สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ เยื่อหุ้มเซลล์และความมีชีวิต ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในระหว่างการเสื่อมคุณภาพ

CHANGES OF DNA, CELL MEMBRANE AND VIABILITY OF SOYBEAN [*Glycine max* (L.) Merr.] SEEDS DURING DETERIORATION

T051504

อภสิรี มีกลาง

APASIREE MEEKLANG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพืชไร่
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2547

ISBN 974-9708-05-9

วพ.
ด 2461
2547

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 51504
วัน,เดือน,ปี 22 ก.ค. 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

b. 1140566
i.....

CHANGES OF DNA, CELL MEMBRANE AND VIABILITY OF SOYBEAN [*Glycine max* (L.) Merr.] SEEDS DURING DETERIORATION

APASIREE MEEKLANG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN AGRONOMY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2004

ISBN 974-9708-05-9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2004
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ เยื่อหุ้มเซลล์และความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในระหว่างการเสื่อมคุณภาพ
นักศึกษา	นางสาวอภสิรี มีกลาง
รหัสประจำตัว	43066112
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	พืชไร่
พ.ศ.	2547
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.อารมย์ ศรีพิจิตต์

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์สำคัญเพื่อศึกษาถึงผลของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ที่เกิดจากการเร่งอายุและการเก็บรักษาตามธรรมชาติต่อการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ เยื่อหุ้มเซลล์ ความงอกและความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง 2 พันธุ์ [*Glycine max* (L.) Merr. พันธุ์ ชม.60 และพันธุ์ GC10848] เก็บเกี่ยวเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ที่ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา นำมาลดความชื้นด้วยแสงอาทิตย์จนกระทั่งเมล็ดมีความชื้นลดลงเหลือประมาณ 15% จึงนวดเมล็ดด้วยมือและลดความชื้นต่อไปจนกระทั่งเมล็ดพันธุ์มีความชื้นเหลือประมาณ 12% แบ่งเมล็ดพันธุ์ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปเก็บรักษาตามธรรมชาติเป็นเวลา 30-180 วัน อีกส่วนนำไปเร่งอายุเป็นเวลา 1-7 วัน ตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ภายหลังการเก็บรักษาและการเร่งอายุในด้านความงอก ความมีชีวิต การรั่วไหล การดูดน้ำ และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองและการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD ผลการทดลองพบว่า เมล็ดพันธุ์ GC10848 มีแนวโน้มที่จะมีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในระหว่างการเก็บรักษาตามธรรมชาติและโดยการเร่งอายุดีกว่าเมล็ดพันธุ์ ชม.60 ซึ่งแสดงออกโดยมีการเปลี่ยนแปลงที่ช้ากว่า ทั้งในความงอก ความมีชีวิต การรั่วไหลและการดูดน้ำ เนื่องจากเมล็ดพันธุ์แสดงการรั่วไหลและการดูดน้ำเพิ่มขึ้นในระหว่างการแช่น้ำ ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในความงอกของเมล็ดพันธุ์ในระยะแรกของการเก็บรักษา การเสื่อมของเยื่อหุ้มเซลล์จึงอาจเป็นสาเหตุเบื้องต้นของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ การสลายตัวของดีเอ็นเอที่สกัดจากเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดระหว่างการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ตามธรรมชาติและการเร่งอายุ อย่างไรก็ตามลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD ให้ผลไม่แตกต่างและความเข้มของแถบดีเอ็นเอคงที่ตลอดระยะการเก็บรักษาและการเร่งอายุ ผลการทดลองนำไปสู่ข้อเสนอที่ว่าเทคนิค RAPD ไม่สามารถใช้ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอในระยะเริ่มต้นของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ได้ เทคนิคที่เรียกว่า competitive PCR ซึ่งใช้ competitor ในการระบุปริมาณเริ่มต้นของดีเอ็นเอในตัวอย่างน่าจะเป็นอีกเทคนิคหนึ่งสำหรับการตรวจสอบการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Changes of DNA, Cell Membrane and Viability of Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Seeds During Deterioration
Student	Miss Apasiree Meeklang
Student ID	43066112
Degree	Master of Science
Programme	Agronomy
Year	2004
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Arom Sripichitt

Abstract

The major objective of this research was to study the effect of seed deterioration caused by accelerated aging and natural storage on changes in DNA, cell membrane, germination and viability of soybean seeds of two varieties [*Glycine max* (L.) Merr. Vars. CM60 and GC10848]. The seeds of two cultivars were harvested at physiological maturity and dried under sunlight until the seed moisture decreased to about 15%. The seeds were then threshed by hands and further dried until seed moisture of about 12% was obtained. The dried seeds of each variety were separated into two parts. The first part was kept at room temperature (natural storage) for 30-180 days and the other part was aged by accelerated aging for 1-7 days. Following natural storage and accelerated aging, the seeds were tested for quality in terms of germination, viability, leakage, water absorption, DNA quality and DNA analysis using RAPD technique. The results revealed that seeds of GC10848 had a tendency of better resistant to deterioration caused by both natural storage and accelerated aging than seeds of CM60 by expressing slower changes in germination, viability, leakage and water absorption. Due to an increase in seed leakage and water absorption during seed soaking while no change in germination at the early storage period, membrane deterioration might be the primary cause of seed deterioration. Seed DNA degradation was increased significantly during storage and aging. DNA fingerprints obtained from RAPD technique were not different and the intensity of each DNA band stayed constant during storage and aging of both cultivars studied. The result suggested that RAPD could not be used to detect DNA changes during early stage of seed deterioration. The technique called competitive PCR that uses competitor to quantitate the

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

initial amount of DNA in the samples could be used as another alternative technique for seed deterioration detection in the future.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.อารมย์ ศรีพิจิตต์ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการจัดหาอุปกรณ์ต่างๆที่จำเป็นสำหรับงานวิจัย ให้คำปรึกษา ชี้แนะ ช่วยแก้ปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้น รวมทั้งให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า ตลอดจนการตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.วิภา หงษ์ตระกูล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อชี้แนะสำหรับผลการทดลองตลอดจนการสรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง โดยเฉพาะในส่วนของเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ทรงยศ ตันพิพัฒน์ และ รศ.ดร.ปัญญา โพธิฐิติรัตน์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และให้คำปรึกษาที่ดีมาตลอดระยะเวลาการศึกษา จนในที่สุดทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบคุณ คุณศุภลักษณ์ ปานรัศมี คุณบุญสม พรหมสุวรรณ์ และคุณวิไลพร น้อยบุรี สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำที่ดีที่มีให้ตลอดระยะเวลาที่ทำงานวิจัยนี้ และขอขอบคุณเพื่อน พี่ และ น้องๆ ทุกคนที่มีส่วนร่วมทำให้งานวิจัยครั้งนี้ประสบผลสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้กับบิดามารดาซึ่งเป็นที่รักและเคารพสูงสุดของข้าพเจ้า ตลอดจนครู อาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้และมอบประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา

อภสิรี มีกลาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... II

กิตติกรรมประกาศ..... IV

สารบัญ..... V

สารบัญตาราง.....VII

สารบัญภาพ..... IX

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา..... 3

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

2.1 คุณภาพของเมล็ดพันธุ์..... 4

2.2 การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์..... 5

2.3 สาเหตุของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์..... 7

2.4 การตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์..... 12

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 16

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง..... 16

3.2 การผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง..... 19

3.3 สถานที่ดำเนินงาน..... 19

3.4 ระยะเวลาการดำเนินงาน..... 19

3.5 วิธีการดำเนินงาน..... 19

3.6 วิธีการทดลอง..... 20

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ..... 23

3.8 การบันทึกข้อมูล..... 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 25

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 49

บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง..... 53

บรรณานุกรม..... 54

ภาคผนวก..... 62

ประวัติผู้เขียน..... 69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ผลของการเก็บรักษาต่อความงอกและความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พันธุ์ ชม.60 และ พันธุ์ GC 10848	26
4.2	ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อลักษณะการติดสี TZ ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พันธุ์ ชม.60 และพันธุ์ GC10848	28
4.3	ผลของการเก็บรักษาต่อค่าการนำไฟฟ้าและค่าการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พันธุ์ ชม.60และพันธุ์ GC 10848	31
4.4	ผลของการเร่งอายุต่อความงอกและความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 และพันธุ์ GC 10848	35
4.5	ผลของระยะเวลาการเร่งอายุต่อลักษณะการติดสี TZ ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 และพันธุ์ GC10848	36
4.6	ผลของการเร่งอายุต่อค่าการนำไฟฟ้าและค่าการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 และพันธุ์ GC 10848	39
4.7	จำนวนแถบดีเอ็นเอและขนาดประมาณของแต่ละแถบของดีเอ็นเอจากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 8 ชนิด กับถั่วเหลืองที่เก็บรักษาโดยวิธีธรรมชาติและเร่งอายุ	44
ผ.1	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนความงอกของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เก็บรักษาด้วยวิธีธรรมชาติ	63
ผ.2	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เก็บรักษาด้วยวิธีธรรมชาติ	63
ผ.3	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าการนำไฟฟ้าของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เก็บรักษาด้วยวิธีธรรมชาติ	63
ผ.4	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เก็บรักษาด้วยวิธีธรรมชาติ	64
ผ.5	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนความงอกของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 ที่เก็บรักษาด้วยวิธีธรรมชาติ	64
ผ.6	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 ที่เก็บรักษาด้วยวิธีธรรมชาติ	64
ผ.7	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าการนำไฟฟ้าของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 ที่เก็บรักษาด้วยวิธีธรรมชาติ	65

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ผ.8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 ที่เก็บรักษาด้วยวิธีธรรมชาติ..... 65

ผ.9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนความงอกของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เร่งอายุ..... 66

ผ.10 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เร่งอายุ..... 66

ผ.11 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าการนำไฟฟ้าของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 เร่งอายุ..... 66

ผ.12 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เร่งอายุ..... 67

ผ.13 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนความงอกของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 ที่เร่งอายุ..... 67

ผ.14 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 ที่เร่งอายุ..... 67

ผ.15 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าการนำไฟฟ้าของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 ที่เร่งอายุ..... 68

ผ.16 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 ที่เร่งอายุ..... 68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

4.1 ลักษณะการติดสี (TZ1-TZ8) ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 และพันธุ์ GC10848 ที่เก็บรักษาโดยวิธีธรรมชาติและการเร่งอายุที่ระยะเวลาต่างๆ..... 27

4.2 ผลของการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์เป็นเวลา 0 (◇) ; 30 (◆) ; 60 (△) ; 90 (▲) ; 120 (○) 150 (●) และ 180 (□) วัน ต่อค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกมาจากเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พันธุ์ ชม.60 (a) และพันธุ์ GC10848 (b) ซึ่งแช่น้ำในระยะเวลาต่างๆกัน..... 32

4.3 ผลของการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์เป็นเวลา 0 (◇) ; 30 (◆) ; 60 (△) ; 90 (▲) ; 120 (○) 150 (●) และ 180 (□) วัน ต่อค่าการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พันธุ์ ชม.60 (a) และพันธุ์ GC10848 (b) ซึ่งแช่น้ำในระยะเวลาต่างๆกัน..... 33

4.4 ผลของการเร่งอายุเมล็ดพันธุ์เป็นเวลา 0 (◇) ; 1 (◆) ; 2 (△) ; 3 (▲) ; 4 (○) ; 5 (●) ; 6 (□) และ 7 (■) วัน ต่อค่าการรั่วไหลของสารออกจากเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พันธุ์ ชม.60 (a) และพันธุ์ GC10848 (b) ซึ่งแช่น้ำในระยะเวลาต่างๆกัน..... 40

4.5 ผลของการเร่งอายุเมล็ดพันธุ์เป็นเวลา 0 (◇) ; 1 (◆) ; 2 (△) ; 3 (▲) ; 4 (○) ; 5 (●) ; 6 (□) และ 7 (■) วัน ต่อค่าการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พันธุ์ ชม.60 (a) และ พันธุ์ GC10848 (b) ซึ่งแช่น้ำในระยะเวลาต่างๆกัน..... 41

4.6 ดีเอ็นเอ (1 μl จากปริมาณทั้งหมด 50 μl) ที่สกัดจากเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 (a) และพันธุ์ GC10848 (b) จากการเก็บรักษาตามธรรมชาติและเร่งอายุเมล็ดพันธุ์จำนวน 5 เมล็ดที่ระยะเวลาต่างๆกัน..... 43

4.7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ D2 (a) ไพรเมอร์ D12 (b) ไพรเมอร์ E1 (c) และไพรเมอร์ E2 (d) ในถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 จากการเก็บรักษาโดยวิธีธรรมชาติและการเร่งอายุที่ระยะเวลาต่างๆกัน..... 45

4.8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ E5 (a) ไพรเมอร์ E8 (b) ไพรเมอร์ E19 (c) และไพรเมอร์ Makok9 (d) ในถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 จากการเก็บรักษาโดยวิธีธรรมชาติและการเร่งอายุที่ระยะเวลาต่างๆกัน..... 46

4.9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ D2 (a) ไพรเมอร์ D12 (b) ไพรเมอร์ E1 (c)และไพรเมอร์ E2 (d) ในถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 จากการเก็บรักษาโดยวิธีธรรมชาติและการเร่งอายุที่ระยะเวลาต่างๆกัน..... 47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.10 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ E5 (a) ไพรเมอร์ E8 (b) ไพรเมอร์ E19 (c) และไพรเมอร์ Makok9 (d)ในถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 จากการเก็บรักษาโดยวิธีธรรมชาติและการเร่งอายุที่ระยะเวลาต่างๆกัน..... 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

คุณภาพของเมล็ดพันธุ์เป็นปัจจัยพื้นฐานสำคัญที่จะทำให้ประสบความสำเร็จในการผลิตพืช เมล็ดพันธุ์ที่มีความงอกและความแข็งแรงสูงจะทำให้ต้นกล้างอกได้เร็ว มีการตั้งตัวดีและได้รับผลผลิตสูง ดังนั้นการใช้เมล็ดพันธุ์ไม่มีคุณภาพหรือเสื่อมคุณภาพปลูกก็จะทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจไม่ว่าจะเป็นการจัดซื้อเมล็ดพันธุ์ใหม่และค่าจ้างแรงงานในการปลูก เฉพาะในประเทศสหรัฐอเมริกาเพียงประเทศเดียวมีการประเมินการสูญเสียซึ่งเกิดจากการซื้อเมล็ดพันธุ์เพื่อทดแทนเมล็ดพันธุ์ที่เสื่อมคุณภาพมีมูลค่าสูงถึง 500 ล้านเหรียญในแต่ละปี (McDonald. 1999) ตัวเลขการประเมินนี้จะมีค่าสูงกว่านี้มากถ้าคิดกันในระดับโลก ดังนั้นการมีความรู้ความเข้าใจในพื้นฐานของกระบวนการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์จึงเป็นสิ่งสำคัญที่อาจจะนำไปสู่การป้องกัน แก้ไข หรือชลอการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์เกิดขึ้นสูงสุดเมื่อเมล็ดมีการสุกแก่ทางสรีรวิทยา (physiological maturity) (Tekrony *et al.* 1980) หลังจากระยะนี้ไปแล้วการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ก็จะเริ่มต้นขึ้น ซึ่งอัตราการเสื่อมคุณภาพขึ้นอยู่กับสภาพของสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการศึกษาการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์จึงควรกระทำในทันทีที่เมล็ดสุกแก่ทางสรีรวิทยาเพราะเป็นระยะที่เมล็ดพันธุ์ยังไม่มีการเสื่อมคุณภาพหรือมีการเสื่อมคุณภาพเกิดขึ้นน้อยที่สุด การเปลี่ยนแปลงในทางชีวเคมีบางประการที่เกิดขึ้นก่อนการสูญเสียความงอกและความแข็งแรงอาจเป็นสาเหตุเบื้องต้นของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

เมล็ดที่เสื่อมคุณภาพหรือสูญเสียความแข็งแรงจะงอกเป็นต้นกล้าช้า อ่อนแอต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจนในที่สุดก็จะสูญเสียความมีชีวิต (Ching. 1972 ; McDonald. 1975) การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์จึงเป็นปัญหาสำคัญของการเกษตรที่นักวิจัยควรให้ความสนใจกันมากยิ่งขึ้น ในปัจจุบันกลไกหรือสาเหตุแท้จริงที่ทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพยังไม่เป็นที่เข้าใจกันดี อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์หลายท่านเชื่อกันว่า การเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) น่าจะเป็นสาเหตุที่สำคัญเพราะเกิดขึ้นก่อนที่จะมีการเปลี่ยนแปลงในความงอกและความแข็งแรง (Stewart and Bewley. 1980 ; Ferguson *et al.* 1990) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเสื่อมของดีเอ็นเอ (DNA degradation) ก็อาจเป็นอีกสาเหตุเบื้องต้นที่นำไปสู่การสูญเสียความมีชีวิตและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ (Coolbear. 1995) การเสื่อมของดีเอ็นเอมีผลให้การสังเคราะห์ปริมาณของเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (mRNA) ลดลง อันจะเป็นผลทำให้ปริมาณของเอนไซม์ลดลงจนอยู่ในระดับที่วิกฤตต่อการงอกในระยะเริ่มแรก (McDonald. 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นักวิทยาศาสตร์พบว่าความเสียหายที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอในเมล็ดพันธุ์ที่เสื่อมคุณภาพอาจเป็นสาเหตุแรกที่ทำให้เมล็ดพันธุ์งอกช้าและต้นกล้าที่งอกมีความผิดปกติสูง (Cheah and Osborne. 1978 ; Osborne *et al.* 1980/1981 ; Cruz-Garcia *et al.* 1995) McDonald *et al.* (1994) ได้นำเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) มาใช้ในการตรวจสอบการเสื่อมคุณภาพของดีเอ็นเอ ซึ่งนับได้ว่าเป็นผู้ที่ได้ริเริ่มนำเทคนิคโมเลกุลมาใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอของเมล็ดพันธุ์โดยตรง โดยที่ปกติแล้วเทคนิคนี้จะใช้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชเป็นส่วนใหญ่ Shatters *et al.* (1995) ใช้เทคนิค RAPD ตรวจสอบการเสื่อมของดีเอ็นเอในเมล็ดพันธุ์ที่เก็บรักษาตามธรรมชาติและเมล็ดพันธุ์ที่เร่งอายุ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เสื่อมคุณภาพดังกล่าว ซึ่งขัดแย้งกับ Zhang *et al.* (1996) ที่พบว่า การใช้ RAPD marker ไม่สามารถตรวจสอบให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เก็บรักษาตามธรรมชาติและเมล็ดพันธุ์ที่เร่งอายุได้ อย่างไรก็ตามทั้งสองการทดลองนี้ไม่ได้มุ่งความสนใจไปที่การเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอตั้งแต่ระยะเริ่มแรกหรือที่ระยะการสุกแก่ทางสรีรวิทยา ซึ่งถือว่าเป็นระยะที่เมล็ดพันธุ์มีความสมบูรณ์สูงสุด แต่ศึกษาเมล็ดพันธุ์ในระยะที่เมล็ดสุกแก่เก็บเกี่ยวได้ (harvest maturity) ซึ่งอาจเป็นได้ว่าเมล็ดพันธุ์เกิดการเสื่อมของดีเอ็นเอไปแล้วในช่วงเวลาระหว่างที่เมล็ดพันธุ์ยังคงอยู่ในแปลงจึงทำให้ผลที่ได้แตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำให้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าสามารถใช้ RAPD เป็น marker ในการตรวจสอบการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ได้หรือไม่

โดยปกติคุณภาพของเมล็ดพันธุ์จะเสื่อมไปตามอายุการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น อัตราการเสื่อมขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญคืออุณหภูมิและความชื้น ดังนั้นถ้าเมล็ดพันธุ์ได้รับอุณหภูมิและความชื้นสูงเพิ่มขึ้นเท่าใดอัตราการเสื่อมคุณภาพก็จะสูงเพิ่มมากขึ้นเท่านั้น โดยอาศัยหลักการนี้การศึกษาการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ด้วยการเร่งอายุจึงเป็นวิธีการที่นิยมใช้กันทั่วไป เพราะสะดวกและรวดเร็วกว่าการปล่อยให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพไปเองตามธรรมชาติซึ่งต้องใช้เวลานาน อย่างไรก็ตามจากการศึกษาหาสาเหตุการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ Priestley and Leopold (1979) พบว่าปฏิกิริยา lipid peroxidation นำไปสู่ความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยไม่มีส่วนสัมพันธ์กับการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เกิดขึ้นโดยการเร่งอายุ ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของ Stewart and Bewley (1980) ที่พบการเกิดขึ้นของ lipid peroxidation ในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เร่งอายุ เช่นเดียวกับ Buchvarov and Gantcheff (1984) พบการเกิด lipid peroxidation ขึ้นในเมล็ดพันธุ์ที่เสื่อมคุณภาพทั้งโดยการเร่งอายุและการเสื่อมคุณภาพโดยธรรมชาติ จากความไม่แน่นอนดังกล่าว การศึกษานี้จึงใช้เมล็ดพันธุ์ที่เสื่อมคุณภาพทั้งโดยการเร่งอายุและเมล็ดพันธุ์ที่เก็บรักษาไว้ในสภาพปกติมาศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ ของการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ คือ

1. เพื่อประเมินว่าจะสามารถใช้ RAPD marker ในการตรวจสอบการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองได้หรือไม่

2. เพื่อศึกษาถึงผลของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง 2 พันธุ์ ซึ่งมีความแตกต่างในการทนต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ ที่เกิดจากการเร่งอายุและจากการเก็บรักษาตามธรรมชาติต่อการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ เยื่อหุ้มเซลล์ ความมีชีวิตและความแข็งแรง

3. เพื่อเปรียบเทียบผลจากการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอและการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์กับความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้มีความรู้ความเข้าใจในสาเหตุการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

2. ได้พัฒนาเทคนิคในการตรวจสอบการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในระดับเซลล์และในระดับชีว-โมเลกุล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คุณภาพของเมล็ดพันธุ์

คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองประกอบด้วยคุณสมบัติหลายลักษณะ (Delouche. 1975) ได้แก่

1. ความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม (genetic purity) ความบริสุทธิ์ของพันธุ์ที่ปลูกนับได้ว่ามีความสำคัญต่อความสม่ำเสมอในการแสดงออกของพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งความสม่ำเสมอในระยะการสุกแก่

2. ความบริสุทธิ์ทางกายภาพ (physical purity) เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองควรจะมีสิ่งปะปนน้อยที่สุด เช่นเศษใบ หรือกรวด และเมล็ดวัชพืชอื่น เป็นต้น

3. ความงอก (germination) เมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพสูงควรมีความงอก 85% หรือสูงกว่า

4. ความแข็งแรง (vigor) เมล็ดพันธุ์ที่งอกได้ควรจะมีความแข็งแรงที่จะให้ต้นกล้างอกได้เร็วและสม่ำเสมอภายใต้สภาวะแวดล้อมที่กว้าง และสามารถพัฒนาต่อไปเป็นต้นพืชที่เจริญเติบโตและให้ผลผลิตดี

ในบรรดาองค์ประกอบเหล่านี้ ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์นับได้ว่าเป็นปัญหาในด้านคุณภาพของเมล็ดพันธุ์มาโดยตลอด โดยที่ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นในระหว่างการพัฒนาของเมล็ดจนกระทั่งเมล็ดสุกแก่ การพัฒนานี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ระยะ (Egli. 1998) คือ

ระยะที่ 1 เป็นระยะการปฏิสนธิและมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว เมื่อสิ้นสุดระยะนี้โครงสร้างต่างๆของเมล็ดจะเกิดขึ้น

ระยะที่ 2 เป็นระยะของการสะสมอาหารสำรอง

ระยะที่ 3 เป็นระยะที่การสะสมอาหารสำรองเริ่มช้าลง และหยุดเมื่อถึงระยะสุกแก่ทาง สรีรวิทยา

