนชื้นสลับกันนี้ ทำให้ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ภายหลังการสุกแก่ก่อนการเก็บเกี่ยว ผลการทดลองนี้สองคลัสกับการทดลองของ Paschal and Ellis (1978) และ Dassou and Kueneman (1984) ซึ่งพบว่า สภาพอากาศที่ฝนตกบ่อยสลับกับอากาศที่ร้อน จะทำให้ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหลืองภายหลังการสุกแก่ก่อนการเก็บเกี่ยวสูญเสียไปอย่างรวดเร็ว การเสื่อมคุณภาพในแปลง ทำให้ความงอกและความแข็งแรงของสายพันธุ์/พันธุ์ต่างๆ มีความผันแปรมาก คือ 16-90% สำหรับความงอก และ 26-86% สำหรับความแข็งแรง (Table 2) การมีความผันแปรกว้างมาก ในคุณภาพของเมล็ดพันธุ์เช่นนี้ น่าที่จะเกิดจากความผันแปรของการสุกแก่ของฝักทั้งหมดใน ต้นเดียวกัน และในระหว่างสายพันธุ์/พันธุ์ดังที่ได้สาธิตไว้โดย Dassou and Kueneman (1984) ดังนั้นฝักจึงได้รับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมแตกต่างกันไปด้วย สำหรับการเสื่อมคุณภาพในตู้อบ เป็นสภาพที่ทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพมากที่สุด เพราะมีเมล็ดพันธุ์มีชีวิตเหลืออยู่เพียง 4 สายพันธุ์/พันธุ์เท่านั้น โดยมีช่วงของความงอกและความแข็งแรงอยู่ระหว่าง 0-69% และ 0-45% (Table 2) ตามลำดับ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับคุณภาพในแปลงแล้ว การเสื่อมคุณภาพ ภายในตู้อบจะทำให้ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์มีความผันแปรน้อยกว่า เมื่อคิด เฉพาะ 4 สายพันธุ์/พันธุ์ที่มีชีวิตรอดมาได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับในด้าน ความแข็งแรงแล้วเมล็ดที่ทำให้เสื่อมคุณภาพในตู้อบมีความผันแปรอยู่ระหว่าง 29-45% ซึ่งน้อยกว่าการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ ซึ่งมีความผันแปรอยู่ระหว่าง 42-77% อย่างเห็นได้ชัดเจน การทำให้เมล็ดเสื่อมคุณภาพในตู้อบมีผลทำให้ความผันแปรในความแข็งแรงเกิดขึ้นน้อยนั้น น่าที่จะเกิดจากการใช้ฝักที่มีระดับการสุกแก่ที่พร้อมกันในการตรวจสอบ จึงเป็นการช่วยลดความผันแปรของการสุกแก่ของฝักในต้นเดียวกันให้เกิดขึ้นน้อยที่สุด นอกจากนี้การทำให้เมล็ดเสื่อมคุณภาพในตู้อบจะช่วยลดอิทธิพลของปัจจัยสิ่งแวดล้อม ทำให้ถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ที่มีอายุการสุกแก่แตกต่างกันสามารถแสดงลักษณะออกมาได้อย่างเต็มที่ (Dassou and Kueneman, 1984) ดังนั้นการทำให้เมล็ดเสื่อมคุณภาพในตู้อบที่ใช้ในการศึกษานี้ จึงน่าที่จะเป็นวิธีการที่เหมาะสม ในการบ่งบอกความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในแปลงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ผลจากวิธีการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่าถั่วเหลือง 4 สายพันธุ์/พันธุ์ที่อาจมีความต้านทานดังกล่าว ได้แก่ GC10848, GC2796, สจ.1 และ GC10981

ความสัมพันธ์ของลักษณะทางกายภาพของเมล็ดกับความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพ

สภาพแวดล้อมที่มีฝนตกบ่อยสลับกับการมีอุณหภูมิที่สูง เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เมล็ดพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งภายหลังการสุกแก่ก่อนการเก็บเกี่ยว เสื่อมคุณภาพลงอย่างรวดเร็ว (Delouche, 1980 ; Bhatia *et al.*, 1993 ; Horlings *et al.*, 1994) การสูญเสียความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว ส่วนใหญ่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเมล็ดพันธุ์ Woodstock *et al.* (1985) ได้สาธิตให้เห็นว่า การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ฝ้าย ภายหลังการสุกแก่ก่อนการเก็บเกี่ยว เกิดจากโครงสร้างของผนังเซลล์และเมมเบรนได้รับความเสียหาย จึงทำให้เมล็ดพันธุ์เกิดการรั่วไหล ซึ่งสัมพันธ์กับการลดลงของความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ Howell *et al.* (1959) ศึกษาการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

ภายหลังการสุกแก่ทางสรีรวิทยาภายใต้สภาพอากาศร้อนชื้น พบว่า สภาพแวดล้อมเช่นนี้ทำให้เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมีอัตราการหายใจสูง จนทำให้เกิดการสูญเสียน้ำตาลและอาหารสำรองอื่น ๆ ในเมล็ด นอกจากนี้การมีสภาพอากาศร้อนและชื้นเป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราอีกด้วย ดังนั้นผลของปัจจัยทั้งภายในและภายนอกเมล็ดดังกล่าว จึงทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพเร็วมากยิ่งขึ้นไปอีก (Paschal and Ellis, 1978; Ndimande *et al.*, 1981)

อย่างไรก็ตามการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองต่างพันธุ์กันจะแตกต่างกัน ทั้งนี้ น่าที่จะเป็นผลมาจากพันธุกรรมที่ทำให้มีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในแปลงต่างกัน ความต้านทานนี้อาจเกี่ยวข้องกับลักษณะทางกายภาพของเมล็ด Potts *et al.* (1978) ได้แสดงให้เห็นว่าพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีเมล็ดแข็งสามารถป้องกันการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์สภาพไร่ได้ดี Dassou and Kueneman (1984) รายงานการมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดระหว่างเมล็ดแข็งกับการงอกหลังจากผ่านการทำให้เสื่อมคุณภาพในตู้อบ แต่มีความสัมพันธ์ต่ำกับการงอกภายหลังการทำให้เมล็ดเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ ในการศึกษาเมล็ดแข็งมีความสัมพันธ์กับค่าการนำไฟฟ้าหรือการรั่วไหล และอัตราการดูดน้ำ ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่า ความต้านทานของเมล็ดแข็งต่อการเสื่อมคุณภาพในแปลงอาจเกิดจากน้ำผ่านเข้าไปในเมล็ดได้ช้า จึงทำให้เมมเบรนของเซลล์ชั้นนอกไม่ได้รับความเสียหายจากการที่น้ำผ่านเข้าไปในเมล็ดเร็วเกินไป (Powell and Matthews, 1978) เมื่อน้ำผ่านเข้าไปได้น้อยจึงไม่มีผลกระทบที่มากพอที่จะทำให้เกิดความเสียหายต่อสรีรวิทยาและชีวเคมีที่อาจจะทำให้เกิดการสูญเสียในความงอกของเมล็ดพันธุ์ นอกจากนี้การมีเยื่อหุ้มเมล็ดที่แข็งยังช่วยปกป้องเชื้อราไม่ให้ผ่านเข้าไปในเมล็ดได้อีกด้วย (Horlings *et al.*, 1994) อย่างไรก็ตามในบรรดาถั่วเหลือง 4 สายพันธุ์/พันธุ์ที่รอดมาได้นี้ ไม่ได้มีเมล็ดแข็งทั้งหมด ดังนั้นพันธุ์ที่ปราศจากเมล็ดแข็งแต่มีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในแปลง อาจเกิดจากการมีสัดส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดสูงก็เป็นได้

การพบความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดกับการดูดน้ำ เป็นสิ่งที่แสดงให้เห็นว่าเมล็ดที่มีสัดส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดสูงจะทำให้น้ำเข้าไปในเมล็ดได้ช้าลง ซึ่งอาจเกิดจากการมีจำนวนรูที่เยื่อหุ้มเมล็ดน้อยกว่าเมล็ดที่มีสัดส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดต่ำกว่า (Yaklich *et al.*, 1986) Calero *et al.* (1981) พบว่า บริเวณพื้นผิวเมล็ดที่มีสัดส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดสูง มีสารพวกไข (wax) ฝังอยู่ใน epidermis และในรู ดังนั้นการที่เมล็ดดังกล่าวดูดน้ำได้ช้าอาจเกิดจากการมีจำนวนรูต่อพื้นที่ผิวของเยื่อหุ้มเมล็ดน้อย นอกจากนี้ยังมีสารพวกไขฝังอยู่ในพื้นผิวของเยื่อหุ้มเมล็ดอีกด้วย จึงอาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เมล็ดพันธุ์มีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในแปลง

การไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเมล็ดกับความงอกมาตรฐานในการศึกษานี้ ขัดแย้งกับนักวิทยาศาสตร์หลายท่านที่ได้รายงานถึงการมีความสัมพันธ์ดังกล่าว (Paschal and Ellis, 1978 ; Bhatia *et al.*, 1993 ; Horlings *et al.*, 1994) การไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวอาจ

เกิดจากการมีความผันแปรที่กว้างของขนาดเมล็ดกับความงอกของเมล็ดพันธุ์ แต่เมื่อพิจารณาถึงสีของเยื่อหุ้มเมล็ดด้วย พบว่า เมล็ดขนาดเล็กที่มีสีน้ำตาลและเขียว งอกได้ดีกว่าเมล็ดขนาดใหญ่ที่มีสีเหลือง การทดลองนี้จึงสนับสนุนรายงานของ Dassou and Kueneman (1984) ซึ่งพบว่าเมล็ดขนาดเล็กและมีสีดำมีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพใน incubator weathering ได้ดีกว่าเมล็ดที่มีสีเหลือง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลืองโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การวิเคราะห์การจัดกลุ่มถั่วเหลืองทั้ง 28 สายพันธุ์/พันธุ์ โดยวิธี UPGMA จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา 10 ลักษณะ สามารถแบ่งกลุ่มถั่วเหลืองออกเป็น 3 กลุ่มหลัก (Figure 1) ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ส่วนใหญ่เป็นถั่วเหลืองพันธุ์มาตรฐานของไทย เช่น พันธุ์ สจ 1, สจ 2, สจ 4, สจ 5 ยกเว้นพันธุ์ pk462, GC3318 และ GC10992 จากประเทศเกาหลีและจากประเทศไต้หวัน กลุ่มที่ 2 เป็นสายพันธุ์ GC จากประเทศไต้หวัน ยกเว้นพันธุ์ นว 1 และ ชม 2 ซึ่งเป็นถั่วเหลืองพันธุ์ไทย กลุ่มที่ 3 คือ พันธุ์ GC10848 ซึ่งเป็นสายพันธุ์จากประเทศไต้หวัน จากลักษณะภายนอกของถั่วเหลืองพันธุ์นี้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างกับพันธุ์อื่น ๆ อย่างชัดเจน คือ มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาล เมล็ดมีขนาดเล็ก และ hilum ไม่มีสี (Table 6) ซึ่งการแบ่งกลุ่มโดยวิธี UPGMA นี้จัดกลุ่มได้ผลสอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มโดยวิธี PCA มีเพียงพันธุ์ GC3318 และ GC10992 ที่ถูกแยกออกจากกลุ่มที่ 1 ของการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA ซึ่งทั้งสองพันธุ์นี้เป็นพันธุ์ที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีน้ำตาลแตกต่างจากพันธุ์อื่น ๆ ในกลุ่มที่ 1 ซึ่งส่วนใหญ่จะมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีเหลืองจึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การจัดกลุ่มโดยวิธี PCA แตกต่างกับ UPGMA พันธุ์ถั่วเหลืองที่ศึกษาในครั้งนี้นี้บางพันธุ์ไม่สามารถจำแนกพันธุ์ได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏ เนื่องจากมีความเหมือนกันมาก เช่น พันธุ์ สจ 4 ในกลุ่มที่ 1 และพันธุ์ นว 1 ในกลุ่มที่ 2 ซึ่งมีดอกสีม่วง เมล็ดมีขนาดกลาง เยื่อหุ้มเมล็ดสีเหลือง hilum มีสีน้ำตาลอ่อน เป็นต้น อีกทั้งลักษณะสีดอก สีเยื่อหุ้มเมล็ดเหล่านี้มีขึ้นควบคุมเพียงตัวเดียว (Chowdhury *et al.*, 2000) จึงไม่สามารถประเมินความแตกต่างทางพันธุกรรมในจีโนมของพันธุ์ต่าง ๆ ได้ เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ศึกษาในแง่วันเก็บเกี่ยว วันออกดอก วันสุกแก่ และความสูงของลำต้น พบว่าการจัดกลุ่มที่ได้มีความยากลำบากในการจำแนกความผันแปรทางพันธุกรรม เนื่องจากลักษณะที่ศึกษาเหล่านี้อาจมีผลกระทบจากสิ่งแวดล้อม (วิสุทธิ ไบไม้, 2536) และจำนวนลักษณะที่ศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยาในครั้งนี้อาจมีน้อยเกินไป ทำให้ไม่สามารถเป็นตัวแทนในการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ดีเพียงพอ อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหล่านี้จะเป็น

ถั่วเหลืองพันธุ์ไทยออกจากพันธุ์อื่น ๆ ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่ใช้ในการจัดกลุ่มย่อยอยู่ในช่วง 0.90-1.00 แสดงความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมากในแต่ละพันธุ์ โดยค่าที่ใช้ในการจัดกลุ่มนี้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมากกว่าเทคนิค RAPD เมื่อพิจารณาการจัดกลุ่มแบบ PCA สามารถจัดกลุ่มได้สอดคล้องกับวิธี UPGMA (Figure 14) โดยแบ่งถั่วเหลืองพันธุ์ไทยออกเป็น 2 กลุ่ม และยังจัดกลุ่มพันธุ์ GC10950 และ GC10981 อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับ phylogenetic tree ที่พบว่าค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่ใช้จัดกลุ่มของถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์นี้มีค่าเท่ากับ 1 และสามารถแยกพันธุ์ สท 2 ได้เหมือนกับการจัดกลุ่มโดยวิธี PCA ของเทคนิค RAPD

ปัจจัยหลายประการที่มีผลกับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลืองที่ศึกษา เช่น จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ศึกษาและการกระจายของเครื่องหมายดีเอ็นเอในยีนโนมตัวอย่าง (Powell *et al.*, 1996) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้นอกจากเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในแต่ละเทคนิคแล้ว ยังได้วิเคราะห์ผลร่วมกันระหว่างเทคนิค RAPD และ AFLP ซึ่งจัดเป็น dominant marker เช่นเดียวกัน เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ศึกษา และทำให้มีการกระจายของเครื่องหมายดีเอ็นเอในยีนโนมตัวอย่างถั่วเหลืองเพิ่มขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลืองได้ละเอียดยิ่งขึ้น จากการวิเคราะห์ข้อมูลจากเทคนิค RAPD ร่วมกับ AFLP พบว่าสามารถจัดกลุ่มถั่วเหลืองโดยวิธี UPGMA ออกได้เป็น 5 กลุ่ม (Figure 15) ซึ่งละเอียดมากขึ้นกว่าการจัดกลุ่มโดยใช้เพียงเทคนิคเดียว โดยกลุ่มที่ 1 ส่วนใหญ่เป็นถั่วเหลืองพันธุ์ไทยเช่น พันธุ์ สจ 1, สจ 2, สจ 4, สจ 5 ยกเว้นพันธุ์ GC9984 กลุ่มที่ 2 และ 3 เป็นพันธุ์ GC จากประเทศไต้หวัน และสามารถแยกพันธุ์ pk462 ซึ่งเป็นพันธุ์จากประเทศเกาหลีออกจากกลุ่มอื่น ๆ ได้อย่างชัดเจน เช่นเดียวกับการแบ่งกลุ่มโดยวิธี PCA ที่สามารถแบ่งกลุ่มถั่วเหลืองได้สอดคล้องกับแหล่งที่มาของพันธุ์ และเป็นไปในทำนองเดียวกับการแบ่งกลุ่มโดยวิธี PCA ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในถั่วเหลืองอีกหลายรายงาน (Maughan *et al.*, 1996; Thompson and Nelson, 1998; Ude *et al.*, 2003) แต่ยังมีรายงานการวิจัยที่พบว่า แหล่งกำเนิดและสภาพภูมิศาสตร์ไม่สามารถบ่งชี้ได้ถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมในระหว่างพันธุ์ถั่วเหลือง ตัวอย่างเช่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากพันธุ์ถั่วเหลืองจากอเมริกาเหนือและยุโรป พบว่ามีแหล่งที่มาจากเอเชีย จึงทำให้ยากในการจัดกลุ่มโดยใช้แหล่งที่มาของพันธุ์ (Brown-Guedira *et al.*, 2000) Griffin and Palmer (1995) รายงานว่า สภาพทางภูมิศาสตร์มีอิทธิพลเพียงเล็กน้อยต่อการเปลี่ยนแปลงของอัลลีลและความแปรปรวนระหว่างพันธุ์ถั่วเหลือง ซึ่งแตกต่างกับ Li and Nelson (2002) ที่พบผลการศึกษาที่แตกต่างไปเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในถั่วเหลืองพันธุ์ดั้งเดิม การศึกษาในครั้งนี้นับพบความแตกต่างของการจัดกลุ่มระหว่างการศึกษาด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยา เทคนิค RAPD และ AFLP ซึ่งอาจเกิดจากการศึกษาในตำแหน่ง (locus) ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของกรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ หากมีข้อสงสัยหรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติม กรุณาติดต่อฝ่ายวิชาการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แตกต่างกัน ทำให้การจัดกลุ่มที่ได้มีความแตกต่างกัน (Liu, 1997) ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่ใช้ในการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA ของเทคนิค RAPD, AFLP และ RAPD ร่วมกับ AFLP มีค่าอยู่ในช่วง 0.81-0.95, 0.90-1.00 และ 0.87-0.96 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่ต่ำ โดยสอดคล้องกับค่า PICs ที่คำนวณได้ของเทคนิค RAPD ร่วมกับ AFLP ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.00-0.05 สูงถึง 60.81 เปอร์เซ็นต์ของเครื่องหมายโมเลกุล และค่า PICs เฉลี่ยเท่ากับ 0.12 ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาโดย Ude *et al.* (2003) ที่คำนวณค่าเฉลี่ย PICs ได้เท่ากับ 0.10 แต่มีค่าต่ำกว่าการศึกษาโดย Thompson and Nelson (1998) ซึ่งพบค่า PICs อยู่ในช่วง 0.06-0.50 เฉลี่ย 0.30 Keim *et al.* (1992) และ Lorenzen *et al.* (1995) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยเทคนิค RFLP พบค่าเฉลี่ย PICs ที่ได้มีค่าเท่ากับ 0.30 และ 0.35 ตามลำดับ มีรายงานถึงความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่ต่ำของถั่วเหลืองซึ่งเป็นพืชผสมตัวเอง (Keim *et al.*, 1992; Maughan *et al.*, 1996; Baranek *et al.*, 2002) เช่นเดียวกับพืชผสมตัวเองชนิดอื่น ๆ เช่น มะละกอ (Kim *et al.*, 2002) กาแฟอาราบิก้า (Steiger *et al.*, 2002) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thompson *et al.* (1998) ที่กล่าวว่า ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองมีค่าต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับพืชตระกูลถั่วชนิดอื่น ๆ ที่ผสมตัวเองเช่นเดียวกัน ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์/พันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในการศึกษารุ่นนี้มีความสัมพันธ์กัน (Chowdhury *et al.*, 2002) โดยเมื่อพิจารณาประวัติของการผสมพันธุ์และแหล่งที่มาพบว่า พันธุ์มาตรฐานของไทยและสายพันธุ์ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้เป็นพันธุ์ที่มาจากประเทศไต้หวัน หรือเป็นลูกผสมของพันธุ์ที่มีแหล่งที่มาจากประเทศไต้หวัน (Table 1) เช่นพันธุ์ Tainung4 ซึ่งเป็นพันธุ์พ่อและแม่ของพันธุ์ สจ 5 และ สจ 4 ตามลำดับ จึงมีผลทำให้ความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่ได้มีค่าต่ำ มีรายงานในถั่วเหลืองที่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ซึ่งอาจเป็นเพราะตัวอย่างที่เลือกศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก โดยอาจศึกษาจากถั่วเหลืองต่างชนิด (species) กัน (Powell *et al.*, 1996; Thseng *et al.*, 1999) เทคนิค RAPD และ AFLP ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่าง พันธุกรรมที่เป็นโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัส (Morell *et al.*, 1995; Maughan *et al.*, 1996) ค่าความแปรปรวนที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จึงมีค่าต่ำกว่าการศึกษาโดยเทคนิค SSR (Powell *et al.*, 1996) โดยการศึกษาครั้งนี้เทคนิค AFLP ให้แถบดีเอ็นเอมากกว่าเทคนิค RAPD เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lin *et al.* (1996) ดังนั้น AFLP จึงเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพมาก

การกระจายตัวในลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ของประชากรลูกชั่วที่ 2