ระยะที่เมล็ดมีการสุกแก่ทางสรีรวิทยาจะเป็นระยะที่เมล็ดพันธุ์มีความงอกและความแข็งแรงเพิ่มขึ้นสูงสุด (Andrews. 1966 ; Wahab and Burris. 1971 ; Delouche. 1974) โดยทั่วไปการเก็บเกี่ยวจะไม่ปฏิบัติกันในระยะนี้เนื่องจากเมล็ดพันธุ์ยังคงมีความชื้นสูงเกินไป ประมาณ 30-50% (จวงจันทร์. 2529) จึงต้องทิ้งไว้กับต้นแม่จนกระทั่งเมล็ดมีความชื้นลดลงเหลือประมาณ 15-16 % จึงจะสามารถทำการเก็บเกี่ยวได้ (Tekrony *et al.* 1979) ระยะเวลาภายหลังการสุกแก่ก่อนการเก็บเกี่ยวนี้ ถ้าอากาศมีสภาพดี เช่นมีฝนตกน้อยหรือไม่มีเลย ความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ อากาศเย็น สภาพดังกล่าวจะทำให้เมล็ดแห้งลงอย่างรวดเร็วและเมล็ดพันธุ์มีความงอกและความแข็งแรงสูงมาก ในทางตรงกันข้ามถ้าในช่วงระยะดังกล่าวมีอุณหภูมิสูงสลับกับการมีฝนตกก็จะทำให้ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ลดลงอย่าง

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวดเร็ว (Delouche. 1980) ดังนั้นเมล็ดพันธุ์หลังจากการสุกแก่ทางสรีรวิทยาไปแล้วจะเสื่อมคุณภาพ การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ระหว่างที่ยังอยู่กับต้นแม่นี้ เรียกว่า การเสื่อมคุณภาพในไร่ (field weathering) (Bhatia *et al.* 1993) อย่างไรก็ตามสภาพแวดล้อมนอกจากจะมีผลทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพภายหลังการสุกแก่ทางสรีรวิทยาแล้ว ยังสามารถทำให้คุณภาพของเมล็ดพันธุ์เสื่อมได้ก่อนการสุกแก่ทางสรีรวิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการขาดน้ำที่นานเกินไปในระหว่างการพัฒนาของเมล็ด จะทำให้เมล็ดลีบเล็กและไม่แข็งแรง (Delouche. 1980) นอกจากนี้การมีอุณหภูมิที่สูงเกินไปก็สามารถทำให้ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ลดลงได้อีกด้วย (Dornbos. 1995)

2.2 การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์นอกจากจะเกิดขึ้นขณะที่ยังอยู่กับต้นแม่แล้ว ยังอาจเกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาได้อีกด้วยโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ภายใต้สภาพที่มีอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์สูง จะทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพอย่างรวดเร็ว (Harrington. 1972 ; Justice and Bass. 1979 ; Tekrony *et al.* 1987) เมื่อการเสื่อมคุณภาพดำเนินเรื่อยมาจนถึงระยะสุดท้ายซึ่งเป็นระยะที่รุนแรงที่สุด เมล็ดพันธุ์จะสูญเสียความงอกโดยสิ้นเชิง (Delouche. 1982) ดังนั้นการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์จึงเป็นการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและทางชีวเคมี และเมื่อมีความรุนแรงมากขึ้น เมล็ดพันธุ์ก็จะตายในที่สุด Delouche and Baskin. (1973) ได้เสนอกระบวนการเสื่อมคุณภาพที่เกิดขึ้นในเมล็ดพันธุ์ ดังนี้

2.2.1 การเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ (Membrane degradation)

นักวิทยาศาสตร์หลายท่านรายงานว่าการเสื่อมของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นกระบวนการแรกที่เกิดขึ้นในเมล็ดพันธุ์ที่เสื่อมคุณภาพ การเสื่อมจะเกิดขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และเยื่อหุ้มองค์ประกอบภายในเซลล์ (subcellular membrane) ซึ่งจะทำให้เซลล์สูญเสียคุณสมบัติในการควบคุมและกักเก็บสารต่างๆภายในเซลล์ ทำให้มีการรั่วไหลของสารจากภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกอย่างรวดเร็ว (Koostra and Harrington. 1969 ; McDonald. 1975 ; Stewart and Bewley. 1980)

2.2.2 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง (Loss of enzymatic activity)

เมล็ดพันธุ์ที่มีชีวิตมีเอนไซม์หลายชนิดในเมล็ด เมื่อเมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพ กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง (Ching and School-Craft. 1968) เอนไซม์เหล่านี้ได้แก่ ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) และอะมัยเลส (amylase) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 **อัตราการหายใจลดลง** (Reduced respiration rate)

เมื่อเมล็ดพันธุ์มีการเสื่อมคุณภาพเกิดขึ้น อัตราการหายใจของเมล็ดจะลดลงตามอายุของเมล็ดพันธุ์ที่เพิ่มขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการเร่งอายุของเมล็ดพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ หรือเมล็ดพันธุ์ที่เก็บรักษาในสภาพธรรมชาติ (Woodstock and Grabe. 1967)

2.2.4 **กรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้น** (Increased in free fatty acid)

โดยปกติปริมาณกรดไขมันอิสระจะเพิ่มขึ้นเมื่อเมล็ดพันธุ์มีการเสื่อมคุณภาพ เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (lypase) ซึ่งจะย่อยสลายไขมันที่อยู่ในรูปไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ให้กลายเป็นกลีเซอรอล (glyceral) และกรดไขมันอิสระ (free fatty acid)

2.2.5 **เมล็ดพันธุ์งอกได้ในสภาพแวดล้อมที่จำกัด** (Narrow germination requirement)

เมื่อเมล็ดพันธุ์มีการเสื่อมคุณภาพ ช่วงของปัจจัยในการงอกจะแคบลง นั่นก็คือเมล็ดพันธุ์จะงอกได้เฉพาะในสภาพแวดล้อมที่จำกัดหรือเฉพาะเจาะจงที่ระดับใดระดับหนึ่ง

2.2.6 **อัตราความงอกของเมล็ดพันธุ์ช้าลง** (Slow germination rate)

เมล็ดพันธุ์ที่มีการเสื่อมคุณภาพเกิดขึ้นจะยังคงงอกได้ตามปกติแต่อัตราเร็วในการงอกของเมล็ดพันธุ์จะช้าลง Murata *et al.* (1980) รายงานว่า ความงอกและอัตราเร็วในการงอกของเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง (*Pisum sativum* L.) จะลดลงเมื่อเมล็ดพันธุ์มีอายุมากขึ้นและภายหลังการเร่งอายุ

2.2.7 **ความสามารถในการเก็บรักษาลดลง** (Reduced storability)

เมล็ดพันธุ์ที่มีการเสื่อมคุณภาพเกิดขึ้นจะมีความสามารถในการเก็บรักษาลดลง เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองต่างพันธุ์กันจะมีการเสื่อมคุณภาพต่างกัน และมีความสามารถในการเก็บรักษาต่างกัน

2.2.8 **อัตราการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นกล้าลดลง** (Reduced rate of seedling growth and development)

เมล็ดพันธุ์ที่มีการเสื่อมคุณภาพเกิดขึ้นไม่มาก จะยังคงงอกได้ตามปกติในสภาพไร่ แต่ต้นกล้าที่งอกขึ้นมานั้นจะมีการเจริญเติบโตและพัฒนาการค่อนข้างช้ากว่าต้นกล้าที่งอกจากเมล็ดพันธุ์ที่ยังไม่มีการเสื่อมคุณภาพ Grabe (1965) ; Woodstock and Feeley (1965) รายงานว่า อัตราการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นกล้าที่ลดลงจะมีผลทำให้ความสม่ำเสมอของเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากต้นกล้าเหล่านี้ลดลง นอกจากนี้ยังอาจมีผลทำให้การออกดอกและติดผลหรือเมล็ดลดลงด้วย

2.2.9 **สูญเสียความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่แปรปรวน** (Loss of environmental stress resistance)

Byrd (1970) รายงานว่า เมล็ดพันธุ์ที่มีการเสื่อมคุณภาพเมื่องอกเป็นต้นกล้าแล้ว จะไม่สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ผิดปกติ เช่น การขาดน้ำ (water stress) และความแปรปรวนของอุณหภูมิ เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.10 **ความสม่ำเสมอของต้นกล้าในไร่นาลดลง** (Decreased uniformity of seedling)

เมล็ดพันธุ์ที่มีการเสื่อมคุณภาพเมื่องอกเป็นต้นกล้าแล้วจะไม่สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมและมีอาการต่างๆดังกล่าวมาข้างต้น จึงทำให้ต้นกล้าเหล่านี้มีการเจริญเติบโตไม่สม่ำเสมอ เช่น ออกดอกไม่พร้อมกันและแก่ไม่พร้อมกัน เป็นต้น

2.2.11 **เมล็ดพันธุ์เปลี่ยนสี** (Color changes)

เมล็ดพันธุ์ที่มีการเสื่อมคุณภาพไปมากแล้ว สีของเมล็ดพันธุ์จะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เมล็ดพันธุ์ที่เคยมีสีสดใสจะเริ่มมัวหมอง เมื่อมีปรากฏการณ์เช่นนี้เกิดขึ้น แสดงว่าเมล็ดพันธุ์มีการเสื่อมคุณภาพค่อนข้างสูง

2.2.12 **ผลผลิตลดลง** (Reduced yield)

ผลผลิตของเมล็ดพันธุ์ที่เสื่อมคุณภาพจะต่ำกว่าต้นพืชที่งอกจากเมล็ดพันธุ์ที่ยังไม่เสื่อมคุณภาพ นอกจากนี้คุณภาพของผลผลิตก็ลดลงด้วย

2.2.13 **ความงอกในไร่ลดลง** (Loss of field emergence)

เมล็ดพันธุ์ที่เริ่มมีการเสื่อมคุณภาพเกิดขึ้น ความงอกของเมล็ดพันธุ์ที่ตรวจสอบได้ในห้องปฏิบัติการและความงอกในไร่อาจไม่แตกต่างกัน แต่ถ้าการเสื่อมคุณภาพเกิดมากขึ้น จะทำให้เมล็ดมีความงอกในไร่ลดลง แต่ความงอกในห้องปฏิบัติการคงที่

2.2.14 **ต้นกล้าผิดปกติเพิ่มมากขึ้น** (Increased abnormal seedling)

เมื่อเมล็ดพันธุ์มีการเสื่อมคุณภาพเพิ่มมากขึ้นจะมีจำนวนต้นกล้าผิดปกติเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย Murata *et al.* (1980) รายงานว่า ความผิดปกติของต้นกล้าเหล่านี้เกิดขึ้นเนื่องจากกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีส (mitosis) เกิดขึ้นช้า และมีผลทำให้จำนวนของรากและยอดที่เกิดขึ้นมาผิดปกติเพิ่มมากขึ้นจึงทำให้ต้นกล้าที่ได้ มีความผิดปกติเพิ่มมากขึ้น

2.2.15 **เมล็ดพันธุ์สูญเสียความงอก หรือเมล็ดตาย** (Dead seed)

เมล็ดพันธุ์ที่เสื่อมคุณภาพไปมากแล้ว เมล็ดพันธุ์จะไม่สามารถงอกได้ ถึงแม้ว่าจะได้รับปัจจัยที่จำเป็นต่อการงอกอย่างเหมาะสมแล้วก็ตาม

2.3 สาเหตุของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

Robert (1973) ได้เสนอสาเหตุที่ชักนำให้เมล็ดพันธุ์เกิดการเสื่อมคุณภาพและทำให้เมล็ดพันธุ์ตายในที่สุด 2 ประการคือ ปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายใน Allen and Boote (2000) รายงานว่าผลกระทบจากปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อทั้งกระบวนการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง และการลดลงของผลผลิตทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 **ปัจจัยภายนอก** ได้แก่ สภาพแวดล้อมและการเข้าทำลายของเชื้อรา ซึ่งทั้งสองปัจจัยนี้จะมีผลต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์เป็นอย่างมาก

2.3.1.1 สภาพแวดล้อมของเมล็ดพันธุ์

สภาพแวดล้อมสามารถที่จะก่อให้เกิดผลกระทบต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์นับตั้งแต่ในระหว่างการพัฒนาของเมล็ดไปจนถึงภายหลังการสุกแก่ก่อนการเก็บเกี่ยว หรือภายหลังการสุกแก่ที่เก็บเกี่ยวได้ (Tekrony *et al.* 1987) การขาดน้ำในระหว่างการพัฒนาของเมล็ดจะมีผลทำให้ได้เมล็ดที่มีน้ำหนักเบาและเหี่ยวย่น และสูญเสียความงอก (Delouche. 1980 ; Andrews. 1982) ปรากฏการณ์เช่นนี้มักเกิดขึ้นกับการปลูกพืชที่ต้องอาศัยน้ำฝนแล้วเกิดฝนทิ้งช่วงในระหว่างการพัฒนาของเมล็ด นอกจากนี้การมีอากาศร้อนในระหว่างระยะสุดท้ายของการสุกแก่จะทำให้เกิดเมล็ดเขียวและเมล็ดพันธุ์มีคุณภาพต่ำ (Andrews. 1982)

Delouche (1980) รายงานว่าสภาพอากาศที่มีฝนตกบ่อยสลับกับการมีอุณหภูมิสูงภายหลังการสุกแก่ก่อนการเก็บเกี่ยว มีผลทำให้ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ลดลงอย่างรวดเร็ว การเก็บเกี่ยวเมล็ดพันธุ์โดยทันทีภายหลังการสุกแก่ทางสรีรวิทยาจึงเป็นสิ่งที่สามารถหลีกเลี่ยงสภาพอากาศที่ไม่เหมาะสมดังกล่าวได้ แต่เกษตรกรจะต้องมีเครื่องอบเมล็ดเพื่อให้ความชื้นของเมล็ดลดลงโดยเร็ว ไม่เช่นนั้นเมล็ดพันธุ์จะเสื่อมคุณภาพลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน อย่างไรก็ตามในบางครั้งการเก็บเกี่ยวเมล็ดพันธุ์ที่สุกแก่และเก็บเกี่ยวได้อาจจำเป็นต้องล่าช้าออกไปเนื่องจากสภาพอากาศไม่เหมาะสม เช่น มีฝนตกติดต่อกันหลายวัน สภาพเช่นนี้ทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพลงอย่างรวดเร็ว (Andrews. 1982) เช่นเดียวกับภายหลังการสุกแก่ก่อนการเก็บเกี่ยว

2.3.1.2 การเข้าทำลายของเชื้อรา

การเข้าทำลายของเชื้อราเป็นปัจจัยภายนอกที่มีความสำคัญและเป็นสาเหตุใหญ่ที่ทำให้เมล็ดพันธุ์มีคุณภาพลดลง โดยสามารถวัดได้จากความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ (Murata *et al.* 1980) เชื้อราที่เข้าทำลายเมล็ดพันธุ์พืช สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ เชื้อราที่เข้าทำลายเมล็ดพันธุ์ขณะที่เมล็ดพันธุ์ยังอยู่ในแปลงปลูก (field fungi) และเชื้อราที่เข้าทำลายเมล็ดพันธุ์ในระหว่างเก็บรักษา (storage fungi) (Copeland and McDonald. 1985) เชื้อราทั้งสองชนิดนี้จะมีความแตกต่างกันในการเข้าทำลายเมล็ดพันธุ์ เชื้อราในแปลงปลูกต้องการความชื้นสัมพัทธ์สูงประมาณ 90-95% หรือเมื่อความชื้นเมล็ดสูงประมาณ 30-33% (Bewley and Black. 1982) โดยจะเข้าทำลายเมล็ดตั้งแต่เมล็ดยังอยู่บนต้นแม่ Kulick and Yaklich (1991) รายงานว่า เชื้อรา *Phomopsis phaseoli* จะเข้าสู่เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทางช่องเปิดตามธรรมชาติ โดยอาจเข้าไปทาง hilum, micropyle และ pores อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีเยื่อหุ้มเมล็ดมีคุณสมบัติไม่ยอมให้น้ำซึมผ่านได้ง่าย (impermeable membrane) เมื่อเก็บรักษาไว้ในสภาพอากาศที่มีความชื้นสูงประมาณ 90-95% ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมล็ดพันธุ์นั้นจะสามารถรักษาคุณภาพและชลอการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ไว้ได้นานกว่าเมล็ดพันธุ์ที่เยื่อหุ้มเมล็ดยอมให้น้ำซึมผ่านได้ง่ายกว่า (Hartwig and Potts. 1987)

ในทางกลับกันเชื้อราในโรงเก็บรักษาสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพอากาศที่มีความชื้นต่ำกว่า คือที่ความชื้นประมาณ 65-90% อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ที่ 30-35 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่แล้วเชื้อราที่เข้าทำลายเมล็ดพันธุ์ในโรงเก็บจะเป็นพวก *Aspergillus* sp. และ *Penicillum* sp. (Copeland and McDonald. 1985) เชื้อราดังกล่าวจะเข้าไปทำลายต้นอ่อน (embryo) และปล่อยสารพิษเข้าไปทำลายเซลล์ของเมล็ดพันธุ์ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพ

2.3.2 **ปัจจัยภายใน** ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีต่างๆที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของเมล็ดเอง ปัจจัยภายในนี้เป็นสาเหตุสำคัญที่สุดที่ทำให้เมล็ดพันธุ์เกิดการเสื่อมคุณภาพ ปัจจัยภายใน ได้แก่

2.3.2.1 การเสื่อมคุณภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ และโครงสร้างที่มีหน้าที่หลักภายในเซลล์ (degradation of membrane and functional structures)

ความแข็งแรงของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane integrity) เกี่ยวข้องโดยตรงต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (Bewley and Black. 1994) และเป็นองค์ประกอบที่สำคัญต่อความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ (seed vigor) (Powell. 1988) เยื่อหุ้มเซลล์ ประกอบด้วยชั้นของไขมัน 2 ชั้นเรียกว่า lipid bilayer และโปรตีนซึ่งแทรกอยู่ระหว่างชั้นของไขมันทั้งสอง ชั้นของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์จะทำหน้าที่เป็นตัวกลางในการพาสารเข้าหรือออกจากเซลล์และเป็นตัวควบคุมการทำงานของโปรตีนให้ทำหน้าที่อย่างเหมาะสม โปรตีนเหล่านี้จะทำหน้าที่ขนส่งและเคลื่อนย้ายเอนไซม์ที่มีความเฉพาะเจาะจงและเกี่ยวข้องกับเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรีย (mitochondria membrane) (McDonald and Nelson. 1986) ในปัจจุบันเชื่อกันว่าการเสื่อมของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นปรากฏการณ์แรกที่เกิดขึ้นเมื่อเมล็ดพันธุ์เริ่มมีการเสื่อมคุณภาพ (Stewart and Bewley. 1980 ; Ferguson *et al.* 1990) รวมทั้งเยื่อหุ้มองค์ประกอบต่างๆภายในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรีย ซึ่งมีบทบาทสำคัญอย่างมากต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากไมโตคอนเดรียเป็นแหล่งสังเคราะห์พลังงานให้แก่เซลล์ ความเสียหายที่เกิดขึ้นกับไมโตคอนเดรียทั้งทางด้านโครงสร้างและหน้าที่จะมีผลทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพอย่างรวดเร็วเนื่องจากเซลล์มีพลังงานลดลง (Harman and Garnett. 1972)

เยื่อหุ้มเซลล์เป็นส่วนประกอบที่มีความสามารถในการเก็บกักสารต่างๆภายในเซลล์ไม่ให้รั่วไหลออกสู่ภายนอก เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมสภาพ การควบคุมการเข้าออกของสารภายในเซลล์และ ความสามารถในการเก็บกักสารต่างๆจะลดลง (Delouche and Baskin. 1973 ; Robert. 1973) การรั่วไหลของสารออกสู่ภายนอกเซลล์จะเพิ่มขึ้น (Matthews and Powell. 1981) สารต่างๆภายในเซลล์ที่รั่วไหลออกสู่ภายนอกเมื่อเมล็ดดูดน้ำมีความสำคัญต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ คือ (1) สารละลายภายในเซลล์ที่ไหลออกสู่ภายนอกอาจจะเป็นสารสำคัญที่ช่วยส่งเสริมความงอกหรือความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ (2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบบางอย่างที่รั่วไหลออกไปอาจจะมีความสำคัญในการรักษาระดับค่า osmotic potential ซึ่งจะมีผลต่อ tugor pressure ภายในเมล็ดเมื่อเมล็ดดูดน้ำเพื่อใช้ในการเจริญของราก และ (3) สารละลายจากเมล็ดที่ไหลออกสู่ภายนอกอาจช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อราที่สามารถเข้ามาทำลายเมล็ดพันธุ์ได้ (Copeland and McDonald. 1995)

การรั่วไหลของสารภายในเซลล์ออกสู่ภายนอก สามารถวัดได้โดยการนำเมล็ดพันธุ์ไปแช่ในน้ำตามเวลาที่กำหนดและวัดค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity, EC) จากน้ำที่แช่เมล็ดพันธุ์ (Smith and Berjak. 1995) Viera *et al.* (2001) รายงานว่า สามารถใช้ค่าการนำไฟฟ้าในการวัดค่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยค่าการนำไฟฟ้าจะเป็นตัวชี้วัดความแข็งแรงของเยื่อหุ้มเซลล์ได้อีกด้วย

2.3.2.2 การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างในระดับเซลล์ (Ultrastructural changes)

การที่องค์ประกอบต่างๆภายในเซลล์มีหลายอย่างประกอบกันทำให้การศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างภายในเซลล์ของเมล็ดทำได้ยากเนื่องจาก โครงสร้างแต่ละอย่างก็จะมีหน้าที่ต่างๆกัน ลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปของโครงสร้างเหล่านี้ ได้แก่ (1) เยื่อหุ้มชั้นนอกและชั้นในของไมโตคอนเดรียและพลาสติด (plastid) มีลักษณะผิดปกติหรือมีรูปร่างบิดเบี้ยวไป (2) นิวเคลียสมีลักษณะคล้ายพูทุเรียน (3) เอนโดพลาสมิคเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) และ กอลจิบอดี (golgi bodies) สลายตัวเป็นชิ้นเล็กๆ (4) เยื่อหุ้มแวคิวโอล (vacuoles) และโปรตีนบอดี (protein bodies) สลายตัว (5) เกิดการรวมตัวกันของลิปิดบอดี (lipid bodies) (6) พลาสมาเลมมา (plasmalemma) เกิดการหดตัวและแยกออกจากผนังเซลล์ (cell wall) นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยนแปลงอื่นๆของโครงสร้างในระดับเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ เช่น การจับตัวกันเป็นก้อนของโครมาติน (chromatin) ความผิดปกติของนิวเคลียสและความเสียหายของไรโบโซม (ribosomes) รวมทั้งโพลีโซม (polysomes) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเหล่านี้อาจจะส่งผลกระทบต่อระบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอและโปรตีนอีกด้วย (Smith and Berjak. 1995)

2.3.2.3 การเปลี่ยนแปลงของไขมันและการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation

การเปลี่ยนแปลงของไขมันภายในเมล็ดเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ส่งผลให้เกิดการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากในเมล็ดพันธุ์พืชบางชนิด มีปริมาณของไขมันในเมล็ดมาก โดยเฉพาะในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง จึงทำให้เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมีการเสื่อมคุณภาพเร็วกว่าเมล็ดพันธุ์พืชชนิดอื่นที่มีปริมาณแป้งและโปรตีนในเมล็ดมากกว่าไขมัน (ธวัชชัย ทีฆชุนหเถียร. 2540) ไขมันที่มีในเมล็ดพันธุ์พืชมีอยู่ 2 ชนิด คือ (1) ไขมันสะสม (storage lipid) เป็นไขมันที่ไม่มีขั้วประจุ ที่พบมากคือ ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ไขมันเหล่านี้สะสมในรูปของเม็ดไขมัน และ (2) ไขมันที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้าง (functional lipid) ซึ่งอาจแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้หลายชนิด คือ ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ไกลโคลิปิด (glycolipid) และสเตอรอล (sterol) เป็นต้น (วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2537) ไขมันพวกนี้จะปรากฏในเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หุ้มเซลล์ อวัยวะย่อยของเซลล์ และในโครงสร้างต่างๆของเซลล์ ในสภาพที่เมล็ดมีความชื้นสูงเมล็ดจะเกิดเมตาโบลิซึมมากขึ้น เอนไซม์ไลเปสและฟอสโฟไลเปส (phospholipase) จะย่อยสลายไตรเอซิลกลีเซอรอลทำให้เกิดกรดไขมันอิสระ (Ching. 1973) การเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิสระจะมีความสัมพันธ์กับการลดลงของเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากกรดไขมันอิสระจะทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้โครงสร้างของไมโตคอนเดรียผิดปกติ ซึ่งจะมีผลกระทบต่อการหายใจของเซลล์ (Priestley. 1986)