เมล็ดที่เก็บเกี่ยวจากประชากรลูกชั่วที่ 2 ของคู่ผสม ชม 60/GC10848 มีความงอกมาตรฐานผันแปรค่อนข้างมาก อยู่ระหว่าง 0-76% และมีความงอกมาตรฐานเฉลี่ยเท่ากับ 18.7% เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบความงอกมาตรฐานมาวิเคราะห์การกระจายตัว โดยใช้โปรแกรม SPSS พบว่ากราฟที่ได้มีการกระจายตัวแบบต่อเนื่องและมีลักษณะเบ้ไปทางด้านซ้าย (Figure 18) ซึ่งมีลักษณะค่อนข้างไปทางแม่ แสดงให้เห็นว่าประชากรลูกชั่วที่ 2 ส่วนใหญ่มีแนวโน้มให้ค่าความงอกของเมล็ดค่อนข้างต่ำหรือไม่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพ ทั้งนี้จะเป็นผลเนื่องมาจากลักษณะไม่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดที่ได้จากพันธุ์แม่ ชม 60 ข่มต่อลักษณะต้านทานที่ได้จากพันธุ์พ่อ GC10848 ดังนั้นลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ (polygenes) และยีนมีการแสดงออกแบบข่มไม่สมบูรณ์ (partial dominant) ส่วนเมล็ดที่เก็บเกี่ยวจากประชากรลูกชั่วที่ 2 ของคู่ผสม ชม 60/GC10981 มีความงอกมาตรฐานผันแปรอยู่ระหว่าง 21.3-81.6% และมีความงอกมาตรฐานเฉลี่ยเท่ากับ 50.2% เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์การกระจายตัวโดยใช้โปรแกรม SPSS พบว่า กราฟที่ได้มีการกระจายตัวอย่างต่อเนื่อง และมีลักษณะเป็นรูประฆังคว่ำ (normal distribution) (Figure 19) ซึ่งแสดงว่าความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่เป็นลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait) ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ และไม่มี การข่มของยีน

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของประชากรลูกชั่วที่ 2 โดยเทคนิค RAPD

จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD ในประชากรลูกชั่วที่ 2 ของทั้ง 2 คู่ผสม ชม 60/GC 10848 และ ชม 60/GC10981 โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ พันธุ์พ่อ พันธุ์แม่ กลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่ต้านทานและกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและแม่ แต่ไม่มีไพรเมอร์ใดที่ให้ความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่ต้านทานและกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่เป็นลักษณะทางปริมาณถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนมาก ซึ่งการแสดงออกของยีนแต่ละตัวต่อลักษณะดังกล่าวมีน้อย (minor gene effect) อีกทั้งสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีนและประชากรที่ใช้ศึกษาอาจไม่เหมาะสม เนื่องจากเป็นประชากรลูกชั่วที่ 2 ซึ่งยีนในตำแหน่งต่าง ๆ ยังมีการกระจายตัวสูงและมีความเป็นเฮเทอโรไซกัสสูงถึง 50% โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ นั้นถูกควบคุมด้วยยีนน้อย โอกาสในการแสดงออกของยีนนั้นก็ยาก เนื่องจากยีนน้อยนี้จะแสดงออกได้ก็ต่อเมื่อยีนอยู่ในสภาพที่เป็นโฮโมไซกัส จึงเป็นเรื่องยากที่จะตรวจพบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกที่ต้านทานและกลุ่มลูกที่อ่อนแอได้ นอกจากนี้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเทคนิค RAPD นี้ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยและการเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบยังเป็นไปอย่างสุ่มและบางครั้งเมื่อทำซ้ำผลที่ได้จากการวิเคราะห์ไม่ซ้ำกัน ไม่ว่าจะรันซ้ำกันอีกครั้งหนึ่ง หรือใช้ไพรเมอร์ตัวอื่นที่ต่างกันก็อาจได้ผลไม่เหมือนกัน ดังนั้นการดำเนินการต่อไปควรพิจารณาถึงข้อจำกัดของการใช้เทคนิค RAPD ในการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกที่ต้านทานและกลุ่มลูกที่อ่อนแอได้

ทดลองจะแตกต่างกันไปจากเดิม เนื่องจากเทคนิคนี้มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสถานะต่าง ๆ อีกทั้งแถบดีเอ็นเอที่ได้มีการแสดงการข่มต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างต้นที่มีพันธุกรรมเป็นโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้ (สุรินทร์, 2545)

Michelmores *et al.* (1991) กล่าวว่าประชากรที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอร่วมกับวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมคือ ประชากรรวมของสายพันธุ์ RIL (recombinant inbred line) ที่เกิดจากการผสมตัวเอง หรือการผสมแบบสายเลือดชิดอย่างต่อเนื่อง จนได้สายพันธุ์ที่มีพันธุกรรมอยู่ในสภาพที่เป็นโฮโมไซกัส ซึ่งการสร้างประชากรรวมของสายพันธุ์ RIL ต้องผ่านกระบวนการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมที่เป็นคู่กันหลาย ๆ ครั้ง ทำให้เกิดการกระจายตัวทางพันธุกรรมแบบสุ่มในแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นถ้าลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดถูกควบคุมด้วยยีนด้อยโอกาสในการแสดงออกของยีนจึงมีมากขึ้น ในทำนองเดียวกัน Wang and Paterson (1994) ที่ได้สร้างกลุ่มดีเอ็นเอจากข้อมูลลักษณะภายนอกที่แสดงออกในมะเขือเทศในประชากรที่แตกต่างกัน 4 แบบ ได้แก่ ประชากรลูกชั่วที่ 2 ประชากรรวมของสายพันธุ์ RIL ประชากรลูกผสมกลับ (backcross) และประชากรรวมของสายพันธุ์ DH (doubled haploid line) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรและมีพันธุกรรมอยู่ในสภาพโฮโมไซกัส พบว่าประชากรรวมของสายพันธุ์ RIL และประชากรรวมของสายพันธุ์ DH เหมาะสมที่จะใช้สร้างกลุ่มดีเอ็นเอมากที่สุด เนื่องจากยีนภายในประชากรเหล่านี้อยู่ในสภาพที่เป็นโฮโมไซกัส แต่ประชากรลูกชั่วที่ 2 และประชากรลูกผสมกลับยังคงมีพันธุกรรมอยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัส อย่างไรก็ตามประชากรลูกผสมกลับมีความเหมาะสมในการสร้างกลุ่มดีเอ็นเอมากกว่าประชากรลูกชั่วที่ 2

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของประชากรลูกชั่วที่ 2 โดยเทคนิค AFLP

จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ในประชากรลูกชั่วที่ 2 ของคู่ผสม ชม 60/GC10848 โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ พันธุ์พ่อ พันธุ์แม่ กลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่ต้านทาน และกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจนทำให้มองเห็นเป็นแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ แต่ไม่มีไพรเมอร์ใดที่สามารถให้ความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกที่ต้านทานและกลุ่มลูกที่อ่อนแอ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอน้อยเกินไปและไพรเมอร์นั้นอาจจะไม่เหมาะสมกับชนิดของพืช ซึ่งบางไพรเมอร์ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยเกินไป หรืออาจเป็นเพราะในขั้นตอนการรวมกลุ่มดีเอ็นเอตัวอย่างจากต้นที่ต้านทานและอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ อาจมีความแตกต่างกันไม่มากพอ ทำให้แถบดีเอ็นเอที่ได้มีจำนวนน้อย หรือในขั้นตอนการเชื่อมต่อดีเอ็นเอต้นแบบกับ adapter นั้น ไม่ดีพอ ทำให้เมื่อเวลาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ไพรเมอร์ไม่สามารถ