ปฏิกิริยา lipid peroxidation คือการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ขึ้นในเนื้อเยื่อของเมล็ดพันธุ์อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนี้จะทำปฏิกิริยากับสารต่างๆที่สะสมในเมล็ดพันธุ์ทำให้เกิดเป็นอนุมูลอิสระอีกชนิดหนึ่งขึ้น อนุมูลอิสระมีหลายประเภทและแต่ละประเภทก็จะมีความสามารถในการสร้างสารพิษหรือเข้าทำลายเซลล์แตกต่างกัน (Grille and Joenje. 1991 ; Larson. 1997) กลไกการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation เกิดจากการที่มีออกซิเจน (O_2) อยู่ล้อมรอบและเข้าทำปฏิกิริยากับกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) เช่น oleic acid และ linoleic acid ซึ่งพบทั่วไปในเยื่อหุ้มเซลล์ ผลที่ได้คือการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของกระบวนการ peroxidation โดยเกิดการลดลงของอนุมูลอิสระซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นไฮโดรเจนไอออน (H^+) จาก methylene group ที่เป็นองค์ประกอบของกรดไขมัน หรือการที่อนุมูลอิสระของไฮโดรเจนไอออนไปรวมตัวกับอนุมูลอิสระจาก carboxyl group (ROOH) และปลดปล่อย peroxy-free radical (ROO^-) ออกมา เมื่ออนุมูลอิสระเหล่านี้ถูกสร้างและสะสมในเซลล์เพิ่มมากขึ้นเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ไม่เพียงไขมันเท่านั้นที่จะถูกทำลายแต่ปฏิกิริยาอันซับซ้อนยังก่อให้เกิดการสร้างสารพิษ (toxic products) อีกหลายชนิดซึ่งจะเพิ่มการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ให้มากยิ่งขึ้น (McDonald. 1999)

2.3.2.4 ความเสียหายทางพันธุกรรม (Genetic damage)

หน่วยพันธุกรรมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตจะถูกบรรจุอยู่ในจีโนม (genome) ความเสียหายที่เกิดขึ้นกับจีโนม จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เมล็ดพันธุ์เกิดการเสื่อมคุณภาพ ความผิดปกติบนโครโมโซม (chromosome) และการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA synthesis) ได้มีผู้ทำการศึกษากันมากและพบว่าส่วนใหญ่แล้วความผิดปกติที่เกิดขึ้นจะมีความเกี่ยวข้องและสัมพันธ์กับเวลา อุณหภูมิ และปริมาณความชื้น ซึ่งจะเป็นตัวกระตุ้นให้เมล็ดพันธุ์สูญเสียความมีชีวิตเร็วขึ้นในขณะเก็บรักษา (Bewley and Black. 1982)

การเสื่อมสภาพของจีโนมในเมล็ดพันธุ์ที่เสื่อมคุณภาพสามารถเกิดขึ้นได้หลายรูปแบบ เช่น ความผิดปกติของโครโมโซมในระยะไมโตซีส การเชื่อมติดกันของโครโมโซมมีการเปลี่ยนแปลงไปโครโมโซมฉีกขาดออกเป็นท่อน (chromosome aberration) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมล็ดพันธุ์ที่เก็บรักษาในสภาพที่มีอุณหภูมิและความชื้นสูง (วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2537) เมล็ดพันธุ์ที่มีอายุเพิ่มขึ้น ความเสียหายที่เกิดขึ้นบนโครโมโซมก็จะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย และจะเพิ่มขึ้นเรื่อยไปจนถึงระดับที่เมล็ดพันธุ์ไม่สามารถงอกเป็นต้นอ่อนได้ซึ่งถือว่าเป็นเมล็ดตาย นอกจากนี้ ความผิดปกติของไซโตพลาสซึมและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิวเคลียส ก็อาจมีผลร่วมกันในการกระตุ้นให้เกิดความเสียหายขึ้นบนโครโมโซมเพิ่มมากขึ้นในเวลาเดียวกันได้อีกด้วย (Bewley and Black. 1982)

Bewley and Black (1982) รายงานว่า นอกจากความผิดปกติที่เกิดขึ้นบนโครโมโซมแล้ว การเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ของเมล็ดก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพ ซึ่งเกิดจากสาเหตุ 2 ประการคือ (1) ละอองเกสรเป็นหมัน (pollen abortion) และ (2) การกลายพันธุ์ของคลอโรพลาสต์ (chloroplast mutation)

การเกิดปฏิกิริยาลิปิดเพอร์ออกซิเดชั่นทำให้เยื่อหุ้มเซลล์และองค์ประกอบต่างๆภายในเซลล์เสียหาย มีผลทำให้นิวเคลียสถูกทำลายไปด้วย เมื่อดีเอ็นเอเกิดการเสื่อมสภาพไปจะมีผลทำให้กระบวนการถอดรหัสเพื่อให้ได้เมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอผิดปกติไป โดยเฉพาะในเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านเก็บรักษามานาน เช่นในเมล็ดพันธุ์ข้าวสาลีที่เก็บรักษามา 5 ปี (Peumans and Carlier. 1981) หรือการเร่งอายุในเมล็ดพันธุ์ข้าวสาลี (Grilli *et al.* 1982) และเมล็ดพันธุ์ข้าว (Ghosh and Chouwhury. 1984) ก็พบว่ามีปริมาณของอาร์เอ็นเอลดลง

2.4 การตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

การตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์สามารถกระทำได้หลายทางทั้งการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคด้านเทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้หลายอย่างและมีวิธีการตรวจสอบที่แตกต่างกันออกไป เช่นการตรวจสอบความงอกหรือความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ และการตรวจสอบความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์เป็นต้น ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาโดยการนำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล (molecular biology techniques) มาใช้กับการตรวจสอบทางด้านเมล็ดพันธุ์ รวมทั้งการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ด้วย

2.4.1 เทคนิคทางด้านเมล็ดพันธุ์

1. การตรวจสอบความงอกมาตรฐาน (standard germination test)

เป็นวิธีการตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่าย ใช้อุปกรณ์น้อยและสามารถใช้ได้กับเมล็ดพันธุ์พืชทุกชนิด วิธีการนี้เป็นการจัดสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการงอกของเมล็ดพันธุ์ ความงอกคืออัตราส่วนของจำนวนเมล็ดที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นกล้าปกติภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม (Anonymous. 1996) วิธีการประเมินค่าความงอกและระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบความงอก จะแตกต่างไปตามชนิดของเมล็ดพันธุ์พืช (Anonymous. 1976) วัสดุที่ใช้ในการเพาะเมล็ดพันธุ์มีหลายชนิด ได้แก่ กระดาษเพาะ ดินและทราย นอกจากนี้อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความงอกอีกด้วย Escoar (1983) พบว่า การใช้กระดาษเพาะเป็นวัสดุเพาะโดยไม่ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิ จะทำให้ค่าความงอกของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้าวโพดมีความแปรปรวนมากกว่าการเพาะในทราย นอกจากนี้ ยังมีปัจจัยอีกหลายอย่างที่มีผลต่อความงอกนอกจากวัสดุที่ใช้เพาะเมล็ด อุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์แล้ว ยังมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับลักษณะเฉพาะของเมล็ดพันธุ์ด้วย เช่น ความสามารถในการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ ลักษณะของเยื่อหุ้มเมล็ดพันธุ์ และอายุของเมล็ดพันธุ์ อาจมีผลกระทบต่ออัตราการงอก ทำให้ค่าความงอกของเมล็ดพันธุ์ที่วัดได้มีค่าแปรปรวนไปได้ (Ragus. 1987) Delouche (1975) กล่าวว่า การงอกไม่สามารถใช้วัดขั้นตอนการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ได้ เนื่องจากความงอกเป็นวิธีการวัดการเสื่อมคุณภาพขั้นตอนสุดท้ายของเมล็ดพันธุ์

2. การตรวจสอบด้วยสารละลายเตตระโซเลียม (tetrazolium test)

เป็นวิธีการตรวจสอบความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์วิธีการหนึ่ง ความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์จะมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการพัฒนาไปเป็นต้นกล้าปกติเมื่อนำไปทดสอบความงอกภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อความต้องการของเมล็ดพันธุ์พืชชนิดนั้นๆ ซึ่งรวมทั้งเมล็ดพันธุ์ที่มีการพักตัวและเมล็ดพันธุ์ที่อาจถูกเข้าทำลายโดยเชื้อจุลินทรีย์หรือเมล็ดพันธุ์ที่อาจพัฒนาไปเป็นต้นกล้าผิดปกติ (Anonymous. 1996) การตรวจสอบความมีชีวิตอาศัยหลักการของปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ซึ่งมีอยู่เฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิต กับสารละลาย 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride ซึ่งเป็นสารละลายที่ไม่มีสี เปลี่ยนไปเป็นสารประกอบ formazan ที่ไม่ละลายน้ำและมีสีแดง ดังนั้นจึงสามารถจำแนกเนื้อเยื่อที่มีชีวิตได้โดยการดูสีของ formazan ในเนื้อเยื่อเมล็ดพันธุ์ที่ยังไม่เสื่อมคุณภาพจะติดสีแดงสดใส แต่เมล็ดพันธุ์ที่เสื่อมคุณภาพจะติดสีแดงคล้ำ ส่วนเนื้อเยื่อที่ไม่มีชีวิตจะไม่ติดสีเลย (Anonymous. 1983) Mason *et al.* (1982) และ Woodstock (1973) พบว่า ในบางครั้งค่าความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากการทดสอบวิธีนี้อาจมากกว่าความเป็นจริงได้ และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่าความงอกมาตรฐาน ค่าความมีชีวิตจะสูงกว่าค่าความงอกมาตรฐานประมาณ 5-10% ไพฑูรย์ ปานเปรม (2529) ได้ทดลองในเมล็ดถั่วลิสง พบว่า วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ทำให้ทราบค่าความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วและให้ผลใกล้เคียงกับการตรวจสอบความงอกในไร่ และความงอกมาตรฐานอย่างมาก

3. การวัดอัตราการรั่วไหลหรือค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity test)

วิธีการนี้เป็นวิธีการวัดความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์วิธีหนึ่ง การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์จะเกี่ยวข้องกับความสามารถของเยื่อหุ้มเซลล์ของเมล็ดในการเก็บรักษาสารต่างๆที่อยู่ภายในเมล็ด (Delouche and Baskin. 1973 ; Roberts. 1973) การเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์สามารถวัดได้โดยการวัดอัตราการรั่วไหล วิธีการนี้อาศัยหลักการที่ว่า การสูญเสียความแข็งแรงของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นเหตุให้คุณสมบัติในการควบคุมการซึมผ่านสารของเยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียไปด้วย การที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเมล็ดเสื่อมสภาพจนไม่สามารถเก็บกักและควบคุมการเข้าออกของสารต่างๆภายในเมล็ดไว้ได้ ทำให้เซลล์ไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถตอบสนองต่อกระบวนการออสโมซีส เซลล์จึงสูญเสียความเต่ง นอกจากนี้สารเมตาโบไลท์ (metabolites) ต่างๆที่รั่วไหลออกมาจะกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งในและนอกเมล็ด ทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพเร็วยิ่งขึ้น (วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2537) Powell and Matthews (1977) และ McDonald and Wilson (1980) ตรวจสอบการรั่วไหลของสารต่างๆจากเมล็ดพันธุ์ที่เสื่อมคุณภาพ พบว่าการรั่วไหลของสารต่างๆหลังจากแช่เมล็ดในน้ำเพียงไม่กี่ชั่วโมง มีความสัมพันธ์กับระดับความเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

ค่าการรั่วไหลของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองจะแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดระหว่างเมล็ดพันธุ์ที่เก็บรักษาตามธรรมชาติและเมล็ดพันธุ์ที่ถูกเร่งอายุ (Edje and Burris. 1970 ; Parrish and Leopold. 1978 ; Loeffler *et al.* 1988) ดังนั้น ผลจากการวัดค่าการนำไฟฟ้าจึงมีความสัมพันธ์กับผลของความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ ความเร็วในการงอกจากการทดสอบความงอกมาตรฐานของเมล็ดพันธุ์ (Edje and Burris. 1970 ; Loeffler *et al.* 1988) และการเร่งอายุเมล็ดพันธุ์ (Loeffler *et al.* 1988) ในเมล็ดพันธุ์ที่ยังไม่มีการเสื่อมคุณภาพ (unaged seed) การรั่วไหลของสารออกจากเมล็ดอาจเกิดขึ้นได้ในไม่กี่นาทีหรือไม่กี่ชั่วโมงซึ่งเป็นสภาพปกติทั่วไปเนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ต้องการระยะเวลาในการจัดเรียงตัว (reorganization) แต่หลังจากระยะนี้ไปแล้วการรั่วไหลจะลดลงซึ่งการรั่วไหลในลักษณะนี้ไม่ทำให้เกิดผลเสียทางสรีรวิทยาตามมา แต่ในเมล็ดพันธุ์ที่เสื่อมคุณภาพแล้ว (aged seed) การรั่วไหลจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและเป็นเวลานานโดยจะมีความสัมพันธ์กับความมีชีวิตและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์

Yaklich and Abdul-Baki (1975) พบว่า เมล็ดพันธุ์ที่มีความแข็งแรงต่ำจะมีสารพวกน้ำตาล กลูโคส และกรดอะมิโนต่างๆรั่วไหลออกมามากทำให้ค่าการนำไฟฟ้าที่วัดได้มีค่าสูง ปัจจัยที่มีผลต่อค่าการนำไฟฟ้า ได้แก่ ความบริสุทธิ์ของน้ำที่ใช้แช่เมล็ดพันธุ์ ความสะอาดของเครื่องมือที่ใช้ ความสม่ำเสมอของตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ที่นำมาทดสอบ เวลา อุณหภูมิที่ใช้ และความชื้นเริ่มต้นของเมล็ดพันธุ์ ซึ่งไม่ควรสูงหรือต่ำเกินไป ควรอยู่ในช่วง 10-14% (Anonymous. 1983) ในเมล็ดที่มีความชื้นต่ำเกินไป (ต่ำกว่า 8.8%) เมื่อนำเมล็ดไปแช่น้ำทันทีโดยไม่มีการปรับความชื้นเมล็ดก่อนจะทำให้ค่าการนำไฟฟ้าสูงผิดปกติ เนื่องจากเมล็ดจะดูดน้ำเข้าไปในอัตราที่รวดเร็วเกินไปจนทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ในเมล็ดเสียหายได้ (Pollock *et al.* 1969)

2.4.2 เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล

William *et al.* (1990) ได้เสนอเทคนิค RAPD ในการใช้ศึกษาและวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองและข้าวโพด เทคนิค RAPD เป็นเทคนิคที่ดัดแปลงมาจากเทคนิค PCR ทำได้โดยการใช้ primer หรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) สายสั้นๆจับกับดีเอ็นเอบนโครโมโซม มักจะใช้เพิ่มจำนวนลำดับดีเอ็นเออย่างสุ่มจากดีเอ็นเอแม่แบบที่ซับซ้อน โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเพียงเล็กน้อยเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอมากขึ้นหลายเท่าในเวลาไม่นาน และสามารถตรวจสอบผลจากปฏิกิริยาได้ทันที โดยวิธีอิเลคโทรโฟไลซิส

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(electrophoresis) ในอาร์กาโรสเจล (agarose gel) เทคนิค RAPD มีวิธีปฏิบัติโดยเริ่มจากการเก็บตัวอย่างพืชที่ต้องการศึกษานำมาสกัดดีเอ็นเอ, วัดปริมาณดีเอ็นเอ, ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ สุ่มเลือก primer เพื่อทำปฏิกิริยา PCR และเช็คผลโดยการทำอิเลคโทรโฟไลซิส จากนั้นจึงวิเคราะห์ผลจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น (พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์. 2538)

จากความสะดวกและรวดเร็วในการตรวจสอบด้วยเทคนิค RAPD จึงได้มีผู้นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชและสัตว์ เช่นใช้เทคนิค RAPD ในการแยกความแตกต่างของหญ้าแฝก 10 กลุ่มพันธุ์ (ecotypes) ที่พบในประเทศไทย (วินิตชาญ รื่นใจชน. 2540) จำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมในข้าวสาลี (*Triticum aestiuum*) ข้าวโพด (*Zea mays* L.) และถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill.) (William *et al.* 1990) คัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อแมลงบั่ว (Nair *et al.* 1995) ตรวจสอบพันธุ์ข้าวจากแหล่งเก็บเชื้อพันธุกรรมในประเทศต่างๆเปรียบเทียบกับแหล่งกำเนิดพันธุ์ (Virk *et al.* 1995) จำแนกสายพันธุ์ของถั่วเหลืองฝักสด (Chowhury *et al.* 2000) วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างข้าวหอมพันธุ์บาสมาติของอินเดียกับพันธุ์ข้าวจากแหล่งต่างๆ (Verma and Singh. 1999) จะเห็นได้ว่าเทคนิค RAPD ได้ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย

Marcos-Filho and McDonald (1998) ได้นำเทคนิค RAPD มาใช้ศึกษาการเสื่อมคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง เนื่องจากการเสื่อมคุณภาพจะเกิดขึ้นหลังจากระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา และมีสาเหตุเนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเมล็ด ซึ่งน่าจะรวมไปถึงการเสื่อมสลายของดีเอ็นเอด้วย โดยได้นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมาทดสอบโดยการเร่งอายุที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90 % เป็นเวลา 1 ถึง 4 วัน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50% ในเวลาที่แตกต่างกันคือ 0, 45, 85, 128, 173 และ 213 วัน แล้วนำมาตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD ซึ่งพบว่าผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอของเมล็ดพันธุ์ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิและเวลาต่างๆกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ GC 10848 และ พันธุ์ ชม.60

3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้กับเทคนิคทางด้านเมล็ดพันธุ์

3.1.2.1 สารเคมี

1. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TZ)
2. Sodium chloride (NaCl)
3. Alcohol 95%
4. Distilled water
5. Deionized water

3.1.2.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. ตู้อบลมร้อน (WTB binder รุ่น F 115)
2. ตู้เพาะ (Hotpack รุ่น 352602) และ (WTB binder รุ่น VAP2)
3. Hygrometer (Barigo)
4. Maximum-minimum thermometer (Brannan)
5. Hot-plate
6. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น BP 310S)
7. เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (JENWAY 4041)
8. เครื่องวัดค่าการเป็นกรด-ด่าง (C831T รุ่น Consort)
9. Dessiccator
10. บิกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร
11. กล่องพลาสติกขนาด 11.25 x 11.25 เซนติเมตร และขนาด 18.75 x 27.50 เซนติเมตร
12. ตะแกรงลวดขนาด 15.0 x 22.5 เซนติเมตร
13. กระดาษเพาะ
14. ตะกร้าพลาสติกขนาด 32 x 41.5 เซนติเมตร
15. กระถางปลูกต้นไม้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

16. ถุงกระดาษสีน้ำตาลขนาด 6 x 10 เซนติเมตร
17. ดินผสม
18. ขวด Duran ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
19. เครื่องฉีดพ่นปุ๋ยและยาป้องกันกำจัดโรคและแมลง

3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

3.1.3.1 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

1. ไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen)
2. Extraction buffer
   - 3X CTAB [3% CTAB (Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide), 1M Tris (Hydroxymethyl)-aminomethane pH8.0, 0.5M Ethylenediamine tetraacetic acid di-sodium salt (EDTA-di-sodium salt) pH 8.0, 5M NaCl]
   - 10% CTAB (10% CTAB , 5M NaCl)
   - 1XCTAB precipitation (1% CTAB, 50M Tris-aminomethane pH 8.0, 10mM Ethylenediamine tetraacetic acid di-sodium salt (EDTA-di-sodium salt) pH 8.0
3. Chloroform : Isoamyl (24 : 1)
4. Ethanol 95% , 85% , 70%, 65%
5. Chloroform : Phenol (1 :1)
6. Isopropanol
7. RNase เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Sigma)
8. Ultra pure distilled water
9. 5 M potassium acetate
10. 3M sodium acetate
11. TE buffer (10mM Tris-HCl pH8.0 และ 1mM EDTA pH8.0)

3.1.3.2 สารเคมีและเอนไซม์สำหรับเทคนิค RAPD

1. 10X PCR buffer (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM Potassium Chloride)
2. $MgCl_2$ (50X Magnesium Chloride)
3. dNTPs
4. *Taq* DNA polymerase (Invitogen Life Technologies, Brazil และ Promega Madison WI, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

51504

5. Ultra pure distilled water

3.1.3.3 สารเคมีสำหรับกระบวนการ electrophoresis

1. Agarose gel (Research Organic, Inc., USA)
2. Tris (Hydroxymethyl) aminomethane (Merck, Germany)
3. 0.5M EDTA (Univar, Australia)
4. Boric acid (Promega, USA)
5. HCl
6. NaOH
7. Bromophenol blue
8. Ethidium bromide (Sigma)
9. 1X TBE (Tris Borate EDTA) buffer

3.1.3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. โกร่งบดสาร
2. หลอดพลาสติก ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3. หลอดพลาสติกผนังบาง (PCR tube) ขนาด 0.5 มิลลิลิตร (Molecular Bioproduct, USA)
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert รุ่น WB 22)
5. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Hettich รุ่น Mikro 20)
6. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Hettich รุ่น Universal 32R)
7. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส (Sunyo รุ่น MIR 553)
8. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส (Jouan รุ่น VXE 380)
9. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น BP 310S)
10. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (Consort รุ่น C831T)
11. เครื่องดูดสารละลายอัตโนมัติปรับปริมาตรได้ ขนาด 2, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Gilson)
12. Pipette tip ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
13. เครื่องอิเลคโตรโฟรีซีสแบบแนวนอนขนาดเล็ก (Toyobo)
14. เครื่องถ่ายภาพ (Gel document) (Syngene รุ่น SYDR/1750)
15. เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR) (MJ Research รุ่น PTC-100)
16. Autoclave (Hirayama รุ่น HVE-50)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17. อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ถุงมือ ปากคีบ กระดาษชั่งสาร ช้อนตักสาร กระดาษติดป้าย ปากกาเคมี แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์

3.2 การผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

ปลูกเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ GC 10848 และ พันธุ์ ชม.60 ในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 ซม. โดยปลูกถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 จำนวน 60 กระถาง และปลูกพันธุ์ GC 10848 จำนวน 70 กระถาง รวมทั้งหมด 130 กระถาง นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองซึ่งคลุกเชื้อไรโซเบียมหยอดลงในกระถางปลูก กระถางละ 4-5 เมล็ด โดยมีฟูราดาน (furadan) รองก้นหลุมเพื่อป้องกันแมลง หลังจากเมล็ดงอกได้ประมาณ 10 วัน ปลูกซ่อมและถอนต้นกล้าให้เหลือกระถางละ 2 ต้น ฉีดพ่นด้วยสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชไบโอเวคอัพ (Bio wake up) อัตรา 20 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตร สัปดาห์ละครั้ง และราดด้วยสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชไบโอเวคอัพ อัตรา 20 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตร 2 สัปดาห์ต่อครั้ง เมื่อต้นถั่วเหลืองอายุประมาณ 20 วัน ใส่ปุ๋ยยูเรีย อัตรา 20 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร อายุประมาณ 30 วัน ฉีดพ่นด้วยสารเร่งการเจริญเติบโตกราเซีย (Gracia) สูตร1 อัตรา 20 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตร อายุประมาณ 35 วันฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดแมลงพอสซ์ (Pause) และทามารอน (Tamaron) อัตรา 20-40 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตร อายุประมาณ 45 วันฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดโรคไดเทนเอ็ม (Ditain-M) อัตรา 20 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร อายุประมาณ 50 วัน ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร อายุประมาณ 56 วันฉีดพ่นสารเร่งการเจริญเติบโตกราเซีย (Grasia) สูตร2 อัตรา 20 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตร อายุประมาณ 62 วัน ฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดแมลงเซฟวิน (Savin) อัตรา 10 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร เก็บเกี่ยวเมล็ดพันธุ์เมื่อถึงระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา หรือเมื่อฝักเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

3.3 สถานที่ดำเนินงาน

ดำเนินงานวิจัยที่ห้องปฏิบัติการเมล็ดพันธุ์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.4 ระยะเวลาการดำเนินงาน

เดือนมิถุนายน 2545-เดือนสิงหาคม 2546

3.5 วิธีการดำเนินงาน

นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เก็บเกี่ยวในระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยามาลดความชื้นด้วยแสงอาทิตย์ โดยการนำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้งฝักวางให้แผ่กระจายกันเป็นชั้นเดียวทั่วตะกร้าพลาสติก ลดความชื้น

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยแสงอาทิตย์ประมาณวันละ 8 ชั่วโมง เกลี่ยฝักกลับไปมาวันละ 2 ครั้ง เพื่อให้เมล็ดแห้งทั่วถึงกัน เมื่อความชื้นเมล็ดลดลงเหลือประมาณ 15 % จึงนวดเมล็ดด้วยมือ นำเมล็ดพันธุ์ที่ได้ลดความชื้นด้วยแสงอาทิตย์ต่อไป จนกระทั่งเมล็ดมีความชื้นประมาณ 12% หลังจากนั้นจึงแบ่งเมล็ดพันธุ์แต่ละพันธุ์ออกเป็น 2 ส่วน แล้วนำมาทำการทดลองดังนี้

1. แบ่งเมล็ดพันธุ์ในส่วนแรกออกเป็น 6 กองๆละ 100 เมล็ด นำแต่ละกองใส่ถุงกระดาษสีน้ำตาล ขนาด 6 x 10 เซนติเมตร ปิดปากถุงให้สนิทเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ ทุกๆ ระยะ 30 วัน เป็นระยะเวลา 180 วัน ของการเก็บรักษา

2. แบ่งเมล็ดพันธุ์ในส่วนที่ 2 ออกเป็น 7 กองๆละ 100 เมล็ด นำเมล็ดพันธุ์แต่ละกองไปทำการเร่งอายุ โดยใช้วิธี Tray Method (McDonald and Phaneendranath. 1978) โดยนำเมล็ดพันธุ์ไปไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 100% เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 1-7 วัน นำเมล็ดพันธุ์ที่เร่งอายุในแต่ละวันมาล้างด้วย alcohol 95% และล้างด้วยน้ำประปาอีกครั้ง ผึ่งลมไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง จึงนำเมล็ดพันธุ์ที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพ

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Complete Randomized Design) ทำ 4 ซ้ำๆ ละ 25 เมล็ด

3.6 วิธีการทดลอง

นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ได้จากการเก็บรักษาและการเร่งอายุ มาตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ และตรวจสอบคุณภาพและวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

3.6.1 *การตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์*

การตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ที่ใช้ ได้แก่

3.6.1.1 การตรวจสอบความงอกมาตรฐาน (standard germination test)

ทำตามวิธีการของ ISTA (1985) นำเมล็ดพันธุ์จำนวน 25 เมล็ด ทำ 4 ซ้ำ เพาะเมล็ดพันธุ์บนกระดาษเพาะที่ทำให้ชื้นด้วยน้ำกลั่น (between paper) ม้วนกระดาษหลวมๆแล้วนำไปใส่ในกล่องพลาสติก ปิดฝากล่อง นำไปเพาะไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประเมินผลความงอกโดยนับต้นกล้าที่งอกปกติภายหลังเพาะได้ 5 และ 8 วัน

3.6.1.2 การตรวจสอบความมีชีวิตด้วยสารละลายเตตระโซเลี่ยม (tetrazolium test, TZ)

นำเมล็ดพันธุ์จำนวน 25 เมล็ด ทำ 4 ซ้ำ มาเพิ่มความชื้นให้แก่เมล็ดโดยการวางเมล็ดในม้วนกระดาษเพาะที่ชื้นด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 คืน แล้วจึงนำมาแช่ในสารละลาย 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TZ) 1% นำไปบ่มในตู้เพาะที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง (Grabe, 1976) จึงนำเมล็ดมาล้างด้วยน้ำประปา แกะเยื่อหุ้มเมล็ดออกประเมินลักษณะการติดสีและความเข้มของสีออกเป็นประเภทที่มีชีวิต (TZ1-TZ4) และไม่มีชีวิต (TZ5-TZ9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.1.3 การตรวจสอบการรั่วไหลของเมล็ดพันธุ์ วิธีการที่ใช้ ได้แก่

1. ค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity, EC)

ทำตามวิธีการของ AOSA (1983) ชั่งน้ำหนักเมล็ดพันธุ์จำนวน 25 เมล็ด ทำ 4 ซ้ำ แช่เมล็ดพันธุ์ในบิกเกอร์ (250 มิลลิลิตร) ที่มีน้ำ deionized water อยู่ 75 มิลลิลิตร ปิดปากบิกเกอร์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ นำไปไว้ในอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ตรวจวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกมาจากเมล็ดทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง และวัดครั้งสุดท้ายที่ 24 ชั่วโมง

2. การดูดน้ำ (imbibition, IM)

ชั่งน้ำหนักเมล็ดพันธุ์จำนวน 25 เมล็ด ทำ 4 ซ้ำ แช่เมล็ดพันธุ์ที่ชั่งน้ำหนักแล้วในบิกเกอร์ (250 มิลลิลิตร) ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 75 มิลลิลิตร ปิดปากบิกเกอร์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักเมล็ดที่แช่น้ำทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง และชั่งน้ำหนักครั้งสุดท้ายที่ 24 ชั่วโมง โดยซับน้ำที่เยื่อหุ้มเมล็ดให้แห้งด้วยกระดาษซับก่อนการชั่งน้ำหนักทุกครั้ง

3.6.2 การตรวจสอบคุณภาพและวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

3.6.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ประยุกต์จากวิธีการของ Dellaporta *et al.* (1983) ดังนี้

1. ทุบเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองจำนวน 5 เมล็ดให้แตกและบดให้มีขนาดเล็กลงด้วยโกร่งบดสาร หลังจากนั้นใช้ liquid nitrogen บดซ้ำอีกครั้งจนละเอียดเป็นผงแป้ง ตักใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. เติม 1.5X CTAB extraction buffer (65 องศาเซลเซียส) 500 ไมโครลิตร ลงในหลอด ผสมให้เข้ากันด้วย mixer
3. บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
4. เติม chloroform : isoamyl (24 : 1) 500 ไมโครลิตร ลงในหลอด ผสมให้เข้ากัน
5. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดูดสารละลายส่วนบนสุดใส่หลอดใหม่
6. เติม 10% CTAB 25ไมโครลิตร ลงในหลอด ผสมให้เข้ากัน
7. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดูดสารละลายส่วนบนสุดใส่ลงในหลอดใหม่
8. เติม 1X CTAB precipitation 750ไมโครลิตร ลงในหลอดเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
9. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้ง
10. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 1M NaCl 300ไมโครลิตร
11. บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าตะกอนจะละลายหมด
12. ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 250 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
14. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้ง
15. ล้างตะกอนด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน โดยทำซ้ำขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง
16. รอให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง แล้วละลายตะกอนใน TE buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
17. เติม chloroform : phenol (1 : 1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร
18. ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
19. ดูดสารละลายส่วนบนสุดใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
20. นำสารละลายดีเอ็นเอ 200 ไมโครลิตร เติมสารละลาย RNase ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หรือที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที
21. เติม 3M sodium acetate 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
22. ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ที่เย็นจัด 240 ไมโครลิตร
23. บ่มที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
24. ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol 65 เปอร์เซ็นต์ และ 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ
25. รอให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง แล้วละลายตะกอนใน TE buffer ปริมาตร 50-200 ไมโครลิตร แล้วแต่ปริมาณตะกอน

3.6.2.2 การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD

1. การเตรียมสารละลายสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
1. DNA template	1.0	100 ng/15μl
2. 10X PCR buffer	1.5	1 เท่า
3. $MgCl_2$ (25mM)	1.5	2.5 mM
4. dNTPs (2mM)	1.2	160 μM
5. primer (5 pmole/μl)	1.0	5 pmole/15μl
6. *Taq* DNA polymerase (5unit/μl)	0.1	0.5 unit/15μl
7. น้ำกลั่น	8.7	
รวม	15μl	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ไพรเมอร์ (primers) ที่ใช้ ได้แก่

ชื่อ primer	ลำดับเบส
1. D2	5' GGACCCAACC 3'
2. D12	5' CACCGTATCC 3'
3. E1	5' CCCAAGGTCC 3'
3. E2	5' GGTGCGGGAA 3'
4. E5	5' TCAGGGAGGT 3'
5. E8	5' TCACCACGCT 3'
6. E19	5' ACGGCGTATG 3'
8. มะกอก9	5' TGACGCATGG 3'

ในการทำพีซีอาร์จำนวนมาก จะเตรียมสารละลายรวมของ PCR buffer, $MgCl_2$, dNTP, *Taq* DNA polymerase และน้ำกลั่นในหลอดเดียวกัน (Masture mix) และแบ่งใส่ทีละหลอด โดยแต่ละหลอดจะมี DNA template อยู่ จากนั้นผสมให้เข้ากัน เมื่อผสมสารต่างๆเข้ากันดีแล้ว นำไปใส่เครื่องพีซีอาร์โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มปริมาณ ดังนี้

1) 94 องศาเซลเซียส 3 นาที
2) 94 องศาเซลเซียส 1 นาที
   36 องศาเซลเซียส 1 นาที
   72 องศาเซลเซียส 2 นาที
   ทำซ้ำ 40 รอบ
3) 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ
4) รักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนถึงเวลาวิเคราะห์ดีเอ็นเอต่อไป

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลด้านเทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมช่วยวิเคราะห์ทางสถิติ SAS (Statistical Analysis System) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านชีวเคมี เปรียบเทียบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่างและตรวจสอบผลผลิต (PCR product) หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยวิธีอิเลคโทรโฟไลซิสในอาร์กาโรสเจล ความเข้มข้น 1% โดยใช้ Lamda DNA marker เพื่อประมาณขนาดของแถบดีเอ็นเอ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ถ่ายภาพดีเอ็นเอภายใต้แสง UV นำมาสรุปผล โดยดูจากลักษณะของดีเอ็นเอเริ่มต้นก่อนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์และการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันภายหลังการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของแต่ละตัวอย่าง

3.8 การบันทึกข้อมูล

3.8.1 การตรวจสอบความงอกมาตรฐาน

- เปอร์เซ็นต์ความงอก (%)

3.8.2 การตรวจสอบความมีชีวิตด้วย TZ

- เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต และไม่มีชีวิต (%)

3.8.3 การวัดค่าการนำไฟฟ้า

- ไมโครซีเมน / เซนติเมตร / กรัมเมล็ด (μs / cm / g.seed)

3.8.4 การตรวจสอบการดูดน้ำ

- มิลลิกรัม / เมล็ด (mg / seed)

3.8.5 การตรวจสอบคุณภาพและวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

- บันทึกลักษณะดีเอ็นเอเริ่มต้นก่อนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ
- บันทึกลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏภายหลังปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเปรียบเทียบการเกิดหรือไม่เกิดแถบดีเอ็นเอจากแต่ละตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 คุณภาพของเมล็ดพันธุ์

คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ที่ศึกษา ได้แก่ ความงอกมาตรฐาน ความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ ค่าการนำไฟฟ้า และอัตราการดูดน้ำ

4.1.1 คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในระหว่างการเก็บรักษาตามธรรมชาติ (Natural storage)

4.1.1.1 ความงอกและความมีชีวิต

เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์แสดงการลดลงในความงอกและความมีชีวิตโดยตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (ตารางที่ 4.1) เมล็ดพันธุ์ชม.60 มีการลดลงในคุณภาพเร็วกว่าเมล็ดพันธุ์GC10848

ความงอกของเมล็ดพันธุ์ ชม.60 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลัง 90 วันของการเก็บรักษา (ตารางที่ 4.1 และ ตารางที่ ผ.1) และลดลงอย่างรวดเร็วจนแทบจะไม่มีเมล็ดงอกเลยในช่วงสุดท้ายของการเก็บรักษา (160-180 วัน) ส่วนการลดลงของความมีชีวิตเป็นไปในลักษณะที่ช้ากว่าความงอก (ตารางที่ 4.1 และ ตารางที่ ผ.2)

ความงอกของเมล็ดพันธุ์ GC10848 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลัง 90 วันของการเก็บรักษา (ตารางที่ 4.1 และ ตารางที่ ผ.5) เมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ GC10848 จะมีความงอกลดลงเหลือ 47% ส่วนการลดลงของความมีชีวิตยังคงเป็นไปในลักษณะที่คล้ายคลึงกับเมล็ดพันธุ์ชม.60 แต่จะลดลงในลักษณะที่ช้ากว่า (ตารางที่ 4.1 และ ตารางที่ ผ.6)

4.1.1.2 ลักษณะการติดสี TZ ของเมล็ดพันธุ์

เมื่อประเมินลักษณะการติดสีโดยอาศัยรูปแบบและความเข้มของการติดสีที่เกิดขึ้นของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์สามารถแบ่งออกได้เป็น 8 แบบ (TZ1-TZ8) (ภาพที่ 4.1) ลักษณะการติดสีของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 และ GC10848 มีรูปแบบของการติดสีผันแปรไปตามระยะเวลาของการเก็บรักษา (ตารางที่ 4.2) ชี้ให้เห็นว่า เมล็ดพันธุ์มีการเสื่อมคุณภาพเกิดขึ้นหรือมีความแข็งแรงลดลง โดยที่อาการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ปรากฏให้เห็นโดยมีการลดลงในสัดส่วนของ TZ1 ตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้งสองพันธุ์ (ตารางที่ 4.2) ผลจากการเก็บรักษาพบว่า เมล็ดพันธุ์ ชม.60 มีสัดส่วนของ TZ1 ลดลง ในขณะเดียวกันก็มีการเพิ่มขึ้นของ TZ2 และ TZ3 สูงขึ้น ซึ่งเป็นตัวชี้ให้เห็นการเสื่อมคุณภาพที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

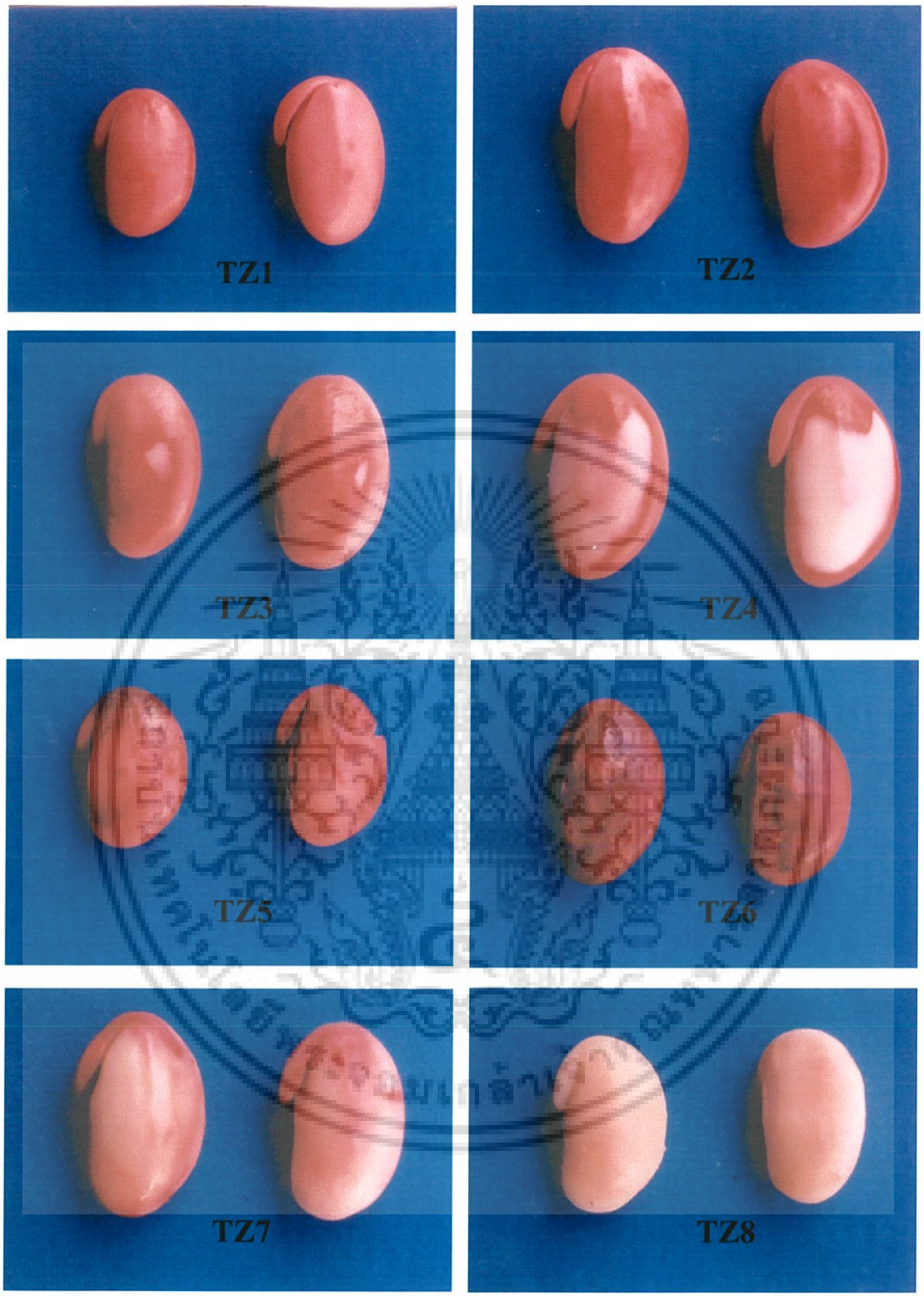
สำหรับพันธุ์ GC10848 การเปลี่ยนแปลงของ TZ โดยตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษาเกิดขึ้นในลักษณะเดียวกันกับพันธุ์ ชม.60 อย่างไรก็ตามการลดลงในสัดส่วนของ TZ1 ในเมล็ดพันธุ์ GC10848 เกิดขึ้นในอัตราที่ช้ากว่าพันธุ์ ชม.60 นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นในสัดส่วนของ TZ2 และ TZ3 ยังเกิดขึ้นน้อยกว่าพันธุ์ ชม.60 อีกด้วย

ตารางที่4.1 ผลของการเก็บรักษาต่อความงอกและความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 และพันธุ์ GC 10848

พันธุ์	ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ความงอก(%)	ความมีชีวิต(%)
ชม.60	0	87.25a[1]	100.00a
	30	87.00a	99.00a
	60	71.00a	97.00a
	90	50.00b	85.00b
	120	50.00b	58.00c
	150	2.00c	12.00d
	180	1.00c	14.00d
GC10848	0	86.00a	98.00a
	30	86.00a	94.00a
	60	82.00a	93.00a
	90	65.00b	82.00ab
	120	60.00bc	68.00bc
	150	47.00c	64.00cd
	180	47.00c	52.00d

[1] ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01 ตามวิธีวิเคราะห์แบบ Duncan's Multiple Range Test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 ลักษณะการติดสี (TZ1 – TZ8) ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 และพันธุ์ GC10848 ซึ่งเก็บรักษาโดยวิธีธรรมชาติ เป็นเวลา 1-6 เดือน และเร่งอายุ เป็นเวลา 1-7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.2 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อลักษณะการติดสี TZ ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 และพันธุ์ GC10848

พันธุ์ถั่วเหลือง	ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ลักษณะการติดสี							
		เมล็ดพันธุ์มีชีวิต[1]				เมล็ดพันธุ์ไม่มีชีวิต[2]			
		TZ1	TZ2	TZ3	TZ4	TZ5	TZ6	TZ7	TZ8
ชม.60	0	3.75	17.75	3.5	ND[3]	ND	ND	ND	ND
	30	4	11	9.75	0.25	ND	ND	ND	ND
	60	2	7.25	15	0.75	ND	ND	ND	ND
	90	1.25	4.75	14.5	3.25	1.25	ND	ND	ND
	120	1.5	2	10.75	8.75	ND	1.25	0.75	ND
	150	1	ND	3.75	10.25	ND	ND	10	ND
	180	1.25	0.5	1.75	4.25	ND	ND	15	2.25
	เฉลี่ย	2.1	6.18	8.43	3.92	0.2	0.18	3.67	0.32
GC10848	0	18.25	1.5	3.5	1.25	0.25	ND	0.25	ND
	30	16	5.5	1.5	1.5	ND	ND	ND	0.5
	60	12.5	7.25	3	2	ND	ND	0.25	ND
	90	9.75	6.25	3.5	5	ND	0.25	0.25	ND
	120	6.5	2.5	6.25	6.75	ND	0.75	2.25	ND
	150	10.5	2.5	2	6.75	ND	ND	2.25	1
	180	8	3	2	9.75	ND	ND	2.25	ND
	เฉลี่ย	11.64	4.1	3.1	4.7	0.04	0.14	1.07	0.21

[1]เมล็ดพันธุ์มีชีวิต TZ1 ติดสีแดงปกติสม่ำเสมอทั่วทั้งเมล็ด

TZ2 ติดสีแดงเข้มกับสีปกติเท่านั้น อาจมีการติดสีบน cotyledon แต่ไม่ทำให้เมล็ดตาย เนื่องจากไม่อยู่ในบริเวณที่สำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TZ3 มีบริเวณของเนื้อเยื่อที่ย้อมสีไม่ติด(สีขาว)ล้อมรอบด้วยสีแดงเข้ม และมีบริเวณที่ติดสีปกติ แต่บริเวณที่ย้อมสีไม่ติและบริเวณที่ติดสีแดงเข้มต้องมีปริมาณน้อยกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ และไม่อยู่ในบริเวณที่สำคัญ

[2]เมล็ดพันธุ์ไม่มีชีวิต

TZ4 เนื้อเยื่อย้อมสีไม่ติดในบริเวณที่สำคัญ เช่น บริเวณที่จะเจริญไปเป็นยอดหรือราก หรือมีเนื้อเยื่อที่ย้อมสีไม่ติดบน cotyledon มีปริมาณมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของเมล็ดทั้งหมด

TZ5 ติดสีแดงปกติและสีแดงเข้ม แต่บริเวณที่ติดสีแดงเข้มเป็นบริเวณที่สำคัญเช่น บริเวณต้นอ่อนที่จะเจริญไปเป็นยอดและราก ซึ่งมีผลทำให้เมล็ดตาย

TZ6 ติดสีแดงเข้มเพียงอย่างเดียวทั้งเมล็ดหรือเกือบทั้งเมล็ด บริเวณที่มีสีแดงเข้มมากอาจจะมีสีเข้มมากจนกลายเป็นสีแดงคล้ำหรือเกือบเป็นสีม่วง

TZ7 ติดสีแดงเข้มเพียงเล็กน้อย บริเวณขอบของเมล็ด แต่มีเนื้อเยื่อที่ย้อมสีไม่ติดเป็นปริมาณมากเกินกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ หรือเกือบหมดทั้งเมล็ด

TZ8 เนื้อเยื่อย้อมสีไม่ติดทั้งเมล็ด

[3]ND = not detect

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.1.3 การรั่วไหลของเมล็ดพันธุ์

1. ค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลในระหว่างการเก็บรักษา

การรั่วไหลหรือการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกจากเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์เพิ่มขึ้นในปริมาณที่แตกต่างกันโดยตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (ตารางที่ 4.3)

เมล็ดพันธุ์ ชม.60 มีการรั่วไหลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญภายหลัง 60 วันของการเก็บรักษา (ตารางที่ 4.3 และ ตารางที่ ผ.3) การรั่วไหลได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายหลัง 150 วันของการเก็บรักษา เมื่อติดตามลักษณะการรั่วไหลของเมล็ดพันธุ์ที่แช่น้ำเป็นระยะภายใน 24 ชั่วโมง พบว่าการรั่วไหลของเมล็ดพันธุ์ในทุกระยะการเก็บรักษาได้เพิ่มขึ้นมากกว่าของเมล็ดพันธุ์ก่อนการเก็บรักษาโดยทันทีเมื่อแช่น้ำไปได้เพียง 1 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.2 a) หลังจากนี้การรั่วไหลยังคงเพิ่มขึ้นได้อย่างชัดเจนโดยตลอดระยะ 6 ชั่วโมงแรกไปจนถึงเมื่อสิ้นสุดการแช่น้ำที่ 24 ชั่วโมง โดยเพิ่มขึ้นตามลำดับของระยะเวลาการเก็บรักษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการรั่วไหลของเมล็ดพันธุ์ที่เก็บรักษาได้ 150 และ 180 วัน จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วโดยตลอดระยะเวลาที่แช่น้ำ

เมล็ดพันธุ์ GC10848 มีการรั่วไหลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีนัยสำคัญภายหลัง 150 วันของการเก็บรักษา (ตารางที่ 4.3 และ ตารางที่ ผ.7) เมื่อติดตามลักษณะการรั่วไหลของเมล็ดพันธุ์ที่แช่น้ำเป็นระยะๆภายใน 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.6 b) พบว่าเป็นไปในลักษณะที่คล้ายคลึงกับการรั่วไหลของเมล็ดพันธุ์ ชม.60 แต่การรั่วไหลเพิ่มขึ้นในลักษณะที่ช้ากว่าของเมล็ดพันธุ์ ชม.60

2. การดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ในระหว่างการเก็บรักษา

การดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์เพิ่มขึ้นในปริมาณที่แตกต่างกันโดยตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (ตารางที่ 4.3)

เมล็ดพันธุ์ ชม.60 มีการดูดน้ำเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญภายหลัง 120 วันของการเก็บรักษาเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการเก็บรักษาหรือ 30 วันของการเก็บรักษา (ตารางที่ 4.3 และตารางที่ ผ.4) เมื่อติดตามลักษณะการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ที่แช่น้ำเป็นระยะๆภายใน 24 ชั่วโมง พบว่าการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ในทุกระยะการเก็บรักษาได้เพิ่มขึ้นมากกว่าของเมล็ดพันธุ์ก่อนการเก็บรักษาโดยทันทีเมื่อแช่น้ำไปได้เพียง 1 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.3 a) หลังจากนี้การดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ที่ระยะเวลาเก็บรักษาต่างกันจะเพิ่มขึ้นให้เห็นได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้นจนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาการแช่น้ำที่ 24 ชั่วโมง ลักษณะการดูดน้ำเพิ่มขึ้นตามลำดับของระยะเวลาการเก็บรักษาที่ต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมล็ดพันธุ์ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 150 และ 180 วัน มีการดูดน้ำที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วมากกว่าระยะเวลาการเก็บรักษาอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

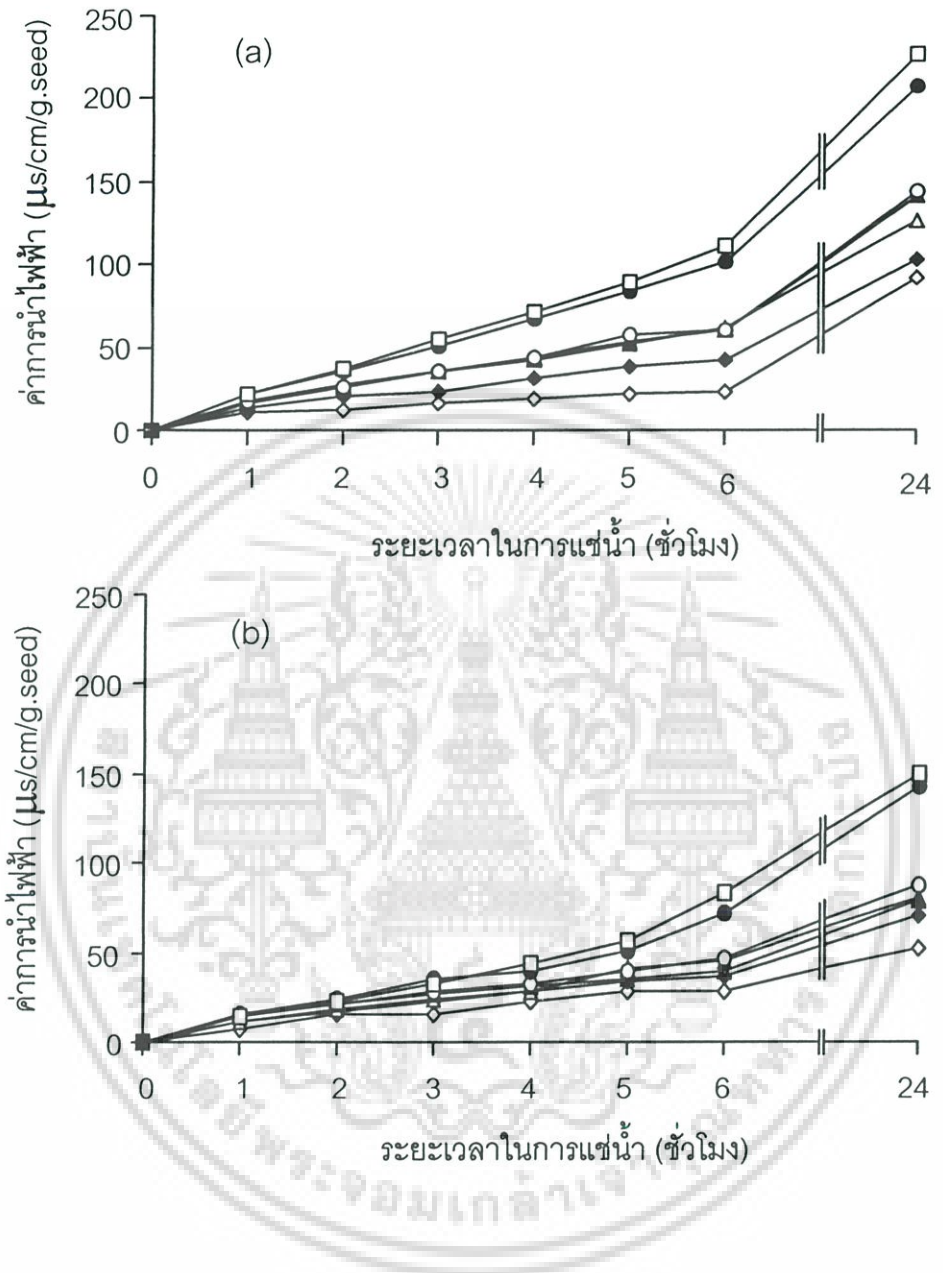
เมล็ดพันธุ์ GC10848 มีการดูดน้ำเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา จึงทำให้ไม่พบว่าการดูดน้ำมีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4.3 และ ตารางที่ ผ.8) เมื่อติดตามลักษณะการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ที่แช่น้ำเป็นระยะๆภายใน 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.3 b) พบว่าเป็นไปในลักษณะที่คล้ายคลึงกับการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ ชม.60 แต่การดูดน้ำเพิ่มขึ้นในลักษณะที่ช้ากว่าของเมล็ดพันธุ์ ชม.60

ตารางที่4.3 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อค่าการนำไฟฟ้าและค่าการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พันธุ์ ชม.60 และพันธุ์ GC 10848

พันธุ์	ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	การนำไฟฟ้า (μs/cm/g.seed)	การดูดน้ำ (mg/seed)
ชม.60	0	91.692d[1]	189.13c
	30	102.695d	197.35c
	60	126.780c	206.54bc
	90	141.162c	208.06bc
	120	143.70c	224.41b
	150	207.335b	259.53a
	180	226.962a	270.72a
GC10848	0	52.08b	88.98a
	30	70.99b	90.61a
	60	78.84b	91.96a
	90	79.96b	96.09a
	120	87.24b	100.06a
	150	142.21a	117.47a
	180	149.59a	122.66a

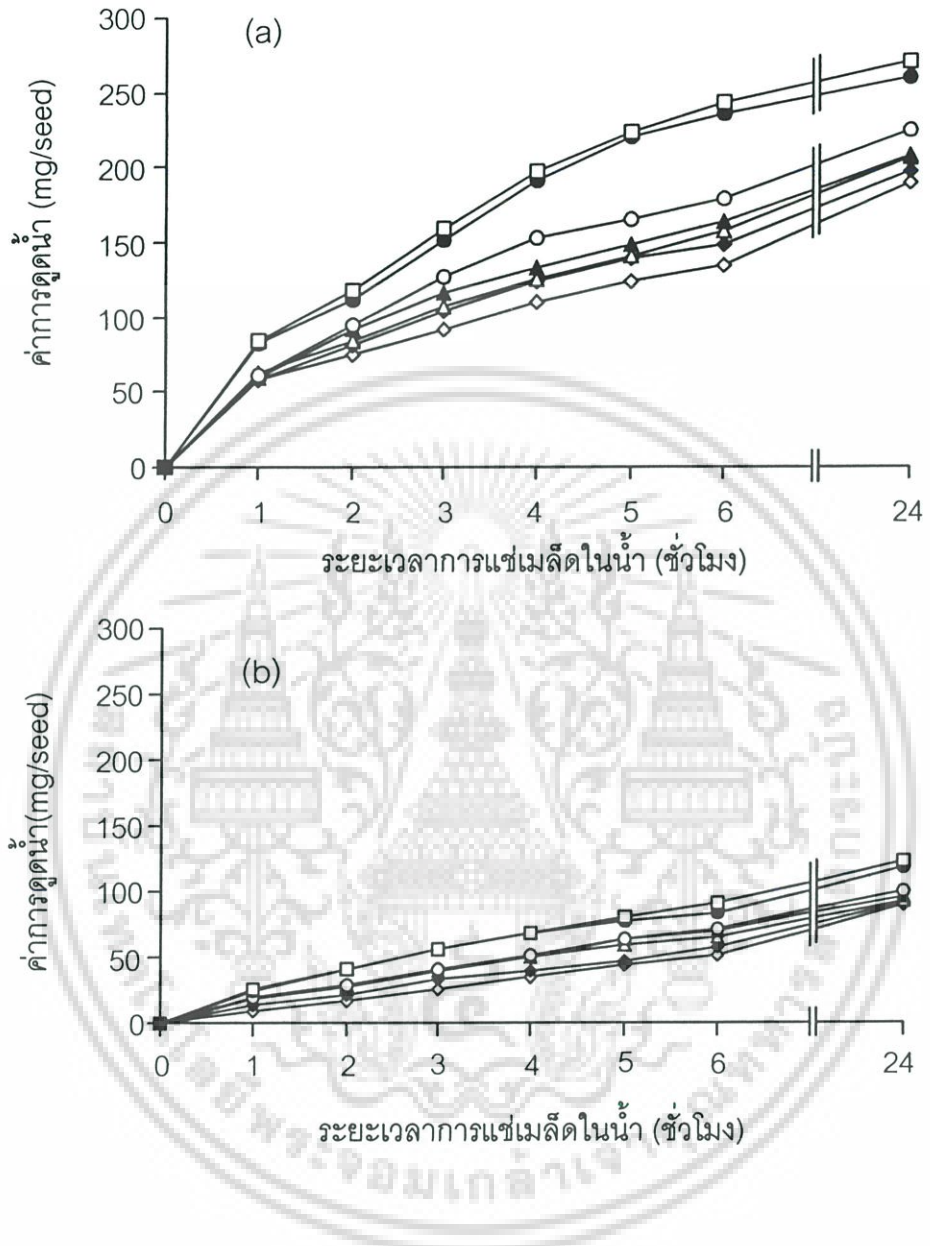
[1] ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01 ตามวิธีวิเคราะห์แบบ Duncan's Multiple Range Test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 ผลของการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์เป็นเวลา 0 (◇) ; 30 (◆) ; 60 (△) ; 90 (▲) ; 120 (○) ; 150 (●) และ 180 (□) วัน ต่อค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกมาจากเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พันธุ์ ชม.60 (a) และพันธุ์ GC10848 (b) ซึ่งแช่น้ำในระยะเวลาต่างๆกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 ผลของการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์เป็นเวลา 0 (◇) ; 30 (◆) ; 60 (△) ; 90 (▲) ; 120 (○) ; 150 (●) และ 180 (□) วัน ต่อค่าการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พันธุ์ ซม.60 (a) และพันธุ์ GC10848 (b) ซึ่งแช่น้ำในระยะเวลาต่างๆกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในระหว่างการเร่งอายุ

4.1.2.1 ความงอกและความมีชีวิต

เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์แสดงการลดลงในความงอกและความมีชีวิตโดยตลอดระยะเวลาการเร่งอายุ (ตารางที่ 4.4) โดยเมล็ดพันธุ์ ชม.60 มีการลดลงในคุณภาพเร็วกว่าเมล็ดพันธุ์ GC10848

ความงอกของเมล็ดพันธุ์ ชม.60 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลัง 2 วันของการเร่งอายุเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการเร่งอายุ (ตารางที่ 4.4 และ ตารางที่ ผ.9) หลังจากนี้ความงอกของเมล็ดพันธุ์จะลดลงอย่างรวดเร็วจนแทบจะไม่มีเมล็ดงอกเลยในช่วง 3 วันสุดท้ายของการเร่งอายุ ส่วนการลดลงของความมีชีวิตเป็นไปในลักษณะที่ช้ากว่าความงอก (ตารางที่ 4.4 และ ตารางที่ ผ.10)

ความงอกของเมล็ดพันธุ์ GC1084 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลัง 2 วันของการเร่งอายุ (ตารางที่ 4.4 และ ตารางที่ ผ.13) ความงอกของเมล็ดพันธุ์จะลดลงอย่างรวดเร็วภายหลัง 4 วันของการเร่งอายุ และในช่วง 3 วันสุดท้ายของการเร่งอายุเมล็ดพันธุ์จะงอกน้อยมาก ส่วนการลดลงของความมีชีวิตยังคงเป็นไปในลักษณะที่คล้ายคลึงกับเมล็ดพันธุ์ ชม.60 แต่จะลดลงในลักษณะที่ช้ากว่า (ตารางที่ 4.4 และ ตารางที่ ผ.14)

4.1.2.2 ลักษณะการติดสี TZ ของเมล็ดพันธุ์

ลักษณะการติดสีของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 และพันธุ์ GC10848 ซึ่งย้อมด้วย TZ สามารถแบ่งออกได้เป็น 8 แบบ (TZ1-TZ8) (ภาพที่ 4.1) ผลจากการเร่งอายุพบว่า ลักษณะการติดสีของเมล็ดพันธุ์ ชม.60 และพันธุ์ GC10848 มีรูปแบบการติดสีพันธุ์ผันแปรไปตามระยะเวลาของการเร่งอายุเมล็ดพันธุ์ (ตารางที่ 4.5)

อาการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ปรากฏให้เห็นโดยมีการลดลงในสัดส่วนของ TZ1 โดยตลอดระยะเวลาการเร่งอายุเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ (ตารางที่ 4.5) พันธุ์ ชม.60 มีสัดส่วนของ TZ1 ลดลงตั้งแต่วันแรก ของการเร่งอายุและไม่พบลักษณะการติดสีแบบ TZ1 เลยเมื่อเมล็ดผ่านการเร่งอายุมาแล้ว 4 วัน แต่ในขณะเดียวกันก็มีการเพิ่มขึ้นในสัดส่วนของเมล็ดพันธุ์ที่ติดสี TZ อื่นๆ โดยเฉพาะใน TZ2-TZ4

สำหรับพันธุ์ GC10848 แสดงการลดลงในสัดส่วนของ TZ1 โดยตลอดระยะเวลาการเร่งอายุ (ตารางที่ 4.5) การลดลงของ TZ1 ในเมล็ดพันธุ์ GC10848 เกิดขึ้นในอัตราที่ช้ากว่าพันธุ์ ชม.60 การเพิ่มขึ้นในสัดส่วนอื่นๆนอกเหนือจาก TZ1 ส่วนใหญ่จะเกิดช้ากว่าพันธุ์ ชม.60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.4 ผลของการเร่งอายุต่อความงอกและความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 และพันธุ์ GC 10848

พันธุ์	จำนวนวันที่เร่งอายุ	ความงอก(%)	ความมีชีวิต(%)
ชม.60	0	86.25a[1]	99.00a
	1	79.00ab	75.00b
	2	71.00b	64.00bc
	3	37.00c	52.00cd
	4	9.00d	35.00de
	5	3.00d	18.00ef
	6	1.00d	1.00f
	7	2.00d	0.00f
GC10848	0	86.00a	84.00ab
	1	84.00a	93.00a
	2	70.00b	83.00ab
	3	61.00b	68.00b
	4	35.00c	67.00b
	5	10.00d	39.00c
	6	12.00d	21.00cd
	7	7.00d	16.00d

[1] ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01 ตามวิธีวิเคราะห์แบบ Duncan's Multiple Range Test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.5 ผลของระยะเวลาการเร่งอายุต่อลักษณะการติดสี TZ ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 และพันธุ์ GC10848

พันธุ์	ระยะเวลาการเร่งอายุ (วัน)	ลักษณะการติดสี							
		เมล็ดพันธุ์มีชีวิต[1]				เมล็ดพันธุ์ไม่มีชีวิต[2]			
		TZ1	TZ2	TZ3	TZ4	TZ5	TZ6	TZ7	TZ8
ชม.60	0	3.75	17.75	3.5	ND[3]	ND	ND	ND	ND
	1	0.75	3.75	15.25	5.25	ND	ND	ND	ND
	2	2	2.75	11.25	7	1.5	ND	0.5	ND
	3	1.5	2	10.25	11.25	ND	ND	ND	ND
	4	ND	0.75	8	12.25	2	0.75	1.25	ND
	5	ND	0.75	3.75	16.25	0.75	0.5	3	ND
	6	ND	0.25	ND	7	ND	ND	10.75	7
	7	ND	ND	ND	4.25	0.5	0.75	11.25	8.25
	เฉลี่ย	1	3.5	6.5	7.9	0.61	0.25	3.34	1.9
GC10848	0	18.25	1.5	3.5	1.25	0.25	ND	0.25	ND
	1	20.75	0.75	1.5	1.25	ND	0.5	0.25	ND
	2	19.5	ND	1.25	1.75	0.75	ND	1.75	ND
	3	11.5	3	3.25	3.75	ND	ND	3.5	ND
	4	8	2.75	4.5	6.25	ND	ND	3.5	ND
	5	7	2.25	0.5	0.5	ND	ND	14.75	ND
	6	1.5	2.5	ND	1.75	ND	ND	19.25	ND
	7	2	1.75	0.25	0.75	ND	ND	19.5	0.75
	เฉลี่ย	11.07	1.81	1.85	2.16	0.12	0.06	7.84	0.09

[1]เมล็ดพันธุ์มีชีวิต TZ1 ติดสีแดงปกติสม่ำเสมอทั่วทั้งเมล็ด

TZ2 ติดสีแดงเข้มกับสีปกติเท่านั้น อาจมีการติดสีบน cotyledon แต่ไม่ทำให้เมล็ดตาย เนื่องจากไม่อยู่ในบริเวณที่สำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TZ3 มีบริเวณของเนื้อเยื่อที่ย้อมสีไม่ติด(สีขาว)ล้อมรอบด้วยสีแดงเข้ม และมีบริเวณที่ติดสีปกติ แต่บริเวณที่ย้อมสีไม่ติและบริเวณที่ติดสีแดงเข้มต้องมีปริมาณน้อยกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ และไม่อยู่ในบริเวณที่สำคัญ

[2]เมล็ดพันธุ์ไม่มีชีวิต

TZ4 เนื้อเยื่อย้อมสีไม่ติดในบริเวณที่สำคัญ เช่น บริเวณที่จะเจริญไปเป็นยอดหรือราก หรือมีเนื้อเยื่อที่ย้อมสีไม่ติดบน cotyledon มีปริมาณมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของเมล็ดทั้งหมด

TZ5 ติดสีแดงปกติและสีแดงเข้ม แต่บริเวณที่ติดสีแดงเข้มเป็นบริเวณที่สำคัญเช่น บริเวณต้นอ่อนที่จะเจริญไปเป็นยอดและราก ซึ่งมีผลทำให้เมล็ดตาย

TZ6 ติดสีแดงเข้มเพียงอย่างเดียวทั้งเมล็ดหรือเกือบทั้งเมล็ด บริเวณที่มีสีแดงเข้มมากอาจจะมีสีเข้มมากจนกลายเป็นสีแดงคล้ำหรือเกือบเป็นสีม่วง

TZ7 ติดสีแดงเข้มเพียงเล็กน้อย บริเวณขอบของเมล็ด แต่มีเนื้อเยื่อที่ย้อมสีไม่ติดเป็นปริมาณมากเกินกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ หรือเกือบหมดทั้งเมล็ด

TZ8 เนื้อเยื่อย้อมสีไม่ติดทั้งเมล็ด

[3]ND = not detect

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2.3 การรั่วไหลของเมล็ดพันธุ์

1. ค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลในระหว่างการเร่งอายุ

การรั่วไหลของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์เพิ่มขึ้นในปริมาณที่แตกต่างกันโดยตลอดระยะเวลาการเร่งอายุ (ตารางที่ 4.6)

เมล็ดพันธุ์ ชม.60 มีการรั่วไหลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญและรวดเร็วภายหลัง 3 วันของการเร่งอายุ (ตารางที่ 4.6 และ ตารางที่ ผ.11) เมื่อติดตามลักษณะการรั่วไหลของเมล็ดพันธุ์ที่แช่น้ำเป็นระยะๆ ภายใน 24 ชั่วโมง พบว่าการรั่วไหลของเมล็ดพันธุ์ในทุกระยะของการเร่งอายุได้เพิ่มขึ้นมากกว่าของเมล็ดพันธุ์ก่อนการเร่งอายุโดยทันทีเมื่อแช่น้ำไปได้เพียง 1 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.4 a) หลังจากนี้ไปแล้วเมล็ดพันธุ์ยังคงมีการรั่วไหลเพิ่มขึ้นโดยตลอดระยะ 6 ชั่วโมงแรกจนกระทั่งสิ้นสุดการแช่น้ำที่ 24 ชั่วโมง เมล็ดพันธุ์มีการรั่วไหลเพิ่มขึ้นตามลำดับของระยะเวลาการเร่งอายุ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการรั่วไหลของเมล็ดพันธุ์ที่เร่งอายุได้ 6 และ 7 วัน จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วโดยตลอดระยะเวลาที่แช่น้ำ

เมล็ดพันธุ์ GC10848 มีการรั่วไหลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีนัยสำคัญภายหลัง 4 วัน ของการเร่งอายุ (ตารางที่ 4.6 และ ตารางที่ ผ.15) เมื่อติดตามลักษณะการรั่วไหลของเมล็ดพันธุ์ที่แช่น้ำเป็นระยะๆภายใน 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.4 b) พบว่าเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการรั่วไหลของเมล็ดพันธุ์ ชม.60 แต่การรั่วไหลของเมล็ดพันธุ์ GC10848 ใน 3 วันแรกของการเร่งอายุเกิดขึ้นช้ากว่า หลังจากระยะนี้ไปแล้วเมล็ดพันธุ์ GC10848 แสดงการรั่วไหลที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วกว่ามากโดยตลอดระยะเวลาที่แช่น้ำ

2. การดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ในระหว่างการเร่งอายุ

การดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์เพิ่มขึ้นในปริมาณที่แตกต่างกันโดยตลอดระยะเวลาการเร่งอายุ (ตารางที่ 4.6)

เมล็ดพันธุ์ ชม.60 มีการดูดน้ำเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญภายหลัง 5 วัน ของการเร่งอายุเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการเร่งอายุหรือภายหลัง 1 วันของการเร่งอายุ (ตารางที่ 4.6 และ ตารางที่ ผ.12) ทั้งนี้เนื่องจากในช่วงแรกของการเร่งอายุการดูดน้ำเพิ่มขึ้นช้า เมื่อติดตามลักษณะการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ที่แช่น้ำเป็นระยะๆภายใน 24 ชั่วโมง พบว่าการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ในทุกระยะการเร่งอายุเพิ่มขึ้นมากกว่าของเมล็ดพันธุ์ก่อนการเร่งอายุโดยทันทีเมื่อแช่น้ำไปได้เพียง 1 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.5 a) หลังจากนี้การดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวจะยังคงเพิ่มขึ้นให้เห็นได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้นจนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาการแช่น้ำที่ 24 ชั่วโมง โดยลักษณะการดูดน้ำจะเพิ่มขึ้นตามลำดับของระยะเวลาการเร่งอายุ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมล็ดพันธุ์ภายหลังการเร่งอายุได้ 6 และ 7 วัน มีการดูดน้ำเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วมากกว่าระยะเวลาการเร่งอายุอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