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้าไปจับกับ adapter ได้หรือจับได้แต่ไม่ดีพอทำให้ได้แถบดีเอ็นเอจำนวนน้อย อีกทั้งลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่เป็นลักษณะทางปริมาณ ถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนมาก ซึ่งการแสดงออกของยีนแต่ละตัวต่อลักษณะดังกล่าวมีน้อยและสภาพแวดล้อมยังมีอิทธิพลเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย นอกจากนี้ประชากรที่ใช้ศึกษาอาจยังไม่เหมาะสม เนื่องจากเป็นประชากรลูกชั่วที่ 2 ซึ่งยีนในตำแหน่งต่าง ๆ ยังมีการกระจายตัวสูงและอยู่ในสภาพที่เป็นเฮเทอโรไซกัสสูง ซึ่งถ้าลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่นั้นถูกควบคุมด้วยยีนด้อย โอกาสในการแสดงออกของยีนนั้นก็ยากเนื่องจากยีนด้อยนี้จะแสดงออกได้ก็ต่อเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นโฮโมไซกัส และเครื่องหมาย AFLP จะให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงลักษณะแบบ dominant ซึ่งทำให้วิเคราะห์ผลได้ยากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้แถบดีเอ็นเอซึ่งแสดงลักษณะแบบ codominant จึงเป็นเรื่องยากที่จะตรวจพบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกที่ต้านทานกับกลุ่มลูกที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ได้ ดังนั้นการจะพบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณควรจะเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาและไพรเมอร์นั้นควรจะเหมาะสมกับชนิดของพืชด้วย และลักษณะดังกล่าวนี้เป็นลักษณะทางปริมาณถูกควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง ดังนั้นเพื่อให้ได้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีน จึงควรทำแผนที่ยีนเพื่อให้ได้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวนมากและครอบคลุมทุกตำแหน่งบนโครโมโซม ดังเช่นงานวิจัยของ Lin *et al.* (1996) ได้เปรียบเทียบการทำแผนที่ดีเอ็นเอของถั่วเหลือง โดยใช้เทคนิค RAPD, RFLP และ AFLP พบว่าเทคนิค AFLP เป็นเทคนิคที่เหมาะสมมากที่สุดในการทำแผนที่ดีเอ็นเอ เนื่องจากเทคนิคนี้ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างสูงกว่าเทคนิคอื่น และยังพบว่าเมื่อใช้ร่วมกับวิธีการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมนั้น สามารถได้เครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวนมาก Vantoai *et al.* (2001) ได้หาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะทนน้ำท่วมในถั่วเหลืองโดยศึกษาในประชากรรวมของสายพันธุ์ RIL ร่วมกับการใช้เทคนิค SSR พบว่ามี 1 เครื่องหมาย คือ Sat_064 ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะทนน้ำท่วม Guo *et al.* (2005) ใช้เทคนิค SSR ในการหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ต้านทานต่อ cyst nematode ในถั่วเหลืองพันธุ์ PI40404198 A พบว่าเครื่องหมาย Satt 453 วางตัวอยู่ใกล้กับยีนที่ต้านทานต่อ cyst nematode Race 2 และ Race 5

จากการวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ในประชากรลูกชั่วที่ 2 ของกลุ่มผสม ชม 60/ GC10981 โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือพันธุ์พ่อ พันธุ์แม่ กลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่ต้านทานและกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 44 คู่ จากทั้งหมด 64 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจนทำให้มองเห็นเป็นแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและแม่ และมีไพรเมอร์ จำนวน 5 คู่ ที่ให้แถบดีเอ็นเอซึ่งแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกที่ต้านทานและกลุ่มลูกที่อ่อนแอหรืออาจกล่าวได้ว่า

เอกลักษณะอันดีการพึงชมมีสิ่งพึงปรารถนาอันมีอยู่ให้เห็นเพียงประจักษ์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ว่าไพรเมอร์ทั้ง 5 คู่นี้มีแนวโน้มวางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ การวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมรวมกับการใช้เครื่องหมาย AFLP สามารถตรวจหาเครื่องหมาย AFLP จำนวนมากที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่เราสนใจได้อย่างรวดเร็ว (Lin *et al.*, 1996) อย่างไรก็ตามความสำเร็จในการค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ชิดกับยีน โดยการรวมกลุ่มลูกที่มีลักษณะแตกต่างกันเข้าด้วยกันนั้นขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะภายนอก (phenotype) และพันธุกรรม (genotype) ว่ามีความใกล้ชิดกันมากน้อยเพียงใด นอกจากนี้การที่จะตรวจพบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูก 2 กลุ่มที่แตกต่างกันได้นั้นยังขึ้นอยู่กับจำนวนลูกในกลุ่ม (bulk progenies) ด้วย ถ้าจำนวนลูกในกลุ่มมากเกินไปจะมีโอกาสน้อยในการตรวจพบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้ หรืออาจตรวจพบได้เฉพาะในกรณีที่ลักษณะนั้น ๆ ถูกควบคุมด้วยยีนหรือกลุ่มยีน (QTL) หลักๆ เท่านั้น หากจำนวนลูกในกลุ่มน้อยเกินไปจะตรวจพบเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวนมากที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูก 2 กลุ่มที่แตกต่างกันได้ แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอบางอันอาจไม่เกี่ยวข้องกับยีนที่เราสนใจก็ได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ตรวจสอบเครื่องหมาย AFLP ที่แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและแม่ได้ค่อนข้างน้อย 5.6% และแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกที่ต้านทานและอ่อนแอได้น้อยมาก 0.2% การตรวจพบเครื่องหมาย AFLP จำนวนน้อยที่แยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้นั้น อาจมีสาเหตุมาจากพันธุ์พ่อและแม่ที่ใช้ในการผสมพันธุ์เพื่อสร้างคู่ผสมนั้นมีความแตกต่างกันมากนั้น และเหตุผลนี้อาจใช้อธิบายถึงสาเหตุที่ไม่สามารถตรวจพบเครื่องหมาย RAPD ที่แยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกที่ต้านทานและอ่อนแอได้เช่นเดียวกัน

การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจง

ในการศึกษานี้ได้ตรวจพบไพรเมอร์ของเครื่องหมาย AFLP จำนวน 5 คู่ที่ให้แถบดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกที่ต้านทานและอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์จากคู่ผสม ชม 60/GC10981 จึงได้หาลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอทั้ง 5 แถบที่ให้ความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกที่ต้านทานและอ่อนแอ แล้วเปรียบเทียบลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอกับลำดับเบสของยีนในถั่วเหลืองจากฐานข้อมูล DDBJ พบว่า ดีเอ็นเอของยีนในถั่วเหลืองจำนวน 5 accession มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ 2 คู่ คือ Eaag/Mcac-233 และ Eact/Mctt-180 และได้ลงทะเบียนลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอทั้ง 5 แถบที่ให้ความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกที่ต้านทานและอ่อนแอในฐานข้อมูล DDBJ

จากการทราบลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอทั้ง 5 แถบที่ให้ความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกที่ต้านทานและอ่อนแอ จึงได้ออกแบบไพรเมอร์ของเครื่องหมาย SCAR ที่เฉพาะเจาะจงกับลำดับเบสเพื่อเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอทั้ง 5 ในยีนในถั่วเหลือง พบว่าไพรเมอร์ของ

เครื่องหมาย SCAR ที่ออกแบบให้เฉพาะเจาะจงกับลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ 2 คู่ คือ Eaag/Mcac-233 และ Eact/Mcctt-157 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในอีโนมของถั่วเหลือง และไพรเมอร์ทั้งสองของเครื่องหมาย SCAR นี้ สามารถใช้ตรวจสอบการกระจายตัวของ ลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ของลูกชั่วที่ 2 ได้ และแต่ละ ไพรเมอร์มีการถ่ายทอดพันธุกรรมในรูปแบบการกระจายตัวของลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนเด่น (dominance segregation pattern) โดยการมีแถบดีเอ็นเอข่มการไม่มีแถบดีเอ็นเอในอัตราส่วน 3:1

จากการวิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ (banding pattern) ที่ได้จากเครื่องหมาย SCAR ทั้งสองแบบในลูกชั่วที่ 2 จำนวน 139 ต้น พบว่า ลูกชั่วที่ 2 มีการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอในรูปแบบที่คล้ายคลึงกับการกระจายตัวของลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีน 2 คู่ โดยลูกชั่วที่ 2 จำนวน 91 ต้น ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ จากเครื่องหมาย SCAR ทั้งสอง (AABB, AABb, AaBB หรือ AaBa) 28 ต้น ให้แถบดีเอ็นเอ 1 แถบ จากเครื่องหมาย SCAR แบบใดแบบหนึ่ง (AAbb, Aabb, aaBB หรือ aaBb) และ 20 ต้น ไม่ให้แถบดีเอ็นเอจากเครื่องหมายทั้งสอง (aabb) นอกจากนี้ ลูกชั่วที่ 2 ที่มีพันธุกรรมเป็น aabb มีเปอร์เซ็นต์ความงอกและความแข็งแรงเมล็ดสูง กว่าหรือมีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์สูงกว่าลูกชั่วที่ 2 ที่มีพันธุกรรมเป็น แบบเฮตเอโรไซกัส และโฮโมไซกัส

จากการตรวจสอบการกระจายตัวของเครื่องหมาย SCAR ในกลุ่มลูกชั่วที่ 2 ที่ ต้านทานและอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ พบว่าเครื่องหมายทั้งสองมีการกระจาย ตัวสอดคล้องกับลักษณะความต้านทานและอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของลูกชั่วที่ 2 (co-segregation) หรืออาจกล่าวได้ว่าเครื่องหมาย SCAR ทั้งสองวางตัวอยู่ชิดกับยีนควบคุมลักษณะ ความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ และสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มลูกที่ ต้านทานและอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ได้ ผลที่ได้จากการทดลองนี้แสดงให้เห็น ว่าการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวมเป็นวิธีการที่รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพในการ ตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมลักษณะที่สลับซับซ้อน น่าสนใจหรือไม่ ทราบข้อมูลทางพันธุกรรมก่อน เช่น ลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ ในสภาพไร่ (จากการศึกษาครั้งนี้) และลักษณะอื่นๆ อีกหลายลักษณะที่มีการศึกษาไว้แล้วก่อน หน้านี้ (Chowdhury *et al.*, 2000 ; Demirbas *et al.*, 2001 ; Alec *et al.*, 2002 ; Zheng *et al.*, 2003 ; Cervigni *et al.*, 2004) เครื่องหมาย SCAR ทั้งสองตัวที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนควบคุมลักษณะ ความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ ซึ่งได้จากการทดลองนี้สามารถ นำไปใช้ในการคัดเลือกต้นในประชากรลูกผสมกลับ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองให้ต้านทาน ต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ต่อไป

สรุป

จากการค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในสภาพไร่ โดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของลักษณะแบบรวม พบว่า เครื่องหมาย AFLP 2 ตัว คือ Eaag/Mcac-233 และ Eact/Mcctt-157 วางตัวอยู่ชิดกับกลุ่มยีน (QTL) ที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ โดยกลุ่มยีนนี้อยู่ห่างจากเครื่องหมาย Eaag/Mcac-233 ประมาณ 14 cM และเครื่องหมาย AFLP ทั้งสองอยู่ในกลุ่ม linkage เดียวกัน โดยอยู่ห่างกัน 25.8 cM เครื่องหมาย AFLP ที่ได้นี้สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกต้นลูกที่ได้จากการผสมกลับเพื่อการปรับปรุงถั่วเหลืองพันธุ์ ชม 60 ให้ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ต่อไป



เอกสารอ้างอิง

- กองขยายพันธุ์พืช. 2540. รายงานประจำปี 2540. กองขยายพันธุ์พืช กรมส่งเสริมการเกษตร กรุงเทพฯ . 81 น.
- รัฐ เกวานันท์. 2546. ความแตกต่างของพันธุ์ถั่วเหลืองในด้านคุณภาพและคุณสมบัติทางกายภาพของเมล็ดพันธุ์ต่อความต้านทานของการเสื่อมคุณภาพในแปลง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.
- วารุณี โสมนัส. 2544. การหาเครื่องหมาย AFLP ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว โดยการวิเคราะห์แบบ bulk segregant. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วิสุทธิ ใบไม้. 2536. พันธุศาสตร์. เจ้าพระยาระบบการพิมพ์, กรุงเทพฯ, 564 น.
- วันชัย จันทร์ประเสริฐ, สุชาติ อ่อนคำ, รังสฤษฎี กาวิตะ และสุรพล อุปติสสกุล. 2539. การเสื่อมคุณภาพในแปลงและลักษณะทางกายภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง 10 พันธุ์. น. 296-302. ใน รายงานการประชุมวิชาการถั่วเหลืองแห่งชาติครั้งที่ 6. วันที่ 3-6 กันยายน 2539. ณ โรงแรมดิเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่.
- ศูนย์สารสนเทศการเกษตร. 2549. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2548. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 121 น.
- สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง และอภิชาติ วรรณวิจิตร. 2538. DNA fingerprinting และการประยุกต์ใช้, น. 10-14. ใน เอกสารประกอบการสัมมนาทางวิชาการเรื่อง พันธุกรรมพืชและการพัฒนาพันธุ์พืช. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอฟดี และเอเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อภิชาติ วรรณวิจิตร, สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง, วันชัย กมลสุขเย็นง, ชีรพล ต. วัฒนบุตร, ฉลอง เกิดศรี, ประพันธ์ศักดิ์ ครุฑโท, Tan Xuilin, ปัทมา ศิริชัยญา และมีชัย เชี่ยวหลิว. 2537. ความก้าวหน้าในการใช้ Molecular marker ในการปรับปรุงพันธุ์พืช, น.428-430 ใน เอกสารประกอบการบรรยายการสัมมนาทางวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืชครั้งที่ 4 เรื่อง พันธุ์พืชใหม่และความปลอดภัยทางชีวภาพ. โรงแรมมารวยกาเด็นส์, กรุงเทพฯ.
- อุไรวรรณ หมุนเวียน. 2547. การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุล AFLP ที่ใช้บ่งชี้ลักษณะตอบสนองต่อช่วงแสงของถั่วเขียวนางแดง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Alec, J.H., G.Ma, G.R. Buss and M.A.S. Maroof. 2002. Molecular marker mapping of *RAV4*, a gene conferring resistance to all known strains of soybean mosaic virus. *Crop Sci.* 40 : 1434-1437.
- Andrews, C.H. 1981. Preharvest environment : weathering, pp. 19-25. *In* J.B.Sinclair and J.A. Jakobs (eds.). Soybean Seed Quality and Stand Establishment. Proceedings of Conference for Scientists of Asia. INTSOY Series No. 22. University of Illinois, Urbana-Champaign.
- AOSA. 1983. Seed Vigor Testing Handbook. Contribution no. 32. The Assoc. off. Seed Anal. 88 p.
- Bhatia, V.S., S.P. Tiwari, O.P. Joshi and A.N. Sharma. 1993. Effect of field weathering on soybean cv. Punjab 1 and JS 71-05. *J. Seed Res.* 21 : 92-93.
- Brown-Guedira, G.L., J.A. Thomson, R.L.Nelson and M.L. Warburton. 2002. Evaluation of genetic diversity of soybean introduction and North American ancestors using RAPD and SSR markers. *Crop Sci.* 40:815-823.
- Colero, E., S.H. West and K. Hinson. 1981. Water absorption of soybean seeds and associated causal factors. *Crop Sci.* 21 : 926-933.
- Cervigni, G.D.L., I. Schuster, E.G. Barros and M.A. Moreira. 2004. Two microsatellite markers flanking a dominant gene for resistance to soybean cyst nematode race 3. *Euphytica* 135 : 99-105.
- Chamma, H.M. et al. 1990. Maturation of seeds of "Aroana" beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and its influence on the storage potential. *Seed Sci. & Tech.* 18 : 371-382.
- Chowdhury, A.K., P. Srinives, P. Tongpamnak and P. Saksoong. 2000. Identification of cultivars of vegetable soybean [*Glycine max*. (L.) Merr.] by RAPD markers. *SABRAO J. Breed. & Genet.* 32 :63-72.
- Chowdhury, A.K., P. Srinives, P. Tongpamnak and P. Saksoong. 2002. Characterization and variation in RAPD marker profile of exotic soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] cultivars. *J. ISSAAS* 7 : 37-52.
- Dassou, S. and E.A. Kueneman. 1984. Screening methodology for resistance to field weathering of soybean seed. *Crop Sci.* 24 : 774-779.
- Daviewala, A.P., A.P.K. Reddy, M.D. Lagu, P.K. Ranjekar and V.S. Gupta. 2001. Marker assisted selection of bacterial blight resistance genes in rice. *Bio. Genet.* 3- : 261-278.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Delouche, J.C. 1980. Environmental effects on seed development and seed quality. Hort Science. 15 : 775-780.
- Demirbas, A., B.G. Rector, D.C. Lohnes, R.J. Fioritto, G.L. Graef, P.B. Cregan, R.C. Shoemaker and J.E. Specht. 2001. Simple sequence repeat marker linked to the soybean *Rps* genes for phytophthora resistance. Crop Sci. 41 : 1220-1227.
- Dornbos, Jr., D.L. 1995. Production environment and seed quality, pp. 119-152. In A.S. Bosra (ed.). Seed Quality : Basic Mechanisms and Agricultural Implications. Food Products Press, an imprint of the Haworth Press, Inc., New York.
- FAO. 2007. The FAOSTAT production STAT module on crops contains detailed agricultural production data. Available source : <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>. January 11,2007.
- Ferguson, J.M., D.M. Tekrony and D.B. Egli. 1990a. Changes during early soybean seed and axes deterioration : I. Seed quality and mitochondrial respiration. Crop Sci. 30 : 175-179.
- Ferguson, J.M., D.M. Tekrony and D.B. Egli. 1990b. Changes during early soybean seed and axes deterioration : II. Lipids. Crop Sci. 30 : 179-182.
- Gower, J.C. 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. Biometrika 53 : 325-338.
- Giovanni, C.D., P.D. Orco, A. Bruno, F. Ciccarese, C. Lotti and L. Ricciardi. 2004. Identification of PCR-based markers (RAPD, AFLP) linked to a novel powdery mildew resistance gene (*ol-2*) in tomato. Plant Sci. 166 : 41-48.
- Giovannoni, J.J., R.A. Wing, M.W. Ganai and S.D. Tanksley. 1991. Isolation of molecular markers from specific chromosomal interval using DNA pools from existing mapping populations. Nucleic Acid Res. 19 : 6553-6558.
- Griffin, J.D. and R.G. Palmer. 1995. Variation of thirteen isozyme loci in the USDA soybean germplasm collections. Crop Sci. 35 : 897-904.
- Guo, B., D. A. Sleper, P.R. Arelli, J.G. Shannon and H.T. Nguyen. 2005. Identification of QTL associated with resistance to soybean cyst nematode race 2, 3 and 5 in soybean PI 90763. Theor. Appl. Genet. 111 : 965-971.
- Hansen, M., C. Halleen, N.O. Nilsson and T. Sall. 1997. Marker-assisted selection of restored male-fertile *Brassica napus* plants using a set of dominant RAPD markers. Mol. Breed. 3 : 449-456.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น. อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Hinson, K. and E.E. Hartwig. 1982. Soybean Production in the Tropics. FAO., Rome, Italy. 222 p.
- Horlings, G.P., E.E. Gamble and S. Shanmugasundaram. 1994. Weathering of soya bean [*Glycine max* (L.) Merr.] in the tropics, as affected by seed characteristics and reproductive development. Trop. Agric. (Trinidad) 71 : 110-115.
- Howell, R.W., F.I. Collins and V.E. Sedgwick. 1959. Respiration of soybean seed as related to weathering losses during ripening. Agron. J. 51 : 677-679.
- ISTA. 1985. International rules for seed testing. Seed Sci. and Tech. 13 : 299-355.
- Keim, P., W. Beavis, J.Schupp and R. Freestone. 1992. Evaluation of soybean RFLP marker diversity in adapted germplasm. Theor. Appl. Genet. 85 : 205-212.
- Krul, W.R. 1978. Diffusible inhibitor (s) of imbibition from senescent soybean pods. ort. Sci. 13 : 41-42.
- Kuo, W.H. J. 1989. Delayed-permeability of soybean seeds : characteristics and screening methodology. Seed Sci. and Tech. 17 : 131-142.
- Lanceras, J.C. 2002. Fine Mapping of Genes Controlling Intermediate Amylose Content in Rice using Bulk Segregant Analysis. M.S. Thesis. Kasetsart University, Bangkok.
- Li, Q. and R.L. Nelson. 2002. RAPD marker diversity among cultivated and wild soybean accession from four Chinese provinces. Crop Sci. 42 : 1752-1753.
- Li, Z., L. Jakkula, R.S. Hussey, J.P. Tamulonis and H.R. Boema. 2001. SSR mapping and confirmation of the QTL from PI 96354 conditioning soybean resistance to southern root knot nematode. Theor. Appl. Genet. 103 : 1167-1173.
- Lin, J, J. Kuo, J. Ma, J.A. Saunders, H.S. Beard, M.H. McDonald, W. Kenworthy, G.N. Ude and Matthews. 1996. Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping techniques. Plant Mol. Bio. Rep. 14 : 156-196.
- Lin, J.J., J. Ma, M. Ambrose and J. Kuo. 1997. Chemiluminescent detection of AFLP™ fingerprints. Focus 19 : 36-38.
- Mackay, I.J. and P.D. S. Caligari. 2000. Efficiencies of F2 and backcross generations of bulked segregant analysis using dominant marker. Crop Sci. 40 : 626-630.
- Maughan, P.J., M.A. Saghai-Marooof, G.R. Buss and G.M. Huestis. 1996. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean : Species diversity, inheritance and near-isogenic line analysis. Theor. Appl. Genet. 93 : 392-401.