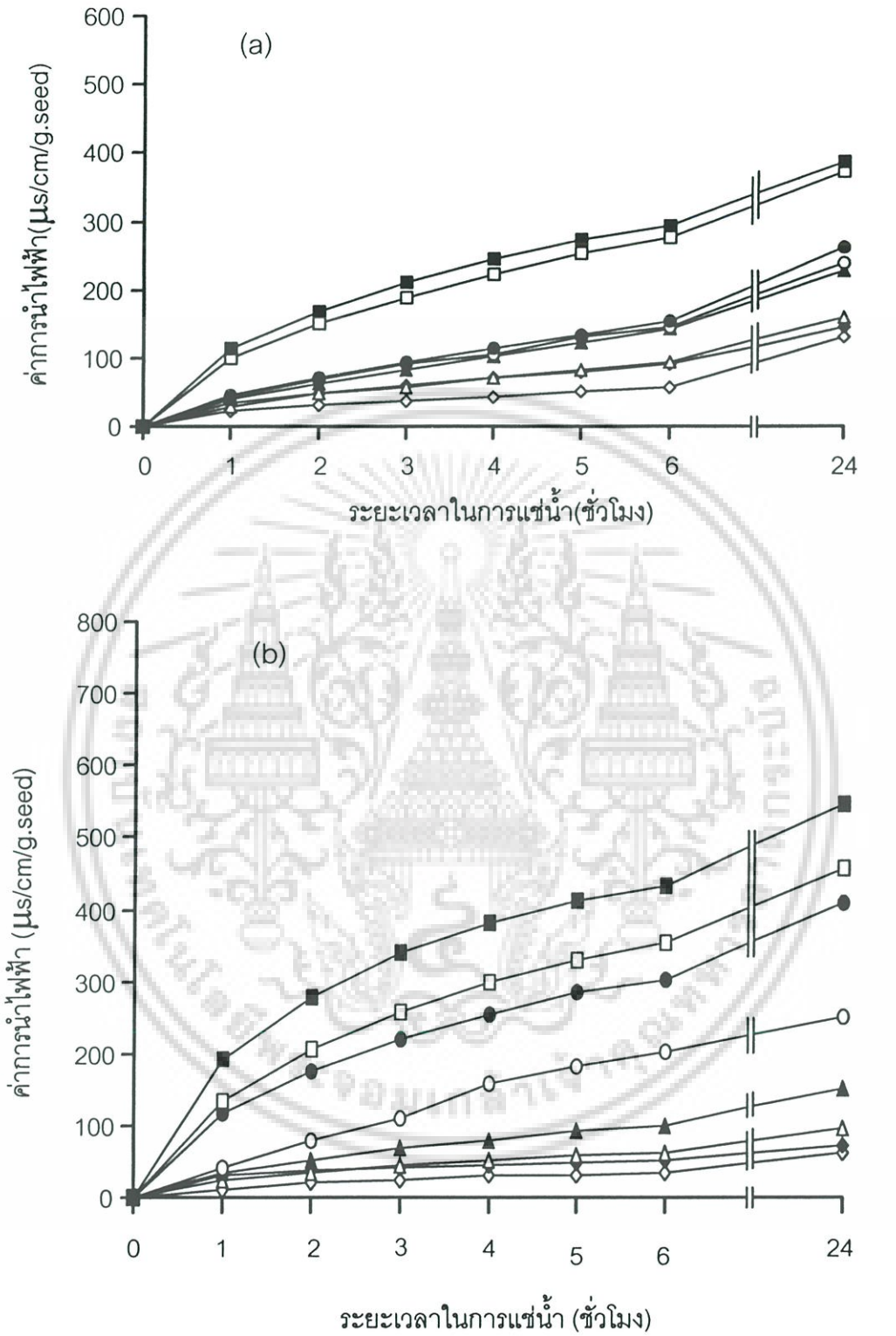
เมล็ดพันธุ์ GC10848 มีการดูดน้ำเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญภายหลัง 4 วันของการเร่งอายุ เมื่อเปรียบเทียบกับช่วง 2 วันแรกของการเร่งอายุ (ตารางที่ 4.6 และ ตารางที่ ผ.16) เมื่อติดตามลักษณะการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ที่แช่น้ำเป็นระยะๆภายใน 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.5 b) พบว่าเป็นไปในลักษณะที่คล้ายคลึงกับการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ ชม.60 แต่การดูดน้ำเพิ่มขึ้นช้ากว่าของเมล็ดพันธุ์ ชม.60 มาก

ตารางที่4.6 ผลของการเร่งอายุต่อค่าการนำไฟฟ้าและค่าการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 และพันธุ์ GC 10848

พันธุ์	จำนวนวันที่เร่งอายุ	การนำไฟฟ้า (μs/cm/g.seed)	การดูดน้ำ (mg/seed)
ชม.60	0	131.06c[1]	189.13c
	1	145.49c	191.57c
	2	159.23c	194.85bc
	3	227.43b	195.94bc
	4	239.51b	205.4bc
	5	261.46b	221.56ab
	6	371.29a	241.66a
	7	388.13a	245.47a
GC10848	0	61.33e	88.98d
	1	73.16e	99.73d
	2	95.81de	102.73d
	3	151.18d	109.77cd
	4	251.47c	130.08bc
	5	408.29b	141.08ab
	6	456.01b	155.47ab
	7	544.53a	160.365a

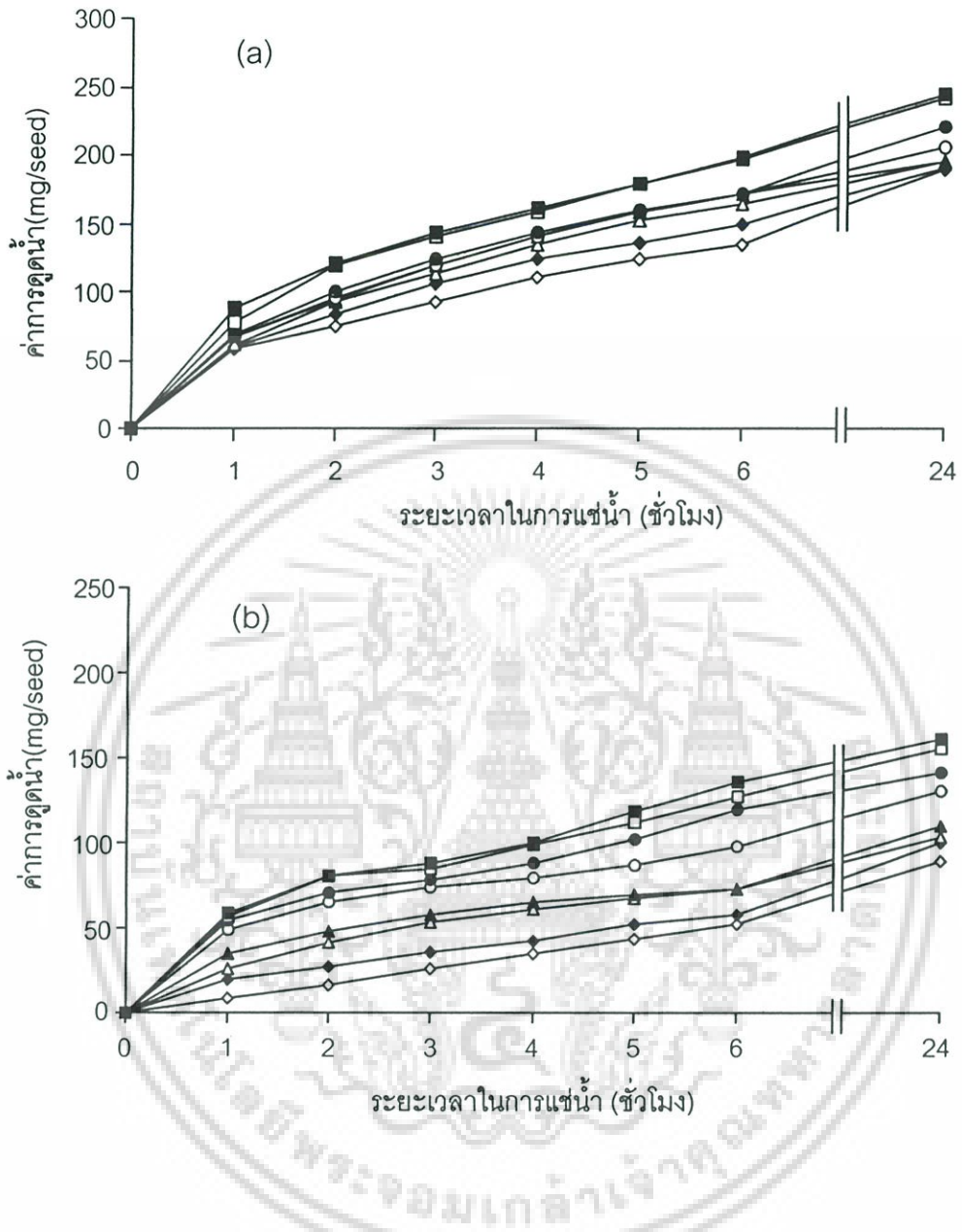
[1]ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01 ตามวิธีวิเคราะห์แบบ Duncan's Multiple Range Test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 ผลของการเร่งอายุเมล็ดพันธุ์เป็นเวลา 0 (◇) ; 1 (◆) ; 2 (△) ; 3 (▲) ; 4 (○) ; 5 (●) ; 6 (□) และ 7 (■) วัน ต่อค่าการรั่วไหลของสารออกจากเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พันธุ์ ชม.60 (a) และพันธุ์ GC10848 (b) ซึ่งแช่น้ำในระยะเวลาต่างๆกัน

เอกสารนี้เป็นการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 ผลของการเร่งอายุเมล็ดพันธุ์เป็นเวลา 0 (◇) ; 1 (◆) ; 2 (△) ; 3 (▲) ; 4 (○) ; 5 (●) ; 6 (□) และ 7 (■) วัน ต่อค่าการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง พันธุ์ ชม.60 (a) และพันธุ์ GC10848 (b) ซึ่งแช่น้ำในระยะเวลาต่างๆกัน

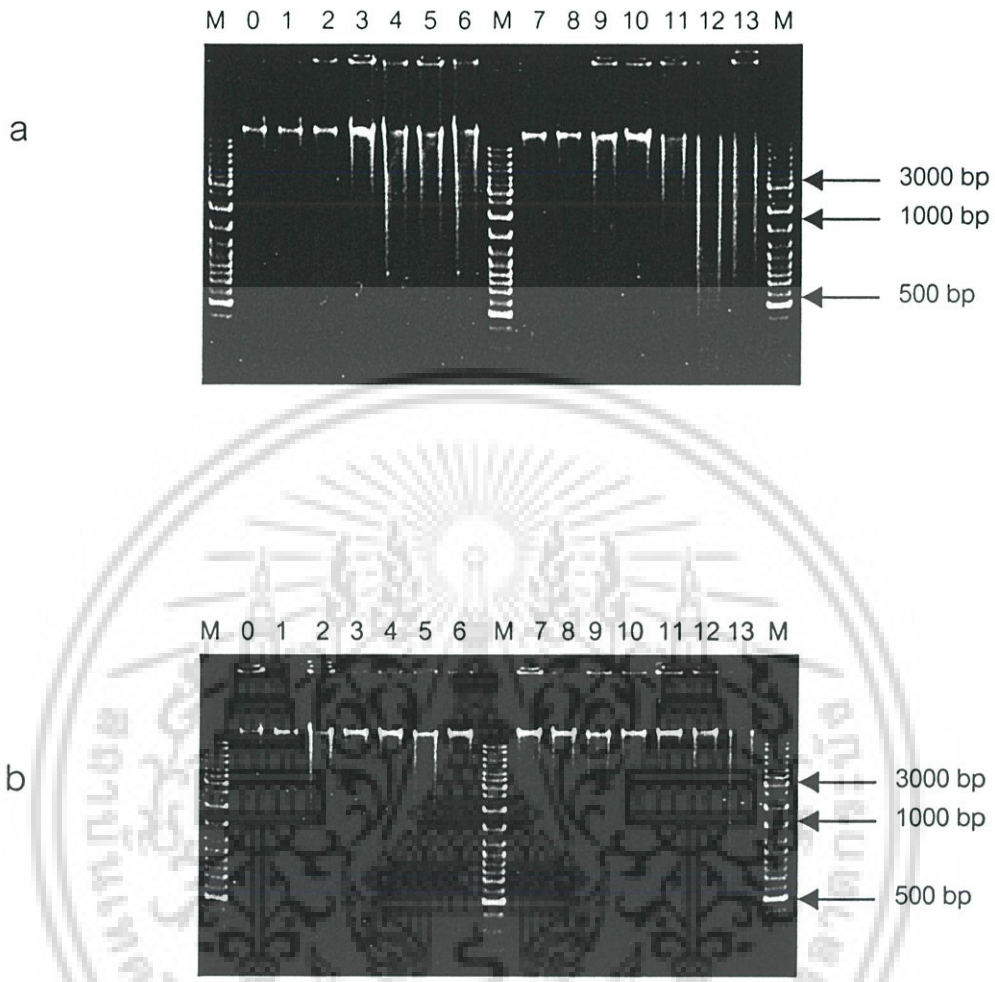
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 คุณภาพของดีเอ็นเอและผลจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

4.2.1 คุณภาพของดีเอ็นเอ

ผลจากการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 และพันธุ์ GC10848 ที่เก็บเกี่ยวที่ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา นำมาเก็บรักษาโดยวิธีธรรมชาติเป็นเวลา 1-6 เดือน และเร่งอายุเป็นเวลา 1-7 วัน พบว่า ดีเอ็นเอของเมล็ดพันธุ์ที่ยังไม่ผ่านการเก็บรักษาและเร่งอายุมีดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีที่สุด ในขณะที่เมล็ดพันธุ์ที่เก็บรักษาโดยวิธีธรรมชาติ ตั้งแต่ 1-6 เดือนมีคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ลดลงตามลำดับ โดยที่เมล็ดพันธุ์ที่เก็บรักษา 1 เดือน คุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จะลดลงเล็กน้อยโดยสังเกตุจากลักษณะที่ปรากฏบนภาพถ่ายของดีเอ็นเอในอาร์กาโรสเจล และคุณภาพของดีเอ็นเอมีการเสื่อมคุณภาพเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆตามระยะเวลาเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น โดยที่ดีเอ็นเอจากเมล็ดพันธุ์ที่เก็บรักษา 6 เดือนจะมีการเสื่อมสภาพเกิดขึ้นมากที่สุด สำหรับเมล็ดพันธุ์ ชม.60 และพันธุ์ GC10848 ที่เร่งอายุ 1-7 วัน พบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอจากเมล็ดพันธุ์ที่เก็บรักษาตามธรรมชาติ คือ เมล็ดพันธุ์ที่ผ่านการเร่งอายุ 1 วัน พบว่าดีเอ็นเอมีการเสื่อมสภาพเกิดขึ้น และลักษณะการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆตามจำนวนวันของการเร่งอายุที่เพิ่มขึ้น และพบว่าดีเอ็นเอจากเมล็ดพันธุ์ที่เร่งอายุ 7 วันเกิดการเสื่อมสภาพมากที่สุด (ภาพที่ 4.6 a และ b)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ดีเอ็นเอ (1 μl จากปริมาณทั้งหมด 50 μl) ที่สกัดจากเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 (a) และพันธุ์ GC10848 (b) จากการเก็บรักษาตามธรรมชาติและเร่งอายุเมล็ดพันธุ์จำนวน 5 เมล็ด ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน (0) ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา, (1) เก็บรักษา 30 วัน, (2) เก็บรักษา 60 วัน, (3) เก็บรักษา 90 วัน, (4) เก็บรักษา 120 วัน, (5) เก็บรักษา 150 วัน, (6) เก็บรักษา 180 วัน, (7) เร่งอายุ 1 วัน, (8) เร่งอายุ 2 วัน, (9) เร่งอายุ 3 วัน, (10) เร่งอายุ 4 วัน, (11) เร่งอายุ 5 วัน, (12) เร่งอายุ 6 วัน, (13) เร่งอายุ 7วัน, M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

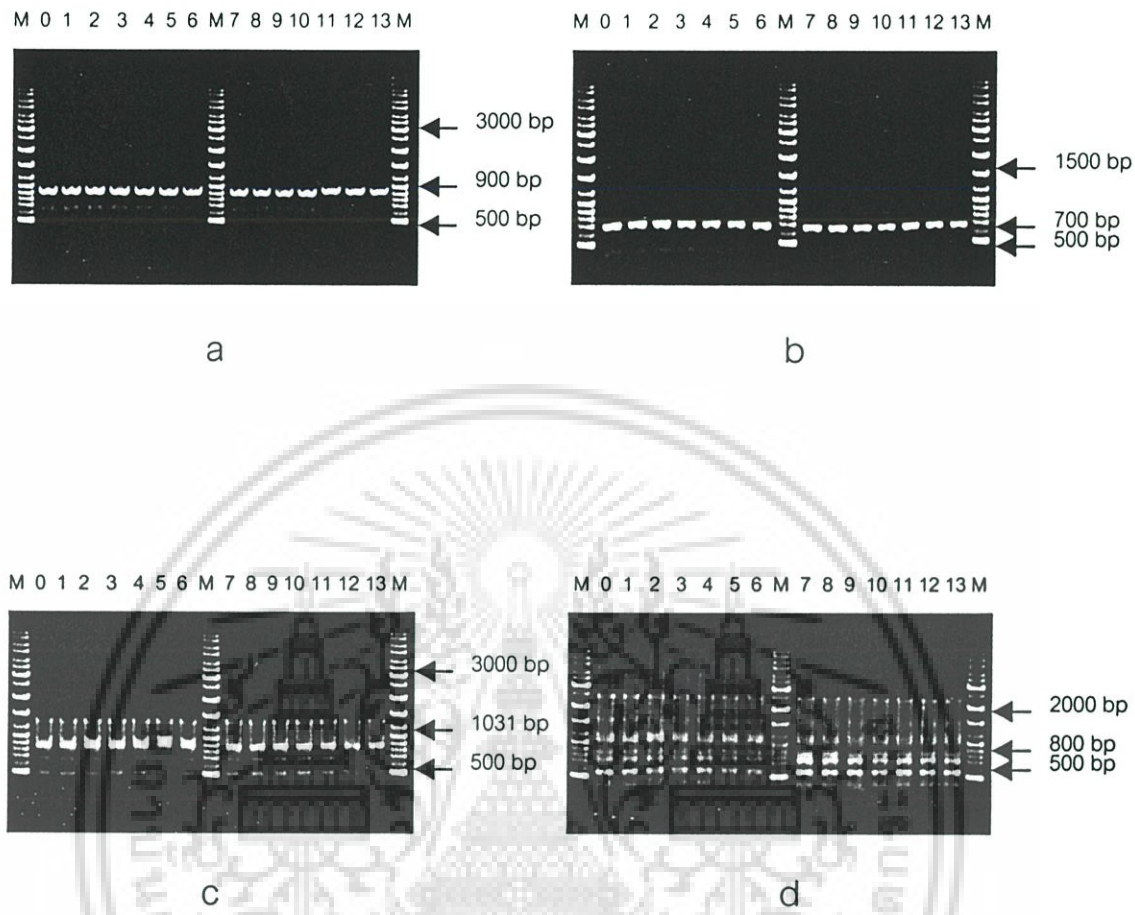
4.2.2 **ผลจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์**

ผลจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ดีเอ็นเอของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 และพันธุ์ GC10848 ทั้งที่ยังไม่ผ่านการเก็บรักษาและเร่งอายุและดีเอ็นเอจากเมล็ดพันธุ์ที่เก็บรักษาตั้งแต่ 1-6 เดือนและเร่งอายุ 1-7 วัน กับ RAPD ไพรเมอร์ 8 ชนิด พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดอยู่ในช่วง 500 bp ถึง 3000 bp (ตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.7-4.10) โดยไม่พบความแตกต่างในปริมาณของผลผลิตพีซีอาร์ในทุกช่วงเวลาที่ทำการศึกษา (ภาพที่ 4.7-4.10)

ตารางที่ 4.7 จำนวนแถบดีเอ็นเอและขนาดประมาณของแต่ละแถบของดีเอ็นเอจากการทำ RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 8 ชนิด กับถั่วเหลืองที่เก็บรักษาโดยวิธีธรรมชาติและเร่งอายุ

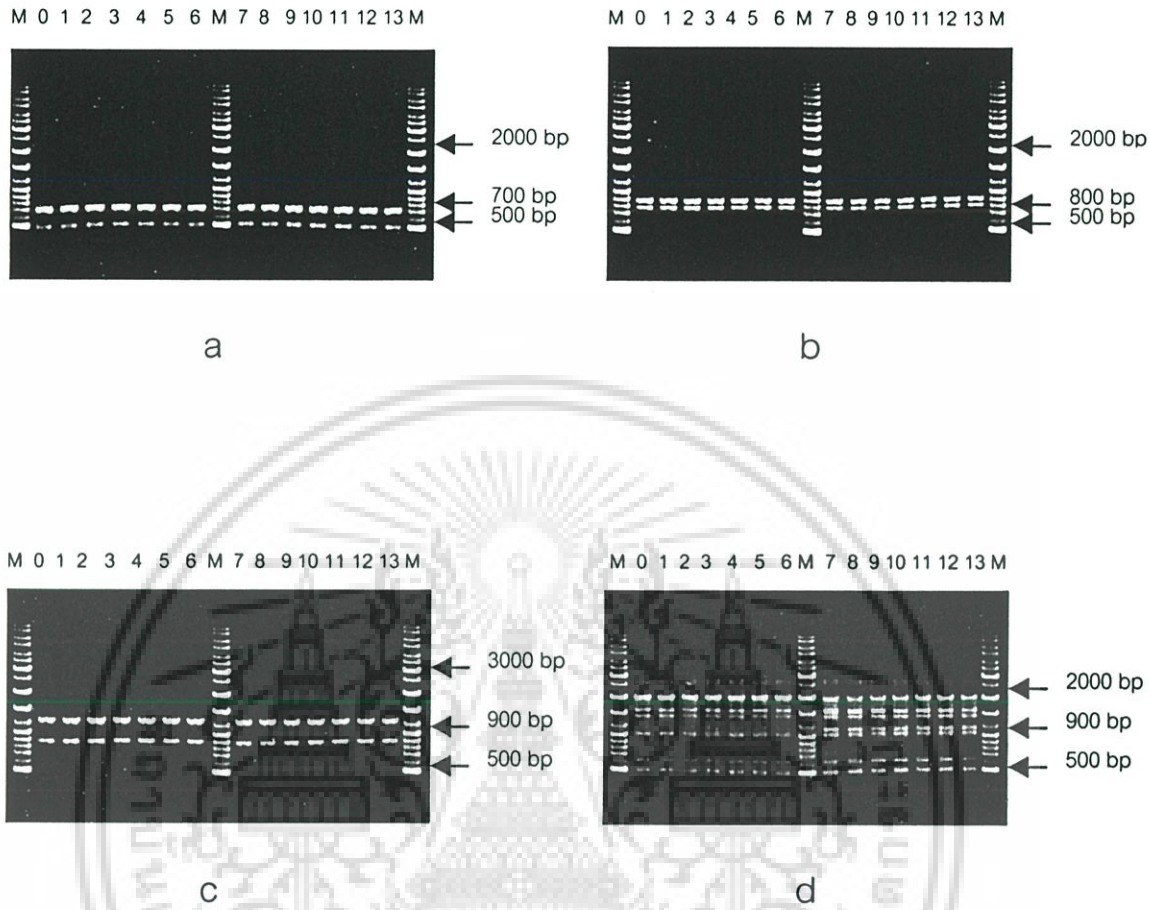
พันธุ์ถั่วเหลือง	ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอ	ขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอ (bp)
ชม.60	D2	1	900
	D12	1	700
	E1	4	500, 700, 800, 1300
	E2	4	600, 700, 1031, 2500
	E5	2	500, 700
	E8	2	800, 900
	E19	2	900, 1200
	Makok9	7	500, 600, 1031, 1200, 1500, 1600, 2000
GC10848	D2	1	900
	D12	1	700
	E1	5	500, 700, 1031, 1400, 1600
	E2	3	900, 1300, 3000
	E5	3	900, 1031
	E8	2	800, 900
	E19	3	900, 1031, 1500
	Makok9	1	500

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



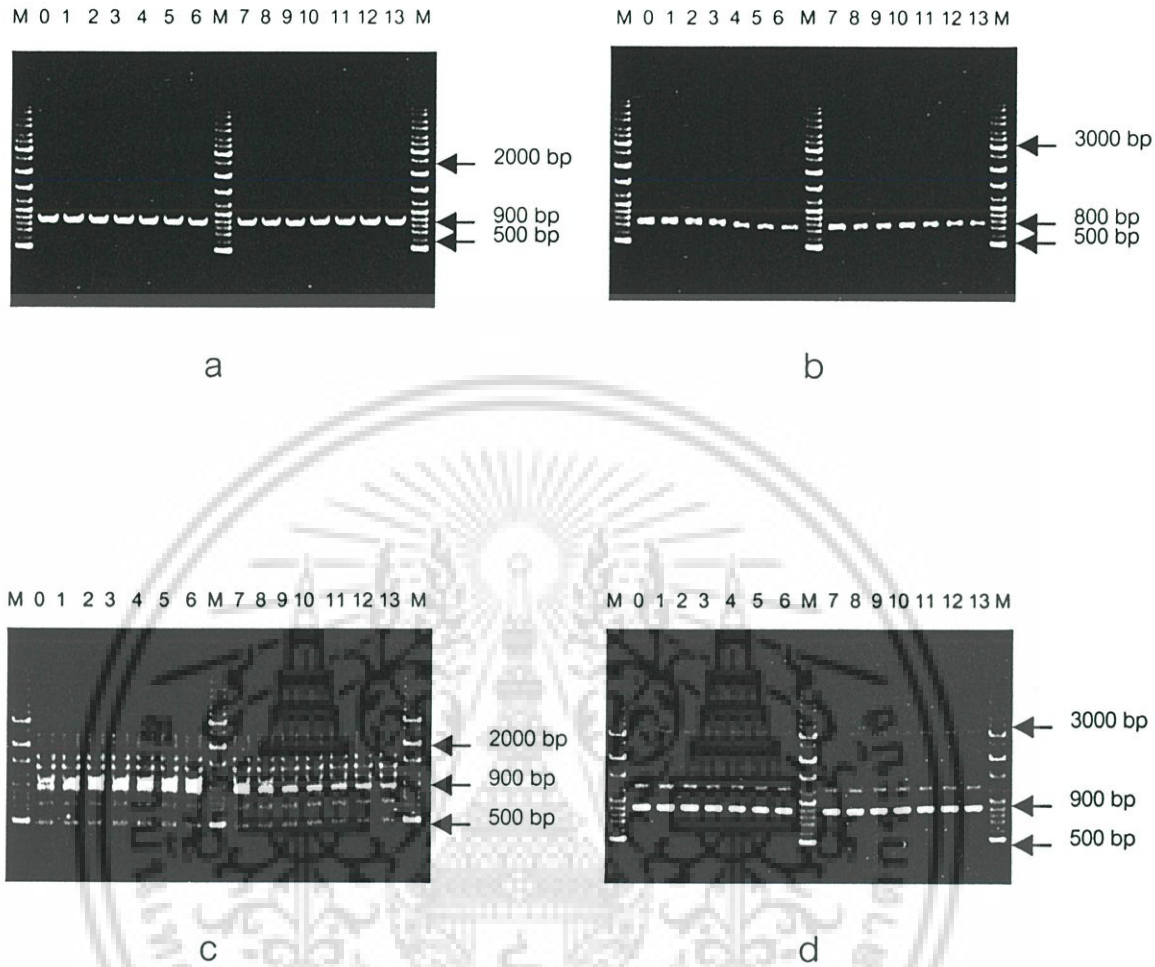
ภาพที่ 4.7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ D2 (a) ไพรเมอร์ D12 (b) ไพรเมอร์ E1 (c) และไพรเมอร์ E2 (d) ในถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 จากการเก็บรักษาโดยวิธีธรรมชาติและการเร่งอายุที่ระยะเวลาต่างๆกัน (0) ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา, (1) เก็บรักษา 30 วัน, (2) เก็บรักษา 60 วัน, (3) เก็บรักษา 90 วัน, (4) เก็บรักษา 120 วัน, (5) เก็บรักษา 150 วัน, (6) เก็บรักษา 180 วัน, (7) เร่งอายุ 1 วัน, (8) เร่งอายุ 2 วัน, (9) เร่งอายุ 3 วัน, (10) เร่งอายุ 4 วัน, (11) เร่งอายุ 5 วัน, (12) เร่งอายุ 6 วัน, (13) เร่งอายุ 7วัน, M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



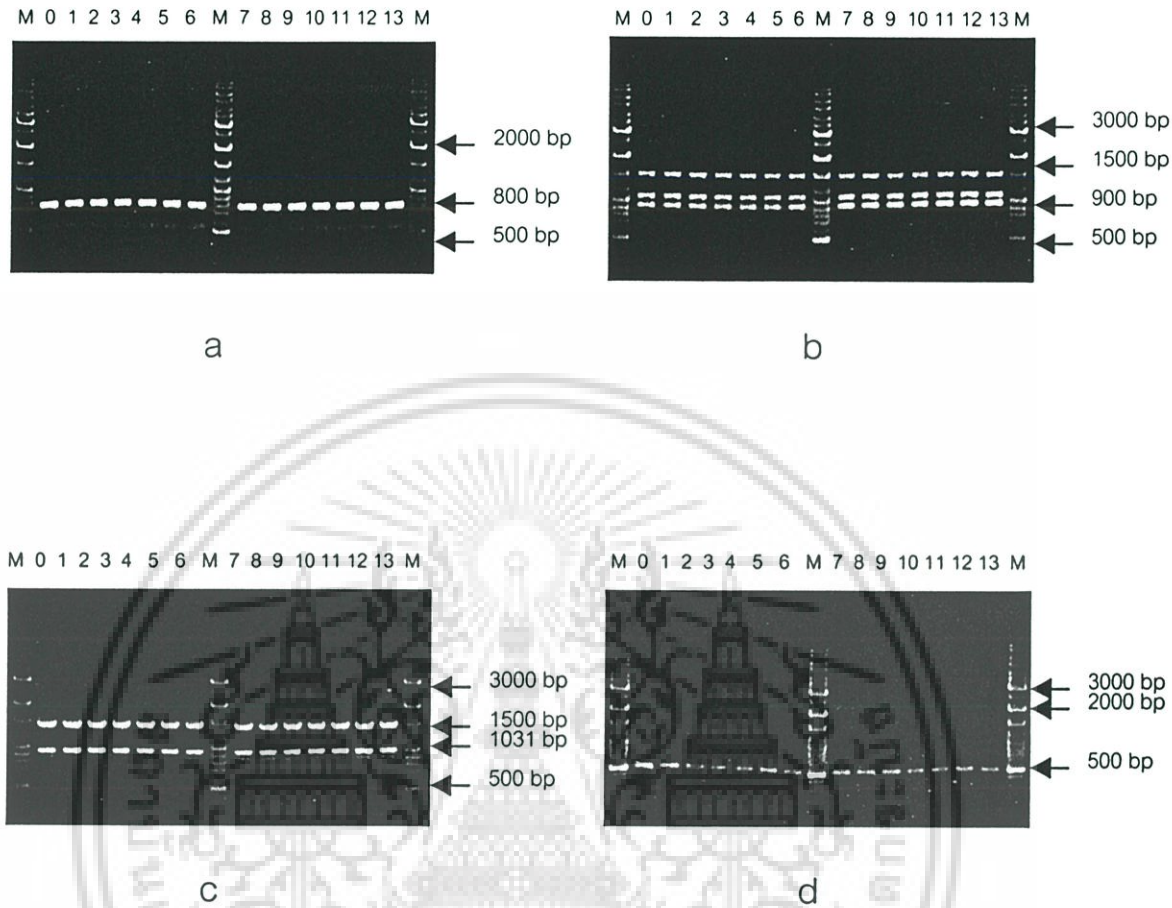
ภาพที่ 4.8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ E5 (a) ไพรเมอร์ E8 (b) ไพรเมอร์ E19 (c) และไพรเมอร์ Makok9 (d) ในถั่วเหลืองพันธุ์ ชม.60 จากการเก็บรักษาโดยวิธีธรรมชาติและการเร่งอายุที่ระยะเวลาต่างๆกัน (0) ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา, (1) เก็บรักษา 30 วัน, (2) เก็บรักษา 60 วัน, (3) เก็บรักษา 90 วัน, (4) เก็บรักษา 120 วัน, (5) เก็บรักษา 150 วัน, (6) เก็บรักษา 180 วัน, (7) เร่งอายุ 1 วัน, (8) เร่งอายุ 2 วัน, (9) เร่งอายุ 3 วัน, (10) เร่งอายุ 4 วัน, (11) เร่งอายุ 5 วัน, (12) เร่งอายุ 6 วัน, (13) เร่งอายุ 7 วัน, M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ D2 (a) ไพรเมอร์ D12 (b) ไพรเมอร์ E1 (c) และไพรเมอร์ E2 (d) ในถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 จากการเก็บรักษาโดยวิธีธรรมชาติและการเร่งอายุที่ระยะเวลาต่างๆกัน (0) ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา, (1) เก็บรักษา 30 วัน, (2) เก็บรักษา 60 วัน, (3) เก็บรักษา 90 วัน, (4) เก็บรักษา 120 วัน, (5) เก็บรักษา 150 วัน, (6) เก็บรักษา 180 วัน, (7) เร่งอายุ 1 วัน, (8) เร่งอายุ 2 วัน, (9) เร่งอายุ 3 วัน, (10) เร่งอายุ 4 วัน, (11) เร่งอายุ 5 วัน, (12) เร่งอายุ 6 วัน, (13) เร่งอายุ 7 วัน, M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไพรเมอร์ E5 (a) ไพรเมอร์ E8 (b) ไพรเมอร์ E19 (c) และไพรเมอร์ Makok9 (d) ในถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 จากการเก็บรักษาโดยวิธีธรรมชาติและการเร่งอายุที่ระยะเวลาต่างๆกัน (0) ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา, (1) เก็บรักษา 30 วัน, (2) เก็บรักษา 60 วัน, (3) เก็บรักษา 90 วัน, (4) เก็บรักษา 120 วัน, (5) เก็บรักษา 150 วัน, (6) เก็บรักษา 180 วัน, (7) เร่งอายุ 1 วัน, (8) เร่งอายุ 2 วัน, (9) เร่งอายุ 3 วัน, (10) เร่งอายุ 4 วัน, (11) เร่งอายุ 5 วัน, (12) เร่งอายุ 6 วัน, (13) เร่งอายุ 7 วัน, M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเมล็ดพันธุ์ ชม.60 อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพหรือมีคุณภาพต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ วันชัย จันทร์ประเสริฐ (2533) และวันชัย จันทร์ประเสริฐ และคณะ (2540) ส่วนเมล็ดพันธุ์ GC10848 มีคุณภาพหรือมีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพดีกว่าเมล็ดพันธุ์ ชม.60 (รัฐ เกาวนันท์. 2540) เนื่องจากความงอกและความแข็งแรงลดลงช้ากว่าเมล็ดพันธุ์ ชม.60 ดังนั้น เมล็ดพันธุ์ทั้ง 2 พันธุ์ซึ่งมีความต่างกันอย่างมากในคุณภาพของเมล็ดพันธุ์จึงนับว่ามีความเหมาะสมในการศึกษาการเสื่อมคุณภาพ

5.1 ความงอก ความมีชีวิต และการรั่วไหลของเมล็ดพันธุ์

การเปลี่ยนแปลงต่างๆของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ทั้ง 2 พันธุ์ภายหลังการเก็บรักษาในสภาพปกติและภายหลังการเร่งอายุ ซึ่งได้แก่ ความงอก ความมีชีวิต รูปแบบการติดสีของ TZ การรั่วไหลและการดูดน้ำ มีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน Buchvarov and Gantcheft (1984) พบว่าความงอกของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองภายหลังการเร่งอายุยาวนานถึง 6 วันและภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ปี แสดงการลดลงในลักษณะที่คล้ายคลึงกันโดยตลอดในระหว่างการเสื่อมคุณภาพ ดังนั้นการศึกษาการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์หรือความสามารถในการเก็บรักษาจึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้การศึกษาการเร่งอายุแทนการเก็บรักษาในสภาพปกติ ทำให้ไม่ต้องรอคอยเป็นระยะเวลานานหลายเดือนหรือหลายปี (Delouche and Baskin. 1973 ; McDonald. 1980) การเปลี่ยนแปลงต่างๆดังกล่าวโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพิ่มขึ้นของการรั่วไหลและการดูดน้ำที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรกที่เมล็ดแช่น้ำ ในขณะที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงในความงอกในระยะแรกของการเก็บรักษาหรือระยะแรกของการเร่งอายุ สิ่งเหล่านี้เป็นการสนับสนุนแนวคิดที่ว่าการเสื่อมของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นสาเหตุเบื้องต้นของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (Parrish and Leopold. 1978 ; Schoettle and Leopold. 1984 ; Ferguson *et al.* 1990)

ในปัจจุบัน lipid peroxidation ได้รับความเชื่อมั่นและอ้างอิงกันมากที่สุดว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (McDonald. 1999) ผลจากปฏิกิริยา lipid peroxidation จะเกิดอนุมูลอิสระซึ่งจะเข้าไปทำความเสียหายกับระบบต่างๆของเซลล์ เช่น ทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ สารพันธุกรรมเสียหาย (genetic damage) ไมโตคอนเดรียเสียหายและเยื่อหุ้มเซลล์เสื่อม เป็นต้น (Halmer and Bewley. 1984 ; Basavarajappa *et al.* 1991 ; McDonald. 1999) การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวจะเป็นผลให้เกิดปรากฏการณ์ทางสรีรวิทยาตามมา เช่น การถอดรหัสผิดพลาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(faulty transcription) เซลล์เกิดการรั่วไหล และ ATP มีปริมาณ ลดลง เป็นต้น ซึ่งในที่สุดก็จะทำให้เมล็ดพันธุ์ไม่สามารถงอกได้ (McDonald. 1999)

ในบรรดาลำดับการเปลี่ยนแปลงต่างๆที่เกิดขึ้นในระหว่างการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์นั้น การเสื่อมของเยื่อหุ้มเซลล์ได้รับการเสนอว่าเป็นปรากฏการณ์แรกสุดซึ่งจะนำไปสู่การสูญเสียความสามารถในการงอก (Delouche and Baskin. 1973) ถ้าการเสื่อมของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นสาเหตุเบื้องต้นที่ทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพหรือสูญเสียความแข็งแรง การรั่วไหลของสารละลายออกมาจากเมล็ดพันธุ์ก็ควรจะแสดงออกมาให้เห็นในระหว่างช่วงแรกที่เมล็ดดูดน้ำ Simon and Raja Harun (1972) ได้เสนอข้อสมมติฐานว่าในขณะที่เมล็ดแห้ง การเรียงตัวของโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์จะไม่อยู่ในลักษณะปกติ เมื่อนำเมล็ดดังกล่าวไปแช่น้ำ การรั่วไหลก็จะเกิดขึ้นโดยทันที เมื่อการดูดน้ำผ่านไประยะหนึ่งเยื่อหุ้มเซลล์ของเมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพดีก็จะมีการจัดเรียงตัวหรือทำการซ่อมแซมตัวเอง (Villiers. 1973 ; Halmer and Bewley. 1984) จึงทำให้เมล็ดพันธุ์มีการรั่วไหลลดน้อยลง ข้อสมมุติฐานนี้จึงใช้อธิบายลักษณะการรั่วไหลในช่วงแรกๆระหว่างการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ที่เสื่อมตามธรรมชาติ (ภาพที่ 4.2) และเสื่อมจากการเร่งอายุ (ภาพที่ 4.4) ดังนั้นการรั่วไหลของเมล็ดพันธุ์ที่ยังคงเพิ่มขึ้นไปโดยตลอดภายหลังช่วงแรกของการแช่น้ำจึงอาจเกิดจากเยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมหรือเสียหายมากจนเกินกว่าที่จะซ่อมแซมตัวเองหรือกลไกการซ่อมแซมได้สูญเสียไป (Berjak and Villiers. 1972) ความเสียหายเช่นนี้ก็จะนำไปสู่การสูญเสียความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ (Villiers. 1973)

นอกจากนี้ลักษณะการดูดน้ำที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรกที่เมล็ดแช่น้ำ (ภาพที่ 4.3 และ 4.5) อาจชี้ให้เห็นถึงการขาดความสามารถในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารละลายหรือความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ (Sreeramulu. 1982 ; Kalpana and Madhava Rao. 1975) ซึ่งสอดคล้องกับการรั่วไหลที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรกที่เมล็ดแช่น้ำ (ภาพที่ 4.2 และ 4.4) ดังนั้นน้ำที่เข้าไปในเซลล์อย่างรวดเร็วก็จะเข้าไปผสมผสานกับสารละลายที่รั่วไหลออกมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ที่เสียหายขององค์ประกอบต่างๆของเซลล์ ทำให้ความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ลดลงหรือสูญเสียไปจนหมดสิ้น (Abdul-Baki.1980)

การย้อมสีเมล็ดพันธุ์ด้วย TZ เป็นการสนับสนุนให้เห็นถึงการเสื่อมของเยื่อหุ้มเซลล์ การเพิ่มขึ้นของสัดส่วนใน TZ2-TZ4 น่าที่จะมีส่วนรับผิดชอบที่ทำให้เมล็ดพันธุ์มีการรั่วไหลเพิ่มขึ้น เพราะสัดส่วนดังกล่าวประกอบด้วยเนื้อเยื่อที่ติดสีแดงเข้มผิดปกติและเนื้อเยื่อไม่ติดสี (เนื้อเยื่อตาย) การติดสีแดงเข้มเกิดจากสารละลาย TZ ซึมเข้าไปภายในเนื้อเยื่อได้เร็วและลึก เป็นการบ่งชี้ให้เห็นว่าเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่ยังมีชีวิตได้รับความเสียหายประกอบเข้ากับเนื้อเยื่อที่ตาย จึงทำให้ทั้งการรั่วไหลและการดูดสารเคมีเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว (Powell and Matthews. 1977)

ดังนั้นในระหว่างการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ไม่ว่าจะเกิดขึ้นโดยการเร่งอายุหรือเสื่อมตามธรรมชาติ มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในด้านความงอก ความมีชีวิต และการรั่วไหล โดยเฉพาะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างยิ่งการเสื่อมของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งก่อให้เกิดการรั่วไหล อาจเป็นสาเหตุเบื้องต้นของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ เพราะเกิดขึ้นก่อนที่จะมีการสูญเสียความงอก

5.2 การเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ

อนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยา lipid peroxidaion นอกจากจะทำความเสียหายให้เกิดกับเยื่อหุ้มเซลล์แล้ว ยังทำให้ดีเอ็นเอได้รับความเสียหายอีกด้วย (Cheah and Osborne. 1978 ; Coolbear. 1995 ; McDonald. 1999) ความเสียหายที่เกิดกับสารพันธุกรรมนี้ก็ได้รับการอ้างอิงมากที่สุดเช่นเดียวกันกับการเสื่อมของเยื่อหุ้มเซลล์ว่าอาจเป็นสาเหตุเบื้องต้นของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (Coolbear. 1995) Cheah and Osborne (1978) ยืนยันการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเออาจเป็นสาเหตุเบื้องต้นที่ทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพและทำให้ความงอกของเมล็ดพันธุ์ลดลงในขณะที่มีต้นกล้าผิดปกติเพิ่มมากขึ้น

ภายหลังที่ McDonald *et al.* (1994) ได้พัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยตรงจากเมล็ด การศึกษาเกี่ยวกับกลไกการเสื่อมคุณภาพเมล็ดในระดับโมเลกุลก็มีมากขึ้น Shatters *et al.* (1995) พบความแตกต่างในรูปแบบ RAPD ในตัวอย่างเมล็ดที่มีการเร่งอายุซึ่งทำให้เชื่อว่าการเปลี่ยนแปลงในดีเอ็นเอที่วิเคราะห์โดยเทคนิค RAPD จะสามารถใช้เป็น Marker เพื่อติดตามเหตุการณ์การเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเสื่อมของเมล็ดได้ แต่ก็มีผลการทดลองที่ขัดแย้งกัน เช่นผลการทดลองของ Zhang *et al.* (1996) ซึ่งไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการเสื่อมของเมล็ดและรูปแบบ RAPD โดยที่ Marcos-Filho and McDonald (1998) ได้รายงานภายหลังว่า การสลายตัวของดีเอ็นเอซึ่งตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิค RAPD เกิดขึ้นภายหลังการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและสรีรวิทยาในเมล็ด อย่างไรก็ตาม RAPD marker เป็น marker ที่อาศัยหลักการของเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีปริมาณเริ่มต้นเพียงเล็กน้อยได้ แต่ปัญหาของพีซีอาร์คือปริมาณดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณภายหลังการทำพีซีอาร์ไม่ได้สะท้อนถึงปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้น ทำให้ไม่สามารถบอกถึงปริมาณเริ่มต้นที่ต่างกันได้อันเนื่องมาจาก "plateau phase" ของพีซีอาร์ซึ่งเกิดจากองค์ประกอบจำเป็นในปฏิกิริยาลดลง เช่น ปริมาณและคุณภาพของเอนไซม์โพลิเมอร์เรส ไพรเมอร์ นิวคลีโอไทด์ และการจับคู่กันเองระหว่างดีเอ็นเอเส้นใหม่ เป็นผลให้การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอไม่เป็นไปตามอัตรา 2^n เช่นในช่วงแรกๆของปฏิกิริยา การหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณดีเอ็นเอที่เหลืออยู่ภายหลังการเสื่อมสลายของดีเอ็นเอและระยะเวลาการเก็บรักษาจึงเป็นไปได้ยาก

จากผลของ plateau phase ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังกล่าว หากลดจำนวนรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ลงโดยอาจใช้จำนวนรอบของพีซีอาร์ตั้งแต่ 5 รอบและค่อยๆเพิ่มจำนวนรอบของปฏิกิริยาขึ้นไปเรื่อยๆแล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแต่ละจำนวนรอบที่กำหนดเพื่อหาจำนวนรอบที่เหมาะสม อาจทำให้เห็นความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณดีเอ็นเอยังเป็นไปตามอัตรา 2^n แต่ละตัวอย่างและยังไม่ถูกจำกัดด้วยองค์ประกอบที่จำเป็นที่ต้องใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ นอกจากนี้เทคนิค competitive PCR ซึ่งเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นได้ (Studer *et al.* 1998) โดยอาศัยหลักการที่ใส่ดีเอ็นเอที่รู้ความเข้มข้นที่เรียกว่า competitor และมีลำดับเบสของตำแหน่งที่ไพรเมอร์จับเช่นเดียวกับดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการเพิ่มปริมาณเริ่มต้นในตัวอย่างที่เรียกว่า target DNA ดีเอ็นเอจากทั้งสองแหล่งจะถูกเพิ่มปริมาณไปด้วยกันและจะแข่งขันกันสำหรับไพรเมอร์ เป็นผลให้สามารถประเมินปริมาณของดีเอ็นเอเริ่มต้นในตัวอย่างที่ต้องการศึกษาได้ competitive PCR นิยมใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนและประเมินจำนวน copy ของยีนโดยเฉพาะจำนวน transgene ในจีโนม (Callaway *et al.* 2002) ใช้เทคนิค competitive PCR-based method ในการตรวจสอบและหาปริมาณของดีเอ็นเอของเชื้อ *Erwinia caratovora* subp. *atroseptica* (Eca) ในหัวมันฝรั่ง ผลที่ได้สอดคล้องกับวิธีนับจำนวนโคโลนี (colony count) ใน crystal violet pectate medium และวิธี immunofluorescence colony straining (Hyman *et al.* 2000) การวิเคราะห์ gene expression โดยการใช้วิธี competitive PCR ร่วมกับเทคนิค reverse transcription ซึ่งสามารถหาปริมาณของยีนรูปแบบต่างๆ (alleles) ได้ทั้งจาก heterozygotes และ alternatively spliced genes (Chunming and Charles. 2003) จึงน่าจะมีการพัฒนา competitor ที่เป็นส่วนประกอบของยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลา โดยอาจจะเป็น housekeeping gene ในนิวเคลียสหรือยีนในคลอโรพลาสต์และในไมโตคอนเดรียซึ่งเป็นแหล่งพลังงานหลักมาเป็นตัวตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอว่ามีการเสื่อมไปในระหว่างการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดมากน้อยเพียงใดและเกิดขึ้นกับดีเอ็นเอใน organelle ใดก่อน ซึ่งปริมาณและความสำคัญของดีเอ็นเอหรือยีนที่มีอยู่ในแต่ละ organelle มีความแตกต่างกัน โดยที่ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย เป็นแหล่งสำคัญในการสังเคราะห์พลังงาน ดีเอ็นเอในนิวเคลียสเป็นบริเวณที่มียีนหรือดีเอ็นเออยู่มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองโดยการเร่งอายุและการเสื่อมตามธรรมชาติต่อการเปลี่ยนแปลงของความงอก ความมีชีวิต เยื่อหุ้มเซลล์และดีเอ็นเอ สรุปได้ดังนี้

1) เมล็ดพันธุ์ GC10848 มีแนวโน้มที่จะมีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพไม่ว่าจะโดยการเร่งอายุหรือจากการเก็บรักษาตามธรรมชาติดีกว่าเมล็ดพันธุ์ ชม.60 ไม่ว่าจะเป็นในด้านความงอก ความมีชีวิต ความสามารถในการควบคุมการเข้าออกของสารละลายในเยื่อหุ้มเซลล์

2) การเร่งอายุสามารถใช้แทนการเก็บรักษาในสภาพธรรมชาติ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ของความงอก ความมีชีวิต รูปแบบการติดสีของ TZ การรั่วไหลและการดูดน้ำ ลดลงในลักษณะที่คล้ายคลึงกันในระหว่างการเสื่อมคุณภาพ

3) การเสื่อมของเยื่อหุ้มเซลล์อาจเป็นสาเหตุเบื้องต้นของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์เพราะเมล็ดพันธุ์แสดงการรั่วไหลและการดูดน้ำเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรกที่เมล็ดแช่น้ำ ในขณะที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงในความงอกในระยะแรกของการเก็บรักษาหรือระยะแรกของการเร่งอายุ

4) คุณภาพของดีเอ็นเอเสื่อมไปตามระยะเวลาการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์และการเร่งอายุที่เพิ่มขึ้น

5) การใช้เทคนิค RAPD ในการตรวจสอบการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในช่วงเวลาการเก็บรักษาและการเร่งอายุต่างๆให้ผลไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากเทคนิค RAPD อาศัยหลักการของเทคนิค PCR ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นได้เพียงเล็กน้อยโดยไม่สะท้อนให้เห็นถึงปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่แตกต่างกัน เทคนิค competitive PCR ที่นิยมใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนน่าจะเป็นวิธีการหนึ่งที่นำมาใช้ในการตรวจสอบการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ได้ดีในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

จวงจันทร์ ดวงพัตรา. 2529. **เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 210 น.