- Michelmore, R.W., I. Paran and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis : A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 9828-9832.
- Miklas, P.N., J.R. Stavely and J.D. Kelly and J.D. Kelly. 1993. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 85 : 745-749.
- Miklas, P.N., L. Afandor and J.D. Kelly. 1996. Recombination-facilitated RAPD marker assisted selection for disease resistance in common bean. *Crop Sci.* 36 : 86-90.
- Morgante, M. 1994. Application of Molecular Marker in Plant Genetics and Breeding. IPBA. Rogla, Slovenia.
- Murai, H., Z. Hashimoto, P.N. Sharma, T. Shimizu, K. Murata, S. Takumi, N. Mori, S. Kawasaki and C. Nakamura. 2001. Construction of high-resolution linkage map of rice brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) resistance gene *bph 2*. *Theor. Appl. Genet.* 103 : 526-532.
- Na Lampang, A. 1993. Country report 14-Thailand, pp. 128-142. *In* N. Chomchalow and P. Laosuwan, (eds.). Soybean in Asia. Science Publishers, Inc., Lebanon, Newhamshire.
- Nangju, D., H.C. Wien and B. Ndimande. 1980. Improved practices for soybean seed production in the tropics, pp. 427-448. *In* p.D. Hebblethwaite. (ed.). Seed Production. Butterworth, London.
- Ndimande, B.N., H.C. Wien and E.A. Kueneman, 1981. Soybean seed deterioration in the tropics. I. The role of physiological factors and fungal pathogens. *Field Crop Res.* 4 : 112-121.
- Pascal, E.H. and M.A. Ellis, 1978. Variation in seed quality characteristics of tropically grown soybeans. *Crop Sci.* 18 : 837-840.
- Potts, H.C., J. Duangpatra, W.G. Hariston and J.C. Delouch. 1978. Some influence of hardseededness on soybean seed quality. *Crop Sci.* 18 : 221-224.
- Poulsen, D.M.E., R.J. Henry, R.P. Johnston, J.A.G. Irwin and R.G. Rees. 1995. The use of bulk segregant analysis to identify a RAPD marker linked to leaf rust resistance in barley. *Theor. Appl. Genet.* 91 : 270-273.
- Powell, A.A. and S. Matthews. 1978. The damaging effect of water on dry pea embryos during imbibition. *J. Exp. Bot.* 29 : 1215-1229.
- Powell, W., M.Morgante, C.Andre, M. Hanafey, J.Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2 : 225-238.

- Quedraga, J.T., V. Maheshwari, K.D. Baerner, C.A. St. Pierre, F. Belzie and M.P. Timko. 2002. Identification of AFLP markers linked to resistance of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) to parasitism by *Striga gesnerioides*. Available Source : [http:// nal.usda.gov/ttic/tektran/data/00_0013/10/0000131065.html](http://nal.usda.gov/ttic/tektran/data/00_0013/10/0000131065.html), April 19, 2006.
- Ramalingam, J., H.S. Basharat and G. Zhang. 2002. STS and microsatellite marker-assisted selection for bacterial blight resistance and waxy genes in rice, *Oryza sativa* L. *Euphytica* 127 : 255-260.
- Schoettle, A.W. and A.C. Leopold. 1984. Solute leakage from artificial aged soybean seeds after imbibition. *Crop Sci.* 24 : 835-838.
- Schuster, I., R.V. Abdelnoor, S.R.R. Marin, V.P. Carvalho, R.A.S. Kihl, J.F. V. Silva, C.S. Sedyama, E.G. Barros and M.A. Moreira. 2001. Identification of a new major QTL associated with resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). *Theor. Appl. Genet.* 102 : 91-96.
- Singh, S., J.S. Sidhu, N. Huang, Y. Vikal, Z. Li, D.S. Brar, H.S. Dhaliwal and G.S. Khush. 2001. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa 5*, *xa 13* and *Xa 21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR 106. *Theor. Appl. Genet.* 102 : 1011-1015.
- Smith, M.J. and P. Berjak, 1995. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds, pp. 701-746. *In* J. Kigel G. Galili (eds.). *Seed Development and Germination*. Mercel Dekker, Inc., New York.
- Tekrony, D.M., D.B. Eglı and A.D. Phillips. 1980. Effect of weathering on viability and vigor of soybean seed. *Agron. J.* 72 : 749-753.
- Thomson, J.A. and R.L.Nelson. 1998. Core set of primers to evaluate genetic diversity in soybean. *Crop Sci.* 38 : 1356-1362.
- Thomson, J.A., R.L. Nelson and L.O. Vodkin. 1998. Identification of diverse soybean germplasm using RAPD markers. *Crop Sci.* 38 : 1348 – 1355.
- Tragoonrung, S., J.Q. Sheng and A. Vanavichit. 1996. Tagging an aromatic gene in lowland rice using bulk segregant analysis, pp. 613-618. *In* G.S. Khush, (ed.). *Rice Genetics III. Proceeding of the Third International Rice Genetics Symposium, IRRI. Manila.*
- Vantoai, T.T., S.K.S. Martin, K. Chase, G.Boru, V. Schnipke, A.F. Schmitthenner and K.G. Lark. 2001. Identification of a QTL associated with tolerance of soybean to soil water logging. *Crop Sci.* 41 : 1247-1252.

- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. V. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Pleleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP : A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23 : 4407-4414.
- Walker, D., H.R. Boerma, J.All and W. Parrott. 2002. Combining *Cry I AC* with QTL alleles from PI 229358 to improve soybean resistance to lepidopteran pests. *Mol. Breed.* 9 : 43-51.
- Wan, G.L. and A.H. Paterson. 1994. Assessment of DNA pooling strategies for mapping of QTL. *Theor. Appl. Genet.* 85 : 355-361.
- Webb, D.M. and S.J. Knapp. 1990. DNA extraction from a previously recalcitrant plant genus. *Mol. Biol. Rep.* 8 : 180-185.
- Williams, J.K. F., A.R. Kubelik, D.G. Livak, J.A. Rafalki, S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.
- Woodstock, L.W., K. Furman and H.R. Leffler. 1985. Relationship between weathering deterioration and germination, respiratory metabolism, and mineral leaching from cottonseeds. *Crop Sci.* 25 : 459-466.
- Yaklich, R.W., E.L. Vigil and W.P. Wergin. 1986. Pore development and seed coat permeability in soybean. *Crop Sci.* 26 : 616-624.
- Zheng, C., R.Chang, L.Qiu, P.Chen, X.Wu and S.Chen. 2003. Identification and characterization of a RAPD/SCAR marker linked to a resistance gene for soybean mosaic virus in soybean. *Euphytica* 132 : 199-210.