ธวัชชัย ทีฆชุนหเถียร. 2540. **เทคโนโลยีการเก็บเกี่ยว**. คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. นครราชสีมา. 228 น.

วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2533. "การศึกษาความงอก ความแข็งแรงและความสามารถในการเก็บรักษาของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง 18 สายพันธุ์." **วารสารเกษตรศาสตร์**. 24 : 261-267.

วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2537 . **สรีรวิทยาเมล็ดพันธุ์**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วันชัย จันทร์ประเสริฐ และคณะ. 2540. "การเสื่อมคุณภาพในแปลงและลักษณะทางกายภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง 10 พันธุ์". หน้า 296-302. ใน **รายงานการประชุมทางวิชาการถั่วเหลืองแห่งชาติ ครั้งที่** 6. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วินิตชาญ รื่นใจชน. 2540 ."การใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการจัดจำแนกและตรวจหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์หญ้าแฝกในประเทศไทย." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาพันธุศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธุ์. 2538. "เทคนิคการจำแนกพันธุ์พืชด้วยวิธี RAPD." หน้า 39-60. ใน **เอกสารประกอบการ ศึกษาอบรมทางวิชาการการตรวจแยกสายพันธุ์พืชด้วยการใช้** Isozyme pattern **และ** RAPD. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.นครปฐม.

รัฐ เกาวนันทน์ . 2546."ความแตกต่างของพันธุ์ถั่วเหลืองในด้านคุณภาพและคุณสมบัติทางกายภาพของเมล็ดพันธุ์ต่อความต้านทานของการเสื่อมคุณภาพในแปลง." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชไร่ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Abdul-Baki, A.A. 1980. "Biochemical aspects of seed vigor". **HortScience**. 15 : 765-770

Allen, L.H. and Boote, K.J. 2000. "Crop ecosystem responses to climatic changes : soybean." Pages 133-160. In K.R. Reddy and H.F. Hodges, ed. **Climatic Changes and Global Crop Productivity**. CABI Publ. NewYork.

Andrews, C.H. 1966. "Some aspects of pod and seed development in Lee soybeans." **Ph.D.Thesis.** Mississippi State University.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Andrews, C.H. 1982. "Preharvest environment : weathering." Pages 19-25. In J.B. Sinclair and J.A. Jacobs, eds. **Soybean Seed Quality and Stand Establishment**. Proceedings of a Conference for Scientists of Asia. INTSOY Series No.22. University of Illinois, Urbana-Champaign, Illinois.

Anonymous. 1976. "International rules for seed testing." **Seed Sci. and Technol.** 4(1) : 3-177.

Anonymous. 1983. "Seed vigor testing handbook." **Assoc. of Off. Seed Analyst**. USA.

Anonymous. 1996. "International rules for seed testing." **Seed Sci. and Technol.** 24 . Supplement

AOSA . 1983. "Seed Vigor Testing Handbook." Contribution. No. 32 . **Assoc. of Off. Seed Analyst**. USA.

Basavarajappa, .B.S. *et al.* 1991. "Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated aging of maize seeds". **Seed Sci. and Technol.** 19 : 279-286.

Berjak, P. and Villiers, T.A. 1972. "Ageing in plant embryos. II. Age induced damage and its repair during early germination." **New Phytologist.** 71 : 135-144.

Bewley, J.D. and Black, M. 1982. "Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Vol.2. Viability, dormancy and environment control." Springer-Verlag, Berlin.

Bewley, J.D. and Black, M. 1994. "Cellular events during germination and seedling growth." Pages 147-197. In J.D.Bewley and M. Black, eds. **Seeds : Physiology of Development and Germination**. New York : Plenum Press.

Bhatia, V.S., *et al.* 1993. "Effect of field weathering on soybean CV. Panjab1 and JS 71-05." **Seed Res.** 21 : 92-93.

Buchvarov, P. and Gantcheff, Ts . 1984. "Influence of accelerated and natural aging on free radical levels in soybean seeds." **Physiol. Plant** . 60 : 53-56.

Byrd, H.W. 1970. "Effect of deterioration in soybean seed on storability and field performance." **Ph.D. Thesis**. Mississippi State Univ. State Collage.

Callaway, A.S. *et al.* 2002. "High-throughput transgene copy number estimate by competitive PCR". **Plant Mol. Bio. Rep.** 20 : 265-277.

Cheah, K.S.E, and Osborne, D.J. 1978. "DNA lesions occur with loss of viability in embryos of aging rye seed." **Nature.** 272 : 629-641.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ching, T.M. 1972. "Aging stress on physiologcal and biochemical activities of Crimson Clover (*Trifolium incarnatum* L.var.*Dixie*) seeds." **Crop Sci.** 12 : 415-418.

Ching, T.M. 1973. "Biochemical aspect of seed vigor." **Seed Sci. and Technol.** 1 : 73-88.

Ching, T.M. and School-Craft, I. 1968. "Physioligical and chemical differences in aged seeds." **Crop. Sci.** 8 : 407-409.

Chowdhury, A.K. *et al.* 2000. "Identification of cultivars of vegetable soybeans [*Glycine max* (L.) Merr.] by RAPD markers." **SABRAO J. Breed. Genet.** 32 : 63-72.

Chunming, D. and Charles, R.C. 2003. "A high-throughput gene expression analysis technique using competitive PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight Ms." **Appl. Bio. Sci.** 100 : 3059-3064.

Coolbear, P. 1995. "Mechanisms of seed deterioration ." Pages 223-277. In A.S. Basra, ed. **Seed Quality : Basic Mechanisms and Agricultural Implications.** New York : Food Product Press, an imprint of the Haworth Press, Inc.

Copeland, L.O. and McDonald, M.B. 1995. **Principles of Seed Science and Technology.** 322 p. 2nd ed. Burgress Publishing Company. Minneapolis. MN.

Cruz-Garcia, F. *et al.* 1995. "Seed deterioration and respiration as related to DNA metabolism in germinating maize." **Seed Sci. and Technol.** 23 : 477-486.

Dellaporta, S.L. *et al* . 1983. "A plant DNA minipreparation : Version II." **Plant Mol. Biol. Rep.** 1:19-21.

Delouche, J.C. 1974. "Maintaining soybean seed quality." Pages 46-61. In **Soybean Production, Marketing, and Use.** Bull. Y-19. TVA. Muscle Shoals. Ala.

Delouche, J.C. 1975. "Seed quality and storage of soybeans." Pages 86-107. In D.K Whingham, ed. **Proceeding : Soybean Production, Protection and Utilization.** INTSOY Series No. 6 University of Illinois : Urbana-Champing.

Delouche, J.C. 1980. "Environmental effects on seed development and seed quality." **HortScience.** 15 : 775-780.

Delouche, J.C. 1982. "Physiological changes during storage that affect soybean seed quality." Pages 57-66. In J.B. Sinclair and J.A. Jackobs, eds. **Soybean Seed Quality and Stand Establishment.** Proceeding of a Conference for Scientists of Asia. INTSOY Series No.22. University of Illinois, Urbana-Champaign.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Delouche, J.C. and Baskin, C.C. 1973. "Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots." **Seed Sci. and Technol.** 1 : 427-452.

Dornbos, D.L., Jr. 1995. "Production environment and seed quality." Pages 119-152. In A.S.Basra, ed. **Seed Quality : Basic Mechanisms and Agricultural Implications.** Food Product Press, an imprint of The Haworth Press, Inc., New York.

Edje, O.T. and Burris, J.S. 1970. "Seedling vigor in soybeans." **Proc. Assoc.of Off. Seed Anal.** 60 :149-157.

Egli, D.B. 1998. **Seed Biology and The Yield of Grain Crops.** UK : CAB International.

Escoar, R. 1983. "Comparison of some method for the evaluation of germination in seed of maize (*Zea mays* L.)." **Field Crop Abstr.** 36 (7) : 548.

Ferguson, J.M. *et al.* 1990. "Changes during early soybean seed and axes deterioration : I. seed quality and mitochondrial respiration." **Crop Sci .** 30 : 175-179.

Ghosh, B. and Choudhury, M.M. 1984. "Ribonucleic acid breakdown and loss of protein synthesis capacity with loss of viability of rice embryos (*Oryza sativa*)." **Seed Sci. and Technol.** 12 : 669-677.

Grabe, D.F . 1976. "Measurement of seed vigor." **J. Seed Technol.** 1(2) : 18-22.

Grabe, D.F. 1965. "Prediction of the relative storability of corn seed lots." **Proc.of Assoc. of Off. Seed Anal.** 55 : 92-96.

Grilli, I. *et al.* 1982. "Influence of age and storage temperature on RNA metabolism in durum wheat seeds." **Z. Pflanzenphysiol.** 107 : 211-221.

Grille, J.J.P. and Joenje, H. 1991. "Biological significance of oxygen toxicity : An introduction." Pages 1-32. In C. Vigo-Pelfrey, ed. **Membrane Lipid Oxidation.** CRC Press. Boca Raton.

Halmer, p. and Bewley, J.D. 1984. "A physiological perspective on seed vigor testing." **Seed Sci. and Technol.** 12 : 561-575.

Harman, G.E. and Granett , A.L. 1972. "Deterioration of stored pea seed : Changes in germination membrane permeability and ultrastructure resulting from infection by *Aspergillus ruber* and from aging." **Physiol. Plant. Pathol.** 2 : 271-278.

Harrington, J.F. 1972. "Seed storage and longevity." Pages 145-245. In T.T. Kozlowski, ed. **Seed Biology.** Vol.3. New York : Academic Press, Inc.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hartwig, E.E. and Potts, H.C. 1987. "Development and evaluation of impermeable seed coat for preserving seed quality." **Crop. Sci.** 27 : 506-509.

Hyman, L.J. *et al.* 2000. "A competitive PCR-based method for the detection and quantification of *Erwinia caratovora* subsp. *astroseptica* on potato tuber." **Letters in Appl. Microbio.** 30 : 330-335.

ISTA . 1985 . "International rules for seed testing." **Seed Sci. and Technol.** 13 : 299-355.

Justice, O.L. and Bass, L.N. 1979. **Principles and Practices of Seed Storage.** London : Castle House Publications Ltd.

Koostra, P.T. and Harrington, J.F. 1969. "Biological effects of age on membranal lipids of *Cucumis sativa* L. seed." **Proc.of Assoc. of Off. Seed Anal.** 36 : 329-340.

Kulick, M.M and Yaklich, R.W. 1991. "Soybean seed coat structures : relationship to weathering resistance and infection by the fungus *Phomopsis phaseoli* ." **Crop. Sci.** 31 : 108-113.

Larson, R.A. 1997. **Naturally Occurring Antioxidants.**" Lewis Publ.Boca Raton.

Loeffler, T.M *et al.* 1988. "The bulk conductivity test as an indicator of soybean seed quality." **J. of Seed Technol.** 12 : 37-53.

Marcos-Filho, J. and McDonald, M.B. 1998. "Sensitivity of RAPD analysis, germination and vigour tests to detect the intensity of deterioration of naturally and artificially aged soybean seeds." **Seed Sci. and Technol.** 26 : 141-157.

Mason, S.C. *et al.* 1982. "Standard, cold, and tetrazolium germination test as estimates of field emergence of mechanically damage soybean seed." **Agron. J.** 74 : 546-550.

Matthews, S. and Powell, A.A. 1981. "Electrical conductivity test." Pages 37-42. In D.A.Perry, ed. **Handbook of Vigor Test Methods.** Zurich : ISTA

McDonald, M.B. , Jr. 1980. "A review and evaluation of seed vigor tests." **Proc. Assoc.Off. Seed Analysis.** 65 : 109-139.

McDonald, M.B. 1999. "Seed deterioration : physiology, repair and assessment." **Seed Sci. and Technol.** 27 : 177-237.

McDonald, M.B. and Nelson, C. J. 1986. "Physiology of seed deterioration." **Crop. Sci. Society of America.** Special Publication No.11. Madison. WI

McDonald, M.B. and Phaneedranath, B.R. 1978. "A modified accelerated aging seed vigor test for soybean." **J. Seed Technol.** 3(1) : 27-37.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

McDonald, M.B. and Wilson, D.O. 1980. "ASA- 610 ability to detect changes in soybean seed quality." **J. Seed Technol.** 5 : 56-66.

McDonald, M.B. *et al.* 1994. "DNA extraction from dry seeds for RAPD analysis in varietal identification studies." **Seed Sci. and Technal.** 22 : 171-176.

Murata, M. *et al.* 1980. "Mitotic delay in root tips of peas induced by artificial seed aging." **Bot. Gazette.** 141 : 19-23.

Nair, S. *et al.* 1995. "DNA markers tightly linked to a gall midge resistance gene (Gm_2) are potentially useful for marker-aided selection in rice breeding." **Theor. Appl. Genet.** 91 : 68-73.

Osborne, D.J. *et al.* 1980/81. "Study on DNA integrity and DNA repair in germinating embryos of rye (*Secale cereale*)." **Israel J. of Bot.** 29 : 259-272.

Parrish, D.J. and Leopold, A.C. 1978. "On the mechanism of aging in soybean seeds." **Plant Physiol.** 61 : 365-368.

Peumans, W.J and Carlier, A.R. 1981. "Loss of protein synthesis activity in aging wheat grains : Lesions in the initiation process and in RNA degradation." **Biochem. Physiol.** 176 : 384-395.

Pollock, B.M. *et al.* 1969. "Vigor of garden bean seeds and seedling influence by initial seed moisture, oxygen and imbibition temperature." **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 94 : 577-584.

Powell, A.A. 1988. "Seed vigor and field establishment." **Adv. Res. and Technol. seeds.** 11 : 29-61.

Powell, A.A. and Matthews, S. 1977. "Deteriorative changes in pea seeds (*Pisum sativum* L.) stored in humid or dry condition." **J. Exp. Bot.** 28 : 225-243.

Pristley, D.A. 1986. **Seed Aging.** Comstock Publishing Associates. Ithaca. NewYork.

Priestley, D.A. and Leopold, A.C. 1979. "Absence of lipid oxidation during accelerated aging in soybean seeds." **Plant Physiol.** 63 : 726-729.

Robert, E.H. 1973. "Predicting the storage life of seeds." **Seed Sci. and Technol.** 1 : 499-514.

Ragus, L.N. 1987. "Role of water absorbing capacity in soybean germination and seedling vigour." **Seed Sci. and Technol.** 15 : 285-296.

Schoettle, A.W. and Leopold, A.C. 1984. "Solute leakage from artificially aged soybean seeds after imbibition. **Crop Sci.** 24 : 835-828.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shatters, R.G. *et al.* 1995. "Environmentally induced polymorphisms detected by RAPD analysis of soybean DNA." **Seed Sci. Res.** 5 : 109-116.

Simon, E.W. and Raja Harun, R.M. 1972. "Leakage during seed imbibition." **J. Exp. Bot.** 23 : 1076-1085.

Smith, M.T. and Berjak, P. 1995. "Deteriotic change associated with the loss of viability of stored dessication-sensitive seed." Pages 701-746. In J. Kiegel, ed. **Seed Development and Germination.** New York . Marcel Dekker Inc.

Stewart, R.C. and Bewley, J.D. 1980. "Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes." **Plant Physiol.** 65 : 245-248.

Studer, E. *et al.* 1998. "Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize." **Zeitschrift Lebensm Unters Forsch.** 207 : 207.

Tekrony, M.D. *et al.* 1979. "Physiological maturity in soybeans." **Agron. J.** 71 : 771-775.

Tekrony, M.D. *et al.* 1980. "Effects of field weathering on the viability and vigor of soybean seed." **Agron. J.** 72 : 749-753.

Tekrony, M.D. *et al.* 1987. "Seed production and technology." Pages 275-357. In J.R.Wilcox, ed. **Soybeans : Improvement, Production, and Uses.** Agronomy Monograph No. 16. ASA-CSSA-SSSA, Madison, Wisconsin.

Verma, S.K. and Singh, N. 1999. "Random amplified polymorphic DNA analysis of Indian scented basmati rice (*Oryza sativa* L.) germplasm for identification of viability and duplicate accessions, if any." **Electrophoresis.** 20 : 1786-1789.

Viera, R.D. *et al.* 2001. "Electrical conductivity of soybean seeds after storage in several environments." **Seed Sci. and Technol.** 29 : 599-608.

Villiers, T.A. 1973. "Aging and longevity of seeds in field conditions." Pages 265-288. In W. Heydecker, ed. **Seed Ecology.** Butterworth. London.

Virk, P.S. *et al.* 1995. "The identification of duplicate accession within a rice germplasm collection using RAPD analysis. **Theor. Appl. Genet.** 99 : 1049-1053.

Wahab, A.H. and Burris, J.S. 1971. "Physiological and chemical differences in low and high quality soybean seed. **Proc. Assoc. Off. Seed. Anal.** 61 : 58-67.

William, J.G.K. *et al.* 1990. "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers." **Nucleic Acids Res.** 18 : 6531-6535.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Woodstock, L.W. 1973. "Physiological and biochemical tests for seed vigor." **Seed Sci. and Technol.** 1 : 127-157.

Woodstock, L.W. and Feelay, J. 1965. "Early seedling growth and initial respiration rates as potential induces of seedling vigour in corn." **Proc. Assoc. Off. Seed Anal.** 55 : 131-139.

Woodstock, L.W. and Grabe, D.F. 1967. "Relationship between seed respiration during imbibition and subsquent seedling growth in *Zea mays* L." **Plant Physiol.** 42 : 1071-1076.

Yaklich, R.W. and Abdul-Baki, A.A. 1975. "Viability in metabolism of individual axes of soybean and its relationship to vigor." **Crop Sci.** 15 : 424-426.

Zhang, J. *et al.* 1996. "RAPDs from seeds of differing soybean and maize genotypes." **Seed Sci. and Technol.** 24 : 513-522.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ผ.1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนความงอกของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เก็บรักษาด้วยวิธีธรรมชาติ

Source	df	SS	Ms	F	F Table	
					0.05	0.01
Model	6	31608.50	5268.08	55.91**	2.57	3.81
Error	21	1978.75	94.22			
Corrected Total	27	33587.25				

CV. = 19.51

ตารางที่ ผ.2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เก็บรักษาด้วยวิธีธรรมชาติ

Source	df	SS	Ms	F	F Table	
					0.05	0.01
Model	6	32987.43	5497.90	174.93**	2.57	3.81
Error	21	660.00	31.43			
Corrected Total	27	33647.43				

CV. = 8.26

ตารางที่ ผ.3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าการนำไฟฟ้าของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เก็บรักษาด้วยวิธีธรรมชาติ

Source	df	SS	Ms	F	F Table	
					0.05	0.01
Model	6	61966.60279	10327.76713	139.33**	2.57	3.81
Error	21	1556.62922	74.12520			
Corrected Total	27	63523.23201				

CV. = 5.793098

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ผ.4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เก็บรักษาด้วยวิธีธรรมชาติ

Source	df	SS	Ms	F	F Table	
					0.05	0.01
Model	6	23635.63794	3939.27299	29.07**	2.57	3.81
Error	21	2845.8672	135.51749			
Corrected Total	27	26481.50514				

CV. = 5.237918

ตารางที่ ผ.5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนความงอกของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 ที่เก็บรักษาด้วยวิธีธรรมชาติ

Source	df	SS	Ms	F	F Table	
					0.05	0.01
Model	6	7190.86	1198.48	19.36**	2.57	3.81
Error	21	1300.00	61.90			
Corrected Total	27	8490.86				

CV. = 11.64

ตารางที่ ผ.6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 ที่เก็บรักษาด้วยวิธีธรรมชาติ

Source	df	SS	Ms	F	F Table	
					0.05	0.01
Model	6	7781.71	1296.95	25.13**	2.57	3.81
Error	21	1084.00	51.62			
Corrected Total	27	8865.71				

CV. = 8.69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ผ.7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าการนำไฟฟ้าของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 ที่เก็บรักษาด้วยวิธีธรรมชาติ

Source	df	SS	Ms	F	F Table	
					0.05	0.01
Model	6	32690.33984	5448.38997	19.39**	2.57	3.81
Error	21	5901.6708	281.03194			
Corrected Total	27	38592.01064				

CV. = 17.75539

ตารางที่ ผ.8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 ที่เก็บรักษาด้วยวิธีธรรมชาติ

Source	df	SS	Ms	F	F Table	
					0.05	0.01
Model	6	4397.855543	732.975924	3.08*	2.57	3.81
Error	21	4992.3444	237.730686			
Corrected Total	27	9390.199943				

CV. = 15.24796

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ผ.9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนความงอกของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เร่งอายุ

Source	df	SS	Ms	F	F Table	
					0.05	0.01
Model	7	39196.22	5599.46	139.30**	2.43	3.50
Error	24	964.75	40.20			
Corrected Total	31	40160.97				

CV. = 17.60

ตารางที่ ผ.10 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เร่งอายุ

Source	df	SS	Ms	F	F Table	
					0.05	0.01
Model	7	35936.00	5133.71	55.80**	2.43	3.50
Error	24	2208.00	92.00			
Corrected Total	31	38144.00				

CV. = 22.31

ตารางที่ ผ.11 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าการนำไฟฟ้าของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 เร่งอายุ

Source	df	SS	Ms	F	F Table	
					0.05	0.01
Model	7	268474.6252	38353.5179	91.57**	2.43	3.50
Error	24	10052.3386	148.8474			
Corrected Total	31	278526.9638				

CV. = 8.511442

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ผ.12 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่เร่งอายุ

Source	df	SS	Ms	F	F Table	
					0.05	0.01
Model	7	14455.22380	2065.03197	11.41**	2.43	3.50
Error	24	4342.6288	180.94287			
Corrected Total	31	18797.85260				

CV. = 6.384272

ตารางที่ ผ.13 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนความงอกของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 ที่เร่งอายุ

Source	df	SS	Ms	F	F Table	
					0.05	0.01
Model	7	31751.50	4535.93	95.49**	2.43	3.50
Error	24	1140.00	47.50			
Corrected Total	31	32891.50				

CV. = 15.11

ตารางที่ ผ.14 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 ที่เร่งอายุ

Source	df	SS	Ms	F	F Table	
					0.05	0.01
Model	7	24779.50	3539.93	35.46**	2.43	3.50
Error	24	2396.00	99.83			
Corrected Total	31	27175.50				

CV. = 16.97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ผ.15 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าการนำไฟฟ้าของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 ที่เร่งอายุ

Source	df	SS	Ms	F	F Table	
					0.05	0.01
Model	7	1017731.054	145390.151	148.44**	2.43	3.50
Error	24	23506.649	979.444			
Corrected Total	31	1041237.703				

CV. = 12.26230

ตารางที่ ผ.16 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนการดูดน้ำของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ GC10848 ที่เร่งอายุ

Source	df	SS	Ms	F	F Table	
					0.05	0.01
Model	7	20440.02309	2920.00330	17.10**	2.43	3.50
Error	24	4098.64510	170.77688			
Corrected Total	31	24538.66819				

CV. = 10.57931

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล : นางสาว อภสิรี มีกลาง

เกิดเมื่อ : วันที่ 11 สิงหาคม พ.ศ. 2520

สถานที่เกิด : 680/60 ถ.นิตโย ต.ธาตุเชิงชุม อ.เมือง จ.สกลนคร

ที่อยู่ปัจจุบัน : 554/21 ซ.แฮปปี้แลนด์ ถ.ลาดพร้าว แขวงคลองจั่น เขตบางกะปิ กรุงเทพฯ 10240

การศึกษา :

- ระดับประถมศึกษา โรงเรียนอนุบาลสกลนคร
- ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนสกลราชวิทยานุกูล อ.เมือง จ.สกลนคร
- ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสกลราชวิทยานุกูล อ.เมือง จ.สกลนคร
- ระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการผลิตพืช) คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
- ศึกษาระดับปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่) คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้